



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Facultad de Veterinaria

Departamento de Producción Animal

“Estudio de la variabilidad genética de genes candidatos implicados en la producción láctea en el ganado ovino”

Memoria presentada por

Jose Alejandro Morán Pérez

para optar al grado de Doctor por la Universidad de León

Dirigida por:

Dr. Fermín San Primitivo Tirados

Catedrático del Departamento de Producción Animal

Dr. Juan José Arranz Santos

Profesor Titular del Departamento de Producción Animal

León, Noviembre de 2015

Las investigaciones realizadas en esta Memoria de Tesis doctoral han sido financiadas por el proyecto AGL2002-01413 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).

El autor de esta Memoria ha sido beneficiario de una beca de postgrado de la Universidad de León.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS:

A mis directores de Tesis, Fermín y Juanjo por darme la oportunidad de embarcarme en esta aventura, por vuestro apoyo y por todo el tiempo dedicado.

A mis compañeros de laboratorio, que habéis sido muchos: Bea, Houcine, Susana, Lorena, Laura, Sara, Marta, Elsa, Aroa, Marina, Praveen, Mila. Han sido muchas horas compartidas, hay muchas razones.

Al personal del Departamento de Producción Animal, por la ayuda me habéis prestado.

Al grupo de Bioquímica. Especialmente a Javier, por tu apoyo.

A Carmo, por tu ayuda para “domesticar” el software.

A Cristina, por apoyarme siempre, por tus ánimos.

Al grupo del Instituto de desarrollo ganadero: A Margot, por su ayuda, paciencia y búsqueda constante de la excelencia. A Silvia y Marta por su ayuda y acogida, por ser tan buenas amigas. Marta, donde quiera que estés, un pedacito de tu corazón, que era muy grande, se ha quedado con nosotros.

A mis amigos, los del pueblo, los del solsticio, por estar ahí, siempre disponibles.

A Jesús M^a, por las oportunidades que me has dado, por estar siempre disponible.

A Carlos y Rosa, por esos consejos tan valiosos.

A Isabel, Elena, Urbano, Rebeca, ... la lista es muy larga, por todos vuestros ánimos.

A Sergio, por todo lo que hemos emprendido juntos, por toda tu ayuda.

A mis padres, porque lo habéis dado todo por mí, por todo el apoyo.

A Alicia, mi Alicia, por ser parte de mí, por estar siempre a mi lado, por tu ayuda, tiempo, paciencia y amor. Por todo.

A todos los que me he olvidado, lo he hecho sin querer. El tiempo apremia...

ÍNDICES

CONTENIDOS:

CONTENIDOS:	I
TABLAS:	VI
FIGURAS:	VIII
ABREVIATURAS:	XII
1 Introducción.	1
1.1 Encuadre histórico.	1
1.2 QTLs.	2
1.3 La variabilidad genética.	4
1.3.1 Estudio de la variabilidad génica.	4
1.4 Genes de interés.	7
1.4.1 Oxitocina (OXT).	7
1.4.2 Prolactina (PRL).	8
1.4.3 Receptor de la hormona de crecimiento (GHR).	9
1.4.4 Diacilglicerol aciltransferasa (DGAT).	10
1.4.5 Hormona de crecimiento (GH).	11
1.5 PCR.	14
1.5.1 PCR cuantitativa en tiempo real.	15
1.6 SSCPs.	16
1.6.1 Principios y consideraciones teóricas.	17
1.7 Secuenciación.	22
1.8 Análisis de datos.	23
1.8.1 Análisis de datos de secuenciación.	23
1.9 El problema de las referencias.	23
1.10 Base de datos de experimentos.	24
1.11 Objetivos.	26
2 Materiales.	29
2.1 Muestras de ADN.	29
2.2 Fenotipos.	29
2.3 Kits comerciales.	30
2.4 Termocicladores.	30
2.5 SSCP.	30
2.6 Secuenciadores.	30

2.7	Vectores.....	31
2.8	Células competentes.	31
2.9	Programas empleados.	31
2.9.1	Suite Consed.....	31
2.9.2	Staden.....	32
2.9.3	ClustalX.....	32
2.9.4	Genedoc.....	32
2.9.5	FinchTV.....	32
2.9.6	Vector NTI.....	32
2.9.7	Artemis.....	32
2.9.8	Unipro UGENE.....	32
2.9.9	SnapGene Viewer.....	32
2.9.10	R.....	33
3	Métodos.....	37
3.1	Extracción de ADN de muestras de sangre.	37
3.1.1	Salting Out.....	37
3.2	Extracción de ADN con el Kit NucleoSpin® Plasmid Protocol-at-a-Glance.....	38
3.3	PCR.....	38
3.3.1	Optimización de la PCR.....	39
3.4	ExoSAP-IT®.....	39
3.5	SSCP.....	40
3.5.1	PCR de amplificación del ADN.....	40
3.5.2	Gel de agarosa al 2%.....	40
3.5.3	Preparación del gel de acrilamida.....	41
3.6	Secado de geles de SSCP.....	44
3.7	Clonación.....	44
3.7.1	Clonación de fragmentos de PCR mediante el kit TOPO®-TA cloning.....	44
3.7.2	Recuperación y plaqueado para células normales DH5α.....	47
3.7.3	Recuento de colonias y almacenamiento.....	47
3.7.4	Cultivo “starter” (iniciador).....	47
3.7.5	Minipreps (protocolo de lisis alcalina).....	48
3.8	Protocolo de secuenciación.....	49
3.8.1	PCR de amplificación del ADN.....	49
3.8.2	ExoSAP-IT®.....	49
3.8.3	PCR de secuenciación (2ª PCR).....	50
3.8.4	Precipitación del ADN.....	50
3.8.5	Centrifugación.....	50

3.8.6	Preparación del gel de secuenciación.....	50
3.8.7	Lavado del ADN.....	51
3.8.8	Secado del ADN.....	51
3.8.9	Montaje del gel.....	52
3.8.10	Preparación de las muestras.....	52
3.8.11	Desnaturalización de las muestras.....	52
3.8.12	Carga de las muestras.....	52
3.8.13	Electroforesis.....	52
3.9	Protocolo de análisis de número de copias de GH.....	53
3.9.1	Preparativos.....	53
3.9.2	PCR.....	54
3.9.3	Mezclas.....	55
3.9.4	Creación de las rectas de calibración.....	56
3.10	Análisis de asociación del número de copias del gen GH con caracteres de producción en oveja.....	57
3.10.1	Genotipado del número de copias.....	57
3.10.2	Asociación del número de copias con los caracteres de producción de leche.....	57
3.10.3	Asociación del número de copias con los caracteres de morfología y lactación.....	59
3.10.4	Análisis de asociación.....	61
4	Resultados.....	65
4.1	PCR.....	65
4.2	SSCP.....	68
4.2.1	OXT.....	68
4.2.2	PRL.....	70
4.2.3	GHR.....	73
4.2.4	DGAT1.....	76
4.3	Secuenciación.....	79
4.3.1	OXT.....	79
4.3.2	PRL.....	85
4.3.3	GHR.....	103
4.3.4	DGAT1.....	116
4.3.5	GH.....	119
4.4	RT-PCR.....	130
4.4.1	GH-Taqman-I1-I4.....	130
4.4.2	GLCO-Taqman-E4.....	130
4.4.3	Diseño de una construcción plasmídica de referencia para determinación del número de copias mediante PCR cuantitativa.....	131

4.5	Análisis de asociación del número de copias del gen GH con caracteres de producción en oveja.	136
4.5.1	Introducción.	136
4.5.2	Relación cuantitativa del número de copias con datos de producción.	136
4.5.3	Relación cualitativa del número de copias con datos de producción.	137
4.5.4	Relación cuantitativa del número de copias con datos morfológicos.	139
4.5.5	Relación cualitativa del número de copias con datos morfológicos.	141
4.6	Base de datos de experimentos.	143
4.6.1	Descripción de la base de datos de experimentos.	144
5	Discusión.	163
5.1	Metodología de Laboratorio.	163
5.1.1	PCR.	163
5.1.2	SSCP.	163
5.1.3	Secuenciación.	166
5.2	Variabilidad genética detectada.	168
5.2.1	La inserción 228AAA.	168
5.2.2	Número variable de copias en el gen GH.	168
5.3	Análisis de asociación con caracteres de producción de leche y morfología del animal.	169
5.4	Base de Datos de Experimentos.	169
6	Conclusiones.	181
7	Bibliografía.	185
8	Anexos.	199
8.1	Anexo I. Ayuda de la Base de Datos de Experimentos.	199
8.1.1	Introducción.	199
8.1.2	Experimentos.	200
8.1.3	Datos.	202
8.1.4	PCR.	221
8.1.5	SSCP.	262
8.1.6	Secuenciación.	297
8.1.7	SNPs.	375
8.1.8	Añadir Información.	392
8.1.9	Consultar Información.	394
8.1.10	Herramientas.	403
8.1.11	Tablas.	414
8.1.12	Acerca De La Ayuda.	415
8.2	Anexo II: Soluciones empleadas.	417

8.2.1	Tampones.....	417
8.2.2	Preparación de soluciones para PCR.....	418
8.2.3	Dilución del ADN.	418
8.2.4	Dilución de los cebadores.	419
8.2.5	Gel de agarosa.....	419
8.2.6	Bromuro de Etidio (EtBr).....	419
8.2.7	Gel de acrilamida al 8%.	419
8.2.8	Gel de acrilamida al 12%, con glicerol al 5%.	420
8.2.9	MDE 0,5x.	420
8.2.10	Preparación de la acrilamida Long Ranger XL.	420
8.2.11	Soluciones para tinción con nitrato de plata.	420
8.2.12	Soluciones para la clonación mediante el kit TOPO® TA Cloning.....	421
8.2.13	Medios de cultivo para la clonación.....	421
8.3	Anexo III: El código genético.....	423

TABLAS:

Tabla 1. Ejemplo de cantidades a añadir a la reacción de ligación con vectores habituales.	46
Tabla 2: Diluciones seriadas 1:10 para formar una recta de calibración.	53
Tabla 3. Composición de las PCRs, para cada muestra.	54
Tabla 4. Programa de PCR habitual.	54
Tabla 5: Composición de la mezcla de PCR “comercial” utilizando sondas TaqMan® en monoplex.	55
Tabla 6: Composición de la mezcla de PCR “casera” usando sondas TaqMan® en monoplex.	56
Tabla 7: Composición de la mezcla de PCR “casera” en multiplex.	56
Tabla 8: Fragmentos de PCR.	66
Tabla 9: Condiciones de PCR.	67
Tabla 10: Cebadores empleados para crear los fragmentos del gen de la oxitocina.	68
Tabla 11: Cebadores empleados para crear los fragmentos del gen PRL.	71
Tabla 12: Cebadores empleados para crear los fragmentos del gen GHR.	73
Tabla 13: Cebadores empleados para crear los fragmentos del gen DGAT1.	77
Tabla 14: Listado de SNPs detectados en el fragmento OXI-E2.	81
Tabla 15: Lista de genotipos del fragmento OXI-E2.	82
Tabla 16: Listado de SNPs detectados en el fragmento OXI-E3.	83
Tabla 17: Características encontradas en la secuencia del gen de la oxitocina y neurofisisina.	84
Tabla 18: Listado de SNPs detectados en el fragmento PRL-E1.	86
Tabla 19: Lista de genotipos del fragmento PRL-E1.	87
Tabla 20: Listado de SNPs detectados en el fragmento PRL2-E2.	88
Tabla 21: Listado de SNPs detectados en el fragmento amplificado para GH-I1-I2.	89
Tabla 22: Listado de SNPs detectados en el fragmento PRL-I4.	92
Tabla 23: Diferencias entre la secuencia obtenida para el fragmento PRL-I4 y la de su referencia.	93
Tabla 24: Listado de fragmentos de PCR alternativos diseñados para amplificar los intrones de la prolactina.	93
Tabla 25: Diferencia entre la secuencia obtenida para el fragmento PRL-E5.1 y la de su referencia.	94
Tabla 26: Listado de SNPs detectados en el fragmento PRL-E5.2.	95
Tabla 27: Diferencia entre la secuencia obtenida para el fragmento PRL-E5.2 y la de su referencia.	95
Tabla 28: Lista de genotipos del fragmento PRL-E5.2.	95
Tabla 29: Lista de genotipos del fragmento GHR-E3.	106
Tabla 30: Diferencia entre la secuencia obtenida para el fragmento GHR-E3 y la de su referencia.	106
Tabla 31: Listado de SNPs detectados en el fragmento GHR-E4.	108
Tabla 32: Lista de genotipos del fragmento GHR-E4.	108
Tabla 33: Listado de SNPs detectados en el fragmento GHR-E5.	109
Tabla 34: Lista de genotipos del fragmento GHR-E5.	109
Tabla 35: Lista de genotipos del fragmento GHR-E6.	111

Tabla 36: Listado de SNPs detectados en el fragmento GHR-E5.....	112
Tabla 37: Lista de genotipos del fragmento GHR-E7.....	112
Tabla 38: Listado de SNPs detectados en el fragmento GHR-E5.....	116
Tabla 39: Lista de genotipos del fragmento GHR-E7.....	116
Tabla 40: Lista de genotipos del fragmento DGAT1-E8.....	117
Tabla 41: Listado de SNPs detectados en el fragmento GH-I1-I4.....	122
Tabla 42: Listado de inserciones detectadas en el fragmento GH-I1-I4.	122
Tabla 43: Listado de SNPs detectados en el exón 2 del gen GH.....	123
Tabla 44: Listado de SNPs detectados en el exón 3 del gen GH.....	123
Tabla 45: Características del SNP detectado en el exón 4 del gen GH.....	124
Tabla 46: Cebadores internos utilizados para secuenciar el espacio intergénico del gen GH.	128
Tabla 47: Listado de SNPs detectados en el fragmento GH2.	129
Tabla 48: Valor P de la relación entre el número de copias y cada carácter productivo.	137
Tabla 49: Coeficiente de correlación de los modelos para carácter de producción....	138
Tabla 50: Efectos del número de copias del gen GH en los distintos caracteres de producción de leche.	138
Tabla 51: Resultados de la asociación lineal entre el número de copias del gen GH y caracteres morfológicos.	139
Tabla 52: Valor P de la relación entre el número de copias y cada carácter morfológico.	141
Tabla 53: Coeficiente de correlación y modelos para carácter morfológicos.....	142
Tabla 54: Efectos del número de copias del gen GH en los distintos caracteres morfológicos.	142
Tabla 55: Mutaciones detectadas en el fragmento GHR-E4.	166
Tabla 56: Traducciones en formato de la base de datos. 3 letras.....	175
Tabla 57: Traducciones en formato de la base de datos. 1 letra.	175
Tabla 58. Composición del caldo Luria-Bertani (LB).....	421

FIGURAS:

Figura 1: Papel de la DGAT en el metabolismo de glicolípidos.	11
Figura 2: Esquema del principio del SSCP.	18
Figura 3: Molécula de acrilamida.	19
Figura 4: Cromatograma típico mostrando una posición polimórfica.	23
Figura 5: Esquema de un programa habitual de PCR.	39
Figura 6: Esquema del programa ExoSAP-IT	39
Figura 7: Distintos geles de SSCP.	42
Figura 8: Extracción de datos de los geles de acrilamida.	43
Figura 9: Esquema de una bomba de vacío hidráulica e instrucciones de manejo.	48
Figura 10: Segunda PCR de secuenciación.	50
Figura 11: Esquema del montaje de los cristales.	51
Figura 12: Inyección del gel.	51
Figura 13: Forma habitual de preparación de muestras y rectas de calibración.	54
Figura 14: Creación de rectas de calibración.	56
Figura 15: Esquema de la colocación de los elementos estudiados en el gen de la oxitocina.	68
Figura 16: Patrones generales del gen de la oxitocina.	69
Figura 17: Patrones encontrados para el gen OXT.	69
Figura 18: Esquema de los fragmentos analizados del gen PRL.	70
Figura 19: Patrones generales del gen de la prolactina.	71
Figura 20: Patrones detectados para el gen de la Prolactina.	72
Figura 21: Esquema de los fragmentos amplificados en el gen GHR.	74
Figura 22: Patrones generales del gen del receptor de la hormona del crecimiento.	74
Figura 23: Patrones electroforéticos encontrados para el gen del receptor de la hormona de crecimiento.	76
Figura 24: Esquema, a escala, del gen DGAT1.	76
Figura 25: Esquema, a escala, de la colocación de los cebadores en los exones centrales del gen DGAT1.	77
Figura 26: Posición de los cebadores utilizados para estudiar por SSCP el exón 8.	78
Figura 27: Patrones electroforéticos encontrados para fragmento DGAT1-E8/2.	78
Figura 28: Esquema del fragmento OXI-E1.	79
Figura 29: Esquema del fragmento OXI-E2.	80
Figura 30: Comparación de la secuencia del fragmento OXI-E2 con su referencia.	80
Figura 31: Electroferograma del extremo distal del fragmento OXI-E2.	81
Figura 32: Esquema del fragmento OXI-E3.	82
Figura 33: Esquema del gen OXT.	84
Figura 34: Inserción heterocigota TCCC.	85
Figura 35: Esquema del gen de la Prolactina.	85
Figura 36: Esquema del fragmento PRL-E1.	86
Figura 37: Esquema del fragmento PRL2-E2.	87
Figura 38: Esquema del fragmento PRL-I1-I2.	89
Figura 39: Esquema del fragmento obtenido usando los cebadores PRL-I1 UP y PRL-I2 DN.	89
Figura 40: Esquema del fragmento PRL2-E3.	90

Figura 41: Alineamiento del cebador PRL2-E3 UP con las variantes C y A del exón 3 de la prolactina.	90
Figura 42: Esquema del fragmento PRL-I3.	91
Figura 43: Esquema del fragmento PRL2-E4.	91
Figura 44: Esquema del fragmento PRL-I4.	92
Figura 45: Esquema del fragmento PRL-E5.	93
Figura 46: Esquema del fragmento PRL-E5.1	94
Figura 47: Esquema del fragmento PRL-E5.2.	95
Figura 48: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos corta y larga del ARNm de la prolactina.	96
Figura 49: Alineamiento de los esquemas de las secuencias larga y corta del ARNm de la prolactina.	96
Figura 50: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos corta y larga del ARNm de la prolactina.	97
Figura 51: Predicción del péptido señal para las formas corta y larga de la prolactina.	97
Figura 52: Alineamiento de los esquemas de las secuencias larga y corta del ARNm de la prolactina. Se muestran las regiones encontradas.	98
Figura 53: Ampliación de las secuencias repetidas de la forma larga de la prolactina.	98
Figura 54: Predicción del plegamiento del ARNm de la estructura presente en la forma larga de la prolactina.	99
Figura 55: Ampliación de la zona de secuencias repetidas de la forma corta de la prolactina.	99
Figura 56: Predicción del plegamiento del ARNm de la estructura presente en la forma larga de la prolactina.	99
Figura 57: Alineamiento de la secuencia de la forma larga del ARNm de la prolactina con la inversa de la secuencia corta.	100
Figura 58: Esquema del alineamiento mediante Blast de la estructura de la forma larga.	100
Figura 59: Listado detallado de los alineamientos de la estructura encontrada en la forma larga de la prolactina.	101
Figura 60: Árbol filogenético de la secuencias que alinean con la estructura de la forma larga de la prolactina.	102
Figura 61: Esquema del gen GHR.	103
Figura 62: Esquema del fragmento GHR-E1 diseñado.	103
Figura 63: Esquema de la construcción quimérica empleada para diseñar la PCR del exón 2 del gen GHR.	104
Figura 64: Esquema del fragmento GHR-E3	105
Figura 65: Electroferogramas que muestran la detección de una inserción en el fragmento GHR-E3.	105
Figura 66: Esquema de discrepancias de GHR-E3.	106
Figura 67: Esquema del fragmento GHR-E4	107
Figura 68: Esquema de discrepancias de GHR-E3.	107
Figura 69: Esquema del fragmento GHR-E5	108
Figura 70: Esquema del fragmento GHR-E6 secuenciado	110
Figura 71: Electroferogramas del extremo 3' del fragmento GHR-E6.	110
Figura 72: Esquema de la formación de las mutaciones de GHR-E6.	111
Figura 73: Esquema del fragmento GHR-E7	112

Figura 74: Esquema del fragmento GHR-E8.....	113
Figura 75: Esquema de posicionamiento de los cebadores empleados para secuenciar GHR-E10.....	114
Figura 76: Esquema del exón GHR-E10.	115
Figura 77: Electroferogramas de dos muestras que presentan las secuencias con la inserción AAA.	117
Figura 78: Alineamiento de las secuencias alternativas del fragmento DGAT1-E8/2.	118
Figura 79: Alineamiento de las traducciones de las 2 variantes del exón 8 ovino con las homólogas en bovino.	118
Figura 80: Esquema del gen GH.....	119
Figura 81: Esquema del gen GH con cebadores de secuenciación.	119
Figura 82: Esquema de la construcción quimérica empleada para diseñar el fragmento GH2-5'2-3'.	120
Figura 83: Esquema del fragmento amplificado con los cebadores de GH2-5'2-3'.....	121
Figura 84: Esquema del fragmento GH-I1-I4.....	122
Figura 85: Esquema del fragmento GH- I1-I4.....	122
Figura 86: Organización de los genes relacionados con la hormona de crecimiento en oveja y cabra.....	124
Figura 87: Predicción de la secuencia del espacio intergénico de GH.	125
Figura 88: Esquema de la región intergénica del gen GH.	127
Figura 89: Esquema del fragmento GH2.	129
Figura 90: Esquema del gen GH-Taqman-I1-I4.....	130
Figura 91: Esquema del gen GLCO.	131
Figura 92: Vector TopoGH-I1-I4.	132
Figura 93: Vector TopoGLCO.....	132
Figura 94: Sitio de clonación múltiple del vector pBluescript II KS (pBKS) y enzimas de la 2ª fase.....	133
Figura 95: Vector pBKS II + SacEcoRVGH-I1-I4.	133
Figura 96: Sitio de clonación múltiple del vector pBluescript II KS (pBKS) y enzimas de la 3ª fase.....	134
Figura 97: Construcción plasmídica de referencia para un experimento de PCR cuantitativa.....	134
Figura 98: Estrategia de obtención de una construcción plasmídica de referencia para determinar el número de copias del gen de la hormona de crecimiento:	135
Figura 99: Resultados de la asociación del número de copias con los caracteres de producción de leche. Gráfico de validación de resultados.	136
Figura 100: Resultados de la asociación del número de copias con los caracteres de morfología y lactación. Gráfico de validación de resultados	140
Figura 101: Arquitectura de la base de datos.	143
Figura 102: Esquema del diagrama de la base de datos.	145
Figura 103: Diagrama de la base de datos, coloreado.	146
Figura 104: Diagrama de la base de datos.	147
Figura 105: Mitad izquierda del diagrama de la base de datos.	148
Figura 106: Mitad derecha del diagrama de la base de datos.	149
Figura 107: Botones de clonación de protocolos de PCR..	152
Figura 108: Esquema del almacenamiento de secuencias en la base de datos.	154
Figura 109: Tabla de genotipado del fragmento OXI-E2.....	155

Figura 110: Genotipado de patrones definitivo.	156
Figura 111: Genotipado de patrones.....	157
Figura 112: Esquemas de plegamiento del fragmento DGAT-E8/2.....	164
Figura 113: Esquemas de plegamiento del fragmento OXI-E2.....	165
Figura 114: Traducción realizada por Artemis.....	173
Figura 115: Traducción realizada por Unipro UGENE.....	173
Figura 116: Traducción realizada por SnapGene Viewer.	174
Figura 117: Traducción realizada por Genome Compiler.....	174
Figura 118: Secuencia reversa complementaria generada por Genome compiler.....	174
Figura 119: Ejemplo del efecto de una inserción sobre la posición de las características.	176
Figura 120: Ejemplo del sistema de almacenamiento de una inserción en la base de datos.	176
Figura 121: Evolución del recuento de trabajos publicados sobre SSCP.....	178

ABREVIATURAS:

Abreviatura	Significado.
aa	aminoácidos.
cDNA	ADN complementario.
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico.
ARNm	ARN mensajero.
ARNt	ARN de transferencia.
APS	Persulfato amónico.
cM	centimorgans; unidad de distancia genética entre dos <i>loci</i> .
C_t	Ciclo umbral. Ciclo fraccional de PCR al cual se observa un valor umbral predefinido (Ruijter et al., 2009).
dATP	Desoxiadenosina trifosfato.
dCTP	Desoxicitidina trifosfato.
dH₂O	Agua destilada.
ddH₂O	Agua doblemente destilada.
DGAT	Acil CoA:DiacilGlicerol Acetil Transferasa (DGAT, EC 2.3.1.20).
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato.
dsDNA	ADN de cadena doble.
dTTP	Desoxitimidina trifosfato.
EBV	Mérito genético estimado. Del inglés “Estimated breeding value”.
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético.
Endo H	Endoglicosidasa H. Hidroliza N-glicanos de tipo manosa de glicoproteínas.
EtBr	Bromuro de etidio. Un agente intercalante (cancerígeno) que emite fluorescencia al ser irradiado con luz ultravioleta. Se usa para visualizar el ADN en geles de agarosa.
FERM	Dominio proteico de unos 150 aminoácidos localizado usualmente en las proteínas de unión al citoesqueleto que se encuentran entre la interface entre la membrana plasmática y el citoesqueleto.
GH	Hormona de crecimiento. Del inglés “Growth Hormone”.
GHR	Receptor de la hormona de crecimiento. Del inglés “Growth Hormone Receptor”.
IGF-1	Factor semejante a la insulina I. Del inglés “Insulin-like Growth Factor I”.
JAK2	JAnus Kinasa 2.
MDE	Gel mejorado para detección de mutaciones. Del ingles “Mutation Detection Enhancement gel”.
MNP	Polimorfismos de múltiples nucleótidos. Del inglés “Multi-Nucleotide Polymorphism”.
NCBI	Centro Nacional (de Estados Unidos) de Información Biotecnológica. Del inglés <i>Nacional Centre for Biotechnology Information</i> .
OXT	Gen de la oxitocina y la neurofina.

Abreviatura	Significado.
pb	Par de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PRL	Prolactina.
QTL	Locus para carácter cuantitativo. Del inglés “Quantitative Trait Locus”.
QTN	Nucleótido para carácter cuantitativo. Del inglés “Quantitative Trait Nucleotide”.
RT-PCR	PCR en tiempo real.
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido. Del inglés “Single Nucleotide Polymorphism”.
SQL	Lenguaje estructurado de consultas. Del inglés “Structured Query Language”.
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena simple. Del inglés “Single Strand Conformation Polymorphism”.
ssDNA	ADN de cadena simple.
SIL	Sistema Informático de Laboratorio.
SINE	Elementos repetitivos intercalados cortos. Del inglés “Short-INTerspersed repetitive Elements”.
STR	Repetición corta en tándem. Del inglés “Short Tandem Repeats”.
TAE	Tampón Tris-Acetato EDTA (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA).
TBE	Tampón Tris-Boro-EDTA.
TBE	Tampón Tris-Borato EDTA.
TE	Tampón Tris-EDTA. Los subíndices de cada letra indican la concentración del compuesto al que representa. Así T ₁₀ E ₁ significa Tris 10 mM, EDTA 1 mM.
TEMED	N,N,N',N' tetrametilendiamina.
TGE	Tampón Tris Glicina EDTA (25 mM Tris, 250 mM glicina, 1 mM EDTA).
Tm	Temperatura de fusión. Del inglés “Melting temperature”.
VNTR	Repetición en tándem en número variable.

INTRODUCCIÓN

1 Introducción.

1.1 Encuadre histórico.

Una de las agrupaciones corporativas más importantes de Europa durante la época medieval fue la Mesta: una asociación de pastores organizados para utilizar eficientemente los diferentes ecosistemas de la península ibérica. Esta organización trazó un imbricado sistema de vías de comunicación que permitía aprovechar los cálidos forrajes del sur en el frío invierno y, mediante el traslado de los rebaños (trashumancia), guarecerse de los rigores del verano en los frescos pastos del norte. Los animales disponían así de pastos en óptimas condiciones durante todo el año.

En la península, la disponibilidad de pastos adecuados durante todas las estaciones del año permitió desarrollar un entramado social y político que protegió a la Mesta durante más de un milenio (Díez Navarro, 1731). Durante todo este tiempo se siguieron unas normas de selección que permitió desarrollar una de las razas ovinas mejor adaptadas al entorno: la raza merina. A grandes rasgos, el programa consistía en seleccionar como reproductores a los mejores ejemplares de cada camada y en proteger el patrimonio genético.

La simplicidad del "programa" de selección no repercutió en su éxito, sino en el tiempo empleado (un milenio).

Hoy en día, es deseable obtener los resultados de la selección en el menor espacio de tiempo posible. Se pretende la consecución de los objetivos minimizando la cantidad de ciclos de selección. Cuando se introduce la variable tiempo en un programa de selección, no es razonable esperar a que el azar manifieste un fenotipo mejorado que sea estable a lo largo de las generaciones (heredable). Es necesario conocer la información genética subyacente para tomar las decisiones de selección que produzcan el resultado lo más rápidamente posible. Dado que nuestro conocimiento de genética molecular implicada en la mayoría de los caracteres productivos se reduce a unos pocos QTNs (García Gámez, 2012; Rahmatalla et al., 2011; Winter et al., 2002) es necesario poner las bases para la detección de aquellas mutaciones que nos permitan inferir la participación de los QTLs estudiados en los caracteres conocidos.

El conocimiento de la variabilidad genética de la población permite afinar y acelerar el desarrollo de los programas de mejora genética actualmente vigentes. En un futuro, esta información podrá ser clave para que los ingenieros genéticos desarrollen genotipos de interés, aun cuando no se encuentren disponibles en la naturaleza, mediante la compilación y combinación de información genética disponible. En cualquier caso, detectar la mayor cantidad de variabilidad permitirá conservarla antes de que desaparezca debido a la especialización de las producciones.

Desde los años 70 se están aplicando programas de mejora genética a diferentes especies ovinas, como la raza churra, tendentes a mejorar la calidad de las poblaciones y la rentabilidad de las explotaciones.

“Cuando la variable que se desea mejorar presenta una heredabilidad baja o media o cuando el tipo de producción es específico de uno de los sexos, como ocurre con la producción de leche, se aplica una selección combinada, basada en la valoración de sementales por descendencia. Este tipo de selección, aplicada al ganado vacuno durante décadas, ha producido incrementos espectaculares en la producción de leche de algunas razas, entre las que destaca la Frisona. El ganado ovino, con una mayor

diversidad racial, sistemas de explotación más extensivos y organización más deficiente, presenta una mayor dificultad para la aplicación de mejora genética.

Los programas de selección tradicionales suelen ofrecer respuestas bajas, de forma que el incremento productivo sufre modificaciones pequeñas año tras año. Por otra parte, la valoración genética de un semental requiere un periodo próximo a los cuatro años, aunque se realice únicamente en las primeras lactaciones de sus hijas, lo que impone un intervalo generacional alto. La presión económica que, con carácter general, sufre el sector primario hace necesario buscar alternativas de mejora que permitan un incremento productivo, un menor intervalo generacional y unos gastos de organización asumibles para los ganaderos” (Marqués Martínez, 1999).

“Durante años se han buscado alternativas a los programas clásicos de mejora. La mayor parte de estas alternativas se han buscado en la utilización de marcadores (caracteres morfológicos, grupos sanguíneos, polimorfismos bioquímicos, polimorfismos de ADN) estrechamente ligados con los genes responsables de los caracteres productivos (“Quantitative Trait Loci” o QTLs), con objeto de aplicar una selección asistida por marcadores” (Adaptado de Marqués Martínez, 1999).

El proyecto Genoma Humano constituye un gran avance para la biología molecular y, a su vez, marca el punto de partida de una nueva forma de abordar los programas de selección. En los últimos años se está produciendo un notable auge de la secuenciación de genomas completos de multitud de especies. El número de genomas completados no hace más que aumentar a la vez que se mejoran las técnicas de secuenciación de genomas y disminuyen drásticamente sus costes. Parece claro que estamos asistiendo al inicio de una nueva época donde se podrá abordar la secuenciación de genomas completos de individuos en tiempos muy razonables y con un coste asequible. Con estas condiciones, la falta de información sobre las secuencias de los individuos no será, nunca más, un problema. Al contrario, el mayor problema será organizar todo el torrente de información de forma que resulte útil al objetivo que se persiga.

No sería descabellado pensar en un futuro de los programas de selección en los que se pudiese secuenciar el genoma completo de cada macho mejorante. El valor genético obtenido sería totalmente exacto. Pero, para ello, es necesario haber identificado previamente las fuentes de variabilidad responsables de los QTLs.

1.2 QTLs.

Durante los últimos 15 años han aparecido multitud de trabajos señalando la identificación de QTLs en ganado productor de leche. La mayoría de ellos refiriéndose a ganado vacuno. Dado la enorme similitud entre el genoma vacuno y el ovino, muchos de los datos obtenidos en una especie son extrapolables a la otra. Khatkar et al., 2004, hicieron una revisión de 55 trabajos publicados que identifican QTLs en ganado vacuno. La misma información, ampliada y actualizada puede consultarse en el sitio web¹ que crearon para consultar y corregir los datos del trabajo (Costa et al., 2008). Aunque se encuentra alguna evidencia de QTLs para caracteres productivos en todos los autosomas vacunos, destacan notablemente los cromosomas 6, 14 y 20.

Se detectaron QTLs que afectan a la producción de leche en 20 de los 29 autosomas vacunos. Especialmente en el cromosoma 6 donde puede haber un QTL cerca del centrómero, que explica el 4,18 % de la varianza fenotípica total, y otro más distante,

¹ http://www.vetsci.usyd.edu.au/reprogen/QTL_Map/

que explica el 3,63 % de dicha varianza. Uno de estos QTLs de producción de leche podría estar relacionado con el complejo génico de las caseínas. También hay fuertes evidencias de QTLs en los cromosomas 1, 3, 9 y 20. El QTL del cromosoma 20 ha mostrado un efecto de sustitución alélica de 308 kg (de desviación de la producción de las hijas) en el trabajo de Arranz et al., 1998, y de 342 kg en el de Georges et al., 1995. Este QTL ha sido relacionado con la mutación F279Y del exón 8 del gen del receptor de la hormona de crecimiento (GHR) por Blott et al., 2003. Estos mismos autores dejan abierta la posibilidad de otro QTL actuando en las proximidades del descrito.

Hay fuertes evidencias de QTLs para porcentaje y producción de proteína en los cromosomas 3, 6 y 20. En el centro del cromosoma 6 hay un QTL para porcentaje de proteína con un efecto de sustitución alélica comprendido entre el 0,07 % y el 0,15 %. En dicho cromosoma se ha mapeado otro QTL que afecta a los caracteres porcentaje de proteína, producción de leche y porcentaje de grasa. En el cromosoma 20 se ha identificado un QTL para porcentaje de proteína que se ha mapeado finamente en el receptor de la hormona de crecimiento. En el cromosoma 20 también se ha detectado un QTL para producción de proteína. En la zona centromérica del cromosoma 3 se ha detectado un QTL para porcentaje de proteína. En este cromosoma también se ha detectado otro QTL para producción de proteína cerca del marcador ILSTS96.

Se han encontrado fortísimas evidencias de un QTL que afecta a porcentaje de grasa y producción de grasa en la región centromérica del cromosoma 14. Este QTL fue asociado por Grisart et al., 2001, como un SNP K232A en el gen acilCoA: diacilglicerol aciltransferasa (DGAT1; EC 2.3.1.20²). Este QTL explica el 51 % de la varianza del porcentaje de grasa y el 8 % de la varianza del porcentaje de proteína. La utilización de las secuencias de este QTL para la mejora genética vacuna ha sido patentada (Georges et al., 2009).

También hay importantes evidencias de un QTL para estos 2 caracteres en el cromosoma 3 con un efecto de sustitución alélica del 0,07% para el porcentaje de grasa.

En cuanto a la producción de células somáticas, se han detectado evidencias de QTLs en el cromosoma 18, en el cromosoma 23 (cerca de la zona del complejo mayor de histocompatibilidad bovino), en el cromosoma 8 (cerca de 4 loci de interferón). Se ha intentado relacionar la producción de células somáticas con la susceptibilidad a la mamitis pero, en general, no hay una correspondencia clara entre los QTLs de producción de células somáticas y la mamitis.

También se han estudiado QTLs para conformación, encontrándose en el cromosoma 5 un QTL para estatura, en el cromosoma 6 un QTL para estatura y tamaño, en el cromosoma 23 un QTL para peso vivo. También hay evidencias de otros QTLs, pero los estudios todavía no son demasiado consistentes.

También se ha informado de QTLs para caracteres reproductivos (como la longitud del periodo de gestación, distocia, fertilidad post-parto y abortos), de susceptibilidad a tratamientos veterinarios (todos salvo fertilidad y mamitis), cetosis, mortalidad del ternero y velocidad de ordeño.

² <http://www.expasy.org/enzyme/2.3.1.20>

1.3 La variabilidad genética.

Las variaciones fenotípicas de las poblaciones naturales se deben a la interacción del genotipo de cada individuo con el ambiente al que está expuesto. En poblaciones sometidas a un ambiente controlado, como pueden ser aquellas de las especies ganaderas, cabe esperar que las diferencias fenotípicas sean un reflejo de las genotípicas. La variabilidad genética puede definirse como la existencia de múltiples formas genotípicas para una misma región cromosómica.

El genotipo de un individuo es la combinación de ácidos nucleicos que contienen su información hereditaria. La información contenida en el genotipo está expuesta a procesos de mutación que pueden modificarla de formas diversas. Si tales cambios se traducen en modificaciones fenotípicas, y los nuevos fenotipos producen eficacias biológicas diferenciadas a los individuos que las portan, las mutaciones pueden generar un cambio en las frecuencias génicas de la población a través del proceso de selección.

En las poblaciones ganaderas el principal factor de selección es la idoneidad productiva de los fenotipos. Hasta fechas relativamente recientes la selección de estas poblaciones radicaba exclusivamente en el criterio del ganadero. Incluso hoy en día es el principal agente de selección. La selección se solía hacer mediante el simple procedimiento de dejar para padres a los hijos de los mejores individuos. Con este sistema se suele lograr un incremento productivo a largo plazo, basado en ensayo y error, ya que los hijos de padres mejorantes pueden ser más, menos o igual de productivos que sus progenitores. El desconocimiento del genotipo del animal restringe los elementos de evaluación únicamente al terreno de la comparación de fenotipos. El proceso descrito conlleva, además, una reducción de la variabilidad genética. Se pierden alelos poco productivos sin ni siquiera saber de su existencia.

Durante la última mitad del siglo XX, en España, el criterio de selección más importante fue la cantidad. Así se seleccionaron genes que incrementaron la producción de leche en las razas lecheras y la de kilos de carne en aquellas con aptitud cárnica. Con la saturación de los mercados y los incrementos en las exigencias de calidad por parte de los consumidores, el interés de los mejoradores ha virado hacia potenciar la calidad de los productos, la manejabilidad de los animales y la intensificación de las explotaciones.

Un estudio genético de las poblaciones ganaderas permitiría obtener datos que ayuden en el proceso de selección y aceleren el de evaluación. Estos datos podrían, además, ser reutilizados si los criterios de selección cambiasen.

Tales datos no pueden ser otros que la descripción de la variabilidad de las poblaciones naturales tanto cuantitativamente como cualitativamente.

Las fuentes de variabilidad son muchas. Cubren el rango que va desde cambios en el número de copias del genoma hasta mutaciones puntuales de un solo nucleótido. Los polimorfismos han sido identificados como SNPs, MNPs, INDELS (inserciones-delecciones) y STRs (Liew et al., 2005). La duplicación y la delección de genes son variaciones genómicas que pueden afectar a la función proteica y al fenotipo.

1.3.1 Estudio de la variabilidad génica.

Se han utilizado varias aproximaciones experimentales y sistemas genómicos especializados para aislar haplotipos de loci individuales. Por ejemplo: extracción de cromosomas idénticos-por-descendencia vía cruces controlados, uso de tejido

haploides o fases haploides de ciclos de vida haplo-diploides, uso de marcadores genéticos ligados a sexo y clonado de productos de PCR (Orti et al., 1997).

Las técnicas que hemos elegido para el estudio de la variabilidad se describen en los apartados siguientes.

1.3.1.1 SSCP.

Es una técnica relativamente simple que únicamente produce información de la variabilidad de una población (ver “1.6 SSCP”, pág. 16, para una descripción más profunda de la técnica). El resultado del SSCP es el patrón de bandas característico para el fragmento delimitado por los cebadores de PCR en el animal en estudio. En principio, este patrón produce información utilizable cuando se compara con otros patrones de la población objeto de estudio. De esta forma se identifican los animales que muestran los mismos patrones electroforéticos. La variabilidad de estos patrones suele corresponderse con variabilidad genotípica. Sin embargo es necesario un segundo método de determinación para confirmar dicha variabilidad.

El análisis por SSCP es más simple y menos laborioso que la clonación directa. Es capaz de detectar variantes con baja eficiencia de amplificación. Por ello, se usa el análisis de SSCP para detectar la variabilidad. La variabilidad detectada se estudia más profundamente mediante otros métodos más informativos, como la secuenciación.

1.3.1.2 Secuenciación.

La secuenciación es la técnica más informativa de cuantas se emplean en biología molecular. La posibilidad de reproducir exactamente el código genético contenido en un polinucleótido brinda al investigador la certeza de disponer de la información que la molécula almacena. Hay un largo trecho entre poder leer la secuencia y entender su significado biológico. No obstante, disponer de una buena lectura facilita mucho el trabajo del investigador y ahorra mucho tiempo de preparación de los resultados.

En la búsqueda de variabilidad conviene entender claramente las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos. Así se perfilará una clara idea de sus posibilidades y de sus limitaciones. Debe quedar claro que las técnicas de secuenciación son subsidiarias de la PCR. Requieren partir de una enorme cantidad de copias del fragmento en estudio. Estas pueden ser obtenidas por PCR o por clonación y purificación del ADN. El segundo paso, cuando se dispone de suficiente material genético, consiste en realizar una PCR especial encaminada a obtener cantidades similares de fragmentos incompletos de todas las longitudes posibles, marcados de forma distinta según el nucleótido 3' en que concluyan.

Como en esta Memoria solo se ha empleado la técnica de los dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente, será la que se explique en profundidad.

1.3.1.2.1 Técnica de los dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente.

El almacenamiento de la información hereditaria en moléculas de ADN no es un evento casual sino que se debe a lo idóneo de sus propiedades químicas. El ARN comparte todas esas propiedades con el ADN salvo una: la estabilidad química. Por eso no es un almacén permanente de información. Esta inestabilidad se produce debido a la alta reactividad del grupo hidroxilo (OH) del segundo carbono del azúcar ribosa. El DNA carece de este grupo OH y en su lugar tiene un hidrógeno (H) que forma un enlace muy estable con su carbono. El ADN está compuesto, por tanto, por unidades de desoxinucleótidos. Ambas moléculas muestran un grupo OH en el tercer carbono

del anillo de ribosa pero este se neutraliza rápidamente durante la polimerización ya que es el lugar donde se establece el enlace con el grupo fosfato del siguiente nucleótido. Se puede sintetizar químicamente otro tipo de nucleótido, el didesoxinucleótido, que carece también de este segundo grupo OH en el tercer carbono. Los didesoxinucleótidos incorporados a una cadena son incapaces de continuar la polimerización pues no tienen ningún grupo OH libre. Su incorporación representa la detención de la reacción de polimerización. Como estos didesoxinucleótidos son indistinguibles para la polimerasa de los desoxinucleótidos, se incorporan sin problemas en el lugar que le corresponde al desoxinucleótido complementario al de la cadena molde. Como cada uno de los 4 tipos de didesoxinucleótido está marcado con un fluorocromo distinto, las cadenas de ADN sintetizadas adquieren todas las longitudes posibles y las cadenas de la misma longitud estarán marcadas con el mismo color, que se corresponderá con la secuencia complementaria de la cadena molde sobre la que se haya hecho la reacción de secuenciación. Basta con una electroforesis con suficiente sensibilidad como para diferenciar fragmentos de un nucleótido de longitud para poder obtener, ordenada, la secuencia de nucleótidos de un fragmento.

1.3.1.2.2 Análisis de las secuencias.

Los métodos de análisis de secuencias están condicionados por el objetivo de dicho análisis. La calidad de la secuenciación puede variar mucho según una larga lista de parámetros, entre los que destacan: el secuenciador, la química utilizada, la secuencia molde, la complementariedad de los cebadores, la limpieza del ADN, la posición de cada nucleótido en la secuencia, la presencia de estructuras repetitivas y la presencia de inhibidores. El primer paso del análisis de secuencias debe ser la limpieza del archivo producido por el secuenciador.

Conviene establecer los límites mínimos de calidad para admitir una secuencia. Por fortuna, el programa Phred (Ewing and Green, 1998; Ewing et al., 1998) puede analizar los electroferogramas y establecer, en virtud a unos parámetros predefinidos, unos índices de calidad de secuencia completamente objetivos:

$$Q = -10 \log_{10} P$$

en donde,

Q: índice Phred o índice de calidad de secuencia.

P: probabilidad de error.

Es ampliamente aceptado que una buena calidad de secuenciación se obtiene con un índice Phred igual o superior a 20 (probabilidad de base incorrecta, 1:100, es decir, un 99% de precisión en la inclusión de una base) y que no deberían admitirse secuencias con menos de 15 puntos.

1.3.1.3 Detección de SNPs.

El procedimiento habitual de detección de SNPs es alinear las secuencias nucleotídicas de un grupo de individuos lo suficientemente variado. Resulta muy fácil producir un informe de aquellas posiciones que difieren de la secuencia consenso.

Esta información en sí misma tiene muy poca utilidad práctica. El estudio de los SNPs consiste en la inferencia de la importancia de las mutaciones detectadas. Aunque cualquier posición puede ser importante dado que puede constituir una señal para los

sistemas de regulación celulares, se considera que las mutaciones que afectan a la fase de lectura, a la secuencia de los exones o las posiciones reguladoras aguas arriba del inicio de transcripción son más propensas a producir cambios fenotípicos en los organismos.

El resultado de la secuenciación de un producto de PCR debe ser comprobado para confirmar que se han amplificado las regiones de interés. Para identificar secuencias desconocidas se alinean contra las bases de datos públicas mediante el algoritmo Blast (Altschul et al., 1990). Esta tarea, que computacionalmente hablando es carísima, se ve facilitada por el enorme grado de refinamiento de este algoritmo y porque los cálculos se realizan en poderosísimos servidores, de forma que el investigador puede utilizar cualquier navegador de internet para enviar las secuencias a alinear y solo tiene que esperar unos minutos para obtener los resultados.

Por comparación de secuencias se identifican las regiones ya descritas y las regiones altamente conservadas. Estas últimas suelen tener una mayor importancia evolutiva y las mutaciones que albergan son, a priori, más interesantes para el estudio. Sin embargo, la mayoría de cambios se registran en regiones sin importancia evolutiva, fisiológica ni reguladora.

Muchas de las mutaciones en secuencia no codificantes ni reguladoras son silentes, no hay diferencias entre los individuos portadores y los salvajes. Aun así, todas las mutaciones pueden constituirse, a través de las tasas de cambio, en relojes moleculares que informen de la historia evolutiva de la especie.

1.4 Genes de interés.

1.4.1 Oxitocina (OXT).

Es una hormona segregada desde la hipófisis posterior que ayuda al aporte de leche desde las glándulas mamarias hasta el pezón durante la succión y ayuda al parto del recién nacido al término de la gestación (Guyton and Hall, 1996a). Estimula poderosamente la contracción del útero grávido, sobre todo hacia el final de la gestación siendo, por ello, la responsable del parto. En relación con la lactación, la oxitocina promueve la movilización de la leche desde los alveolos hacia los conductos para que el recién nacido la obtenga al mamar.

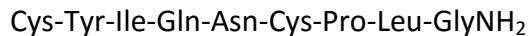
La leche se secreta constantemente a los alveolos, pero no pasa fácilmente desde los alveolos al sistema ductal. Para que el lactante la reciba, la leche tiene que ser impulsada desde los alveolos a los conductos galactóforos.

Los impulsos sensoriales de la succión del lactante son transmitidos por los nervios somáticos hasta la médula espinal y luego al hipotálamo. Estimulan a las neuronas oxitócicas de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo para que liberen oxitocina en la hipófisis posterior. La oxitocina es transportada por la sangre hasta las mamas donde hace que se contraigan las células mioepiteliales que rodean exteriormente a la pared de los alveolos. Así, la leche pasa a los conductos.

La oxitocina se sintetiza principalmente en los núcleos paraventriculares del hipotálamo y posteriormente es transportada junto con proteínas “portadoras” denominadas *neurofisinas*, hasta las terminaciones nerviosas situadas en la hipófisis posterior, empleando en el viaje varios días. Cuando los impulsos nerviosos se transmiten a lo largo del núcleo paraventricular la hormona es liberada por exocitosis de los gránulos secretores de las terminaciones nerviosas a los capilares adyacentes.

Se excretan conjuntamente tanto la neurofisiina como la hormona pero, dado que su unión es laxa, la hormona se separa inmediatamente. Las neurofisinas no tienen una función conocida una vez que abandonan los terminales nerviosos.

La oxitocina es un polipéptido de 9 aminoácidos con una secuencia aminoacídica muy similar a la vasopresina:



1.4.2 Prolactina (PRL).

Es una hormona sintetizada por las células lactotropas de la hipófisis anterior que estimula el desarrollo de la glándula mamaria, fomentando el desarrollo de los conductos galactóforos, y la producción de leche (Guyton and Hall, 1996b). Esta hormona se ha asociado con más de 300 funciones biológicas implicadas en reproducción, osmorregulación, desarrollo y crecimiento, metabolismo de carbohidratos y lípidos e inmunorregulación (Blanco-Favela et al., 2012; Mathey et al., 2009). Su principal interés productivo es estimular la secreción de leche.

En humanos la concentración de esta hormona se eleva constantemente desde la quinta semana del embarazo hasta alcanzar una concentración de 10 a 20 veces su valor inicial, en el momento del nacimiento. Sin embargo, la glándula mamaria no segrega leche debido a los efectos inhibidores de los estrógenos y la progesterona. Inmediatamente después de nacer cesa la secreción de estrógeno y progesterona por la placenta (al desaparecer esta) y queda libre la prolactina para estimular la producción de leche. Esta producción requiere una secreción de apoyo suficiente por parte de las demás hormonas, pero sobre todo de la hormona de crecimiento, el cortisol, la hormona paratiroidea y la insulina. Gracias a ellas se proporcionan sustratos imprescindibles para la producción de la leche como los ácidos grasos, la glucosa y el calcio. Después del nacimiento, el nivel basal de prolactina vuelve al previo al parto en pocas semanas. Sin embargo, cada vez que la madre amamanta se produce un aumento de secreción de prolactina de entre 10 a 20 veces. Esta prolactina actúa sobre la glándula de forma que mantiene su producción de leche para los siguientes periodos de lactancia. Si la prolactina deja de producirse, la glándula pierde su capacidad de producir leche en una semana. Para revisión ver Guyton and Hall, 1996b.

La prolactina es una proteína globular de una sola cadena de 99 aminoácidos y 3 puentes disulfuro intramoleculares. La estructura secundaria se caracteriza por la presencia de 4 hélices α . En su formación están implicados aproximadamente la mitad de sus aminoácidos. La estructura terciaria, globular, expone 2 sitios de unión al receptor. La forma principal de la prolactina, sintetizada en la hipófisis, tiene un peso molecular de unos 23 kDa, sin embargo, se encuentran varias isoformas de la hormona con tamaños y actividades distintas: la glucosilada, la macroprolactina y la "big PRL" (Blanco-Favela et al., 2012).

Una molécula de prolactina se une al dominio extracelular de dos receptores de prolactina a través de sendos sitios de unión. Al emparejarse, los receptores de prolactina inician cascadas de fosforilación citoplásmica en las que intervienen factores como JAK2, SOS, RAS, STAT y MAPK. Estos últimos actúan como factores de transcripción del núcleo, modificando la expresión génica. Dímeros de STAT reconocen la secuencia palindrómica "TTCnnnGAA" que está presente en diferentes promotores. Así activan la expresión de diferentes genes. La coordinación de cascadas paralelas de proteín-kinasas y la vía JAK/STAT pueden determinar patrones de expresión de genes

en diferentes tejidos y células como respuesta a la prolactina (Blanco-Favela et al., 2012).

Existen, al menos, dos formas del receptor de la prolactina (PRLR). La secuencia de estas dos formas se diferencia en la presencia o ausencia de un inserto de 39 pb. Cada genoma haploide ovino contiene una sola copia del gen del receptor de la prolactina. La generación de las dos variantes se produce por *splicing* alternativo de un intrón que tiene un único sitio 5' y dos sitios 3' alternativos colocados al inicio y al final de los 39 nucleótidos insertados. Esta organización es general en rumiantes, pero distinta de la de roedores (Bignon et al., 1997). En humanos se encuentran tres formas de este receptor, dos cortas y una larga. La expresión de las dos formas cortas difiere notablemente entre la superficie celular y el citoplasma. Estas diferentes formas se crean por *splicing* alternativo de los exones 10 y 11 del gen (Hu et al., 2001).

Las dos formas del receptor de la prolactina tienen la misma afinidad por la hormona y pueden coexistir en el mismo tejido. Únicamente la forma larga es capaz de estimular la transcripción de los genes de producción de leche (Lesueur et al., 1991).

El gen que codifica la prolactina pertenece a la misma familia que los genes para la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario. Proviene del mismo gen ancestral y comparten características genéticas, funcionales y estructurales. Está compuesto por 5 exones y 4 intrones. Tiene un tamaño de unos 8,5 Kb.

Se ha encontrado un polimorfismo, mediante SSCP, en la región aledaña al 5' del gen de la prolactina que está asociado con el tamaño de la camada en oveja (Chu et al., 2009). Los heterocigotos para este polimorfismo tienen 0,83 corderos más que los homocigotos.

1.4.3 Receptor de la hormona de crecimiento (GHR).

El receptor de la hormona de crecimiento (GHR) es una glucoproteína tipo I, miembro de la superfamilia de los receptores de citoquinas. Como otros receptores de citoquinas, el GHR se acopla a la Janus kinasa (JAK2) para activar las cascadas de respuesta citosólica a la estimulación. La JAK2 es una tirosin-kinasa que no tiene dominio transmembranal y que se une a la forma dimérica del receptor tanto en la vía secretora como en la superficie gracias a un dominio del receptor, rico en prolina, llamado Box 1 y al dominio FERM N-Terminal de la kinasa (Yeh and Pellegrini, 1999).

El gen GHR codifica para la proteína de membrana a la que se une la hormona de crecimiento para desencadenar su acción celular. Es un miembro de la superfamilia de los receptores de citokina/hematopoyetina. En ganado vacuno es codificado por un único gen localizado en el cromosoma 20. Consiste en 9 exones codificantes, numerados del 2 al 10, precedidos por una región 5' no transcrita que incluye 9 variantes del exón 1. Estos se unen al resto de ARNm mediante "splicing" alternativo (Maj and Zwierzchowski, 2006). La presencia de estas variantes del exón 1 y su proporción varían entre los diferentes tejidos (Jiang and Lucy, 2001; Adams, 1995). El exón 2 codifica el péptido señal, los exones 3 a 7 codifican el dominio extracelular de unión a GH, el exón 8 codifica el dominio transmembrana y los exones 9 a 10 codifican el dominio intracelular. Los aminoácidos de las posiciones 60, 61, 62 y 88 son codificados por el exón 4 del receptor. Estas posiciones son críticas para la interacción con la hormona.

En la parte C-terminal de la secuencia polipeptídica se localiza un dominio conservado Fibronectina tipo 3 (Marchler-Bauer and Bryant, 2004).

El GHR es sintetizado en el retículo endoplasmático. Rápidamente dimeriza como una proteína rica en manosa, sensible a la endoglicosidasa H (*Endo H*). En su tránsito por el aparato de Golgi adquiere un patrón de glicosilación resistente a *Endo H*. Esta forma madura es transportada a la membrana plasmática, donde reside y ejerce su función.

La abundancia de la proteína GHR, en ausencia de ligando, está sujeta a modulación por dos mecanismos principales. Primero, la parte extracelular del receptor puede ser desligada del resto de la proteína por una metaloproteasa, obteniendo una proteína de unión a GH. Esto disminuye la abundancia del receptor y reduce la sensibilidad de una posterior estimulación por GH. En segundo lugar, hay una regulación negativa por un mecanismo de endocitosis que degrada, constitutivamente, las proteínas de membrana y que, en el caso del GHR, es protegido por la presencia de la JAK2 (Deng et al., 2007).

La estequiometría de la unión del complejo hormona-receptor es de dos moléculas de receptor por molécula de la hormona. La formación del complejo sigue un mecanismo secuencial en el cual el sitio 1 de una molécula de hormona se une a una molécula de receptor, posteriormente se une una segunda molécula del receptor al sitio 2 de la hormona unida al receptor (Wells, 1996).

La unión hormona receptor tiende a enterrar dentro del complejo a los residuos hidrofóbicos localizados cerca del centro de contacto (Clackson and Wells, 1995). El sitio 1 y el 2 de la hormona se unen a zonas distintas del receptor. Las cadenas laterales de la hormona (unas 30) afectan a la velocidad de disociación del complejo, no a la de asociación. El segundo receptor sólo se puede unir al complejo formado por un receptor unido al sitio 1 de la hormona. En esta unión se forman enlaces tanto con la hormona como con partes del primer receptor.

El complejo sólo es funcional cuando se han unido las dos moléculas del receptor porque puede activar componentes citosólicos cuando están próximos dos dominios intracelulares.

Falaki et al., 1997, encontraron polimorfismos de restricción para la enzima *Taq I* que producen un efecto negativo en la producción de leche y positivo en el porcentaje de proteína en leche.

1.4.4 Diacilglicerol aciltransferasa (DGAT).

La DGAT es una enzima microsomal clave en la síntesis celular de triacilglicerol. El cDNA que codifica para esta enzima fue identificado en 1998 (Cases et al., 1998). DGAT es una proteína integral de membrana. Cataliza el paso terminal de la síntesis de triacilglicerol. Usa diacilglicerol y acil-CoA como sustratos para producir triacilglicerol. (ver Figura 1) La DGAT juega un papel fundamental en el metabolismo celular del glicerol y es importante en eucariotas superiores para procesos fisiológicos como la absorción intestinal de grasa, el ensamblado lipoproteico, la formación de tejido adiposo, la producción de oocitos y la lactación.

El gen que codifica esta enzima se convirtió en el primer QTL confirmado en ganado vacuno (Winter et al., 2002). En él se descubrió que la variabilidad en las posiciones 10433 y 10434 puede traducirse en un cambio lisina-alanina en la posición 232 de la secuencia proteica (K232A). El proceso que llevó al establecimiento de este QTL no fue sencillo. Comenzó en 1998 con la publicación de sendos mapeos de este QTL en la región centromérica del cromosoma 14 por Coppieters et al., 1998 y Ron et al., 1998. En 1999 se publicó un mapeo fino de esta región (Riquet et al., 1999), reduciendo la localización del QTL a una región de 9,5 cM entre los marcadores ILSTS039 y BULGE004. No fue hasta 2002 cuando se pudo establecer la base molecular de dicho QTL con la publicación del SNP antes mencionado (Winter et al., 2002).

Esta mutación modifica valores productivos del grupo de animales portadores, demostrando que es responsable del QTL para contenido de grasa en leche localizado en una región del cromosoma 14 bobino, entre el marcador ILSTS039 y el BM1508 (Kühn et al., 2004).

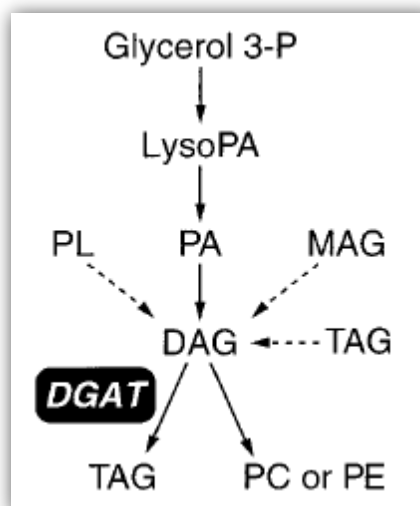


Figura 1: Papel de la DGAT en el metabolismo de glicolípidos.

El diacilglicerol (DAG) usado por la enzima se origina por la hidrólisis de ácido fosfatídico (PA), por la esterificación de 2-monoacilglicerol (MAG), por la hidrólisis del triacilglicerol (TAG) o de fosfolípidos (PL). P, fosfato; LysoPA, ácido lisofosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina. Tomado de Cases et al., 1998.

1.4.5 Hormona de crecimiento (GH).

Es una hormona peptídica secretada por las células somatotropas de la hipófisis anterior en respuesta a las hormonas hipotálamicas “hormona liberadora de la hormona de crecimiento” (GHRH) y “hormona inhibidora de la hormona de crecimiento” (somatostatina). Es una proteína monocatenaria de 191 aminoácidos, con un peso molecular de 22000 daltons. Las secuencias de la hormona de crecimiento de ganado ovino y bovino son prácticamente iguales. Hay varias formas de GH (Wood et al., 1989). Por ejemplo, la GH bovina liberada en la pituitaria presenta 4 formas distintas. Estas variantes pueden tener sustituciones valina-leucina en la posición 127 o alanina-fenilalanina en las posiciones 190 ó 191 según cómo se elimine el péptido señal.

Hay evidencias de que esas variantes pueden diferir en potencia. El tratamiento con la variante valina-127 provoca una mayor producción de leche que la variante leucina-127. La GH bovina comercializada por Monsanto es la variante de 190 aminoácidos. Porta una valina en la posición 127 y tiene una metionina extra en el extremo NH₂ terminal.

La hormona puede tardar meses en producir su efecto completo desde que es liberada.

La hormona de crecimiento estimula el crecimiento de todos o casi todos los tejidos corporales incrementando la síntesis proteica, la lipólisis, la multiplicación y la diferenciación celular (para revisión consultar Guyton and Hall, 1996b). Reduce la utilización de glucosa en el organismo. Esta hormona favorece el transporte de los

aminoácidos a través de las membranas celulares hasta el interior de la célula, aumenta la traducción de ARN para producir la síntesis de proteínas en los ribosomas, aumenta la transcripción nuclear de ADN para formar ARN y disminuye el catabolismo de proteínas y aminoácidos. La hormona de crecimiento causa la liberación de ácidos grasos libres a partir de tejido adiposo. Además, en los tejidos de todo el organismo, favorece la conversión de los ácidos grasos en acetilcoenzima A (acetil-CoA). También modifica el metabolismo de glúcidos ya que reduce la utilización de glucosa como fuente de energía. La glucosa excedentaria se deposita en forma de glucógeno en las células, saturándolas rápidamente. Ello produce una disminución de la captación de glucosa por las células y un aumento de la glucemia (diabetes hipofisaria). El aumento de azúcar en sangre promueve un incremento en la secreción de insulina. En ocasiones, el efecto sobre las células beta de los islotes de Langerhans es tan grande que estas literalmente se consumen, produciendo una diabetes mellitus. Por todo esto, bajo influencia de la hormona del crecimiento, se utilizan las grasas como fuente de energía con preferencia sobre los hidratos de carbono y las proteínas.

Para que la hormona de crecimiento produzca su acción necesita insulina e hidratos de carbono. Ejerce esta acción a través de los denominados “factores de crecimiento de tipo insulínico” (IGF) porque muchos de sus efectos son similares a la insulina. Se sabe que el hígado y otros tejidos los sintetizan en respuesta a hormona de crecimiento. De ellos, el más importante es el IGF-I. Su concentración en plasma sigue muy de cerca la tasa de secreción de la hormona de crecimiento. Los pigmeos africanos y algunos enanos tienen incapacidad congénita para sintetizar cantidades elevadas de IGF-I y, aun cuando la concentración en sangre de hormona de crecimiento es normal, ven reducido su crecimiento. La acción del IGF-I es más prolongada que la de la hormona de crecimiento ya que, a diferencia de esta, se une estrechamente a una proteína transportadora plasmática, lo que le permite liberarse lentamente a los tejidos.

Se han descrito muchos efectos de la hormona de crecimiento sobre el sistema reproductor. (Para revisión ver Hull and Harvey, 2000).

La hormona de crecimiento tiene un papel clave en el desarrollo de la glándula mamaria, ya que fomenta el crecimiento de los conductos galactóforos, y en la producción de leche. En tratamientos con GH bovina se incrementa la toma y utilización de nutrientes para la síntesis de leche en la glándula mamaria. Las células incrementan la capacidad de síntesis de proteína porque se produce un aumento de ARN en la glándula. En animales vivos se ha visto un incremento de enzimas metabólicas como la acetil-CoA carboxilasa, la acetil-CoA sintasa y la ácido graso sintasa.

El mecanismo por el que la GH actúa sobre la glándula mamaria no está claro pero parece mediado por el sistema de IGF. En tejido mamario hay abundantes receptores para IGF-I e IGF-II pero no se detectan receptores para GH. El nivel de expresión del ARN del receptor de GH (GHR) es muy bajo. Se sabe que la adición de IGF-I previene la involución de la glándula mamaria tras la lactación, incrementa la producción de caseínas y que una infusión en el sistema arterial de la glándula incrementa la producción de leche. La infusión de GH en este sistema arterial no tiene efectos sobre la producción de leche. Sin embargo, las respuestas obtenidas por infusión de IGF en el sistema arterial de la glándula son muy inferiores a las obtenidas por el aporte sistémico de GH. Para revisión ver Etherton and Bauman, 1998.

Parece que la GH tiene una acción específica de tejido mediada por el IGF-1 y su efecto depende del receptor de GH (GHR) y de otras hormonas.

La hormona de crecimiento se segrega a lo largo de toda la vida del individuo desde la pubertad, disminuyendo ligeramente con el envejecimiento. Su tasa de secreción aumenta y disminuye en minutos. Algunos factores estimulantes de su secreción son la inanición, sobre todo si conlleva un déficit proteico intenso, la hipoglucemia o la baja concentración de ácidos grasos en sangre, el ejercicio, la excitación, los traumatismos y también aumenta durante las dos primeras horas de sueño profundo.

La secreción de la hormona de crecimiento está controlada por los factores hipotalámicos “hormona liberadora de la hormona del crecimiento” (GHRH), que la estimula, y “hormona inhibidora de la hormona del crecimiento” o somatostatina, que la inhibe. Los factores son segregados en el hipotálamo y transportados a la hipófisis anterior a través de los vasos portales hipotalámicos-hipofisarios. La GHRH se une a receptores de membrana de las células hipofisarias que sintetizan la hormona de crecimiento. Activa el sistema adenilciclase celular y aumenta el nivel de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Este aumenta el transporte de iones calcio al interior de la célula, produciendo, en pocos minutos, la fusión de las vesículas secretoras con la membrana celular para liberar la hormona a sangre. Además, aumenta la transcripción nuclear de los genes de la hormona de crecimiento. La somatostatina desempeña otras funciones en el organismo además de su efecto inhibitor de la secreción de hormona de crecimiento. Es secretada por las células delta de los islotes de Langerhans, puede inhibir la secreción de insulina y glucagón por las células beta y alfa de los islotes. También se encuentra en muchas otras áreas del sistema nervioso central y del aparato digestivo.

La secreción de hormona de crecimiento está sujeta a un sistema de control por retroalimentación negativa.

El exceso en la producción de hormona de crecimiento en humanos causa gigantismo, acromegalia u otras malformaciones, el defecto produce enanismo. En personas que han perdido la capacidad de secretar hormona del crecimiento se observa un envejecimiento acelerado como consecuencia de la disminución de proteínas en la mayor parte de los tejidos, sustituida por el aumento del depósito de grasa.

Los polimorfismos en el gen han sido ampliamente estudiados y correlacionados con caracteres productivos. Lee et al., 1996, encontraron una posible asociación de un polimorfismo Leu-Val en la posición 127 de la proteína (exón 5 del gen) con la producción de leche en vacas Holstein con mérito genético incrementado (EBV). Falaki et al., 1997, no encontraron significativo el efecto del polimorfismo de restricción Taq I sobre el carácter producción de leche pero los machos con el patrón BB mostraron un mayor valor genético para rendimiento lechero (milk yield) que los machos con patrón AA. Lagziel et al., 1996, asociaron uno de los haplotipos detectados por SSCP con un alto porcentaje de proteína en leche de vaca. Lagziel et al., 1999 publicaron la secuencia de estos haplotipos, relacionando la tasa de cambio de las secuencias nucleotídicas con la historia evolutiva de las diferentes especies bovinas. Bastos et al., 2001, detectaron 2 patrones de SSCP en un fragmento que comprendía al exón 4, y 5 patrones en el que comprendía el exón 5. Sin embargo, no encontraron ninguno en el exón 6.

1.4.5.1 Gen de la hormona de crecimiento humana

El locus de la hormona de crecimiento está localizado en el cromosoma 17 humano (Número de acceso en Genbank: NG_011676)³.

El locus de la hormona de crecimiento humana está compuesto por 5 genes, cada uno de los cuales comprende a un miembro de la familia de hormonas somatotropina/prolactina. El locus contiene 2 genes de la hormona de crecimiento intercalados con 3 genes de la somatotropina coriónica, todos ellos en la misma orientación transcripcional. Se piensa que el agrupamiento génico ha evolucionado recientemente debido a una serie de duplicaciones génicas. Como subproducto de los eventos de duplicación que crearon el locus de la hormona de crecimiento, porciones de estos genes también han sido duplicados y se localizan exones huérfanos en las regiones intergénicas, a través del locus.

1.5 PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica enzimática que permite una amplificación masiva de la secuencia comprendida entre el inicio y el final de dos cebadores extremos.

Cada uno de los cebadores es complementario a una de las cadenas de la doble hebra de ADN. El cebador “UP” se une al extremo 5’ del fragmento de ADN y el “DN” al extremo 3’ de dicho fragmento. La enzima *Taq* polimerasa cataliza la reacción de polimerización de dNTPs en los extremos de cada uno de los cebadores utilizando como molde la hebra a la que se ha unido el cebador. El resultado de un ciclo de PCR es la obtención de dos copias exactas del ADN que se usa como molde.

Cada ciclo de PCR tiene 3 pasos: 1) desnaturalización: las cadenas de ADN molde se separan en dos hebras; 2) hibridación: cada cebador se une a la secuencia de la hebra de ADN que lo complementa; 3) extensión: ocurren las reacciones de polimerización de dNTPs hasta que se obtienen 2 copias de la cadena de ADN original.

El crecimiento de los productos de PCR en cada ciclo es exponencial. Así, se consigue obtener un elevado número de copias de cada fragmento de interés en un cortísimo periodo de tiempo.

La PCR ha tenido un inmenso impacto en biología y medicina, especialmente en investigación genética. El inventor de la técnica, Kary Mullis, fue galardonado con el Premio Nobel de Química en 1993.

La PCR permite hacer análisis moleculares y genéticos a cantidades muy pequeñas de células o tejidos. Este análisis sería inabordable sin la posibilidad de hacer una gran cantidad de copias del ADN.

En el trabajo de Sansinforiano et al., 2001, se realizan multitud de optimizaciones de parámetros de PCR. Aunque son importantes tanto los componentes de la reacción enzimática (concentración de enzima, cantidad de ADN, concentración de cebadores, concentración de MgCl₂, aditivos) como los parámetros físicos de la reacción (temperaturas y tiempos de cada fase), llegan a la conclusión de que los parámetros más importantes son la temperatura de hibridación y la concentración de cloruro magnésico.

³ *Homo sapiens* growth hormone 1 (GH1), RefSeqGene on chromosome 17

1.5.1 PCR cuantitativa en tiempo real.

Es una técnica derivada de la PCR que puede detectar el número de copias inicial. Se basa en la monitorización fluorescente, a tiempo real, de la amplificación del ADN en una reacción de PCR (Rutledge and Côté, 2003).

Utiliza termocicladores mejorados que son capaces de medir el incremento en el número de copias a lo largo de cada paso de una reacción de PCR. Para ello requieren la introducción, en la mezcla de la reacción, de componentes que emitan fluorescencia de forma proporcional al número de copias sintetizadas.

La tecnología de sondas TaqMan[®], utiliza sondas marcadas en un extremo con una molécula fluorescente (*reporter*) y en el otro con un fluoróforo capaz de anular la fluorescencia del *reporter* (*quencher*). Cada sonda TaqMan[®] se diseña de forma que es complementaria a una región central del fragmento de PCR. En el paso de hibridación se unen a sus secuencias complementarias tanto los cebadores como la sonda. Sin embargo, en el paso de extensión, la enzima *Taq* polimerasa se topa con la sonda TaqMan[®] y su actividad exonucleasa destruye la sonda (Holland et al., 1991). De esta forma, el marcaje fluorescente (*reporter*) se separa de su molécula capturadora (*quencher*) y emite fluorescencia. Esta fluorescencia es detectada por el termociclador. En la fase exponencial de crecimiento, cuando no hay limitación de ningún reactivo, es muy fácil relacionar matemáticamente el número de copias del fragmento en un determinado ciclo con el número inicial de cadenas de ADN. En esta fase exponencial, el **número de copias** en cada paso (X_n) es igual al **número de copias inicial** (X_0) por 1 más la **eficiencia de amplificación de la diana** (E_x), elevados al **número de pasos de PCR** (n) (Livak and Schmittgen, 2001).

$$X_n = X_0 \cdot (1 + E_x)^n$$

A partir de esta ecuación, que es la ecuación que describe un crecimiento exponencial típico, se pueden derivar las demás ecuaciones necesarias para el tratamiento matemático de los datos. Así, reordenando se obtiene que el número de copias inicial es:

$$X_0 = \frac{X_n}{(1 + E_x)^n}$$

Esto permite calcular el número inicial de copias de ADN si la eficiencia de la reacción es conocida.

Como la acumulación del producto amplificado se mide en relación a la fluorescencia que emite, se utilizan los umbrales de fluorescencia para simplificar los cálculos de determinación del X_n . En este, se comparan las reacciones de amplificación individuales en el punto en que la cantidad de ADN ha amplificado hasta un valor preestablecido. Para ello se selecciona un umbral de fluorescencia (F_x) y se calcula el **ciclo umbral** (C_t). Este se define como el ciclo fraccional, teórico, al cual cada amplificación alcanza el umbral de fluorescencia. Aplicando este umbral el X_n se convierte en una constante y la ecuación anterior puede formularse como:

$$X_0 = \frac{X_t}{(1 + E_x)^{C_t}}$$

Siendo X_t el número de moléculas necesarias para alcanzar el umbral de fluorescencia y C_t el ciclo umbral o ciclo en que se alcanza.

La cuantificación absoluta puede realizarse haciendo una curva estándar a partir de cantidades de ADN conocidas y dibujando sus valores de C_t con respecto a cantidades

iniciales de ADN conocidas. Las bases matemáticas de la curva estándar pueden ser derivadas tomando el logaritmo de la ecuación anterior.

$$\begin{aligned} \text{Log}(X_0) &= \text{Log}(X_t) - \text{Log}[(E_x + 1)^{C_t}] \\ \text{Log}(X_0) &= -\text{Log}(E_x + 1) \cdot C_t + \text{Log}(X_t) \end{aligned}$$

Asumiendo que E_x y X_t son constantes, la ecuación anterior tiene la estructura típica de una recta ($y=ax+b$) de forma que, dibujar $\text{Log}(X_0)$ versus C_t , produce una línea con pendiente igual a:

$$\text{Pendiente} = -\text{Log}(E_x + 1)$$

despejando la eficiencia se obtiene:

$$E_x = 10^{-\text{Pendiente}} - 1$$

e

$$\text{Intercepción} = \text{Log}(X_t)$$

despejando la cantidad total se obtiene:

$$X_t = 10^{\text{Intercepción}}$$

Para poder aplicar estas ecuaciones en los cálculos deben cumplirse una serie de premisas, a saber: que todas las reacciones de PCR tengan la misma eficiencia y que la eficiencia de amplificación no varíe, al menos, durante los ciclos necesarios para alcanzar el umbral. Además, para comparar diferentes carreras debe seleccionarse el mismo umbral de fluorescencia (que es directamente proporcional al X_t) (Rutledge and Côté, 2003).

El método de comparación de C_t es muy sensible a las variaciones en la eficiencia de las PCRs (Ramakers et al., 2003). Así, en cada pocillo puede haber condiciones de PCR ligeramente distintas a las de los pocillos adyacentes.

1.6 SSCP.

El análisis de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) es un método simple de detección de mutaciones. Usa los mismos cebadores de la PCR sin modificar y detecta los patrones de bandas mediante distintos tipos de marcaje. Esta técnica fue desarrollada por Orita et al., 1989. Se basa en el principio de que la secuencia primaria y la longitud de un fragmento de cadena simple determinan su conformación cuando este migra en un gel de poliacrilamida no desnaturante (Han and Robinson, 2004).

El marcaje y visualización del fragmento se realizaron inicialmente por medio de marcaje con radioisótopos y visualización por autorradiografía (Kasuga et al., 1995; Kukita et al., 1997; Neibergs et al., 1993; Orita et al., 1989; Sarkar et al., 1995; Sheffield et al., 1993). Posteriormente, se han sustituido por diferentes métodos no isotópicos como la tinción con bromuro de etidio (Hongyo et al., 1993; Kasuga et al., 1995; Sarkar et al., 1992), con nitrato de plata (Ainsworth et al., 1991; Bastos et al., 2001; Bodenes et al., 1996; Sarkar et al., 1995) y el marcaje fluorescente.

El SSCP era una de las técnicas más utilizadas para el rastreo de alteraciones genéticas pequeñas. Se consideraba una alternativa muy conveniente a la secuenciación directa. Es una técnica rápida, usa reacciones de PCR no purificadas, no utiliza digestión por enzimas de restricción, *blotting* ni hibridación de sondas. Los geles no requieren equipamiento especializado. Los resultados son fáciles de interpretar. El tiempo que requiere para crear, cargar, teñir y secar los geles no es mayor que para técnicas comparables. El equipo no es costoso y muchos sistemas de electroforesis en gel de

poliacrilamida pueden adaptarse para esta aplicación. La eficiencia de detección de mutaciones puede superar el 90% en fragmentos de ADN desde 150 a 400 pb. Neibergs et al., 1993, consideran al análisis de SSCPs una “herramienta ideal para el análisis de genes candidatos”.

Puede detectar mutaciones no conocidas, pero no produce información posicional. Teóricamente, cada cambio en la secuencia causa un cambio en la movilidad de las bandas detectadas. Sin embargo, hay cambios que no son detectados por análisis de SSCP (Cai and Tuituo, 1993). La intensidad y la movilidad de las bandas pueden variar dependiendo de las condiciones de electroforesis. En ocasiones, la reproducibilidad de los patrones se ve comprometida por la presencia de bandas muy débiles en los carriles de ADN desnaturalizado que no se corresponden con ninguna banda en el ADN no desnaturalizado. Se piensa que estas diferencias son la manifestación de la existencia de más de una conformación metaestable para una misma secuencia en dichas condiciones (Hayashi, 1991; Orita et al., 1989). Estas conformaciones metaestables dificultan el análisis pero pueden ser reducidas eliminando el exceso de cebadores no unidos de la mezcla de PCR. Sin embargo, diferencias en las bandas de las conformaciones metaestables podrían ser útiles para detectar mutaciones no caracterizadas. Se cree que las conformaciones metaestables se originan por uniones de las bases de los lazos no autocomplementarios con regiones no autocomplementarias de otras moléculas. Las mutaciones en estas regiones únicamente se manifestarían como diferencias de movilidad de las regiones metaestables (Kasuga et al., 1995).

La demostración positiva de la presencia de una mutación también implicaría la confirmación por otra técnica como la digestión de restricción, la secuenciación o la ligación de oligonucleótidos específicos de secuencia.

El SSCP fue ampliamente usado como herramienta de rastreo de polimorfismos no caracterizados (Bastos et al., 2001). Otras aplicaciones comunes incluyen la detección de mutaciones definidas y tipificación de marcas polimórficas para usar en estudios de mapeo físico de genes (Neibergs et al., 1993), como herramienta de diagnóstico clínico de mutaciones que causan enfermedades humanas (Ainsworth et al., 1991; Sarkar et al., 1995, 1992).

En la actualidad, el SSCP ha sido sustituido por técnicas más modernas y eficientes de detección de polimorfismos, pero aún se emplea en estudios preliminares de asociación de polimorfismos genéticos (Moradian et al., 2013).

1.6.1 Principios y consideraciones teóricas.

La técnica de SSCP aprovecha la habilidad de las mutaciones para alterar la movilidad electroforética de un ADN de cadena simple (ssDNA) en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Durante la electroforesis las moléculas de ADN cargadas negativamente se mueven por el campo eléctrico a través de obstáculos fijos resultantes de la polimerización de la acrilamida. (ver Figura 2)

La movilidad electroforética del ssDNA bajo condiciones no desnaturalizantes depende de varios factores. Dado que la carga se mantiene constante en moléculas del mismo tamaño, cobra importancia la forma tridimensional o configuración que adopte el ssDNA. Bajo condiciones no desnaturalizantes, dentro de la matriz del gel, algunos de los ssDNA rehibridan con su cadena complementaria para formar ADN dúplex. El resto de ssDNA formará asociaciones intramoleculares débiles (estructuras secundarias) en áreas de autocomplementariedad. La configuración o forma adoptada por el ssDNA y, por tanto, la movilidad electroforética, es altamente variable y dependiente de la secuencia. Cualquier cambio en la secuencia que modifique las regiones de autocomplementariedad es probable que altere la configuración y produzca un cambio en la movilidad susceptible de ser detectado por SSCP.

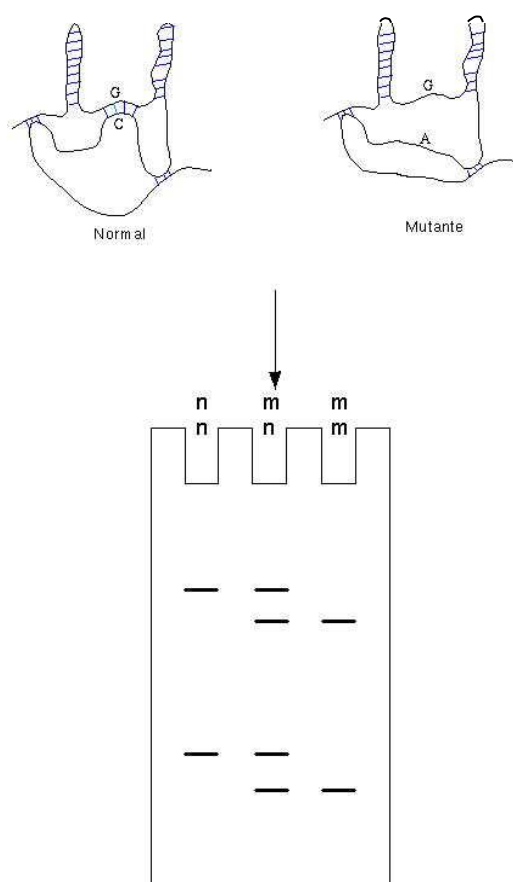


Figura 2: Esquema del principio del SSCP.

Una mutación puntual inestabiliza un grupo de puentes de hidrógeno y provoca un gran cambio en la configuración tridimensional de la molécula de ADN. Este cambio es suficiente como para provocar diferencias de movilidad claramente detectables en un gel de acrilamida. A partir de una sola población de moléculas de ADN bicatenario pueden aparecer 2 bandas que representan a cada una de las 2 cadenas.

1.6.1.1 Parámetros que afectan a la eficiencia del SSCP.

1.6.1.1.1 Tamaño de los fragmentos del ADN.

La máxima sensibilidad se obtiene con pequeños fragmentos de alrededor de 150 pb (Sheffield et al., 1993) y disminuye a partir de los 300 pb (Kukita et al., 1997). Los fragmentos de ADN más pequeños serán incapaces de formar suficientes estructuras secundarias. Sheffield et al., 1993, sugieren que debe de haber un límite inferior de tamaño. Una mutación fuera de las zonas que participan en las estructuras secundarias no sería localizable. En fragmentos grandes, el conjunto de efectos conformacionales podría reducir la diferencia de movilidad de una secuencia mutada con respecto a su original hasta hacerlas indistinguibles. Bodenes et al., 1996, observaron patrones polimórficos de solamente 4 bandas en un fragmento de 780 pb que, una vez secuenciado, mostró 30 posiciones heterocigotas y una inserción de 8 pb en la posición 78. Hay evidencias de que es menos probable que mutaciones puntuales produzcan cambios de movilidad dentro de los 50 pares de bases de los extremos de un

fragmento. Donde sea posible, la secuencia de interés no debería estar cerca del extremo del fragmento del ADN. Sin embargo, Spinardi et al., 1991, utilizó con éxito fragmentos de 60 pb del virus del papiloma humano que diferían entre ellos en una única mutación.

Este tamaño óptimo tan pequeño es un inconveniente porque obliga a diseñar muchas reacciones de PCR para cubrir la secuencia completa, incluso aunque el gen sea pequeño. No obstante, los fragmentos grandes pueden ser analizados, sin reducir demasiado la sensibilidad, optimizando otros parámetros. Así, Kukita et al., 1997 consiguieron mantener aceptablemente la sensibilidad de fragmentos entre 300 y 800 pb reduciendo el pH del tampón de electroforesis.

1.6.1.1.2 Temperatura.

Algunos autores consideran que la temperatura del SSCP es el parámetro más importante en la resolución y reproducibilidad de los SSCPs (Hongyo et al., 1993). Este autor recomienda correr el exón 7 del gen *p53* humano a una temperatura de 10 °C para obtener la mejor resolución pero matiza que la temperatura óptima debería ser determinada empíricamente para cada fragmento. Bastos et al., 2001, probaron temperaturas entre 4 y 20 °C, eligiendo para la mayoría de los protocolos la de 15 °C. Muchos protocolos publicados recomiendan realizar la electroforesis bajo una de estas dos condiciones: temperatura ambiente o a una temperatura de + 4 °C (Spinardi et al., 1991). Sheffield et al., 1993, encontraron que una cadena de ADN de 212 pb del gen de la globina murina formaba 2 confórmeros estables cuando eran analizados a temperatura ambiente con el 5 % de glicerol. El análisis del mismo fragmento a 4 °C produjo una única cadena. Esto simplifica los análisis.

Con geles de 0,3 mm se puede aplicar un gradiente de voltaje sin producir un calentamiento óhmico serio (el gel no produce mucha resistencia al paso de la corriente eléctrica y no se calienta). La conformación del ADN de cadena simple es muy sensible a la temperatura (Orita et al., 1989). Además, la resolución en geles más estrechos es mayor. Sin embargo, son mucho más difíciles de manipular.

Pequeños cambios de temperatura pueden afectar a la estabilidad de los enlaces, no covalentes, de las regiones de autocomplementariedad. A menos que el laboratorio esté climatizado la temperatura ambiente variará diaria y estacionalmente. Esto afectará a la reproducibilidad de los resultados del SSCP.

1.6.1.1.3 Aditivos.

Muchos protocolos de SSCP recomiendan la inclusión de aditivos en la matriz del gel como el glicerol y sacarosa. En particular, se ha descrito que la adición de glicerol incrementa la sensibilidad del análisis SSCP en algunos fragmentos (Bastos et al., 2001; Spinardi et al., 1991). Sin embargo, la velocidad de la electroforesis en geles con glicerol es más lenta, especialmente a bajas temperaturas (Hayashi, 1991). El glicerol y otros alcoholes pueden ser también incompatibles con los iones de borato presentes en tampones electroforéticos de TBE. Otros tampones electroforéticos como el Tris-fosfato EDTA (TPE) o el Tris-aurina EDTA (TTE) son más compatibles con geles que contienen glicerol.

1.6.1.1.4 Uniones cruzadas de acrilamida.

La proporción de uniones cruzadas de acrilamida (acrilamida:bisacrilamida) usadas en protocolos de SSCP es muy variable, algunos grupos usan una proporción 19:1 otros una 29:1 ó

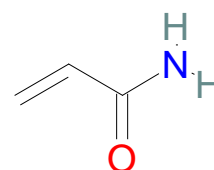


Figura 3: Molécula de acrilamida.

49:1. Se dice que los geles con bajo nivel de puentes cruzados (49:1) mejoran la eficiencia del análisis por SSCP (Hayashi, 1991), especialmente en fragmentos de más de 400 pb (Bastos et al., 2001).

1.6.1.1.5 Otras variables.

En la literatura hay numerosas notificaciones de otras variables aplicables, incluyendo:

- incremento de resolución de los productos grandes de PCR en geles con un gran porcentaje de acrilamida (12-17 %)(Kasuga et al., 1995);
- mejora de la eficiencia del SSCP eliminando los cebadores de PCR residuales (Kasuga et al., 1995);
- perfeccionando el rango de detección de SSCPs usando ARN en lugar de ADN (Sarkar et al., 1992);
- utilización de diferentes compuestos desnaturalizantes como el hidróxido de metilmercurio, el hidróxido sódico o la urea (Hongyo et al., 1993);
- optimización de la dilución de los productos de PCR y el volumen de carga (Hongyo et al., 1993);
- elección del tampón de carga apropiado, como Ficoll al 15 % , formamida al 95 % (Hongyo et al., 1993) o en gradiente (Paccoud et al., 1998);
- selección del tampón de electroforesis y su concentración, como el TBE 1,5x, TAE 1x ó TGE 1x (Hongyo et al., 1993), TBE 0,5x (Sarkar et al., 1992; Spinardi et al., 1991);
- tipo de gel, como geles de poliacrilamida al 20 % o geles en gradiente del 4 al 20 % (Hongyo et al., 1993);
- voltajes de carrera, que pueden variar entre 40 y 400 voltios teniendo en cuenta que mayores voltajes producen mayores calentamientos del gel y requieren un mejor sistema de refrigeración (Hongyo et al., 1993).

La densidad de los geles de poliacrilamida depende de la concentración de acrilamida y el grado de entrecruzamiento entre cadenas depende de la concentración de bisacrilamida. La densidad del gel y el grado de entrecruzamiento determinan las propiedades características del gel resultante, incluyendo el tamaño de poro.

Hay dos parámetros que definen las características de un gel, teniendo en cuenta que la bisacrilamida participa, además de en los entrecruzamientos, en la formación de las cadenas lineales:

- El reticulado (%T): que es la concentración total de monómeros (acrilamida + bisacrilamida % p/v).
- La dureza (%C): que es el porcentaje de bisacrilamida respecto al total de monómeros.

Se suele usar un valor de %C constante e inferior al 1%, y lo que se varía para cambiar las características del gel es el reticulado (%T).

Al aumentar %T disminuye el tamaño de poro y viceversa. Aunque hay límites, con %T < 2,5-3% los geles son casi líquidos, y el máximo %T es de un 30%.

Los geles se preparan variando el %T en función del tamaño de las moléculas que se quieren separar.

1.6.1.1.6 Tipo de mutación.

Las mutaciones por inserción/delección casi siempre producen patrones fácilmente reconocibles; sin embargo, los patrones resultantes del mal apareamiento de un par de bases son más variables. No hay reglas en cuanto a la variación en la movilidad. Parece

estar determinada por el contexto que rodea a la secuencia. Además, los dominios que funden a alta temperatura pueden ser reacios al análisis por SSCP.

No se observan diferencias en la detección de las mutaciones cuando estas generan transiciones o transversiones (Sheffield et al., 1993).

1.6.1.1.7 Matrices de gel alternativas.

Se han utilizado matrices de poliacrilamida al 15 %, con y sin glicerol al 10 %, y de poliacrilamida al 11 % (Bastos et al., 2001). Comercialmente, hay disponibles matrices de gel de monoacrilamida, MDE (Lagziel et al., 1996) y poliacrilamida, fabricadas específicamente para aplicaciones como el SSCP. Con matrices de MDE se logra disminuir el tiempo total de electroforesis de forma notable.

1.6.1.2 Interpretación de resultados.

Teóricamente, los geles de SSCP son fáciles de interpretar. La aparición de un SSCP con distinta movilidad indica una diferencia de secuencia. La confirmación de una nueva variación suele realizarse por secuenciación. Los resultados pueden complicarse con la presencia de polimorfismos neutrales que, si son comunes, pueden confundir el análisis. En este caso la experiencia del técnico ayudará en la interpretación. Los cambios mutacionales que producen variaciones idénticas en los polimorfismos son un problema potencial, pero son extremadamente raros. A continuación sigue una breve guía perfilando la disposición usual y apariencia de bandas en geles SSCP y las excepciones observadas comúnmente.

1.6.1.2.1 Guía de interpretación.

1. El ssDNA tiene mucha menos movilidad que su correspondiente dsDNA en los geles de poliacrilamida que típicamente son usados para SSCP. Obviamente, cuanto más aumenta la migración de las bandas mayor es el potencial para resolver pequeñas diferencias de movilidad, pero el factor limitante en cualquier SSCP es la necesidad de retener el dsDNA en el gel. Como tosca guía, el xilen cianol migra aproximadamente como 180 pb en un gel (49:1) al 8 %. Cuando ya se han establecido las condiciones de migración de un fragmento es posible aumentar la resolución aumentando el tiempo de migración aun cuando se pierda la zona de bandas de dsDNA.
2. La técnica de tinción con plata tiende a teñir el ssDNA, que forma los SSCP con una sombra marrón/anaranjada. El dsDNA tiñe de gris oscuro/negro. Sin embargo, el color final está muy influenciado por las condiciones físicas de la carrera y la tinción.
3. Los SSCPs de un homocigoto que típicamente producen 2 bandas de distinta migración son correspondientes con las 2 cadenas de ADN complementarias. A menudo producen más de 2 bandas de SSCP, algunas de las cuales pueden teñirse más débilmente que otras. Asumiendo que la amplificación de la PCR es clara y específica, estas bandas subsidiarias pueden ser configuraciones alternativas estables.
4. En raras ocasiones, desaparecen las bandas de SSCP discretas en la zona de las cadenas de ssDNA. Si esto ocurre se observa un debilitamiento y una atenuación de la pista. Esto sucede porque los fragmentos adoptan todas las series de conformaciones estables, cada una con una movilidad ligeramente diferente. La

presencia de una mutación a menudo destruye este delicado balance, creando una banda de SSCP de apariencia típica.

5. Ocasionalmente, se observa solamente una banda SSCP de un fragmento particular. Esto se debe a que ambas cadenas tienen movilidades muy similares y no se diferencian.
6. Cuando un SSCP se produce por una diferencia en la secuencia (creando una nueva banda), la intensidad de tinción de cada banda debe reducirse proporcionalmente puesto que la misma cantidad de ssDNA se distribuye sobre un mayor volumen de gel. Este hecho puede resultar útil para excluir artefactos originados por falsas amplificaciones.
7. Si un exceso de cebadores reanilla con el ssDNA después de cargar el gel puede causar un tercer tipo de bandas de movilidad intermedia entre el ssDNA y el dsDNA. Su patrón de migración normalmente se corresponde al del ssDNA aunque tienden a teñirse gris/negras, como el dsDNA (Kirkpatrick and Hart, 1994).

1.7 Secuenciación.

La técnica de secuenciación se utiliza para averiguar la composición y el orden de los nucleótidos de una cadena de ADN. Para ello se utiliza una modificación de la técnica de PCR que se basa en la utilización de dideoxynucleótidos marcados fluorescentemente.

La secuenciación comienza con una PCR normal en la que se incrementa el número de copias del fragmento en estudio.

En una segunda PCR se incorporan dideoxynucleótidos marcados radiactivamente en la mezcla de PCR. Estos nucleótidos se incorporan en la cadena, al igual que los normales, en posiciones complementarias a los nucleótidos de la cadena molde. La polimerización se detiene en el momento en el que se incorpora uno de estos nucleótidos porque carecen del grupo OH que formaría el enlace con el grupo fosfato del nucleótido siguiente. La cantidad de dideoxynucleótidos está formulada de forma que, aleatoriamente, la probabilidad de que se incorpore uno de estos nucleótidos sea igual para cada una de las posiciones de la secuencia. Cada fragmento así sintetizado tiene 2 marcadores que lo caracterizan: la longitud de la secuencia, marcada por el lugar de integración del dideoxynucleótido, y el color de fluorescencia, determinado por la molécula fluorescente unida covalentemente a cada uno de los cuatro tipos posibles de nucleótidos.

Dentro del secuenciador, sea del tipo que sea, estos fragmentos se diferencian por su tamaño mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. Los fragmentos de menor tamaño recorren antes el polímero que separa el inicio de la electroforesis del lugar donde se sitúa el detector. Los fragmentos, marcados fluorescentemente, son alcanzados por el haz de luz de alta energía de un láser. Según el fluorocromo con el que esté marcado, cada fragmento emite luz en una longitud de onda (color) distinta. Cambiando el tiempo de aparición con el color emitido se generan unos diagramas de picos, llamados electroferogramas que representan la secuencia de nucleótidos en estudio.

Los secuenciadores tienen resolución suficiente para distinguir fragmentos diferenciados entre sí por 1 nucleótido.

1.8 Análisis de datos.

1.8.1 Análisis de datos de secuenciación.

Los resultados producidos por los secuenciadores se almacenan en ficheros de picos o cromatogramas. En estos archivos se representan las lecturas del aparato en forma de gráficos de intensidad de señal con respecto al tiempo de carrera. Los picos son analizados por el software del secuenciador para producir una interpretación en forma de secuencia nucleotídica. Dependiendo de la calidad de la secuenciación la precisión de esta interpretación puede ser mayor o menor, sin embargo, nunca es perfecta y se hace necesario revisar manualmente los datos producidos por el programa de asignación de bases (en inglés: *base caller*).

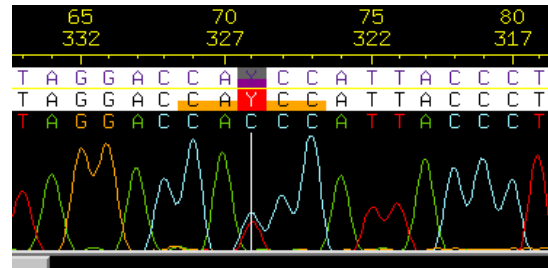


Figura 4: Cromatograma típico mostrando una posición polimórfica.

En la posición 9 se localizan sendas bases C y T. El código de ambigüedad Y indica esta situación.

El formato de estos cromatogramas puede variar ya que, como ocurre habitualmente en informática, hay múltiples opciones. En esencia, todos los formatos son equivalentes e interconvertibles. Los más utilizados son el “abi” que es el que producen por defecto los secuenciadores de Applied Biosystems® y el “scf” (del inglés: *standard chromatogram format*)(Dear and Staden, 1992) que es de libre utilización. Los cromatogramas, una vez corregidos, se emplean como entrada en programas que producen alineamientos de las secuencias. Estos programas suelen ser complejas *suites* de utilidades que tienen una curva de aprendizaje, en ocasiones, bastante pronunciada.

En este trabajo se han empleado principalmente dos, el Consed (Gordon et al., 1998) y el paquete Staden (Staden et al., 2000).

1.9 El problema de las referencias.

Cuando se dispone de una base de datos de secuencias lo suficientemente amplia se pueden comenzar a hacer estudios para inferir el significado biológico de las secuencias obtenidas. Raramente será de interés la secuencia en su conjunto; las pesquisas se referirán a una zona muy concreta de la secuenciación. Así, lo normal es referirse a un SNP determinado o a un fragmento que se extiende desde una base X a otra Y. En secuencias de miles de bases, o millones, es importante tener un sistema de referencia que permita designar, con exactitud, la zona de la secuencia a la que se está haciendo referencia en cada momento. Es deseable que este sistema sea fácil de utilizar y fácilmente adaptable a cualquier secuencia.

De la propia definición del concepto de secuencia se infiere un sistema de referencia fácil: numerar las unidades de dicha secuencia. Este algoritmo tan intuitivo y simple, es el usado en la mayoría de las nomenclaturas de fragmentos de secuencia, pero con variaciones ya que se presentan varios problemas. Uno de los problemas que casi nunca se tiene en cuenta, y que más quebraderos de cabeza puede dar, es el establecimiento del origen. Esto es: el punto desde el que comienza la numeración, la base +1.

En principio, puede parecer que tal problema no existe. Se numera como +1 la primera base y las demás correlativamente. Pero ¿qué ocurre cuando se realiza un alineamiento múltiple? Lo normal es que las secuenciaciones de varias muestras comiencen en posiciones distintas, aun cuando comprendan el mismo fragmento. Por ejemplo, si se encuentra un SNP en la posición 50 de una secuencia, que se corresponde con la posición 47 de otra y la 52 de una tercera, ¿cómo se numera ese SNP? Una solución sencilla es calcular la secuencia consenso y numerarlo según la posición que ocupa en esta secuencia. La secuencia consenso cumple un requerimiento importante: cubre toda la amplitud del alineamiento.

La secuencia consenso de un alineamiento es, en realidad, una secuencia de referencia. Es deseable que la secuencia de referencia cumpla una serie de requerimientos:

1. Que sea similar a la secuencia o secuencias que la refieren.
2. Que cubra toda la longitud del fragmento.
3. Que sea fácil acceder a ella. Idealmente, que esté publicada en una base de datos de fácil acceso.

1.10 Base de datos de experimentos.

En la actualidad, existe un elevado número de grupos de investigación que mantienen, como uno de sus objetivos, la identificación de variabilidad genética. Algunos utilizan esta información para buscar una base genética que explique al menos parte de las variaciones fenotípicas que se observan en caracteres de interés económico.

La investigación genética es enormemente activa. Los conocimientos y las técnicas evolucionan con inusitada rapidez. Los investigadores suelen aplicar diversas técnicas de Genética Molecular, que deben poner a punto para captar cada tipo concreto de variabilidad. Durante este proceso se utiliza una enorme cantidad de información que es preciso almacenar y analizar.

Tradicionalmente se utiliza el cuaderno de laboratorio como bitácora. El cuaderno es en realidad un diario de laboratorio en el que se registran todos los detalles de cada uno de los procedimientos realizados para cada experimento. Es una herramienta imprescindible, con unos objetivos claros, que permite almacenar todos los acontecimientos que pueden explicar el resultado del trabajo de cada día.

El contenido de un cuaderno no está estandarizado, dado que es un documento en el que cada investigador organiza la información siguiendo su criterio. Sin embargo, no debe ser un documento privado, especialmente en relación con los investigadores en formación. Debe estar a disposición, al menos, de los directores del proyecto, que deben revisarlo y analizarlo periódicamente.

Además de constituir un método de archivo de información que, en general, supera nuestra capacidad memorística, la información que contiene un cuaderno de laboratorio debe utilizarse para analizar cada detalle de cada experimento. Es en el necesario análisis de la información contenida en el cuaderno, cuando este se muestra menos eficiente. Se le pueden atribuir las siguientes carencias:

- Por su propio formato, no permite realizar búsquedas automáticas.
- No es posible reordenar la información que contiene. El cuaderno está ordenado por fechas y, a lo sumo, por capítulos. No permite ordenar, extraer ni introducir información de forma práctica.

- No permite validaciones automáticas de la información introducida. Así, un error en un cálculo, puede no ser detectado y mantenerse en los cálculos derivados.
- No resiste bien el paso del tiempo. A medida que aumenta la distancia temporal entre el momento de escribir el cuaderno y el momento de revisarlo cuesta más trabajo entender lo escrito, porque se va perdiendo en el olvido el contexto en que se hacían las cosas.
- No es fácil de respaldar.
- El cuaderno difícilmente se puede compartir con personal ajeno a la investigación.
- El cuaderno no puede soportar todos los tipos de datos producidos. Por ejemplo: audio, imágenes complejas, video. Algunos datos, por su extensión, no permiten su almacenamiento en el cuaderno.

Todas estas carencias pueden ser suplidas mediante la utilización adicional de herramientas informáticas.

El objetivo de este trabajo es, por lo tanto, desarrollar una herramienta capaz de almacenar la información procedente de los cuadernos de laboratorio y facilitar su análisis.

Abordar este objetivo requiere un doble esfuerzo. Por una parte, se requiere conocer todos y cada uno de los aspectos que deben ser integrados en la herramienta informática. Para ello, es necesario:

1.- Conocer en profundidad en qué consiste un cuaderno de laboratorio:

- Qué información contiene o debe contener.
- Cuáles son los sistemas de anotación más importantes.

2.- Saber cuáles son los análisis que suelen realizarse con la información contenida en los cuadernos de laboratorio.

3.- Conocer qué tipo de información debería ser posible extraer de forma ordenada, etc.

Por otra parte, es necesario evaluar las herramientas informáticas disponibles para poder adaptar aquella que más se aproxime al ideal buscado o diseñar una herramienta idónea. Además, es necesario comprobar la utilidad de la herramienta diseñada. Indudablemente es necesario disponer de la formación adecuada para abordar este aspecto concreto.

La información generada en un laboratorio puede ser importante, tanto para la recopilación de resultados de los experimentos como para la gestión de dicho laboratorio. En los grandes hospitales se utilizan sistemas informáticos de laboratorio (SIL) para gestionar la enorme cantidad de información que manejan. El desarrollo de los SIL en las últimas décadas, unido al de los grandes autoanalizadores y al de la robótica, ha posibilitado un aumento extraordinario de la capacidad y la eficiencia de los laboratorios (López, 2012). Sin embargo, la decisión de su implantación está condicionada muchas veces por el enorme coste que suelen tener y las necesidades de formación del personal (Aguilera Gámiz et al., 2014).

En un laboratorio pequeño puede resultar impensable la implantación de un sistema informático comercial pero no por ello se debe renunciar a los beneficios de la gestión informatizada.

1.11 Objetivos.

El **OBJETIVO GENERAL** de este trabajo es el estudio de la variabilidad genética de genes candidatos implicados en la producción láctea en el ganado ovino. Este objetivo se ha concretado en el estudio de la variabilidad de los genes de la oxitocina-neurofisisina (OXT), de la prolactina (PRL), del receptor de la hormona del crecimiento (GHR), de la hormona de crecimiento (GH) y del exón 8 del gen de la Acil CoA:Diacylglicerol Acetil Transferasa (DGAT1).

Para realizar este estudio se marcaron los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

1. Optimizar las reacciones de PCR necesarias para amplificar los fragmentos de ADN en estudio.
2. Evaluar la utilidad del método de análisis de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) para la detección de variabilidad genética no descrita.
3. Evaluar la utilidad del método SSCP para el genotipado de la variabilidad genética.
4. Determinar la variabilidad genética de los genes estudiados y su posible aplicación en estudios en ganado ovino de leche.
5. Analizar la posible asociación entre los polimorfismos detectados en los genes candidatos y algún carácter de producción de leche o funcionales (recuento de células somáticas, morfología mamaria y corporal) en la oveja.
6. Crear un sistema informático capaz de almacenar y gestionar de manera eficiente los resultados obtenidos.

MATERIALES

2 Materiales.

2.1 Muestras de ADN.

Las muestras de ADN empleadas en los experimentos de esta Memoria procedieron de diversas razas ovinas.

La relación de muestras utilizadas es la siguiente:

- a. Experimentos de detección de variabilidad genética en los fragmentos de ADN de varios genes candidatos a QTL para producción de leche, mediante el análisis de SSCP y evaluación de la utilidad de esta técnica como mecanismo de genotipado de dicha variabilidad. Se emplearon un total de 394 muestras de ADN, repartidas de esta forma:
 - 37 muestras de ovejas de raza Assaf;
 - 4 muestras de ovejas de raza Awassi;
 - 16 muestras de ovejas de raza Castellana;
 - 287 muestras de ovejas de raza Churra;
 - 22 muestras de ovejas de raza Lacaune;
 - 4 muestras de ovejas de raza Latxa;
 - 4 muestras de ovejas de raza Manchega;
 - 16 muestras de ovejas de raza Merino;
 - 4 muestras de ovejas de raza Milchschaf.

Algunas de estas muestras se emplearon en posteriores experimentos de secuenciación para comprobar la variabilidad encontrada.

- b. Experimento de estimación del número de copias del gen de la hormona de crecimiento (GH) y asociación con caracteres de producción:
Se emplearon 456 ovejas de raza churra genotipadas por el método de genotipado del número de copias del gen GH. Estas ovejas pertenecen a ganaderos de la asociación ANCHE (ANCHE, 2015).

2.2 Fenotipos.

Los datos registrados en la base de datos de producción empleada en este trabajo proceden del control lechero oficial; los datos de composición de ácidos grasos fueron obtenidos por Barbosa, 2009 y han sido descritos por De la Fuente (2009). La **base de datos de producción** contiene 1996 registros que se generan al agrupar las distintas repeticiones de los análisis de las 456 ovejas genotipadas. También se dispuso de las bases de datos de lactaciones y de morfología que pertenecen a la asociación de criadores ANCHE. Estas dos últimas se combinaron en una sola **base de datos de lactación y morfología**. Para esto, se calcularon los promedios de las calificaciones morfológicas obtenidas para cada animal así como los promedios de los datos de lactación “corderos nacidos”, “corderos nacidos vivos”, “Kg de proteína”, “lactación real”, “lactación a 120 días” y “días en lactación”. Para cada oveja se registraron los datos morfológicos y de lactación en función del calificador (persona que realiza la valoración morfológica) y del número de parto. Así, la base de datos de morfología y lactación contiene 3173 registros, que quedaron en 2809 tras eliminar los valores atípicos.

A cada base de datos se le añade la variable “valoración del número de copias del gen GH (NC)”, que fue estudiada como variable numérica, tal cual, o como variable categórica, redondeando el resultado obtenido al entero de copias más próximo. Los datos de estimación de número de copias se obtuvieron por PCR cuantitativa comparando las fluorescencias de una sonda TaqMan[®] específica del gen GH con la de un fragmento normalizador del gen GLCO.

2.3 Kits comerciales.

Además de las PCRs realizadas por el método habitual, se han empleado los siguientes kits comerciales para la realización de algunas PCRs.

- Advantage-GC Genomic PCR (Clontech).
- CERTAMP Kit Long Amplifications (Biotools).
- Expand Long Range, dNTPack (Sigma-Aldrich).
- Fidelity PCR Master Mix (Affimetrix).
- GC-Rich Template and Complex PCR Amplification | Advantage GC 2 Polymerase Mix and PCR Kit (Clontech).

Las clonaciones en TOPO[®] utilizaron el kit de propio vector: “kit TOPO[®] TA Cloning” (ThermoFisher Scientific).

La extracción de ADN de bandas de gel utilizó el kit “QIAquick PCR Purification Kit” (QIAGEN).

Para la purificación de ADN se ha utilizado el “Kit NucleoSpin[®] Plasmid Protocol-at-a-Glance” (MACHEREY-NAGEL).

2.4 Termocicladores.

Para la realización de las PCRs se han utilizado termocicladores de los siguientes modelos:

Perkin Elmer PE 9700 Thermal Cycler.

Applied Biosystems[®] / Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 Thermal Cycler.

Applied Biosystems[®] 2720 Thermal Cycler.

Applied Biosystems[®] 9800 Fast Thermal Cycler.

Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System.

2.5 SSCP.

Se ha empleado el equipamiento de Bio-Rad para la realización de los experimentos de SSCP: DCode[™] Universal Mutation Detection System⁴.

Las matrices de gel utilizadas han sido acrilamida/bisacrilamida (en diferentes proporciones: 37,5:1; 29:1, 19:1) y MDE.

La secadora de geles es una Bio-Rad modelo 583⁵.

2.6 Secuenciadores.

Para los experimentos de secuenciación se han empleado los siguientes secuenciadores:

ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer.

ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer.

⁴ <http://www.bio-rad.com/es-es/product/dcode-universal-mutation-detection-system>;

⁵ <http://www.bio-rad.com/es-es/product/model-583-gel-dryers>

MegaBACE 1000 DNA Sequencing System. Este es un secuenciador capilar operado por el personal del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León.

2.7 Vectores.

Para la clonación de productos de PCR se ha empleado el vector TOPO® (Invitrogen, 2006) y pBluescript II KS + (Stratagene, 2006).

2.8 Células competentes.

Los plásmidos resultantes de la unión del vector TOPO® con los productos de PCR se han amplificado en células competentes de *Escherichia coli*, cepa DH5α.

2.9 Programas empleados.

Para el análisis de los datos se ha empleado tanto el software propio de cada aparato como programas de libre acceso. Se detallan a continuación.

2.9.1 Suite Consed.

Es una *suite* compuesta por varios programas de manejo de secuencias que sólo está disponible para entornos UNIX. Estos programas suelen ejecutarse en cascada de forma que los datos siguen esta secuencia de procesamiento: Phred→ Phrap→ Polyphred→Consed.

2.9.1.1 Phred.

El programa Phred (Ewing and Green, 1998) es el encargado de la asignación de bases (del inglés *base caller*). Crea una secuencia de bases (letras) a partir de la secuencia de picos del electroferograma (intensidades luminosas). Para ello tiene en cuenta la forma de los picos, su color, el espaciamiento, el ruido de fondo, etc. Este programa asigna la base más probable a cada pico, pero no está diseñado para detectar posiciones heterocigotas. Genera un valor de calidad de secuenciación que es un indicador de la fiabilidad de la asignación de cada base.

2.9.1.2 Phrap.

El programa Phrap (Green, 1994) utiliza los archivos generados por Phred para ensamblar todas las secuencias de una misma región. Cada ensamblamiento se conoce como “contig”. Genera también la secuencia consenso del alineamiento. Utiliza los valores de calidad de secuenciación generados por Phred para crear mejores ensamblamientos. Ignora las bases de las secuencias del vector de clonación, si lo hubiere.

2.9.1.3 Polyphred.

El software Polyphred (Nickerson et al., 1997) sirve para detectar las posiciones heterocigotas. Este programa compara cada posición de cada secuencia con la de las demás secuencias del mismo alineamiento y marca todas las bases en cada posición polimórfica como homocigoto o heterocigoto.

2.9.1.4 Consed

Consed (Gordon et al., 1998) es el único programa de la *suite* que tiene una interfaz gráfica y que se utiliza para manipular, de forma visual, los alineamientos. Puede

llamar a programas precedentes en el flujo de trabajo. Ej. Llama a Phrap para reensamblar los *contigs*, cuando es necesario. Permite la edición manual de los alineamientos para corregir los errores que haya podido cometer el proceso automático, hacer búsquedas de secuencias, de heterocigotos, etc., y permite anotar los alineamientos mediante *tags* (Gordon, 2003).

2.9.2 Staden.

El paquete Staden (Staden et al., 2000) es una *suite* de programas con origen comercial cuyo código fuente fue liberado y es ahora mantenido con licencia libre (BSD). Los principales programas del paquete son “Gap4”, sirve para editar la base de datos de ensamblamientos creada por la utilidad “PreGap4”, y “Spin”: una utilidad de análisis de las secuencias.

Está disponible para los sistemas operativos Unix, Linux, MacOSX y MS Windows. El manejo del paquete Staden es más intuitivo, para los usuarios acostumbrados a los entornos Windows, que Consed.

2.9.3 ClustalX.

ClustalX (Lombard et al., 2002) es una interfaz gráfica para el programa de alineamiento Clustal. Permite alinear localmente archivos de secuencias en formato FASTA.

2.9.4 Genedoc.

Genedoc (Nicholas and Nicholas, 1997) es un software de edición de alineamientos. Permite visualizar y editar los alineamientos generados por Clustal.

2.9.5 FinchTV.

FinchTV (Geospiza, 2006) es una utilidad muy sencilla de visualización de electroferogramas. Destaca por tener una interfaz gráfica extraordinariamente intuitiva.

2.9.6 Vector NTI.

Vector NTI (Lu, 2004) es una *suite* de utilidades que sirven para almacenar, editar y alinear secuencias. En este trabajo se utilizó para diseñar PCRs y almacenar secuencias mientras la licencia de acceso fue gratuita.

2.9.7 Artemis.

Artemis (Rutherford et al., 2000) es un software de visualización y edición de secuencias de libre disposición. Es multiplataforma por estar programado en java.

2.9.8 Unipro UGENE.

Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Es una suite de programas gratuita que tiene funciones similares al Vector NTI. No es tan intuitiva.

2.9.9 SnapGene Viewer

SnapGene Viewer (GSL Biotech, 2015) es un editor y visualizador de secuencias gratuito que forma parte de una *suite* comercial. Es otra alternativa al Vector NTI, como UGENE, pero su interfaz está más cuidada. Sin embargo, las funciones

avanzadas no están disponibles y para su utilización requiere la compra de la versión de pago (Snap Gene).

2.9.10 R.

El paquete R (R Core Team, 2015) se ha utilizado para realizar los análisis estadísticos.

MÉTODOS

3 Métodos.

En esta sección se detallan los métodos analíticos utilizados en el laboratorio para la realización de este trabajo. La preparación de las soluciones necesarias para realizar estos métodos se detallan en el Anexo II, pág. 417.

3.1 Extracción de ADN de muestras de sangre.

Las muestras se obtienen mediante punción de la vena yugular. Se recogen unos 5 ml de sangre en tubos al vacío de 10 ml que contienen EDTA-K₃ como anticoagulante (Venoject®). La extracción del ADN se realiza mediante el método “Salting out”, descrito por Miller et al., 1988.

3.1.1 Salting Out.

La extracción del ADN se realiza a través de los siguientes pasos:

3.1.1.1 Lavado.

1. Añadir **10 ml de T₁₀E₁₀** (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM).
2. **Agitar** 20-30 segundos en el vórtex.
3. Centrifugar a **2500 rpm** durante **20 minutos a 4 °C**, para precipitar los leucocitos.
4. **Eliminar** la mayoría del **sobrenadante**, dejando solamente el último mililitro.
5. Añadir **15 ml de T₁₀E₁** (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM), para lavar los leucocitos.
6. **Agitar** 20-30 segundos en el vórtex.
7. Centrifugar a **2500 rpm** durante **20 minutos a 4 °C**.
8. **Repetir** los 4 últimos pasos **hasta que** el precipitado **quede limpio**.
9. **Eliminar** la mayoría del **sobrenadante**, dejando solamente el último mililitro.

3.1.1.2 Digestión.

1. **Resuspender** el precipitado del paso anterior **en 3 ml de tampón de digestión** (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 2 mM pH 8,0; NaCl 0,4 M).
2. **Agitar** 20-30 segundos en el vórtex.
3. Añadir **500 µl** de solución de **proteínasa K** (proteínasa K 2 mg/ml; SDS 10 % v/v; EDTA 30 mM).
4. Añadir **200 µl** de **SDS** al 10 % (v/v).
5. **Mezclar** bien.
6. Incubar a **37 °C toda la noche**; ó 2 horas a 65 °C.

3.1.1.3 Precipitación de las proteínas.

1. Añadir **1 ml** de **NaCl** 6 M (solución saturada).
2. **Agitar** 20-30 segundos en el vórtex.
3. Centrifugar a **2500 rpm** durante **20 minutos a 4 °C**.
4. Pasar el sobrenadante a un **tubo nuevo**.

3.1.1.4 Precipitación del ADN

1. Añadir **5 ml** de **etanol** absoluto.
2. **Recoger** el ovillo que forma el **ADN** con la ayuda de una pipeta *Pasteur* cerrada.
3. Lavar el ovillo adherido a la punta de la pipeta en **etanol al 70 %**.
4. **Secar** al aire durante **1 minuto**.
5. Resuspender en **400 ml de T₁₀E₁** estéril.

Este es el ADN que se almacenará a 4 ó a -20 °C para posteriores experimentos.

3.2 Extracción de ADN con el Kit NucleoSpin® Plasmid Protocol-at-a-Glance.

Este protocolo se utiliza para purificar ADN cuando es necesario ADN muy limpio.

1. Cargar 1 µl de cultivo en un tubo eppendorf y centrifugarlo durante **30 segundos a 11000 ×g**.
2. Eliminar el sobrenadante mediante **bomba de vacío**.
3. **Añadir** otro microlitro de **cultivo y repetir** los pasos anteriores hasta haber obtenido el precipitado de todo el volumen de cultivo.
4. Resuspender el precipitado en **250 µl de tampón A1**. Este tampón debe mantenerse refrigerado a 4 °C para evitar la degradación de la RNAsa contenida.
5. **Mezclar** cuidadosamente de 6 a 8 veces **por inversión**.
6. Centrifugar durante **10 minutos a 11000 ×g**.
7. Situar una columna sobre un tubo **colector** de 2 ml y cargar el sobrenadante en ella.
8. Centrifugar **1 minuto a 11000 ×g**.
9. Descartar el filtrado.
10. Añadir **600 µl** de tampón **A4** (con etanol) a la columna.
11. Centrifugar durante **1 minuto a 11000 ×g**.
12. Descartar el filtrado.
13. **Centrifugar 2 minutos a 11000 ×g en vacío** para eliminar los restos de etanol.
14. Colocar la columna en un Eppendorf® estéril correctamente rotulado.
15. Añadir **50 µl** de tampón **AE**.
16. Incubar **1 minuto a temperatura ambiente**.
17. Centrifugar **1 minuto a 11000 ×g**.

El ADN está ahora en el filtrado.

3.3 PCR.

La PCR es la técnica básica en la que se apoyan la mayoría de las utilizadas en biología molecular. Para llevarla a cabo basta con mezclar los componentes de la reacción y someterla a entre 25 y 50 ciclos de desnaturalización, anillamiento y amplificación (ver Figura 5).

Los componentes imprescindibles para una reacción de PCR son:

- el ADN molde,
- los cebadores,
- los dNTPs,
- cloruro magnésico (MgCl₂),
- la enzima Taq polimerasa.

Las cantidades de cada uno de estos componentes, más la de otros aditivos, pueden variar enormemente entre unos fragmentos y otros y entre unas aplicaciones y otras. Conviene optimizarlas para cada caso.

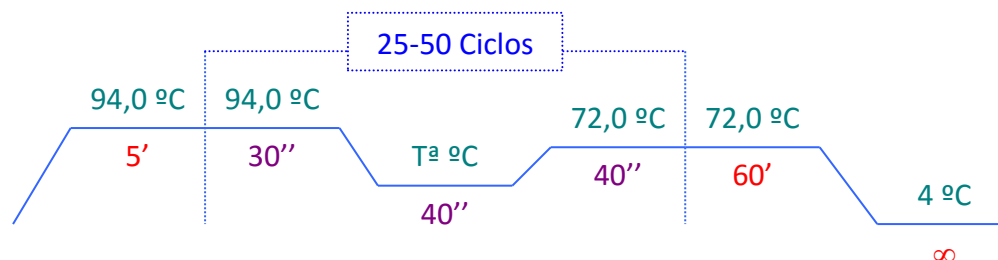


Figura 5: Esquema de un programa habitual de PCR.

Este es el esquema de un protocolo genérico de PCR. Para cada paso de PCR se indica la temperatura a la que ocurre (en verde, sobre la línea horizontal) y el tiempo que dura (los minutos se muestran en rojo, los segundos en morado, debajo de la línea horizontal). El ciclo central suele repetirse entre 25 y 50 veces. La temperatura del paso central del ciclo es variable, depende de la temperatura de fusión de los cebadores y, habitualmente, debe optimizarse para cada fragmento. El paso a 4 °C tiene duración ilimitada.

3.3.1 Optimización de la PCR.

La PCR estándar tiene lugar a 55 °C y con una concentración de $MgCl_2$ de 1,5 mM. A partir de ella se suele variar la temperatura, aumentándola o disminuyéndola en 2 ó 3 grados y la concentración de sales se lleva a los valores de 0,75 mM, 2 mM, 3 mM o 4 mM. Si el problema es la falta de amplificación se tiende a bajar la temperatura y a aumentar la concentración de $MgCl_2$; si el problema es un exceso de bandas inespecíficas se hace lo contrario.

En cualquier caso, la información de la secuencia del ADN amplificado y de los cebadores puede dar pistas que ahorren tiempo de laboratorio. Se suele comenzar con 5 °C menos que la T_m (Temperatura de fusión) de los cebadores. Si la secuencia a amplificar tiene un alto contenido en GC resulta muy útil añadir betaína 0,5 mM ó 0,91 mM.

3.4 ExoSAP-IT®.

Este es el protocolo para añadir las enzimas que limpian las PCRs de productos amplificados de pequeño tamaño. El complejo enzimático utiliza 2 enzimas: la exonucleasa I (EC 3.1.11.1), que elimina los oligonucleótidos de cadena simple, y la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1), que defosforila los dNTPs. Así, la exonucleasa limpia los cebadores excedentarios y la fosfatasa elimina los dNTPs no unidos en la reacción de polimerización. El procedimiento de limpieza es este:

1. Añadir (por muestra):
 - 2 µl de ExoSAP-IT® (Affimetrix)
 - 10 µl de ADN
2. Utilizar el programa ExoSAP-IT para favorecer la reacción enzimática: 37° 45 min. + 80° 15 min (ver Figura 6).

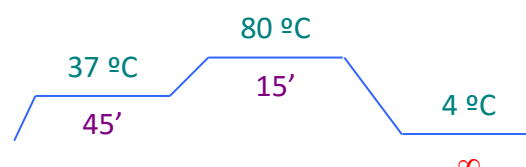


Figura 6: Esquema del programa ExoSAP-IT

En la parte superior, en verde se recoge la temperatura que alcanza cada paso. En la parte inferior se indica el tiempo que dura cada paso.

3.5 SSCP.

La técnica de detección de Polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) se basa en el cambio de movilidad que tienen las cadenas simples de DNA cuando cambia su estructura tridimensional como consecuencia de variaciones en su secuencia de nucleótidos.

Para optimizar los resultados suele ser necesario evaluar empíricamente varias condiciones experimentales. Según Orti et al., 1997 la temperatura de electroforesis y la concentración del gel son parámetros que producen los cambios de conformación más importantes. Por ello es recomendable optimizarlos cuidadosamente para cada fragmento.

La técnica consiste en cargar los productos desnaturalizados de una PCR en un gel de acrilamida desnaturalizante y teñir el resultado con nitrato de plata. En estas condiciones las hebras de ADN se separan en función de su secuencia nucleotídica. El detalle de la técnica se recoge en los apartados siguientes:

3.5.1 PCR de amplificación del ADN.

El primer paso del análisis es hacer una PCR normal que permita multiplicar el número de copias del fragmento de ADN de interés. Conviene tener en cuenta ciertas restricciones que impone la técnica. Así:

- El tamaño del fragmento amplificado debe estar entre 150 y 300 pb.
- Longitudes inferiores a 150 pb incrementan la importancia relativa de la zona de extremos de la secuencia. En ella la detección de mutaciones puntuales es menos eficiente.
- Longitudes superiores a 300 pb disminuyen la importancia relativa que el cambio de secuencia produce en la movilidad del conjunto, además incrementan el tiempo necesario para lograr una correcta resolución de las bandas, ya que la movilidad de las secuencias largas es más lenta que la de las cortas.

La concentración de los cebadores de PCR debería ajustarse a la concentración más baja posible. Se ha publicado que el exceso de cebadores de PCR puede afectar a la eficiencia de SSCP ya que, al interactuar con la secuencia amplificada, disminuirían el poder de discriminación del método (Cai and Touituo, 1993).

El protocolo habitual de una reacción de PCR se puede consultar en el punto 3.3 “PCR.”, pág. 38.

3.5.2 Gel de agarosa al 2%.

Una vez concluida la PCR debe comprobarse que se ha producido la amplificación de la cadena buscada. Como diagnóstico se hace una electroforesis en un gel de agarosa junto con un estándar de peso molecular. El resultado obtenido debe ser la aparición de una única banda del tamaño de la secuencia amplificada. La preparación del gel de agarosa al 2% se detalla en el punto 8.2.5 “Gel de agarosa.”, pág. 419.

3.5.3 Preparación del gel de acrilamida.

Se prepara un gel de **80ml de acrilamida 37,5:1 al 12%, con glicerol al 5%** siguiendo las instrucciones recogidas en el apartado 8.2.8 “Gel de acrilamida al 12%, con glicerol al 5%.”, pág. 420.

También se puede utilizar MDE en lugar de acrilamida (Westburg, 2015). En este caso, las proporciones se ajustan siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.3.1 Preparación del tampón de carga de formamida.

El tampón de carga lleva formamida para prevenir la renaturalización del ADN después de someterlo al choque térmico. Se prepara de acuerdo a lo descrito en el punto 8.2.1.3 “Tampón de carga de formamida.”, pág. 417. Se mezclará tanto volumen de tampón como de ADN procedente de la PCR.

3.5.3.2 Desnaturalización del ADN.

Ocurre por choque térmico a 94 °C durante 5 minutos.

Tras este tiempo se baja rápidamente la temperatura en hielo para evitar en lo posible que las cadenas simples hibriden.

3.5.3.3 Electroforesis.

El objetivo de este paso es diferenciar claramente los distintos patrones de bandas que se producirán como consecuencia del cambio de movilidad de aquellos fragmentos en cuyas secuencias haya cambios. Para ello se siguen estos pasos:

1. La cubeta de electroforesis se rellena con **6 litros** de tampón **TBE 1×**.
2. Conectar el sistema de **refrigeración** para que el tampón alcance la temperatura de **6 °C**.
3. Se **montan los geles** en la cubeta de electroforesis.
4. **Limpiar** los pocillos.
5. **Cargar** entre 10-25 µl de la muestra.
6. Tapar la cubeta.
7. Se **enciende** la fuente de electroforesis y se seleccionan 5 W por cada gel de 20 cm y 14 horas de corrido, en caso de que el protocolo no esté optimizado, o las condiciones apropiadas cuando el protocolo ha sido optimizado. En caso de usar como matriz de gel MDE, el tiempo de electroforesis puede reducirse notablemente, a 4 horas.

Una vez concluida la electroforesis se tiñe con plata el ADN.

3.5.3.4 Tinción con nitrato de plata (para geles de acrilamida).

Antes de comenzar el protocolo, se deben preparar las soluciones de tinción con nitrato de plata. Par ello, consultar el punto 8.2.11 “Soluciones para tinción con nitrato de plata.”, pág. 420.

El protocolo de tinción sigue estos pasos:

1 **Fijación:** 10 minutos. Sumergir el gel de acrilamida en 100 ml de ácido acético 10 % (Fijador).

2 **Lavado:** El paso de lavado consiste en:

- + Enjuagar 2 veces con agua desionizada, y, en seguida,
- + Cubrir con agua, y agitar durante 10 a 15 minutos.
- + Retirar el agua y enjuagar nuevamente.

3 **Impregnación:** 30 minutos. Sumergir el gel de acrilamida en:

- 100 ml de solución de AgNO_3 (Solución de impregnación).
- 140 μl de formaldehído (35 %).

4 **Lavado:** 10 segundos. Con agua desionizada.

5 **Revelado:** Sumergir el gel de acrilamida, hasta obtener el contraste adecuado en:

- 100 ml de solución de revelador.
- 170 μl de formaldehído al (35%).
- 15 μl de tiosulfato sódico (0,1M).

6 **Parada:** 5 minutos. Sumergir el gel en ácido acético glacial al 10 %.

3.5.3.5 Lectura de bandas.

Sutiles diferencias en las condiciones ambientales en el proceso de tinción pueden producir resultados variables. Así, el contraste de las bandas con el fondo puede no ser óptimo y debe maximizarse para poder realizar una lectura adecuada de los geles. Como el proceso de SSCP es muy dependiente de condiciones ambientales, los resultados finales pueden parecer muy diferentes (ver Figura 7). Sin embargo, el patrón de bandas es constante.

La mejor forma de leer las bandas es situar el gel sobre un transiluminador de luz blanca o negatoscopio.

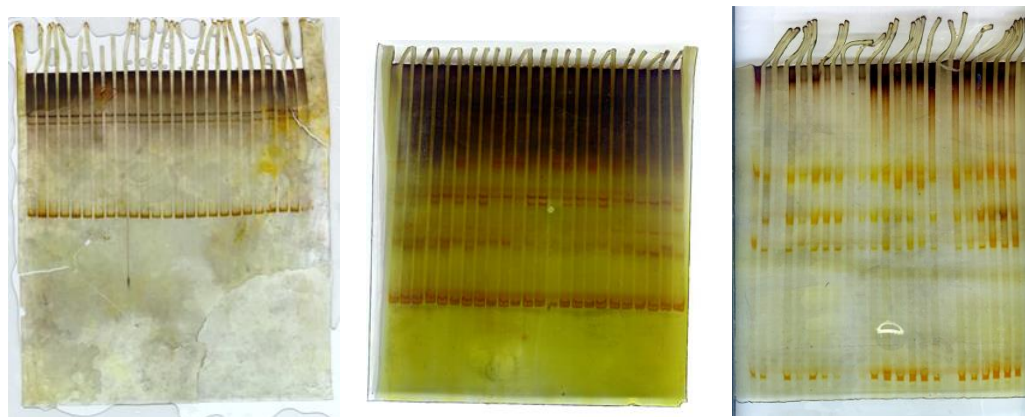


Figura 7: Distintos geles de SSCP.

Sutiles diferencias en las condiciones de tinción pueden producir geles con de SSCP con características muy diferentes.

A falta de instrumental digital adecuado para la detección de bandas, esta se puede hacer de forma manual. Se podrá variar el ángulo de inclinación del gel o utilizar técnicas de contraste de fases para determinar el perfil de bandas de cada muestra.

El perfil se dibuja en el cuaderno de laboratorio, para cada muestra.

Se considera que cada patrón de bandas corresponde a un mutante y se numeran correlativamente. Así, al primer patrón se le denomina N, al segundo M1, al tercero M2 etc.

Se asigna cada muestra a un código de mutante.

Se almacena en la base de datos el mutante asignado a cada muestra, así como un esquema que representa cada patrón de bandas. Este proceso se resume en la Figura 8.

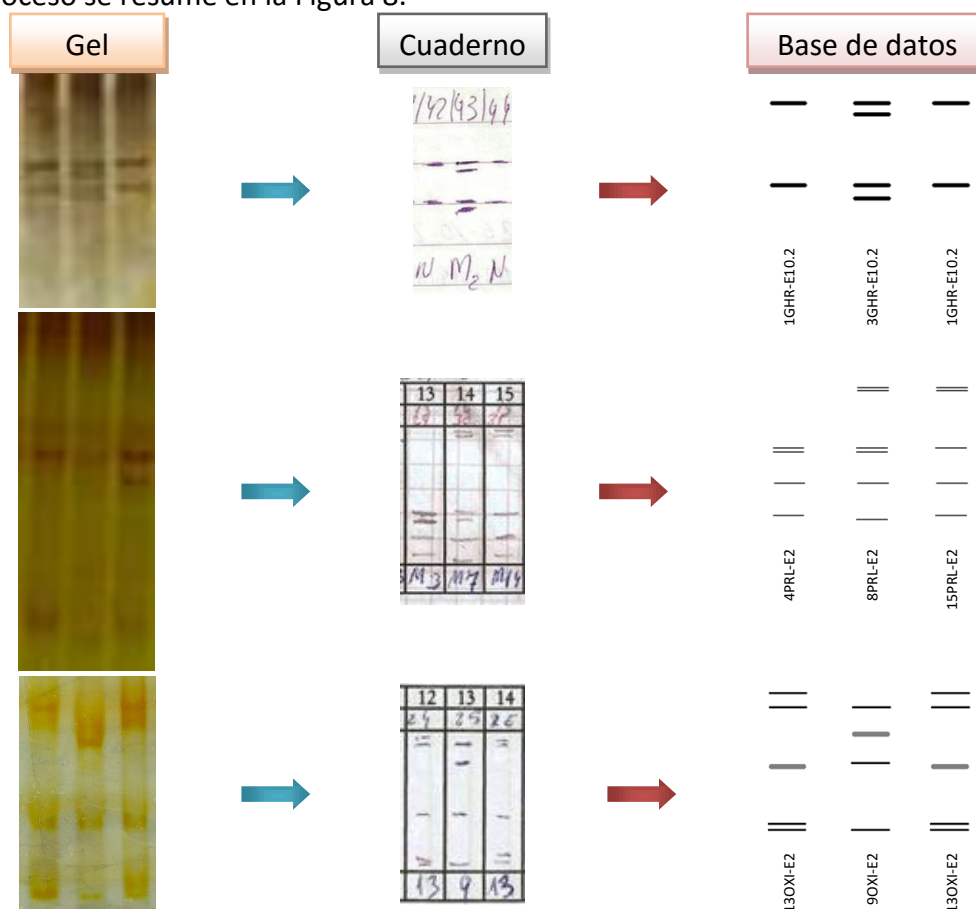


Figura 8: Extracción de datos de los geles de acrilamida.

En la 1ª columna se muestran secciones de 3 geles. Sus tinciones son diferentes.

En la 2ª columna se muestra el resultado del reconocimiento visual, manual, de las bandas. Son secciones del cuaderno de laboratorio. Los datos pueden recogerse de distinta forma. En el superior se dibuja un esquema del gel. En los dos de abajo, cada esquema se dibuja en el hueco correspondiente de una plantilla que fue creada para facilitar la recogida de los datos. La primera fila de números (en el superior no está presente) indica el pocillo del gel. La segunda fila de números indica el número de muestra.

La fila inferior indica el número de mutante (a juicio del investigador). Nótese que el 2º gel se escaneó invertido con respecto a su esquema.

La 3ª columna muestra cómo se almacenan los resultados en la base de datos.

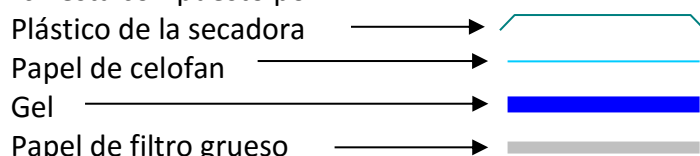
El proceso de detección de las bandas consigue unificar geles con condiciones de tinción muy distintas en registros de una base de datos que son muy fácilmente consultables. En un primer paso, se crea un esquema de lo que ve en los geles. Luego se comparan los esquemas y asignan a cada tipo un número de mutante distinto. Deben diferenciarse aquellas muestras que presentan el mismo patrón de las demás. Los datos se almacenan en la base de datos diseñada y quedan disponibles para su estudio posterior.

3.6 Secado de geles de SSCP.

Para conservar el gel en el tiempo se debe secar. Para ello se siguió este protocolo:

1. El gel se monta sobre papel y se cubre con plástico (de envolver alimentos).
2. Se cubre con el plástico de la máquina secadora (para hacer el vacío).
3. Se conecta la bomba de vacío.
4. Seleccionar el segundo ciclo de la secadora:
5. Dejar secando 30 minutos a 90 °C. Para geles de MDE utilizar 35 minutos.

El sandwich está compuesto por:



6. Dejar enfriar al aire, en la mesa.

3.7 Clonación.

El protocolo de clonación persigue la replicación de una secuencia de ADN. Para ello, se introduce esta en un plásmido que, a su vez, transforma bacterias competentes. Las bacterias se multiplicarán cuando se desee obtener el material genético.

3.7.1 Clonación de fragmentos de PCR mediante el kit TOPO®-TA cloning

El sistema TOPO®-TA cloning contiene un vector comercial especialmente diseñado para poder clonar fragmentos de PCR de interés.

3.7.1.1 PCR

La **PCR** debe ser hecha con la Taq polimerasa. El programa de PCR debe terminar con un tiempo de extensión de 7 a 30 minutos (habitualmente 15 minutos). De esta forma se garantiza que tenga lugar la **actividad +A** de la Taq polimerasa (ver 3.3 “PCR.”, pág. 38).

Tras la PCR, se debe analizar cada muestra de PCR mediante electroforesis en **gel de agarosa** (ver 8.2.5 “Gel de agarosa.”, pág. 419.).

La amplificación debe haber sido intensa y clara. Así se asegura una buena cantidad de ADN para la transformación y se evita la existencia de otras secuencias de ADN diferentes de la deseada. Es conveniente incluir en el gel al menos un marcador de peso molecular y un marcador cuantificado.

3.7.1.2 Cortar bandas de ADN del gel de agarosa.

El procedimiento para extraer una banda de PCR de un gel de agarosa sigue estos pasos:

1. Disponer de tantos tubos Eppendorf® como bandas se desee extraer y pesarlos en vacío.
2. **Cortar las bandas del gel.** Se extienden dos capas de plástico sobre la superficie del transiluminador para protegerlo de ralladuras. Encima se pone el gel sin cubeta. Se enciende el transiluminador a baja potencia y se corta la banda con la máxima celeridad para evitar mutaciones por radiación. Cada gajo del gel, que contiene la banda, se introduce en un

Eppendorf®. Debe lavarse el bisturí con alcohol después de extraer cada banda.

3. Hacer una **foto** del gel. El tamaño de las bandas se calcula comparando el hueco que dejan al ser cortadas con el patrón de peso molecular.

3.7.1.3 Extracción del ADN del gel con el kit QIAquick.

Este es el procedimiento para purificar la banda extraída del gel de agarosa.

1. Pesar y **destarar** cada eppendorf para averiguar la masa de cada fragmento de gel cortado.
2. Añadir **3 volúmenes de tampón QG** a cada volumen del gel. Se asume que 100 mg equivalen a 100 microlitros.
3. **Incubar** a 50 °C durante 10 min. Debe disolverse completamente el fragmento de gel de agarosa. Agitar suavemente el tubo cada 3 minutos para ayudar a la correcta disolución.
4. Comprobar que la dilución es de color amarillo. Esto asegura que el pH es el correcto para la extracción.
5. Añadir **un volumen de isopropanol** y mezclar.
6. Colocar una columna en un tubo de 2 ml.
7. Verter la muestra en la columna y **centrifugar** 1 min a 14000 rpm.
8. Desechar el líquido filtrado.
9. Añadir 0,75 ml de tampón **PE** (para lavar) y **centrifugar** 1 minuto a 14000 rpm.
10. Desechar el líquido filtrado.
11. **Centrifugar** 1 min a 14000 rpm en vacío.
12. Colocar la columna en un eppendorf nuevo y roturarlo.
13. Añadir 50 µl de **tampón EB**, u otra cantidad dependiendo de la dilución que se desee. Este tampón arrastrará al ADN que se hallaba unido a la membrana de la columna.
14. **Centrifugar** 1 min a 14000 rpm. El filtrado contiene el ADN de la banda.
15. Es recomendable cargar una alícuota del ADN obtenido en un gel de agarosa de cuantificación con objeto de conocer la cantidad de ADN recuperado. En su lugar también se puede utilizar un espectrofotómetro como el NanoDrop® que sólo consume 1 µl.

3.7.1.4 Reacción de ligación con TOPO®.

En este paso, el ADN de la PCR se liga con el vector TOPO®. Este es un vector comercial que tiene extremos cohesivos de una sola base: la T. Esta enlaza con la A producida por la actividad +A. El vector tiene un protocolo propio de ligación optimizado por el fabricante. Es este:

1. Realizar la siguiente **reacción** en un volumen final de 6 µl:
 - a. Producto fresco de **PCR**: de 0,5 a 4 µl.
 - b. Solución de **sales**: 1 µl.
 - c. **Agua** estéril: hasta 5 µl de volumen final.
 - d. **Vector** TOPO: 1 µl.
2. Mezclar con cuidado e **incubar** 5 a 30 min a temperatura ambiente.
3. **Enfriar** en hielo.
4. Puede congelarse a -20 °C toda la noche.

3.7.1.5 Reacción de ligación con vectores habituales.

Con los vectores habituales del laboratorio se suele seguir un protocolo de ligación estandarizado. Habitualmente se realizan mezclas que tienen una proporción molar 1:5 de vector/inserto. Puede determinarse empíricamente qué otras proporciones son más adecuadas. Así suelen ensayarse también las proporciones 1:1, 1:3 y 1:10. Como estas proporciones son molares se deben realizar cálculos previos para hallar las cantidades precisas en cada reacción. Estos cálculos consisten en la resolución del siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} 1) \text{ ngI} &= (\text{ngV} * \text{pbl} * \text{Vi}) / \text{pbV} \\ 2) \text{ ngI} + \text{ngV} &\leq 200 \end{aligned}$$

Siendo:

ngI = nanogramos de inserto
ngV = nanogramos de vector
pbl = pares de bases del inserto
Vi = relación molar inserto/vector
pbV = pares de bases del vector

La fórmula 2 viene dada por las especificaciones del fabricante del kit de ligación que recomienda no utilizar más de 200 ng de ADN total para cada reacción.

Mediante la inclusión de un marcador cuantificado en el gel de agarosa de comprobación de la PCR se conoce la cantidad de producto de PCR (ng / microlitro) que se ha obtenido de la extracción de ADN con el kit QIAquick. Con los datos obtenidos se puede construir una tabla (ver Tabla 1) con las cantidades que se han de añadir a cada reacción. La **ligación** se llevará a cabo en **5 minutos a temperatura ambiente**, una vez hecha la mezcla de reacción.

Componente	Muestra1 (μl)	Control (+) (μl)	Control (-) (μl)
H ₂ O			
ADN V			
ADN I			
Tampón de Dilución (5x)	2	2	2
Volumen inicial:	10	10	10
Tampón de Ligación (2x)	10	10	10
Volumen final:	20	20	20
Ligasa	(Usualmente 1)	(Usualmente 1)	(Usualmente 1)

Tabla 1. Ejemplo de cantidades a añadir a la reacción de ligación con vectores habituales.

3.7.1.6 Dilución de bacterias competentes DH5α

Este paso es necesario para diluir bacterias competentes cuando no hay suficientes para realizar la transformación. Procedimiento:

1. Preparar un **baño “etanol-nieve carbónica” 15 minutos antes** de comenzar para que dé tiempo a que se establezca la temperatura del etanol.
2. **Descongelar** en hielo picado **un tubo de 500 μl de bacterias**. Estas se almacenan en el congelador de -80 °C.

3. Por cada vial descongelado, **marcar** unos **12 tubos eppendorf** y enfriarlos en hielo picado durante, al menos, 2 minutos (en la cabina de flujo laminar o cerca del mechero).
5. **Alicuotar** 50 µl de vial en cada tubo Eppendorf®.
6. **Congelar** las alícuotas sumergiéndolas **en el baño de etanol** enfriado con nieve carbónica. Para ello se sitúan en un flotado sobre el hielo y se pasan rápidamente al baño. Es importante que las células no se calienten para que no pierdan su capacidad de ser competentes.
7. **Almacenar** a -80 °C hasta su uso.

3.7.1.7 Transformación química One Shot® con células normales DH5α

Este es el paso en que el ADN se introduce en la bacteria.

1. **Descongelar** las células de *E. coli* pasándolas del frigorífico de -80 °C a una bandeja con hielo. **Cuidado:** No tocar el fondo del eppendorf hasta no dar el choque térmico. De esta forma el choque será más fuerte porque no se habrá descongelado.
2. Añadir **2 µl** (idealmente 10 ng del plásmido) **de** la “**Reacción** de clonación con TOPO®” a las células de *E. coli* y mezclar evitando contaminaciones (en cabina de flujo laminar).
3. Incubar en **hielo 10 minutos**.
4. Dar un choque de calor de **5 minutos a 37 °C**. Este paso es crítico. Son las condiciones en las que se abren los poros de las membranas para que penetre el ADN y ocurra la transformación.
5. Enfriar **2 minutos en hielo**.
6. Esta reacción se puede congelar toda la noche si fuese necesario.

3.7.2 Recuperación y plaqueado para células normales DH5α

1. Precalentar las placas de Petri en la estufa a 37 °C. De esta forma estarán a la temperatura apropiada para el paso de plaqueado.
2. Añadir **1 ml de medio LB** a las células transformadas (en cabina).
3. Cerrar los tubos e incubar en **agitador orbital 1 hora a 37 °C**.
4. **Plaquear** las cantidades adecuadas de cada transformación en placas de Petri con medio LB/agar con ampicilina 1:1000 (v/v) previamente calentadas a 37 °C. Habitualmente se plaquean 50 y 150 mililitros de dilución de células transformadas.
5. **Incubar** toda la noche a **37 °C**.

3.7.3 Recuento de colonias y almacenamiento.

1. **Marcar** cada colonia dibujando un punto en la parte trasera de la placa.
2. **Contar** el número de puntos y anotarlo.
3. **Cerrar** las placas con parafilm. Así se evita que se abran.
4. **Almacenar** en frigorífico a 4 °C.

3.7.4 Cultivo “starter” (iniciador).

Este paso debe hacerse en la cabina de flujo laminar.

1. **Determinar** el número de tubos (*Falcon* de 15 ml) que se van a utilizar y rotularlos adecuadamente.
2. **Mezclar 5 ml de LB con 5 µl de Ampicilina** por tubo (LB:Amp 1000:1).
3. **Picar** las colonias. Para ello se roza la colonia con una punta amarilla de una micropipeta. La punta de la micropipeta se suelta en el tubo con LB+Amp. Se tapa el tubo.

4. **Incubar** en el agitador orbital durante **12 a 16 horas** a 37 °C y 225 rpm.
5. **Limpiar** y apagar la cabina.

3.7.5 Minipreps (protocolo de lisis alcalina).

Antes de comenzar la extracción de ADN mediante la técnica de minipreps conviene asegurarse de que se dispone de los siguientes reactivos: Soluciones I, II y III (ver 8.2.12 “Soluciones para la clonación mediante el kit TOPO® TA Cloning.”, pág. 421), isopropanol, etanol al 70% y tampón TE con RNAsa.

1. **Rociar** los tubos con etanol para esterilizarlos e introducirlos en la campana de flujo laminar.
2. **Marcar** igual número de tubos Eppendorf® que tubos de cultivo vamos a utilizar.
3. **Retirar la punta amarilla** utilizada en el inóculo.
4. **Transferir 1 ml de cultivo** de bacterias a un tubo Eppendorf®.
5. **Centrifugar** 5 min a 6000 rpm.
6. **Retirar el sobrenadante** por aspiración mediante una bomba de vacío (ver Figura 9). Eliminar la máxima cantidad de restos de medio LB.

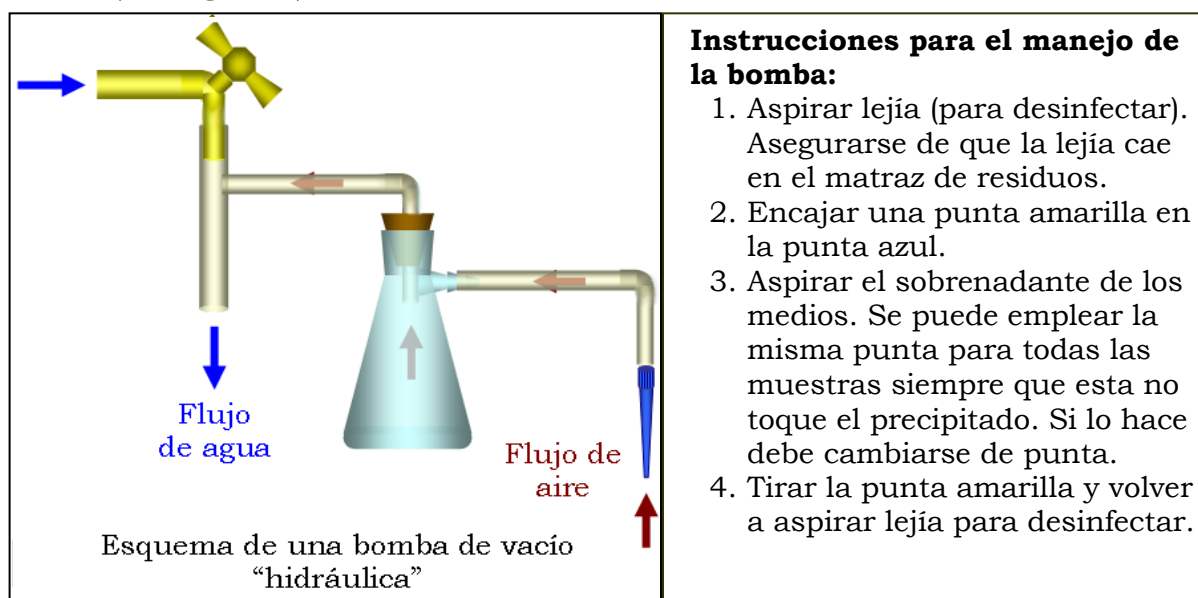


Figura 9: Esquema de una bomba de vacío hidráulica e instrucciones de manejo.

7. **Resuspender** el precipitado en 100 µl de **solución I**. Esta debería haber sido previamente enfriada en hielo.
8. **Agitar** en vórtex hasta obtener una solución lechosa.
9. Añadir **200 µl** de **solución II** (solución de lisis). Mezclar por inversión e incubar un máximo de 5 minutos. El tiempo de incubación es un paso clave. En caso de excederse la solución podría lisar el ADN plasmídico. Si es demasiado corto no se romperán las estructuras celulares e impediría la liberación de dicho ADN.
10. Añadir **150 µl** de **solución III** (solución de neutralización) pre-enfriada.
11. **Mezclar** por inversión.
12. **Incubar 10 min en hielo.**
13. **Centrifugar** 10 min a 13000 rpm.
14. **Transferir** el sobrenadante, que contiene el ADN plasmídico, a un tubo Eppendorf® limpio previamente rotulado.
15. **Precipitar** el ADN con **300 µl de isopropanol** a temperatura ambiente.

16. Incubar **2 min a temperatura** ambiente.
17. **Centrifugar** 15 min a 13000 rpm.
18. **Eliminar el sobrenadante** con una micropipeta.
19. **Lavar** el precipitado de ADN con **100 µl de etanol al 70%**.
20. Dar un pulso de **vórtex** para que se despegue el precipitado del fondo del tubo eppendorf. Cuando se vea que se mueve debería quedarse en el fondo para no perderlo en pasos posteriores.
21. **Centrifugar** 5 minutos a 13000 rpm.
22. **Eliminar** cuidadosamente el **sobrenadante** con una micropipeta y dejar el tubo abierto.
23. **Preparar** TE con RNAsa en proporción 500:1 (v/v) (2 µl / µl de TE).
24. Dejar **secar** el precipitado hasta que pierda casi por completo la tonalidad blanquecina y antes de que esto suceda, realizar el paso siguiente.
25. **Resuspender** el ADN plasmídico **en 50 µl de tampón TE con RNAsa** preparado en el paso 23.
26. Golpear muy suavemente el tubo con los dedos para asegurarse de que el ADN se **resuspende** por completo.
27. Dar un **pulso de centrifuga**.

3.8 Protocolo de secuenciación.

El protocolo consiste en realizar una primera PCR por el método habitual, limpiar los productos de esta PCR con ExoSAP-IT® y realizar una segunda PCR de secuenciación que utiliza dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente para que, al integrarse en la cadena de ADN de nueva creación, finalicen la polimerización y generen fragmentos marcados de todas las longitudes posibles. Estos fragmentos se cargan en un gel de acrilamida para ser leídos en el secuenciador. El detalle del protocolo se recoge en los apartados siguientes.

3.8.1 PCR de amplificación del ADN.

La secuenciación parte de una PCR de amplificación normal (ver 3.3 “PCR.”, pág. 38). Estas son las cantidades de reactivos para un volumen final de 20 µl.

- dH₂O: 4,12 µl
- Tampón: 2 µl
- dNTPs: 2 µl
- Cebador UP: 0,24 µl
- Cebador DN: 0,24 µl
- MgCl₂: 1,2 µl
- Taq: 0,2 µl

El producto de esta amplificación debe ser analizado en un gel de agarosa (ver 8.2.5 “Gel de agarosa.”, pág. 419).

3.8.2 ExoSAP-IT®.

Este paso es opcional y sirve para limpiar la solución de nucleótidos no polimerizados. Para detalles del método, ver 3.4 “ExoSAP-IT®.”, pág. 39.

3.8.3 PCR de secuenciación (2ª PCR).

De cada secuencia se pueden obtener las 2 cadenas. Para ello, de cada PCR de amplificación se hacen 2 PCR de secuenciación. Estas se caracterizan porque los terminadores están marcados y porque sólo se usa el cebador de uno de los extremos 5' o 3'.

Para cada muestra de la 2ª PCR se mezclan:

- + *BigDye*TM Terminator: 2,5 µl
- + Tampón *BigDye*TM: 1,5 µl
- + Cebador: 0,5 µl
- + dH₂O: 1,5 µl
- + ADN: 4 µl

La PCR de secuenciación sigue un ciclo similar al de la Figura 10. Para optimizar esta PCR se puede variar la temperatura del paso central de los 25 ciclos.

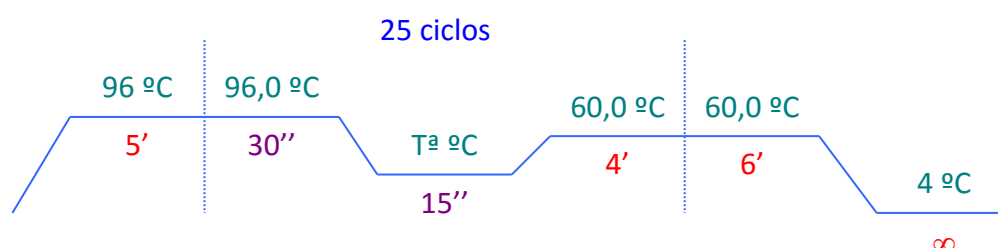


Figura 10: Segunda PCR de secuenciación.

Para cada paso de PCR se indica la temperatura a la que ocurre (en verde, sobre la línea horizontal) y el tiempo que dura (los minutos se muestran en rojo, los segundos en morado, debajo de la línea horizontal). El ciclo central suele repetirse 25 veces. La temperatura del paso central del ciclo es variable. El paso a 4 °C tiene duración ilimitada.

3.8.4 Precipitación del ADN.

El paso de precipitación del ADN es clave para obtener una buena calidad de secuenciación. Por eso es recomendable respetar las proporciones y tiempos escrupulosamente. Los pasos de precipitación son:

1. Cuando acaba la PCR se añade:
 - 1 µl de EDTA 125 mM.
 - 1 µl de NaOAc 3M.
 - 25 µl de EtOH 95%.
2. Sellar y mezclar.
3. Dejar precipitar un cuarto de hora a temperatura ambiente.

3.8.5 Centrifugación.

Centrifugar 40 min el precipitado a 3000 rpm (1107 ×g) a 4 °C.

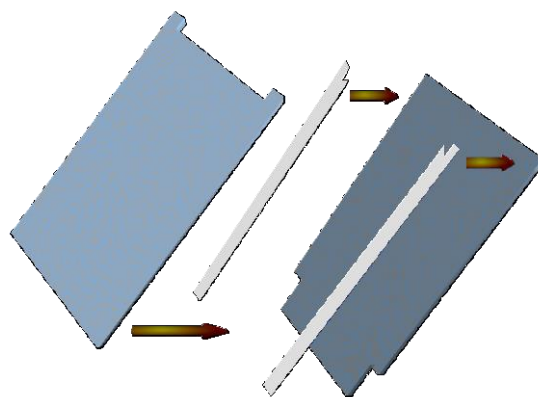
3.8.6 Preparación del gel de secuenciación.

La secuenciación se realiza en geles de acrilamida Long Ranger XL. El protocolo para preparar la acrilamida Long Ranger XL se muestra en el apartado 8.2.10 "Preparación de la acrilamida Long Ranger XL.", pág. 420.

3.8.6.1 Mezcla del gel.

Pasos para crear 50 ml de gel de acrilamida:

- Añadir la solución de acrilamida previamente filtrada.
- Enrasar hasta 50 ml con dH_2O
- Enfriar 10 minutos a 4 °C esta mezcla:
 - 250 μl de APS al 10%.
 - 35 μl de TEMED.



3.8.6.2 Fabricación del gel.

Para fabricar el gel se siguen estos pasos:

1. Limpiar el material exhaustivamente.
2. Montar los cristales de 48 cm con espaciadores de 0,2 mm (Figura 10).
3. Introducir la mezcla del gel por uno de los extremos con una jeringuilla con mucho cuidado de no dejar burbujas de aire (Figura 12). Para evitarlas es conveniente dar golpecitos en el cristal a la altura del frente según se desplaza hacia el extremo opuesto. Esto hace que se eliminen los entrantes del gel que podrían dar lugar a la formación de burbujas.
4. Colocar el peine en la parte superior del gel de forma que el lomo se introduzca entre los costales para que cuando polimerice quede el hueco para los pocillos.
5. Dejar secando durante 20 minutos.

Figura 11: Esquema del montaje de los cristales.

Los 2 espaciadores (blancos) se interponen entre los 2 cristales (azules) dejando 2 mm de espacio entre ellos y sellando los laterales. El conjunto se sujeta con pinzas.



3.8.7 Lavado del ADN.

El ADN centrifugado se encuentra en el precipitado. Es necesario eliminar el sobrenadante. Se vuelca la placa para que caiga el alcohol. El precipitado se queda adherido al fondo del pocillo. Para lavarlo:

- Añadir 35 μl de etanol al 70 %.
- Centrifugar una segunda vez durante 10' a 4 °C y 3000 rpm.

No se debe tardar más de 2 minutos en eliminar el sobrenadante de las centrifugaciones para evitar que el precipitado se resuspenda.

3.8.8 Secado del ADN.

Para eliminar rápidamente el alcohol de los tubos se invierte la placa de forma que la boca quede hacia el fondo y se les da un spin hasta que la centrífuga llegue a 750 rpm.

Figura 12: Inyección del gel.

El gel de acrilamida se inyecta desde la parte superior, evitando que forme burbujas en su recorrido descendente.

3.8.9 Montaje del gel.

Cuando el gel ya ha polimerizado se quita el peine y se limpia el frente del gel. Se monta el peine con los pocillos hacia abajo.

Se limpian los cristales y se monta en el marco que se coloca en el secuenciador.

Se arranca el ordenador y se activa el programa ABI PRISM 377XL Data Collection y se rellenan los parámetros adecuados.

Se pone la cubeta superior y la faja térmica. Se activa el paso "*Pre Run*" con los ajustes para geles de 48 cm y matriz de secuenciación. Hay que añadir 1,3 litros de tampón TBE.

3.8.10 Preparación de las muestras.

Durante el tiempo del *Pre Run* podemos añadir el tampón de carga (entre 2 y 4 µl). La dilución del ADN en formamida: azul dextrano (5 : 1) depende de lo buena que sea la amplificación del ADN y se averigua empíricamente. El objetivo es que la amplitud de la señal sea óptima para su posterior lectura por los programas de análisis de datos.

3.8.11 Desnaturalización de las muestras.

Las muestras se desnaturalizan por calor poniéndolas a 94 °C durante 5 minutos, al cabo de los cuales se transfieren a hielo.

3.8.12 Carga de las muestras.

El *Pre Run* se detiene abriendo la puerta del secuenciador.

Se toman 0,8 µl de cada muestra y se cargan en los pocillos del gel.

3.8.13 Electroforesis.

Continuar con el *Pre Run* unos 2 minutos más. Terminar el *Pre Run* y poner la tapa de la cubeta superior.

Seleccionar la hoja de muestras "*Sample Sheet*" y comenzar la electroforesis pulsando en *Run*.

La electroforesis se prolonga por espacio de 10 horas.

3.9 Protocolo de análisis de número de copias de GH.

Este protocolo hace una cuantificación del número de copias utilizando una PCR en tiempo real. Se muestran los materiales y concentraciones empleados en la **determinación del número de copias del gen GH en oveja**.

Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) se han realizado en el termociclador *7500 Real-Time PCR System* de Applied Biosystems®.

3.9.1 Preparativos.

Antes de comenzar la PCR cuantitativa es necesario haber preparado algunos de sus componentes:

3.9.1.1 Dilución de cebadores.

Los cebadores suelen almacenarse con una concentración de 100 μM . La concentración de trabajo de los cebadores suele ser 10 μM o 25 μM . Las sondas se emplean diluidas a concentración 10 μM .

A continuación se muestran algunos protocolos habituales de dilución:

75 μl de cebadores 100 μM + 225 μl de H_2O = 300 μl de cebadores 25 μM .


40 μl de cebadores 100 μM + 160 μl de H_2O = 200 μl de cebadores 10 μM .

25 μl de sonda 100 μM + 225 μl de H_2O = 250 μl de sonda a 10 μM .

3.9.1.2 Creación de diluciones seriadas.

Las diluciones seriadas de ADN se utilizan para la creación de curvas de calibración. En los experimentos de PCR a tiempo real la cantidad de ADN de las curvas de calibración no es importante, es importante que se mantenga constante la proporción de ADN entre los distintos puntos de la recta. Una forma simple de lograr una alta precisión en la creación de estos puntos es la utilización de diluciones seriadas. La seriación más habitual es con diluciones 1:10, pero puede obtenerse cualquier otra variando las proporciones de muestra/ dH_2O que se utilizan.

Se toman 10 μl de una muestra y se mezclan concienzudamente con 90 μl de dH_2O para formar la dilución 1:10. Se toman 10 μl de esta dilución y, sucesivamente, se repite el proceso para formar la siguiente dilución de la serie, tal y como se muestra en la Tabla 2.



Concentración	$10^{-1}\times$	$10^{-2}\times$	$10^{-3}\times$	$10^{-4}\times$	$10^{-5}\times$	$10^{-6}\times$	$10^{-7}\times$	$10^{-8}\times$	$10^{-9}\times$	$10^{-10}\times$	$10^{-11}\times$
dH_2O	27	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
μl PCR anterior	3	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 2: Diluciones seriadas 1:10 para formar una recta de calibración.

En cada pocillo se mezcla 1/10 del volumen de la mezcla anterior con 9/10 del volumen de agua. La dilución $0.1\times$ utiliza 3 μl para ahorrar muestra patrón.

Se debe poner especial cuidado en el pipeteo y en la homogeneización de las mezclas ya que cualquier error en las primeras diluciones se transmite, acumulativamente, hacia las más diluidas.

3.9.2 PCR.

La forma habitual de realizar las reacciones de PCR es preparando 3 réplicas de cada punto (48 µl de mezcla). Para cada fragmento de PCR se han utilizado diferentes mezclas de reacción, que se detallan en el apartado “3.9.3 Mezclas.” (pág. 55).

A estas se les añade 12 µl de ADN de las muestras.

Se separan en 3 pocillos de 20 µl cada uno.

Para evitar pérdidas de reactivo por adhesión a las paredes del tubo, puede utilizarse uno de los pocillos de la propia placa para hacer la dilución de los 48 µl de mezcla con los 12 µl de ADN. De este pocillo se extraen 2 alícuotas, de 20 µl cada una, que se repartirán en otros tantos pocillos para constituir las réplicas de la muestra (ver Figura 13). La composición de las PCRs, para cada muestra, se indica en la Tabla 3.

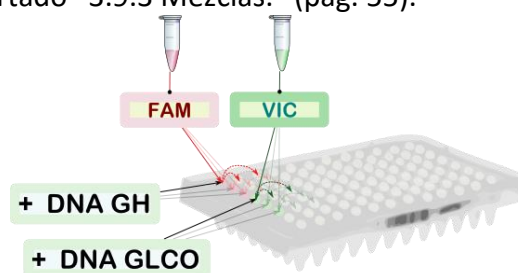


Figura 13: Forma habitual de preparación de muestras y rectas de calibración.

El reactivo de PCR y el ADN se mezclan, por pipeteo, en uno de los pocillos de la placa para no perder volumen por adhesión a las paredes. De esta forma se evita el paso intermedio de crear alícuotas de las mezclas de PCR.

	1 réplica	2 réplicas	3 réplicas	4 réplicas
Mezcla de PCR	16 µl	32 µl	48 µl	64 µl
ADN	4 µl	8 µl	12 µl	16 µl

Tabla 3. Composición de las PCRs, para cada muestra.

El máximo número de animales que se pueden analizar simultáneamente es 44 cuando se siguen las siguientes proporciones:

44 animales × 2 réplicas = 88 pocillos.

1 negativo × 2 réplicas = 2 pocillos.

3 concentraciones patrón × 2 réplicas = 6 pocillos.

Total = 88 + 2 + 6 = 96 pocillos.

3.9.2.1 Programa de PCR

Los datos de temperatura y tiempo para el programa de PCR que se usa de manera habitual se especifican en la Tabla 4.

Estado	Repeticiones	Temperatura	Tiempo (min)
1	1	50 °C	2:00
2	1	95 °C	10:00
3	50	95 °C	0:15
		60 °C	1:00

Tabla 4. Programa de PCR habitual.

3.9.2.2 Recta patrón.

Se utiliza el ADN de un plásmido creado *ad-hoc* en el que se garantiza que hay una copia de cada uno de los fragmentos en estudio (ver 4.4.3 “Diseño de una construcción plasmídica de referencia para determinación del número de copias mediante PCR cuantitativa.”, pág. 131). El procedimiento de creación de las rectas de calibración se detalla en el punto 3.9.4 “Creación de las rectas de calibración.”, pág. 56,. En cada placa de PCR se incluyen 3 diluciones seriadas, 1:10, del citado plásmido: 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Esta curva de calibración tan simple y la realización de 2 réplicas por muestra permiten maximizar el número de muestras en estudio.

3.9.2.3 Controles.

Control negativo: Se substituye el ADN por agua.

Control positivo: Se emplea como ADN el de las muestras de la curva de calibración, que llevan un plásmido con una copia de cada fragmento.

Control de número de copias: Se emplea como ADN el de las muestras de la curva de calibración, que llevan un plásmido con la misma cantidad de copias de cada uno de los fragmentos.

3.9.3 Mezclas.

Se realizaron PCRs de los dos fragmentos en estudio tanto en pocillos separados (monoplex) como en el mismo pocillo (multiplex). Se puede utilizar tanto el preparado comercial, creado por Applied Biosystems® mediante el “Assay By Design” (Applied Biosystems, 2010), como mezclas de cebadores preparadas en el laboratorio. El preparado comercial es más fácil de utilizar y muy constante en su formulación, pero es muy caro. Las mezclas de cebadores “caseras” son más laboriosas y pueden variar más su composición, pero son más baratas y permiten optimizar sus componentes de forma más fina. De hecho, el sistema “Assay By Design” no fue capaz de preparar una formulación en multiplex de ambos fragmentos mientras que utilizando mezclas caseras sí se logró. Para evitar las variaciones en la composición de las mezclas caseras es habitual preparar un gran volumen de mezcla de cebadores que servirá para muchas reacciones de PCR. La mezcla de cebadores es la misma que tendría la mezcla de PCR pero sin añadir el tampón *Universal mix*. Las reacciones de cada lote serán muy homogéneas en su formulación química. La composición de las mezclas de PCR comerciales se muestran en la Tabla 5; la de las PCRs “caseras”, en *monoplex*, se recogen en la Tabla 6; la de las caseras, en *multiplex*, se listan en la Tabla 7.

Comercial	1 muestra	3 muestras	96 muestras
Universal mix	10 μ l	30 μ l	960 μ l
20x assay mix	1 μ l	3 μ l	96 μ l
H ₂ O	5 μ l	15 μ l	480 μ l
Total	16 μl	48 μl	1536 μl

Tabla 5: Composición de la mezcla de PCR “comercial” utilizando sondas TaqMan® en monoplex.

Se lista la composición para una muestra, para 3 réplicas y para una placa completa de 96 pocillos. El “20x assay mix” es un preparado comercial que contiene una mezcla de cebadores y sondas TaqMan®. Fue diseñado y manufacturado por el sistema Assay By Design de Applied Biosystems®.

Casera	1 muestra	3 muestras	96 muestras
Universal mix	10 µl	30 µl	960 µl
Cebador UP	1,8 µl	5,4 µl	172,8 µl
Cebador DN	1,8 µl	5,4 µl	172,8 µl
Sonda TaqMan®	0,5 µl	1,5 µl	48 µl
H ₂ O	1,9 µl	5,7 µl	182,4 µl
Total	16 µl	48 µl	1536 µl

Tabla 6: Composición de la mezcla de PCR “casera” usando sondas TaqMan® en monoplex.

Se lista la composición para una muestra, para 3 réplicas y para una placa completa de 96 pocillos. Las mezclas de sondas y cebadores de PCR se realizan en el laboratorio.

Multiplex casera	1 muestra 10mM	1 muestra 25mM	500 muestras 25 mM
Universal mix	10 µl	10 µl	Mezcla de cebadores
Cebador GH UP	1,8 µl	0,72 µl	360 µl
Cebador GH DN	1,8 µl	0,72 µl	360 µl
Sonda GH TaqMan®	0,5 µl	0,5 µl	250 µl
Cebador GLCO UP	1,8 µl	0,72 µl	360 µl
Cebador GLCO DN	1,8 µl	0,72 µl	360 µl
Sonda GLCO TaqMan®	0,5 µl	0,5 µl	250 µl
H ₂ O	0 µl	2,12 µl	1060 µl
Total	16 µl	16 µl	3000 µl

Tabla 7: Composición de la mezcla de PCR “casera” en multiplex.

Se listan las composiciones de PCR para una muestra partiendo de cebadores 10 mM y 25 mM. También se muestra la composición de stock de mezcla de cebadores para 500 pocillos.

Las mezclas de PCR se combinan con el equivalente a 4 µl de DNA por pocillo.

3.9.4 Creación de las rectas de calibración.

Las rectas de calibración pueden crearse a partir de diluciones de muestras del ADN plasmídico utilizado como control de número de copias conocido que contienen una copia de sendos fragmentos: de interés y normalizador.

Se han probado diluciones seriadas con concentraciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} (ver 3.9.1.2 “Creación de diluciones seriadas.”, pág. 53).

El esquema de la creación de las curvas se resume en la Figura 14.

Se hacen 4 réplicas de cada uno de los puntos de las curvas de calibración. Esto, para curvas de calibración de 5 puntos se traduce en:

1. Preparar en un tubo Eppendorf® 320 µl de cada mezcla de reacción ($16 \mu\text{l} \times 4 \text{ réplicas} \times 5 \text{ puntos} = 320 \mu\text{l}$ totales). Ver 3.9.2 “PCR”.

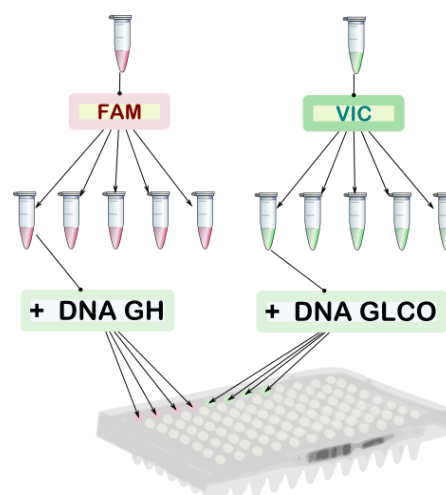


Figura 14: Creación de rectas de calibración.

Se prepara la mezcla de la reacción en un tubo Eppendorf®. Se crean tantas alícuotas como puntos tenga la recta. Se añade ADN a cada alícuota. Se distribuye esta mezcla en los pocillos réplica de la placa de PCR.

2. Distribuir cada una de las mezclas anteriores en 5 tubos, a razón de 64 μ l por tubo, para crear las alícuotas de los 5 puntos de la curva de calibración.
3. Añadir a cada alícuota 16 μ l de ADN diluido. Esto se corresponde con 4 μ l de ADN por pocillo.
4. Los 80 μ l de mezcla de PCR se distribuyen en 4 pocillos de la placa de PCR a razón de 20 μ l por pocillo.

3.10 Análisis de asociación del número de copias del gen GH con caracteres de producción en oveja.

3.10.1 Genotipado del número de copias.

El **método de genotipado del número de copias** consiste en una modificación del método general de estimación de número de copias por PCR cuantitativa que se utiliza habitualmente (ABI, 1997; Liew et al., 2005). Para asegurar la exactitud de los controles se utiliza una construcción plasmídica de referencia que contiene exactamente una copia del fragmento de interés y otra del control. Es habitual omitir este paso designando como control un fragmento de un gen constitutivo, que esté reconocido en la bibliografía como de copia única (Huggett et al., 2005). En nuestro caso no hemos recurrido a esta simplificación. Así aseguramos la unicidad de copias del control.

Los resultados se presentan como número de copias total en el individuo. Cada individuo debe tener, al menos, 2 copias (una proveniente de la madre y otra proveniente del padre). Por ejemplo: un individuo con 2 copias tendría 1 en uno de los cromosomas y 2 en el otro, sin embargo, el individuo que presente 4 copias podría tener 2 copias en cada cromosoma o 3 copias en uno y 1 en el otro. El método no es capaz de distinguir la composición cromosómica del individuo.

3.10.2 Asociación del número de copias con los caracteres de producción de leche.

A la base de datos de producción de leche se le ha añadido una columna con el número de copias estimado. Como el método de genotipado no produce valores exactos se ha utilizado el fraccionario, a sabiendas de que un número de copias fraccionario no tiene significado biológico pero puede ser un estimador más preciso del valor real que el redondeado. Este valor decimal se ha utilizado en los estudios que emplean el carácter NC como variable numérica (cuantitativa). Para aquellos estudios en los que se modela NC como factor (cualitativo), se ha redondeado su valor al entero más próximo antes de convertirlo en factor.

Por ejemplo, estas son las 2 primeras filas de la matriz de datos de un estudio cualitativo:

ID	C4.0	C6.0	C8.0	C10.0	C12.0	C14.0	C14.1	C16.0	C16.1	C18.0	C18.1t11	C18.1c9	C18.2c	C18.3c	CLA
XX01134	2.14	7.50	2.09	3.02	4.88	9.47	0.97	18.11	1.71	11.05	2.92	18.06	4.14	1.52	1.01
XX01134	2.48	8.61	2.34	3.86	5.37	8.05	0.85	22.01	1.33	8.07	2.08	19.03	3.94	1.86	0.54
AGS	AGS.C	AGS.M	AGS.L	Mufa	Pufa	AGI	AGI.AGS	W6.W3	C14.1.C14.0	C16.1.C16.0	C18.1.C18.0	CLA	C18.1t11	C18.3c_6	
66.37	14.75	17.42	34.20	33.66	25.80	7.86	0.5071568	3.230263	0.1024287	0.09442297		0.08	1.634389	0.3458904	
66.49	17.29	15.37	33.83	33.53	25.89	7.64	0.5042864	2.435484	0.1055901	0.06042708		0.09	2.358116	0.2596154	
C20.4	RCS	Proteína	Grasa	Leche	HTD	DIM	AGE	PERM	ID_P	NC					
0.69	4.81		4.86	5.39	1520	14	5	6	4	XY10363	6				
0.50	4.62		5.63	3.95	1178	12	3	6	4	XY10363	6				

Cada animal suele haber sido valorado en varias ocasiones para caracteres productivos. En total se registraron 1632 mediciones.

El significado de las variables empleadas es el siguiente (García-Fernández et al., 2010):

- ID: Identificación única del animal en la base de datos.
- C4.0: Ácido graso de 4 carbonos (Ácido butírico).
- C6.0: Ácido graso de 6 carbonos (Ácido caproico).
- C8.0: Ácido graso de 8 carbonos (Ácido caprílico).
- C10.0: Ácido graso de 10 carbonos (Ácido cáprico).
- C12.0: Ácido graso de 12 carbonos (Ácido láurico).
- C14.0: Ácido graso de 14 carbonos (Ácido mirístico).
- C14.1: Ácido graso de 14 carbonos, insaturado cis-9 (Ácido miristoleico).
- C16.0: Ácido graso de 16 carbonos (Ácido palmítico).
- C16.1: Ácido graso de 16 carbonos, insaturado cis-9 (Ácido palmitoléico).
- C18.0: Ácido graso de 18 carbonos (Ácido esteárico).
- C18.1t11: Ácido graso de 18 carbonos, insaturado trans-11 (Ácido vaccénico).
- C18.1c9: Ácido graso de 18 carbonos, insaturado cis-9 (Ácido oleico).
- C18.2c: Ácido graso de 18 carbonos, insaturado cis-9 y cis-12 (Ácido linoleico).
- C18.3c: Ácido graso de 18 carbonos, insaturado cis-9, cis-12 y cis-15 (Ácido α -linolenico).
- CLA: Ácido graso de 18 carbonos, insaturado cis-9 y trans-11 (Ácido linoleico conjugado).
- AGS: Ácidos grasos saturados.
- AGS.C: Ácidos grasos saturados de cadena corta.
- AGS.M: Ácidos grasos saturados de cadena media.
- AGS.L: Ácidos grasos saturados de cadena larga.
- Mufa: Ácidos grasos mono-insaturados.
- Pufo: Ácidos grasos poli-insaturados.
- AGI: Ácidos grasos insaturados.
- AGI.AGS: Proporción ácidos grasos saturados / insaturados.
- W6.W3: Proporción de ácidos grasos poli-insaturados n-6/n-3 (linoleico + γ -linolénico + araquidónico / α -linoleico, también conocido como proporción $\omega 6/\omega 3$).
- C14.1.C14.0: Proporción de C14.1 / C14.0.
- C16.1.C16.0: Proporción de C16.1 / C16.0.
- C18.1.C18.0: Proporción de C18.1 / C18.0.
- CLA.C18.1t11: Proporción de CLA / C18.1t11.
- C18.3c_6: Ácido graso de 18 carbonos, insaturado cis-6, cis-9 y cis-12 (Ácido γ -linolénico).
- C20.4: Ácido graso de 20 carbonos, insaturado cis-5, cis-8, cis-11 y cis-14 (Ácido araquidónico).
- RCS: Recuento de células somáticas.
- Proteína: Porcentaje de proteína.
- Grasa: Porcentaje de grasa.
- Leche: Producción de leche.

3.10.2.1 El modelo de regresión

El modelo de análisis empleado con los caracteres de producción es:

$$Y \sim \text{HTD} + \text{DIM} + \text{AGE} + \text{NC} + \text{ID_P} + \text{PERM}$$

Siendo la Y la respuesta en estudio (el fenotipo medido en el animal) y teniendo las variables el siguiente significado:

- HTD (Del inglés Herd Test Day). Este término acumula la variabilidad intrínseca del día en que se hace el muestreo. Esta es una variable categórica con 135 niveles
- DIM (Del inglés Day In Milk). Indica el día de la lactación en que se encuentra la oveja cuando se le realiza el muestreo. Esta es una variable categórica que agrupa los valores en 5 niveles.
- AGE: Edad de la oveja. Esta es una variable categórica que agrupa sus valores en 6 niveles.
- NC: La variable de interés: número de copias del gen de la hormona de crecimiento. Esta variable se puede estudiar como numérica, suponiendo que el efecto del número de copias es directamente proporcional a las copias que presenta cada animal, o categórica, admitiendo que cada intervalo de número de copias puede tener un efecto diferente sobre la respuesta.
- ID_P: Identificación del padre. Esta es una variable categórica de 10 niveles que se corresponde con cada uno de los 10 machos de churra que se utilizaron en la inseminación artificial de las ovejas.
- PERM: Efecto permanente de la madre. Esta variable categórica refleja el efecto de la madre de cada una de las ovejas. Tiene 446 niveles.

3.10.2.2 Eliminación de valores atípicos.

Los valores atípicos fueron detectados con el test de Bonferroni mediante la función `outlierTest` del paquete `car` (Fox and Weisberg, 2011). Aquellas tuplas que resultaron significativas fueron eliminadas del análisis.

3.10.3 Asociación del número de copias con los caracteres de morfología y lactación.

A la base de datos combinada de valores medios de morfología y lactación se le añadió una columna con el número de copias estimado para cada animal. Los caracteres de morfología de la ubre empleados se describen en el trabajo de Fernández et al., 1997. Los caracteres de morfología corporal y su valoración se detallan en el trabajo de Gutiérrez-Gil et al., 2011.

Por ejemplo, estas son las 2 primeras filas de la matriz de datos de un estudio cuantitativo:

ID	CORD_NAC	COR_NAC_VI	KGPROTEINA	LACT_REAL	LACT_120D	LAC_DIAS	PROFUBRE	INSERCIÓN	VERTICAL	TAMANO	FORMA	ESTATURA
XX01134	2	2	6.1	106	142	167	5.8	6	5.1	5.2	6.3	6.1
XX01134	2	2	6.8	118	175	169	5.8	6	5.1	5.2	6.3	6.1
ANCHOGRUPA	APLOMOS	PROFTALON	CALGLOBAL	CALIFICADOR	NUM_MADRE	NUM_PADRE	NUM_PARTO	EDAD_PARTO	MESES	EXPLOTACIÓN	NC	
6.8	4	4.6	4.8	Em	XY98115	XX10363	1	24		AB		6.21
6.8	4	4.6	4.8	Em	XY98115	XX10363	2	34		AB		6.21

El significado de las variables empleadas es el siguiente:

ID: Identificación única del animal en la base de datos.

CORD_NAC: Corderos nacidos en una lactación.

COR_NAC_VI: Corderos nacidos vivos en una lactación.

KGPROTEINA: Kg de proteína producidos en una lactación.

LACT_REAL: Producción real de leche en una lactación.

LACT_120D: Producción de leche en una lactación normalizada a 120 días (Cappelletti et al., 2006).

LAC_DIAS: Días que ha durado la lactación.

PROFUBRE: Valoración de profundidad de la ubre.

INSERCIÓN: Valoración de la inserción de la ubre de una oveja.

VERTICAL: Valoración de la verticalidad de los pezones.

TAMANO: Valoración del tamaño de los pezones.

FORMA: Valoración de la forma de la ubre.

ESTATURA: Valoración de la alzada, al nivel de la grupa, del animal.

ANCHOGRUPA: Valoración del ancho de la grupa del animal.

APLOMOS: Valoración de los aplomos del animal.

PROFTALON: Valoración de la profundidad del talón del animal.

CALGLOBAL: Valoración global general del cuerpo del animal.

3.10.3.1 El modelo de regresión

El modelo de análisis de estos datos puede ser distinto para cada variable dependiente debido a que la composición de la base de datos es heterogénea. La base de datos contiene datos de prolificidad, de lactación, de morfología de la ubre y de morfología corporal de la oveja. En cada caso se ha calculado el modelo de regresión óptimo. Para ello, se ha reducido el modelo saturado de forma que se han mantenido sólo las variables que superan el test de significación AIC y la variable de interés.

El modelo saturado utilizado para el análisis de los datos de morfología y lactación es el siguiente:

$$Y \sim NC + EXPLOTACION + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE$$

Siendo la Y la respuesta en estudio (el fenotipo medido en el animal) y teniendo las variables el siguiente significado:

- NC: La variable de interés: número de copias del gen de la hormona de crecimiento. Esta variable se puede estudiar como numérica, suponiendo que el efecto del número de copias es directamente proporcional a las copias que presenta cada animal, o categórica, admitiendo que cada intervalo de número de copias puede tener un efecto diferente sobre la respuesta.
- EXPLOTACION. Código de la explotación en la que se cría la oveja. Es una variable categórica con 14 niveles.
- NUM_PARTO. Indica el parto al que corresponden los datos de lactación. Esta es una variable numérica.
- EDAD_PARTO_MESES: Edad de la oveja en el momento de producirse el parto, medida en meses. Esta es una variable numérica.
- CALIFICADOR: Es el código de la persona que realizó la calificación morfológica. Es una variable categórica con 2 niveles.
- NUM_PADRE: Identificación del padre. Esta es una variable categórica de 10 niveles que se corresponde cada uno con uno de los 10 machos de churra que se utilizaron en la inseminación artificial de las ovejas. Es el mismo dato que el ID_P de la base de datos de caracteres de producción.
- NUM_MADRE: Efecto permanente de la madre. Esta variable categórica refleja el efecto de la madre de cada una de las ovejas. Tiene 446 niveles. Este dato equivale al PERM de la base de datos de producción.

3.10.3.2 Eliminación de valores atípicos.

Los valores atípicos fueron estudiados con el test de Bonferroni mediante la función `outlierTest` del paquete `car`. Aquellas tuplas que resultaron significativas fueron eliminadas del análisis.

3.10.4 Análisis de asociación.

Se ha analizado el número de copias como variable numérica (cuantitativo) y como factor (cualitativo).

Como carácter cuantitativo se pretende testar si existe una relación lineal entre el número de copias y la variable dependiente. En caso de que existiese, esta relación sería constante y proporcional al número de copias.

Como carácter cualitativo se pretende estudiar la relación entre cada uno de los niveles del carácter con la variable dependiente. Esta aproximación permite detectar relaciones más complicadas que la simple relación lineal.

Para realizar estos análisis se han ajustado los modelos lineales empleando el paquete estadístico R cargando, además, las bibliotecas de funciones `car`, `lattice` (Sarkar, 2008), `lme4` (Bates et al., 2015a, 2015b) y `lmerTest` (Kuznetsova et al., 2015), `MASS` (Venables and Ripley, 2002) y `stats` (R Core Team, 2015),

3.10.4.1 Corrección de Bonferroni para test múltiples.

Se empleó la aproximación de Bonferroni (Lynch and Walsh, 1998) para contrarrestar el efecto de la realización de múltiples test.

Con el nivel de significación del 0.05 se admite un falso positivo por cada 20 test realizados (5%). Este error se multiplica por el número de test. Para contrarrestarlo, el nivel de significación habitual (5%) se divide entre el número de pruebas independientes. Este número se ha establecido calculando la cantidad de componentes principales que explican el 85% de la variabilidad. Para ello se ha utilizado la función `prcomp` del paquete `stats`.

RESULTADOS

4 Resultados.

Los resultados obtenidos en el trabajo experimental descrito en esta Memoria se muestran desglosados según el tipo de técnica de laboratorio que los produjo. Así, se listan como resultados las condiciones optimizadas de PCR que se han probado, los patrones de SSCP obtenidos para los distintos fragmentos y las secuencias de estos fragmentos. Las reacciones de PCR son una etapa necesaria en los experimentos de SSCP y en los de secuenciación.

4.1 PCR.

En este trabajo se han optimizado las reacciones de PCR para una amplia variedad de fragmentos. Conviene recordar que un fragmento es definido aquí como la sección de ADN que amplifica entre dos cebadores de PCR determinados.

En la Tabla 8 se listan las secuencias de los cebadores que se han utilizado para amplificar los distintos fragmentos y que han producido PCRs válidas:

Fragmento	Cebador UP	Secuencia del cebador UP	Cebador DN	Secuencia del cebador DN
DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	GCGGCGGCGCGGGCGGCTCC	DGAT1-E1 DN	AAAGGTTAGGGTCACGCGCAC
DGAT1-E10	DGAT1-E10 UP	TCACTGTCCGCTTGCTTCTCC	DGAT1-E10 DN	CCCAGAGTCCCCCCCCCCCC
DGAT1-E14	DGAT1-E14 UP	CCACTCTGCCCCGCCCGCAGG	DGAT1-E14 DN	ACGCGACCCCGTCCACCCCC
DGAT1-E4	DGAT1-E4 UP	TGCCACCTCACCCCTCGCTA	DGAT1-E4 DN	TCCTGGGCACCCAGCTCACCA
DGAT1-E5	DGAT1-E5 UP	ACCTGCCCTGGGTTGCTTCTGT	DGAT1-E5 DN	ACCTTGAGGCAAGTCAGGGGA
DGAT1-E6	DGAT1-E6 UP	GGGGTCCCTGGCTGACGCTCT	DGAT1-E6 DN	CCGTGGCCGAGACAGCGTGGG
DGAT1-E7	DGAT1-E7 UP	CTGAGCTTGCTCTCCACAGT	DGAT1-E7 DN	GAGGCAAGTGGCAGCCAGTG
DGAT1-E8	DGAT1-E8 UP	CCCGACCCGCCCTGCGCTTGC	DGAT1-E8 DN	AGCAGGCCAGGCCGCGGGCA
DGAT1-E8/2	DGAT1-E8/2 UP	CAAGGCCAAGGCTGGTGAGG	DGAT1-E8/2 DN	TGGGGGCCAAGAGGAAGTAG
DGAT1-E9	DGAT1-E9 UP	GCCTGCTAGCCCGCCTCCCT	DGAT1-E9 DN	GGCAGGCCCGCCACCTGGC
GH2	GH2-E5 UP	GCACAAGACGGAGAGCTACCTG	GH2-E2 DN	CAAGGACATGGCTGGGAAGG
GH2-E5-3 ^{prima}	GH2-E5 UP	GCACAAGACGGAGAGCTACCTG	GH2-3' DN	TCCAACCTTCAACCACTCCC
GH-I1-I2	GH-I1 UP	TCCCTCCATTAGCGTGTC	GH-I2 DN	TCTGTCCCTCCGGGATGTAG
GH-I1-I4	GH-I1 UP	TCCCTCCATTAGCGTGTC	GH-I4 DN	TGCCAAGGGAGGAGAGACA
GHR-E10	GHR-E10 UP*	ACATGGTTTGTATATGATTTGTAC	GHR-E10 DN*	TTCATATCCCCACCCTCAACT
GHR-E10.1	GHR-E10.1 UP	GAAGGAAAATTAGAAGAGGTGA	GHR-E10.1 DN	GCACATGTACTGACATGGA
GHR-E10.2	GHR-E10.2 UP	GCTATGAACCTGACATTCTGG	GHR-E10.2 DN	ACCAATGAGAAGTGGTCTTGG
GHR-E10.3	GHR-E10.3 UP	CTGCTAGCCAGCAGCCAGT	GHR-E10.3 DN	GTGTCACTGGGGTTCCAG
GHR-E10.4	GHR-E10.4 UP	CACCAGCAGGAAATGTGGTC	GHR-E10.4 DN	GCTGTAGTGGTAAGGCTTCTG
GHR-E10_1	GHR-E10_1 UP*	ACATTCTGGAGGCTGATTC	GHR-E10_1 DN*	AGCTTGGCTCTACGTGTGAT
GHR-E10_1-E10_2	GHR-E10_1 UP*	ACATTCTGGAGGCTGATTC	GHR-E10_2 DN*	GATAACACTGGGCTGCTGGT
GHR-E10gap1-E10	GHR-E10gap1 UP	ATTCCATGTCACTGACA	GHR-E10 DN*	TTCATATCCCCACCCTCAACT
GHR-E3	GHR-E3 UP*	TAGGAGTTCCTTTAGAGGATAGGTGG	GHR-E3 DN*	GCCTTGTTGAGAAGTTGACAAA
GHR-E4	GHR-E4 UP*	GCCCAGAGAAACAGCATTTCTA	GHR-E4 DN*	TCACTGCCATATTTCCAGCATC
GHR-E5	GHR-E5 UP*	CTTGCTCATAAAATACTCGTCTCT	GHR-E5 DN*	ATGCAATGGCAAAGTCTTCTAC
GHR-E6	GHR-E6 UP*	TGTATGAAGTAAGTCTGCTTCG	GHR-E6 DN*	GAGAGGGGTTGTTGAACACAAA
GHR-E7	GHR-E7 UP*	TCCTACTTCCAGAAATTCATTTG	GHR-E7 DN*	CTGAGGCTAATGTATATTGATCTGGAC
GHR-E8	GHR-E8 UP*	GTGGTATCAAGTGAAATCATTGAC	GHR-E8 DN*	ACTGGGTTGATGAAACATTCCTC
GHR-E9	GHR-E9 UP*	GCCTCATCATCACTGCTTA	GHR-E9 DN*	GGTTTCAACATAAGGCTCTG
GLCO-Taqman-E4	GLCO-Taqman-E4 UP	AACATTGCCAAACGTCATGATG	GLCO-Taqman-E4 DN	GCCTTCTCGGCTTTCA
OXI-E1	OXI-E1 UP	AAAGGCCAGACCCGAGAGAC	OXI-E1 DN	TCGATTCCCAGGCTAGGTGG
OXI-E2	OXI-E2 UP	CTCCGCCAGTGTCTCCCT	OXI-E2 DN	TGCACAGAGAGACGCCGAGT
OXI-E3	OXI-E3 UP	ACTCGGCTCTCTGTGCAGA	OXI-E3 DN	ACGAGGCTTGTGGAGGGGAA

Fragmento	Cebador UP	Secuencia del cebador UP	Cebador DN	Secuencia del cebador DN
OXT_PCRb	OXT_PCRb UP	AGAGACATTGTCAGTAGCTGTTG	OXT_PCRb DN	TTCCCTCCCGTTCTGACACT
PRL2-E2	PRL2-E2 UP	TCCTGCTGCTGGTGGTGCA	PRL2-E2 DN	AGTGGGACACCATGACTGCC
PRL2-E3	PRL2-E3 UP	GATAAACGGTATGCCAGGG	PRL2-E3 DN	TGTTCTTTGTCTTCAGGGGT
PRL2-E4	PRL2-E4 UP	TGCGCTCCTGGAATGACCCT	PRL2-E4 DN	TCCATGCCTCCAGAAGTCG
PRL-E1	PRL-E1 UP	AAGCCTTATAAGCCAACATCTG	PRL-E1 DN	AAAACCCAACAACCTCCACAA
PRL-E2	PRL-E2 UP	TGAACATTTCCGAGGAGAGG	PRL-E2 DN	TAGAGCGGCTCATGCTTTTT
PRL-E3	PRL-E3 UP	TCTGTTGGGCTGTTCTTTGT	PRL-E3 DN	GTATGCCAGGGCAA
PRL-E4	PRL-E4 UP	CTGGCCAAATATCATCTCCA	PRL-E4 DN	GCTCCTGGAATGACCCTC
PRL-E5.1	PRL-E5.1 UP	TTATTCTGGAGCCAAAGAG	PRL-E5.1 DN	GGATAGGATGGAATGTGGG
PRL-E5.2	PRL-E5.2 UP	CTCCTGAATTGCAGAAATCATC	PRL-E5.2 DN	GATAAGAAACATTGACAAAATTGC
PRL-I1	PRL-I1 UP	ATCACCACCATGGACAGC	PRL-I1 DN	GCAGCAGGAGCAGGC
PRL-I1-I1M	PRL-I1 UP	ATCACCACCATGGACAGC	PRL-I1M DN	TTATGGATGTAGTGGGACACC
PRL-I1-I2	PRL-I1 UP	ATCACCACCATGGACAGC	PRL-I2 DN	GAACCTTTGCGCTGG
PRL-I1M-E2	PRL-I1M UP	GACGAGAGCTTCTGTGAAG	PRL-E2 DN	TAGAGCGGCTCATGCTTTTT
PRL-I4	PRL-I4 UP	AAGGCATGGAGATGATATTTGG	PRL-I4 DN	TAGGGCTCAGTCTCTTTGGC

Tabla 8: Fragmentos de PCR.

Cada línea contiene el nombre de uno de los fragmentos de PCR que se han utilizado en esta Tesis y los cebadores que lo limitan.

*Estos cebadores están tomados del trabajo de Blott et al., 2003.

Las condiciones de PCR varían para cada fragmento. Los parámetros más importantes para cada condición de PCR son: la combinación de cebadores (Fragmento), la temperatura de hibridación de la PCR (T^a PCR), la concentración de cloruro magnésico ($MgCl_2$) y la concentración de los distintos aditivos utilizados (Betaína, Glicerol, DMSO). Las condiciones de PCR utilizadas para amplificar los fragmentos listados anteriormente se recogen en la Tabla 9:

Fragmento	T^a PCR (°C)	[MgCl] (nM)	Betaína (M)	2º Aditivo
DGAT1-E1	55	3	0	
DGAT1-E1	60	1,5	1	
DGAT1-E1	65	1,5	1	
DGAT1-E1	70	1,5	0	
DGAT1-E10	58	1,5	0	
DGAT1-E14	55	1,5	1	
DGAT1-E14	60	1	1,01	
DGAT1-E14	60	1,5	0	
DGAT1-E14	60	1,5	1	
DGAT1-E14	60	2	1	DMSO: 5 %
DGAT1-E4	55	1,5	0	
DGAT1-E4	58	1,5	0	
DGAT1-E4	58	1,5	0,5	
DGAT1-E4	60	1,5	0	
DGAT1-E4	60	1,5	0,5	
DGAT1-E4	60	3	0,5	Glicerol: 5 %
DGAT1-E4	61	1,5	0	
DGAT1-E4	64	1,5	0	
DGAT1-E5	60	1,5	0,5	
DGAT1-E5	60	1,5	1	
DGAT1-E5	65	1,5	0,5	
DGAT1-E5	65	1,5	1	
DGAT1-E6	60	1,5	0	
DGAT1-E6	60	1,5	0,5	
DGAT1-E6	60	3	0,5	Glicerol: 5 %
DGAT1-E6	64	1,5	0	
DGAT1-E6	65	1,5	0,5	
DGAT1-E6	65	1,5	1	
DGAT1-E7	55	1,5	0	
DGAT1-E7	58	1,5	0	
DGAT1-E7	58	1,5	0,5	
DGAT1-E7	60	1,5	0	
DGAT1-E7	60	1,5	0,5	
DGAT1-E7	60	3	0,5	Glicerol: 5 %

Fragmento	T^a PCR (°C)	[MgCl] (nM)	Betaína (M)	2º Aditivo
DGAT1-E7	64	1,5	0	
DGAT1-E7	65	1,5	0,5	
DGAT1-E7	65	1,5	1	
DGAT1-E8	55	1,5	1	
DGAT1-E8	60	1,5	1	
DGAT1-E8	65	1,5	1	
DGAT1-E8	67	1,5	0	
DGAT1-E8/2	55	1,5	0,5	Glicerol: 5 %
DGAT1-E8/2	58	1,5	0,5	Glicerol: 5 %
DGAT1-E8/2	60	1,5	0	Glicerol: 5 %
DGAT1-E8/2	60	1,5	0,5	Glicerol: 5 %
DGAT1-E8/2	60	3	0,5	Glicerol: 5 %
DGAT1-E8/2	62	1	0,25	DMSO: 5 %
DGAT1-E8/2	62	1	0,5	DMSO: 5 %
DGAT1-E8/2	62	1	1	DMSO: 4,5 %
DGAT1-E8/3	60	3	0	
DGAT1-E8/3	60	3	0,5	Glicerol: 0,5 %
DGAT1-E8/3	60	3	0,5	Glicerol: 5 %
DGAT1-E8/3	60	4	0,5	Glicerol: 0,5 %
DGAT1-E8/3	62	3	0,5	
DGAT1-E8/3	62	3	0,5	Glicerol: 0,5 %
DGAT1-E8/3	62	3	0,5	Glicerol: 5 %
DGAT1-E8/3	62	4	0,5	Glicerol: 0,5 %
DGAT1-E9	60	1,5	1	
DGAT1-E9	65	1,5	0,5	
DGAT1-E9	65	1,5	1	
GH2	52	0	0	
GH2	58	0	0	
GH2	60	0	0,7	
GH2	62	0	0	
GH2	64	0	0	
GH2	64	0	0,7	
GH2	65	0	0	
GH2	65	0	0,7	

Fragmento	Tª PCR (°C)	[MgCl] (nM)	Betaina (M)	2º Aditivo
GH2-E5-3prima	58	0	0	
GH2-E5-3prima	58	0	0,7	
GH2-E5-3prima	61	0	0	
GH-I1-I2	55	1,5	0	
GH-I1-I4	50	1,5	0	
GH-I1-I4	55	1,5	0	
GH-I1-I4	58	1,5	0	
GH-I1-I4	60	1,5	0	
GH-I1-I4	61	1,5	0	
GH-I1-I4	61	3	0	
GHR-E1	65	2	0	
GHR-E10	53	3	0	
GHR-E10	55	1,5	0	
GHR-E10	55	2	0	
GHR-E10	55	3	0	
GHR-E10.1	55	3	0	
GHR-E10.1	60	3	0	
GHR-E10.2	55	0	0	
GHR-E10.2	55	1,5	0	
GHR-E10.3	55	0	0	
GHR-E10.4	55	0	0	
GHR-E10.4	55	0,75	0	
GHR-E10.4	55	1,5	0	
GHR-E10.4	60	1,5	0	
GHR-E10_1	55	0	0	
GHR-E10_1-E10_2	55	0	0	
GHR-E10_1-E10_2	55	1,5	0	
GHR-E10gap1-E10	60	1,5	0	
GHR-E3	55	0	0	
GHR-E3	60	0,75	0	
GHR-E3	60	1,5	0	
GHR-E3	60	3	0	
GHR-E3	60	3	0,91	
GHR-E3	60	4	0	
GHR-E3	60	4	0,5	
GHR-E4	60	0,75	0	
GHR-E4	60	0,75	0,91	
GHR-E4	60	1,5	0	
GHR-E4	60	1,5	0,91	
GHR-E4	60	3	0	
GHR-E4	60	3	0,91	
GHR-E4	60	4	0	
GHR-E4	60	4	0,5	
GHR-E5	60	1,5	0	
GHR-E5	60	3	0	
GHR-E5	60	4	0	
GHR-E6	60	0,75	0	
GHR-E6	60	1,5	0	
GHR-E6	60	3	0	
GHR-E6	60	4	0	
GHR-E7	60	1,5	0	
GHR-E7	60	3	0	
GHR-E7	60	4	0	
GHR-E8	55	0,75	0	
GHR-E8	55	1,5	0	
GHR-E8	55	1,5	0,91	
GHR-E8	55	3	0	
GHR-E8	55	3	0,91	
GHR-E8	55	4	0	
GHR-E8	55	4	0,5	
GHR-E8	60	1,5	0	
GHR-E8	60	3	0	
GHR-E9	55	1,5	0	
GHR-E9	58	0,75	0	

Fragmento	Tª PCR (°C)	[MgCl] (nM)	Betaina (M)	2º Aditivo
GHR-E9	58	3	0	
GHR-E9	58	4	0	
GHR-E9	58	4	0,5	
GHR-E9	60	1,5	0	
GHR-E9	60	3	0	
GLCO-Taqman-E4	60	1,5	0	
OXI-E1	60	0,75	1,06	
OXI-E1	60	1,5	0,5	
OXI-E1	60	1,5	0,5	Glicerol: 5 %
OXI-E1	60	1,5	0,91	
OXI-E1	60	3	0	
OXI-E1	60	3	0,91	
OXI-E2	60	1,5	0,5	Glicerol: 5 %
OXI-E2	60	1,5	0,91	
OXI-E2	60	3	0,5	Glicerol: 5 %
OXI-E3	55	3	0	
OXI-E3	60	1,5	0	
OXI-E3	60	1,5	0,91	
OXI-E3	60	3	0	
OXI-E3	60	3	0,5	Glicerol: 5 %
OXI-E3	60	3	0,61	
OXI-E3	60	3	0,91	
OXI-E3	60	6	0	
OXT_PCRb	57	1,5	0,75	
PRL2-E2	56	1,5	0	
PRL2-E3	52	1,5	0	
PRL2-E4	52	1,5	0	
PRL2-E4	55	1,5	0	
PRL2-E4	60	1,5	0	
PRL-E1	57	1,5	0	
PRL-E1	58	1,5	0	
PRL-E1	62	1,5	0	
PRL-E2	57	1,5	0	
PRL-E3	54	1,5	0	
PRL-E4	55	1,5	0	
PRL-E4	59	1,5	0	
PRL-E5.1	57	1,5	0	
PRL-E5.2	52	1,5	0	
PRL-E5.2	57	1,5	0	
PRL-I1	55	1,5	0	
PRL-I1-E3	60	1,5	0	
PRL-I1-I1M	55	1,5	0	
PRL-I1-I2	55	1,5	0	
PRL-I1M-E2	55	1,5	0	
PRL-I4	60	1,5	0	

Tabla 9: Condiciones de PCR.

Lista los principales parámetros de PCR para cada uno de los fragmentos. Son las condiciones en las que ha funcionado la PCR para cada fragmento.

Aquellos protocolos que no registran $MgCl_2$ es porque el tampón de PCR ya contiene esta sal. Esto suele ocurrir cuando se emplean kits comerciales.

Como puede deducirse de la Tabla 9, el aditivo de PCR que mejores resultados produjo fue la betaína. Muchas de las PCRs optimizadas la utilizan porque está indicado para secuencias con alto contenido en pares GC y las regiones exónicas suelen serlo.

4.2 SSCP.

El objetivo de la técnica de detección “polimorfismos de conformación de cadena simple” (SSCP) es la detección de variabilidad génica en los fragmentos de ADN estudiados. El objetivo de este capítulo es la detección de la variabilidad génica en los fragmentos de ADN de varios genes candidatos a QTL para producción de leche y la evaluación de la utilidad del SSCP como mecanismo de genotipado de dicha variabilidad.

A continuación se recogen los resultados de la detección de polimorfismos en cada uno de los genes analizados.

4.2.1 OXT.

El gen de la oxitocina y la neurofisisina ovina es un gen compuesto por 3 exones. Para amplificarlos por SSCP se diseñaron 3 fragmentos, delimitados por las parejas de cebadores recogidas en la Tabla 10:

Fragmento	Cebador	Secuencia
OXI-E1	OXI-E1 UP	AAAGGCCAGACCCGAGAGAC
	OXI-E1 DN	TCGATTCCCAGGCTAGGTGG
OXI-E2	OXI-E2 UP	CTCCCGCCAGTGTCTCCCT
	OXI-E2 DN	TGCACAGAGAGACGCCGAGT
OXI-E3	OXI-E3 UP	ACTCGGCGTCTCTGTGCAGA
	OXI-E3 DN	ACGAGGCTTGTTGGAGGGGAA

Tabla 10: Cebadores empleados para crear los fragmentos del gen de la oxitocina.

Se listan las secuencias y los nombres de los cebadores que generan los fragmentos del gen de la oxitocina.

En el nombre del cebador se utilizó OXI en vez de OXT para marcar aquellos fragmentos diseñados para el SSCP.

En la Figura 15 se muestra el esquema del gen que contiene la situación de los cebadores.

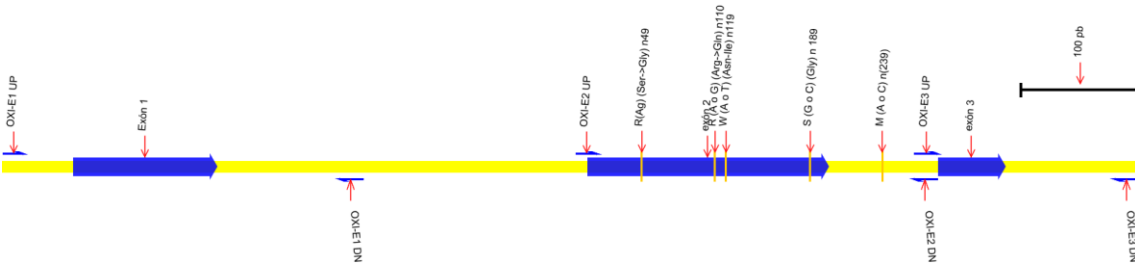


Figura 15: Esquema de la colocación de los elementos estudiados en el gen de la oxitocina.

Las flechas azules gruesas marcan los 3 exones. Los cebadores utilizados para definir los fragmentos de PCR para SSCP se muestran como medias flechas; los de orientación UP en la parte superior, los de orientación DN en la inferior. También se sitúan las posiciones de las mutaciones encontradas tras la secuenciación de los fragmentos. El esquema está realizado a escala: los tamaños horizontales son proporcionales a la longitud, en pb, de cada característica. La cota superior, negra, representa 100 pb.

Se realizaron pruebas de SSCP de los tres fragmentos del gen. Se registraron los patrones de bandas en cada muestra y, con ellos, se determinó el patrón general para cada fragmento. El patrón general es la superposición, teórica, de todos los patrones encontrados en ese fragmento.

En la Figura 16 se recogen los patrones generales:

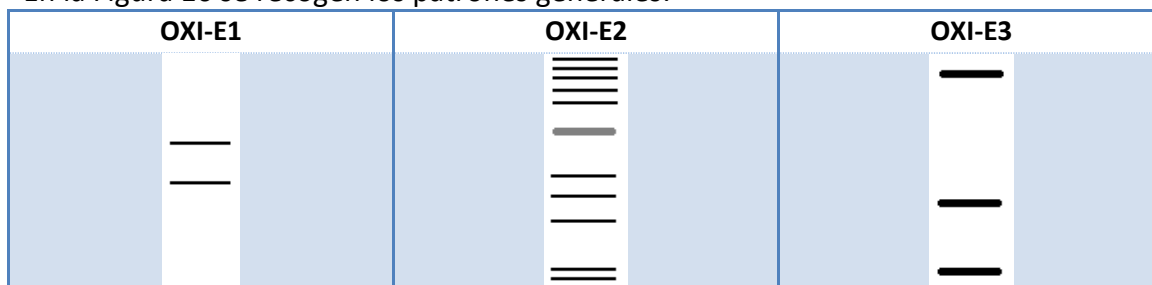


Figura 16: Patrones generales del gen de la oxitocina.

Patrones generales de los fragmentos del gen de la oxitocina. Son la superposición de los patrones encontrados para cada una de las muestras. Representan todas las bandas que se han encontrado en cada muestra. Las líneas gruesas y negras representan bandas más intensas. Las líneas grises representan bandas menos intensas. Las bandas grises y gruesas representan zonas difusas.

El patrón general de OXI-E1 muestra 2 bandas. El de OXI-E2 tiene 11 bandas, una de ellas difusa, que puede convertirse en 2 bandas. El patrón de OXI-E3 está formado por 3 bandas. El fragmento OXI-E2 es más variable porque contiene varios SNPs.

Los distintos patrones que se han encontrado en las muestras analizadas se recogen en la Figura 17:

1OXI-E1	2OXI-E1	1OXI-E2	2OXI-E2	3OXI-E2	4aOXI-E2	4bOXI-E2	5OXI-E2
6OXI-E2	7OXI-E2	8OXI-E2	9OXI-E2	10OXI-E2	11OXI-E2	12OXI-E2	13OXI-E2
1OXI-E3							

Figura 17: Patrones encontrados para el gen OXT.

En esta tabla se recogen los diferentes patrones encontrados. 2 para el fragmento OXI-E1, 14 para el fragmento OXI-E2 y 1 para OXI-E3.

En el fragmento 1 se han encontrado 2 patrones distintos.

En el fragmento 2 se han encontrado muchos más: 14. Los patrones 4aOXI-E2 y 4bOXI-E2 fueron identificados inicialmente como pertenecientes al mismo patrón: 4OXI-E2. Posteriormente se encontró que en el patrón 4OXI-E2 se engloban 2 patrones distintos. Estos pueden ser diferenciados por la presencia o ausencia de una sutil separación en 2 bandas de la 3ª banda (la línea difusa central del fragmento 4aOXI-E2 se diferencia en 2 líneas en el 4bOXI-E2). Es importante hacer esta distinción porque cada uno de estos 2 patrones se corresponde con un genotipo distinto. La mutación que diferencia a estos patrones se sitúa en uno de los extremos del fragmento. Posiblemente, esta es la causa de que los patrones electroforéticos sean tan similares. En el fragmento 3 sólo se encontró un patrón, no observándose variabilidad electroforética.

Los resultados del análisis de SSCP de este gen se presentaron como comunicación en las “X Jornadas sobre Producción Animal” (Morán Pérez et al., 2003).

4.2.2 PRL.

El gen de la prolactina tiene 5 exones. Para estudiar cada exón se diseñó una pareja de cebadores; excepto para el exón 5, que por ser demasiado grande para el SSCP se dividió en 2 fragmentos. El esquema del gen, a escala, se presenta en la Figura 18:

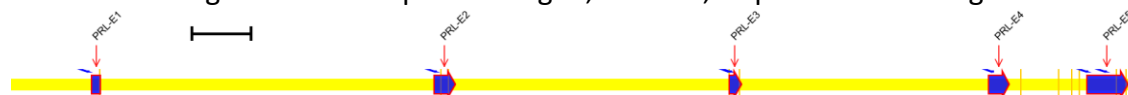


Figura 18: Esquema de los fragmentos analizados del gen PRL.

Los exones del gen se dibujan en color azul resaltado en rojo. Las líneas inclinadas azules situadas encima y debajo de estas marcan las posiciones de los cebadores diseñados. El exón 5 (PRL-E5) se dividió en 2 fragmentos para su amplificación por SSCP. Las líneas naranjas verticales marcan las posiciones de los SNPs detectados. El esquema está realizado a escala. La cota superior, negra, indica 500 pb.

Para su amplificación se diseñaron los cebadores de PCR que se recogen en la Tabla 11:

Fragmento	Cebador	Secuencia
PRL-E1	PRL-E1 UP	AAGCCTTATAAAGCCAACATCTG
	PRL-E1 DN	AAAACCCAACAACCTCCACAA
PRL-E2	PRL-E2 UP	TGAACATTTCCGAGGAGAGG
	PRL-E2 DN	TAGAGCGGCTCATGCTTTTT
PRL-E3	PRL-E3 UP	TCTGTTGGGCTGTTCTTTGT
	PRL-E3 DN	GTATGCCCAGGGCAA
PRL-E4	PRL-E4 UP	CTGGCCAAATATCATCTCCA
	PRL-E4 DN	GCTCCTGGAATGACCCTC
PRL-E5.1	PRL-E5.1 UP	TTATTCTCTGGAGCCAAAGAG
	PRL-E5.1 DN	GGATAGGATGGAATGTGGG
PRL-E5.2	PRL-E5.2 UP	CTCTGAATTGCAGAATCATC
	PRL-E5.2 DN	GATAAGAAACATTGACAAAATTGC
PRL2-E2	PRL2-E2 UP	TCCTGCTGCTGGTGGTGTCA
	PRL2-E2 DN	AGTGGGACACCATGACTGCC
PRL2-E3	PRL2-E3 UP	GATAAACGGTATGCCCAGGG
	PRL2-E3 DN	TGTCTTTGTCTTCAGGGGT

PRL2-E4	PRL2-E4 UP	TGCGCTCCTGGAATGACCCT
	PRL2-E4 DN	TCCATGCCTTCCAGAAGTCG

Tabla 11: Cebadores empleados para crear los fragmentos del gen PRL.

Se listan las secuencias y los nombres de los cebadores que generan los fragmentos del gen de PRL.

Los fragmentos PRL2 son diseños alternativos para amplificar los exones E2, E3 y E4. Se realizaron pruebas SSCP de los 5 exones del gen. Como el exón 5 es demasiado grande para SSCP se dividió en 2 fragmentos (5.1 y 5.2).

Los patrones generales de los fragmentos obtenidos son los se listan en la Figura 19:

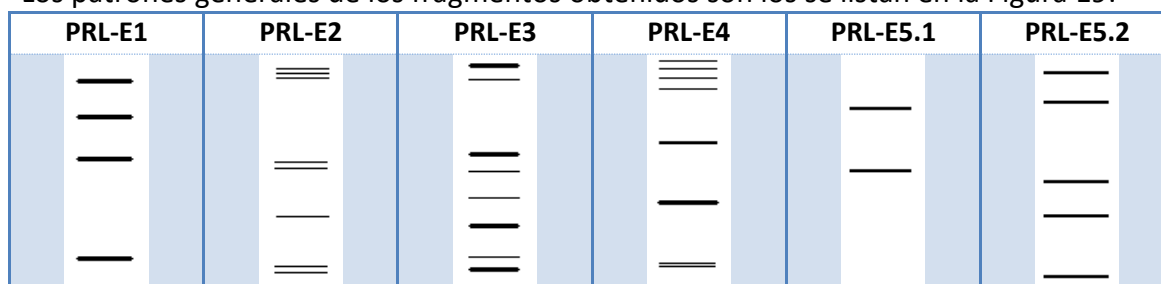


Figura 19: Patrones generales del gen de la prolactina.

Los patrones se forman por la superposición de las bandas encontradas para cada muestra. Las líneas gruesas y negras representan bandas más intensas. Las grises representan bandas menos intensas.

Los patrones electroforéticos detectados en las muestras analizadas se recogen en la Figura 20:

Las diferencias entre los patrones 2PRL-E2 y 3PRL-E2 así como las que hay entre 4PRL-E2 y 7PRL-E2 son difíciles de distinguir a simple vista: se diferencian en la posición de la banda inferior del patrón. En ambos casos, el primer patrón de cada pareja posee la banda superior y el segundo posee la banda inferior de las 2 que se muestran el patrón general PRL-E2.

Aunque la longitud de los fragmentos es similar la cantidad de variabilidad en cada uno de ellos es muy diferente. Generalmente se considera que las secuencias más importantes para la especie permanecen inalterables. El fragmento menos polimórfico para la función de la hormona es el PRL-E5.1, seguido por los fragmentos PRL-E1 y PRL-E4, y el más polimórfico es el fragmento PRL-E2

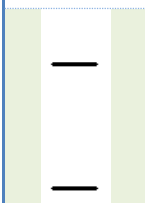
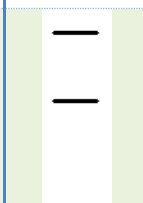
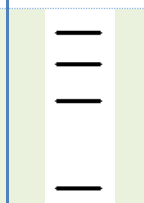
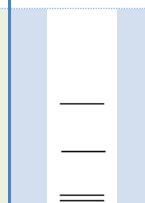
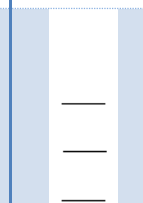
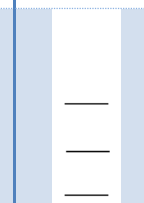


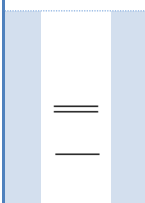
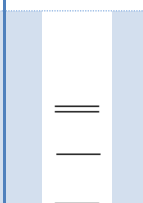
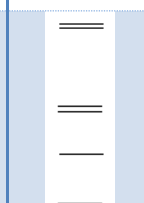
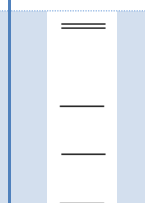
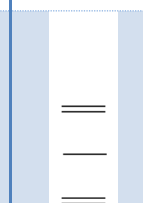
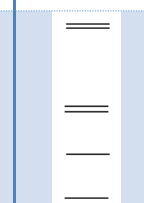

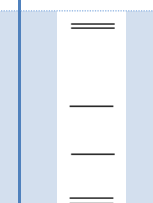
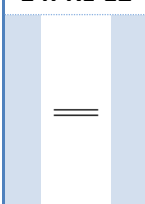
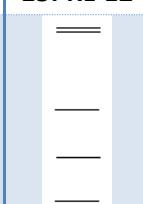
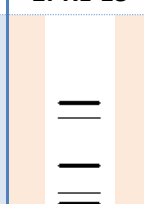
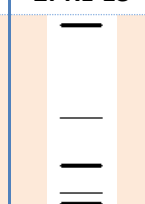
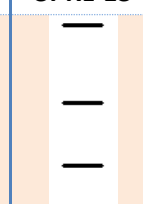
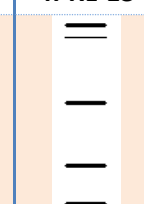
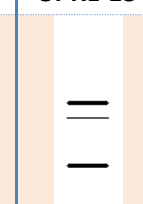
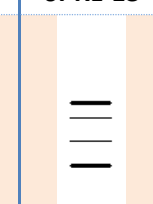
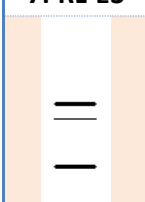
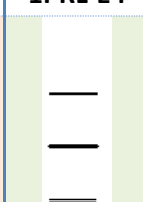
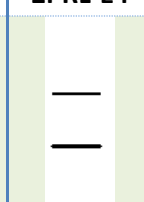

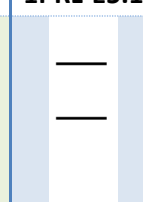

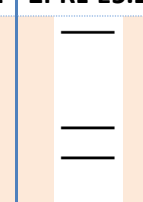
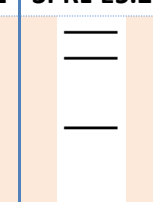
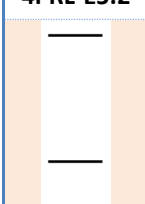
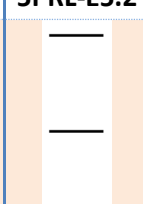
1PRL-E1	2PRL-E1	3PRL-E1	1PRL-E2	2PRL-E2	3PRL-E2	4PRL-E2	5PRL-E2
							
6PRL-E2	7PRL-E2	8PRL-E2	9PRL-E2	10PRL-E2	11PRL-E2	12PRL-E2	13PRL-E2
							
14PRL-E2	15PRL-E2	1PRL-E3	2PRL-E3	3PRL-E3	4PRL-E3	5PRL-E3	6PRL-E3
							
7PRL-E3	1PRL-E4	2PRL-E4	3PRL-E4	1PRL-E5.1	1PRL-E5.2	2PRL-E5.2	3PRL-E5.2
							
4PRL-E5.2	5PRL-E5.2						
							

Figura 20: Patrones detectados para el gen de la Prolactina.

En esta tabla se recogen los diferentes patrones encontrados. 3 para el fragmento 1PRL-E1, 15 para PRL-E2, 7 para PRL-E3, 3 para PRL-E4, 1 para PRL-E5.1 y 5 para PRL-E5.2. El patrón 3PRL-E1 muestra todas las bandas presentes en el patrón general; lo mismo ocurre en el caso del fragmento PRL-E4. En el fragmento PRL-E5.1 no se detectó variabilidad.

4.2.3 GHR.

El gen del receptor de la hormona de crecimiento está compuesto por 10 exones. Como secuencia de referencia de este gen se utilizó la secuencia AM161140⁶ de Genbank. Los cebadores utilizados para amplificar los fragmentos se listan en la Tabla 12:

Fragmento	Cebador	Secuencia
GHR-E3	GHR-E3 UP	TAGGAGTTCCTTTTAGAGGATAGGTGG
	GHR-E3 DN	GCCTTGTGGAGAAGTTGACAAA
GHR-E4	GHR-E4 UP	CCCCAGAGAAACAGCATTTCTA
	GHR-E4 DN	TCACTGCCATATTTCCAGCATC
GHR-E5	GHR-E5 UP	CTTGCTCATAAAATACTCGTGTCCCT
	GHR-E5 DN	ATGCAATGGCAAAGTCTTCCTAC
GHR-E6	GHR-E6 UP	TGTATGAAGTAACTTAGTCGTCTTCG
	GHR-E6 DN	GAGAGGGGTTGTTGAACACAAA
GHR-E7	GHR-E7 UP	TCCTACTTTCAGAAATTCATTTTG
	GHR-E7 DN	CTGAGGCTAATGTATATTGATCTGGAC
GHR-E8	GHR-E8 UP	GTGGCTATCAAGTGAAATCATTGAC
	GHR-E8 DN	ACTGGGTTGATGAAACACTTCACTC
GHR-E9	GHR-E9 UP	GCCTCATCATTCACTGCTTA
	GHR-E9 DN	GGTTTCAACATAAGGCTCTG
GHR-E10	GHR-E10 UP	ACATGGTTTGTATATGATTTTGTTAC
	GHR-E10 DN	TTCATATTCCCCACCCTCAACT
GHR-E10.1	GHR-E10.1 UP	GAAGGAAAATTAGAAGAGGTGA
	GHR-E10.1 DN	GCACATGTCACTGACATGGA
GHR-E10.2	GHR-E10.2 UP	GCTATGAACCTGACATTCTGG
	GHR-E10.2 DN	ACCAATGAGAAGTGGTCTTGG
GHR-E10.3	GHR-E10.3 UP	CTGCTAGCCAGCAGCCCAGT
	GHR-E10.3 DN	GTGTCACACTGGGGTTCCAG
GHR-E10.4	GHR-E10.4 UP	CACCAGCAGGAAATGTGGTC
	GHR-E10.4 DN	GCTGTAGTGGTAAGGCTTTCTG
GHR-E10.5	GHR-E10.5 UP	CCAGGAAGACATTTACATCAC
	GHR-E10.5 DN	GTAGCTCATAGGAAATCAAAG

Tabla 12: Cebadores empleados para crear los fragmentos del gen GHR.

Se listan las secuencias y los nombres de los cebadores que generan los fragmentos del gen de GHR.

El tamaño del exón 10 es demasiado grande como para estudiarlo por SSCP. Por ello se dividió en 5 fragmentos: 10.1, 10.2, 10.3, 10.4 y 10.5. Además de los cebadores mostrados, se diseñaron cebadores para amplificar los fragmentos GHR-E1 y GHR-E2 cuyas PCRs no funcionaron correctamente.

El esquema de gen se muestra en la Figura 21:

⁶ *Bos taurus* GHR gene for growth hormone receptor, exons 2-10, Finnish Ayrshire Breed.

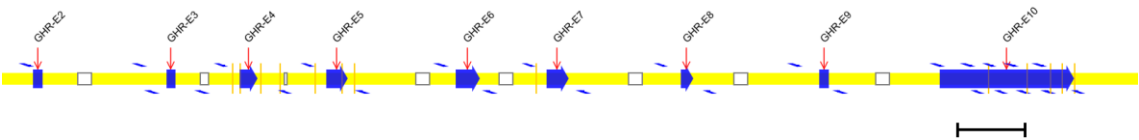


Figura 21: Esquema de los fragmentos amplificados en el gen GHR.
Este esquema está basado en la secuencia de referencia AM161140. Las flechas y rectángulos azules marcan los exones. Los cebadores utilizados para definir los fragmentos de PCR para SSCP se muestran como medias flechas; los de orientación UP en la parte superior, los de orientación DN en la inferior. Los rectángulos blancos representan “gaps”: zonas intermedias de longitud desconocida. También se sitúan las posiciones de las mutaciones encontradas tras la secuenciación de los fragmentos (líneas verticales naranjas). El esquema está realizado a escala, salvo los gaps, que son de longitud desconocida. Los tamaños horizontales son proporcionales a la longitud, en pb, de cada característica. La cota inferior, negra, representa 500 pb.

Los patrones generales obtenidos por SSCP se recogen en la Figura 22:

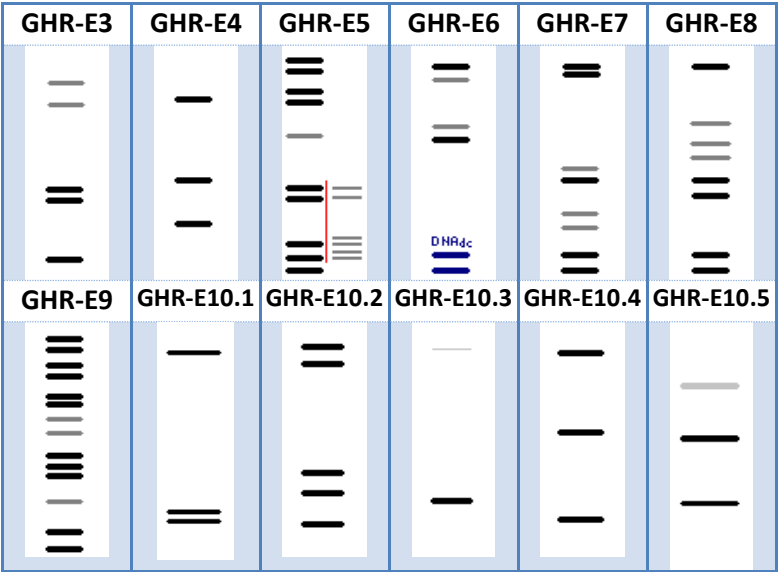


Figura 22: Patrones generales del gen del receptor de la hormona del crecimiento.
Estos patrones se forman por la superposición de las bandas encontrados para cada una de las muestras. Las marcas grises representan bandas menos intensas. Las marcas gruesas y negras representan bandas más intensas. En el patrón GHR-E5 se muestran, separadas por una barra vertical roja las 2 posibilidades encontradas en la zona inferior del patrón. En el patrón GHR-E6 se muestra en azul las bandas correspondientes a la zona de ADN de cadena doble.

Como puede observarse, no se han amplificado todos los exones del gen. Cuando se diseñaron los cebadores sólo se conocía la secuencia de ARNm. El exón 1 es demasiado pequeño como para poder estudiarlo por SSCP (16 pb). Tampoco fue posible amplificar el exón 2.

La variabilidad encontrada en el fragmento GHR-E6 no sólo afecta a la zona de ADN de cadena simple sino que modifica la movilidad electroforética del ADN de cadena doble. El GHR-E5 muestra conformaciones alternativas en la zona inferior del patrón de bandas. Como al superponerlos se ocultarían mutuamente, se ha optado por dibujarlos en paralelo en el patrón general.

Los patrones electroforéticos obtenidos para cada uno de los fragmentos se recogen en la Figura 23:

1GHR-E3	2GHR-E3	3GHR-E3	4GHR-E3	1GHR-E4	2GHR-E4	3GHR-E4	1GHR-E5
2GHR-E5	3GHR-E5	4GHR-E5	5GHR-E5	6GHR-E5	1GHR-E6	2GHR-E6	3GHR-E6
4GHR-E6	1GHR-E7	2GHR-E7	3GHR-E7	4GHR-E7	5GHR-E7	6GHR-E7	7GHR-E7
8GHR-E7	9GHR-E7	GHR-E8	2GHR-E8	3GHR-E8	4GHR-E8	5GHR-E8	6GHR-E8
1GHR-E9	2GHR-E9	3GHR-E9	4GHR-E9	5GHR-E9	6GHR-E9	7GHR-E9	8GHR-E9
9GHR-E9	10GHR-E9	11GHR-E9	12GHR-E9	1GHR-E10.1	1GHR-E10.2	2GHR-E10.2	3GHR-E10.2
4GHR-E10.2	1GHR-E10.3	1GHR-E10.4	2GHR-E10.4	3GHR-E10.4	4GHR-E10.4	1GHR-E10.5	2GHR-E10.5

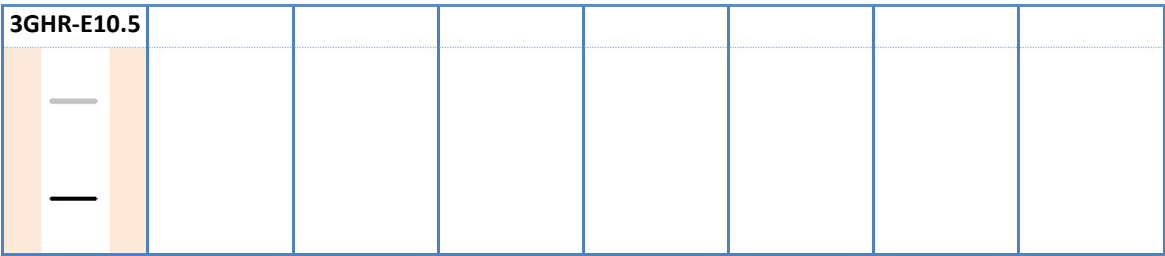
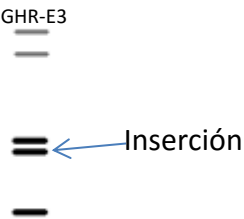


Figura 23: Patrones electroforéticos encontrados para el gen del receptor de la hormona de crecimiento.
En esta figura se recogen los diferentes patrones encontrados.

La secuenciación de muestras de los patrones indica que los patrones 1 y 3 de GHR-E3 se corresponden con el mismo genotipo. Lo mismo ocurre con los patrones 2 y 4. Por tanto, las 2 bandas superiores, poco intensas, no están relacionadas con las variantes génicas. Aquellos patrones que tienen dos bandas en la zona central (patrón 2 y 4) presentan una inserción heterocigota de una C 18 bases aguas arriba de inicio del exón 3. Los otros dos, que tienen una sola banda central, no presentan la inserción.



4.2.4 DGAT1.

Se realizó un estudio preliminar del gen de la Acil CoA:DiacilGlicerol Acetil Transferasa (DGAT1). Este estudio consistió en poner a punto condiciones de PCR de algunos fragmentos del gen y buscar, por SSCP, variabilidad en el exón 8. El exón 8 era de máximo interés porque es el lugar donde se confirmó un QTL para producción de leche, grasa y proteína en ganado vacuno (Coppieters et al., 1998). El gen DGAT tiene 17 exones. El esquema del gen se muestra en la Figura 24:



Figura 24: Esquema, a escala, del gen DGAT1.
Las flechas y rectángulos azules marcan los exones. Los cebadores utilizados para definir los fragmentos de PCR para SSCP del exón 8 se muestran como líneas azules encima y debajo de su posición en los exones 7 y 9. La zona entre los exones 3 y 11 se muestra ampliada en la Figura 25, pág. 77. La cota, superior, negra, representa 500 pb.

Los exones 3 a 17 están muy próximos. Se pueden diseñar cebadores desde las secuencias exónicas adyacentes, más conservadas, para amplificar fragmentos de cada exón de interés. Esta es la estrategia seguida para amplificar el fragmento de SSCP del exón 8 (Fragmento DGAT1-E8/2). Los cebadores diseñados para amplificar fragmentos que contienen exones del gen DGAT1 se recogen en la Tabla 13:

Fragmento	Cebador	Secuencia
DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	GCGGCGGCGCGGGCGGCTCC
	DGAT1-E1 DN	AAAGGTTAGGGGTACGCGCAC
DGAT1-E4	DGAT1-E4 UP	TGCCACCTACCCCTCGCCTA
	DGAT1-E4 DN	TCCTGGGCACCCAGCTCACCA

DGAT1-E5*	DGAT1-E5 UP	ACCTGCCCTGGGTTGCTTCTGT
	DGAT1-E5 DN	ACCTTGAGGCAAGTCAGGGGA
DGAT1-E6	DGAT1-E6 UP	GGGGTCCCTGGCTGACGCTCT
	DGAT1-E6 DN	CCGTGGCCGAGACAGCGTGGG
DGAT1-E7	DGAT1-E7 UP	CTGAGCTTGCCTCTCCACAGT
	DGAT1-E7 DN	GAGGCAAGTGGCAGCCCAGTG
DGAT1-E8*	DGAT1-E8 UP	CCCGACCCGCCCCCTGCCGCTTGC
	DGAT1-E8 DN	AGCAGGCCAGGCCGCCGGGCA
DGAT1-E9*	DGAT1-E9 UP	GCCTGCTAGCCCCGCCCTCCCT
	DGAT1-E9 DN	GGCAGGCCCGCCACCTGGC
DGAT1-E10	DGAT1-E10 UP	TCACTGTCCGCTTGCTTCCTTCCCC
	DGAT1-E10 DN	CCCAGAGTCCCCCCCCCCCCC
DGAT1-E14*	DGAT1-E14 UP	CCACTTGCCCCGCCCCGCAGG
	DGAT1-E14 DN	ACGCGACCCCGTCCACCCCC
DGAT1-E8/2**	DGAT1-E8/2 UP	CAAGGCCAAGGCTGGTGAGG
	DGAT1-E8/2 DN	TGGGGGCGAAGAGGAAGTAG

Tabla 13: Cebadores empleados para crear los fragmentos del gen DGAT1.

Se listan las secuencias y los nombres de los cebadores que generan los fragmentos del gen de DGAT1.

* Las PCRs de los fragmentos marcados con el asterisco funcionan pero presentan algunos problemas: la banda es muy poco intensa (DGAT1-E5, DGAT1-E8); en algunas muestras la amplificación es correcta y en otras no la hay (DGAT1-E9, DGAT1-E14).

** El DGAT1-E8/2 está delimitado por una nueva pareja de cebadores destinada a amplificar el exón 8. Se rediseñó para evitar los problemas técnicos que se producen con la pareja del DGAT1-E8.

El objetivo de este diseño de cebadores era amplificar la secuencia completa de las regiones exónicas del gen. Por ello, los cebadores se situaron en las regiones intrónicas. Su situación se muestra en la Figura 25:

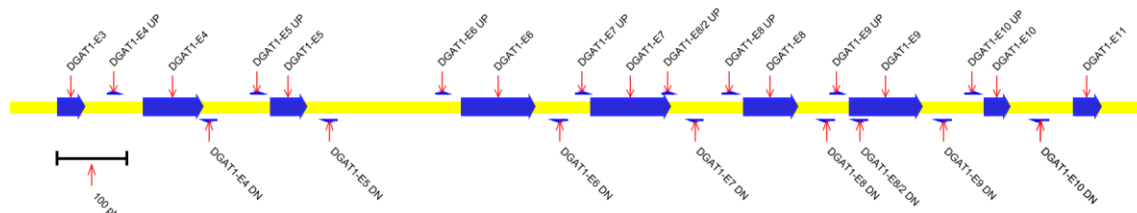


Figura 25: Esquema, a escala, de la colocación de los cebadores en los exones centrales del gen DGAT1.

Cada pareja de exones (medias-flechas azules) fue diseñada para amplificar el exón al que rodea (Flechas azules gruesas). Para el exón 8 se diseñaron 2 parejas. El esquema está realizado a escala. La zona entre los exones 7 y 9 se muestra ampliada en la Figura 26, pág. 78. La cota inferior, negra, representa 100 pb.

Dado el potencial como QTL que tiene el exón 8 se diseñó una nueva pareja de cebadores para amplificar la región desde los exones adyacentes: DGAT1-E8/2.

4.2.4.1 DGAT1-E8

Se analizó el exón 8 del gen DGAT1 porque en este exón se había detectado un QTL con un efecto importante en caracteres de producción en vacas (Coppieters et al., 1998).

Como la primera pareja de cebadores diseñada no había funcionado completamente, se diseñó una nueva (DGAT1-E8/2 UP y DGAT1-E8/2 DN). Esta vez se situaron en posiciones mejor conocidas y más conservadas: los extremos de los exones adyacentes. La posición de estos cebadores se recoge en la Figura 26:

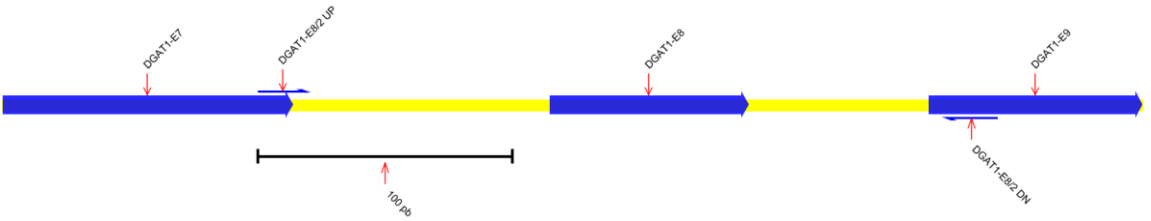


Figura 26: Posición de los cebadores utilizados para estudiar por SSCP el exón 8.
Los cebadores del fragmento DGAT1-E8/2 se diseñaron para aparear en los extremos de los exones circundantes. El tamaño esperado para la secuencia amplificada es de 287 pb. El esquema está realizado a escala. La cota inferior, negra, representa 100 pb.

La PCR funciona correctamente y, al estar los exones tan próximos, el tamaño del fragmento resultante es adecuado para su estudio por SSCP.
Los patrones de SSCP obtenidos son se recogen en la Figura 27:





1DGAT1-E8	2 DGAT1-E8	3 DGAT1-E8	4 DGAT1-E8
			

Figura 27: Patrones electroforéticos encontrados para fragmento DGAT1-E8/2.
En esta figura se recogen los 4 patrones encontrados. Los puntos azules indican que la distancia entre las bandas es mucho mayor.

Los puntos azules del patrón 2 DGAT1-E8 indican que la distancia es mayor que la mostrada pues la última banda migra mucho más que el resto de bandas de ADN de cadena simple.
Al secuenciar los individuos que presentan el patrón 2DGAT1-E8 se encontró una inserción de 3 nucleótidos (AAA), que se traduce en la inserción de un aminoácido *Lys*, muy próxima al QTN detectado en este mismo exón para el ganado vacuno.

4.3 Secuenciación.

La técnica de secuenciación se utilizó en un primer momento para la comprobación de los patrones de SSCP. También se ha utilizado para estudiar productos de PCR más grandes.

A continuación se presenta una relación de las secuencias obtenidas para cada uno de los genes estudiados.

4.3.1 OXT.

Este es el gen que contiene el código para la oxitocina y la neurofisina. La secuencia que se ha utilizado como referencia tiene el ID X55131⁷ en GeneBank.

Este gen se ha dividido en fragmentos (OXI-E1, OXI-E3 y OXI-E3) para ser estudiado por SSCP. Debido al pequeño tamaño del gen OXT, también se ha amplificado en un solo fragmento (OXT_PCRb).

Los resultados de la secuenciación de los fragmentos son los mencionados en los apartaos siguientes:

4.3.1.1 OXI-E1.

El fragmento que engloba al primer exón del gen OXT. El fragmento está delimitado por los cebadores OXI-E1 UP y OXI-E1 DN (ver Tabla 10).

La PCR del fragmento funciona a 60 °C, con 0,75 a 3 mM de MgCl₂, con y sin betaína, con y sin glicerol al 5 % (ver Tabla 9).

La secuencia consenso del fragmento es la siguiente:

AAAGGCCAGA CCCGAGAGAC GGCCGCAGTC CCCGGCCCGG AGCCCAGCGC GTCTGCACCA 60
 TGGCAGGTTC CAGCCTCGCC TGCTGCCTGC TCGGCCTCCT GGCGTTGACC TCCGCCTGCT 120
 ACATTCAGAA CTGCCCCCTG GGCGGCAAGC GTGCGGTGCT GGACCTCGAC GTGCGCACGG 180
 TGAGAGCCCC GCCCTCGACC CGTGGCTCTC CGGGCTGCCA GCCCCGCTGC CACAGGGTCG 240
 CCCCCGCCGC CCCCTTTCCC GCCCTGACCG CGTACCGGCC CCACCTAGCC TGGGAATCGA 300

En azul se resalta la secuencia del exón. Las zonas subrayadas alinean con sendos cebadores OXI-E1 UP y OXI-E1 DN.

El esquema del fragmento se muestra en la Figura 28:

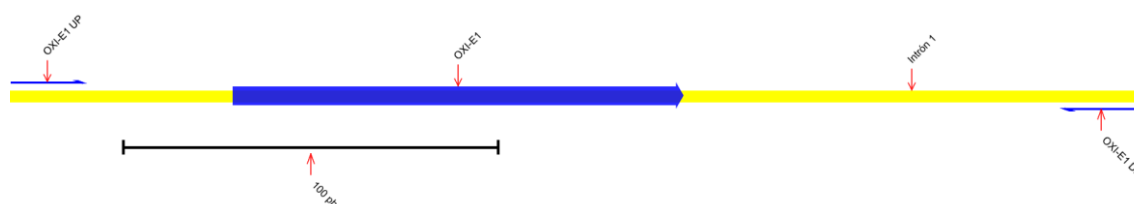


Figura 28: Esquema del fragmento OXI-E1.

La flecha azul gruesa representa el exón. Las medias flechas azules indican la zona donde alinean los cebadores. La cota inferior, negra, representa 100 pb.

En la secuencia de este fragmento no se encontró variabilidad.

4.3.1.2 OXI-E2.

El fragmento que contiene el segundo exón del gen OXT está delimitado por los cebadores OXI-E2 UP y OXI-E2 DN (ver Tabla 10).

La PCR del fragmento funciona a 60 °C, con 1,5 a 3 mM de MgCl₂, con betaína, con y sin glicerol al 5 % (ver Tabla 9).

⁷ Sheep gene for oxytocin and neurophysin

La secuencia completa del fragmento es la siguiente:

CAGTGTCTCC CCTGCGGCCC CGGGGGCAAA GGCCGCTGCT TCGGGCCCRG CATCTGCTGC 60
 GGGGACGAGC TGGGCTGCTT CGTGGGCACG GCCGAGGCGC TGCCTGCCR AGAGGAGAWC 120
 TACCTGCCGT CGCCTGCCA GTCCGGCCAG AAGCCCTGCG GGAGCGGGGG CCGCTGCGCC 180
 GCCGCCGSA TCTGCTGCAG CCCGGGTGAG TCCGGCAGGG GCCGAGACGG GGCCGGGGCT 240
 CCGGAACCMG GCGGGCCGGG CCAGGGTGGC CTTGACTCGG CGTCTCTCTG TGCA 294

En azul se resalta la secuencia del exón. Las zonas subrayadas alinean con sendos cebadores OXI-E2 UP y OXI-E2 DN. En rojo se muestran las posiciones de los SNPs detectados. El esquema de la secuencia se representa en la Figura 29:

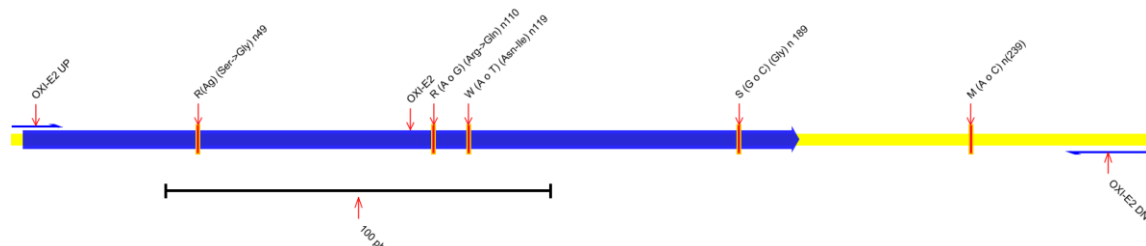


Figura 29: Esquema del fragmento OXI-E2.

La flecha azul gruesa representa el exón. Las medias flechas azules indican la zona donde alinean los cebadores. Se indican las posiciones de los SNPs detectados y la traducción a aminoácidos de los que ocurren dentro de la secuencia codificante. La cota inferior, negra, representa 100 pb.

Esta secuencia contiene 5 polimorfismos de tipo SNP y 4 discrepancias con respecto a la secuencia de referencia, su comparación se observa en la Figura 30.

```

1  CAGTGTCTCCCTGCGGCCCCGGGGGCAAAAGGCCGCTGCTTCGGGCCCRGCATCTGCTGC 60
1145 CAGTGTCTCCCTGCGGCCCCGGGGGCAAAAGGCCGCTGCTTCGGGCCCRGCATCTGCTGC1204

61  GGGGACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCACGGCCGAGGCGCTGCGCTGCCRAGAGGAGAWC 120
1205 GGGGACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCACGGCCGAGGCGCTGCGCTGCCRAGAGGAGAAC1264

121  TACCTGCCGTGCGCCTGCCAGTCCGGCCAGAAGCCCTGCGGGAGCGGGGGCCGCTGCGCC 180
1265 TACCTGCCGTGCGCCTGCCAGTCCGGCCAGAAGCCCTGCGGGAGCGGGGGCCGCTGCGCC1324

181  GCCGCCGGSATCTGCTGCAGCCCGGTGAGTCCGGCAGGGGCCGAGACGGGGCCGGGGCT 240
1325 GCCGCCGGSATCTGCTGCAGCCCGGTGAGTCCGGCAGGGGCCAGACGGGCGGGGGCT1384

241  CCGGAACCMGGCGGGCCGGGCCAGGGTGGCCCTGACTCGGCGTCTCTCTGTGCA 294
1385 CCGGAACCMGGCGGGCCGGGCCAGGGTGGCCCTGACTCGGCGTCTCTCTGTGCA1438
    
```

Figura 30: Comparación de la secuencia del fragmento OXI-E2 con su referencia.

Leyenda: Verde - residuos idénticos | Azul - SNPs | Marrón - discrepancias |. La secuencia superior es la secuencia obtenida en laboratorio para el fragmento OXI-E2, la inferior es la secuencia de referencia X55131. Este alineamiento se ha obtenido utilizando la biblioteca *biojava-alignment-4.0.0* del paquete *biojava* (Prlić et al., 2012) y seleccionando el formato PDBWEB. Se han adaptado y traducido las leyendas.

En la Figura 31 se muestra un electroferograma que contiene las 4 discrepancias con respecto a la secuencia de referencia:

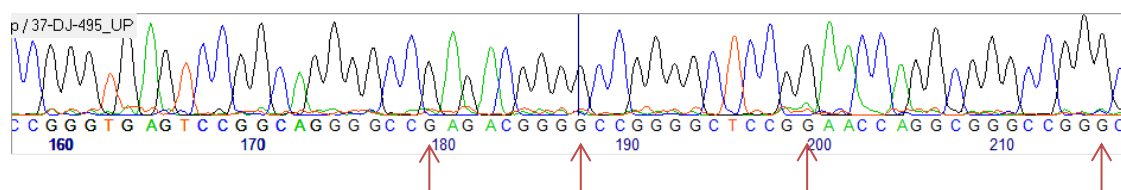


Figura 31: Electroferograma del extremo distal del fragmento OXI-E2.

Las flechas rojas marcan las bases que no aparecen en la secuencia de referencia.

El espaciamiento y la forma de los picos, así como que el índice de calidad *Phred* de las posiciones sea superior a 40 indica que no es posible que estos picos se produzcan por un error en el laboratorio. Llama la atención que las 4 posiciones estén tan juntas y que el nucleótido que falta en la secuencia de referencia sea siempre G. Hemos observado que en secuenciaciones de baja calidad puede perderse sistemáticamente la señal de un nucleótido, sin embargo no tenemos forma de saber si hay un artefacto en la secuenciación que produjo la secuencia de referencia (lo sospechamos) o si esta es una nueva variante de dicha secuencia.

4.3.1.2.1 Traducción.

La traducción de la secuencia produce estos resultados⁸:

TGTCTCCCTGCGGCCCGGGGCAAAGGCCGCTGCTTCGGGCCC (-RGC--) ATCTGCTGCGGGGACGAGCTGGGC
CysLeuProCysGlyProGlyGlyLysGlyArgCysPheGlyPro (SerGly) IleCysCysGlyAspGluLeuGly

TGCTTCGTGGGCACGGCCGAGGCGCTGCGCTGC (-CRA--) GAGGAG (-AWC--) TACCTGCCGTCGCCCTGCCAG
CysPheValGlyThrAlaGluAlaLeuArgCys (ArgGln) GluGlu (AsnIle) TyrLeuProSerProCysGln

TCCGGCCAGAAGCCCTGCGGGAGCGGGGGCCGCTGCGCCCGCCG (-GGS--) ATCTGCTGCAGCCCG
SerGlyGlnLysProCysGlySerGlyGlyArgCysAlaAlaAla (GlyGly) IleCysCysSerPro

En la Tabla 14 se recogen los SNPs detectados:

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
R(49)	Agc	Ser
	Ggc	Gly
R(110)	cGa	Arg
	cAa	Gln
W(119)	aAc	Asn
	aTc	Ile
S(189)	ggG	Gly
	ggC	Gly
M(239)	No traducido	

Tabla 14: Listado de SNPs detectados en el fragmento OXI-E2.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis) y, si el SNP se encuentra en la región traducida, el codón que genera cada variante y la traducción de dicho codón. Para cada codón, el nucleótido afectado por el SNP se capitaliza en mayúscula, los demás en minúscula. Aquellas traducciones que producen cambio de aminoácido están coloreadas.

Los 3 primeros SNPs se traducen en un cambio de aminoácido (49: Ser ->Gly; 110: Arg -> Gln; 119: Asn -> Ile). El SNP en posición 198 no produce cambio de Aminoácido y el de la posición 239 no se traduce por localizarse fuera del exón.

⁸ El código genético, empleado para traducir las secuencias, se puede consultar en el Anexo III.

4.3.1.2.2 Genotipado.

Se secuenciaron algunos representantes de los patrones de SSCP de forma que se puede establecer el genotipo de estos patrones. Los resultados se recogen en la Tabla 15:

LISTA DE GENOTIPOS		Posición				
Genotipo	Patrón	49	110	119	189	239
1	1	A	G	A	G	A
	4A					
	11					
	12					
2	2	A	G	A	S	A
3	3	A	G	A	C	A
4	13	A	R	W	C	A
5	4B	A	G	A	G	M
6	7	R	G	A	G	A

Tabla 15: Lista de genotipos del fragmento OXI-E2.

Para cada genotipo se listan los nucleótidos que lo definen, ordenados por posición en la secuencia, y los patrones de SSCP que produce dicho genotipo. Los heterocigotos se colorean en rojo, los homocigotos menos frecuentes se colorean en azul.

Las coordenadas indicadas en la tabla son relativas al fragmento OXI-E2.

Los patrones 1, 4A, 12 y 11 tienen todos el mismo genotipo, que no presenta ambigüedades (AGAGA). El genotipo 2 se diferencia de este en poseer un heterocigoto S en posición 189. El genotipo 3 presenta en esta posición el otro homocigoto: C. el genotipo 4 difiere del primero en las posiciones 110, 119 y 189 que contiene a su vez los nucleótidos ambiguos R, W y el homocigoto C respectivamente. El genotipo 5 se caracteriza por una ambigüedad M en la posición 239. El genotipo 6 varía del resto al presentar una ambigüedad R en posición 49.

4.3.1.3 OXI-E3

El fragmento que contiene el tercer exón del gen OXT está delimitado por los cebadores OXI-E3 UP y OXI-E3 DN (ver Tabla 10).

La PCR del fragmento funciona a 55 °C con MgCl₂ 3 mM y a 60 °C, con MgCl₂ 1,5, 3 y 6 mM, con y sin betaína, con y sin glicerol al 5 % (ver Tabla 9).

La secuencia del fragmento es la siguiente:

ACTCGGCGTC TCTCTGTGCA GACGGCTGCC ACGCGGATCC CGCCTGCGAC CCGAGGCCG 60
 CCTTCTCCCA GCACTGAGAC CGRCCGGCCC CTGACACCAT CGGAGCACAG CCCTCACTCC 120
 CTCTGTAATC ATCCCCAGGA ATTATGACAA TGAAATAAAG CCTTTTTTTC CCCTCCAACA 180
 AGCCTCGT 188

Se colorea en azul la secuencia del exón 2 y en rojo la del SNP encontrado. Se ha subrayado la posición de los cebadores.

El esquema de la secuencia se muestra en la Figura 32:

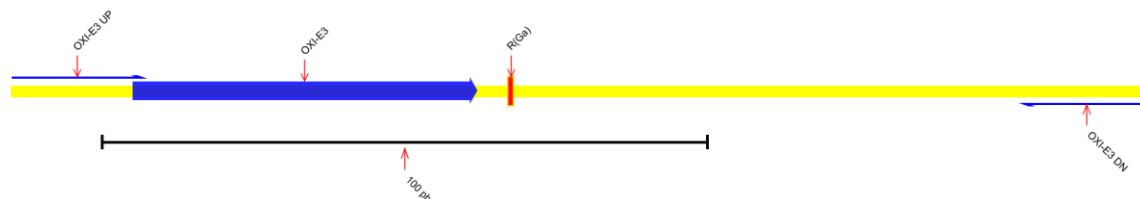


Figura 32: Esquema del fragmento OXI-E3.

La flecha azul gruesa representa el exón. Las medias flechas azules indican la zona donde alinean los cebadores. Se indican las posiciones del SNP detectado. La cota inferior, negra, representa 100 pb.

La mutación encontrada cae fuera de la secuencia codificante y no se corresponde con ningún patrón de SSCP porque no se encontró en las muestras empleadas en los experimentos de SSCP sino en una secuenciación posterior del gen completo.

En la Tabla 16 se recoge el SNP detectado en el fragmento:

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
R(83)		No traducido

Tabla 16: Listado de SNPs detectados en el fragmento OXI-E3.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis).

Los resultados obtenidos en el estudio de este gen fueron presentados como comunicación en las X Jornadas sobre Producción Animal (Morán Pérez et al., 2003).

4.3.1.4 OXT

Este fragmento, de 1600 pb, contiene el gen completo de la oxitocina y la neurofisina. Para amplificar este fragmento se utilizaron los cebadores OXT-PCRb UP y OXT-PCRb DN (ver Tabla 8).

La PCR funciona a 57 °C, con 1,5 mM de MgCl₂ y betaína 0,75 M (ver Tabla 9).

La secuencia consenso, obtenida de la secuenciación de este fragmento es:

```

GTAGCTGTTG TAATGCAATA GGAGGATATC AGCCATTTC A TTTGTGACG AAGTCACAGG 60
TATTGCAAAT TCCACTGTGG TTTGTTGCCT ACCTTATAGT TGAAGGAAAG GCTGGATTTC 120
ACTTAGAAGA GAGAAAATAA AATCTTTYCA TATCCAAGAG CCTCCTCCAG GTAAATGGAT 180
GTTGGTGTAG GGAGCCGGGC TGGGGTTCCA GGAAATCAGA TTTCAGGAAG AGAACTTGCT 240
TGCAGAGGGG AGCTAGGGGG TGTGTGTGGT TGGCCAAGAG GGCAGATGGG GGAGTCCTAA 300
ACCAATCTCT TCTCGCCTGG AGGGCCCGAG TGTTTCATCCT GACCCCTCAC CCCAAAGGAA 360
TGAGAAGTCT CTCGGTTGGG CCGCAGCCCC CATACTCCCT GTCCCACMGT AGGACCCAGG 420
CCACCGCACA GGCTCCCTGC CCAGAGCTGC TTGCTTCCCC TAGCGGCGCT CGCTATCATC 480
TCCCGTAACA TTAGCCATTA GCAGACATAA CCTTGACCCG GCACAGCCCC TGCAAATGAG 540
GGGGCGCGCC GGGGGCGCAG GGCTTGACCC GCGGCGGCGC GCTGTGACCA GTCATGCGGC 600
TGCCCTCTTA AGACACCGTT CCGCCCACRC GGCCGCGGGG CTTAAAAGGC CAGACCCGAG 660
AGACGGCKC AGTCCCCGGC CCGGAGCCCA GCGCGTCTGC ACCATGGCAG GTTCCAGCCT 720
CGCCTGTGTC CTGCTCGGC TCCTGGCGTT GACCTCGGC TGCTACATTC AGAAGTCCCC 780
CCTGGGCGGC AAGCGTGGG TGCTGGACCT CGACGTGCGC ACGGTGAGCG CCCC GCCCTC 840
GTCCCGTGGC TCTCGGGGCT GGCAGGCCCG CTGCCACAGG GTCGCCCCCG CCGCCCCCTT 900
TCCCGCCCTG ACCGCGTACC GGCCCCACCT AGCCTGGGAA TCGAGGGAGC GGAGGAGCTT 960
TTGACTGCCC TCCTTCGACC AATTCTGAGC CCAAAGAGAG CGGGGAAGAC CCGCCATCTC 1020
CCGCGTCTCT CAGGCCGCCC TCGCCCGCCC GGCTCAGCCC CCCACCCAC AGGGTCTTCCC 1080
TCCC***CG GCCGTCCCC TCCCGGCCCG GGCTCATCCC CGCCCTCCG CCAGTGTCTC 1140
CCCTGCGGCC CCGGGGGCAA AGGCCGCTGC TTCGGGCCA GCATCTGCTG CGGGGACGAG 1200
CTGGGCTGCT TCGTGGGCAC GGCCGAGGCG CTGCGTGCC GAGAGGAGAA CTACCTGCCG 1260
TCGCCCTGCC AGTCCGGCCA GAAGCCCTGC GGGAGCGGGG CCGCTGCGC CGCCGCCGGS 1320
ATCTGTCTGA GCCCGGGTGA GTCCGGCAGG GGCCGAGACG GGGCCGGGGC TCCGGAACCA 1380
GGCGGGCCGG GCCAGGTGG CCCTGACTCG GCGTCTCTCT GTGCAGACGG CTGCCACGCG 1440
GATCCCGCCT GCGACCCCGA GGCCGCCCTC TCCCAGCACT GAGACCCRCC GGCCCTGAC 1500
ACCATCGGAG CACAGCCCTC ACTCCCTCTG TAATCATCCC CAGGAATTAT GACAATGAAA 1560
TAAAGCCTTT TTTTCCCCCT CAACAAGCCT CGTGTCTGAG TGTA 1604

```

Se representan los nucleótidos que pertenecen a los exones en color azul, los SNPs en rojo sin fondo y las inserciones en rojo con fondo rojo. La segunda inserción (TCCCTCCC****) marca la posición de la secuencia repetida que en algunas muestras presenta 2 repeticiones TCCC y en otras presenta 3.

Esta misma secuencia se representa, gráficamente, en la Figura 15:

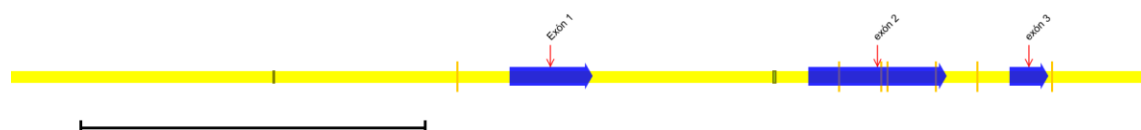


Figura 33: Esquema del gen OXT

El gen está compuesto por 3 exones (flechas horizontales azules). Se han encontrado 7 SNPs (líneas verticales) y 2 inserciones (rectángulos verdosos). La cota inferior, negra, representa 500 pb.

La Tabla 17 es la tabla de características de la secuencia consenso para el fragmento OXT. Detalla los elementos del esquema de la Figura 33:

Inicio	Final	Tipo	Nombre	Comentario
380	381	Inserción	Inserción AG	
646	646	SNP	R(ag)	
721	840	Exón	Exón 1	
1102	1105	Inserción	Inserción heterocigota TCCC	Ambos alelos se diferencian en la posesión de 2 repeticiones TCCC (TCCCTCCC) o 3 repeticiones TCCC (TCCCTCCCTCCC)
1152	1352	Exón	Exón 2	
1197	1197	SNP	R(Ag)	(Ser->Gly) n49
1258	1258	SNP	R (AG)	(Arg->Gln) n110
1267	1267	SNP	W (AT)	(Asn->Ile) n119
1337	1337	SNP	S (GC)	(Gly) n189
1397	1397	SNP	M (AC)	n239
1443	1499	Exón	exón 3	
1505	1505	SNP	R(Ga)	

Tabla 17: Características encontradas en la secuencia del gen de la oxitocina y neurofina.

Para cada característica se lista la posición de la primera base afectada por dicha característica (Inicio), la de la última (Final), el tipo de característica (Nombre) y, si es necesario, información adicional (Comentario). Para nombrar los SNPs se emplea un formato que consiste en concatenar el código de ambigüedad con los distintos nucleótidos que representa dicho código entre paréntesis. Estos nucleótidos se ordenan de mayor a menor frecuencia. La capitalización en mayúsculas indica que se ha encontrado la forma genética. Así, R(GA) significa que se ha encontrado el heterocigoto R, el homocigoto G y el homocigoto A y que la frecuencia del homocigoto G es mayor que la del A. En los comentarios de los SNPs implicados en el genotipado del fragmento OXI-E2 se indica, entre paréntesis, el cambio de aminoácido que produce (si lo hace) y la posición relativa del nucleótido en este formato: nPosición.

4.3.1.4.1 Inserción TCCC

A partir de la base 1094 de la secuencia del fragmento OXT se encontró una inserción heterocigota con la secuencia: **TCCCTCCCins (TCCC)**. Este tipo de inserción presenta una dificultad añadida a la hora de ser detectada por secuenciación: los puntos de corte de calidad de secuenciación no coinciden en la misma posición en la secuencia UP y en la DN.

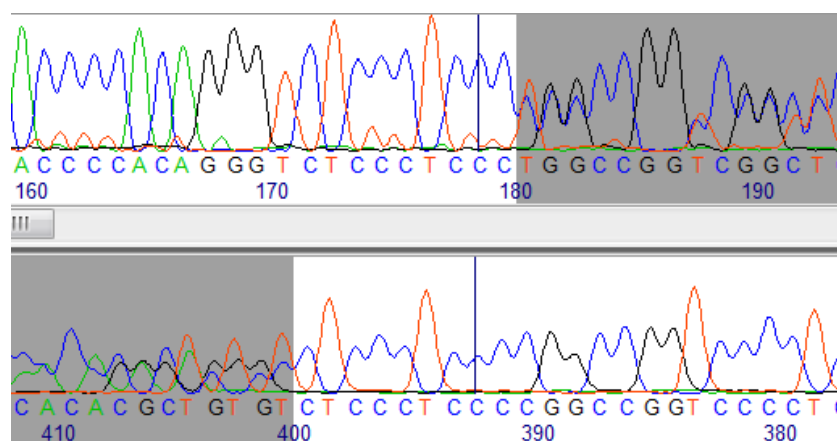


Figura 34: Inserción heterocigota TCCC.

Se dibujan los electroferogramas obtenidos para la secuenciación de una muestra que contiene la inserción TCCC en heterocigosis: 2 repeticiones en una de las cadenas y 3 repeticiones en la otra. La secuencia superior se obtuvo a partir del cebador UP, la inferior se secuenció desde el cebador DN. La zona obscurecida está considerada de baja calidad por el programa de identificación de bases.

4.3.2 PRL.

Al secuenciar el gen de la prolactina se pretendía establecer el genotipo de los distintos patrones de SSCP y caracterizar las secuencias del gen.

El gen de la prolactina tiene 5 exones. El 5º es más grande que los demás (ver Figura 35).

Cuando se diseñaron los cebadores para el estudio del gen de la prolactina no se conocía la secuencia del gen en oveja. La información de que se disponía era:

- El ARNm de la prolactina en oveja, con ID X76050⁹ en la base de datos GeneBank del NCBI (Benson et al., 2013).
- Las regiones 3' (M34535.1¹⁰) y 5' (X01452¹¹, Camper et al., 1984) en vaca. Estas regiones incluyen los exones 1 y 5 así como un fragmento del intrón 1.
- Un fragmento del exón 2 de vaca (X01744¹², Camper et al., 1984).
- La secuencia completa del gen de la prolactina en humano (AL023883.6¹³).

Los cebadores de SSCP se diseñaron para amplificar las secuencias codificantes del gen. En la Figura 35 puede verse su posición. El exón 5 es demasiado largo y se partió en 2 fragmentos de SSCP.



Figura 35: Esquema del gen de la Prolactina.

Los rectángulos y flechas azules representan los exones. Los cebadores están representados como medias flechas en el sentido en que alinean sus secuencias (→ ó ←). Como son muy pequeños en relación al resto de características, sólo se ve la línea inclinada que es parte de la cabeza de la flecha. Los extremos inferiores de las marcas de cebadores UP y los superiores de las de cebadores DN

⁹ *O. aries* ovine mammary gland prolactin mRNA.

¹⁰ Bovine prolactin gene, exon 5.

¹¹ Bovine prolactin gene 5' flanking region and exon 1.

¹² Bovine prolactin gene exon 2 fragment.

¹³ Human DNA sequence from clone RP3-404K8 on chromosome 6p22.2-22.3, complete sequence.

indican la posición de cada cebador. Las líneas horizontales dibujadas de bajo de cada exón indican la posición de cada uno de los fragmentos diseñados. Para estudiar por SSCP el exón 5 se diseñaron 2 fragmentos, el PRL-E5.1 (línea gris) y el PRL-E5.2 (línea verde). El esquema está dibujado a escala. La cota superior, negra, representa 500 pb.

Se eligió “*Capra hircus* prolactin precursor, gene, complete cds.”, con ID EU586510 en la base de datos del NCBI como referencia para posicionar las características del gen de la prolactina por ser la más próxima, filogenéticamente, a la de la oveja. Como esta secuencia no cubre completamente el extremo 3’, se completó el exón 5 y la zona 5’ de la secuencia de referencia con la secuencia “Bovine prolactin gene, exon 5” (M34535.1) de vaca.

A continuación se recogen los resultados obtenidos de la secuenciación de los fragmentos de SSCP.

4.3.2.1 PRL-E1

El fragmento que engloba al exón 1 del gen de la prolactina tiene una longitud de 149 pb y está delimitado por los cebadores PRL-E1 UP y PRL-E1 DN (ver Tabla 11).

La PCR funciona a 57, 58 y 62 °C con una concentración de MgCl₂ de 1,5 mM (ver Tabla 9).

Esta es la secuencia obtenida para el fragmento PRL-E1:

AAGCCTTATA AAGCCAACAT CTGGGGAAGA GAAAGCTATA GGACGAGAGC TTCCTGGTGA 60
AGTGTGTTTC TTGAAATCAT CACCACCATG GACAGCAAAG GTTCAGCACA GAAAGGTATG 120
TACAGCAGCT TGTGGAGTTG TTGGGTTTT 149

Se representa en azul los nucleótidos que pertenecen al exón 1, en rojo el SNP detectado y se subrayan las posiciones de los cebadores que delimitan el fragmento.

El esquema del fragmento se dibuja en la Figura 36:



Figura 36: Esquema del fragmento PRL-E1.

La flecha azul gruesa representa el exón y el rectángulo de fondo rojo la mutación encontrada. También se indica la posición de la caja TATA, del codón de inicio de la traducción, del comienzo del ARNm, del comienzo de la secuencia codificante y las regiones 1 y 2 que se describen en el apartado 4.3.2.12, pág. 96. Las medias flechas azules indican la zona donde alinean los cebadores. El esquema está realizado a escala. La cota inferior, negra, representa 10 pb.

La secuencia del exón produce un ARNm de forma corta (similar al X76050¹⁴).

El SNP detectado se localiza dentro de la secuencia del exón, alinea con la posición 749 de la secuencia de referencia (posición 149 relativa al fragmento), pero no produce cambio de aminoácido:

ATGGACAGCAAAGGTTCA (-GCR--) CAGAAAG
MetAspSerLysGlySer (AlaAla) GlnLys

En la Tabla 18 se recoge la información de este SNP.:

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
R(149)	gcA	Ala
	gcG	Ala

Tabla 18: Listado de SNPs detectados en el fragmento PRL-E1.

¹⁴ *O. aries* ovine mammary gland prolactin mRNA.”

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis) y, si el SNP se encuentra en la región traducida, el codón que genera cada variante y la traducción de dicho codón. Para cada codón, el nucleótido afectado por el SNP se capitaliza en mayúscula, los demás en minúscula.

La secuenciación de las muestra empleadas en el SSCP permite asignar a cada patrón un genotipo diferente, que se muestra en la Tabla 19:

Patrón	Genotipo
1	G
2	A
3	R

Tabla 19: Lista de genotipos del fragmento PRL-E1.

Para cada patrón de SSCP se lista el nucleótido que define al genotipo. Los heterocigotos se colorean en rojo, los homocigotos menos frecuentes se colorean en azul.

4.3.2.2 PRL-I1

Este fragmento cubre el intrón 1 del gen de la prolactina. El tamaño esperado del fragmento es de 2898 pb. Está delimitado por los cebadores PRL-I1 UP y PRL-I1 DN (ver Tabla 8).

Los intentos por amplificarlo completamente fueron infructuosos. Se probaron 15 condiciones de PCR: 5 concentraciones de $MgCl_2$ (1, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 mM) a 3 temperaturas (52, 55 y 58 °C).

También se probó a amplificar el mismo intrón incluido dentro de otros fragmentos distintos. En ningún caso se logró secuenciar correctamente.

4.3.2.3 PRL-E2

Para amplificar el segundo exón de la prolactina se diseñó esta pareja de cebadores PRL-E2 UP y PRL-E2 DN.

Como la PCR no funcionó correctamente, se diseñó una nueva pareja de cebadores que delimitan un nuevo fragmento: PRL2-E2.

4.3.2.3.1 PRL2-E2

Es el fragmento delimitado por la pareja de cebadores PRL2-E2 UP y PRL2-E2 DN (ver Tabla 11).

La PCR funciona a 56 °C y con una concentración de $MgCl_2$ de 1,5 mM (ver Tabla 9).

El fragmento tiene una longitud de 132 pb. La secuencia obtenida para este fragmento es:

```
TCCTGCTGCT GGTGGTGTC AATCTACTCT TGTGTCAGGG TGTGGTCTCC ACYCCGTGCT 60
GTCCCAATGG GCCTGGCAAC TGCCAGGTGT CCCTTCGAGA CCTGTTTGAC CMGGCAGTCA 120
TGGTGTCCCA CT 132
```

El esquema del fragmento se muestra en la Figura 37:

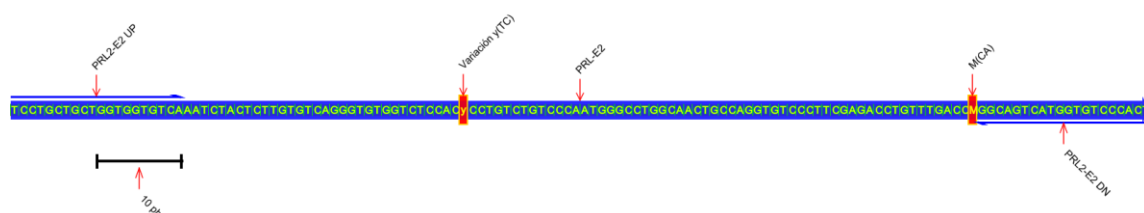


Figura 37: Esquema del fragmento PRL2-E2.

El fragmento comprende una sección del exón 2 (fondo azul). Los cebadores que lo generan se muestran como medias flechas encima (UP) y debajo (DN) de la secuencia. Los SNPs detectados en el fragmento se

marcan con un rectángulo rojo. El esquema está realizado a escala. La cota inferior, negra, representa 10 pb.

En esta secuencia se han encontrado los 2 SNPs que se listan en la Tabla 20.

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
Y(53)	acC	Thr
	acT	Thr
M(112)	Agg	Arg
	Cgg	Arg

Tabla 20: Listado de SNPs detectados en el fragmento PRL2-E2.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis) y, si el SNP se encuentra en la región traducida, el codón que genera cada variante y la traducción de dicho codón. Para cada codón, el nucleótido afectado por el SNP se capitaliza en mayúscula, los demás en minúscula.

El SNP 53 apareció en muy pocas muestras secuenciadas en este trabajo pero se confirmó en muestras de un trabajo posterior (García Gámez, 2012).

Ninguno de los 2 SNPs produce cambio de aminoácido. Esta es la traducción de la secuencia del fragmento:

TCCTGCTGCTGGTGGTGTCAAATCTACTCTTGTGTCAGGGTGTGGTCTCC (-ACY--) CCTGTCTGTCCCAATG
LeuLeuLeuValValSerAsnLeuLeuLeuCysGlnGlyValValSer (ThrThr) ProValCysProAsnG

GGCCTGGCAACTGCCAGGTGTCCCTTCGAGACCTGTTTGAC (-MGG--) GCAGTCATGGTGTCCCACT
lyProGlyAsnCysGlnValSerLeuArgAspLeuPheAsp (ArgArg) AlaValMetValSerHis

No fue posible establecer una asociación adecuada entre los SNPs detectados y los patrones de SSCP. La cantidad de patrones detectados en este fragmento tan pequeño parece demasiado alta y puede deberse al exceso de celo al registrar como bandas de SSCP aquellas que podrían ser sólo conformaciones estables de una misma secuencia génica.

4.3.2.4 PRL-I2

Este fragmento cubre el intrón 2 del gen de la prolactina. Está delimitado por los cebadores:

- PRL-I2 UP: ACATCCATAACCTCTCCTCGG
- PRL-I2 DN: GAACCCTTTGCCCTGG

El tamaño esperado para el fragmento es de 2315 pb. No se consiguió obtener una amplificación de este fragmento. Se intentó diseñar una segunda pareja de cebadores:

4.3.2.4.1 PRL2-I2

Está delimitado por los cebadores:

- PRL2-I2 UP: GCTCCTGCTGCTGGTGGTGTCAA
- PRL2-I2 DN: TAGGAAGGGAGGAGGTGTGGCAGCT

El tamaño esperado para el fragmento es de 2492 pb. Las PCRs diseñadas para su amplificación no funcionaron. Se descartó la secuenciación de este fragmento.

4.3.2.5 PRL-I1-I2

Se diseñó este fragmento para intentar amplificar los 2 intrones que circundan al exón 2: PRL-I1 y PRL-I2. Se utilizaron el cebador UP del intrón 1 y el DN del intrón 2 (ver Tabla 8).

Se determinó que sus temperaturas de anillamiento eran compatibles y que podían funcionar juntos en una PCR. La PCR se realizó a 55 °C con 1,5 mM de MgCl₂. El fragmento esperado, de 5418 pb, se muestra en la Figura 38:

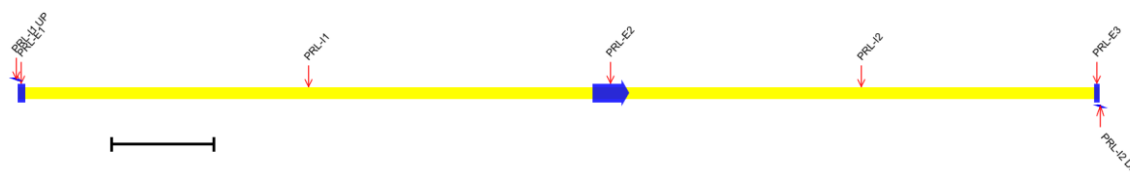


Figura 38: Esquema del fragmento PRL-I1-I2

El fragmento esperado contiene secuencias de los exones 1, 2 y 3 además de los intrones 1 y 2 completos. La longitud esperada para este fragmento es de 5234 pb. Se muestran las posiciones de los exones y los cebadores. También se marcan los intrones. El dibujo está realizado a escala. La cota inferior, negra, representa 500 pb.

La secuencia que se obtuvo como resultado de la secuenciación del producto de PCR es la siguiente:

```

TTTGTCTTCT GTGATTCTCT TTCTGTCTTG TAAATAACTT CATTTCTGTC ATTTCTTTTT 60
AGATTCCACA TATAAGGATG TCATATGATA TTTATCCTGT GTCTGACTGC ACCCGGTATG 120
ACACTCTCTA GGTCCATACA TGTTGCTGCA AAGTGTCTTA TTTCATTCTT TTTAATGGCY 180
GAGTAATATT CCATTATATA TATGTACCAC ATCTTCTTTA GCCATTCTC TGTCAGTGGA 240
CATTTAGGTT GTGTCCATGT CTTKGCTATT ATAAACAGTG CTGCAGTGAA CATGGGAGTG 300
CATGTATCTT TGGGGACCAT GTCTTTCTYT GGATATATGC CCAGGAGTGG GATTACAGGG 360
TCATATGGTA GCTCGATTTC TCCTAGAGAA GGAAATGGCA ACCCACTCCA GTATTCTTGC 420
CTAGAGAATC CTGTGGACAG AGGAGCCTGG TA 452

```

El esquema de esta secuencia se muestra en la Figura 39:



Figura 39: Esquema del fragmento obtenido usando los cebadores PRL-I1 UP y PRL-I2 DN.

Se encontraron 3 SNPs (en rojo). El dibujo está realizado a escala. La cota inferior, negra, representa 50 pb. Los rectángulos oscuros se indican zonas de secuencia reconocidas como un transposón L1-2_BT y un SINE Bob-tA2.

Se han encontrado 3 SNPs en las posiciones 180, 264 y 329 (ver Tabla 21).

Posición	SNP
180	Y(Ct)
264	K(Gt)
329	Y(Tc)

Tabla 21: Listado de SNPs detectados en el fragmento amplificado para GH-I1-I2.

Para cada SNP se muestra la posición y el tipo de heterocigoto detectado.

La secuencia obtenida contiene 452 pb pero no se corresponde con la esperada. Tampoco alinea de forma clara con ninguna secuencia conocida. Esta secuencia alinea con la fragmentos de la secuencia con ID CP011902¹⁵ en la base de datos de GeneBank. En esta secuencia se localiza un transposón L1-2_BT entre las posiciones 8 y 381 y un SINE Bov-tA2 entre las posiciones 382 y 450 utilizando la aplicación CENSOR (Kohany et al., 2006) de la base de datos Repbase (Jurka, 2000).

¹⁵ *Ovis canadensis canadensis* isolate 43U chromosome 17 sequence.

Por tanto, el fragmento no ha amplificado correctamente y los cebadores no sirven para obtener el fragmento deseado.

4.3.2.6 PRL-E3

Para amplificar el tercer exón de la prolactina se diseñó la pareja de cebadores PRL-E3 UP y PRL-E3 DN (ver Tabla 11).

Como la PCR no funcionó correctamente en todas las ocasiones, se diseñó una nueva pareja de cebadores que delimitan un nuevo fragmento: PRL2-E3.

4.3.2.6.1 PRL2-E3

Es el fragmento delimitado por esta la pareja de cebadores PRL2-E3 UP y PRL2-E3 DN (ver Tabla 11).

La PCR funciona a 52 °C y con una concentración de MgCl₂ de 1,5 mM (ver Tabla 8). El esquema del fragmento se muestra en la Figura 40:

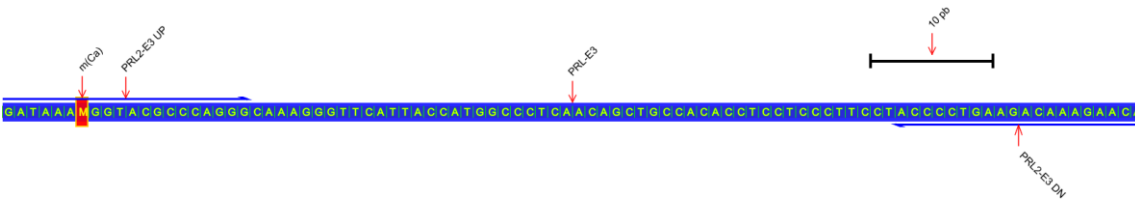


Figura 40: Esquema del fragmento PRL2-E3.

El fragmento comprende una sección del exón 3 (flecha azul). Los cebadores que lo generan se muestran como medias flechas encima (UP) y debajo (DN) de la secuencia. Se marca la posición del SNP M detectado por García Gámez, 2012. En nuestro caso sólo secuenciamos la variante C. El dibujo está realizado a escala. La cota inferior, negra, representa 10 pb.

En el esquema se incluye la posición del SNP M detectado por García Gámez, 2012 en un trabajo posterior. En este trabajo no se detectó porque el cebador cubre la posición del SNP. Además, la secuencia con la que se diseñó el cebador difiere de la oveja en la posición 12 (ver Figura 41). Esta degeneración no impidió la amplificación de las variantes C pero, probablemente, si lo hizo con las de las variantes A en la posición del SNP. Por eso no la detectamos mediante secuenciación.

1	GATAAA C GGTAT T GCCCAGGG	20	Cebador	1	GATAAA C GGTAT T GCCCAGGG	20
1	GATAAA C GGTAC G CCCAGGG	20	Secuencia	1	GATAAA A GGTAC C GCCCAGGG	20
Variante C				Variante A		

Figura 41: Alineamiento del cebador PRL2-E3 UP con las variantes C y A del exón 3 de la prolactina.

La secuencia superior es la del cebador. La inferior es la secuencia de cada una de las variantes del exón 3 descritas en la prolactina por García Gámez, 2012. La variante C discrepa del cebador en la posición 12. La variante A discrepa del cebador en las posiciones 7 y 12. Las bases implicadas se presentan en negrita.

4.3.2.7 PRL-I3

Se intentó amplificar el intrón 3 del gen de la prolactina mediante esta pareja de cebadores:

- PRL-I3 UP: TACCCCTGAAGACAAAGAACA
- PRL-I3 DN: TGATACAGAGGGTCATTCCAG

El fragmento diseñado tendría una longitud de 2200 pb. El esquema del fragmento esperado se muestra en la Figura 42:

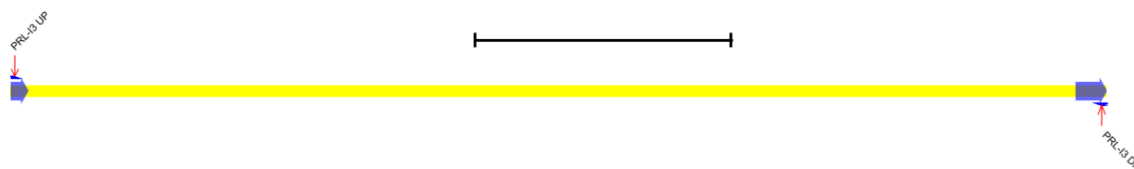


Figura 42: Esquema del fragmento PRL-I3.

Las flechas gruesas azules marcan las posiciones de los extremos de los exones 3 y 4. Las medias flechas indican la posición de los cebadores UP (superior) y DN (inferior). La cota superior, negra, representa 500 pb.

La PCR de este fragmento no funcionó. El fragmento no se secuenció.

Se realizaron varios fragmentos alternativos con diseños de combinaciones de cebadores diferentes pero tampoco se logró la amplificación del intrón 3.

4.3.2.8 PRL-E4

Para amplificar el cuarto exón de la prolactina se diseñaron los cebadores PRL-E4 UP y PRL-E4 DN (ver Tabla 11).

Como la PCR no funcionó correctamente, se diseñó una nueva pareja de cebadores que delimitan un nuevo fragmento: PRL2-E4.

4.3.2.8.1 PRL2-E4

Es el fragmento delimitado por los cebadores PRL2-E4 UP y PRL2-E4 DN (ver Tabla 11). La PCR funciona entre 52 y 60 °C y con una concentración de $MgCl_2$ de 1,5 mM (ver Tabla 8).

La secuencia obtenida de la secuenciación de este fragmento es la siguiente:

TGCGCTCCTG GAATGACCCT CTGTATCACC TAGTCACAGA GGTGC GG GT ATGAAAGGAG 60
TCCGAGATGC TATCCTATCG AGGGCCATAG AGATTGAGGA AGAAAACAAA CGACTTCTGG 120
AAGGCATGGA 130

Las bases se colorean en azul porque todas pertenecen al exón 4. Las zonas subrayadas son aquellas donde alinean los cebadores que delimitan el fragmento.

El esquema del fragmento se recoge en la Figura 43:

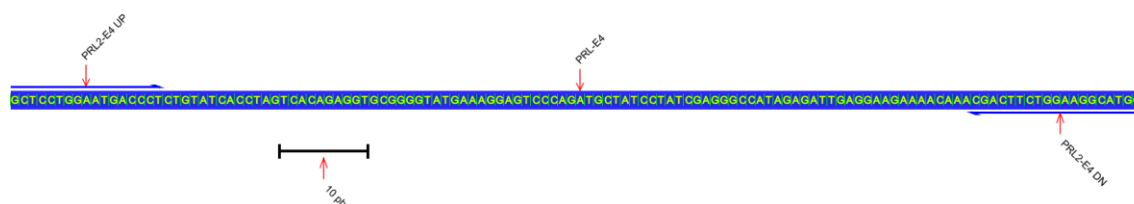


Figura 43: Esquema del fragmento PRL2-E4.

El fragmento comprende una sección del exón 4 (flecha azul). Los cebadores que lo generan se muestran como medias flechas encima (UP) y debajo (DN) de la secuencia. La cota inferior, negra, representa 10 pb.

La secuencia es la esperada. No se ha encontrado variabilidad en el fragmento.

4.3.2.9 PRL-I4

Este es el fragmento comprendido entre los cebadores PRL-I4 UP y PRL-I4 DN (ver Tabla 8). Se utilizó para secuenciar el intrón 4 del gen. El tamaño esperado para el fragmento es de 961 pb. La secuencia de los cebadores utilizados es:

La PCR funciona a 60 °C con 1,5 mM de $MgCl_2$.

El tamaño esperado para el fragmento es de 961 pb. La secuencia obtenida para este fragmento es la siguiente:

AAGGCATGGA AATGATATTT GGCCAGGTGA GCAGCCTCAT GAAATCTTCC TTGCTATTCT 60
CATGAATGAG AGAGGTGATT TCTTTAAGGA GGAATGAGTT TTGAACTATC TCACTGTAYA 120
AGAACACAAT TCAGACCTTC TTTTCTAGA CTGGTATTAC ACAAAGCAAA AATCTGTTCA 180
TTCATAGTGA TAAATTCTAC TGTAATGAA TTAGAATTCC ACAGCAATTT TTGACAGGTA 240
TAGTCTTTCT TGAATTGCAC AGTACACCA AAATCTTGCC TCTCCTGGG TACAGATGGC 300
TGAAATATTT TCAAGGATAA GAGAACTAGA GAATACAATT TGCAAGATAA ATGTTTTCTT 360
CAAAATATCC AAAGATATCC TCTACTGAAA TTCAGCTTGT ATTCTTCCTC TGTCTCCTC 420
AAACCATAGK ATGAGAGTGA GAAGAAAGAA AAGAGAAAGT CAAAACCAAA CTAATACTTG 480
AATTCTGCTA TTAGTTTTTA TTAATAAATT ACTAACACAT ATCTGATMCA CTAACTCYAA 540
AATCCAAGTG TAGAATCTTT CATGTATCTT CCCCAATTAC TAATTTGATA ATTAGAAAGA 600
ACAAWGATGA GCAAATACTA CTAATACTCA TAACAACCTCA TTATCTTTTG GATGCTTAGG 660
TTATTCCTGG AGCCAAAGAG ACTAAGACCT A 691

La zona atenuada no se ha obtenido, por secuenciación, en este trabajo. La secuenciación de los extremos del fragmento no llega al mínimo de calidad. Es la secuencia de los extremos del fragmento diseñado. Se muestran en azul los exones que rodean al intrón (PRL-E4 y PRL-E5 respectivamente) y en rojo las posiciones de los SNPs detectados. Las bases en negrita han sido detectadas como un retrovirus endógeno EVR2 utilizando la aplicación CENSOR (Kohany et al., 2006) de la base de datos Repbase (Jurka, 2000).

El esquema de esta secuencia se muestra en la Figura 44:



Figura 44: Esquema del fragmento PRL-I4.

Las zonas azules son exones. Las flechas indican donde se unen los cebadores. Se muestran los SNPs detectados en la secuencia. El esquema está dibujado a escala. La cota inferior, negra, representa 100 pb.

Los SNPs encontrados son los se listan en la Tabla 22:

Posición	SNP
119	Y(TC)
430	K(TG)
538	Y(TC)
605	W(TA)

Tabla 22: Listado de SNPs detectados en el fragmento PRL-I4

Para cada SNP se muestra la posición y el tipo de heterocigoto.

La secuencia de referencia para diseñar este fragmento es la identificada con el código EU586510¹⁶ en la base de datos del NCBI. Además de los SNPs citados, se encontró una inserción y 4 discrepancias entre las secuencia obtenida para la oveja y la secuencia de referencia de la cabra. Se listan en la Tabla 23:

¹⁶ *Capra hircus* prolactin precursor, gene, complete cds

Posición	Oveja	Cabra
73-74	AG	--
299	G	T
407	C	T
482	A	G
634	C	T

Tabla 23: Diferencias entre la secuencia obtenida para el fragmento PRL-I4 y la de su referencia.

Para cada diferencia se lista el número de base, o intervalo, de bases que ocupa (Posición), la secuencia de nucleótidos obtenida en esa posición (Oveja) y la secuencia en la posición equivalente en la referencia EU586510 (Cabra).

4.3.2.10 Otras combinaciones de PRL.

Además de la combinación de cebadores PRL- I1-I2 se probaron las combinaciones de cebadores listadas en la Tabla 24:

Fragmento	Cebador UP	Cebador DN
PRL-I1-I1M	PRL-I1 UP ATCACCACCATGGACAGC	PRL-I1M DN TTATGGATGTAGTGGGACACC
PRL-I1M-E2	PRL-I1M UP GACGAGAGCTTCCTGGTGAAG	PRL-E2 DN TAGAGCGGCTCATGCTTTTT
PRL-I3-I4	PRL-I3 UP TACCCCTGAAGACAAAGAACA	PRL-I4 DN TAGGGCTCAGTCTCTTTGGC
PRL-E3-I4	PRL-E3 UP TCTGTTGGGCTGTTCTTTGT	PRL-I4 DN TAGGGCTCAGTCTCTTTGGC

Tabla 24: Listado de fragmentos de PCR alternativos diseñados para amplificar los intrones de la prolactina.

En cada caso se lista el nombre del fragmento resultante (Fragmento), El nombre del cebador UP y su secuencia de nucleótidos (Cebador UP) y el nombre del cebador DN y su secuencia de nucleótidos (Cebador DN).

Ninguna de estas combinaciones produjo un tamaño de producto de PCR acorde con el esperado. Por eso se decidió no continuar la secuenciación de las demás regiones intrónicas.

4.3.2.11 PRL-E5

Este es el nombre del fragmento que engloba al exón 5 del gen de la prolactina. Se muestra en la Figura 45

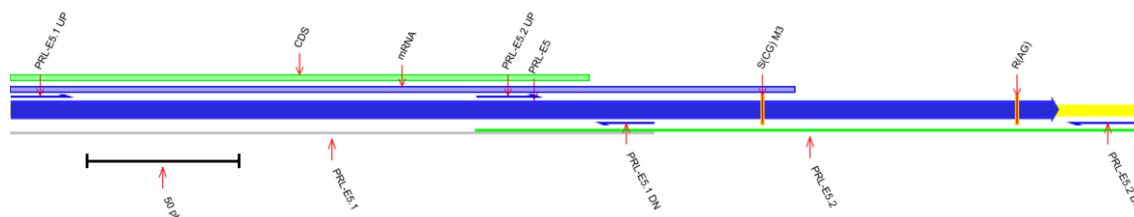


Figura 45: Esquema del fragmento PRL-E5.

Este es el fragmento que engloba al exón 5 de la prolactina. A su vez, se subdividió en 2 fragmentos de SSCP (PRL-E5.1 y PRL-E5.2, líneas horizontales gris y verde, respectivamente). Cada uno de los cebadores que delimitan los fragmentos se dibujan como medias flechas encima (UP) o debajo (DN) de la secuencia. El exón 5 se representa con una flecha gruesa azul. Se marcan las posiciones de los SNPs encontrados con rectángulos rojos. El rectángulo azul superior se corresponde con la posición del ARNm en la secuencia de la oveja. No llega hasta el extremo del exón porque esta secuencia es incompleta. Para generar el esquema se completó la secuencia con la equivalente en vaca. El rectángulo verde representa la secuencia codificante. El esquema está dibujado a escala. La cota inferior, negra, representa 50 pb.

Dado que este exón es demasiado grande para realizar las pruebas de SSCP, se dividió en 2 fragmentos: PRL-E5.1 y PRL-E5.2.

4.3.2.11.1 PRL-E5.1

Este fragmento está delimitado por los cebadores PRL-E5.1 UP y PRL-E5.1 DN (ver Tabla 11).

La PCR funciona a 57 °C con una concentración de MgCl₂ de 1,5 mM (ver Tabla 8).

El esquema del fragmento se muestra en la Figura 46.

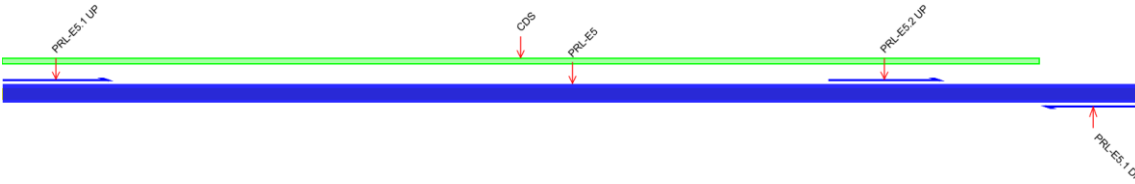


Figura 46: Esquema del fragmento PRL-E5.1

La flecha azul representa el exón 5 (PRL-E5). Los cebadores se representan con medias flechas azules. También se muestra la situación del cebador UP del fragmento 5.2 (PRL-E5.2 UP). El rectángulo verde muestra la posición de la secuencia codificante. El esquema está realizado a escala.

La secuencia obtenida para el fragmento es la siguiente:

TTATTCCTGG AGCCAAAGAG ACTAAGACCT ACCCTGTGTG GTCAGGACTC CCATCCCTGC 60
AAACTAAGGA TGAAGAGGCA CGTCATTCTG CTTTTCACAA CCTGCTCCAC TGCCTGCGCA 120
GGGATTCAAG CAAGATTGAC ACTTACCTTA AGCTCCTGAA TTGCAGAATC ATCTACAACA 180
ACAACTGCTA AGCCACATT CATCCTATCC 210

Se colorea toda ella en azul porque toda ella pertenece al exón 5. Las bases subrayadas en los extremos se corresponden con las secuencias de los cebadores de amplificación. Esta secuencia se diferencia de su secuencia de referencia en una base (subrayada, en posición 46). Sus características se listan en la Tabla 25.

Posición	Oveja	Cabra
46	T	G

Tabla 25: Diferencia entre la secuencia obtenida para el fragmento PRL-E5.1 y la de su referencia.

Se lista el número de base que ocupa (Posición), la secuencia de nucleótidos obtenida en esa posición (Oveja) y la secuencia en la posición equivalente en la referencia EU586510 (Cabra).

4.3.2.11.2 PRL-E5.2

El segundo fragmento del exón 5 está delimitado por los cebadores PRL-E5.2 UP y PRL-E5.2 DN (ver Tabla 11).

La PCR funciona a 52 °C y a 57 °C con una concentración de MgCl₂ de 1,5 mM (ver Tabla 9).

La secuencia consenso obtenida para este fragmento es:

CTCCTGAATT GCAGAATCAT CTACAACAAC AACTGCTAAG CCCACATTCA TCCTATCCAT 60
TTCTGAGATG GTTCTTAATG ATCCATTCCC TGG^SAAACTT CTCTGAGCTT TATAGCTTTT 120
TAATGCATGC TTGGCTCTAA TGGGTTTCAT CTTAAATAAA AACAGACTCT GTAGAA^RTGT 180
CAAAATCTAA GATGGCAATT TTGTCAATGT TTCTTATC 218

En color azul se muestran las bases del exón 5. En color rojo las localizaciones de los SNPs encontrados. Las zonas subrayadas son aquellas donde se unen los cebadores que delimitan el fragmento.

Este es el esquema de este fragmento se muestra en la Figura 47:

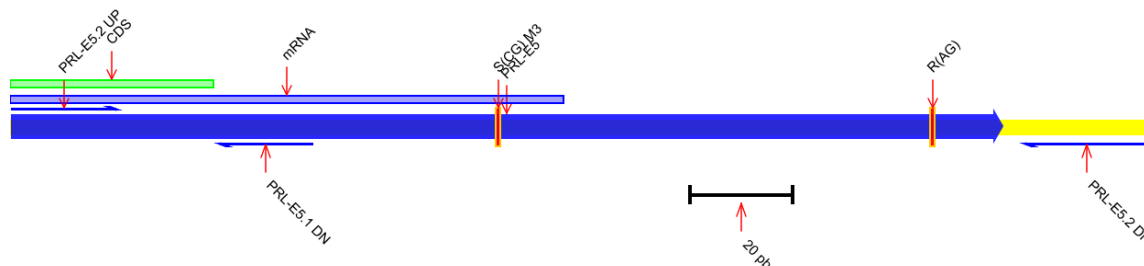


Figura 47: Esquema del fragmento PRL-E5.2.

La flecha azul muestra el final del exón 5. El rectángulo verde superior representa la zona codificante (CDS) y el rectángulo azul la posición del ARNm. Los rectángulos rojos verticales localizan la posición de los SNPs. Las medias flechas indican la situación donde alinean los cebadores. Las características de la zona superior tienen orientación UP y las de la inferior tienen orientación DN. El esquema está dibujado a escala. La cota inferior, negra, representa 20 pb.

Los SNPs detectados en este fragmento se listan en la Tabla 26:

Posición	SNP
94	S(Cg)
177	R(AG)

Tabla 26: Listado de SNPs detectados en el fragmento PRL-E5.2

Para cada SNP se muestra la posición y el tipo de heterocigoto.

Los dos SNPs encontrados están fuera de la secuencia codificante, pero dentro de la secuencia del exón 5.

La secuenciación tiene una discrepancia con respecto a la secuencia de referencia (ver Tabla 27).

Posición	Oveja	Cabra
98	C	T

Tabla 27: Diferencia entre la secuencia obtenida para el fragmento PRL-E5.2 y la de su referencia.

Se lista el número de base que ocupa (Posición), la secuencia de nucleótidos obtenida en esa posición (Oveja) y la secuencia en la posición equivalente en la referencia EU586510 (Cabra).

El genotipado de los patrones de SSCP de este fragmento se recoge en la Tabla 28:

Patrón	Genotipo	Posición 94	Posición 177
1	CA	C	A
2	CR	C	R
3	SA	S	A
4	CG	C	G

Tabla 28: Lista de genotipos del fragmento PRL-E5.2.

Para cada patrón de SSCP se lista el nucleótido que define al genotipo en las dos posiciones, 94 y 177, que en que se detecta la variabilidad. Los heterocigotos se colorean en rojo, los homocigotos menos frecuentes se colorean en azul.

4.3.2.12 Estudio adicional: diferencia entre la forma corta y larga del ARNm de la prolactina.

Al revisar las secuencias corta y larga del ARNm de la prolactina se encontró un fenómeno que puede explicar la formación de ambas secuencias. La diferencia entre ambas secuencias podría haberse producido por inversión en la región 5' del ARNm, que coincide con el inicio del péptido señal.

4.3.2.12.1 Materiales y métodos

El estudio se ha realizado por comparación bioinformática de las secuencias corta y larga del ARNm de la prolactina. En concreto, la secuencia de la forma corta es la identificada con el código X76050¹⁷ (Le Provost et al., 1994) en la base de datos del NCBI y la forma larga es identificada con el código de acceso M27057¹⁸ (Varma et al., 1989). En la Figura 48 se comparan las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas:



Figura 48: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos corta y larga del ARNm de la prolactina.

Alineamiento de la forma larga (M27057) y corta (X76050) del ARNm de la prolactina. La traducción a aminoácidos de las 2 secuencias codificantes difiere poco (El aminoácido X en posición 112, se produce por la presencia de un código de nucleótido desconocido (N) en la secuencia X76050). La principal diferencia entre ambas es que la forma larga contiene 11 aminoácidos adicionales al principio de la secuencia. Debajo se muestra la secuencia consenso del alineamiento.

Los esquemas de la secuencia, alineados, se dibujan en la Figura 49:

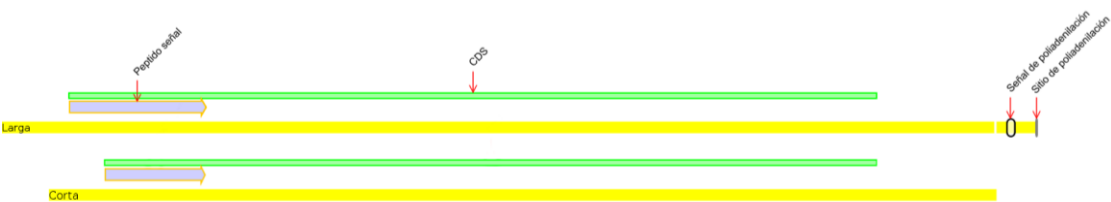


Figura 49: Alineamiento de los esquemas de las secuencias larga y corta del ARNm de la prolactina.

Cada una de las secuencias se representa como un rectángulo amarillo. El rectángulo verde marca la zona codificante (CDS), la flecha azul marca la zona del péptido señal.

La secuencia de nucleótidos difiere significativamente en la región 5'. En la Figura 50 se puede ver su alineamiento:

¹⁷ *O. aries* ovine mammary gland prolactin mRNA.

¹⁸ Ovine prolactin (PRL) mRNA, complete cds.

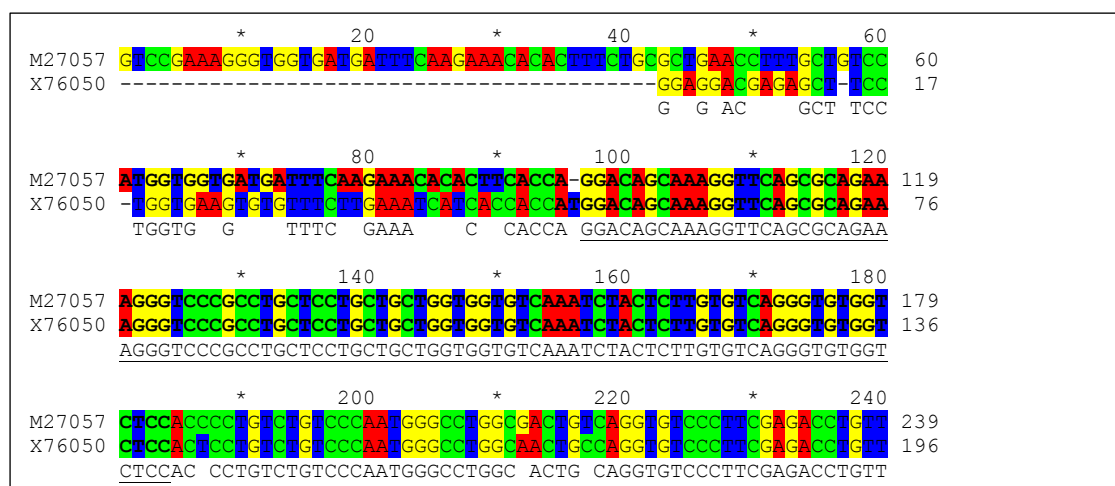


Figura 50: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos corta y larga del ARNm de la prolactina

Alineamiento de la forma larga (M27057) y corta (X76050) de la hormona de crecimiento. Sólo se muestran las primeras 240 posiciones del alineamiento. Debajo se sitúa la secuencia consenso. La zona del péptido señal se resalta con nucleótidos en negrita. La zona del péptido señal común a ambos alineamientos se subraya en la secuencia consenso.

En vista del resultado de este alineamiento se estudió en profundidad la diferencia estructural en la zona en que difieren ambas secuencias.

Se comparó la puntuación que obtienen ambas secuencias para funcionar como péptido señal utilizando el algoritmo de Petersen et al., 2011.

También se buscaron secuencias repetidas invertidas en cada región alineando cada secuencia con su inversa.

La predicción del plegamiento de las secuencias de ARN se llevó a cabo con el software RNAdraw (Matzura and Wennborg, 1995).

4.3.2.12.2 Resultados y discusión

La predicción del péptido señal de ambas secuencias produce resultados similares (ver Figura 51, pág. 97). El péptido maduro en ambas secuencias es similar. El péptido señal es donde reside la diferencia entre la forma larga y la corta, sin embargo, el exceso de longitud en la forma larga no parece ser importante en la función señalizadora de la secuencia (los valores de S-score descienden apreciablemente en los 11 primeros aminoácidos de la forma larga).

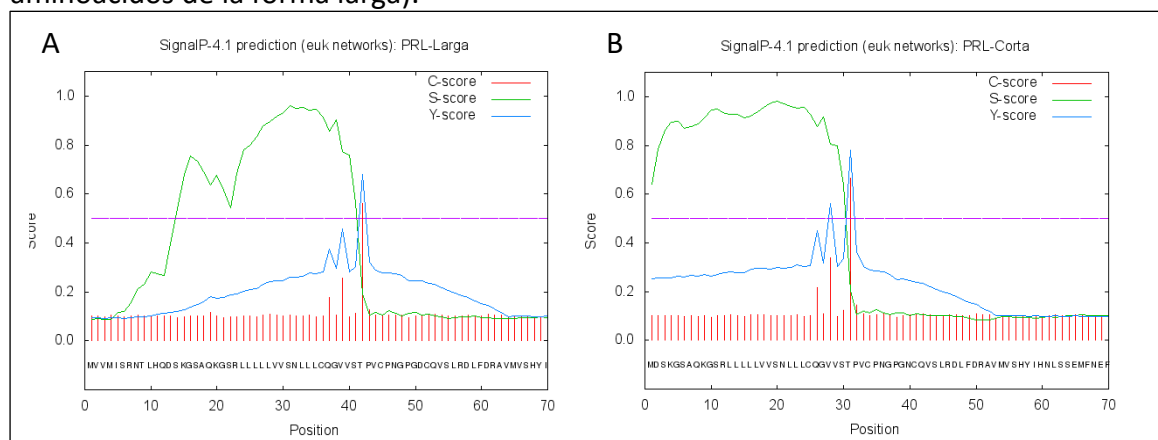


Figura 51: Predicción del péptido señal para las formas corta y larga de la prolactina.

Gráficos de predicción del péptido señal producidos por el servidor SignalP (Nielsen, n.d.). En la forma PRL-Larga (A, secuencia M27057) y PRL-Corta (B, secuencia X76050) el punto de corte está situado en

una posición equivalente: entre los nucleótidos 41 y 42 para la larga y los nucleótidos 30 y 31 para la corta (secuencia VVS-TP). El S-score trata de distinguir las posiciones de los péptidos señal de las posiciones de la parte madura de la proteína. El C-score trata de distinguir los sitios de corte del péptido señal de los demás. El Y-score es una combinación de los 2 valores anteriores que trata de establecer el punto preciso de corte.

Al analizar en profundidad la zona discrepante descubrimos la presencia de secuencias repetidas invertidas. En concreto, hay 2 zonas repetidas invertidas entre las posiciones 35 a 66 y 91 a 121 de la secuencia larga. Algo similar ocurre en la secuencia corta, donde repeticiones equivalentes se detectan entre las posiciones 15 a 22 y 47 a 78 (ver Figura 52).

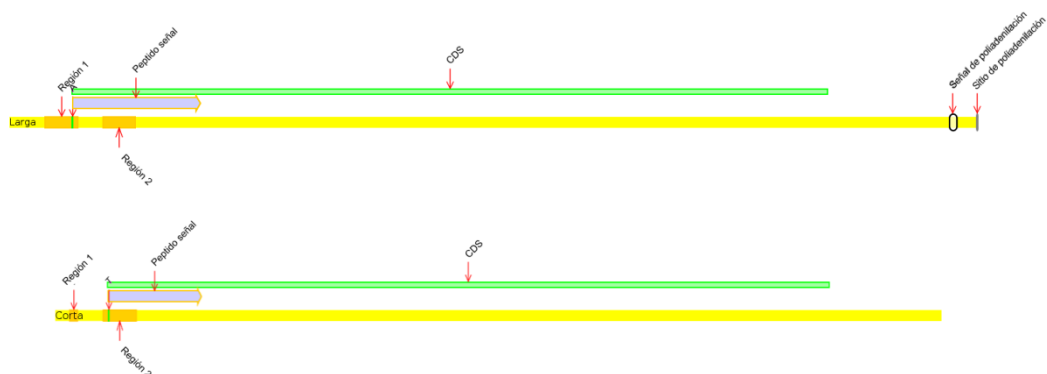


Figura 52: Alineamiento de los esquemas de las secuencias larga y corta del ARNm de la prolactina. Se muestran las regiones encontradas.

Este alineamiento es similar al de la Figura 49, pág. 96 pero se le han añadido las posiciones de las estructuras encontradas en la zona del péptido señal. Los recuadros rojizos indican zonas repetidas invertidas (Regiones 1 y 2 en ambas moléculas). También se incluye la posición de un nucleótido (A en la secuencia larga y T en la secuencia corta) que es importante para la función del ARNm. El esquema está realizado a escala. Los tamaños horizontales son proporcionales a la longitud, en pb, de cada característica.

Ampliando la zona de secuencias repetidas de la forma larga se obtiene el esquema de la Figura 53:



Figura 53: Ampliación de las secuencias repetidas de la forma larga de la prolactina.

Las secuencias repetidas e invertidas se muestran en color rojizo. En verde se marca el nucleótido A que ocupa la primera posición de la secuencia del péptido señal. El esquema está realizado a escala. Los tamaños horizontales son proporcionales a la longitud de cada característica.

Las zonas repetidas invertidas alinean entre sí.

Región 1 (directa) 1 ctttctgcgctgaacctttgctgtccatggtg 32
 |||||
 Región 2 (invertida) 1 ctttctgcgctgaacctttgctgtcc-tggtg 31

Las 2 regiones únicamente se diferencian en que la región 1 contiene una A en posición 27 que no está presente en la región 2; serían auto-complementarias si no fuese por la presencia del nucleótido A en posición 27. Aun así, esta secuencia aparea sobre sí misma en casi toda su longitud (ver Figura 54):

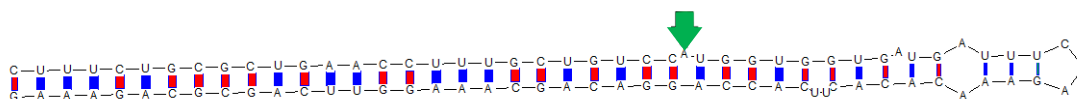


Figura 54: Predicción del plegamiento del ARNm de la estructura presente en la forma larga de la prolactina.

La flecha verde indica la base A marcada. Se ha sustituido T por U para al el software RNAdraw para el cálculo del alineamiento. El tamaño de los enlaces es proporcional a la probabilidad de que ocurran.

La zona de secuencias repetidas de la forma corta de la prolactina genera el esquema de la Figura 55:



Figura 55: Ampliación de la zona de secuencias repetidas de la forma corta de la prolactina.

Las secuencias repetidas e invertidas se muestran en color rojizo. En verde se marca el nucleótido T que ocupa la segunda posición de la secuencia del péptido señal. La región repetida 1 comienza en la posición 15 de la secuencia de ARNm. Las primeras 14 bases de la secuencia también se incluyen en el esquema. El esquema está realizado a escala. Los tamaños horizontales son proporcionales a la longitud, en pb, de cada característica.

La región 1 alinea con el comienzo de la región 2:

```
Región 2:      1 caccatggacagcaaaggttcagcgcagaaaag 32
                ||||| |||
Región 1:      1 cacca-gga 8
```

La única base que no alinea es la marcada en el esquema como T: base número dos, de la secuencia del péptido señal.

La predicción de plegamiento de la secuencia mostrada en la Figura 55 tiene una forma similar a la de un ARNt, con un bucle inferior (del codón) demasiado grande. Este podría ser un SINE derivado de ARNt (ver Figura 57). Sin embargo, esta secuencia no es detectada como SINE mediante la aplicación CENSOR (Kohany et al., 2006) de la base de datos Repbase (Jurka, 2000). No podemos saber si la estructura se corresponde con un SINE no descrito previamente. Sería necesario realizar estudios adicionales para comprobarlo.

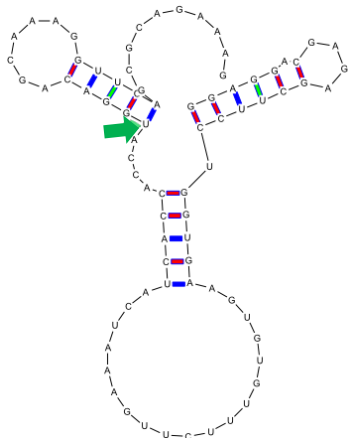


Figura 56: Predicción del plegamiento del ARNm de la estructura presente en la forma larga de la prolactina.

La flecha verde indica la base T marcada, se ha sustituido T por U al utilizar el software RNAdraw en el cálculo del alineamiento.

Al alinear la secuencia de la forma larga con la reversa complementaria de la forma corta se obtiene el alineamiento de la Figura 57:

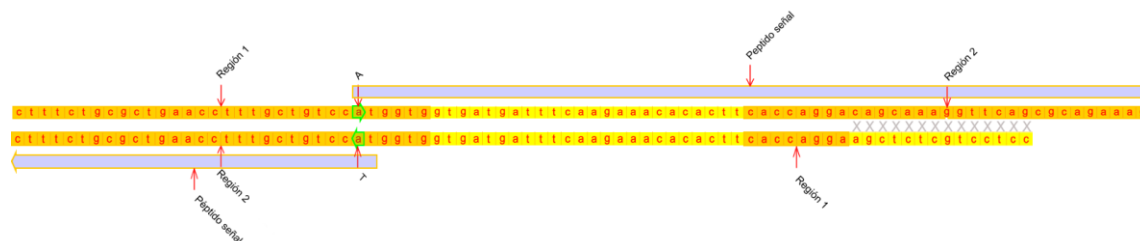


Figura 57: Alineamiento de la secuencia de la forma larga del ARNm de la prolactina con la inversa de la secuencia corta.

En la mitad superior se dibuja la secuencia de la zona de repeticiones del ARNm de la forma larga de la prolactina. En la mitad inferior se dibuja, alineada, la secuencia invertida del ARNm de la forma corta de la prolactina. En este último también se ha invertido la posición de las características, pero no se han modificado sus nombres. Así, el nucleótido marcado como T, es en realidad su reverso complementario: una A. La zona que no aparea está marcada con X's.

La región 1 de la secuencia larga y la región invertida 2 de la corta alinean perfectamente. Además, también lo hacen las regiones intermedias.

Resulta curioso ver que el nucleótido que impide el apareamiento de las secuencias repetidas invertidas adyacentes esté implicado en la formación del codón +1 en ambos casos.

La estructura presente en la forma larga tiene 87 pb y extremos cohesivos. Únicamente la base 27 (A) interfiere el perfecto alineamiento. La estructura de la forma corta parece una secuencia invertida y truncada de la anterior.

Sorprende la importancia del nucleótido 27. Al romper la complementariedad de los extremos probablemente estabiliza estructuralmente la secuencia para evitar que salte. Además, forma parte del primer codón tanto de la forma larga como de la corta. Es, por ello, vital para la generación de la proteína.

El alineamiento de la secuencia larga con la base de datos del NCBI indica que esta estructura está restringida al gen de la prolactina. De hecho, la forma larga únicamente alinea completamente con el gen de la prolactina ovina. El trozo de secuencia que comparte con la corta alinea con más de 20 secuencias, todas ellas relacionadas con el gen de la prolactina. En la Figura 58 se muestra la posición donde alinean:

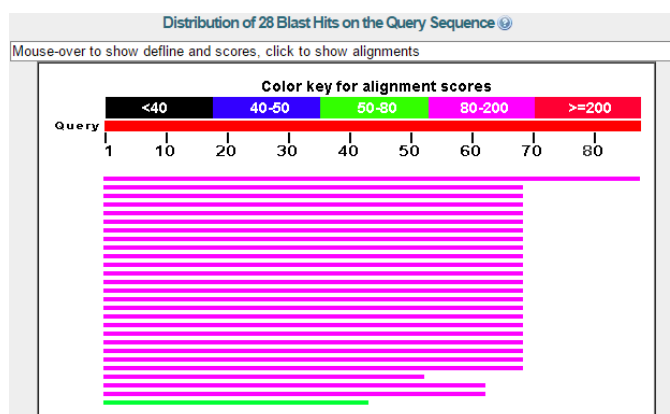


Figura 58: Esquema del alineamiento mediante Blast de la estructura de la forma larga.

Cada barra horizontal representa la posición de una de las secuencias de la base de datos que alinea con la búsqueda (Query). La secuencia buscada es la región de 87 bases que engloba las repeticiones del inicio de la forma larga del ARNm de la prolactina, identificada con el ID M27057 en la base de datos del NCBI.

En detalle, el alineamiento se produce con secuencias de oveja (*Ovis aries*), cabra (*Capra hircus*), muflón canadiense (*Ovis canadensis*), antílope tibetano (*Pantholops hodgsonii*), cebú (*Bos indicus*), bisonte americano (*Bison bison*), vaca (*Bos taurus*), yak (*Bos grunniensis*), búfalo (*Bubalus bubalis*) y, en menor medida, con el rorcual aliblanco (*Balaenoptera acutorostrata*). Los datos del alineamiento se muestran en la Figura 59:

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 27

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Ovis aries prolactin (PRL) mRNA	161	214	100%	1e-36	100%	NM_001009306.1
<input checked="" type="checkbox"/> Capra hircus PROLACTIN protein (PROLACTIN) mRNA	119	119	78%	7e-24	99%	NM_001285547.1
<input checked="" type="checkbox"/> Ovis aries prolactin (PRL) gene, complete cds	119	119	78%	7e-24	99%	KC764410.1
<input checked="" type="checkbox"/> O.aries ovine mammary gland prolactin mRNA	119	119	78%	7e-24	99%	X76050.1
<input checked="" type="checkbox"/> C.hircus caprine pituitary gland prolactin mRNA	119	119	78%	7e-24	99%	X76049.1
<input checked="" type="checkbox"/> Ovis canadensis canadensis isolate 43U chromosome 20 sequence	115	115	78%	9e-23	97%	CP011905.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Pantholops hodgsonii prolactin-like (LOC102340740), transcript variant X3, mRNA	113	113	78%	3e-22	97%	XM_005976861.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Pantholops hodgsonii prolactin-like (LOC102340740), transcript variant X2, mRNA	113	113	78%	3e-22	97%	XM_005976860.1
<input checked="" type="checkbox"/> Capra hircus prolactin precursor, gene, complete cds	113	113	78%	3e-22	97%	EU586510.2
<input checked="" type="checkbox"/> C.hircus caprine mammary gland prolactin mRNA	113	113	78%	3e-22	97%	X76048.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bos indicus breed Haryana prolactin hormone (PRL) gene, exon 1 and partial cds	108	108	78%	2e-20	96%	KP635967.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bos indicus prolactin hormone gene, exon 1 and partial cds	108	108	78%	2e-20	96%	KM242132.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Bison bison bison prolactin (LOC104992619), mRNA	108	108	78%	2e-20	96%	XM_010845567.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Bos mutus prolactin-like (LOC102275031), mRNA	108	108	78%	2e-20	96%	XM_005894272.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bos taurus prolactin, mRNA (cDNA clone MGC:148731 IMAGE:8247476), complete cds	108	108	78%	2e-20	96%	BC148124.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bos grunniensis prolactin precursor (PRL) gene, exon 1 and partial cds	108	108	78%	2e-20	96%	AF516697.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bovine prolactin gene 5' flanking region and exon 1	108	108	78%	2e-20	96%	X01452.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cattle prolactin mRNA, 5' end	108	108	78%	2e-20	96%	M36873.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bos taurus prolactin (PRL) mRNA	108	108	78%	2e-20	96%	NM_173953.2
<input checked="" type="checkbox"/> Bos taurus prolactin precursor (PRL) gene, complete cds	108	108	78%	2e-20	96%	AF426315.1
<input checked="" type="checkbox"/> Manipulation-derived rearrangement of cattle prolactin mRNA	108	108	78%	2e-20	96%	M35587.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Bubalus bubalis prolactin-like (LOC102412882), transcript variant X1, mRNA	102	102	78%	7e-19	94%	XM_006072861.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bubalus bubalis prolactin-like (LOC102412882), mRNA	102	102	78%	7e-19	94%	NM_001290885.1
<input checked="" type="checkbox"/> Sheep mRNA for lactogenic polypeptide hormone	97.1	97.1	59%	3e-17	100%	X13483.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Balaenoptera acutorostrata scammoni prolactin (PRL), transcript variant X2, mRNA	93.5	93.5	71%	4e-16	94%	XM_007197144.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Balaenoptera acutorostrata scammoni prolactin (PRL), transcript variant X1, mRNA	93.5	93.5	71%	4e-16	94%	XM_007197143.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Pantholops hodgsonii prolactin-like (LOC102340740), transcript variant X1, mRNA	75.0	75.0	49%	2e-10	98%	XM_005976859.1

Figura 59: Listado detallado de los alineamientos de la estructura encontrada en la forma larga de la prolactina.

En la tabla se listan, ordenadas de mejor a peor alineamiento, las secuencias de la base de datos de *GeneBank* que alinean con las secuencia buscada mediante el algoritmo *Blast*. La secuencia buscada es la región de 87 bases que engloba las repeticiones del inicio de la forma larga del ARNm de la prolactina, identificada con el ID M27057 en la base de datos del NCBI. En la tabla se lista el nombre de cada secuencia coincidente (Description), el código de acceso en la base de datos de la secuencia de la coincidencia (Accession) y el porcentaje de la secuencia buscada que alinea con cada coincidencia (Query cover). El resto de campos son indicadores de la calidad del alineamiento.

La forma larga del ARNm de la prolactina únicamente se encuentra completa en oveja. La zona de alineamiento mayoritario de las demás coincidencias es similar a la forma corta de ARNm.

El árbol filogenético muestra el agrupamiento de la secuencias encontradas (Figura 60):

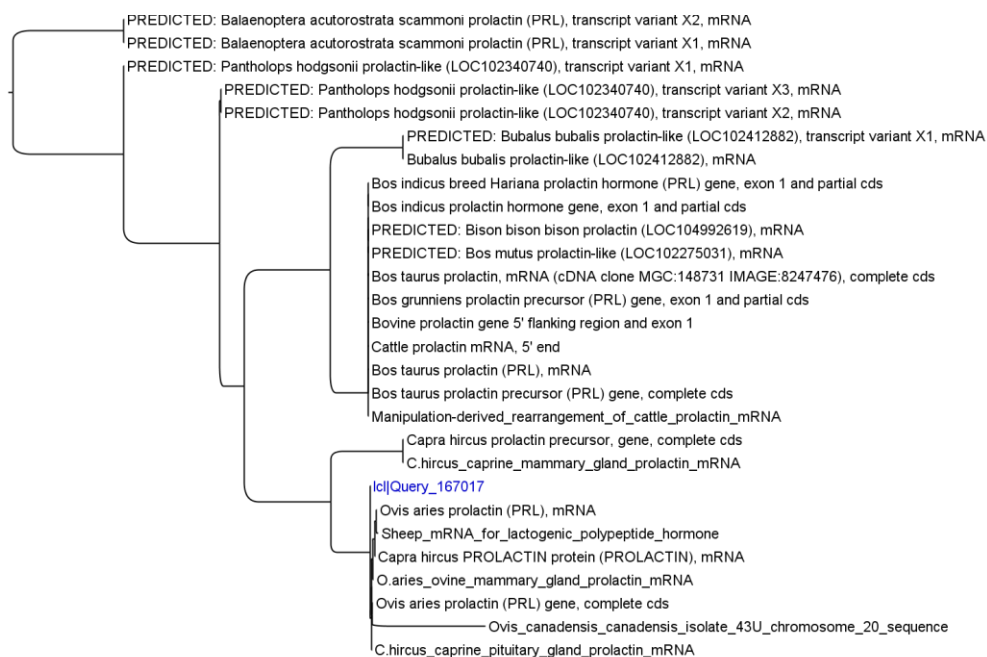


Figura 60: Árbol filogenético de la secuencias que alinean con la estructura de la forma larga de la prolactina.

La secuencia buscada está marcada en azul (Icl|Query_167015). Está próxima al clúster de la oveja.

Por lo visto, la región de la forma corta se integró en un estadio temprano de la evolución de los rumiantes, probablemente antes de que el superorden *Laurasiteria* se dividiera en los órdenes *Cetácea* y *Artiodáctila*. La forma larga aparece más recientemente, únicamente en oveja.

4.3.2.12.3 Conclusiones

Se ha encontrado una estructura, con extremos repetidos invertidos, al inicio de la secuencia del ARNm de la prolactina que puede ser responsable de la diferenciación entre la forma corta y larga de dicho ARNm según se haya insertado en un sentido o en el complementario.

4.3.3 GHR.

Este es el gen del receptor de la hormona de crecimiento. Está compuesto por 10 exones. Para diseñar los cebadores de SSCP y secuenciación se ha utilizado, como referencia, la secuencia AM161140¹⁹. Su esquema se muestra en la Figura 61:

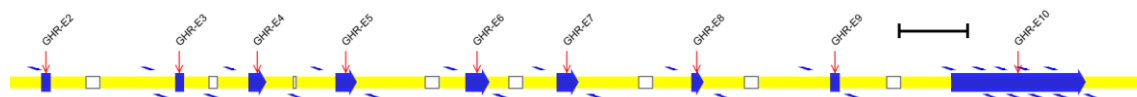


Figura 61: Esquema del gen GHR.

Este es el esquema de la secuencia AM161140. Contiene los exones 2 a 10 del gen (Flechas y rectángulos gruesos azules). Los recuadros blancos indican las posiciones de "gaps" en la secuenciación. Las líneas azules oblicuas son las cabezas de las medias flechas que indican la posición de los cebadores de SSCP. Las superiores son los cebadores con orientación UP, las inferiores tienen orientación DN. La cota superior, negra, representa 500 pb.

A continuación se recogen los resultados de la secuenciación de los fragmentos delimitados por estos cebadores.

4.3.3.1 GHR-E1

Este fragmento contiene el promotor del gen y el exón 1. Como el fragmento no es parte de la secuencia de referencia (AM161140), se utilizó otra secuencia de referencia para diseñar los cebadores: AY641539²⁰. Los cebadores diseñados fueron:

- GHR-E1 UP: GTTAATTAGGTCCCATTGT
- GHR-E1 DN: AGTGACCAAGAAGGGAATA

El esquema del fragmento diseñado para amplificar el exón 1 del gen GHR y su promotor se muestra en la Figura 62:

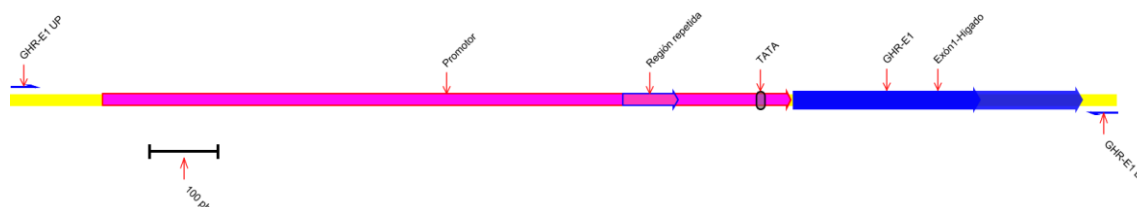


Figura 62: Esquema del fragmento GHR-E1 diseñado.

Este es el esquema del fragmento GHR-E1 que se esperaba obtener. Los cebadores que definen este fragmento (medias flechas azules) engloban las secuencia del Exón 1 del gen GHR (flecha azul gruesa rellena), el promotor del gen (Flecha rosa gruesa) y la caja TATA (óvalo azulado). En la región del promotor, muy próxima al exón 1 se encuentra una región repetida. El exón 1 en hígado (Exón1-Higado) es más largo que en los demás tejidos (GHR-E1). La cota inferior, negra, representa 100 pb.

La PCR de amplificación se hizo a 55 °C, 1,5 mM de MgCl₂ y con betaína al 0,5 M.

Al secuenciar el producto de la PCR se obtuvo este resultado:

```
ATTAGGTCCC ATTTGTTTAT TTTTGCTTTT ATTTCCAATA TTCTGGGATG TGAGTCATAG 60
AGGATCCTGC TGAGATTTAC GTCAGAGAGT GTTTTGCCTA TGTTCTCCTC TAGGAGTATT 120
ATAGTTTCTG GTCTTACATT TAGATCTTTA ATCCATTTTG AGTTTATTTT TGTGTATGGT 180
GTTAGAAAGT GTTCTAGTTT CATTCTTTTA CAAGTGGTTA ACCTAGAGTC CCATTGGCTG 240
AAGGATTTTG AGCATAATCT TGCTGGCATG TGAAATGAGT GTGATTGTAC AGTAATTGA 300
ACATTCTTG GCATTTCCTT TCTTTGGGAT TGGAATGAAA ACTGATATTT CCCTTCTTGG 360
TCACT 365
```

¹⁹ *Bos taurus* GHR gene for growth hormone receptor, exons 2-10, Finnish Ayrshire Breed.

²⁰ *Ovis aries musimon* growth hormone receptor gene, promoter P1 and exon 1A.

Esta secuencia alinea con CP011886 (*Ovis canadensis canadensis* isolate 43U chromosome 1 sequence) en múltiples posiciones. La región que engloba a los nucleótidos subrayados con una línea doble y subrayados con línea gruesa es identificada por el paquete Staden como HETI (deleción heterocigota). Las 2 zonas subrayadas con una línea alinean con los cebadores.

Esta secuencia no contiene el exón 1 y, por tanto, no se corresponde con la esperada.

4.3.3.2 GHR-E2

Cuando se intentó la amplificación y secuenciación de este fragmento se disponía de muy pocos datos de su secuencia nucleotídica. Para calcular los cebadores de amplificación del fragmento se diseñó bioinformáticamente una construcción quimérica que constaba de 2 partes: el fragmento aguas arriba provenía de las secuencia del gen GHR de vaca (U15731²¹); el fragmento aguas abajo provenía del fragmento GHR-E3 de oveja, que ya se había secuenciado. El fragmento de vaca contiene una parte de la secuencia del exón 2 del gen GHR, y el inicio de la secuencia codificante. El trozo de secuencia entre los 2 fragmentos era desconocido en ambas especies, tanto en secuencia como en longitud. Si la longitud de la secuencia intermedia no fuese excesiva ni incompatible, con este diseño se podría lograr su amplificación y secuenciación. El esquema del fragmento se muestra en la Figura 63:

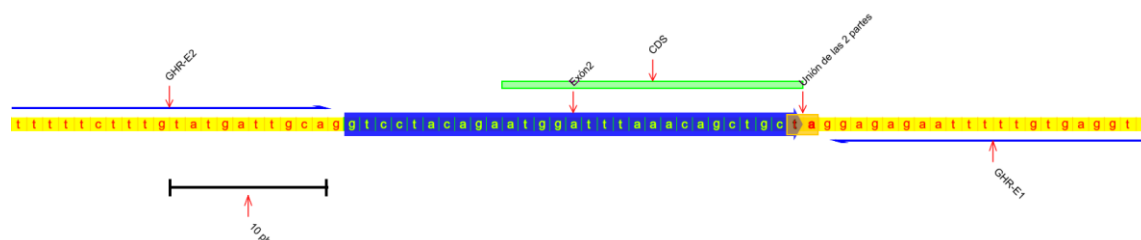


Figura 63: Esquema de la construcción quimérica empleada para diseñar la PCR del exón 2 del gen GHR.

Las medias-flechas azules muestran las posiciones de los cebadores. La flecha azul gorda muestra la secuencia conocida del exón 2 de vaca. El rectángulo verde indica la posición de la secuencia codificante. El rectángulo naranja marca los extremos de las 2 secuencias que se unieron para crear la construcción quimérica: la de la izquierda proviene del exón 2 de vaca, la de la derecha proviene de secuencia conocida del exón 3 de oveja. La cota inferior, negra, representa 100 pb.

Al secuenciar el fragmento obteniéndose el siguiente resultado:

```
AACCTTCACA AAAATTCTCT CTGCTTCTCC TCTTGCTTC CTAAAGTCTA CTTCCACCA 60
GCAGCCAGAG TGATGTATTA GAAGTTTGAA TCAGATCTCA TCACATCCCT GCTTTAACAC 120
CATCTAATGT CTACCCGCTA CAGTCAAAAC CAAGTCCAGT CAAGTCATTG GCTGACTGCT 180
CTGTGTTATC TGGTCTCCTC CCACTTCTCT GATCATTCTC ATTTCCCAT CCAGGTCACC 240
CTTGCTCTTA CCAGGAATGG CTACCCCCCA CTGTAGCCTT CTTTCACTT AAGCCTTTAG 300
CAATACATAC AAAGAAAAA A 321
```

Esta secuencia no coincide en longitud con el fragmento esperado ni contiene el exón 2. Sólo alinea con las secuencias de oveja XR_001027773²², XR_001042722²³ y CP011894²⁴. No es, por tanto, la secuencia buscada.

²¹ *Bos taurus* somatotropin receptor gene, exon 1 and liver-specific promoter region.

²² PREDICTED: *Ovis aries musimon* uncharacterized LOC105607369 (LOC105607369), transcript variant X2, ncRNA.

²³ PREDICTED: *Ovis aries* uncharacterized LOC105607369 (LOC105607369), transcript variant X1, ncRNA.

²⁴ *Ovis canadensis canadensis* isolate 43U chromosome 9 sequence.

4.3.3.3 GHR-E3

La secuenciación del fragmento que contiene al exón 3 del gen GHR está delimitado por los cebadores GHR-E3 UP y GHR-E3 DN (ver Tabla 12).

La PCR funciona a 60 °C con 0.75 a 4 mM de MgCl₂, con y sin betaína. Al secuenciarla produjo este resultado:

```
TTTAGAGGAT AGGTGGAATT TTAGTTTGA AAAGACAGAA GAAAGGAGAG AATTTTGTG 60
AGGTTGGGCC AGGTCACATG TTGACATT- GAAAATGGGA ATGTAACAAG GTCACATCGG 120
ACCATTTTTT ACATGGGTGA CTAATGGGGG TTTTTTTC*T CCTCTTCTC TTTCAGCCAC 180
ACCAGCTTTC TTTGTCAGAG CATCTCAGAG TCTGCAGATA CTATATCCAG GCCTAGAGAC 240
AAGTAAGAAT TTCAGTCCTT TTTCCACCTT TGGCAATACT GTCCAGATTT TACTACTGTT 300
GAAGCTACCG CCCTTACTCT GTTTTATTTA GGATATGGTA ACTGGATGAA TTAATAACTG 360
AAACTGCAGG GGCAACTAA AAAAAAAAAA WTTTTTTTTC ARAATTTCTT KGTCAACTTC 420
T 421
```

Se indica en color azul la secuencia del exón 3. Las bases subrayadas coinciden con la posición de los cebadores. El asterisco rojo muestra la posición de la inserción encontrada en algunos animales. El guion marca la posición de una delección con respecto a la secuencia de referencia. La zona en cursiva cae dentro del tercer “gap” de la secuencia de referencia (por tanto, no aparece en esta secuencia). La secuenciación de la zona 3’, gris, es de baja calidad; se recoge aquí para poder situar el lugar de unión del cebador.

El esquema del fragmento se recoge en la Figura 64:

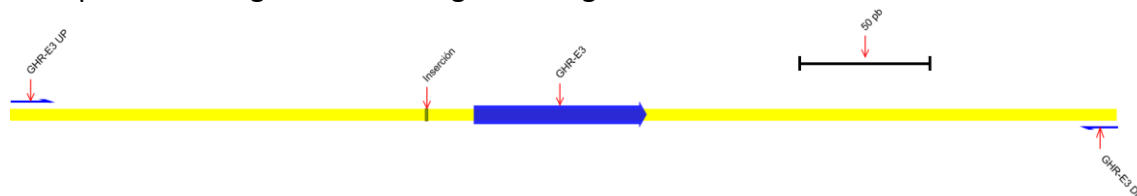


Figura 64: Esquema del fragmento GHR-E3

La flecha azul gruesa muestra la posición del exón 3. Las medias-flechas azules muestran la posición de los cebadores. El rectángulo marca la posición de la inserción encontrada en varias muestras. La cota superior, negra, representa 50 pb.

El fragmento presenta una inserción de una C aguas arriba del exón 3, en posición 159 (ver Figura 65):

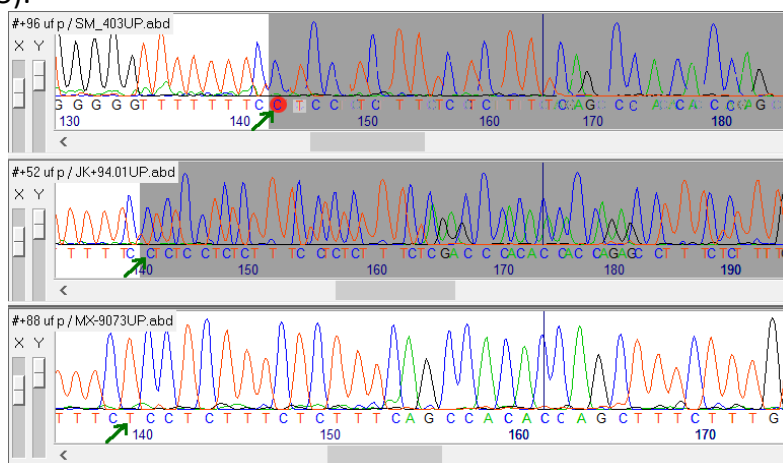


Figura 65: Electroferogramas que muestran la detección de una inserción en el fragmento GHR-E3.

La zona oscura marca el lugar donde se detecta la inserción heterocigota de una C. La flecha verde marca el punto de inserción en todos los casos. El electroferograma superior ha sido modificado para eliminar los picos de la secuencia no insertada, dejando al descubierto la secuencia alternativa. El electroferograma central no está modificado, contiene los picos correspondientes a las 2 secuencias (que están ligeramente desfasados en algunos casos porque la migración de la C tiende a retrasarse con

respecto a la T). El electroferograma inferior es normal, no muestra la inserción. La base insertada (C) está rodeada por un círculo rojo. La base que ocupa esa posición en la secuencia normal (T) está embebida en un cuadrado claro.

Esta inserción se encuentra en aquellos animales que presentan los patrones de SSCP 2GHR-E3 y 4GHR-E3. La equivalencia en genotipos de los patrones de SSCP se muestra en la Tabla 29:

Patrón	Genotipo
1	-
2	C/-
3	-
4	C/-

Tabla 29: Lista de genotipos del fragmento GHR-E3.

Para cada patrón de SSCP se lista el genotipo de la posición 159 de la secuencia. El código C/- indica la inserción heterocigota de una C.

Además de la inserción, en el fragmento se han encontrado varias discrepancias con respecto a la secuencia de referencia (AM161140). Estas discrepancias están resaltadas en el esquema de la Figura 66:



Figura 66: Esquema de discrepancias de GHR-E3.

Los rectángulos naranja marcan las discrepancias con respecto a la secuencia de referencia AM161140²⁵. Se mantienen los dibujos de las características mostradas en la Figura 64 para situar mejor la posición de las discrepancias.

Las discrepancias de la secuencia obtenida con respecto a la secuencia consenso se listan en la Tabla 30 :

Posición	Oveja	Vaca
90	-	T
98	G	A
148-151	ins(GGGT)	-
160*	T	A

Tabla 30: Diferencia entre la secuencia obtenida para el fragmento GHR-E3 y la de su referencia.

Se lista el número de base que ocupa (Posición), la secuencia de nucleótidos obtenida en esa posición (Oveja) y la secuencia en la posición equivalente en la referencia AM161140 (Vaca).

* Esta posición es la siguiente a aquella en la que se produce la inserción que define a los patrones 2 y 4 del SSCP.

²⁵ *Bos taurus* GHR gene for growth hormone receptor, exons 2-10, Finnish Ayrshire Breed.

4.3.3.4 GHR-E4

Este es el fragmento que engloba al exón 4 del GHR. Está delimitado por la pareja de cebadores GHR-E4 UP y GHR-E4 DN (ver Tabla 12).

La PCR de este fragmento funciona a 60 °C, a 0,75 a 4 mM de MgCl₂, con y sin betaína hasta 0,91 M. La secuencia obtenida por secuenciación es la siguiente:

```
CAGAGAAACA GCATTTCTAG AAGTGGTTGC TCTTGATCAC TTTAAATGTG TGTCTCATTA 60
GGACCAYCCA TTACCCTCCT GATTTTCATGA CTTGT----- CTTTTTACTC TGCAGATTCT 120
TCYGGGAATC CTAAATTCAC CAAGTGCCGT TCACCTGAAC TGGAGACTTT CTCATGTCAC 180
TGGACAGATG TGGCTAATCA CAGTTTACAG AGCCCAGGAT CTGTACAGAT GTTCTATATC 240
AGAAGGTATG GGCTTCATGC TTTTCTGATT TYTCTCCATG AATTTTCTGA TGAAAATCCA 300
TTGAGTGTC TGCAGTAGTG GGAATGGAAA TAATCTTCTT TGGTGATCTA AATGCATTC 360
CCCATTGATT CATTCAAATA TATTAGTTAA GCCCTTACTA TATGTTGGGT ACYATTTTAG 420
ATGCTGGAAA TATGGCAGTG A 441
```

Se indica en color azul la posición del exón 4 y en rojo la de cada uno de los SNPs detectados. El tercer SNP (S3E4) es el único relacionado con los patrones de SSCP (ver Tabla 55, pág. 166). Las bases subrayadas coinciden con la posición de los cebadores.

Los guiones indican una repetición del microsatélite CTTGT que aparece en la secuencia de referencia (AM161140) pero que no está presente en ninguna de las muestras secuenciadas. La zona en cursiva, atenuada, cae dentro de un “gap” de la secuencia de referencia. Esta misma secuencia es detectada como un LINE de tipo L2 por el software Staden y está confirmada como tal por búsqueda en la base de datos Repbase (Jurka, 2000) mediante la aplicación CENSOR (Kohany et al., 2006).

El esquema del fragmento se muestra en la Figura 67:



Figura 67: Esquema del fragmento GHR-E4

La flecha azul muestra el final del exón 4. Las medias flechas indican la situación donde alinean los cebadores. Los rectángulos rojos verticales localizan la posición de los SNPs. Los SNPs están marcados como S1E4, S2E4, S3E4 y S4E4. El SNP S2E4 está situado dentro del exón pero no produce un cambio de aminoácido. Las características de la zona superior tienen orientación UP y las de la inferior tienen orientación DN. El esquema está dibujado a escala. La cota superior, negra, representa 50 pb.

Al comparar la secuencia obtenida con la de referencia se observan las 2 discrepancias que se muestran en la Figura 68:



Figura 68: Esquema de discrepancias de GHR-E3.

Los rectángulos naranja marcan las discrepancias con respecto a la secuencia de referencia AM161140²⁶. Las discrepancias son la posición de la repetición CTTGT que no se ha obtenido en este trabajo (Inserto no secuenciado) y la del LINE detectado en la zona del gap de la secuencia de referencia (LINE L2). Se mantienen los dibujos de las características mostradas en la Figura 67 para situar mejor la posición de las discrepancias.

La Tabla 31 contiene la lista de SNPs y su traducción en proteína:

²⁶ *Bos taurus* GHR gene for growth hormone receptor, exons 2-10, Finnish Ayrshire Breed.

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
Y(67)	No traducido	
Y(123)	tcT	Ser
	tcC	Ser
Y(272)	No traducido	
Y(413)	No traducido	

Tabla 31: Listado de SNPs detectados en el fragmento GHR-E4.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis) y, si el SNP se encuentra en la región traducida, el codón que genera cada variante y la traducción de dicho codón. Para cada codón, el nucleótido afectado por el SNP se capitaliza en mayúscula, los demás en minúscula.

De los 4 SNPs detectados únicamente el de la posición 272 se relaciona con los patrones de SSCP detectados (ver Tabla 55, pág. 166). La equivalencia en genotipos de los patrones de SSCP se muestra en la Tabla 32:

Patrón	Genotipo
1	Y
2	C
3	T

Tabla 32: Lista de genotipos del fragmento GHR-E4.

Para cada patrón de SSCP se lista el genotipo de la posición 272 de la secuencia. El heterocigoto se colorea en rojo, el homocigoto menos frecuentes se colorea en azul.

4.3.3.5 GHR-E5

Es el fragmento que engloba al exón 5 del GHR. Está delimitado por los cebadores GHR-E5 UP y GHR-E5 DN (ver Tabla 12).

La PCR funciona a 60 °C con 1,5, 3 y 4 mM de $MgCl_2$ (ver Tabla 9).

La secuencia obtenida para este fragmento es la siguiente:

CTTGCTCATA AAATACTCGT GTCCTGGTTT ATTGAATGTG ACTCTTAAGC AGCTTGCTTT 60
 GAATGGCACT ATTGCATGAT TTGGGGAACA ATTCTTCCTT TTACCCCTCC ATTTCAGGGA 120
 CATTCAAGAA TGGAAAGAAT GCGCCGATTA CGTCTCTGCT GGTGAAAACA GCTGTTACTT 180
 TAATTCGTCT TATACCTCTG TGTGGACCCC CTACTGCATC AAGCTAACTA GCAATGGCGR 240
 TATGTGGAT CATAAGTGTT TCTCTGTTGA GGACATAGGT AAATCACAGG TTTGTGTTTT 300
 ATTTGACATG GCTTTAGATT ACATAAGCGG GGAAGGCTGC AAAGTCCAAG TGCATGCAAG 360
 TAGGAAGACT TTGCCATTGC AT 382

Se indica en color la posición del exón 5 y en rojo la de cada uno de los SNPs detectados.

En la Figura 69 se muestra el esquema de fragmento que engloba al exón 5 del gen GHR:

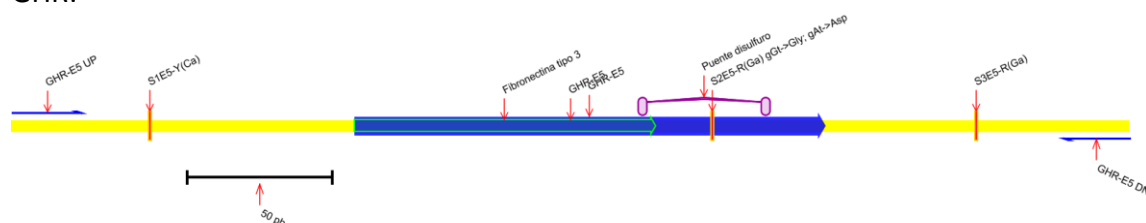


Figura 69: Esquema del fragmento GHR-E5

La flecha azul muestra el exón 5. Los rectángulos rojos verticales localizan la posición de los SNPs. Los SNPs están marcados como S1E5, S2E5 y S3E5. El SNP S2E5 está situado dentro del exón y produce un cambio de aminoácido Gly por Asp. Las medias flechas indican la posición donde alinean los cebadores. La flecha verde indica la parte del exón que pertenece al dominio Fibronectina tipo 3 de la proteína. En violeta se marca la posición de los codones para 2 aminoácidos que establecen un puente disulfuro

entre ellos. Las características de la zona superior tienen orientación UP y las de la inferior tienen orientación DN. El esquema está dibujado a escala. La cota inferior, negra, representa 50 pb.

La traducción de la secuencia codificante del exón es:

GGACATTCAAGAATGGAAAGAATGCCCCGATTACGTCTCTGCTGGTGAAAACAGCTGTTACTTTAATTCGTCTTATACC
AspIleGlnGluTrpLysGluCysProAspTyrValSerAlaGlyGluAsnSerCysTyrPheAsnSerSerTyrThr

TCTGTGTGGACCCCCTACTGCATCAAGCTAACTAGCAATGGC (-GRT--) ATTGTGGATCATAAGTGTCTCTGTTGA
SerValTrpThrProTyrCysIleLysLeuThrSerAsnGly (GlyAsp) IleValAspHisLysCysPheSerValGlu

GGACATAG

uAspIle

El mutante S2E5, en posición 240 de la secuencia, produce un cambio de aminoácido *Gly* -> *Asp*. Este aminoácido cae próximo al extremo del dominio Fibronectina tipo 3 (en negrita) y en medio de 2 aminoácidos que establecen un puente disulfuro entre ellos (sus codones están subrayados).

La Tabla 33 contiene la lista de SNPs y su traducción en proteína:

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
Y(48)		No traducido
R(240)	gGt	Gly
	gAt	Asp
R(330)		No traducido

Tabla 33: Listado de SNPs detectados en el fragmento GHR-E5.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis) y, si el SNP se encuentra en la región traducida, el codón que genera cada variante y la traducción de dicho codón. Para cada codón, el nucleótido afectado por el SNP se capitaliza en mayúscula, los demás en minúscula. La traducción en verde indica que el SNP produce un cambio de aminoácido.

La correspondencia de genotipos con los patrones de SSCP se muestra en la Tabla 34:

LISTA DE GENOTIPOS		Posición		
Genotipo	Patrón	48	240	330
CGG	1	C	G	G
TGR	2	T	G	R
YGG	3	Y	G	G
TRG	4	Y	R	G
YRG	5	Y	G	G
CGG	6	C	G	G

Tabla 34: Lista de genotipos del fragmento GHR-E5.

Para cada genotipo se listan los nucleótidos que lo definen, ordenados por posición en la secuencia, y los patrones de SSCP que produce dicho genotipo. Los heterocigotos se colorean en rojo, el homocigoto menos frecuentes se colorea en azul.

4.3.3.6 GHR-E6

Este es el fragmento que engloba al exón 6 del GHR. Está delimitado por los cebadores (ver Tabla 12).

La PCR funciona a 60 °C y con 0,75 a 4 mM de MgCl₂ (ver Tabla 9).

La secuencia obtenida es la siguiente:

```
CTTAGTCGTC TTCGGAAAAA TGCATTCCAC TAACATCAAG CTATGTCTGT GTACTAATTC 60
TCTGCTGAAA TGCACAGTAC AACCAGATCC ACCCGTTGGC CTCAACTGGA CTCTGCTGAA 120
CATCAGTTTG ACGGAGATTC ATGCCGACAT CCTAGTGAAA TGGGAACCAC CACCCAATAC 180
AGATGTTAAG ATGGGATGGA TAATCCTGGA GTATGAACTG CACTATAAAG AACTAAATGA 240
GACCCAGTGG AAAATGGTAA GATATTATTA CATCTCAC-- -----CC -TTGACCTTT 300
CTTTKTTKTS TTCAA---CC 320
```

Se muestra en azul la zona del exón 6 y subrayado las secuencias donde se unen los cebadores. En rojo se muestran los SNPs detectados. Sólo se han detectado SNPs en el extremo 3'. El cebador DN no alinea completamente con la secuencia obtenida. Aun así fue lo bastante similar como para aparear y permitir la PCR de amplificación.

El esquema que resume el resultado de la secuenciación se muestra en la Figura 70:

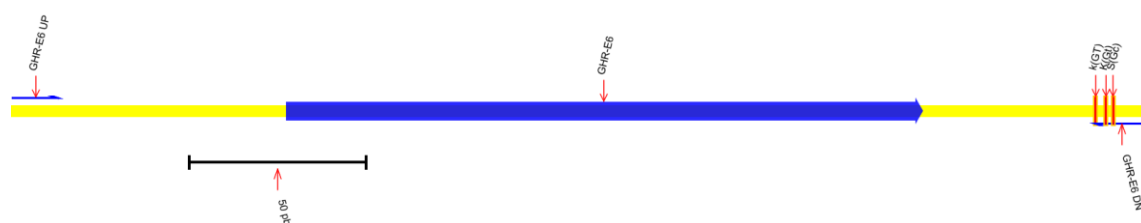


Figura 70: Esquema del fragmento GHR-E6 secuenciado

La flecha azul muestra el final del exón 6. Los rectángulos rojos verticales localizan la posición de los SNPs. Las medias flechas indican la posición donde alinean los cebadores. Las características de la zona superior tienen orientación UP y las de la inferior tienen orientación DN. El esquema está dibujado a escala. La cota inferior, negra, representa 50 pb.

Un análisis más exhaustivo del extremo 3' secuenciado descubre una extraña estructura en algunas muestras (Figura 70).

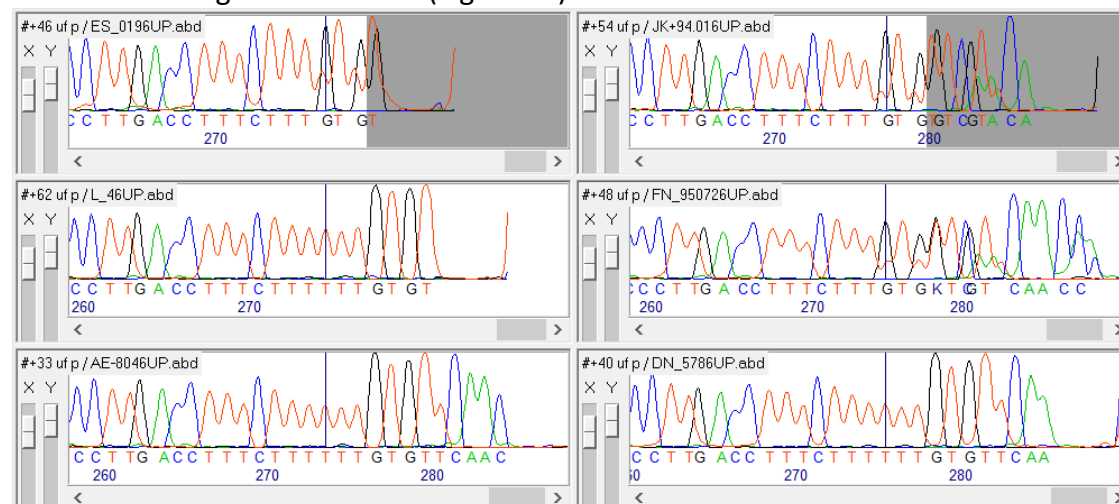


Figura 71: Electroferogramas del extremo 3' del fragmento GHR-E6.

Diagrama de picos de las secuenciaciones de varias muestras del extremo 3' del fragmento GHR-E6. Se puede apreciar que, aunque las secuenciaciones son de alta calidad, en algunas muestras (ES 019, JK+90.01 y FN 95072) hay varios picos solapados. En todos los casos está marcada, con una línea vertical, la posición donde comienza el solapamiento.

Este solapamiento está presente en las muestras que producen el patrón 2GHR-E6 de SSCP y se genera por una delección heterocigota de 3 timinas a partir de la posición marcada, como puede apreciarse en la figura Figura 72:

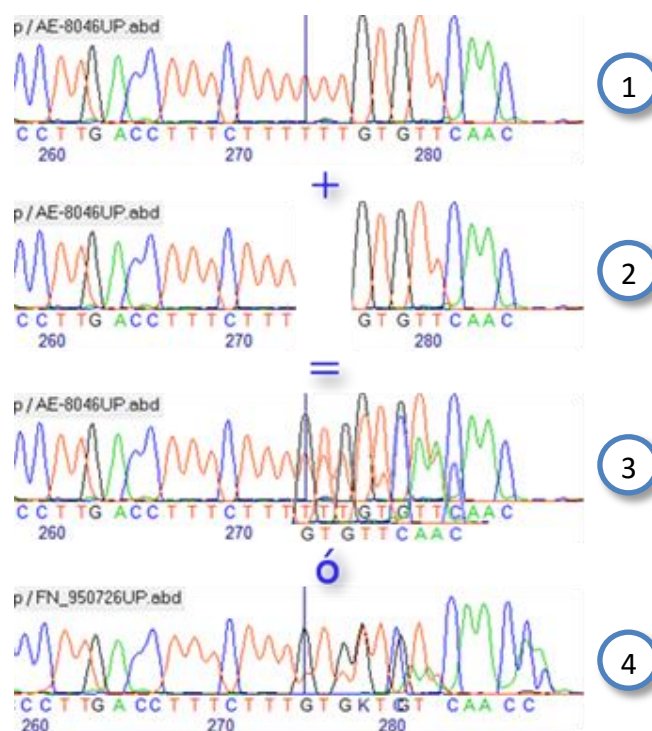


Figura 72: Esquema de la formación de las mutaciones de GHR-E6

En este esquema se ilustra la formación del genotipo heterocigoto a partir de la delección de TTT en la secuencia homocigota AE-8046UP (1). El electroferograma (2) es el mismo que (1) pero sin la zona afectada por la delección. Al superponer (1) y (2) se obtiene el electroferograma (3). -Los picos solapantes se han desplazado hacia abajo para evitar que se monten los nucleótidos-. La secuencia resultante sería CCTTGACCTTTCTTTKTGKTSTCAAC, que es la misma que en el heterocigoto real FN_950726UP (4). Se puede apreciar que el electroferograma heterocigoto real (4) se parece mucho al simulado (3).

El fragmento presenta 4 patrones de SSCP. Se puede considerar que la zona de bandas de ADN de cadena simple es similar en todos y que los distintos patrones se deben a la detección de “bandas fantasma” (falsos positivos). El patrón 2GHR-E6, presenta una duplicación de la banda de ADN de cadena doble que se corresponde con la presencia tanto de la secuencia completa como la delecionada. Esta importante modificación no tiene su reflejo en la región de bandas de ADNss del SSCP.

La Tabla 35 muestra la relación entre los genotipos y los patrones de SSCP:

LISTA DE GENOTIPOS		Posición
Genotipo	Patrón	3'
N	1	Normal
	3	
	4	
Del	2	Del(TTT)

Tabla 35: Lista de genotipos del fragmento GHR-E6.

Para cada genotipo se listan los patrones que lo presentan y la presencia (Den(TTT)) o ausencia de la delección heterocigota localizada en el extremo 3'.

4.3.3.7 GHR-E7

Este es el fragmento que engloba al exón 7 del GHR. Está delimitado por los cebadores GHR-E7 UP y GHR-E7 DN (ver Tabla 12).

La PCR funciona a 60 °C y con 1,5 a 4 mM de MgCl₂ (ver Tabla 9).

La secuenciación del fragmento produjo esta secuencia:

```
TCCTACTTTC CAGAAATTCA TTTGAATAA AAATGCACAA GCAYCTCATG GAGCTTATTG 60
CATTGAGTTG TTGACTCTCT AACCAGTAAG TTTTATATTT TGTCTTGAAA GATGGACCCT 120
TTAATGGTAA CATCAGTTCC GATGTACTCG TTGAGACTGG ATAAAGAGTA TGAAGTGCGT 180
GTGAGAACCA GACAACGAAA CACTGAAAAA TATGGCAAGT TCAGTGAGGT GCTCCTGATA 240
ACATTTCCTC AGATGAACCC ATCTGCATGT GAAGAAGGTA AACCTAAGAG ATTAAGGTGG 300
CAGCCAACAT GGTTTCTGTC AATACACAGG CATACATTCC CTATACTGTT AGAGTGTGTG 360
CCAGATCAAT ATACATTAGC CTCAG 385
```

Se muestra en azul la posición del exón, en rojo el SNP detectado. Se subrayan las zonas de unión de los cebadores.

El esquema de esta secuencia se ilustra en la Figura 73:

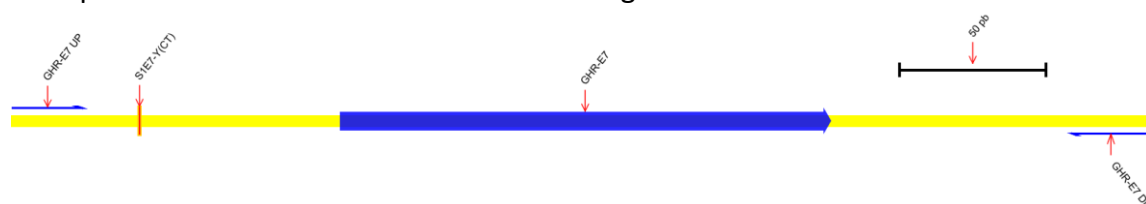


Figura 73: Esquema del fragmento GHR-E7

La flecha azul muestra el final del exón 7. El rectángulo rojo vertical localiza la posición del SNP. Las medias flechas indican la situación donde alinean los cebadores. Las características de la zona superior tienen orientación UP y las de la inferior tienen orientación DN. El esquema está dibujado a escala. La cota inferior, negra, representa 50 pb.

La Tabla 36 lista las características del SNP:

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
Y(44)		No traducido

Tabla 36: Listado de SNPs detectados en el fragmento GHR-E5.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis).

La Tabla 37 muestra la relación entre los genotipos y los patrones de SSCP:

LISTA DE GENOTIPOS		Posición
Genotipo	Patrón	44
C	1	C
Y	4	^Y
T	2	^T
	3	
	6	

Tabla 37: Lista de genotipos del fragmento GHR-E7.

Para cada patrón de SSCP se lista el nucleótido que define al genotipo en la posición 44. Los heterocigotos se colorean en rojo, los homocigotos menos frecuentes se colorean en azul.

El resto de patrones están muy poco representados y no fueron secuenciados.

4.3.3.8 GHR-E8

Este es el fragmento que engloba al exón 8 del GHR. Está delimitado por los cebadores GHR-E8 UP y GHR-E8 DN (ver Tabla 12).

La PCR funciona a 55 °C con 0,75 a 4 mM de MgCl₂, con y sin betaína. También funciona a 60 °C y con 1,5 a 3 mM de MgCl₂ (ver Tabla 9).

La secuencia del fragmento que engloba al 8º exón del gen GHR es la siguiente:

```
GTGGCTATCA AGTGAAATCA TTGACTTTAC TAGATGAATA CAAATTAGGA AGTTTTATGT 60
GGAACAGGAG AATGAGATAT AAAC TTCAAC TGTTTCATAGT TCTGTGAGAT ATTATTTTGT 120
TGTTTTTCAG ATTTCAGTT TCCATGGTC TTAATTATTA TCTTTGGAAT ACTTGGGCTA 180
GCAGTGACAT TATTTTTACT CATATTTTCT AAACAGCAAA GGTAAGTGTG ATATAACCTA 240
CTCTGATATG TTTTGCCAGT TATTTAGCAA ATGTCCATGT TTCCATTTT TGTTTGATGT 300
TTTCTTTTGT GAATCCTGAG TGAAGTGTT CATCAACCCA GT 342
```

Se indica en azul la zona del exón y, subrayada, las secuencias de unión de los cebadores de PCR.

El esquema de la secuencia se ilustra en la Figura 74:



Figura 74: Esquema del fragmento GHR-E8.

La flecha azul muestra el final del exón 8. Las medias flechas indican la posición donde alinean los cebadores. Las características de la zona superior tienen orientación UP y las de la inferior tienen orientación DN. El esquema está dibujado a escala. La cota inferior, negra, representa 50 pb. Adicionalmente se marca la posición de la mutación F279Y de vaca.

En las muestras de SSCP no se detectó ningún SNP. Tampoco el F279Y que fue detectado en el gen de vaca (Georges et al., 1995) y está reconocido como posible QTN para producción de leche (Blott et al., 2003; Rahmatalla et al., 2011; Waters et al., 2011).

4.3.3.9 GHR-E9

Este es el fragmento que engloba al exón 9 del GHR. Está delimitado por los cebadores GHR-E9 UP y GHR-E9 DN (ver Tabla 12).

La PCR parece funcionar a 55 °C con 1,5 mM de MgCl₂. También lo hace a 58 °C y con 0,75 a 4 mM de MgCl₂, con y sin betaína y a 60 °C con 1,5 a 3 mM de MgCl₂ (ver Tabla 9).

Sin embargo, no pudimos obtener ninguna secuencia legible de este fragmento. En todos los casos se obtuvieron electroferogramas en los que parece haber más de una secuencia superpuesta, entre ellas, la esperada para GHR-E9.

4.3.3.10 GHR-E10

Este fragmento engloba al exón 10 del gen de la hormona de crecimiento, esto es, a los 5 fragmentos de SSCP. Se decidió secuenciar el fragmento completo porque tiene un tamaño adecuado para la secuenciación, es más rápido y económico y, además, minimiza los problemas de falta de calidad en los extremos de cada secuenciación.

Los cebadores empleados para amplificar este fragmento fueron GHR-E10 UP y GHR-E10 DN, cogidos del trabajo de Blott et al., 2003 (ver Tabla 8).

La PCR del fragmento ha funcionado a 53 °C y 3 mM de MgCl₂ y a 55 °C y entre 1,5 y 3 mM de MgCl₂ (ver Tabla 9).

Como el fragmento esperado tiene unas 1200 pb, se emplearon cebadores internos para completar la secuenciación. Estos fueron obtenidos, también, del trabajo de Blott et al., 2003:

- GHR-E10_1 UP: ACATTCTGGAGGCTGATTC
- GHR-E10_1 DN: AGCTTGGCTCTACGTGTGAT
- GHR-E10_2 UP: CAAAAGAATAAGACTGGGAA
- GHR-E10_2 DN: GATAACACTGGGCTGCTGGT

Se diseñaron cebadores internos adicionales para resolver las zonas conflictivas.

- GHR-E10gap1 UP: ATTTCCATGTCAGTGACA
- GHR-E10gap2 UP: ATTTACATCACCACAGAA

Como referencia, la posición de los cebadores empleados para secuenciar este fragmento puede verse en el esquema de la Figura 75:

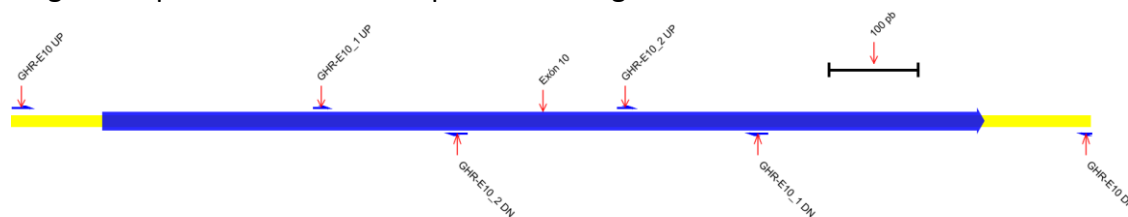


Figura 75: Esquema de posicionamiento de los cebadores empleados para secuenciar GHR-E10.

La flecha gruesa representa al exón 10 (GHR-E10). Los cebadores se marcan con medias flechas. Aquellos que tienen orientación UP se dibujan sobre la secuencia. Los de orientación DN se dibujan debajo de la secuencia. Los cebadores empleados para amplificar el fragmento en la primera PCR de secuenciación son los de los extremos (GHR-E10 UP y GHR-E10 DN). La cota superior, negra, representa 100 pb.

La secuencia obtenida para este fragmento es la siguiente:

```
GGGTTTGTTA TATGATTTTG TTACTGATTA GACTCAATAT TATTTGTTAA ATCAATTGTT 60
GTGAGTTTAT TTTCATAGAT CTT----TTC TATTTTATAG GAAGGAAAAT TAGAAGAGGT 120
GAATACAATC TTAGCCATTC ATGACAACCTA TAAACACGAA TTCTACAATG ATGACTCTTG 180
GGTTGAATTT ATTGAACCTAG ATATTGATGA CCTGATGAG AAGACTGAAG GGTCAGACAC 240
AGACAGACTT CTAAGCAATG ACCATGAAAA ATCACTCAGT ATCTTTGGGG CAAAGGATGA 300
TGACTCTGGG CGTACCAGCT GTTATGAACC TGACATTCTG GAGACTGATT TCCATGTCAG 360
TGACATGTGC GATGGTACCT CAGAGGTGTC TCAGCCACAA AGGTAAAAAG GGGAAGCAGA 420
TATCTTGTC CTTGATCAGA AGAATCAAAA TAACTCAYCT TCTAATGATG CTGCCCTGTC 480
TAGCCAGCAG CCCAGTGTTA TCCTAGTAGA GGAAAACAAA CCAAGACCAC TTCCTATTGG 540
TGGAACTGAG TCAACTCATC AAGCTGTCCA TACACAGCTC AGCAATCCAA GTTCATTGGC 600
AAACATTGAT TTTTATGCCC AGGTAAGCGA CATTACACCA GCAGGGAATG TGGTCCTTTC 660
CCCAGGCCAA AAGAATAAGA CTGGGAACCC CCAGTGTGAC ACGCACCAG AAGTGGTCAC 720
ACCCAGCCAA GCARACTTCA TCGTGGACAG CGCTTACTTC TCGAGGTAG ATGCCAAAAA 780
GTACATTGCC CTGGCCCCTG ATGTTGAGGC TGATCACAT ATAGAGCCAA GCTTTAACCA 840
GGAAGACATT TACATCACCA CAGAAAGCCT TACCACTACA GCCGGGAGGT CAGGGACAGC 900
AGAAATATGT CCAAGTCTG AGATACCTGT CCCAGATTAT ACCTCCATTC ATATAGTACA 960
GTCTCCACAG GGCCTCGTAC TCAATGCRAC TGCCCTGCC TCGCTGACA AAGAGTTTCT 1020
CTCATCATGT GGCTATGTGA GCACAGACCA ACTGAACAAA ATCATGCCGT AGCTTTTSTT 1080
```


TGATTTCCCA TGAGCTACCC ATTGAATGGC ACAGGGTTGG CTGGGGCATG AATGCTTAAA 1140
 CCAATTCAAT GTTTAACTT TTTTGGGGGA GGGGGATGAG TTAGAGGTGG 1190

En azul se señalan las bases que pertenecen al exón 10. En rojo se marcan los SNPs detectados. Las bases subrayadas se corresponden con las secuencias de unión de los cebadores de PCR.

En la Figura 76 se indican las posiciones de los SNPs encontrados, así como las de los fragmentos de SSCP en los que se dividió el exón:



Figura 76: Esquema del exón GHR-E10.

Se indican las posiciones de los SNPs encontrados. La flecha azul gruesa representa al exón 10, las medias flechas marcan las posiciones de los cebadores empleados en el SSCP. Los fragmentos de SSCP resultantes se indican con líneas verdes y grises alternas. La cota superior, negra, representa 100 pb.

La traducción de la secuencia del exón 10 es esta:

GAAGGAAAATTAGAAGAGGTGAATACAATCTTAGCCATTCATGACAACATAAACACGAATTCTACAATGATGACTCT
 GluGlyLysLeuGluGluValAsnThrIleLeuAlaIleHisAspAsnTyrLysHisGluPheTyrAsnAspAspSer

TGGGTTGAATTTATTGAACTAGATATTGATGACCCTGATGAGAAGACTGAAGGGTCAGACACAGACAGACTTCTAAGC
 TrpValGluPheIleGluLeuAspIleAspAspProAspGluLysThrGluGlySerAspThrAspArgLeuLeuSer

AATGACCATGAAAATCACTCAGTATCTTTGGGGCAAAGGATGATGACTCTGGGCGTACCAGCTGTTATGAACCTGAC
 AsnAspHisGluLysSerLeuSerIlePheGlyAlaLysAspAspAspSerGlyArgThrSerCysTyrGluProAsp

ATTCTGGAGACTGATTTCCATGTCAGTGACATGTGCGATGGTACCTCAGAGGTGCTCAGCCACAAAGGTTAAAAGGG
 IleLeuGluThrAspPheHisValSerAspMetCysAspGlyThrSerGluValAlaGlnProGlnArgLeuLysGly

GAAGCAGATATCTTGTGCCTTGATCAGAAGAATCAAAATAACTCA (-YCT--) TCTAATGATGCTGCCCTGCTAGCC
 GluAlaAspIleLeuCysLeuAspGlnLysAsnGlnAsnAsnSer (ProSer) SerAsnAspAlaAlaProAlaSerG

AGCAGCCAGTGTTATCCTAGTAGAGGAAAACAAACCAAGACCACTTCCTATTGGTGGAAGTGAAGTCAACTCATCAAG
 InGlnProSerValIleLeuValGluGluAsnLysProArgProLeuProIleGlyGlyThrGluSerThrHisGlnA

CTGTCCATACACAGCTCAGCAATCCAAGTTCATTGGCAAACATTGATTTTTATGCCAGGTAAGCGACATTACACCAG
 laValHisThrGlnLeuSerAsnProSerSerLeuAlaAsnIleAspPheTyrAlaGlnValSerAspIleThrProA

CAGGGAATGTGGTCTTTCCCCAGGCCAAAAGAATAAGACTGGGAACCCCAAGTGTGACACGCACCCAGAAGTGGTCA
 laGlyAsnValValLeuSerProGlyGlnLysAsnLysThrGlyAsnProGlnCysAspThrHisProGluValValT

CACCCAGCCAAGCA (-RAC--) TTCATCGTGGACAGCGCTTACTTCTGCGAGGTAGATGCCAAAAAGTACATTGCCCT
 hrProSerGlnAla (AsnAsp) PheIleValAspSerAlaTyrPheCysGluValAspAlaLysLysTyrIleAlaLe

GGCCCCTGATGTTGAGGCTGAATCACATATAGAGCCAAGCTTTAACCAGGAAGACATTTACATCACCACAGAAAGCCT
 uAlaProAspValGluAlaGluSerHisIleGluProSerPheAsnGlnGluAspIleTyrIleThrThrGluSerLe

TACCACTACAGCCGGGAGGTCAGGGACAGCAGAA (-MAT--) GTTCCAAGTCTGAGATACCTGTCCAGATTATACC
 uThrThrThrAlaGlyArgSerGlyThrAlaGlu (AsnHis) ValProSerSerGluIleProValProAspTyrThr

TCCATTATATAGTACAGTCTCCACAGGGCCTCGTACTCAAT (-GCR--) ACTGCCCTGCCCTTGCTGACAAAGAGT
 SerIleHisIleValGlnSerProGlnGlyLeuValLeuAsn (AlaAla) ThrAlaLeuProLeuProAspLysGluP

TTCTCTCATCATGTGGCTATGTGAGCACAGACCAACTGAACAAAATCATGCCGTAG
 heLeuSerSerCysGlyTyrValSerThrAspGlnLeuAsnLysIleMetPro *

En la Tabla 38 se listan las posiciones de los SNPs detectados:

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
Y(458)	Cct	Pro
	Tct	Ser
R(734)	Aac	Asn
	Gac	Asp
M(905)	Aat	Asn
	Cat	His
R(988)	gcA	Ala
	gcG	Ala
S(1026)	No traducido	

Tabla 38: Listado de SNPs detectados en el fragmento GHR-E5.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis) y, si el SNP se encuentra en la región traducida, el codón que genera cada variante y la traducción de dicho codón. Para cada codón, el nucleótido afectado por el SNP se capitaliza en mayúscula, los demás en minúscula. La traducción en verde indica que el SNP produce un cambio de aminoácido.

Los resultados de la secuenciación de los patrones de SSCP se recogen en la Tabla 39:

- Fragmento 1: No se detectó variabilidad.
- Fragmento 2: No se secuenció ninguna muestra con el patrón 3. La correspondencia entre los demás patrones y los genotipos se muestra en la Tabla 39:

LISTA DE GENOTIPOS		Posición
Genotipo	Patrón	138
C	1	C
	2	
Y	4	Y

Tabla 39: Lista de genotipos del fragmento GHR-E7.

Para cada patrón de SSCP se lista el nucleótido que define al genotipo en la posición 44. Los heterocigotos se colorean en rojo, los homocigotos menos frecuentes se colorean en azul.

- Fragmento 3: No se detectó variabilidad.
- Fragmento 4: El genotipo de este fragmento no se pudo resolver correctamente. Contiene ambigüedades.
- Fragmento 5: No se secuenció.

4.3.4 DGAT1.

En el gen Acil CoA:DiacilGlicerol Acetil Transferasa (DGAT1) se optimizaron las condiciones de PCR para la amplificación de algunos fragmentos y se identificaron 4 patrones de SSCP en el fragmento del exón 8. Este gen resultaba de interés por haberse detectado un QTN en el exón 8 de vaca. El objetivo de la secuenciación del fragmento DGAT1-E8 era confirmar si ese QTN encontraba también en oveja.

4.3.4.1 DGAT1-E8.

El fragmento DGAT1-E8 contiene al exón 8 del gen DGAT1. Es el amplificado entre los cebadores DGAT1-E8/2 UP y DGAT1-E8/2 DN (ver Tabla 13).

La PCR funciona a entre 55 y 62 °C, con 1 a 3 mM de MgCl₂, con y sin Betaína y con glicerol al 5% (ver Tabla 9).

La secuencia obtenida es la siguiente:

CAAGGCAGGC TGGTGAGGGC TCCCTCGGGC TGGGGCCACT GGGCTGCCAC CTGCCGCGGG 60
 ACCGGCAGGG GCTCGGCTCA CCCCCGCCCC GCCCCCTGCC GCTTGCTCGT AGCTTT***G 120
 GCAGGTAAGA AGGCCAACGG GGGAGCTGCC CAGCGCACCG TGAGCTACCC CGACAACCTG 180
 ACCTACCGCG GTGAGGATCC TGCCTGGGGC TGGGGGGGCT GCCCGGCGGC CTGGCCTGCT 240
 AGCCCCGCC TCCCTTCCAG ATCTCTACTA CTTCTCTTGG CCCCCA 286

En la secuencia se colorean en azul las regiones cubiertas por los exones 7, 8 y 9. Las bases subrayadas son las que alinean con los cebadores de amplificación. Los asteriscos rojos marcan la posición de una inserción heterocigota de AAA.

En la Figura 77 se muestran los electroferogramas de dos muestras que presentan la inserción AAA.

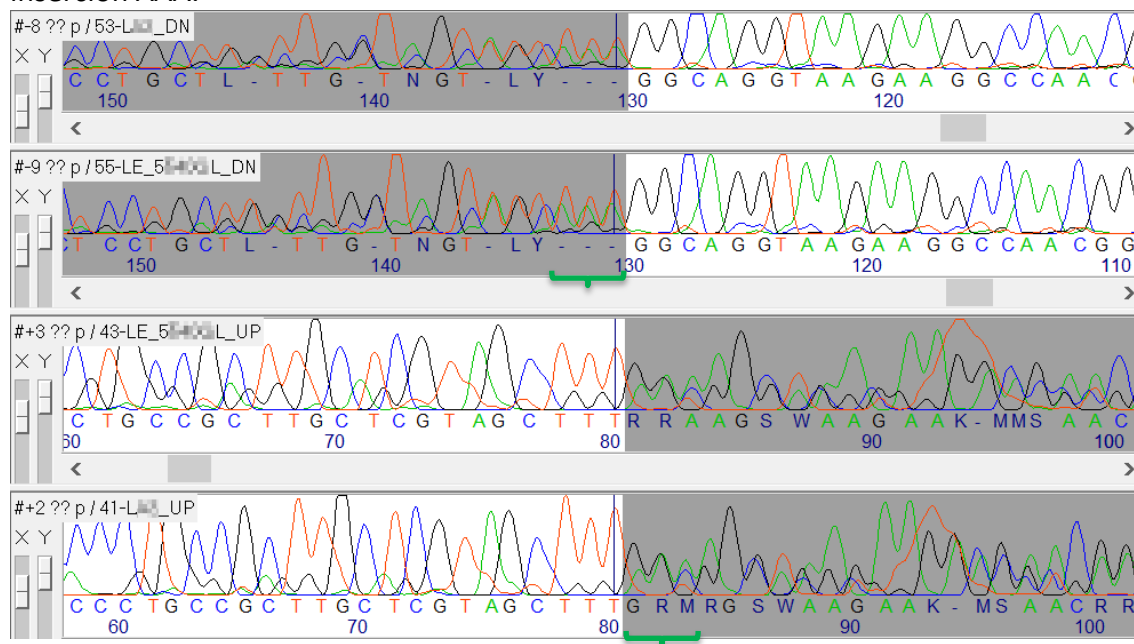


Figura 77: Electroferogramas de dos muestras que presentan las secuencias con la inserción AAA.

Los dos electroferogramas superiores han sido secuenciados con el cebador reverso (DN). Los dos inferiores han sido secuenciados con el cebador directo (UP). Las zonas con fondo oscuro tienen baja calidad de secuenciación porque se superponen los picos del electroferograma normal con aquellos en los que está presente la inserción AAA. Las llaves verdes marcan la posición donde se encuentran los picos de los 3 nucleótidos insertados. Los códigos de las muestras han sido difuminados parcialmente para proteger la identidad de los animales.

La inserción heterocigota detectada se encuentra en aquellos animales que presentan el patrón de SSCP 2DGAT1-E8. La equivalencia en genotipos de los patrones de SSCP se muestra en la Tabla 41:

Patrón	Genotipo	Traducción
1	-	
2	AAA/-	Ins(Lys)
3	-	
4	-	

Tabla 40: Lista de genotipos del fragmento DGAT1-E8.

Para cada patrón de SSCP se lista el genotipo de las posiciones 117 a 119 de la secuencia. El código AAA/- indica la inserción heterocigota de tres nucleótidos A. Esta inserción se traduce en la inserción de un aminoácido *Lys* en la secuencia de la proteína.

En la Figura 78 se muestra el alineamiento de las secuencias de los patrones 1 y 2 de SSCP.

```

1      1                               50
1 (1)  CAAGGAAGGCTGGTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCCACTGGGCTGCCAC
2 (1)  CAAGGAAGGCTGGTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCCACTGGGCTGCCAC
      51                               100
1 (51) CTGCCGCGGGACCGGCAGGGGCTCGGCTCACCCTCGCCCGCCCTGCGC
2 (51) CTGCCGCGGGACCGGCAGGGGCTCGGCTCACCCTCGCCCGCCCTGCGC
      101                              150
1 (101) GCTTGCTCGTAGCTTT---GGCAGGTAAGAGGCCAACGGGGGAGCTGCC
2 (101) GCTTGCTCGTAGCTTTAAAAGCAGGTAAGAGGCCAACGGGGGAGCTGCC
      151                              200
1 (148) CAGCGCACCGTGAGCTACCCCGACAACCTGACCTACCGCGGTGAGGATCC
2 (151) CAGCGCACCGTGAGCTACCCCGACAACCTGACCTACCGCGGTGAGGATCC
      201                              250
1 (198) TGCCTGGGGCTGGGGGGGCTGCCCCGGCGGCTGGCCTGCTAGCCCCGCC
2 (201) TGCCTGGGGCTGGGGGGGCTGCCCCGGCGGCTGGCCTGCTAGCCCCGCC
      251                              286
1 (248) TCCCTTCCAGATCTCTACTACTTCCTCTTGCCCCCA
2 (251) TCCCTTCCAGATCTCTACTACTTCCTCTTGCCCCCA

```

Figura 78: Alineamiento de las secuencias alternativas del fragmento DGAT1-E8/2.

La secuencia número 1 es la secuencia conocida de este fragmento. La secuencia número 2 contiene la inserción AAA descrita en este trabajo; se encuentra en heterocigosis en las muestras que presentan el patrón 2 de SSCP. Las bases coloreadas en verde son las afectadas por la mutación K232A de vaca. El alelo de este QTN sustituye estas bases por GC.

La traducción a proteína de estas secuencias revela una inserción de un aminoácido K (Lys). La secuencia aminoacídica del genotipo salvaje alinea perfectamente con la secuencia de la vaca. La inserción del aminoácido K alinea a una distancia de 4 aminoácidos de la mutación causal del QLT descubierto en vacuno por Grisart et al., 2001 (ver Figura 79).

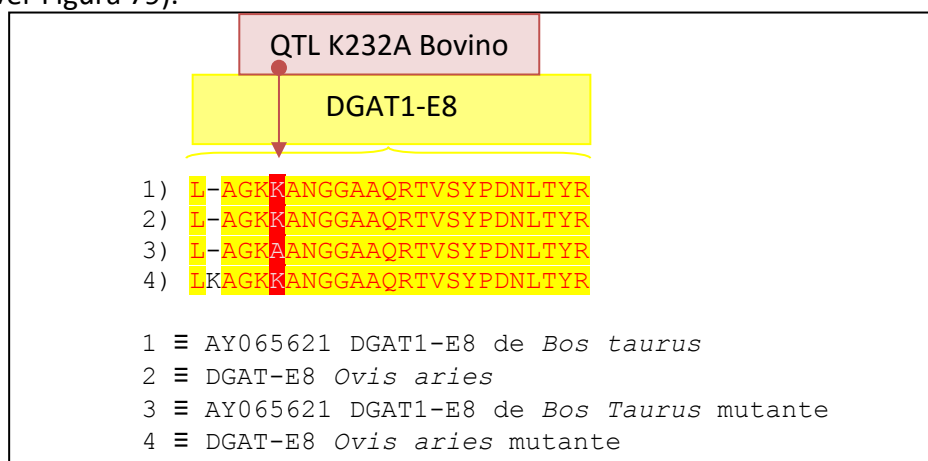


Figura 79: Alineamiento de las traducciones de las 2 variantes del exón 8 ovino con las homólogas en bovino.

La inserción encontrada en oveja (K) dista 4 posiciones del cambio de aminoácidos responsable de un QTL en vaca (en rojo). Las secuencias 1 y 2 son, respectivamente, las secuencias normales de vaca y oveja. La secuencia 3 es la secuencia vacuna que incorpora la mutación K232A. La secuencia 4 es la traducción de la inserción descubierta en este estudio y muestra la proximidad de la inserción K a la posición que modifica el comportamiento de la encima en vaca.

La frecuencia de la mutación encontrada es muy baja: del 1,3 % en nuestros patrones de SSCP. Los análisis de SSCP se realizaron sobre un grupo de muestras antiguas muy heterogéneo. Estaba diseñado para maximizar la detección de variabilidad.

La secuenciación del gen DGAT1 completo fue realizada, posteriormente, por Fernández García, 2011, con un grupo de muestras más amplio, de raza churra para el que se disponían de datos de producción de ácidos grasos. La inserción de la Lisina en posición 228 de la secuencia aminoacídica no fue encontrada.

Hemos realizado la secuenciación de este mismo fragmento para machos de churra que están en el programa de selección y que tienen hijas valoradas para caracteres de producción. Tampoco hemos encontrado la inserción.

4.3.5 GH.

El gen de la hormona de crecimiento (GH) es muy parecido estructuralmente al de la prolactina. Ambos pertenecen a la superfamilia de los receptores de citoquinas de clase 1 (Goffin and Kelly, 1997). Al igual que el gen PRL, está compuesto por 5 exones (ver Figura 80):

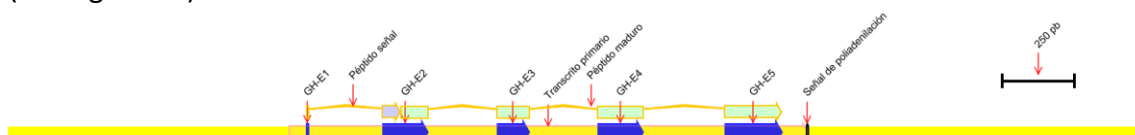


Figura 80: Esquema del gen GH.

Esta es la estructura del gen de la hormona de crecimiento. El esquema está realizado a partir de la secuencia M37310 (Byrne et al., 1987). Los exones se representan como flechas y rectángulos azules sobre la secuencia. El transcrito primario se representa como una flecha naranja sobre la secuencia. El péptido señal y el maduro se representan en azul y verde, respectivamente, encima de la secuencia. Por simplicidad, se ha eliminado la característica de la secuencia codificante porque es igual a la concatenación de estos dos péptidos. La señal de poliadenilación se presenta como un óvalo azul, sobre la secuencia. La cota superior, negra, representa 250 pb.

El gen de la hormona de crecimiento fue estudiado mediante SSCP por Varejão, 2003. Encontró 20 SNPs en una secuencia de 2161 nucleótidos. Esto representa 1 SNP cada 108 nucleótidos, que es una densidad de SNPs 5 veces superior a la habitual: Pariset et al., 2006 encontraron una densidad de 1 SNP cada 557 bases.

El objetivo de la secuenciación del gen de la hormona de crecimiento era encontrar la causa de la elevada frecuencia de mutación detectada por SSCP.

Para estudiarlo, se diseñó un fragmento de PCR que permitía secuenciar la mayor parte del gen. El fragmento que se encuentra entre los 2 cebadores se muestra en la Figura 81:

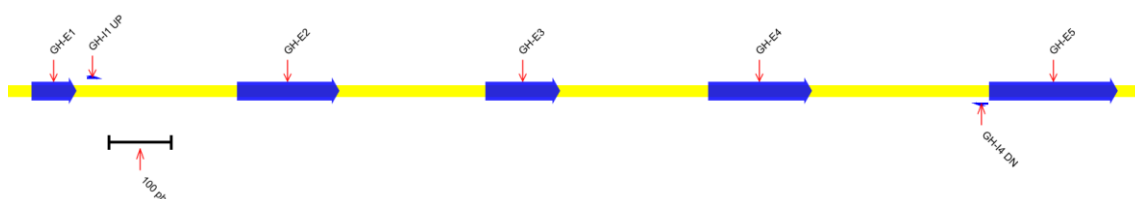


Figura 81: Esquema del gen GH con cebadores de secuenciación.

Las flechas azules marcan la posición de cada uno de los exones. También se muestran las posiciones de los cebadores que delimitan al fragmento GH-I1-I4 (ver Figura 84). La cota inferior, negra, representa 100 pb.

También se intentaron secuenciar las zonas de los extremos del gen.

La bibliografía disponible indicaba que, en oveja, podían encontrarse 2 formas alélicas del gen: como copia única o como duplicación en tándem (Wallis et al., 1998; Yamano et al., 1991), sin embargo, la secuencia de la región intergénica era desconocida en oveja. Para caracterizar el número de copias de nuestra población de ovejas, principalmente churras, se diseñó un fragmento para amplificar y secuenciar esta

región. El diseño de este fragmento incluyó una predicción bioinformática de la secuencia que se esperaba obtener.
A continuación se recogen los resultados de la secuenciación de estos fragmentos.

4.3.5.1 GH2-E5-3prima

Este fragmento se diseñó para amplificar la región 3' del gen GH. Como no se disponía de la secuencia completa del gen, el diseño de cebadores se hizo contra una construcción quimérica entre la secuencia de oveja (M37310²⁷) y la de vaca (AAFC01389511²⁸) (ver Figura 82). Con esta construcción se pretendía extender la PCR aguas abajo de la zona conocida de oveja, por homología con la secuencia bovina. El fragmento de PCR está delimitado por los cebadores GH2-E5 UP y GH2-E3' DN (ver

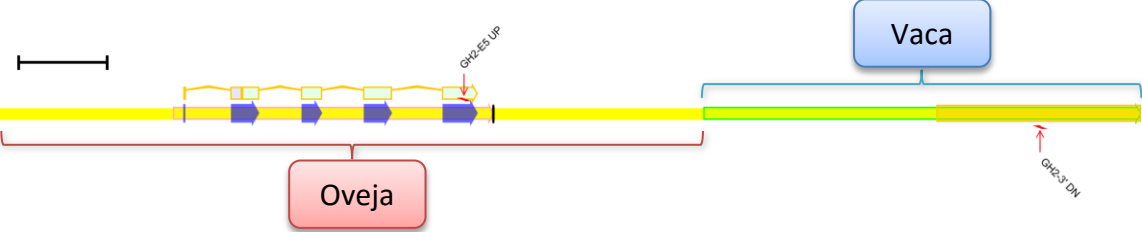


Tabla 8).

Figura 82: Esquema de la construcción quimérica empleada para diseñar el fragmento GH2-5'2-3'.
La secuencia de la izquierda es la secuencia conocida de oveja con ID M37310 en la base de datos GeneBank (para más detalles ver Figura 80, pág. 119). La de la derecha es un trozo de la secuencia de vaca AAFC01389511 (flecha verde). La zona de vaca que se resalta en naranja no alinea con la secuencia de oveja. La zona de vaca no resaltada alinea con las secuencias publicadas por Yamano et al., 1991. Se marcan las posiciones de los cebadores UP y DN como medias flechas azules. La zona a amplificar se marca con una línea gris. El mapa está realizado a escala. La cota superior, negra, representa 500 pb.

La PCR parece funcionar a 58 °C, con y sin betaína, al 0,7 mM y a 61 °C. En todos los casos, se utiliza el kit para fragmentos largos FidelityTaq (Affimetrix, 2005). El detalle de las condiciones de PCR se puede consultar en la Tabla 9.

El tamaño del producto de PCR esperado era de 3185 pb. La secuencia resultante de la secuenciación es la siguiente:

```
ATTTGTA AAA CATGATGCTG CTGCTGCTGC TGCTGCTAAG TCGCTTCAGT CGTGTCCGAC 60
TCTGTGTGAC CCCATAGATG GCAGCCCACC AGGCTCCTCC GTCCCTGGGA TTCTCCAGGC 120
AAGAACACTG GAGTGGGTTG CCATTTCCTT CTCCAATGCA TGAAAGTGAA AARTGAAAGT 180
GAAGTCACTG AGTCATGTCC AACTCTCAGT GACCCCATGT ACTGCAGCCT ATCAGGCTCC 240
TCTATCCATG GGATTCTCCA GGCAACAGTA CTAGAGTGGG GTGCCATTGC CTTCTCYRAA 300
AACATGATGC TACAAAATCA ATAATTCTTC TACAATGAAA ATAATCAGCA AATMTTCYTA 360
AAAAGCTTTT AGGAAGTTCT TACATGCTGT AATGAATTTT CTTCCAAATG GCACACATAT 420
GTATTCAC TG GGA 433
```

Se marcan en rojo los SNPs encontrados. La secuencia subrayada es un microsatélite con 7 repeticiones de TGC.

El mapa de la secuencia obtenida se muestra en la Figura 83.



²⁷ Ovine growth hormone gene, complete cds.

²⁸ Bos taurus breed Hereford Cont389523, whole genome shotgun sequence.

Figura 83: Esquema del fragmento amplificado con los cebadores de GH2-5'2-3'.

El rectángulo azul marca la posición del Microsatélite. Los rectángulos verticales rojos indican la posición de los SNPs detectados. Todos los SNPs se localizan en la secuencia directa. Algunos se dibujan debajo de la secuencia para evitar que las etiquetas de los que están próximos solapen. El mapa está realizado a escala. La cota superior, negra, representa 50 pb.

La secuencia no se corresponde en longitud con el tamaño esperado y sólo alinea completamente con la secuencia identificada en la base de datos del NCBI como CP011896²⁹. Por tanto, la secuencia obtenida no se corresponde con el extremo 3' de la hormona de crecimiento.

4.3.5.2 GH-I1-I4

Este fragmento se sitúa entre los intrones 1 y 4 del gen GH. Engloba a los 3 exones centrales del gen de la hormona de crecimiento. El fragmento tiene 1407 pb y está definido por la pareja de cebadores GH-I1 UP y GH-I4 DN (ver Tabla 8).

Las condiciones de PCR a las que amplifica se recogen en la Tabla 9.

Para realizar la secuenciación de este fragmento se clonó el producto de la PCR en un vector de clonación TOPO. Para ello se siguió el método de clonación a partir del cuarto paso de la "Reacción de ligación con TOPO[®]", pág. 44.

Para completar la secuenciación de la zona interna del fragmento se diseñó un segundo cebador UP:

- GH2-Largo2 UP: CAACTGGCTGCTGACACCTTC
- GH2-Largo2 DN: TTGGAGAAGGGCGAGGAAG

La secuencia obtenida para este fragmento es la siguiente:

```
TCCCTCCAT TAGCGTGCC TAAGGGRGTG ATGCGGGGG CCCTGCCGAT GGATGTGTCC 60
ACAGCTTTGG GTTTTAGGGY TTCYGAATGY RAACATAGGT ATCYRCACCC *GACATTTGG 120
CCAAGTTTGA AATRTTCTCA GTCCCTGGAG GGAAGGGCAG GCGGG*CTG GCAGGARATC 180
AGGCGYCTAG CTCTCTGGGC CCCTCCGTCG CGGCCCTCCT GGTCTCTCCC TAGGCCCCCG 240
GACCTCCCTG CTCTCTGGCT TCACCYTGCT CTGCCTGCYC TGGACTCAGG TGGTGGGCGC 300
CTTCCCAGCC ATGTCCYGT CCRGCCTGTT TGCCAACGCT GTGCTCCGGG CTCAGCACCT 360
GCATCARCTG GCTGCTGACA CCTTCAAAGA GTTTGTAAGC TCCCCAGAGA TGTGTCTTAG 420
AGGTGGGGAG GCAGGAAGGG RTGAATCCRC AM*CCCTCCA CACAATGGGA GGGAATGAG 480
GACCTCAGTG GTATTTTATC CAAGTAAGGA TGTGGTCAGG GGAGTAGAAA TGGGGGTGTG 540
TGGGGTGGGG AGGGTTCCGA ATAAGGCAGT GAGGGGAACG CACGCACCAG CTTAGACCTA 600
GGTGGGTGTG TTCTTCTCCC CCCTAGGAGC GCACCTACAT CCCGGAGGGA CAGAGATACT 660
CCATCCAGAA CACCCAGGTT GCCTTCTGCT TCTCYGAAAC CATCCCRGCC CCCACGRGCA 720
AGAATGAGGC CCAGCAGAAA TCAGTGAGTG GCCACCTAGA ACCGAGGAGC AGGGACCTCC 780
TTCATCCTAA GTAGGCTGCC CCAGCTCTCT GCACCGGGCC TGGGGCGTCC TTCTCCCCGA 840
GGTGCAGAG GGTGTTGGAT GGCAGTGGAG GATGATGGTT GGTGGTGGTG GCAGGAGGTC 900
CTCGGGCAGR GGCCGACMTT GCAGGGCTGC CCCGAGCCCG CRGCACCSAC CAACCACCCA 960
TCTGCCAGCA GGACTTGGAG CTGCTTCGCA TCTCACTGCT CTTATCCAG TCGTGGCTTG 1020
GGCCCCTGCA GTTCTCAGC AGAGTCTTCA CCAACAGCCT GGTGTTTGGC ACCTCGGACC 1080
GTGTCTATGA GAAGCTGAAG GACCTGGAGG AAGGCATCCT GGCCCTGATG CGGGTGAGGA 1140
TGGCRITGT GGGTCCCTTC CATGCTGRGG GCCATGCTCA CCCTCTCCTG GCTTAGCCAG 1200
GAGAACACAC RTGGGCTGGG GGAGAGAGAT CCCTGTCTC TCTCTCTTTC TAGCAGCCCA 1260
GCCTTGACCC AGGAGAAACC TCTTCCCTT TTGAAACCTC CTTCCYCGCC CTTCTCCAAG 1320
CCTATAGGGG AGGGTGGAAA ATGGAGCGG CAGAGGGAG CCGCTCCYCA GGGCCCTTCG 1380
GCCTCTCTGT CTCTCCCTCC CTTGGCA 1407
```

Las bases mostradas en azul se corresponden con los exones 2, 3 y 4, respectivamente. Las bases en rojo marcan la posición de los SNPs encontrados. Los asteriscos indican la posición de las inserciones. Las regiones subrayadas en los extremos de la secuencia son los cebadores de amplificación, que también se utilizaron para el primer paso de secuenciación. Las zonas subrayadas internas marcan la secuencia de los cebadores del

²⁹ *Ovis canadensis canadensis* isolate 43U chromosome 11 sequence

segundo paso de secuenciación, que se utilizaron para cubrir la secuencia a la que no se llegaba desde los extremos.

El esquema del fragmento se muestra en la Figura 84:

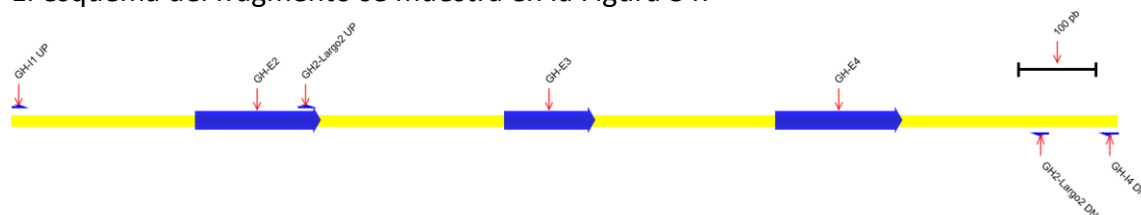


Figura 84: Esquema del fragmento GH-I1-I4.

Las flechas azules marcan los exones. Las medias flechas indican la posición donde alinean los cebadores. Las características de la zona superior tienen orientación UP y las de la inferior tienen orientación DN. El esquema está dibujado a escala. La cota superior, negra, representa 100 pb.

La posición de los SNPs e inserciones detectadas se muestra en la Figura 85:

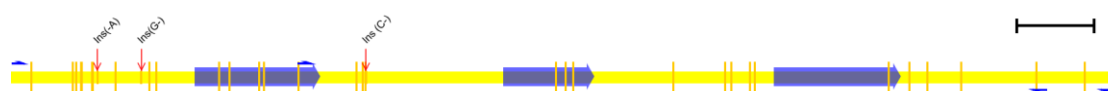


Figura 85: Esquema del fragmento GH- I1-I4.

El fragmento comprende la mayor parte de los intrones 1 y 4, los intrones 2 y 3 completos y los exones 2, 3 y 4 (flechas azules). La posición de los SNPs detectados se indica con líneas verticales naranjas. Las posiciones de las inserciones (marcadas) se muestran en verde. También se indica la posición de los cebadores utilizados para amplificar este fragmento (GH-I1 UP y GH-I4 DN). La cota superior, negra, representa 100 pb.

En la Tabla 41 se listan los 33 SNPs detectados.

Posición/SNP						
27*	80	84	90	91	104	105
r(GA)	y(CT)	y(TC)	y(CT)	r(GA)	y(TC)	r(GA)
134	177*	186	186*	266	279	317*
r(GA)	r(GA)	y(TC)	y(TC)	y(CT)	y(CT)	y(TC)
323	367*	441	449*	452	695	707
r(GC)	r(AG)	r(GA)	r(GA)	m(CA)	y(TC)	r(AG)
717	844*	910*	918	942	948	1118
r(AG)	r(GA)	r(AG)	m(CA)	r(GA)	s(CG)	s(GC)
1145	1168	1211*	1306*	1368*		
r(GA)	r(GA)	r(GA)	y(TC)	y(TC)		

Tabla 41: Listado de SNPs detectados en el fragmento GH-I1-I4.

En cada celda se recoge la posición y el tipo de SNP detectado. Como todas las muestras provienen de clones, ninguna presenta picos heterocigotos en el electroferograma.

* Los SNP cuya posición está marcada con asterisco son poco frecuentes.

La lista de inserciones detectadas se recoge en la Tabla 42:

Posición	Inserción
111	Ins(A-)
167	Ins(G-)
*453	Ins(C-)

Tabla 42: Listado de inserciones detectadas en el fragmento GH-I1-I4.

Para cada posición, se indica el tipo de inserción detectada.

*La inserción 453 forma una unidad junto con el SNP 452, porque las secuencias en ambas bases son siempre 'A-' o 'CC'.

La traducción a proteínas de las secuencias codificantes se recoge a continuación.:

Traducción del exón 2:

GGCCCGGACCTCCCTGCTGGCTTTTACC (-YTG--) CTCTGCCTG (-CYC--) TGGACTCAGGTGGTGGGCGCCT
ProArgThrSerLeuLeuLeuAlaPheThr (LeuLeu) LeuCysLeu (ProLeu) TrpThrGlnValValGlyAlaP

TCCCAGCCATGTCC (-YTG--) TCC (-RGC--) CTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTGCAT (-CAR--
heProAlaMetSer (LeuLeu) Ser (SerGly) LeuPheAlaAsnAlaValLeuArgAlaGlnHisLeuHis (GlnGln

) CTGGCTGCTGACACCTTCAAAGAGTTT

) LeuAlaAlaAspThrPheLysGluPhe

La Tabla 43 lista las características de los SNPs detectados en el exón 2:

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
Y(266)	Ctg	Leu
	Ttg	Leu
Y(279)	cCc	Pro
	cTc	Leu
Y(317)	Ctg	Leu
	Ttg	Leu
R(323)	Agc	Ser
	Ggc	Gly
Y(367)	caA	Gln
	caG	Gln

Tabla 43: Listado de SNPs detectados en el exón 2 del gen GH.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis), el codón que genera cada variante y la traducción de dicho codón. Para cada codón, el nucleótido afectado por el SNP se capitaliza en mayúscula, los demás en minúscula. La traducción en verde indica que el SNP produce un cambio de aminoácido.

Traducción del exón 3:

GAGCGCACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATCCAGAACACCCAGGTTGCCTTCTGCTTC (-TCY--) GAAAC
GluArgThrTyrIleProGluGlyGlnArgTyrSerIleGlnAsnThrGlnValAlaPheCysPhe (SerSer) GluTh

CATC (-CCR--) GCCCCCAGC (-RGC--) AAGAATGAGGCCAGCAGAAATCA

rIle (ProPro) AlaProThr (SerGly) LysAsnGluAlaGlnGlnLysSer

La Tabla 44 lista las características de los SNPs detectados en el exón 3:

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
Y(695)	tcT	Ser
	tcC	Ser
R(707)	ccA	Pro
	ccG	Pro
R(717)	Agc	Ser
	Ggc	Gly

Tabla 44: Listado de SNPs detectados en el exón 3 del gen GH.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis), el codón que genera cada variante y la traducción de dicho codón. Para cada codón, el nucleótido afectado por el SNP se capitaliza en mayúscula, los demás en minúscula. La traducción en verde indica que el SNP produce un cambio de aminoácido.

Traducción del exón 4:

GACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTCCTTATCCAGTCGTGGCTTGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCA
AspLeuGluLeuLeuArgIleSerLeuLeuLeuIleGlnSerTrpLeuGlyProLeuGlnPheLeuSerArgValPheT

CCAACAGCCTGGTGTGTTGGCACCTCGGACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGC (-ATS--) CTGGCC
hrAsnSerLeuValPheGlyThrSerAspArgValTyrGluLysLeuLysAspLeuGluGluGly (IleMet) LeuAla

CTGATGCGG
LeuMetArg

La Tabla 45 lista las características del SNP detectado en el exón 4:

Heterozigoto(Posición)	Codón	Traducción
S(1118)	atC	Ile
	atG	Met

Tabla 45: Características del SNP detectado en el exón 4 del gen GH.

El tipo de heterocigoto se indica mediante el código de ambigüedad, su posición en la secuencia del fragmento (entre paréntesis), el codón que genera cada variante y la traducción de dicho codón. Para cada codón, el nucleótido afectado por el SNP se capitaliza en mayúscula, los demás en minúscula. La traducción en verde indica que el SNP produce un cambio de aminoácido.

4.3.5.3 Predicción bioinformática de la secuencia del espacio intergénico del gen GH.

El conocimiento de la estructura alélica del gen GH, obtenida mediante estudios de polimorfismos en fragmentos de restricción, indicaba que existían 2 alelos posibles: uno de ellos tiene una única copia del gen y otro tiene 2 copias dispuestas en tándem y separadas por un espacio intergénico. Esta estructura se muestra en la Figura 86.

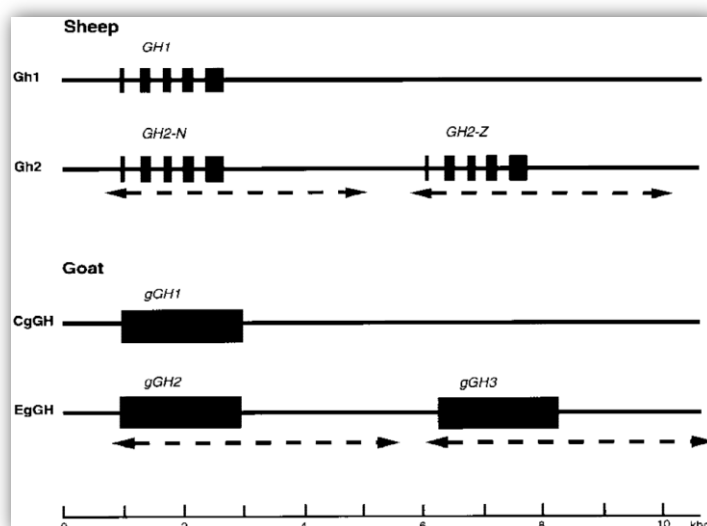


Figura 86: Organización de los genes relacionados con la hormona de crecimiento en oveja y cabra.

Esta imagen, tomada de Wallis et al., 1998, muestra el conocimiento de la estructura alélica del gen GH en oveja (*Sheep*) y cabra (*Goat*). Para la oveja se muestra la estructura de intrones y exones, para la cabra, la de genes. Las flechas discontinuas marcan las regiones aparentemente duplicadas. El nombre de los alelos se muestra a la izquierda. En el alelo con 2 copias, la secuencia de cada copia difiere ligeramente y reciben un nombre distinto (en oveja GH2-N y GH2-Z).

El estudio de la hormona de crecimiento requería caracterizar la secuencia del espacio intergénico, que separa a ambas copias del gen.

Antes de abordar la secuenciación del espacio que separa las 2 copias del gen GH se realizó la búsqueda de secuencias disponibles en las bases de datos públicas que permitió obtener una predicción de cuál sería la secuencia del espacio intergénico.

Las secuencias de que se disponía eran:

- La secuencia de los extremos del gen de la hormona de crecimiento en oveja con código de identificación M37310³⁰ en la base de datos de GeneBank. Tanto

³⁰ Ovine growth hormone gene, complete cds.

el extremo 3' como 5' de esta secuencia pueden ser parte del inserto si varias copias de este gen se disponen en tándem.

- La secuencia del gen GH de cabra publicada por Yamano et al., 1991, que contiene un inserto aguas arriba de la región 5' del gen.
- La secuencia de vaca identificada en la base de datos GeneBank con el código AAFC01389511³¹. Esta secuencia, que había sido producida por secuenciación masiva del genoma bovino, es capaz de rellenar el hueco que presenta el alineamiento de las 2 secuencias anteriores. Su extremo 5' alinea con el extremo 3' de la secuencia de oveja y su extremo 3' alinea con el extremo 5' de la secuencia de cabra.

En la figura se muestra un esquema del fragmento predicho y el origen de las secuencias que dieron lugar a la predicción:

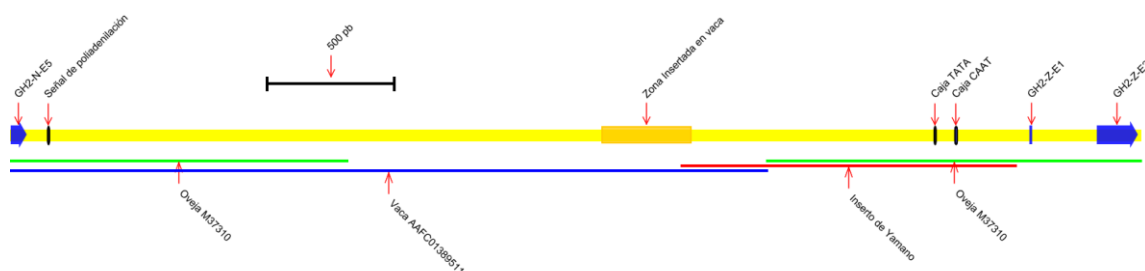


Figura 87: Predicción de la secuencia del espacio intergénico de GH.

Las flechas y rectángulos gruesos azules representan los exones del final de la primera copia (GH2-N-E5) y del inicio de la segunda (GH2-Z-E1 y GH2-Z-E2). Se muestra también las posiciones de la señal de poliadenilación de la primera copia y las cajas TATA y CAAT de la segunda. Las líneas inferiores indican el origen de la secuencia. La línea verde indica la secuencia conocida en oveja del gen GH. La línea roja indica la secuencia, de cabra, publicada por Yamano y la línea verde la secuencia, de vaca, con ID AAFC01389511 en la base de datos del NCBI. La "Zona insertada en vaca" marca la región que no se encontró al secuenciar el fragmento. La cota superior, negra, representa 500 pb.

La secuencia predicha es la siguiente:

```

AAGACGGAGA CGTACCTGAG GGTCATGAAG TGTCGCCGCT TCGGGGAGGC CAGCTGCGCC 60
TTCTAGTTGC CAGCCATCTG CTGTTACCCC TCCCTGTGCC TTCTAGACC CTGGAAGGTG 120
CCACTCCAGT GCCCACCCTC CTTTCTTAAT AAAGCGGAGG AAATTGCATC ACATTGTCTG 180
AGTAGGTGTC ATTCTATTCT AGGGGGTGGG GTCGGGCAGG ATAGCGAGGG GGAGGATTGG 240
GAAGACAATA GCAGGGGTGC TGTGGGCTCT ATGGGTACCC AGGTGCTGAA TAATTGACCC 300
GGTTCCTCCT GGGGCAGAAA GAAGCAGGCA CATCCCTTC TCTGTGACAC ACCCGTCCCT 360
CGCCCCGGT CTTAGTTCC AGCCCCATC ATAGGACACT CACAGCTCAG GAGGGCTCCG 420
CCTTCAATCC CACCCGCTAA AGTGCTTGA GCGTCTCTC CCTCTCAGCC ACCAGCCGAA 480
TCTAGGCCTC CAGAGTGGGA AGAATTTAAG CAAGACAGGC TATGAAGTAC AGAGGGAGAG 540
AAAATGCCTC CAACATGTGA GGAAGTGATG AGAGAAAGCG TAGAATTAGT TTTGTGGCAT 600
AAATTTTAAG GTGACTACAC ACTTGGCCCA ACTACCTTG GGAAATGTGT GTGTGTTAGT 660
CACTCAGTTG TGTCCAGCTC TTTGTGACCC CACGGACTGT GGCTGCCAGG CTCCTCTGTC 720
CATGGGATTC TCCAGGGCAA GAATACTGGA GGGGGTTGCC ATTCGCCAGG GGATCTTCCC 780
AGCCCAAGGA TCAAACCCGA GTTCTGCAT TGCAGGCAGA TTCTTTACTC TCTGAGCCAT 840
CAGGGAAGCC CTGTGGGAAA TGGGAACCAT GCAAGAATGG CTTTGGGACC AATAGGACCA 900
GAATGTTTGG GATCTGAACT GGGTCAAGAG ATGTGGAAGA GAGATTCTAA ATGCATGTGT 960
TCATGCTAAG TGGCTTCAGT CGTGTCTTAC TATTTGCAAC CCCGATGAAC TGCAGCCACC 1020
AGGCTCCTCT GTCCATGGGA TTCTCCATTC AAGAATACTG GAGTGAGTTT CCATTCTCT 1080
TCCAGGGGAT CTCAAACCC AGGGATTGAA CCAGCATCTC TTGTATCTCC TGCATTGACA 1140
GGCGGGTCTC TTTACCACTA GCGCCACCTG GGACCCAGTT CTAAGTGAGG GGTGCAAAAT 1200
CTCAGTGCCA ACAGGTGCCA GGCAGGTTAT ATACATAAGT GGCAAGGGCT GCATGTGAAG 1260
GGAGAAATCA GCAACCAGCC CTCTAGCCTG CTTGTGAAG ACATAGCACA GAGGGTGGGA 1320
ACCAGGGCAG CCTGAAGTCT CAGGCCCCAG CTAAGGATGT GGCCAGCCA GCCTTGTTAC 1380
ATTGCCTGAT CTGCAATTCA GGAAGTGCAG AGGACTTTCC TGGTGGTCCA GTGGTTGAGA 1440
ATCCACATGC CAATGCAGGG GACACGGGTT CAATCCCTGA TCTGGGAAGA TTCCACATGC 1500

```

³¹ *Bos taurus* breed Hereford Cont389523, whole genome shotgun sequence.

```

CTCAGGGCAA CTACGCCCGT ACATCACAAC TACCGAAGCC CTCGCACCTA GAGCCTGTGC 1560
TCTGCAACAG GAGAAGCCAC TCAGGGAGAA GCCTGCTCAC CACAAC TAGA AAGTACAGTA 1620
GCCCCTGCTC GCTGCAACTG GAGAAAGCCC TCTTGACGCA ACCAACACCC AGCACAGCCA 1680
AAACTAAATA TATATATATT TAAAAAGACC TCAGGGGACT TCCCTGGTGG TTCAGCGTGT 1740
AAGGCTCTGT GTTTCCAATG GAGGGGGCCC AGGTTCAACC CCTGGTTGGA GAACTAGATC 1800
CCTCATGCTG AAATTAAGA TCCCAAGTGC TGCAACCTGA CTCAGCCAAA AAAAAAAAAA 1860
AAAAGCTCAG ATGCAGGGCT GCCAGACCTT CTGATTCTTT GAGACAGACA GGGTATCTAG 1920
ACTTTCATGT AAAATCAAAT GTTTACACAT TGGCAACTAA TTCATAGTGA AAACATTTTA 1980
AGGGCAAAAT TTAACCCAAA CACATTTGCT CTTCAGCTG TCAGTGAGCA ATTTGTTATT 2040
AGAGGAATGG ATTGGGATAA CTTGGAATAA GGGAAAGAAT CAGAAGGACC TGGACTTGAA 2100
CTTATGCTCA GGAAGAAATT ACTTAACCTC CCCGAGACCC AGTTTGCTCA CCTACAAAAT 2160
AGAGATAATA ATATTGCCTC ATAAGGCTTG GGTGAGGAGT AAATGAAATG AGGTTTCTAA 2220
AGTTATTGAC ACATTACAGC ACGCGAGAAG CTTAGCTAT TTTTGCATGG AACTGTGGGG 2280
TGCTCTGTGT TTTTCCAAAG GAATTAATC ACCTCTGCT TCCCTAATGG CGGCTTGAAC 2340
GTTTCTTTTT CTTTCTAAAT GCACTTCAA GGGCAGTTTT AAAGTTGTTT TTAGTCACCC 2400
AAGCACCTTG GCTAAGTAAC TAGTGATCTA TAAATCAATG CTTAGTGTTT AAAGTAACTC 2460
TATTGTCTGT TAAATTTTGC TCATAACTTT ATTATTTCTA CTTTACTACT CACTTTAAGT 2520
TTTTGTCTTT AAAAGCCTAT ATTCTTTAAG TGGATTTTTA GATTACTACT TTAGAGCTTT 2580
ATTCTTTTCA AATATAAGAT TTAAAGGTAT AAAGCTTGAA CTGCGGAGTG CTCTGTGTTT 2640
TTCCAAGGAA TTGAATCACA TTCTGCTTCC CTAATCGCAG CCTGAATGTT CTTTCTAAAT 2700
ACACTTCAAG GGCAGTTTTA AAGTTGTTTT TAGTCACCCA AGCACCTTGA CTAAGTAACC 2760
AGTGATCGAT AAATTAATGC TTAGATGTTT AAGTAACTCT ATTGTCTGCT AAATTTTGCT 2820
CATAACTTTA TTATTTCTAC TTTACTACT ACTTTAAGTT TTCTTCTTTA AAAGCCTCTA 2880
TTCTTTAAGT GGATTTTTAG ATTACTAACT TTAGAGCTTT ACTTTTTACA AATAAGATTT 2940
AAAAGTATGG TTCAGTTCAG TTCAGTTCAG TTCAGTTCAG TCGCTCAGTC ATGTCTGACT 3000
CTTTGCGACC CCATGAATCG CAGTGCACCA GGCTCCCTG TCCATCACCA ACTGCCGCGC 3060
TTCCTCAGA CTCACGTCCA TCGAGTCGTG ATGCATCTAG CATCTCATCC TCTGTCGTCC 3120
CCTTCTCCTT TCTGCCCCCA ATCCCTCCCA GCATCAGAGT CTTTTCCAAT GAGTCAACTC 3180
TTTGATGAG GTGGCCAAAG TACTGGAATT TCAGCTTTAG CATCATTCCT TCCAAAGAAA 3240
TCCCAGGGCT GATCTCCTTC AGAATGGATT CGTTGGATCT CTTTGCAGTC CCAGGGACTC 3300
TCGAGAGTCT TCTCCAACAC CACAGTTCAA ACGCATCAAT TCTTCGGCGT TCAGCCTTAT 3360
TCACAGTCCA GCTCTCACAT CCATACATGA CCACAGTAGT AGACATAAGT GTCATCTGAA 3420
TTAAACTCAC CCATTCAGT CCGTTTTTCT CTGATATCTG TGTGATGTC AATGTAAACT 3480
GTTGCCATCT CCCGTTTGAC CACTTCCAAT TTACCTTGAT TCATGGACCT AACATTCCAG 3540
GTTCTTATGC AATATTGTTT TTTACAGTGT CAAACTTTAC TTCCATCACC AATCATATCT 3600
ATAACTGGG ACCATTTTCA CTTTGGCTAC ATCTCTTCCT GCTTCTGGA GTTATTTCTC 3660
CACTGATCTC CTAGGCATA TTGCGCACCT ACCAACCTGG GGAGTTCATT GCTCAGTGTC 3720
ATATCTTTTT AATTTTCATA CTGTTCATGG GATTCTCAAG GCAAGAATAC AGAAGTGGTT 3780
TACCATTGCC TTCTCCAGTG GACCACGTTT TGTCAGAACT CTCCACCATG ACTCATCGGT 3840
CTTGGGTGGC CCTACACAGC ACGGGTCATA GTTTAACTGA GTTAGACAAG GGCCAGCAG 3900
GGACCAATTC CAGGATCCCA GGACCCAGTT CACCAGACGA CTCAGGGTCC TGCTGACAGC 3960
TCACCAGCTA TGATGGCTGC AGGTAAGCTC ACGAAAATCC CCTCCATTAG CGTGTCTTAA 4020
GGGGGTGATG CGGGGGGCCC TGCCGATGGA TGTGTCCACA GCTTTGGGTT TTAGGGCTTC 4080
TGAATGTGAA CATAGGTATC TGCACCCGAC ATTTGGCCAA GTTTGAAATG TTCTCAGTCC 4140
CTGGAGGGAA GGGCAGGCGG GGCTGGCAGG AGATCAGGCG TCTAGCTCTC TGGGCCCCCTC 4200
CGTCGCGGCC CTCTGGTCT CTCCCTAGGC CCCCGGACCT CCCTGCTCCT GGCTTTCACC 4260
CTGCTCTGCC TGCCCTGGAC TCAGGTGGTG GGCGCTTCC CAGCCATGTC CTGTGCCGGC 4320
CTGTTTGCCA ACGCTGTGCT CCGGGCTCAG CACCTGCATC AACTGGCTGC TGACACCTTC 4380
AAAGAGTTTG TAAGCTCCCC AGAGA 4405

```

Las secuencias de los exones se indican en azul. La zona subrayada es la única que no se obtuvo en la posterior secuenciación de este fragmento (llamado GH2).

4.3.5.4 GH2.

Este fragmento se diseñó para amplificar el espacio intergénico que separa 2 copias, dispuestas en tándem, del gen de la hormona de crecimiento. Los cebadores de amplificación del fragmento son GH2-E5 UP y GH2-E2 DN (ver Tabla 8).

El cebador UP se sitúa sobre la secuencia del exón 5 de la copia del gen GH que está aguas arriba del espacio intergénico (GH-N). El cebador DN se sitúa sobre la secuencia del exón 2 de la copia del gen que está aguas abajo del espacio intergénico (GH-Z).

La PCR del fragmento funcionó entre 52 y 65 °C. En todos los casos, se utilizó el kit para fragmentos largos Fidelity Taq (Affimetrix, 2005). El detalle de las condiciones de PCR se puede consultar en la Tabla 9.

El tamaño esperado para este fragmento es de unas 4 kilobases. Como es demasiado grande para realizar una sola reacción de secuenciación se recurrió a la técnica del paseo cromosómico (En inglés: *chromosome walking*), Esto es, se secuenció en pasos sucesivos desde los extremos.

Para realizar la secuenciación de este fragmento se clonó el producto de la PCR en un vector de clonación TOPO®. Para ello se siguió el método de clonación a partir del cuarto paso de la “Reacción de ligación con TOPO®”, pág. 44. El vector TOPO®, es un plásmido comercial indicado para clonar fragmentos de PCR que no tienen extremos cohesivos.

El paseo cromosómico se dirigió desde los extremos del vector hacia el interior del fragmento hasta completar la secuenciación. La secuencia obtenida en cada paso se utilizó para diseñar nuevos cebadores para el paso siguiente. En la Figura 88 se muestra el mapa del fragmento así como los pasos de secuenciación empleados.

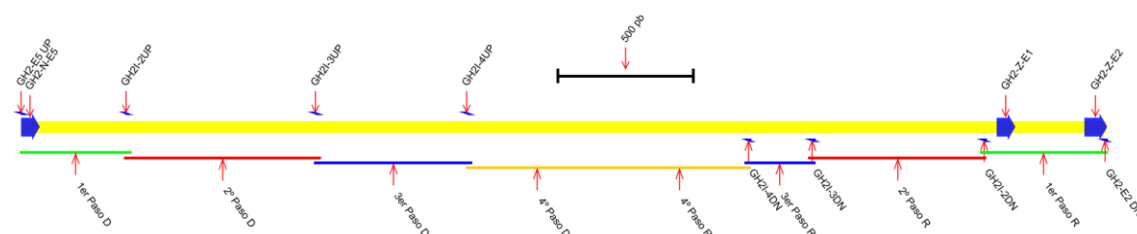


Figura 88: Esquema de la región intergénica del gen GH.

Las regiones de los exones se representan con flechas azules. Se indica el nombre de los cebadores utilizados en cada paso de secuenciación (medias flechas azules). Debajo, se indica la región cubierta en cada paso de la secuenciación. La secuencia obtenida en el primer paso se representa en verde, tanto desde el lado directo como el reverso, la obtenida en el segundo paso se indica en rojo, la obtenida en el tercero se indica en azul y, por último, la obtenida en el cuarto en amarillo. La cota superior, negra, representa 500 pb.

Los cebadores internos, que se utilizaron para completar el paseo se listan en la Tabla 46:

Paso	Dirección	Nombre	Secuencia
2	UP	GH2I-2UP	CAGCCCCACTCATAGGACACTC
3	UP	GH2I-3UP	TGAGTTGCCATTCTCTTCCAG
4	UP	GH2I-4UP	CCCTGCTCGCTGCAACTAGA
4	DN	GH2I-4DN	CATGGGGTCGCAAAGAGTCA
3	DN	GH2I-3DN	CCCTGGGATTTCTTTGAAGG
2	DN	GH2I-2DN	TGAAACTATGACCCGTGCTGTG

Tabla 46: Cebadores internos utilizados para secuenciar el espacio intergénico del gen GH.

Para cada cebador, se lista el paso de secuenciación en que se empleó (Paso), el sentido en que se secuenció (Dirección), el nombre del cebador (Nombre) y la secuencia del cebador (Secuencia). Se omiten los cebadores de secuenciación del primer paso porque son los mismos que los de la PCR de amplificación.

La secuencia resultante de la secuenciación y alineamiento de los *contigs* del espacio intergénico del gen GH es la siguiente:

```

GCACAAGACG GAGACGTACC TGAGGGTCAT GAAGTGTCGC CGCTTCGGGG AGGCCAGCTG 60
CGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTA CCCCTCCCCG TGCCCTCCTA GACCCTGGAA 120
GGTGCCACTC CAGTGCCAC TGTCTTTCC TAATAAAGCG AGGAAATTGC ATCACATT 180
CTGAGTAGST GTCATTCTAT TCTAGGGGGT GGRGTCTGGC AGGACAGCGA GGGGGAGGAT 240
TGGGAAGACA ATAGCAGGGG TGCTGTGGGC TCTATGGGTA CCCAGGTGCT GAATAATTGA 300
CCCGGTTTCT CCTGGGSCAG AAAGAAGCAG GCACATCCCC TTCTYGTGA CACACCCGGT 360
CCTCGCCCCCT GGTMCCTTAGT TCCAGCCCCA CTCATAGGAC ACTCACAGCT CAGGAGGGCT 420
CTCGCCTTCA GTCCACCCG CTAAAGTGCT TGGAGCGGTT TCTCCTTCCC TCATCAGCCC 480
ACCAAACCGA ACCTAGCCTC CAAGAGTGGG AAGAAATTTA AGCAAGACAG GCTATGAAGT 540
ACAGAGGGAG AGAAATGCC TCCAACATGT GAGGAAGTGA TGAGAGAAAG CGTAGAATTA 600
GTTTTGTGCA GAAATTTTAA GGTGACTACA CACTTGGCCC AACTACCCTT GGGAAATGTG 660
TGTGTGTTAG TCACTCAGTT GTGTCCAGCT CTTTGTGACC CCACGGACTG TGGCCTGCCA 720
GGCTCCTCTG TCCATGGGAT TCTCCAGGCA AGAATACTGG AGGGGGTTGC CATTTCCCAG 780
GGGATCTTCC CAACCCAAGG AYCAAACCCG AGTTTCCTGC ATTGCAGGCA GATTCTTTAC 840
TCTCTGAGCC AGCAGGGAAG CCCTGTGGGA AATGGGAACC ATGCAAAAAT GGCTTTGGGA 900
CCAATAGGAC CAGAATGTTT GGGATCTGAA CTGGGTCAAG AGATGTGGAA GAGAGATTCT 960
AAATGCATGT GTTCATGCTA AGTTGCTTCA GTCGTGTCCG ACTATTTGCA ACCCATATGA 1020
CTCAGCCCCA CCAGGCTCCT CTGTCCATGG GATTCTCCAT TCAAGAATAC TGGAGTGAGT 1080
TCCCATTTCT CTTCAGGGA TCTCCGAAC CCAGGCATTG AACAGCGTCT CTTATATCTC 1140
CTGCATTGAC AGGCGGGTTC TTTACCACTA GCGCCACCTG GGACCCAGTT CTAAGTGAGG 1200
GGTTGCAAAT TCAGTGCCAA CAGGTGCCAG GCAGGTTATA TACATAAGTG GCAAGGGCTG 1260
CATGTGAAGG GAGAAATAGC AACCAGCCCT TAGCCTGCTT GTGAAGGACA TAGCACAGAG 1320
GGGTAGGAAC CAGGGCAGCC TAAAGTCTCA GGCCCCAGCT AAGGATGCAG CCCACCCAGC 1380
CCTGTTACAT TGCCTTATCC TGCAATCAGG ACTGCAGGAG GACTTTCCTG GTGGTCCAGT 1440
GGCTGAGAAT CCACATACCA ATGCAGGGGA CACGGGTTCA ATCCCTGATC TGGAAAGATT 1500
CCACATGCCT CAGGGCAACT AAGCCTGTAT ATCACGACTA CCAAAGCCCT CACACCTACA 1560
GCCTGTGCTG TGCTACAAGA GAAGCCCTC AGTGAGAAGC CTGCTCACC AACTAGAAA 1620
GTAGAGTAGC CCCTGCTCGC TGCAACTAGA GAAAGCCCTC TTGCAGCAAC CAACAGCAC 1680
AGCCAAAAC AATTAAAGAC TCAGGGACTT CCCTGGTGGT TCAGCATATA AGGCTCTGTG 1740
CTTCCAATGG AGGGGGCCCA GGTTCAACCC CTGGTTGGAG AACTAGATCC CTCATGCTGA 1800
AATTAAAGAT CCCAAGTGCC ACAACCTGAC TCAGCCAAAT AAATAAATTA AAAAAAACA 1860
AAACTCRGAT CAGGGCTGC CAGACCTTCT GATTCTTCAA GACAGACAGG GTATCCACAC 1920
TTTCATGTAA AATCAAATGT TTAACATTG GCAACTAATT CATATTGAAA CATTTTAAGG 1980
GCAAATTTTA ACCCAAACAC ATTTGCTCTT CAAGCAGTCA GTGAGCAATC TGTATTAGA 2040
GGAATGGATT GGGATAACTT GGAACAAGGG AAAGAATCAG AAAGACCTAG ACTTGAACCT 2100
GTGCTCAGGA AGAATTAAT TAACCTCCCC AAGACCCAGT TTGCTCACCT ACAAATAGA 2160
GATAAATAATG TATTGCCTTA TARGGCTTGG GTGAGGAGTA AATGAAATGA GGTTCCTAAA 2220
GTGATTGACA CATTACGGCA GGTAAAGAAG TTCAGCTATT TTTGCATTGA ACTGTGGAGT 2280
GCCTGTGTGT TTTCCAAAGG AATTGAATCA CATTCTGCTT CCCTAATGGC AGCCTGAATG 2340
TTCTTTTCGAA ATACACTTCA AAGGGCAGTT TTAAGTTGT TTTTAGTCAC CCAAGCACCT 2400
TGGCTAAGTA ACCAGTGATC GATAAATTAA TGCTTAGAAG TTCAAAGTAA CTCTATTGTC 2460
TGCTAAGTTT TGCTCATAAC TTTATTATTT CTACTTTACT ACTCACTTTA AATTTTCTTC 2520
TTTAAAAGCC TCTATTCTTT AAGTGGATTT TTAGATTACT AACTTTAGAG CTTTACTCTT 2580
TACAAATATA AGATTTAAAA GTATGGTTCA GTTCAGTTCA GTTCAGTTCA GTTGCTCAGT 2640
CATGTYTGAC TCTTTGCGAC CCCRTGAATC GCAGTGTAAC AGGCTTCCCT GTCCATCACC 2700
AACTCCCGCA GTTCACTCAG ACTCACGTCC ATCGAGTCAG TGATGCCATC TAGCCATCTC 2760
ATCCTCTGTT GTCCCTTCTT CCTCCTGCCC CCAATCCCTC CCAGCATCAG AGTCTTTTCC 2820
AATGAGTCAA CCCTTTACAT GAGGTGGCCA AAGTACTGGA ATTTAGCTT TAGCATCATT 2880
CCTTCCAAAG AATCCAGG GCTGATCTCC TTCAGAATGG ATTGGTTGGA TCTCCTGGCA 2940
GTCCAGGGA CTCTCGAGAG TCTTCTCCAA CACCGCAGTT CAAACGCATC AATCTTTCGG 3000
CGTTCAGCCT TCTTCACAGT CCAGCTCTCA GATCCGTACA TGACCACAGT AGTAGACATA 3060
TTTGTGTCAT GAATTAAATT CACCATTTCC AGTCCGTTTT TCTCTGATAT CTGTGTTGAT 3120
GTCAATGTTT ACTGTTGCCA TCTCCTGTTT GACCACTTCC AATTTACCTT GATTTCATGA 3180
CGTAACATTC CAGGTTCTTA TGCAATATTG TTCTTTACAG TGTCAAACTT TACTTCCATC 3240
ACCAATCGTA TCTATAACTG GGTACCATTT TCATTTGGC TACACCTCTT CCGCTTTCT 3300
GGAGTTATTT CTCCACTGAG CTCTGTAGC ATATTGGGCA CCTACCGACC TGGGGAGTTC 3360
ATTGCTCAGT GTCATATCTT TTTGAATTTT CATACTGTTC ATGGGATTCT CAAGGCAAGA 3420
ATACAGAAGT GGTTTACCAT TGCTTCTTCC AGTGACCAC GTTTGTGAGA CTCTCCTCCA 3480

```

```

TGACTCATCG GTCTTGGATG GCCCTACACA GCACGGGTCA TAGTTTCACT GAGTTAGACA 3540
AGGGCCCAGC AGGGACCAAT TCCAGGATCC CAGGACCCAG TTCACCAGAT GACTCAGGGT 3600
CCTGCTGACA GCTCACCAGC TATGATGGCT GCAGGTAAGC TCACGAAAAT CCCCTCCATT 3660
AGCGTGTCTT AAGGGGGTGA TGCGGGGGGC CCTGCCGATG GATGTGTCCA CAGCTTTGGG 3720
TTTTAGGGTT TCCGAATGCG AACATAGGTA TCTACACCCA GACATTGGC CAAGTTTGAA 3780
ATGTTCTCAG TCCCTGGAGG GAAGGGCAGG CGGGGGCTGG CAGGAGATCA GCGCTCTAGC 3840
TCTCTGGGCC CCTCCGTCGC GGCCCTCCTG GTCTCTCCCT AGGCCCCCGG ACCTCCSTGC 3900
TCCTGGCTTT CACCCTGCTC TGCCTGCTCT GGACTCAGGT GGTGGGCGCC TTCCCAGCCA 3960
TGTCCTTG 3968

```

Se colorean en azul las bases que corresponden a cada uno de los 3 exones amplificados (GH-N-E5, GH-Z-E1 y GH-Z-E2). En rojo se marca los diferentes SNPs encontrados. Las zonas subrayadas se corresponden con las posiciones de los cebadores de amplificación.

En la Figura 89 se muestra el esquema del fragmento y las posiciones de los SNPs encontrados.



Figura 89: Esquema del fragmento GH2.

Las flechas azules gruesas marcan las posiciones de los exones: el de la izquierda es el número 5 de una copia del gen GH y los de la derecha son los número 1 y 2 de la copia siguiente. Las marcas azules, encima y debajo de la secuencia indican la posición de los cebadores de secuenciación. Las barras naranjas verticales marcan la posición de los SNPs detectados.

La lista de SNPs se recoge en la Tabla 47:

Posición/SNP					
179	189	213	217	317	345
k(GT)	s(GC)	r(GA)	r(AG)	s(GC)	y(CT)
374	802	1867	2183	2646	2664
m(CA)	y(CT)	r(GA)	r(AG)	y(CT)	r(AG)

Tabla 47: Listado de SNPs detectados en el fragmento GH2.

En cada celda se recoge la posición y el tipo de SNP detectado. Como todas las muestras provienen de clones, ninguna presenta picos heterocigotos en el electroferograma.

En la secuenciación de este fragmento se encontraron dos circunstancias relevantes:

- La PCR de la región intergénica funcionaba bien, con distintas intensidades, en todas las muestras amplificadas. Se esperaba que algunas muestras fuesen homocigotas para el alelo con una copia, pero este caso no se dio.
- La clonación se hizo con ADN de un solo animal y se encontraron 19 alelos distintos, lo cual implica que, al menos, hay 10 copias del gen en el genoma haploide del animal.

Esto es incompatible con el modelo de existencia de una o 2 copias y nos permite postular que en oveja pueden existir más de 2 copias del gen de la hormona de crecimiento.

Este experimento fue repetido de nuevo, poniendo especial cuidado en evitar cualquier contaminación, y se obtuvieron los mismo resultados.

4.4 RT-PCR

Se ha utilizado la técnica de PCR en tiempo real para desarrollar un método de estimación del número de copias del gen de la hormona de crecimiento (GH). Para ello se ha puesto a punto un método de detección del número de copias utilizando la técnica de PCR que consiste en comparar la cantidad de ADN de este gen con un control de número de copias conocido. En nuestro caso, el gen en estudio es el GH y el de control es GLCO.

4.4.1 GH-Taqman-I1-I4.

Este es el fragmento del gen de la hormona de crecimiento que se empleó para detectar el número de copias de dicha hormona mediante el procedimiento de PCR cuantitativa que utiliza sondas TaqMan[®].

Para la amplificación del fragmento se eligieron estos cebadores:

- GH-Taqman-I1-I4 UP: CGGCCCTCCTGGTCTCT
- GH-Taqman-I1-I4 DN: GCAGAGCAGGGTGAAAGC

Como sonda Taqman, teñida con fluorocromo FAM, se eligió:

- GH-Taqman-I1-I4FAM-NFQ UP: CCCCGACCTCCCTG

El mapa del fragmento es el siguiente:

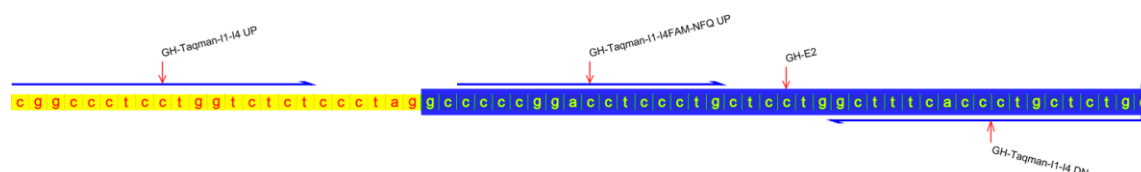


Figura 90: Esquema del gen GH-Taqman-I1-I4.

Se muestra con una flecha azul gruesa la posición del exón 2 del gen GH-Taqman-I1-I4. Las medias flechas azules muestran la posición de los cebadores de amplificación, GH-Taqman-I1-I4 UP y GH-Taqman-I1-I4 DN, y de la sonda TaqMan[®], GH-Taqman-I1-I4FAM-NFQ UP. El dibujo está realizado a escala.

La secuencia amplificada es:

cggccctcct ggtctctccc taggccccg gacctccctg ctcctggctt tcacctgct 60
ctgc 64

Las bases subrayadas se corresponden con los cebadores de amplificación (en los extremos) y con la sonda TaqMan[®] (en el centro).

4.4.2 GLCO-Taqman-E4.

Este es un fragmento del gen del glucagón (GLCO), que se utilizó como como fragmento normalizador para la determinación del número de copias del gen GH por un procedimiento de PCR cuantitativa utilizando sondas TaqMan[®]. Par el diseño de la PCR se empleó la secuencia AY588290³², que contiene el exón 4 del gen del glucagón.

Para la amplificación del fragmento se eligieron estos cebadores:

- GLCO-Taqman-E4 UP: AACATTGCCAAACGTCATGATG
- GLCO-Taqman-E4 DN: GCCTTCCTCGGCCTTTCA

Como sonda TaqMan[®], teñida con fluorocromo VIC, se eligió:

³² *Capra hircus* glucagon gene, exon 4 and partial cds.

- GLCO-Taqman-E4-VIC-MGB: ACATGCTGAAGGGACC

El mapa del fragmento se muestra en la Figura 91.



Figura 91: Esquema del gen GLCO.

Se muestra con una flecha azul gruesa la posición del exón 4 del gen GLCO. Las medias flechas azules muestran la posición de los cebadores de amplificación, GLCO-Taqman-E4 UP y GLCO-Taqman-E4 DN, y de la sonda TaqMan®, GLCO-Taqman-E4-VIC-MGB. El dibujo está realizado a escala.

La secuencia amplificada es esta:

```
aacattgcc aacgtcatga tgaatttgag agacatgctg aagggacott taccagtgat 60
gtaagttott atttggaagg ccaagctgcc aaggaattca ttgcttggt ggtgaaaggc 120
cgaggaaggc 130
```

Las bases subrayadas se corresponden con los cebadores de amplificación (en los extremos) y con la sonda TaqMan® (en el centro).

4.4.3 Diseño de una construcción plasmídica de referencia para determinación del número de copias mediante PCR cuantitativa.

4.4.3.1 Introducción.

La determinación del número de copias de un fragmento génico mediante PCR cuantitativa requiere una cuantificación relativa del número de copias de la muestra con respecto de una referencia de número de copias conocido. Cuando no se dispone de datos fiables sobre el número de copias por genoma que tiene un gen no se puede hacer esta determinación. Más aún, las técnicas habituales de PCR son incapaces, en la mayoría de ocasiones, de determinar el número de copias inicial. Como muchas de las técnicas que se emplean en biología molecular están basadas en la PCR este problema se arrastra a lo largo de todos los experimentos. Por todo ello, resulta de utilidad diseñar una construcción que se pueda utilizar como referencia. Esta construcción debe tener una única copia del fragmento en estudio y otra copia del fragmento normalizador.

Para que el método de determinación por PCR cuantitativa sea fiable la eficiencia de la PCR del fragmento en estudio y la del normalizador deben ser similares e, idealmente, próximas al 100 %. Esto se consigue diseñando fragmentos de PCR de entre 75 y 150 pb.

Con fragmentos tan cortos los tiempos de extensión no son demasiado prolongados. Aun así, conviene situar los 2 lugares donde ocurre la PCR a cierta distancia dentro de la construcción para evitar posibles interferencias. Siendo meticulosos, ambas PCRs deberían funcionar en sentidos contrarios en la misma cadena, de forma que el extremo 3' de uno de los fragmentos no sirviese de cebador para la otra PCR.

En este trabajo hemos desarrollado un método de creación de una construcción plasmídica, como la deseada, para disponer de una referencia para cuantificar el número de copias del gen GH. El fragmento en estudio será una sección del fragmento GH-I1-I4 y como normalizador se usará una sección del gen GLCO.

La estrategia de creación de esta construcción plasmídica de referencia se resume en la Figura 98, página 135.

A continuación se describen las fases del proceso.

4.4.3.2 Primera fase: Clonación de los productos de PCR en un vector TOPO.

En esta primera fase se pretende introducir las secuencias de interés en vectores plasmídicos para que puedan ser manejadas y amplificadas mediante las técnicas de clonación habituales en cualquier laboratorio microbiológico. La introducción de productos de PCR en vectores de clonación se realiza, de forma muy sencilla, gracias al kit comercial TOPO® (Invitrogen, 2006). Siguiendo las instrucciones del fabricante se obtienen los plásmido que se presentan en la Figura 92 y en la Figura 93:

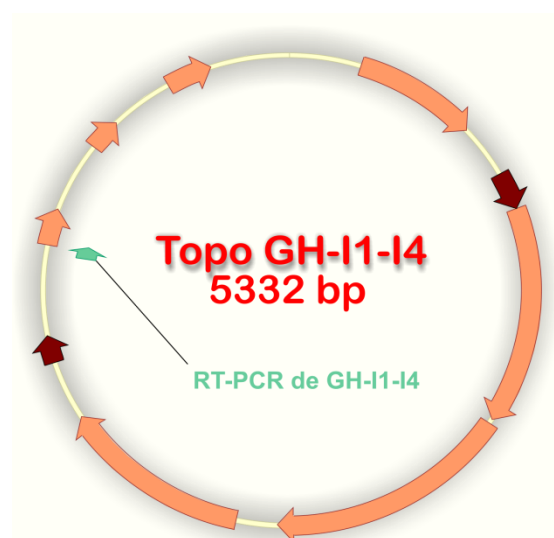


Figura 92: Vector TopoGH-I1-I4.

Esquema del vector TOPO® en el que se ha insertado el fragmento GH-I1-I4. La flecha verde marca la posición de la secuencia de interés del fragmento GH-I1-I4.



Figura 93: Vector TopoGLCO

Esquema del vector TOPO® en el que se ha insertado el fragmento GLCO. La flecha verde indica la posición de la zona del gen GLCO de interés.

Esta fase se corresponde con los pasos 1 y 4 de la Figura 98. El fragmento en estudio (GH-I1-I4) y el de referencia (GLCO) están insertados en sentido directo (5'-3'). Cada uno de los plásmidos contiene una de los fragmentos que se emplearán en PCR cuantitativa. Las secuencias que flanquean al inserto se pueden utilizar para comprobar, por secuenciación, que se ha introducido la secuencia correcta en la orientación adecuada.

4.4.3.3 Segunda fase: Clonación del inserto de GH-I1-I4 en pBluescript II KS +

El inserto de TopoGH-I1-I4 se extrae con las enzimas *Sac I* y *EcoR V*. Este fragmento se introduce en pBluescript II Ks + entre las mismas regiones *Sac I*, *EcoR V* (ver Figura 94).

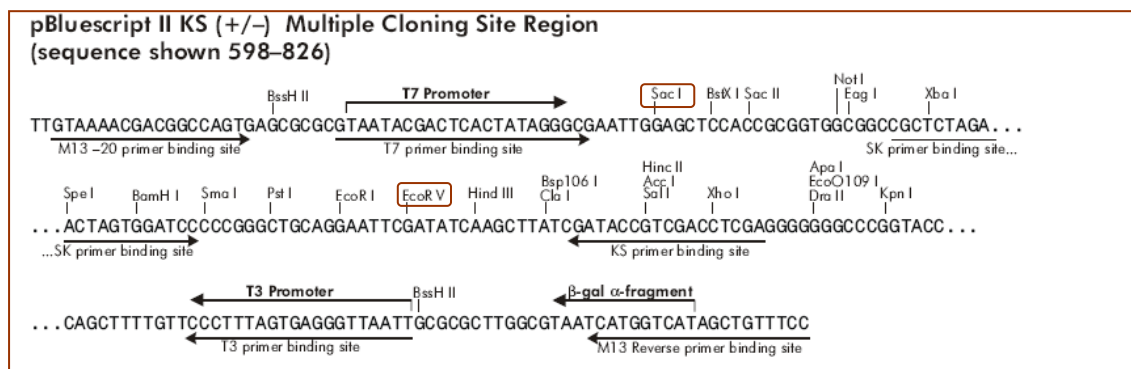


Figura 94: Sitio de clonación múltiple del vector pBluescript II KS (pBKS) y enzimas de la 2ª fase.

Secuencia y mapa de restricción del sitio de clonación múltiple del vector pBluescript II KS (+). Se muestran resaltados los sitios de restricción de las enzimas *Sac I* y *EcoR V*. El fragmento TopoGH-I1-I4 se introduce entre los sitios de restricción de estas enzimas. Fuente: documentación del vector.

El plásmido obtenido se esquematiza en la Figura 95:

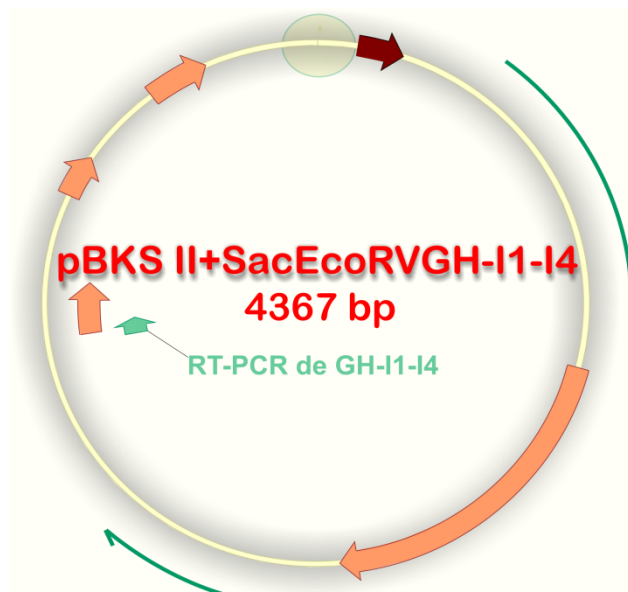


Figura 95: Vector pBKS II + SacEcoRVGH-I1-I4.

Se muestra un esquema del vector pBKS II generado en el segundo paso. La secuencia de interés (GH-I1-I4) se muestra con una flecha verde. El sitio de clonación múltiple se marca con un óvalo, en la parte superior.

La secuencia que va a ser amplificada por PCR se encuentra a más de 1200 pb del sitio de clonación donde se introducirá la secuencia de referencia (GLCO).

Esta fase se corresponde con los pasos 2 y 3 de la Figura 98.

4.4.3.4 Tercera fase: Introducción de la secuencia de referencia en el vector.

El inserto del vector “TopoGLCO” se extrae mediante las enzimas *Xho I* y *Acc65 I*. Se inserta en el plásmido “pBKS II + SacEcoRVGH-I1-I4” en los mismos puntos de corte *Xho I*, *Acc65 I*. *Acc65 I* es un isoesquizómero de *Kpn I*. Tiene la misma secuencia de reconocimiento pero corta en sentido inverso. Se prefiere *Acc65 I* a *Kpn I* porque es menos exigente con el tampón de corte y resulta más fácil optimizar las reacciones de corte doble con otras enzimas (ver Figura 96).

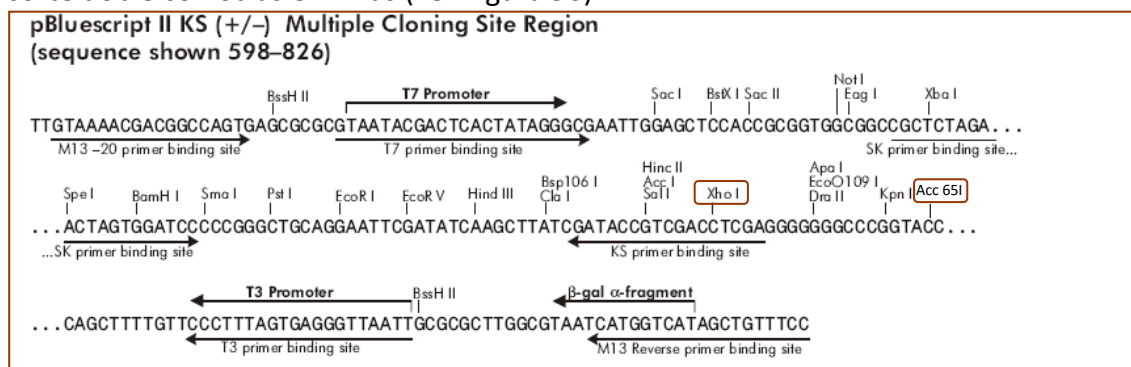


Figura 96: Sitio de clonación múltiple del vector pBluescript II KS (pBKS) y enzimas de la 3ª fase.

Secuencia y mapa de restricción del sitio de clonación múltiple del vector pBluescript II KS (+). Se muestran resaltados los sitios de restricción de las enzimas *Xho I* y *Acc 65 I*. El fragmento TopoGLCO se introduce entre los sitios de restricción de estas enzimas. Se ha añadido la posición de corte de la enzima *Acc 65 I*, que es un isoesquizómero de *Kpn I*.

El plásmido obtenido al final del proceso se muestra en la Figura 97:

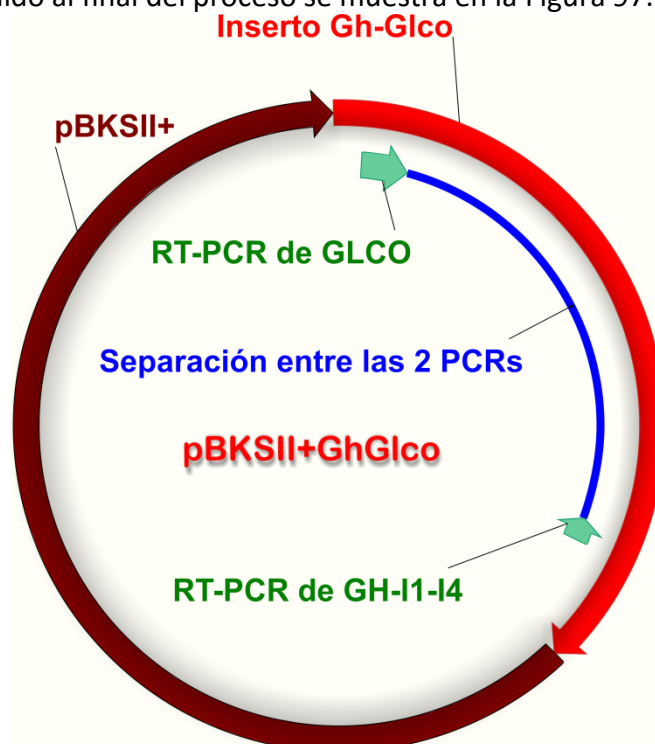


Figura 97: Construcción plasmídica de referencia para un experimento de PCR cuantitativa.

El plásmido pBKSII+GhGlcO es el resultado de la inserción en un plásmido de tipo pBKSII+ de un inserto génico que contiene los elementos necesarios para funcionar como control de número de copias conocido: tiene la secuencia para amplificar en la RT-PCR el fragmento de interés (GH-I1-I4) y la secuencia del fragmento normalizador (GLCO). Estas están enfrentadas y separadas lo suficiente para que las 2 PCRs, que deben ocurrir en multiplex, no interfieran entre ellas.

Este plásmido cumple con las condiciones para constituirse en muestra normalizadora para número de copias en un protocolo de PCR cuantitativa. Esta fase se corresponde con los pasos 5 y 6 de la Figura 98. La Figura 98 resume el proceso completo.

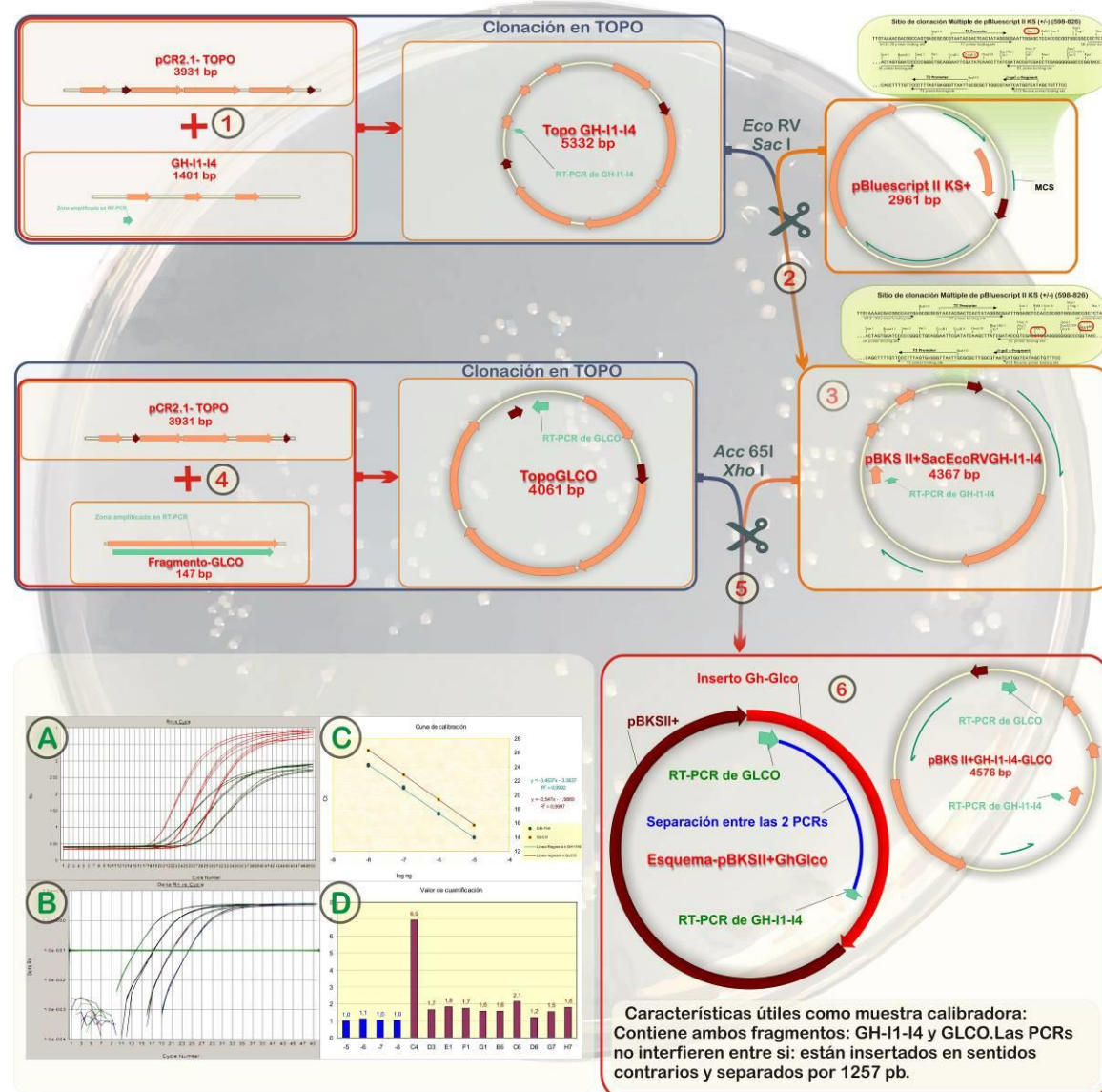


Figura 98: Estrategia de obtención de una construcción plasmídica de referencia para determinar el número de copias del gen de la hormona de crecimiento:

1) Clonar un producto de PCR del gen GH en TOPO. 2) Extraer el inserto con *EcoRV* y *SacI*. 3) Introducirlo en pBSK II+, entre los sitios *EcoRV* y *SacI*. 4) Clonar un producto de PCR del gen GLCO en TOPO. 5) Extraer el inserto con *Acc65I* y *XhoI*. 6) Insertarlo en la construcción anterior entre los sitios *Acc65I* y *XhoI*. La construcción ha sido utilizada satisfactoriamente como muestra calibradora. A) Ambas PCR, GH-I1-I4 y GLCO amplifican en multiplex. B) La amplificación es independiente de la concentración inicial de ADN. C) Las curvas de calibración de ambas PCR son rectas y paralelas D) Concentraciones distintas de la muestra calibradora se emplean en cada ensayo de cuantificación de muestras desconocidas.

Este trabajo fue presentado en el XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Genética (Morán Pérez et al., 2007).

4.5 Análisis de asociación del número de copias del gen GH con caracteres de producción en oveja.

4.5.1 Introducción.

La hormona de crecimiento de oveja es una cadena polipeptídica producida en la glándula pituitaria. El gen es codificado por 1,8 kb y contiene 5 exones. En ovejas se han descrito 2 alelos (Valinsky et al., 1990). El alelo GH1 contiene una única copia del gen. El alelo GH2 contiene 2 copias del gen (GH2-N y GH2-Z) dispuestas en tándem y separadas entre sí por 3,5 kb.

Hemos encontrado que el número de copias de la hormona de crecimiento puede ser superior a 2. Hemos desarrollado un método de estimación del número de copias del gen de la hormona de crecimiento (GH) a partir de un procedimiento de PCR cuantitativa que compara la cantidad de ADN de este gen con un control de número de copias conocido.

4.5.2 Relación cuantitativa del número de copias con datos de producción.

El número de copias no se asocia linealmente con ninguno de los caracteres productivos estudiados.

Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 99.

Los R^2 s de los modelos varían entre el 40% y el 80% pero ninguno de ellos presenta una relación lineal con el número de copias.

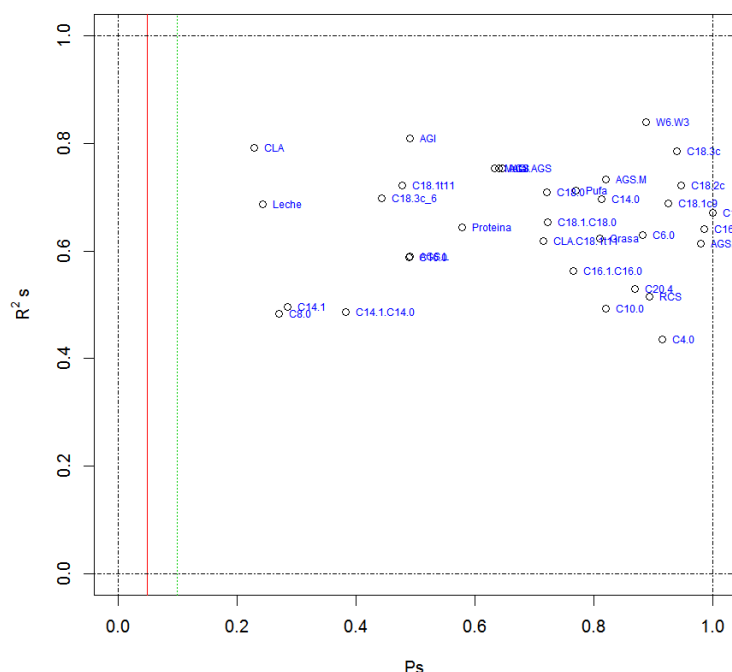


Figura 99: Resultados de la asociación del número de copias con los caracteres de producción de leche. Gráfico de validación de resultados.

En el eje de abscisas se muestra la probabilidad P de que el resultado haya sido obtenido por azar. En el eje de ordenadas se representa el valor R^2 del modelo. La línea roja vertical delimita el valor de tolerancia del 0.05 (5% de probabilidad de error). Los valores a la derecha de esta línea se consideran no significativos. La línea vertical punteada verde marca un valor de probabilidad de error del 10% y las líneas punteadas azules delimitan la superficie de valores posibles.

4.5.3 Relación cualitativa del número de copias con datos de producción.

Sólo se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre los niveles del número de copias y el carácter RCS (Recuento de Células Somáticas).

A continuación se muestra la tabla de probabilidades P de que el resultado sea debido al azar. En cada fila se recogen los resultados para cada uno de los caracteres de producción. Las columnas corresponden con los 10 primeros niveles del número de copias. Se resaltan en rojo los valores que superan el test de Bonferroni. Como número de componentes principales de este conjunto de datos es 4 (Fernández García, 2011), el nivel de significación queda establecido a 0.0125.

	NC3	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10	NC11	NC12
C4.0	2,36E-01	5,14E-01	4,23E-01	5,10E-01	4,66E-01	5,32E-01	1,25E-01	8,51E-01	9,19E-01	9,08E-01
C6.0	6,02E-01	3,10E-01	3,71E-01	2,86E-01	3,36E-01	2,60E-01	1,17E-01	5,47E-01	8,05E-01	4,29E-01
C8.0	8,44E-02	6,02E-01	6,14E-01	7,80E-01	7,43E-01	5,79E-01	7,54E-01	5,76E-01	6,51E-01	5,42E-01
C10.0	7,44E-01	4,86E-01	7,90E-01	2,71E-01	2,11E-01	5,59E-01	2,58E-01	5,21E-01	8,55E-01	2,01E-01
C12.0	4,99E-01	2,60E-01	2,84E-01	1,82E-01	1,82E-01	2,07E-01	4,54E-02	9,38E-01	6,30E-01	3,83E-01
C14.0	1,48E-01	6,81E-02	4,89E-02	5,44E-02	3,87E-02	5,98E-02	6,57E-03	7,48E-01	7,31E-01	1,78E-01
C14.1	5,95E-01	6,16E-01	6,16E-01	8,12E-01	4,93E-01	5,05E-01	6,83E-01	9,07E-01	8,76E-01	5,52E-01
C16.0	7,24E-01	8,40E-01	9,09E-01	9,17E-01	9,85E-01	9,97E-01	8,11E-01	6,55E-01	9,35E-01	6,77E-01
C16.1	6,16E-01	9,08E-01	7,93E-01	7,56E-01	6,95E-01	9,96E-01	7,69E-01	5,39E-01	6,88E-01	9,21E-01
C18.0	4,43E-01	3,18E-01	5,31E-01	3,25E-01	1,63E-01	3,71E-01	1,45E-01	9,08E-01	8,88E-01	3,48E-01
C18.1t11	6,18E-01	7,00E-01	5,85E-01	6,26E-01	8,59E-01	4,61E-01	1,58E-01	5,08E-01	7,14E-01	7,34E-01
C18.1c9	4,97E-01	5,51E-01	6,30E-01	5,05E-01	4,93E-01	3,54E-01	3,07E-01	8,22E-01	9,25E-01	3,95E-01
C18.2c	7,10E-01	3,47E-01	9,12E-02	3,46E-01	2,40E-01	3,35E-01	2,26E-01	1,71E-01	2,96E-01	1,00E-01
C18.3c	7,99E-01	3,13E-01	2,80E-01	2,40E-01	2,95E-01	1,66E-01	4,92E-01	3,64E-01	4,71E-01	3,49E-01
CLA	6,11E-01	6,84E-01	4,28E-01	4,35E-01	6,79E-01	5,14E-01	3,77E-01	7,23E-01	9,24E-01	8,65E-01
AGS	6,26E-01	4,08E-01	2,91E-01	2,86E-01	3,13E-01	2,11E-01	1,05E-01	8,41E-01	9,06E-01	2,40E-01
AGS.C	6,55E-01	5,57E-01	7,32E-01	4,36E-01	4,74E-01	5,25E-01	3,91E-01	6,74E-01	9,98E-01	4,60E-01
AGS.M	1,72E-01	7,16E-02	5,83E-02	5,45E-02	3,74E-02	4,84E-02	6,61E-03	7,77E-01	9,94E-01	1,69E-01
AGS.L	7,99E-01	3,19E-01	5,13E-01	3,26E-01	2,62E-01	4,67E-01	2,74E-01	7,48E-01	9,06E-01	6,86E-01
Mufa	6,22E-01	3,97E-01	2,87E-01	2,78E-01	3,05E-01	2,08E-01	1,07E-01	8,36E-01	9,00E-01	2,38E-01
Pufa	5,31E-01	5,54E-01	5,36E-01	4,66E-01	4,98E-01	3,38E-01	1,99E-01	8,26E-01	9,34E-01	3,97E-01
AGI	8,84E-01	3,03E-01	1,04E-01	1,62E-01	1,74E-01	1,84E-01	1,21E-01	2,22E-01	5,45E-01	1,69E-01
AGI.AGS	6,68E-01	4,42E-01	3,26E-01	3,36E-01	3,56E-01	2,39E-01	1,25E-01	8,75E-01	9,49E-01	2,80E-01
W6.W3	9,56E-01	7,67E-01	9,00E-01	7,70E-01	9,12E-01	6,58E-01	9,26E-01	9,51E-01	9,42E-01	8,35E-01
C14.1.C14.0	9,75E-01	5,94E-01	5,44E-01	4,39E-01	6,13E-01	6,87E-01	3,12E-01	8,01E-01	9,45E-01	8,55E-01
C16.1.C16.0	8,99E-01	8,81E-01	8,76E-01	8,33E-01	7,61E-01	9,82E-01	7,02E-01	7,67E-01	7,29E-01	7,74E-01
C18.1.C18.0	2,47E-01	9,28E-01	9,44E-01	6,89E-01	3,93E-01	7,50E-01	5,88E-01	5,30E-01	9,94E-01	9,25E-01
CLA.C18.1t11	3,81E-01	4,00E-01	5,34E-01	4,04E-01	2,55E-01	5,62E-01	3,77E-01	7,04E-01	8,54E-01	6,25E-01
C18.3c_6	4,04E-01	9,11E-01	6,80E-01	7,05E-01	8,12E-01	9,08E-01	9,56E-01	5,83E-01	9,25E-01	9,68E-01
C20.4	3,85E-01	8,93E-01	9,50E-01	7,85E-01	7,08E-01	7,89E-01	2,47E-01	5,28E-01	6,34E-01	6,39E-01
RCS	4,70E-02	4,43E-05	1,29E-04	3,30E-07	7,79E-08	2,70E-06	5,29E-07	2,15E-04	1,47E-02	2,36E-06
Proteína	8,69E-01	5,62E-01	8,78E-01	7,24E-01	4,28E-01	3,59E-01	3,29E-01	8,38E-01	5,04E-01	3,06E-01
Grasa	6,54E-01	9,98E-02	9,50E-01	7,29E-02	2,27E-01	1,36E-01	2,19E-01	6,69E-01	9,94E-01	2,40E-01
Leche	7,54E-02	6,64E-01	3,02E-01	3,82E-01	3,81E-01	5,87E-01	2,59E-01	4,26E-01	5,33E-01	5,82E-01

Tabla 48: Valor P de la relación entre el número de copias y cada carácter productivo.

En cada fila se recogen el valor de probabilidad para cada uno de los caracteres de producción (negrita). Las columnas corresponden con los 10 primeros niveles del número de copias (NC). Se resaltan en rojo los valores que superan el test de Bonferroni para test.

Únicamente el carácter RCS es significativo para casi todos los niveles de NC. Los caracteres AGS.M y C14.1 mantienen su significación en el nivel 9.

Las categorías con NC > 8 tienen un bajo número de datos pues están representadas por menos de 50 tuplas en la matriz de datos analizada.

El coeficiente de correlación de los modelos se recoge en la Tabla 49:

	R ²		R ²		R ²
C4.0	0,43545149	C18.2c	0,72189628	C14.1.C14.0	0,48677311
C6.0	0,62977611	C18.3c	0,78472807	C16.1.C16.0	0,56350638
C8.0	0,48405411	CLA	0,79120222	C18.1.C18.0	0,65416147
C10.0	0,49212873	AGS	0,7539009	CLA.C18.1t11	0,61838621
C12.0	0,67157449	AGS.C	0,61304191	C18.3c_6	0,69780446
C14.0	0,69622848	AGS.M	0,7331793	C20.4	0,52923727
C14.1	0,496202	AGS.L	0,58958656	RCS	0,51457053
C16.0	0,58868921	Mufa	0,75416006	Proteína	0,64416918
C16.1	0,64042592	Pufa	0,71192946	Grasa	0,62373617
C18.0	0,70906542	AGI	0,80994734	Leche	0,68715417
C18.1t11	0,72159008	AGI.AGS	0,75315103		
C18.1c9	0,68899403	W6.W3	0,83904851		

Tabla 49: Coeficiente de correlación de los modelos para carácter de producción.

El R² del modelo para RCS es uno de los más bajos. Explica el 51% de la variabilidad. Esto sugiere que puede haber otras variables, no identificadas, con influencia significativa en el recuento de células somáticas. El R² de los modelos para las demás variables comentadas ronda el entorno del 70%.

Los resultados significativos del ajuste se muestran en la Tabla 50:

	NC3	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10	NC11	NC12
C4.0										
C6.0										
C8.0										
C10.0										
C12.0										
C14.0							6,1007			
C14.1										
C16.0										
C16.1										
C18.0										
C18.1t11										
C18.1c9										
C18.2c										
C18.3c										
CLA										
AGS										
AGS.C										
AGS.M							10,0278			
AGS.L										
Mufa										
Pufa										
AGI										
AGI.AGS										
W6.W3										
C14.1.C14.0										
C16.1.C16.0										
C18.1.C18.0										
CLA.C18.1t11										
C18.3c_6										
C20.4										
RCS		-5,6882	-4,8792	-4,9347	-5,3393	-5,9698	-6,6591	-4,4680		-8,2246
Proteína										
Grasa										
Leche										

Tabla 50: Efectos del número de copias del gen GH en los distintos caracteres de producción de leche.

Sólo se muestran aquellos resultados cuya probabilidad de error es inferior al 5%, corregido mediante el test de Bonferroni al 1,25 %.

El número de copias se relaciona de forma inversa con el RCS. Para NC 3 disminuye en 1,6 unidades (sin embargo este valor no pasa el test de Bonferroni y no se muestra en la tabla). Para los demás niveles la disminución es mayor, entre 5 y 6 unidades, aproximadamente.

Los valores de AGS.M se relacionan con el nivel 9 de NC en 10,03 unidades.

Los valores de C14.0 se relacionan con el nivel 9 en 6,1 unidades.

4.5.4 Relación cuantitativa del número de copias con datos morfológicos.

Se han encontrado relaciones lineales significativas con los siguientes caracteres: profundidad de la ubre, inserción de los pezones, verticalidad, tamaño, forma, estatura, ancho de la grupa, aplomos y profundidad del talón. Los resultados se condensan en la siguiente tabla:

	Efecto	R ²	P	Modelo elegido
CORD_NAC	0,0013	0,0197	4,81E-01	CORD_NAC ~ NC + NUM_PARTO
COR_NAC_VI	0,0013	0,0197	4,81E-01	COR_NAC_VI ~ NC + NUM_PARTO
KGPROTEINA	-0,0991	0,3342	2,25E-01	KGPROTEINA ~ NC + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + NUM_PADRE + NUM_MADRE
LACT_REAL	0,5486	0,3750	6,34E-01	LACT_REAL ~ NC + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
LACT_120D	-0,1598	0,3871	9,17E-01	LACT_120D ~ NC + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
LAC_DIAS	0,9545	0,2006	4,03E-01	LAC_DIAS ~ NC + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
PROFUBRE	-0,0377	0,7811	4,31E-10	PROFUBRE ~ NC + NUM_MADRE
INSERCIÓN	-0,0416	0,6655	5,28E-06	INSERCIÓN ~ NC + NUM_MADRE
VERTICAL	-0,0441	0,8331	7,41E-05	VERTICAL ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
TAMANO	-0,0114	0,0963	1,39E-08	TAMANO ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE
FORMA	-0,0565	0,8078	3,16E-04	FORMA ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
ESTATURA	-0,0048	0,1664	1,14E-04	ESTATURA ~ NC + NUM_PADRE
ANCHOGRUPA	-0,0144	0,1823	6,36E-11	ANCHOGRUPA ~ NC + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + CALIFICADOR + NUM_PADRE
APLOMOS	0,0549	0,7923	1,58E-04	APLOMOS ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
PROFTALON	-0,1128	0,8819	1,06E-20	PROFTALON ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
CALGLOBAL	0,0192	0,8585	1,23E-01	CALGLOBAL ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE

Tabla 51: Resultados de la asociación lineal entre el número de copias del gen GH y caracteres morfológicos.

Para cada carácter se recoge el valor del efecto (Efecto), el coeficiente de correlación (R²), la probabilidad de error (P) y el modelo estadístico utilizado (Modelo elegido). Se representan en rojo aquellos valores de P que resultan significativos.

Los valores de R² de las variables de prolificidad (COR_NAC y COR_NAC_VI) indican que las variables incluidas en el modelo no tienen ninguna relación con la prolificidad. Los modelos explican el 2% de la variabilidad y la relación con el NC no es significativa.

Los modelos para las variables de lactación (LACT_REAL, LACT_120D y LAC_DIAS) tienen correlaciones entre el 20 y el 39%, pero el efecto del número de copias del NC no es significativo. Los modelos optimizados mediante el AIC son más complejos, conservan mayor número de variables independientes. Sorprende que la variable CALIFICADOR se mantenga cuando, en principio, no debería haber ningún motivo para que la subjetividad de la calificación morfológica influya en los parámetros de la lactación. Esta distorsión puede ser producida porque los modelos no explican demasiado bien el

comportamiento de la variable independiente (explican, a lo sumo, el 40% de la variabilidad).

La cantidad de proteína producida en una lactación (KGPRTEINA) tampoco se relaciona linealmente con el NC. El modelo optimizado para esta variable tampoco ajusta demasiado bien (el 33%).

Las variables de morfología de la ubre (PROFUBRE, INSERCIÓN, VERTICAL, TAMAÑO y FORMA) muestran una relación significativa con el NC. Salvo en el caso de TAMAÑO, la correlación de los modelos es alta, explican entre el 67 y el 83% de la variabilidad. El efecto del NC sobre las variables de morfología de la ubre es muy pequeño en términos absolutos y siempre de signo negativo. Las variables que explican estos factores son el NC y los efectos del padre y la madre. El caso de TAMAÑO es especial, porque el efecto de la madre no logró superar el umbral de significación del test AIC y la correlación del modelo es muy baja: entorno al 10%.

Las variables de morfología de la oveja (ESTATURA, ANCHOGRUPA, APLOMOS, PROFTALON y CALGLOBAL) muestran una relación significativa con el NC, salvo CALGLOBAL, cuya P es de 0.12. La correlación de los modelos es muy baja para ESTATURA y ANCHOGRUPA (17 y 18% respectivamente). Los modelos de APLOMOS, PROFTALON y CALGLOBAL se ajustan mucho mejor (79 a 88%). Los efectos del NC son muy bajos y de signo negativo para las variables ESTATURA, ANCHOGRUPA, y PROFTALON. Son también bajos y de signo positivo para APLOMOS. El modelo para ESTATURA está muy simplificado. Sólo pasaron el test de AIC las variables NC y NUM_PADRE. Este modelo explica muy poca variabilidad (el 17%). En contraste, el modelo para ANCHOGRUPA es mucho más complejo. Pasan el test de AIC las variables NC, NUM_PARTO, EDAD_PARTO_MESES, CALIFICADOR y NUM_PADRE. Sin embargo, la correlación es tan pobre como en el caso anterior (18%).

La importancia de estos valores se recoge en el siguiente gráfico:

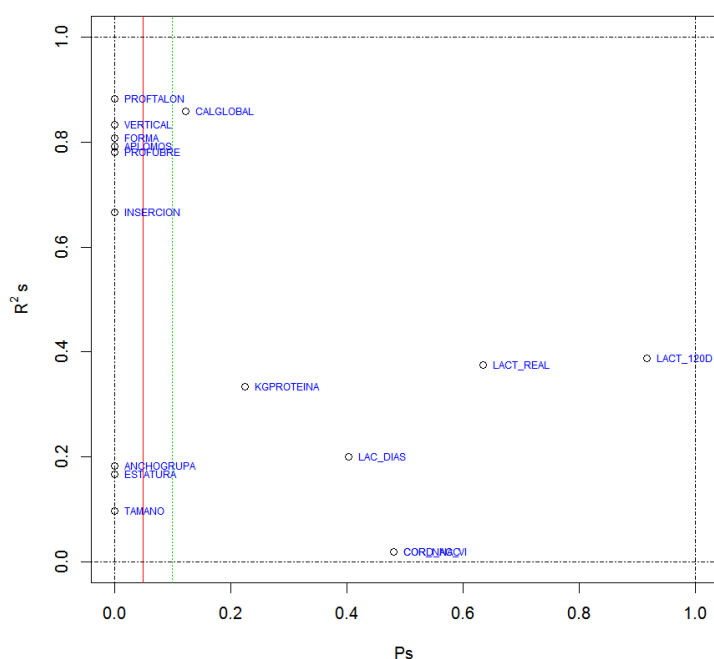


Figura 100: Resultados de la asociación del número de copias con los caracteres de morfología y lactación. Gráfico de validación de resultados

En el eje de abscisas se muestra la probabilidad P de que el resultado haya sido obtenido por azar. En el eje de ordenadas se representa el valor R^2 del modelo. La línea roja vertical delimita el valor de tolerancia admitido del 0.05. Los valores a la derecha de esta línea se consideran no significativos. La línea punteada verde vertical marca un valor de probabilidad de error del 10% y las líneas punteadas azules limitan los valores posibles.

Se aprecia claramente que el modelado de las variables significativas de morfología de la ubre es mucho mejor que el de anchura de la grupa, estatura y tamaño.

4.5.5 Relación cualitativa del número de copias con datos morfológicos.

Se ha encontrado asociación entre los niveles más representados de verticalidad de los pezones y ancho de la grupa. También mantienen la significación estadística algunos niveles de profundidad de la ubre, inserción de la ubre, forma de la ubre, aplomos, profundidad del talón y calificación global.

El número de componentes principales para este conjunto de datos es de 8. Al aplicar la corrección de Bonferroni para test múltiples, el nivel de significación admitido queda en el 0.00625.

En la siguiente tabla se muestra la probabilidad de encontrar, por azar, los valores obtenidos para todos los caracteres de morfología y lactación hasta el nivel 12. Se imprimen en rojo aquellas probabilidades que están por debajo del valor umbral de 0,625% y, por tanto, son significativas.

	NC3	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10	NC11	NC12
CORD_NAC	5,65E-01	5,61E-01	5,96E-01	5,96E-01	6,48E-01	6,38E-01	5,47E-01	3,37E-01	6,19E-01	4,80E-01
COR_NAC_VI	5,65E-01	5,61E-01	5,96E-01	5,96E-01	6,48E-01	6,38E-01	5,47E-01	3,37E-01	6,19E-01	4,80E-01
KGPROTEINA	1,73E-01	2,07E-02	2,06E-02	2,17E-02	1,29E-02	3,96E-01	1,69E-02	2,57E-01	3,43E-01	5,64E-01
LACT_REAL	2,06E-01	1,13E-01	1,48E-01	8,70E-02	1,72E-02	7,01E-01	6,49E-03	7,89E-01	9,59E-02	1,46E-01
LACT_120D	2,10E-01	5,83E-02	8,61E-02	5,95E-02	1,94E-02	7,51E-01	5,97E-03	9,22E-01	9,37E-02	1,96E-01
LAC_DIAS	9,66E-01	6,20E-01	4,61E-01	6,80E-01	9,30E-01	4,29E-01	3,64E-01	3,25E-01	7,08E-02	2,07E-01
PROFUBRE	1,63E-02	1,18E-01	3,60E-02	4,81E-01	6,12E-03	1,04E-01	5,92E-01	1,92E-01	1,53E-02	1,37E-03
INSERCIÓN	1,80E-02	8,14E-02	1,05E-02	7,19E-04	1,00E+00	5,58E-02	3,23E-02	2,93E-03	1,00E+00	2,74E-02
VERTICAL	9,79E-01	1,28E-07	1,60E-05	1,64E-09	5,42E-03	4,56E-08	4,58E-14	2,82E-11	1,15E-16	5,30E-27
TAMANO	3,40E-02	2,03E-02	1,65E-02	4,92E-02	3,23E-02	5,05E-02	2,58E-02	2,15E-02	1,61E-01	2,35E-02
FORMA	3,00E-04	9,44E-01	6,42E-01	7,03E-01	6,07E-02	5,72E-01	6,21E-07	9,53E-01	3,95E-11	4,33E-13
ESTATURA	6,57E-01	8,25E-01	9,56E-01	8,16E-01	7,27E-01	7,17E-01	7,41E-01	6,40E-01	8,57E-01	8,35E-01
ANCHOGROUPA	9,81E-11	3,81E-09	7,53E-09	1,80E-08	6,82E-03	7,02E-14	9,87E-10	8,44E-07	1,67E-02	1,00E+00
APLOMOS	2,55E-02	5,65E-02	2,40E-01	7,50E-02	1,00E+00	2,74E-03	1,20E-01	1,79E-03	6,32E-08	3,21E-04
PROFTALON	9,12E-02	3,89E-01	2,25E-01	8,25E-02	8,14E-03	1,80E-01	1,30E-01	1,60E-01	4,37E-04	5,64E-01
CALGLOBAL	1,94E-01	5,77E-01	4,84E-01	3,29E-01	2,41E-02	1,70E-01	3,94E-01	1,78E-01	3,95E-11	7,74E-06

Tabla 52: Valor P de la relación entre el número de copias y cada carácter morfológico.

En cada fila se recogen el valor de probabilidad para cada uno de los caracteres de producción (negrita). Las columnas corresponden con los 10 primeros niveles del número de copias (NC). Se resaltan en rojo los valores que tienen una probabilidad de error inferior al 0,625%.

Puede comprobarse que los caracteres relacionados con la calificación morfológica de la ubre presentan asociación con el estudiado. Esta relación es especialmente evidente en los caracteres de verticalidad de los pezones y ancho de la grupa, donde los niveles mayoritarios son claramente significativos.

A diferencia del modelo cuantitativo, estatura no muestra ninguna asociación. Aunque muchos de los valores de tamaño tienen una probabilidad inferior al 5%, ninguno de ellos pasa el test de Bonferroni. Aplomos y profundidad del talón tienen significación en algunos niveles del número de copias. Sin embargo, estos niveles representan a cantidades minoritarias de la muestra estudiada.

El coeficiente de correlación indica que el ajuste de los modelos a los diferentes caracteres es muy variable. Se recoge en la Tabla 53, junto con la fórmula optimizada para cada modelo:

	R^2	Modelo elegido
CORD_NAC	0,02743409	CORD_NAC ~ NC + NUM_PARTO
COR_NAC_VI	0,02743409	COR_NAC_VI ~ NC + NUM_PARTO
KGPROTEINA	0,33386677	KGPROTEINA ~ NC + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + NUM_PADRE + NUM_MADRE
LACT_REAL	0,38071865	LACT_REAL ~ NC + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
LACT_120D	0,39117948	LACT_120D ~ NC + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
LAC_DIAS	0,20370746	LAC_DIAS ~ NC + NUM_PARTO + EDAD_PARTO_MESES + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
PROFUBRE	0,82803084	NC + CALIFICADOR + NUM_MADRE
INSERCIÓN	0,7527419	INSERCIÓN ~ NC + NUM_MADRE
VERTICAL	0,85269792	VERTICAL ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
TAMANO	0,14956794	TAMANO ~ NC + NUM_PARTO + CALIFICADOR + NUM_PADRE
FORMA	0,81859086	FORMA ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
ESTATURA	0,09539981	ESTATURA ~ NC + NUM_PADRE
ANCHOGRUPA	0,20503048	ANCHOGRUPA ~ NC + CALIFICADOR + NUM_MADRE
APLOMOS	0,77464848	APLOMOS ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
PROFTALON	0,89332164	PROFTALON ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE
CALGLOBAL	0,85912429	CALGLOBAL ~ NC + CALIFICADOR + NUM_PADRE + NUM_MADRE

Tabla 53: Coeficiente de correlación y modelos para carácter morfológicos.

Para cada carácter morfológico (negrita) se muestra el coeficiente de correlación (R^2) y el modelo de análisis estadístico (Modelo elegido).

El modelo prácticamente no se ajusta a las variables de prolificidad (explica el 2% de la variabilidad). Explica menos del 50% de la variabilidad de las variables dependientes “Kg de proteína”, “lactación real”, “lactación a 120 días”, “días en lactación”, “estatura” y “ancho de la grupa”. El ajuste mejora notablemente para los caracteres morfológicos profundidad de la ubre, inserción de los pezones, verticalidad de los pezones, forma, aplomos, profundidad del talón y calificación global.

Los modelos ajustan bastante bien las variables relacionadas con la forma de la ubre, sin embargo son menos adecuados para explicar el comportamiento de otras variables morfológicas como el tamaño, estatura y ancho de la grupa. Como es de esperar, el ajuste también es bajo para las variables de lactación y de prolificidad.

En la siguiente tabla se muestra el efecto de aquellos niveles que han resultado significativos:

	NC3	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10	NC11	NC12
CORD_NAC										
COR_NAC_VI										
KGPROTEINA										
LACT_REAL										
LACT_120D										
LAC_DIAS										
PROFUBRE										
INSERCIÓN				-1,8744				-1,9561		
VERTICAL		-1,9874	-1,6171	-2,2903	-1,0000	-2,3022	-3,2903	-2,9874	-5,3029	-6,3029
TAMANO										
FORMA	2,5391						-3,2143		-6,2534	-6,2534
ESTATURA										
ANCHOGRUPA	-2,7339	-2,2631	-2,2173	-2,1816	-1,0000	-3,2402	-2,6167	-2,2631		
APLOMOS						1,8482			-5,0614	-3,0614
PROFTALON									2,3511	
CALGLOBAL									-5,1981	-3,1981

Tabla 54: Efectos del número de copias del gen GH en los distintos caracteres morfológicos.

Sólo se muestran aquellos resultados cuya probabilidad de error es inferior al 5%.

Las variables que más claramente están relacionadas con el número de copias de la hormona de crecimiento son verticalidad de los pezones y ancho de la grupa. Las otras

variables que muestran resultados significativos lo hacen de forma débil, en categorías que están poco representadas y es razonable pensar que su significación se deba a simple azar.

La calificación de la verticalidad de los pezones parece disminuir con el incremento del número de copias.

4.6 Base de datos de experimentos.

El objetivo de este capítulo es la creación de una herramienta que permita gestionar los datos de los experimentos utilizados para la elaboración de esta tesis. Se pretende que esta herramienta supere los problemas que para este cometido tiene el cuaderno de laboratorio.

Para lograrlo se decidió crear una base de datos relacional que cumpla los siguientes requerimientos:

- Permitir almacenar y consultar los datos de las muestra empleadas en los experimentos.
- Permitir almacenar y consultar los resultados de los experimentos.
- Ser fácil de utilizar y ser lo más intuitiva posible.
- Evitar redundancias. El dato introducido en una tabla estará disponible para el resto de la base de datos. El usuario no debe tener que introducir el mismo dato en varias tablas distintas.
- Validar, en lo posible, la información introducida e informar al usuario cuando haya motivos para creer que alguno de los datos no es coherente.
- Contener los informes y consultas de datos más habituales y contar con un sistema sencillo para crear aquellas otras que se necesiten de forma puntual.
- Ser fácil de respaldar y compartir.
- Ser flexible: fácil de desarrollar y tener la potencialidad de adaptarse a las necesidades futuras del laboratorio.

Para el desarrollo del proyecto se utilizó el gestor de bases de datos Microsoft Access (Microsoft Corporation, 2015a).

La base de datos desarrollada para este trabajo está dividida en 2 ficheros. Uno contiene la interfaz gráfica de la aplicación y la mayoría del código de automatización. El otro contiene la base de datos en sí (tablas y relaciones). El nombre de este último es el mismo que el de la interfaz pero se le añade el sufijo “_bs”.

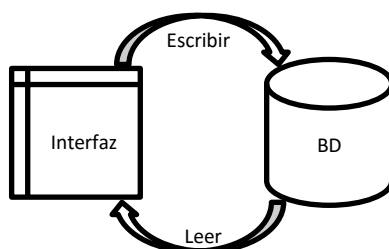


Figura 101: Arquitectura de la base de datos.

La interfaz lee los datos del archivo de base de datos (BD) y escribe las modificaciones en él. El archivo de base de datos contiene los datos y las relaciones entre ellos. El archivo de interfaz contiene los formularios y el código necesarios para facilitar al usuario la consulta y edición de los datos. La comunicación entre la interfaz y los datos se hace mediante vinculación de tablas.

La interfaz utiliza los datos del archivo de base de datos a través del mecanismo de tablas vinculadas. Esta arquitectura permite utilizar distintos tipos de interfaz

(programa de escritorio, web...) sobre un mismo conjunto de datos. Además, permite desarrollar y respaldar la interfaz y la base de datos por separado.

La base de datos está compuesta por un conjunto de tablas relacionadas. Así se pueden combinar fácilmente datos de tablas diferentes en una sola consulta. De este modo se evita que un mismo dato deba ser introducido en más de una tabla distinta. Las actualizaciones de datos se propagan en cascada a través del sistema de relaciones. Este diseño evita, además, los problemas de inconsistencia que se generarían si un mismo dato no estuviera sincronizado entre 2 tablas que lo registrasen.

4.6.1 Descripción de la base de datos de experimentos.

La base de datos es una estructura de tablas relacionadas que contiene toda la información relevante para documentar los experimentos realizados en el laboratorio. La información se ha dividido en tablas atendiendo a los siguientes criterios:

- Los datos de una misma tabla están relacionados entre sí de forma que describen una única realidad. A esta realidad se le puede asignar un código de identificación único. Cada dato de la tabla puede considerarse como un adjetivo que se aplica al sustantivo identificado por el código único. Por ejemplo, aquellos datos que describen cada uno de los protocolos de PCR se han agrupado en la tabla “protocolos de PCR”. Las diferentes tablas se relacionan entre sí a través del código de identificación.
- Cada dato tendrá un lugar único en la base de datos. Si hiciese falta utilizarlo o modificarlo desde otra parte de la base de datos se deberá poder acceder a la ubicación que tenga asignada a través del sistema de relaciones. Se pretende con ello evitar duplicidades y fallos de sincronización de datos.
- Se han agrupado juntos aquellos datos que hacen referencia a cada tipo de experimento concreto. Algunos datos se han agrupado en tablas generales por ser comunes a varios tipos de experimentos. Por ejemplo, el código de identificación de un animal se puede utilizar para referirse a la muestra que se está procesando en tablas de experimentos de SSCP, de PCR, de secuenciación, ... Este código se almacena en la tabla de muestras que, a su vez, está relacionada con las tablas de los distintos tipos de experimentos.

En la Figura 102, pág. 145 se representa un esquema del diagrama de relaciones de la base de datos. Este esquema es una simplificación que sirve para registrar los grupos de tablas utilizados en la base de datos y cómo se relacionan entre sí. Así, existe un grupo de tablas que almacena datos generales para toda la aplicación y que está ampliamente relacionado con el resto de las tablas (Datos comunes). El resto de los grupos de tablas tienen funciones más específicas, especializadas en cada uno de los tipos de experimentos recogidos en la base de datos (PCR, SSCP, Secuenciación y SNPs).

No obstante, esta compartimentalización no es estricta y las tablas de un grupo pueden tener relaciones con otros grupos cuando así lo requiera el modelado del problema que se pretenda resolver. La correspondencia entre el esquema de la Figura 102 (pág. 145) y el mapa real de tablas de la base de datos, que se recoge en las páginas 148 y 149 (Figura 105 y Figura 106), se manifiesta comparando los colores de dicho esquema con los de la Figura 103, pág. 146 que contiene una versión coloreada del esquema real de la base de datos.

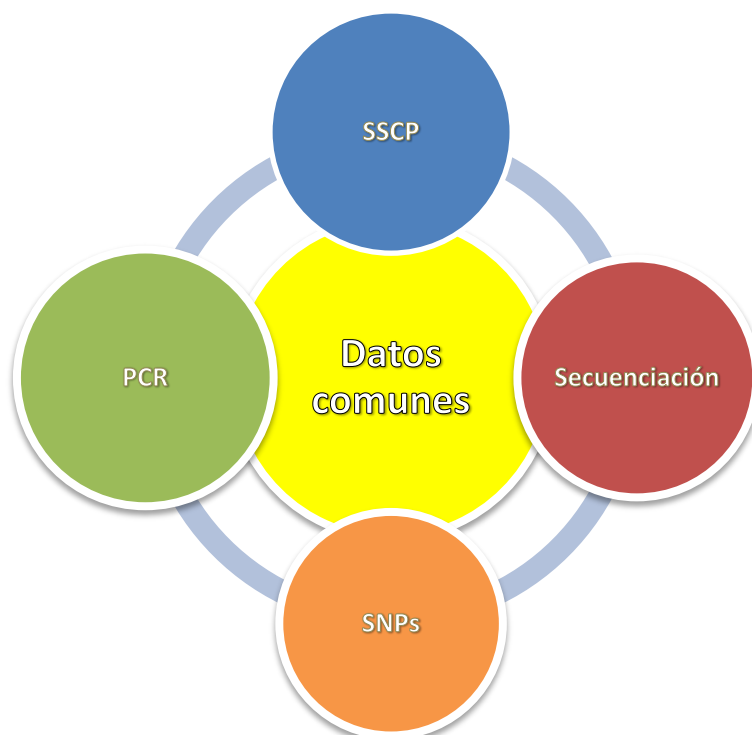


Figura 102: Esquema del diagrama de la base de datos.

Esta es una representación muy idealizada de la disposición de los grupos de tablas en el esquema de la base de datos. Todas las tablas están interrelacionadas. En la parte central se han agrupado las que contienen datos comunes a los experimentos (como día, fragmento, etc.) porque es más probable que tengan relaciones con las demás. Aun así, también hay relaciones directas entre tablas de los distintos grupos. El color de los grupos es similar al mostrado en los fondos de las tablas de la Figura 103, que representa cada tabla individualmente.

La base de datos se ha modelado para almacenar el contenido de un cuaderno de laboratorio. El cuaderno de laboratorio es una bitácora de los trabajos realizados y está ordenado por días. Por eso, la tabla de días ocupa una posición central en el esquema y mantiene relaciones con las tablas principales de la base de datos. Otras tablas comunes a todos los experimentos son aquellas que codifican los datos de las muestras (Especie, Raza, Cajas, Muestras, MuestrasDeLosProtocolos, Fragmentos y Genes).

En general, las tablas más importantes contienen mayor número de campos³³. En la parte izquierda del diagrama (Figura 104, pág. 147) se agrupan las tablas relacionadas con la PCR. Como esta técnica es tan importante y forma parte de los primeros pasos del resto de protocolos, se ha considerado necesario modelar completamente todos los parámetros relacionados con ella. Así se ha generado una tabla de 50 campos (Protocolos PCR). La tabla que modela los programas de PCR de los termocicladores tiene 29 campos (Programas PCR). Sin embargo, en esta última hay varios campos que sólo se utilizan cuando se introducen programas de PCR de 2 ciclos. Además, en el grupo de PCR también se incluyen las tablas Termocicladores, Tipos de Taq, Aditivos, Concentraciones y Cebadores.

En la Figura 104, pág. 147 se recoge el esquema de relaciones de la base de datos creada. Dado que es una figura muy grande se ha dividido en 2 para facilitar su lectura

³³ Un campo es una unidad atómica de información en una base de datos. El contenido de un campo se muestra en una celda de una tabla en la base de datos.

(Figura 105 y Figura 106, páginas 148 y 149). El diagrama de relaciones es un documento técnico difícil de comprender para quien no tenga conocimientos informáticos. Para facilitar el entendimiento del diagrama de la base de datos se ha creado la Figura 103, pág. 146. En ella, las tablas están coloreadas como en el esquema de la Figura 102, pág. 145. Cada grupo de tablas comparte un mismo fondo. Las tablas que modelan datos relacionados pertenecen al mismo grupo. Esta clasificación se recoge aquí con carácter informativo. No influye en el funcionamiento de la base de datos. Además, algunas tablas son difíciles de clasificar en un grupo u otro. Por ejemplo, la tabla “Genotipos” está clasificada como perteneciente al grupo “SSCP” pero podría estar clasificada perfectamente como perteneciente al grupo de “Secuenciación”.

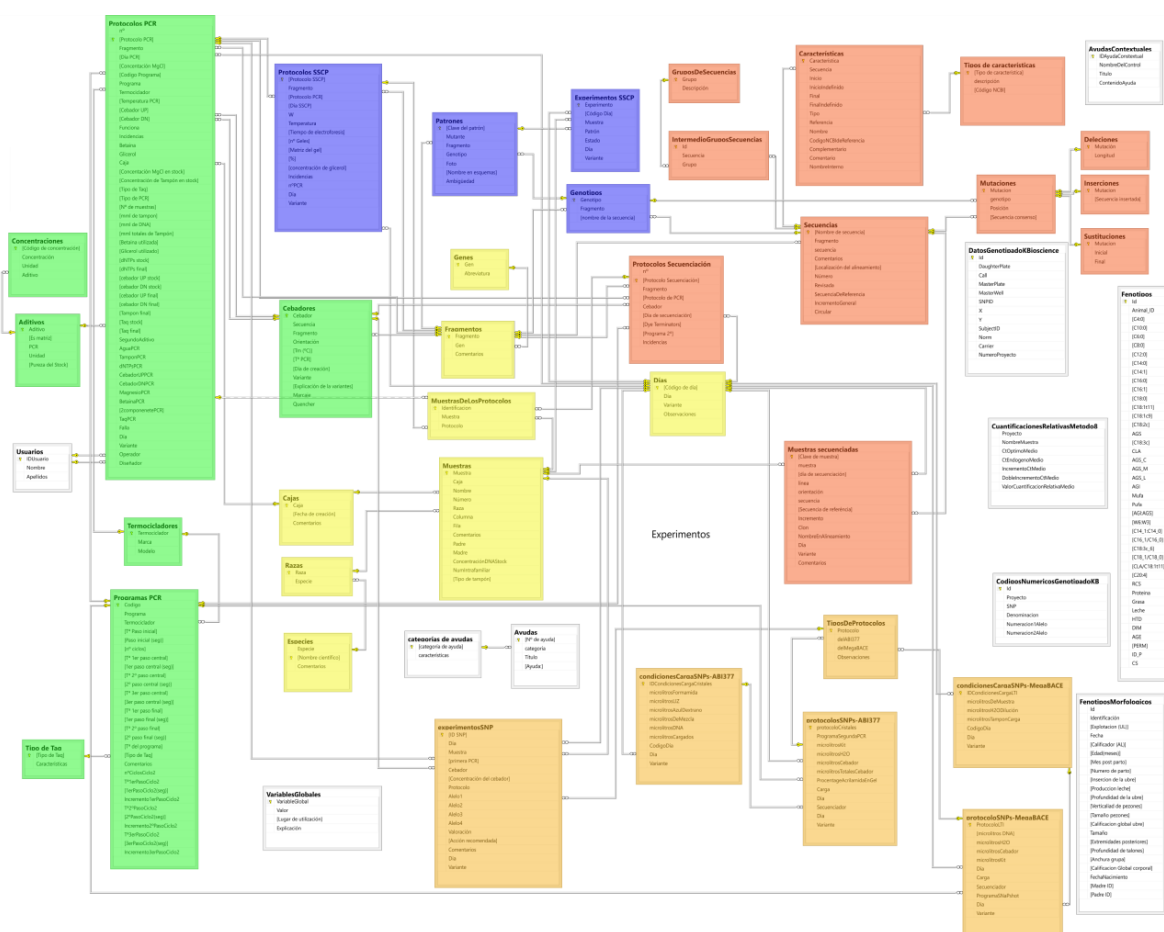


Figura 103: Diagrama de la base de datos, coloreado.

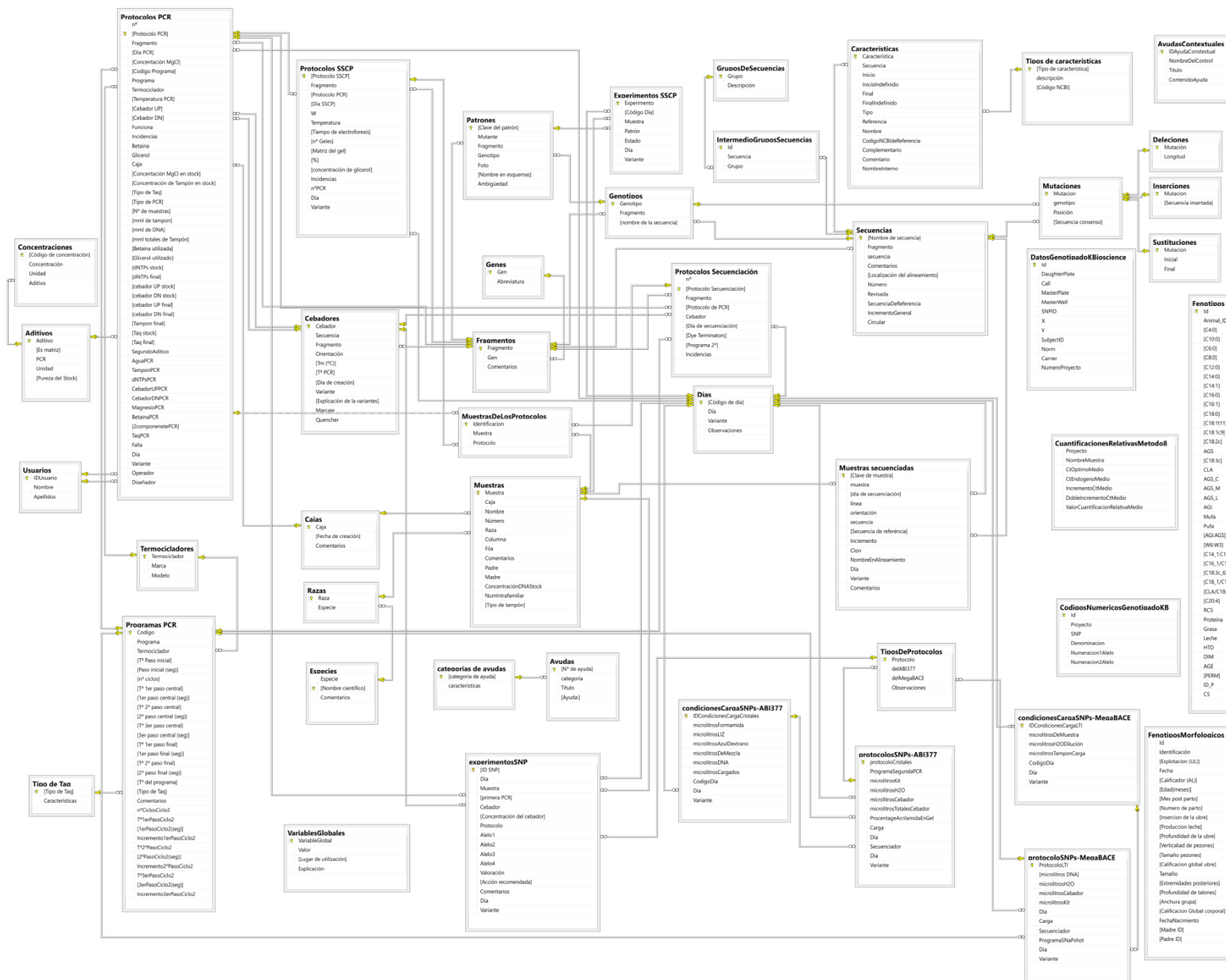
En el diagrama se dibujan sombreadas con igual color aquellas tablas que modelan datos relacionados. En color amarillo se pintan las tablas de datos generales, comunes para los demás experimentos; en verde las tablas que modelan los experimentos de PCR; en azul los de SSCP, en rojo los de secuenciación y en marrón los de SNPs. Las tablas accesorias no están coloreadas.

El nombre de la tabla de muestra en **negrita** en el título.

La llave amarilla al lado de un campo indica que ese campo es la clave primaria de la tabla.

Las relaciones entre tablas se representan por una línea que las une. Si la clave primaria está implicada en la relación, el extremo de la línea muestra el icono de la llave amarilla. En el otro extremo suele mostrarse el símbolo “infinito” (∞) esto indica una relación 1 a varios.

Esta imagen se muestra ampliada en las 2 páginas siguientes, para facilitar su lectura.



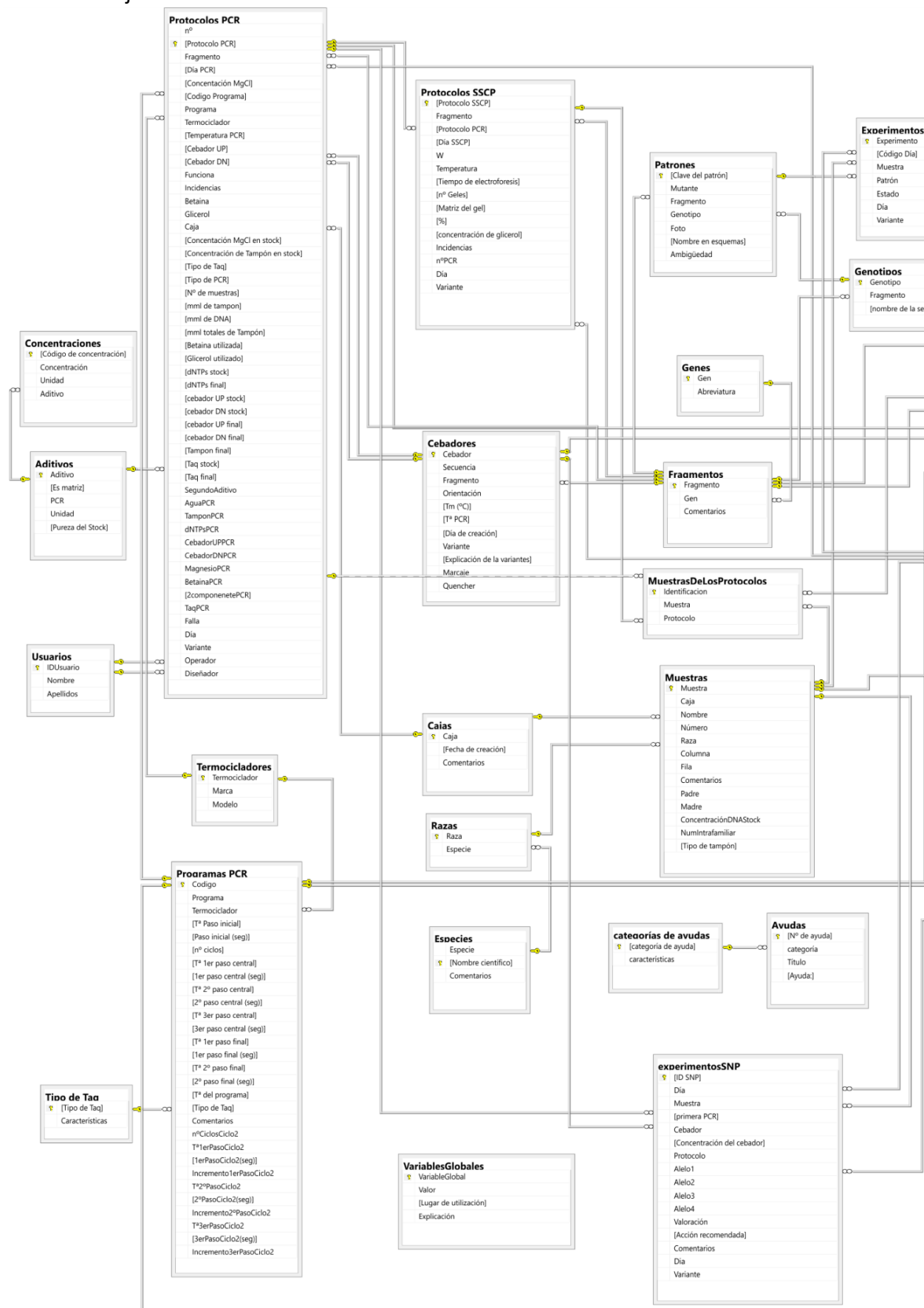


Figura 105: Mitad izquierda del diagrama de la base de datos.

Para descripción ver la Figura 104, pág. 147

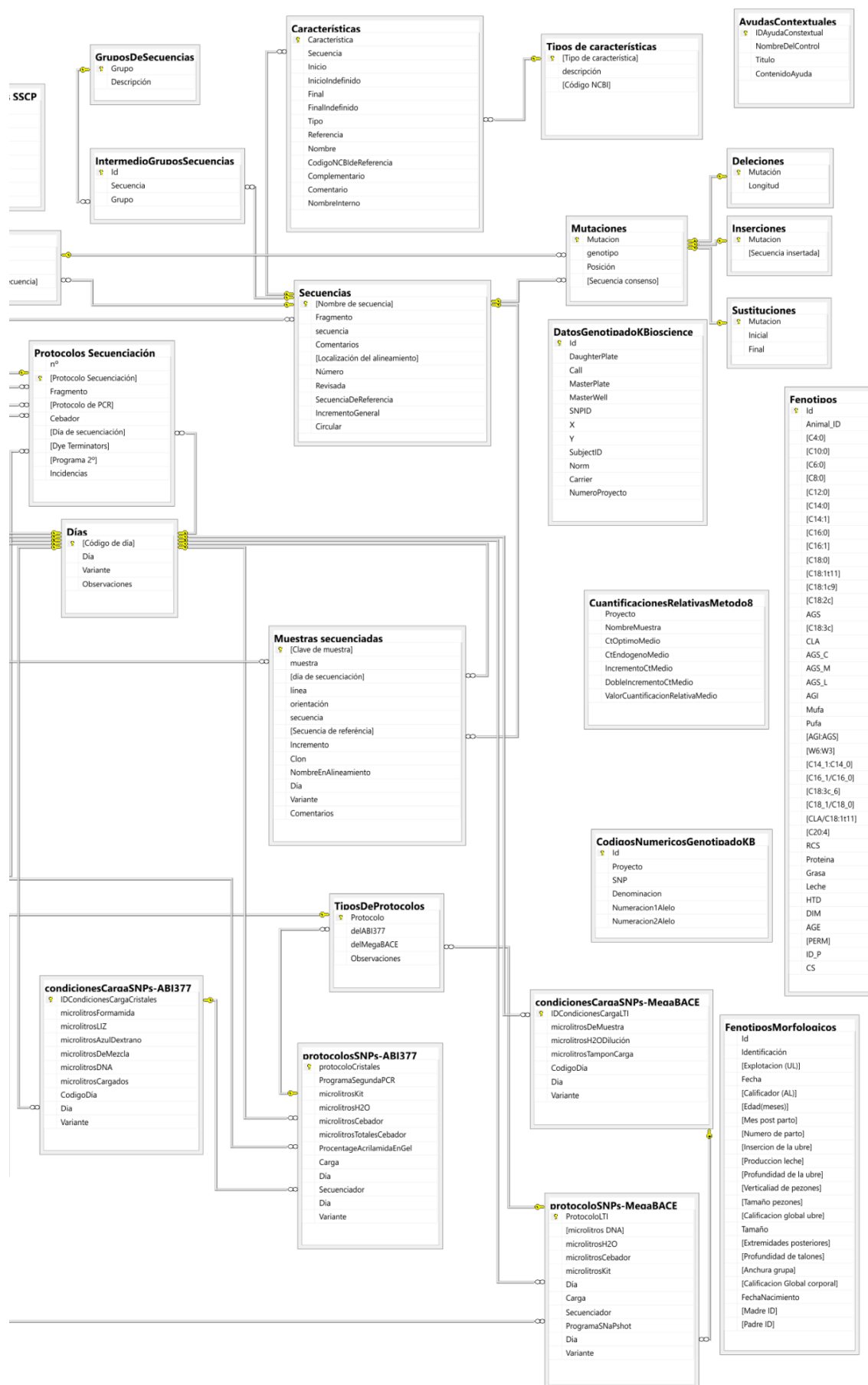


Figura 106: Mitad derecha del diagrama de la base de datos.

Para descripción ver la Figura 104, pág. 147

El esquema de la base de datos indica las posiciones en que se sitúan cada uno de los elementos y la forma en que se relacionan entre sí. A pesar de haber sido diseñada con la idea de ser lo más simple posible, la cantidad y variedad de datos recogidos ha resultado en una base de datos bastante compleja.

Sin embargo, esta complejidad en el esquema de relaciones no refleja la complejidad real del programa pues una gran carga de la automatización se ha implementado en la interfaz. Así, cada una de estas tablas, o varias a la vez, es manipulada por formularios, consultas e informes que permiten introducir y acceder a la información de la manera más conveniente.

Los formularios han sido dotados de controles y se han programado rutinas para asegurar la integridad de los datos, evitar la introducción de errores, detectar errores que ya han sido los introducidos y simplificar, en la medida de lo posible, el trabajo al usuario final del programa.

La cantidad y variedad de formularios, consultas e informes generados es amplísima. Para consultar la función y pormenores de cada uno se puede recurrir al archivo de ayuda de la base de datos. Para su consulta, se ha incluido una copia de dicho archivo en el Anexo I: Ayuda de la Base de Datos de Experimentos (pág. 199). Particularidades de la base de datos.

En esta sección se expondrán algunas de las particularidades más notables de la base de datos de experimentos. Son funcionalidades implementadas en la base de datos que resuelven problemas particulares o aportan un avance significativo respecto a otros sistemas disponibles.

4.6.1.1 El problema de los formatos.

Los laboratorios de investigación están dotados de instrumental de vanguardia. Cuanto más moderno es un aparato, más sistemas electrónicos suele incorporar. La información, procesada por estos sistemas, se almacena en archivos informáticos. El formato de estos archivos es variopinto. Los fabricantes de los aparatos pueden optar por almacenar la información en formatos estandarizados, que estén reglados internacionalmente, y para los cuales haya multitud de programas que los puedan interpretar. Sin embargo, esta estrategia no es la más habitual porque requiere el paso adicional de desarrollo que consiste en asegurar el cumplimiento del estándar y esto encarece el producto. Además, la política comercial de algunas empresas tiende a crear formatos propietarios para dificultar la utilización de los datos de sus productos con software de la competencia. Es habitual que cada aparato produzca sus resultados en un formato propietario. No es extraño que el único programa capaz de extraer completamente la información de un archivo sea el del fabricante del aparato que lo genera. En ocasiones la licencia de este software puede ser muy cara y/o estar restringida su utilización a un número discreto de ordenadores.

Cuando se diseña un sistema informático de laboratorio que pretende centralizar toda la información y hacerla disponible al usuario debe tenerse en cuenta el problema de la disparidad de formatos en los que se pueden presentar los datos. La página de la Wikipedia que recoge los principales formatos de archivo para datos científicos (Wikipedia, 2015). lista 115 formatos biológicos y 22 formatos químicos Las estrategias para abordar este problema pueden ser:

- Almacenar el archivo producido por el aparato en la base de datos y abrirlo con visualizadores universales. Estos son programas que pueden interpretar una gran cantidad de formatos de datos. Hay varios visualizadores disponibles para los formatos de ficheros de uso general en informática (Sourceforge, 2015), es más difícil encontrarlos para los formatos de fichero científicos o específicos de aparatos (Fountaine, 2014; Microsoft Corporation, 2011). Dada la escasez de visualizadores universales para formatos científicos, la única forma factible de seguir esta estrategia es contratar a una empresa de software que cree desarrollos a medida capaces de manipular los archivos producidos por los instrumentos del laboratorio. Esta estrategia, además de ser potencialmente cara, no soluciona el problema de la incorporación de nuevos aparatos o de una posible actualización del software de los existentes que modifique el formato de los archivos producidos. Además, dependiendo de lo críptico que sea el formato, puede resultar imposible el desarrollo de un visualizador adecuado.
- Extraer la información relevante del archivo generado por el aparato y almacenarla en la base de datos. Esta estrategia requiere la identificación de la información relevante para cada tipo de experimento. Tiene la ventaja de que puede unificar datos provenientes de distintos tipos de aparatos. Introduce un paso intermedio, de extracción de resultados, que puede incrementar la cantidad de errores en los datos. Además, se debe establecer correctamente la información a almacenar en la base de datos para no perder la importante.

En este trabajo se ha desarrollado una estrategia híbrida, más sofisticada. Consiste en extraer la información relevante para cada tipo de experimento y almacenarla en la base de datos. En vez de almacenar los archivos de resultados en la base de datos, se guarda un enlace a la dirección del sistema de ficheros donde residen estos archivos. Con esto se consigue no cargar en la base de datos información superflua, que incrementaría su tamaño y disminuiría el rendimiento, y seguir disponiendo de un acceso a los archivos de datos originales para su revisión. La visualización de los archivos no dependería de la base de datos sino del sistema operativo del ordenador cliente. El ordenador en el que resida la base de datos podrá visualizar los datos brutos de cada aparato si tiene instalado el programa del fabricante o un visualizador compatible. En caso contrario sólo podrá visualizar los datos extraídos e introducidos en la base de datos.

Esta estrategia permite almacenar datos brutos en ubicaciones compartidas en la red local del laboratorio de forma que sea accesible desde cualquier ordenador y facilitando el establecimiento de una política de respaldo independiente entre los datos brutos y la base de datos. Dado que los enlaces a los datos brutos pueden ser relativos, se pueden crear carpetas de resultados en subdirectorios para copiarlos o moverlos junto con la base de datos. Es, por tanto, una arquitectura muy flexible, que puede ser adaptada a casi cualquier laboratorio con independencia de los aparatos instalados, el software de que se disponga, sus licencias de uso o las políticas de respaldo. Además, minimiza la cantidad de recursos de almacenamiento exigibles y los requerimientos del ordenador en que se ejecute la aplicación.

4.6.1.2 Los protocolos de PCR.

Cuando se inició este trabajo la información de las secuencias de los genes estudiados era muy escasa. En muchos casos sólo se disponía de la información de la secuencia de ARNm, o de secuencias muy próximas a los exones. Tampoco había información sobre los cebadores y condiciones de PCR con la que amplificar los fragmentos de interés. Fue necesario realizar innumerables PCRs de optimización para establecer las condiciones adecuadas para la amplificación de los fragmentos génicos de interés.

Cada placa de optimización contiene las condiciones de PCR que se están testando, cada una de ellas repetida en un número limitado de pocillos. Las condiciones suelen ser variaciones de un mismo protocolo en las que se cambia, secuencialmente, uno de los parámetros de la PCR con objeto de identificar cuál es el óptimo. Por lo tanto, en una sola placa hay muchos protocolos de PCR (por ejemplo, si cada condición se replica en 3 muestras, en una placa de 96 pocillos se pueden testar 32 protocolos de PCR distintos). Incluso cada una de estas placas puede ser amplificada a una temperatura diferente (si las muestras de 3 placas como la anterior fuesen amplificadas a 50, 55 y 60 °C se obtendrían 96 protocolos de PCR en unas pocas horas) generando una gran cantidad de condiciones de PCR que están estrechamente relacionadas (sólo cambian en un parámetro con respecto al anterior). Cada una de estas condiciones de PCR es denominada en la base de datos “Protocolo de PCR”. Como se ha descrito anteriormente, la tabla de protocolos de PCR almacena 50 datos para cada uno. En el ejemplo mostrado sería necesario cumplimentar 4.800 campos (96 x 50) para registrar completamente la información de la optimización de la PCR realizada con sólo 3 placas (y no se ha tenido en cuenta la asignación de muestras a cada protocolo). El registro de la información sería mucho más laborioso que la propia realización del experimento.

El formulario de introducción de Protocolos de PCR está dotado una serie de controles que permite simplificar al máximo este proceso:



Figura 107: Botones de clonación de protocolos de PCR..

Estos son los 3 botones dispuestos para duplicar la información de un registro en otro derivado. “CopiarValores” copia la información relevante de un protocolo; “Siguiete” (►) cambia de registro y “PegarValores” rellena los datos del nuevo registro con los datos copiados del primero, modificando los parámetros necesarios.

Una vez establecidas las condiciones para el primer protocolo de la serie basta pulsar en “Copiar Valores”, cambiar al registro siguiente y “Pegar Valores”. La programación interna del formulario copia los valores relevantes en el nuevo registro. Se duplican los parámetros de la PCR del registro copiado pero se incrementa el número de orden del experimento (Variante). Ahora se puede modificar cualquier parámetro de PCR que cambie con respecto al protocolo anterior y repetir el proceso. Así, en el anterior ejemplo, se podrían haber rellenado automáticamente los 4.800 campos con tan sólo 270 pulsaciones (96 protocolos x 4 pulsaciones por protocolo (1: “Copiar Valores”; 2: “Siguiete”; 3: “Pegar Valores”; 4: la modificación del parámetro)).

Además, esta arquitectura es también útil para repetir las condiciones de PCR de un protocolo que funciona en momentos sucesivos. Al pegar los valores en el nuevo protocolo se recalculan los componentes de la PCR para la cantidad de muestras deseadas. Como cada modificación en el número de muestras provoca la actualización

inmediata de las cantidades de los componentes de la PCR resulta muy fácil y rápido crear nuevas PCRs basadas en condiciones anteriores.

4.6.1.3 Almacenamiento alineado de secuencias.

Una secuencia génica es una sucesión de códigos de nucleótidos que condensa en sí la historia evolutiva de ese fragmento de ADN. Es, por tanto, una estructura de información muy compacta. Sin embargo el conocimiento de la secuencia de ADN no aporta información biológica relevante sobre la función, utilidad o importancia de cada una de las partes de dicha secuencia. La información relevante de una secuencia se recoge en su tabla de características. La información que los distintos estudios recopilan sobre cada secuencia se convierte en características que se suben a la bases de datos de internet para su publicación y compartición con el resto de la comunidad científica.

Para el establecimiento de la función de una parte de una secuencia es útil el alineamiento de la secuencia desconocida con secuencias ya anotadas. El alineamiento de múltiples secuencias es una operación común en el análisis de secuencias biológicas. Sin embargo, es un proceso intenso y caro que requiere un tremendo poder de computación, tiempo y recursos (Nguyen, 2012). Los algoritmos de alineamiento son piezas de software muy complejas cuyos resultados dependen de los parámetros con los que se hayan lanzado (matriz de sustituciones, penalización de los gaps, ...). Una vez alineadas las secuencias se pueden establecer las características de la nueva secuencia por comparación con las homólogas de aquellas otras secuencias que ya están anotadas y alinean con la desconocida.

Hasta donde conocemos no existe ninguna base de datos que almacene la secuencias alineadas, junto con sus características. Existen repositorios de secuencias que admiten el envío de alineamientos de secuencias (Benson et al., 2000; Lombard et al., 2002) pero las secuencias que componen el alineamiento no tienen entidad individual. Se usan para confirmar la conservación de la secuencia consenso del alineamiento. El objetivo de estas bases de datos es almacenar secuencias de nucleótidos. No tienen en cuenta otra información de las muestras individuales que se secuenciaron para obtener la secuencia consenso.

En este trabajo, se ha creado una base de datos que permite el almacenamiento de secuencias alineadas junto con sus características y que está relacionada con información adicional sobre las muestras secuenciada (fenotipos de SSCP, animal del que provienen, raza, producción de leche, de grasa, etc.). El concepto es totalmente distinto al de las bases de datos vistas anteriormente. Estas almacenan secuencias anotadas que pueden ser alineadas con otras secuencias desconocidas. En nuestra base de datos se almacena el producto de este alineamiento. En vez de almacenar sólo la secuencia de nucleótidos se incorporan, también, los gaps necesarios para que alinee con su secuencia de referencia. Cada muestra secuenciada se asocia con una secuencia de referencia, con la que alinea.

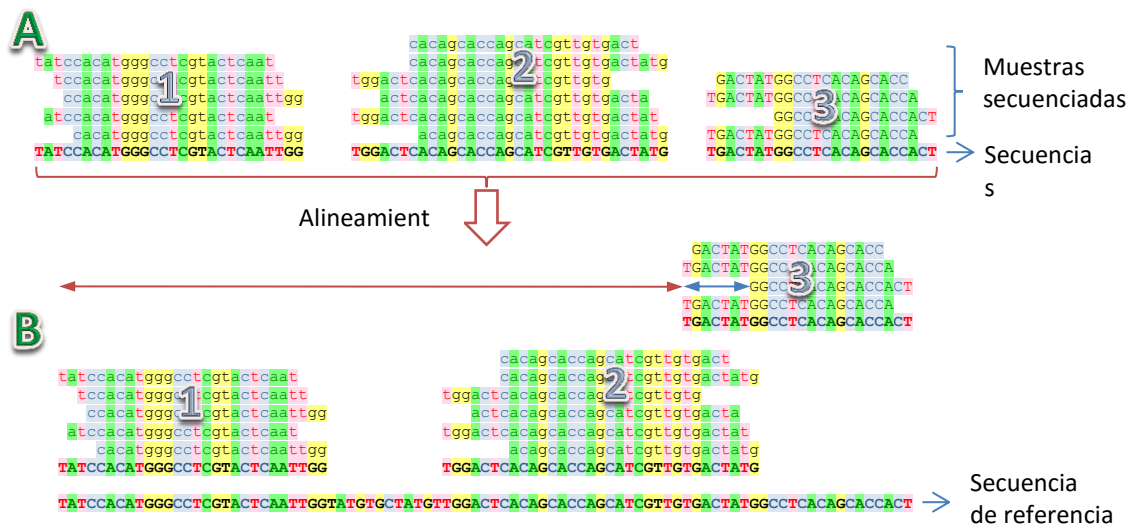


Figura 108: Esquema del almacenamiento de secuencias en la base de datos.

En este ejemplo se esquematiza cómo se almacenarían 15 muestras secuenciadas, pertenecientes a 3 fragmentos de 1 gen, en la base de datos. (A) Cada muestra secuenciada se alinea con las demás muestras de su mismo fragmento obteniendo las secuencias consenso de cada fragmento. (B) Estos alineamientos, a su vez, se alinean con una secuencia de referencia.

Para la tercera muestra del alineamiento 3 se muestra ilustran los conceptos de incremento (flecha de doble punta azul) e incremento general (flecha de doble punta roja).

Esta arquitectura es mucho más compleja de mantener que el simple almacenamiento de las secuencias porque es mucho más sensible a errores. Ha sido necesario desarrollar varias herramientas adicionales para manejar secuencias alineadas. Por ejemplo, al hacer una inserción en un alineamiento hay que desplazar las características aguas abajo del punto de inserción tantas posiciones como tenga la longitud de la secuencia de nucleótidos insertada. Lo mismo ocurre con una delección, pero aquí es posible que algunas características deban ser eliminadas por estar comprendidas dentro de la zona delecionada. También se han creado rutinas para realizar modificaciones puntuales en todas las secuencias de un alineamiento.

A pesar de que el sistema de almacenamiento de secuencias alineadas es más delicado se ha optado por él debido a las cualidades únicas que aporta a la base de datos:

- Es posible importar masivamente características de secuencias anotadas a otras desconocidas. Se dispone de rutinas que pueden extraer las características de una secuencia de referencia y duplicarlas en cualquier otra secuencia con el único requisito de saber los límites de la extracción y la posición relativa que ocupa en dicha secuencia.
- Es posible generar informes con el alineamiento de las secuencias almacenado en la base de datos.
- Se puede reposicionar fácilmente el alineamiento para alinearlo, a su vez, a una secuencia de referencia global de forma que se puede crear una jerarquía como sigue: varias muestras secuenciadas se alinean para formar la secuencia consenso de un fragmento y varias secuencias consenso se alinean para formar la secuencia del gen de interés.
- Se establece un sistema de referencia único para identificar la posición de cada uno de los nucleótidos de una secuencia. Esto permite consultarlos individualmente y es una pieza clave del sistema de genotipado implementado.

4.6.1.4 El sistema de genotipado.

El SSCP es una prueba bioquímica que permite establecer una relación entre el patrón de bandas que se produce en la electroforesis y el genotipo del animal porque la diferente composición de la secuencia de nucleótidos modifica el plegamiento de la cadena desnaturalizada y, por tanto, su migración.

A las muestras analizadas por SSCP se les ha asignado un patrón de migración. La secuenciación de varios representantes de cada uno de los patrones informa de la secuencia de nucleótidos que genera dicho patrón. Con ello, se puede establecer el genotipo de cada uno de los patrones y, por consiguiente, asignar ese genotipo a cada una de las muestras que genera un patrón.

La cadena de sucesos que lleva a la asignación de un genotipo a una muestra analizada por SSCP presenta multitud de puntos donde pueden producirse errores que lleven a imposibilitar el objetivo final, que es el genotipado, o a distorsionar los resultados.

El proceso consiste en realizar el SSCP a cada una de las muestras, determinar los distintos patrones de SSCP presentes en cada fragmento, secuenciar algunas muestras de cada patrón, determinar las mutaciones que producen los patrones encontrados y asignar esas mutaciones a todas las muestras que presentan el mismo patrón.

La base de datos está dotada de un mecanismo que permite realizar un genotipado automático de las muestras utilizando para ello la información recogida en cada uno de los apartados. Para poder genotipar una muestra es necesario registrar:

- Los datos de la muestra de ADN.
- Los experimentos de SSCP que se le realizan a esa muestra.
- El patrón de SSCP obtenido para cada fragmento.
- El genotipo asignado a cada uno de los patrones.
- Las mutaciones que presenta cada genotipo.

El diseño de la base de datos permite generar la tabla de genotipado que se desee pulsando en el botón “Tabla de mutaciones SSCP” (para más información ver Tabla de Mutaciones SSCP, pág. 296).

er), pag. 256).

		Fragmento ▾		Posición ▾		
		OXI-E2				
		1193	1254	1263	1333	1393
		+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Nombre ▾	Patrón ▾	SNP ▾	SNP ▾	SNP ▾	SNP ▾	SNP ▾
OXI-E2 54900	2OXI-E2	A	G	A	S	A
AC+7117	1OXI-E2	A	G	A	G	A
AE-804	1OXI-E2	A	G	A	G	A

Figura 109: Tabla de genotipado del fragmento OXI-E2.

En la tabla se muestra el genotipo de cada muestra en cada posición heterocigota del patrón de SSCP. El código de identificación del animal se recoge en el campo “Nombre”, el patrón de SSCP en el campo “Patrón”. El campo “Fragmento” permite filtrar la tabla para mostrar las posiciones del fragmento deseado. Posición es la coordenada (en pb) del nucleótido heterocigoto.

Los pasos cruciales del sistema de genotipado son la asignación de patrones de SSCP a las muestras y la asignación de genotipos a los patrones de SSCP.

La definición y asignación de patrones de SSCP se hace por reconocimiento ocular del patrón de bandas y, como las condiciones de migración no son siempre las mismas, requiere de la identificación visual y asignación manual de los patrones a las muestras. La distinción precisa de patrones similares requiere de la pericia y experiencia del

técnico que haga el estudio. Aun así, puede cometer errores en la determinación de los patrones más complicados. El mismo efecto puede producirse si al introducir los experimentos de SSCP en la base de datos se comete un error y se asigna un patrón equivocado. La detección de estos errores de forma manual puede ser muy complicada, pero la base de datos está dotada de consultas que pueden encontrarlos de forma muy simple: utilizando la consulta “Genotipado de patrones definitivo”.

Tipo ▾ Fragmento ▾						
Todas OXI-E2						
		Inicio ▾				
		1193	1254	1263	1333	1393
		+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Patrón ▾	Genotipo ▾	Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾
<input type="checkbox"/> 11OXI-E2	OXI-E2>AGAGM	A	G	A	G	M
<input type="checkbox"/> 12OXI-E2	OXI-E2>AGAGA	A	G	A	G	A

Figura 110: Genotipado de patrones definitivo.

Esta tabla muestra la asignación de bases que se hace a cada patrón teniendo en cuenta el genotipo que presenta. Los resultados se pueden filtrar por los siguientes campos:

- Tipo: tipo de característica génica que considerar para el genotipado (SNP o Inserción).
- Fragmento: Nombre del fragmento.
- Patrón: patrón de SSCP.
- Genotipo: Genotipo asignado al patrón de SSCP.
- Inicio: primera base de la característica (en el caso de SNPs coincide con su posición).

Esta consulta recorre todas la tablas de la base de datos implicadas en el sistema de genotipado siguiendo el esquema de relaciones para resumir todos los genotipos asignados a cada patrón. El resultado esperado es que un solo genotipo sea asignado a cada patrón. Cualquier muestra a la que se le haya asignado mal un patrón o un genotipo podría producir la modificación de esta tabla de forma que algunos de los patrones podrían tener más de un genotipo.

En caso de detectarse este problema resulta muy útil poder determinar cuáles son las muestras que lo causan. Para eso se puede utilizar la consulta “Genotipado de patrones”, que es parecida a la anterior, pero aporta información de las muestras que intervienen en la conformación de cada genotipo.

Tipo	Fragmento	Estado	Alineada	Revisada						
SNP	OXI-E2	B	Todas	Todas						
					Inicio					
					1193	1254	1263	1333	1393	
					+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
Patrón	Nombre	Muestra	MuestraSec		Sei	Sei	Sei	Sei	Sei	
10XI-E2	BD-8016	94	298	+	A	G	A	G		
			1210	+	A	G	A	G	A	
			1218	+				G		
	BR-5491	153	299	+	A	G	A	G		
			339	+		G	a	G	A	
	HI 224	217	356	+	A	G	A	G		
			386	+		G	A	G	A	
			1212	+	a	G	A	G	A	
			1215	+		G	A	G		
	M 2	196	338	+		g	A	G	A	
			355	+	A	G	A	G		
			385	+		G	A			
			1209	+	a	G	A	G	A	
			1216	+			A	G		
20XI-E2	54900	239	340	+		G	a	s	A	
			357	+	A	G	A	s		
			1211	+	a	G	A	s		

Figura 111: Genotipado de patrones.

Esta tabla dinámica muestra más información sobre el genotipado de los patrones. Para cada patrón, recoge el nombre del animal secuenciado, el número de la muestra de ADN, el número de la muestra secuenciada y el resultado de la secuenciación en los SNPs que definen su genotipo. Como los SNPs sólo ocupan una base, su posición equivale al inicio de la característica. La tabla se puede filtrar por tipo de característica, fragmento, estado del SSCP (Bien o Repetir), si la secuencia está alineada con la referencia y si el alineamiento está revisado.

En esta tabla es fácil identificar si una muestra no coincide con las demás y, en ese caso, se pueden revisar sus datos hasta detectar el error que lo provocó. Habitualmente, estos errores pueden ser:

- que el experimento de SSCP se haya asignado a una muestra equivocada,
- que el patrón de SSCP no esté bien determinado o sea ambiguo,
- que el genotipo no esté bien asignado al patrón de SSCP,
- que las muestras secuenciadas no estén bien alineadas con la secuencia consenso,
- que las características génicas no estén bien posicionadas.

La revisión de estos puntos puede hacerse fácilmente empleando el resto de formularios y consultas de la base de datos.

4.6.1.5 El algoritmo de traducción.

La base de datos cuenta con soporte completo para nucleótidos ambiguos (Cornish-Bowden, 1985), por eso las secuencias de nucleótidos pueden almacenarse con códigos de ambigüedad en la base de datos. El “navegador de secuencias” puede traducir las regiones específicas de la secuencia que se desee. La traducción es especialmente útil para evaluar el efecto de una mutación en una región codificante de un gen.

La traducción de una región que contiene códigos de ambigüedad no resulta en una traducción única secuencia aminoacídica. Dependiendo del tipo de ambigüedad, del marco de lectura y de la composición del resto de nucleótidos que forman el codón podrían obtenerse un número muy variable de posibles cadenas polipeptídicas. El

número de cadenas posibles aumenta exponencialmente al aumentar el número de codones afectados por ambigüedades y el número de posibles traducciones del codón. Es necesario un sistema de representación de las traducciones de la secuencias ambiguas que pueda abordar los problemas expuestos anteriormente. En este trabajo se ha definido un formato de presentación de todas las traducciones posibles para cada nucleótido ambiguo y que, además, mantiene alineada la traducción con la secuencia nucleotídica. El algoritmo que lo implementa puede presentar la secuencia de aminoácidos codificada tanto en código de 3 letras como de una sola. Para ello realiza los siguientes pasos:

- Divide la secuencia en codones atendiendo al marco de lectura especificado en el formulario.
- Si el codón tiene códigos de ambigüedad calcula todos los codones que pueden obtenerse con dichos códigos.
- Traduce cada codón según el código genético
- Presenta los resultados en 2 líneas de texto. En la superior se imprime la secuencia de nucleótidos. En la inferior se imprime la secuencia de aminoácidos. En código de 3 letras, cada letra del aminoácido se alinea con una de las bases del codón. En código de una letra, la traducción se alinea con la base central del codón. Si el codón contiene nucleótidos ambiguos, se crea una serie de traducciones de todos los codones posibles y se presenta entre paréntesis en la línea de la secuencia de aminoácidos. A su vez, la secuencia del codón que genera la traducción se incluye también entre paréntesis y los paréntesis se separan entre sí con guiones el número adecuado de posiciones para que alineen con los paréntesis de la secuencia de aminoácidos. De esta forma la secuencia resultante siempre se mantiene alineada con independencia de lo variable que sea la traducción de la ambigüedad o del número de ellas que haya.

Por ejemplo, dada la secuencia `aaaaaaayaaaaaaa` se obtienen estas traducciones:

```
AAAAAA (AYA---) AAAAAA | AAAAAA (AYA---) AAAAAA
LysLys (ThrIle) LysLys | K K ( T I ) K K
Código de 3 letras      Código de una letra
```

El código Y equivale a C o T. Los codones posibles son ACA o ATA, que se traducen a Thr o Ile. La representación de la traducción se corresponde con las 2 secuencias de aminoácidos:

```
LysLysThrLysLys
LysLysIleLysLys
```

Si se sustituye el nucleótido ambiguo Y por N, que equivale a las 4 bases se obtiene:

```
AAAAAA (---ANA-----) AAAAAA | AAAAAA (---ANA-----) AAAAAA
LysLys (LysThrArgIle) LysLys | K K ( K T R I ) K K
```

Si se encuentra más de un codón ambiguo se concatenan las zonas de ambigüedad , por ejemplo en la secuencia `aaaaaaayaaaaasra:`

```
AAAAAA (AYA---) AAA (---SRA-----)
LysLys (ThrIle) Lys (GlnArgGluGly)
```

En este caso, la representación equivale a las siguientes secuencias:

```
LysLysThrLysGln
LysLysThrLysArg
LysLysThrLysGlu
LysLysThrLysGly
LysLysIleLysGln
LysLysIleLysArg
LysLysIleLysGlu
LysLysIleLysGly
```

El caso más extremo es el codón NNN que codifica todas las combinaciones posibles. Sustituyendo el codón ambiguo del primer ejemplo por este otro, se obtiene:

```

AAAAAA (-----
LysLys (LysAsnLysAsnThrThrThrThrArgSerArgSerIleIleMetIleGlnHisGlnHisProProProProA
-----NNN-----
rgArgArgArgLeuLeuLeuLeuGluAspGluAspAlaAlaAlaAlaGlyGlyGlyGlyValValValVal * Tyr *
-----) AAAAAA
TyrSerSerSerSer * CysTrpCysLeuPheLeuPhe) LysLys

```

Además, dada una secuencia de nucleótidos, se puede pedir la traducción del marco de lectura 1, 2 ó 3.

Al programa también se le puede pedir exclusivamente la secuencia de aminoácidos, sin estar acompañada por la de nucleótidos.

DISCUSIÓN

5 Discusión.

Aunque ya se ha realizado una breve discusión de los resultados obtenidos en cada capítulo específico, es nuestro propósito en el presente capítulo hacer una discusión general de los resultados tomando una perspectiva más global de los mismos. Para ello, dividiremos la discusión en cuatro grandes apartados que engloban los diferentes aspectos de la tesis: (i) metodología de laboratorio, (ii) análisis de la variabilidad genética, (iii) análisis de asociación con caracteres productivos y (iv) elaboración de una base de datos de apoyo al trabajo laboratorial.

5.1 Metodología de Laboratorio.

En la presente Tesis doctoral se han utilizado como técnicas de laboratorio más relevantes la PCR como método general de trabajo con fragmentos específicos de ADN, el análisis SSCP como técnica general de búsqueda de variabilidad genética en algunos genes candidatos y la secuenciación como método de referencia para el análisis y la verificación de la variabilidad detectada mediante SSCP. A continuación indicaremos, de una manera breve, las principales consecuencias que pueden ser deducidas durante la fase de trabajo de laboratorio.

5.1.1 PCR.

La PCR es una técnica de uso generalizado y gran importancia. En nuestro caso ha sido la primera fase de los protocolos de análisis de variabilidad que constituye un objetivo del presente trabajo.

Como es bien conocido uno de los elementos críticos para poner a punto las reacciones de PCR es el diseño de cebadores apropiados, el ajuste de los componentes de la mezcla de reacción y de las temperaturas de cada paso de PCR. Aunque es una técnica muy robusta, la optimización de la PCR es problemática en el caso de secuencias de elevada composición en GC y para reacciones que implican fragmentos de más de 2000 bp de longitud. Es sabido que las regiones codificantes suelen presentar un contenido en pares GC superior al resto (Illingworth and Bird, 2009). La mayoría de los genes analizados en este estudio son secuencias exónicas y, por tanto, el problema de falta de eficacia de la PCR en estas secuencias se presentaba frecuentemente en el principio de estas regiones. En nuestra experiencia, el uso durante la PCR de determinados aditivos puede ser clave para amplificar de manera eficiente determinadas secuencias (Gene Link, 2015). La adición de betaína a las reacciones de PCR resultó en una mejora significativa en la amplificación de las secuencias problemáticas. Además, el empleo de betaína no afectó de forma negativa a prácticamente ningún otro aspecto clave de la PCR.

5.1.2 SSCP.

La técnica de análisis de SSCPs fue publicada en los años 80 del siglo XX como aproximación eficiente para localizar un alto porcentaje de mutantes (Orita et al., 1989). Es una técnica que se ha utilizado mucho en el análisis de los genomas en las especies en las que se tenía poca información ya que requiere poca información previa de la secuencia que se está estudiando.

Sin embargo, la precisión de sus resultados depende de la diferencia en conformación tridimensional de las cadenas estudiadas. Si analizamos alguno de los fragmentos estudiados en el presente estudio observamos que tienen una sensibilidad y especificidad limitadas (Figura 112, Figura 113 y Tabla 55). En dichas figuras puede verse como hay cambios de secuencia que originan patrones completamente diferentes (muy frecuente en polimorfismos de tipo “indel” (Figura 112) y otros cambios que tienen una interpretación mucho más compleja y que, en la mayoría de las ocasiones se relacionan con patrones de múltiples SNPs en las regiones analizadas (Figura 119).

En la Figura 112 se muestra el efecto de una inserción en el esquema de plegamiento 2 patrones de SSCP del gen DGAT1.

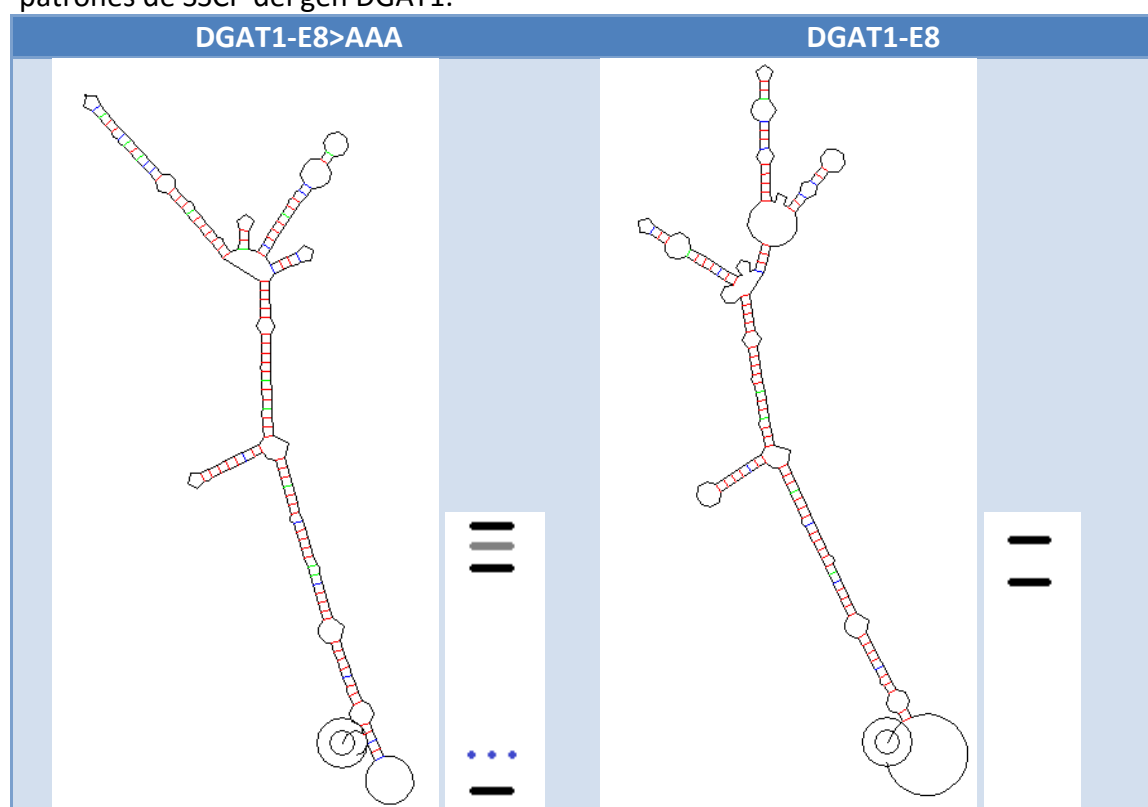


Figura 112: Esquemas de plegamiento del fragmento DGAT-E8/2.

Se muestra el esquema de plegamiento y el patrón de SSCP para dos de los genotipos estudiados en este trabajo. Los puntos suspensivos azules en el patrón del genotipo indican que la distancia de la banda inferior es, proporcionalmente, mayor a la que cabe en el esquema. El genotipo DGAT1-E8>AAA tiene una inserción de 3 nucleótidos en la posición 117. Esto produce un notable cambio en el esquema de plegamiento de gran parte de la molécula debido a la reordenación de los puentes de hidrógeno entre los nucleótidos. Dichos cambios se traducen en patrones de SSCP muy diferentes.

Los esquemas de plegamiento mostrados han sido calculados por el programa RNAdraw v1.1 (Matzura and Wennborg, 1995).

Aunque, en principio, cada patrón debería corresponderse con un genotipo, esto no siempre es así (ver Figura 113). La presencia de diferentes patrones para la misma composición genética podría explicarse por la alta sensibilidad que tiene la técnica a las condiciones ambientales del análisis, especialmente a la temperatura (Bastos et al., 2001; Hongyo et al., 1993; Sheffield et al., 1993).

La sensibilidad del SSCP varía según lo hace la variación detectada (Barroso et al., 1999). Así, si la variación se sitúa en los extremos del fragmento es posible que el

cambio tridimensional que se produce entre los distintos variantes sea de menor entidad que si se sitúa en el medio del fragmento. Así, la diferencia de movilidad electroforética podría ser insuficiente para diferenciar ambos genotipos.

El caso del fragmento GHR-E4 es una buena muestra de este fenómeno. En la Tabla 55 se recogen las mutaciones encontradas en dicho fragmento.

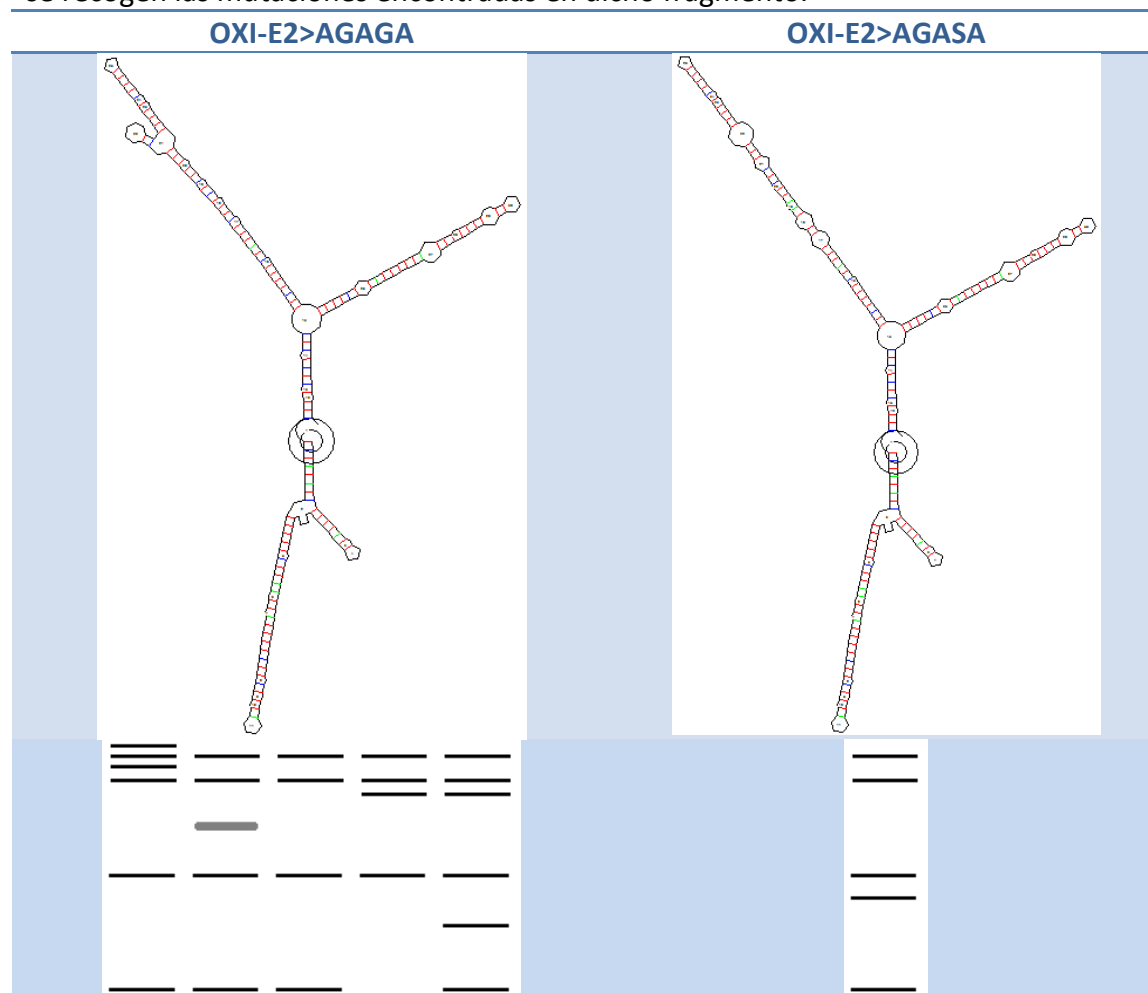


Figura 113: Esquemas de plegamiento del fragmento OXI-E2.

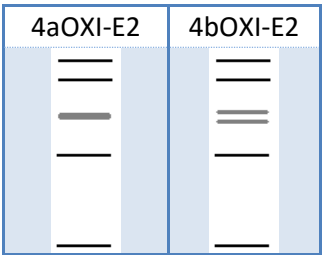
Se muestran 2 de los genotipos de los patrones estudiados en este trabajo. Se diferencian en la posición 189. Tienen una G y una C respectivamente. La conformación tridimensional a 8 °C es ligeramente diferente en uno de los brazos. El patrón AGASA es un heterocigoto de los genotipos AGAGA y AGACA. Sin embargo, se han detectado 5 patrones que producen el genotipo AGAGA y solamente 1 que produce el genotipo AGASA.

			SNP			
Esquema	Patrón	Genotipo	67	123	272	413
— — —	1GHR-E4	GHR-E4>Y	T	Y	Y	Y
			Y			
— — —	2GHR-E4	GHR-E4>C	C	C	C	C
			T			T
			Y			Y
— —	3GHR-E4	GHR-E4>T	T	T	T	T
				Y		

Tabla 55: Mutaciones detectadas en el fragmento GHR-E4.

De derecha a izquierda se presenta el esquema, el código, el genotipo y las mutaciones detectadas en las muestras secuenciadas para cada patrón. El SNP en posición 272 (en verde) es específico del patrón. Además, en el esquema se puede apreciar que el patrón del genotipo heterocigoto puede obtenerse por superposición de los patrones de los otros 2 genotipos homocigotos. Las posiciones 67, 123 y 413 no son específicas del patrón porque tienen más de una variante.

Cuando los geles de SSCP son demasiado resolutivos, pueden identificarse erróneamente “bandas fantasma” como bandas de interés (Gautheron et al., 2009). Las “bandas fantasma” probablemente son configuraciones tridimensionales alternativas, creadas por desnaturalización incompleta de bandas de ADN de cadena simple (Hongyo et al., 1993). Normalmente, son mucho menos frecuentes que las principales y que no se corresponden con ninguna diferencia genética. En aquellas condiciones que son muy resolutivas pueden distinguirse perfectamente e incrementar el número de patrones que muestra un fragmento. Al secuenciar individuos de cada patrón se puede identificar aquellas bandas cuya variación se correlaciona con la variación genética (bandas principales) y las que no (bandas fantasma). Habitualmente estas últimas son mucho menos intensas. Sin embargo, en principio, no deben descartarse porque a priori no se puede establecer la importancia de una de estas bandas. Por ejemplo, al secuenciar el patrón 4OXI-E2 se encontró que englobaba a 2 genotipos distintos. Al volver a revisar los patrones se descubrió que lo que parecían “bandas fantasma” en la zona centrar se correspondían exactamente con sendos genotipos 4aOXI-E2 y 4bOXI-E2.



La única faceta donde la técnica del SSCP presenta gran eficiencia es en la detección de inserciones/delecciones heterocigotas. Estas pueden confundirse con secuencias de baja calidad en secuenciación pero, habitualmente, provocan un cambio muy importante en el plegamiento tridimensional de las cadenas simples y, por tanto, son muy fáciles de detectar por SSCP. En este trabajo hay varios ejemplos de este fenómeno. El más interesante es el patrón 2DGAT-E8, que es el resultado de la presencia de una inserción/delección en heterocigosis de tres nucleótidos AAA, produciendo el genotipo DGAT-E8>AAA que comentaremos en el apartado de variabilidad genética.

5.1.3 Secuenciación.

La secuenciación es el método más efectivo para la detección de variabilidad y el genotipado de los fragmentos estudiados. Las ventajas que aporta sobre el SSCP son evidentes y la única desventaja al principio de la realización de este trabajo eran de índole económica (el precio de la secuenciación era de unas 6-10 veces el coste de los SSCP). La secuenciación aporta información completa sobre la secuencia de cada muestra, no solamente sobre las posiciones en las que hay variabilidad. Esta información se puede utilizar en los estudios actuales y/o almacenar para estudios posteriores, más amplios. Además, los resultados de una secuenciación son fáciles de

almacenar y procesar informáticamente: se pueden sintetizar en una cadena de texto. La cadena de texto obtenida (secuencia) es suficiente para realizar los estudios y comparaciones posteriores. El electroferograma sólo tiene interés para evaluar la fiabilidad de la secuencia. La secuencia de las zonas codificantes puede ser traducida para inferir la importancia que una mutación pueda tener en cada una de las posiciones (sólo algunas mutaciones producen cambio de aminoácido).

Además, las reacciones de secuenciación están mucho más automatizadas que los experimentos de SSCP. Ambos procedimientos parten de una reacción inicial de PCR pero el procesamiento artesanal de las muestras de SSCP, frente a la automatización de las secuenciaciones, hace que la obtención de resultados sea más lenta y tediosa. El análisis de los resultados de SSCP requiere de la asignación manual de los patrones. El secuenciador obtiene automáticamente las secuencias y las almacena en forma de electroferogramas.

La variabilidad de la calidad de los resultados es inherente al trabajo en laboratorio. Aquellos menos claros suelen requerir más tiempo en su evaluación. En el caso de la secuenciación existen algoritmos informáticos que indican de la calidad de cada una de las asignaciones de base realizadas, por ejemplo el índice *phred* (Ewing et al., 1998). Basta con establecer un umbral mínimo para obtener rápidamente secuencias de una calidad adecuada. Esto reduce enormemente el tiempo necesario para evaluar e interpretar los resultados de la secuenciación.

Un punto débil en el análisis de secuencias Sanger en el caso de análisis de variabilidad en genes candidatos es la interpretación de electroferogramas que implican polimorfismos "indel" en estado heterocigoto. Aunque existen métodos computacionales para tratar de descifrar estos casos (Dmitriev and Rakitov, 2008), en su mayoría requieren del conocimiento de una secuencia de referencia o del alineamiento de las secuencias obtenidas tanto del extremo 5' como 3'. En el caso de análisis de fragmentos cortos, como los que se suelen obtener para analizar mediante la técnica de SSCP, si las mutaciones se encuentran en alguno de los extremos del fragmento puede ser muy complicado establecer el genotipo de la muestra. Habitualmente, la calidad de las primeras 50 bases es inferior porque estas migran junto con artefactos debidos a los restos de ddNTPs fluorescentes que suelen acumularse al principio de la secuencia. Este fenómeno tiene mayor importancia relativa cuanto menor es la longitud total del fragmento.

El análisis de estos artefactos ha sido implementado en los modernos algoritmos de identificación de bases (*base callers*). Por ejemplo, Applied Biosystems® los incorporó en el algoritmo KB (Labrenz et al., 2003). Aunque estos algoritmos no estaban disponibles cuando se hicieron una gran parte de las secuenciaciones de los fragmentos de SSCP, la técnica había sido empleada en la edición manual de la mayoría de secuencias.

5.2 Variabilidad genética detectada.

Aunque hemos comentado con detalle la variabilidad genética detectada en todos los genes candidatos nos gustaría comentar en este apartado el polimorfismo de inserción de tres nucleótidos en la región codificante del gen de la DGAT1 Y la variabilidad en número de copias del gen GH.

5.2.1 La inserción 228AAA.

El haplotipo que contiene la inserción de 3 nucleótidos A se traduce en la inserción de una aminoácido *Lys* 4 nucleótidos antes de la posición que ocupa el QTN K232A descubierto en vacuno (Grisart et al., 2004). Este QTN produce una sustitución de lisina por alanina en el gen DGAT1 que hace variar a la cadena lateral del aminoácido en posición 232 en tres carbonos de longitud. Además, cambia el tipo de aminoácido de básico (cargado) a alifático (sin carga). El QTN está relacionado con efectos en la producción de leche de forma que el alelo K incrementa la producción de grasa, el porcentaje de grasa y el porcentaje de proteína mientras que disminuye la producción de leche y de proteína (Grisart et al., 2001). Además, estos efectos, son importantes. Este QTN explica por sí solo aproximadamente la mitad de la variación genética de la producción de grasa.

Es fácil suponer que la inserción descrita en esta memoria (K en posición 228 de la secuencia de aminoácidos) produzca un cambio en el plegamiento tridimensional de la proteína mucho más grande que la simple sustitución de una aminoácido *Lys* (K) por otro *Ala* (A) que está 4 posiciones aguas abajo. Sin embargo únicamente hemos encontrado tres animales con dicha inserción en estado heterocigoto y ninguno de ellos pertenecía a una población en la que se hubiesen establecido controles productivos y genealógicos. Al buscar este polimorfismo en la población de raza Churra, con la que trabajamos desde hace años, no pudimos encontrar ningún animal con el alelo mutado (García-Fernández et al., 2011). Resultados similares se han obtenido en la raza italiana Sarda (Scatà et al., 2009). Estos resultados nos indican que otra posibilidad pudiera ser que la secuencia de estos animales nos diese un artefacto que nos ha hecho identificar un polimorfismo falso.

5.2.2 Número variable de copias en el gen GH.

Hasta el momento de realizar nuestro trabajo no se disponía de información completa de la secuencia del espacio intergénico del alelo con dos copias de la hormona de crecimiento descrito por Wallis et al., 1998. Por fortuna, una de las secuencias producidas por secuenciación masiva del genoma de la vaca era capaz de alinear con el extremo 3' del gen de la hormona de crecimiento y con la secuencia portadora del inserto descrita por Yamano et al., 1991 en cabra. Como esta última también alineaba con la región 5' del gen de oveja se pudo predecir la secuencia del espacio intergénico. La predicción bioinformática del espacio intergénico fue útil para diseñar, con precisión, cebadores que permitieron su secuenciación completa. La amplificación de esta región no es sencilla debido a la enorme cantidad de secuencias repetidas invertidas que contiene. La aplicación CENSOR de la base de datos Repbase (Kohany et al., 2006) detecta 13 elementos genéticos transponibles en la secuencia obtenida para el fragmento GH2 y 15 para la secuencia predicha. En el fragmento de secuencia que no se encuentra en el genoma ovino se identifican, según la misma aplicación, 6 elementos transponibles: un transposón de *ADN hAT*, un transposón *LTR Gypsy*, un

transposón *L1* y tres SINES. La región discordante entre la predicción y lo obtenido proviene del genoma vacuno. La presencia del transposón en genoma vacuno y su ausencia en ovino indica que el transposón tiene capacidad para moverse. Es sabido que en las regiones donde se integran transposones pueden producirse duplicaciones en tándem porque el transposón arrastre a secuencias próximas. Este podría ser el mecanismo que ha generado la variabilidad encontrada en el genoma ovino.

La metodología de clonación elegida para completar la secuencia de este fragmento empleó un paso de clonación. Como en cada vector se integra una única copia de ADN, al secuenciar varios vectores se pueden obtener, por separado, las diferentes copias que contiene un mismo animal. Se encontraron 19 alelos, que son muchos más alelos de los que permite el modelo de 2 copias repetidas en tándem por genoma haploide (un máximo de 4 alelos). Por ello, podemos postular que, en oveja, pueden darse más de 2 copias del gen de la hormona de crecimiento por genoma haploide. Al determinar el número de copias en la población de ovejas de raza churra disponibles se encontró que la cantidad más frecuente eran 4 copias por genoma diploide.

5.3 Análisis de asociación con caracteres de producción de leche y morfología del animal.

En cuanto al análisis de asociación realizado, hay que tener en cuenta que ha sido la variabilidad encontrada en el gen GH (número de copias) y los caracteres de producción y morfológicos los que han mostrado una evidencia estadística más clara. El número de copias del gen GH no parece presentar una asociación con los caracteres productivos de composición de ácidos grasos y de producción de proteína y leche. Sin embargo, si se relaciona con una disminución en el recuento de células somáticas. Esta disminución no es lineal sino que se estabiliza a partir de 4 copias (el alelo más frecuente). En cuanto a los caracteres de morfología, hay que destacar la asociación encontrada con el carácter “verticalidad de los pezones” y “ancho de la grupa”. En función de los resultados encontrados es verosímil que el incremento del número de copias de la hormona de crecimiento influya en la morfología mamaria de forma que, al modificar la verticalidad de los pezones y el ancho de la grupa se reduce el recuento de células somáticas. Una posible explicación es que los animales con un número de copias mayor tuviesen una mejor conformación de la ubre (mejor insertada en la ubre y pezones más verticales) que tendría como efecto colateral un menor número de células somáticas por estar las ubres mejor conformadas para el ordeño mecánico y sufrir menor trauma durante el ordeño.

5.4 Base de Datos de Experimentos.

La necesidad de crear una base de datos para almacenar los experimentos del laboratorio surgió rápidamente al empezar a acumularse los parámetros de los protocolos y los resultados.

En un principio, los cálculos de la cantidad de reactivos de los protocolos de PCRs se realizaban manualmente en cada reacción y se anotaban en el cuaderno de laboratorio. Este cálculo se realizaba con la calculadora; posteriormente se desarrolló una hoja de cálculo que simplificaba y aceleraba el proceso (para más información sobre esta hoja de cálculo ver “Abrir Protocolos De PCR”, página 224, Anexo I).

A diferencia de otros métodos de genotipado, el SSCP realizado es un procedimiento completamente artesanal. Ninguno de los aparatos utilizados para realizarlo genera

archivos de resultados ni se dispone de ningún software comercial que almacene o extraiga ninguna información. A medida que fueron realizándose experimentos de SSCP surgió la necesidad de organizar toda la información producida. En principio se crearon tablas de patrones en las que se recogía la interpretación de las bandas y se les asignaba un código de mutante. Rápidamente se vio que este método era útil para almacenar la información pero no para procesarla, corregirla o manejarla. Los datos de las tablas comenzaron a registrarse en una base de datos que mejoró notablemente el acceso a la información.

Quedó claro que era deseable integrar la información en una base de datos para mejorar su gestión. Se pretendió crear una base de datos capaz de integrar las funcionalidades de la hoja de cálculo de protocolos de PCR y del registro de datos de SSCP y secuenciación. El desarrollo de esta base de datos siguió un esquema en espiral clásico, en el que primero se crea la parte fundamental del programa y luego se le van añadiendo funcionalidades, hasta que fue capaz de almacenar todos los datos relevantes producidos en el laboratorio y estuvo en condiciones de reemplazar, casi por completo, al cuaderno de laboratorio, superándolo en muchos aspectos.

Para el desarrollo del proyecto se decidió utilizar el gestor de bases de datos Microsoft Access porque se ajusta mejor a algunos requerimientos que otras herramientas. En concreto, las cualidades de Access son las siguientes:

- Es parte de la suite de oficina más ampliamente utilizada, por tanto es fácil acceder a ella y está disponible en la mayoría de laboratorios. Al estar tan ampliamente distribuida constituye un estándar de facto. Se encuentran muchas páginas en Internet con tutoriales y foros de soporte para la resolución de problemas.
- Se pueden crear fácilmente bases de datos relacionales y así aprovechar las ventajas de este tipo de bases de datos.
- Está concebida para ser utilizada por usuarios inexpertos. No requiere conocimientos avanzados de programación y está dotada de asistentes visuales que facilitan mucho su aprendizaje y utilización.
- Contiene un editor visual que permite crear consultas SQL de forma gráfica e intuitiva, sin necesidad de conocer el lenguaje de programación.
- No requiere de un servidor de bases de datos. Los datos se almacenan en un archivo que es gestionado por Access, de esta forma se puede respaldar y compartir fácilmente.
- Access permite crear tanto la base de datos como la interfaz gráfica de manejo.
- Las funciones más complicadas se pueden programar en lenguaje Visual Basic para Aplicaciones (Microsoft Corporation, 2013a) que es uno de los más sencillos de aprender y también está ampliamente distribuido.
- El gestor de bases de datos Access es considerado como una herramienta de usuario, no profesional, pero el fabricante dispone de un gestor de bases de datos profesional (SQL Server, Microsoft Corporation, 2014) y es fácil migrar de uno a otro mediante una utilidad creada por el mismo fabricante: SQL Server Migration Assistant for Access (Microsoft Corporation, 2013b).

Hoy en día existen alternativas muy solventes y gratuitas como MySQL (Oracle Corporation, 2015) o PostgreSQL (The PostgreSQL Global Development Group, 2015), sin embargo, cuando se inició el trabajo estos sistemas estaban en un estadio de desarrollo muy inicial que dificultaba su adopción en un proyecto destinado a usuarios

no expertos. A pesar de que Access recibe muchas críticas debido a sus limitadas características y a su orientación a un público generalista, a día de hoy está en el puesto nº 6 del ranking de sistemas de bases de datos relacionales (solid IT, 2015). Ciertamente, MySQL es la 2ª y PostgreSQL la 5ª pero la base de datos para servidores SQL Server ocupa la 3ª posición, casi igualada con la 2ª, y es muy fácil convertir una base de datos Access a SQL Server.

A diferencia de estos gestores de bases de datos “profesionales”, las aplicaciones de Access tienen la ventaja de requerir muy pocos recursos para su despliegue. En un solo archivo se pueden almacenar tanto los datos como los formularios, consultas e informes. En este trabajo se optó por dividir este archivo en 2, uno para los datos y otro para la interfaz, con objeto de optimizar el sistema de control de versiones y de copia de seguridad.

Así, el desarrollo en ambas partes no se produjo a la vez. En un principio se estableció la arquitectura de tablas y relaciones de forma que almacenase adecuadamente los datos relevantes producidos en el laboratorio. Cuando esta parte fue estabilizada el desarrollo se dirigió a la implementación de formularios, consultas e informes, cada vez más intuitivos, que mejoraban la experiencia de uso.

Al mantener separada la interfaz de los datos se pueden crear interfaces de prueba donde implementar las mejoras que sólo se incorporarán a la interfaz principal cuando sean estables. Además, se puede respaldar por separado el archivo de la interfaz sin tener que incluir en la copia de seguridad el archivo de datos.

El diseño de la base de datos de experimentos permite implementar sistemas muy sencillos de seguridad. Como todos los datos se almacenan en un fichero basta con copiar periódicamente dicho fichero en un soporte de almacenamiento externo (Microsoft Corporation, 2015b). La compresión del fichero puede suponer un ahorro notable de espacio.

Un modelo de copia de seguridad más sofisticado, pero igualmente sencillo, consistiría en incluir dicho fichero en un repositorio gestionado por un sistema de control de versiones. En concreto, incluirlo en un repositorio SVN (Apache Software Foundation, 2000) y manejarlos desde Windows con el software TortoiseSVN (TortoiseSVN team, 2004) es fácil e intuitivo.

La base de datos no tiene ningún sistema de control de acceso por usuarios. El que permitía establecer Access no era demasiado seguro y ha sido eliminado en las últimas versiones (Microsoft Corporation, 2015c). La protección de la confidencialidad de la información debe llevarla a cabo el usuario de la base de datos. Un sistema simple y efectivo es almacenar la base de datos en un directorio al que sólo tenga acceso el usuario o grupo de usuarios que estén autorizados a modificarla.

La gran desventaja que se le puede achacar a Access es su dependencia del sistema operativo Windows. En muchos laboratorios se utilizan sistemas Unix, como Linux, que no están contemplados por el desarrollador de Access. La utilización de la base de datos en estos sistemas está restringida salvo que se utilice alguna estrategia para superar el problema: utilizar emuladores de Windows, ejecutar el programa en máquinas virtuales o crear clientes de la base de datos que se conecten a ella a través de alguna biblioteca capaz de leer el formato de archivos de Access (como por ejemplo UCanAccess, Amadei, 2014, que es gratuito).

Desde las primeras versiones, Access cuenta con un editor visual de consultas y con asistentes para la creación de consultas más complejas. El editor es sencillo de utilizar gracias al mecanismo de arrastrar y soltar campos.

El usuario con conocimientos más avanzados puede crear las consultas que desee utilizando directamente el lenguaje de SQL, automatizar procedimientos empleando macros o programar funciones y subrutinas en lenguaje Visual Basic para Aplicaciones.

Al analizar el esquema de la base de datos creada, puede sorprender la gran cantidad de campos que tiene la tabla de protocolos de PCR (50). El motivo por el que la base de datos recoge tal cantidad de campos es porque modela completamente cada protocolo de PCR, esto incluye las concentraciones iniciales y finales de los stocks de productos de laboratorio (que raramente se tienen en cuenta en un protocolo porque suelen ser constantes; el laboratorio suele comprar los mismos productos). También incluye datos de organización interna y administrativos (como nº de programa, operador, diseñador, Día, etc.). Además se almacenan las cantidades realmente utilizadas en la receta de PCR. Dado que estas últimas se recalculan cada vez que se modifica un parámetro que pueda influir en ellas, podría optimizarse el tamaño de la base de datos evitando guardar estos datos (que pueden calcularse a partir de los demás). Sin embargo, se ha decidido mantenerlos porque en ocasiones resulta útil guardar las cantidades realmente utilizadas (y no las calculadas) para denotar alguna condición de PCR inusual o cuya realización fue errónea o no acorde a lo previsto. Estas situaciones pueden darse cuando se deciden hacer modificaciones de última hora en el laboratorio o cuando se registran PCRs antiguas que no fueron bien calculadas. En cualquier caso, el formulario comprueba los datos almacenados al cargarse y los resalta en rojo si no se corresponden con los calculados.

Una de las grandes ventajas que tiene la utilización de la base de datos con respecto al cuaderno del laboratorio es, precisamente, la capacidad de validación automática de los datos. Por ejemplo, el formulario de protocolos de PCR realiza 31 comprobaciones para asegurar la coherencia de los datos (para más información, ver Anexo I, página 244). Algunos campos restringen el tipo de formato de los datos introducidos, por ejemplo, el campo “Día” del formulario “Días” solo admite datos en formato de fecha. Esta fecha puede introducirse en cualquiera de los formatos de fecha reconocidos por Access. Dado que internamente se almacena como el tipo de dato especializado “Fecha y hora” (Microsoft Corporation, 2015d), se puede presentar después con cualquier formato de fecha que se desee y, además, se pueden realizar cálculos específicos de fechas (como buscar el día siguiente o el anterior). Se han programado varias consultas de detección de errores que pueden destacar situaciones que requieren especial atención: son poco frecuentes o erróneas (para más información ver la sección Consulta de “Errores”, página 396, Anexo I). Todos estos mecanismos permiten detectar errores antes de introducirlos en la base de datos, al hacerlo o con posterioridad. En ocasiones deben introducirse datos incompletos a la espera del resto de la información. Estas automatizaciones permiten recuperar fácilmente la lista de tareas pendientes.

Empleando el cuaderno de laboratorio se puede llegar a un nivel de control de la información similar siempre y cuando este cuaderno esté bien estructurado, se lleven al día las tareas y se haga un mantenimiento adecuado. En el caso ideal, en que el cuaderno de laboratorio esté perfectamente estructurado, almacenado y disponible, una persona distinta de la que lo creó debería preguntar al autor cuál es su estructura

y funcionamiento. Al utilizar una base de datos, cualquier persona con conocimientos del lenguaje de consultas (SQL) podrá acceder inmediatamente a la información (Marteens, 1999), ya que esta se almacena en un formato estandarizado.

Otra de las ventajas es la posibilidad de reordenación y búsqueda de información. Además, los resultados de una consulta pueden ser empleados como entrada para consultas posteriores que los refinan más.

La base de datos tiene soporte completo para nucleótidos ambiguos. Cuando se implementó, había programas que no soportaban la presencia de nucleótidos ambiguos en la secuencia a invertir y, entre los que la soportaban, alguno lo hacía con errores (El software de Applied Biosystems® invertía erróneamente los códigos W y S : producía estos resultados $W \rightarrow S$ y $S \rightarrow W$ cuando lo correcto es $W \rightarrow W$ y $S \rightarrow S$). Actualmente casi todos los programas soportan perfectamente la inversión de secuencias ambiguas. Sin embargo, la traducción de las secuencias ambiguas no es satisfactoria en ningún software que conozcamos. Por eso, en esta memoria hemos propuesto un nuevo formato que consiste en incluir todas las posibilidades de traducción entre paréntesis y, a la vez, mantener el alineamiento con la secuencia de nucleótidos expandiendo esta con la cantidad apropiada de guiones.

El formato de traducción a proteína que se ha creado para la base de datos permite combinar en una sola secuencia la información relevante para evaluar la importancia potencial de cada mutación. En comparación con otro software disponible, es más informativo. Por ejemplo, para la secuencia `aaaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaa` que contiene el código de ambigüedad γ , que equivale a C o T , estas son las capturas de la traducción en algunos programas:

a) **Artemis** (Rutherford et al., 2000):

```

K K K K K . K K K K K
K K K K K . K K K K .
. K K K K . K K K K K
AAAAAAAAAAAAAAAAAYAAAAAAAAAAAAAAAAA
                                     |20
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
F F F F F . F F F F .
. F F F F . F F F F F
F F F F F . F F F F F
  
```

Artemis ignora el codón que contiene el nucleótido γ y no presenta su traducción en ninguno de los marcos de lectura posibles. En lugar de la traducción del codón dibuja un punto (ver Figura 114).

Figura 114: Traducción realizada por Artemis.

b) **Unipro UGENE** (Okonechnikov et al., 2012):

```

K K K K K X K K K K K
K K K K K X K K K K K
K K K K K X K K K K K
AAAAAAAAAAAAAAAAAYAAAAAAAAAAAAAAAAA
12 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 33
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
F F F F F X F F F F F
F F F F F X F F F F F
F F F F F X F F F F F
  
```

Unipro UGENE ignora el nucleótido ambiguo γ y no presenta su traducción. En lugar de la traducción del codón dibuja una x (ver Figura 115).

Figura 115: Traducción realizada por Unipro UGENE..

c) **SnapGene Viewer** (GSL Biotech, 2015)

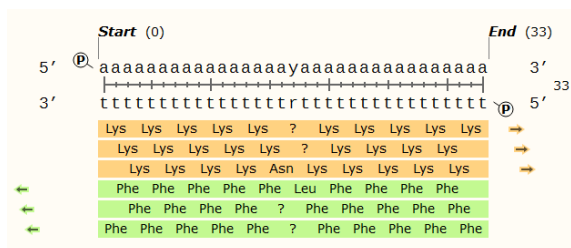


Figura 116: Traducción realizada por SnapGene Viewer.

a Taa y Caa, se traducen a Gln y Stop respectivamente. Como no hay sitio físico en el alineamiento para presentar ambas traducciones, se indica una condición especial con un signo de interrogación, pero no se da más información. De igual forma, el codón del marco 1 (aaY): equivale a aaT o aaC que se traducen en Thr e Ile respectivamente. El caso de las secuencias invertidas es similar (ver Figura 116).

SnapGene Viewer traduce únicamente aquellos marcos de lectura que sólo producen un tipo de aminoácido (el 3 y el -3). El marco 3 produce el mismo tipo de aminoácido porque tanto el codón aCa como aTa codifican para Asn . La traducción de los codones que pueden codificar para más de 2 aminoácidos se sustituye por un signo de interrogación. El codón del marco 2 (Yaa), que equivale

d) **Genome compiler** (Genome Compiler Corporation, 2015):

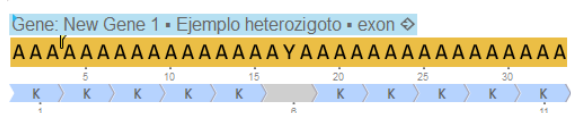


Figura 117: Traducción realizada por Genome Compiler.

ambiguos bien desarrollado. Este parece ser el único programa de los testados que falla, también, al generar la secuencia reversa complementaria de la del ejemplo. En la Figura 118 se muestra como el programa falla al calcular la secuencia inversa de `aaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaa`. Se esperaba que produjese `TTTTTTTTTTTTTTTTRTTTTTTTTTTTTTTTT`. El nucleótido ambiguo Y no es invertido.

Genome Compiler también ignora el codón que contiene el nucleótido ambiguo y presenta en su lugar una forma vacía coloreada diferencialmente (ver Figura 117). Este software está en una fase inicial de desarrollo y parece no tener el soporte para nucleótidos

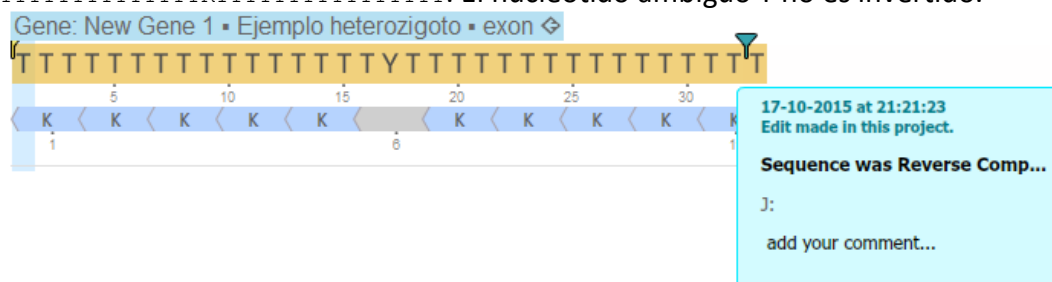


Figura 118: Secuencia reversa complementaria generada por Genome compiler.

A continuación se muestran las salidas del algoritmo de traducción de la base de datos objeto de este trabajo. En la Tabla 57 se muestran las traducciones en los 3 marcos de lectura tanto para la secuencia del ejemplo (Directa) como para su reversa complementaria (Inversa). Los aminoácidos se codifican en código de 3 letras. En la Tabla 58 se muestra la misma información pero los aminoácidos están codificados en código de 1 letra.

Marco	Directa	Inversa
1	AAAAAAAAAAAAAA (AYA---) AAAAAAAAAAAAAA LysLysLysLysLys (ThrIle) LysLysLysLysLys	TTTTTTTTTTTTTT (TRT---) TTTTTTTTTTTTTT PhePhePhePhePhe (TyrCys) PhePhePhePhePhe
2	AAAAAAAAAAAAAA (YAA---) AAAAAAAAAAAAAA LysLysLysLysLys (Gln *) LysLysLysLys	TTTTTTTTTTTTTT (RTT---) TTTTTTTTTTTTTT PhePhePhePhePhe (IleVal) PhePhePhePhe
3	AAAAAAAAAAAAAA (AAY---) AAAAAAAAAAAAAA LysLysLysLys (AsnAsn) LysLysLysLysLys	TTTTTTTTTTTTTT (TTR---) TTTTTTTTTTTTTT PhePhePhePhe (LeuLeu) PhePhePhePhePhe

Tabla 56: Traducciones en formato de la base de datos. 3 letras.

Marco	Directa	Inversa
1	AAAAAAAAAAAAAA (AYA---) AAAAAAAAAAAAAA K K K K K (T I) K K K K K	TTTTTTTTTTTTTT (TRT---) TTTTTTTTTTTTTT F F F F F (Y C) F F F F F
2	AAAAAAAAAAAAAA (YAA---) AAAAAAAAAAAAAA K K K K K (Q *) K K K K	TTTTTTTTTTTTTT (RTT---) TTTTTTTTTTTTTT F F F F F (I V) F F F F F
3	AAAAAAAAAAAAAA (AAY---) AAAAAAAAAAAAAA K K K K K (N N) K K K K K	TTTTTTTTTTTTTT (TTR---) TTTTTTTTTTTTTT F F F F F (L L) F F F F F

Tabla 57: Traducciones en formato de la base de datos. 1 letra.

Con el formato utilizado en la base de datos se consigue presentar, de un solo vistazo, el alineamiento de la secuencia de nucleótidos con todas sus posibles traducciones, la lista de aminoácidos distintos codificados por un mismo codón ambiguo, la secuencia del codón ambiguo y, por tanto, es fácil inferir la importancia relativa de cada posición ambigua.

Se han mostrado varios ejemplos de software actual que comparten una característica común: todos ellos tienen dificultades para mostrar la traducción completa de nucleótidos ambiguos. La innovación de este trabajo es la utilización del guion como signo que indica que en una posición no hay nucleótido (como se hace habitualmente en los alineamientos de secuencias) y la utilización de paréntesis para agrupar todas las traducciones que provienen del mismo codón.

La base de datos incorpora otra característica única: tiene soporte para almacenar las secuencias alineadas (además de como se hace habitualmente: almacenar las secuencias de nucleótidos tal cual se obtienen, sin signos adicionales –guiones-). La adición de guiones a las secuencias de nucleótidos no supone una alteración de la información genética almacenada porque no tienen significado biológico alguno. Únicamente indican las posiciones de los nucleótidos que han resultado de un alineamiento. En todo momento se pueden añadir, eliminar o recolocar los guiones para realizar otros estudios con la secuencia. Por ejemplo, el algoritmo de traducción elimina los guiones antes de realizar la traducción.

La única carga que puede suponer la adición de guiones a las secuencias es el incremento de recursos informáticos necesarios en la base de datos (espacio de almacenamiento, memoria, procesador) pero el descenso del rendimiento es inapreciable. Sin embargo, la inclusión de los guiones permite mantener alineadas las secuencias de un mismo fragmento de ADN. De esta forma se crea un sistema de referencias, un origen de coordenadas, muy sencillo para referirse a cada base de una secuencia individualmente.

En un sistema tradicional de referencia la posición de cada base se establece con respecto a un punto que ha sido definido previamente (por ejemplo, el inicio de la traducción, la primera base de un exón, etc.). La presencia de inserciones y deleciones dificulta el establecimiento de las coordenadas de cada nucleótido. Por ejemplo, un caso habitual y sencillo, que produce bastante confusión, puede ser el siguiente:

supongamos que se descubre una inserción de 5 bases a partir de la posición 20 de una secuencia y que esa secuencia tiene un exón entre las posiciones 25 y 40 (ver Figura 119). Un sistema habitual es utilizar la posición del inicio del exón como origen de coordenadas. En el primer caso (A), la base τ en posición 20 sería la base -5 y en el segundo caso (B) sería la -10. Con este sistema, la posición de cada nucleótido es válida únicamente para cada secuencia individualmente.

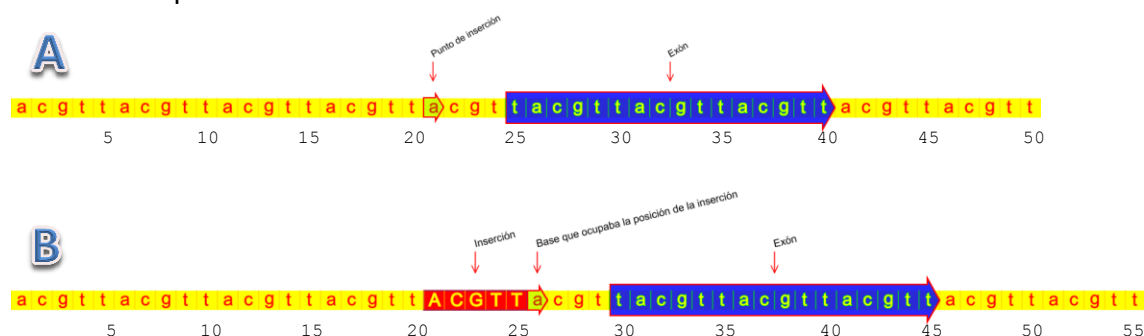


Figura 119: Ejemplo del efecto de una inserción sobre la posición de las características.

En esta imagen puede compararse cómo se modifican las coordenadas de la característica Exón antes (A) y después (B) de insertar 5 bases ACGTT entre las bases 20 y 21. Bajo cada secuencia se imprime una guía con los números de posición de las bases.

En el trabajo presentado se ha optado por crear un sistema de referencias unificado para todas las secuencias que alineen entre sí. Para ello, las posiciones de cada nucleótido se mantienen alineadas en la secuencia mediante guiones. La adición de una nueva inserción supone un cambio en todas las secuencias del alineamiento, pues hay que añadir los guiones correspondientes a las que no los tengan, pero las coordenadas de las características seguirán siendo coherentes para todas las secuencias que las compartan. En la Figura 120 se ilustra el comportamiento adecuado para almacenar la secuencia del ejemplo anterior en la base de datos.

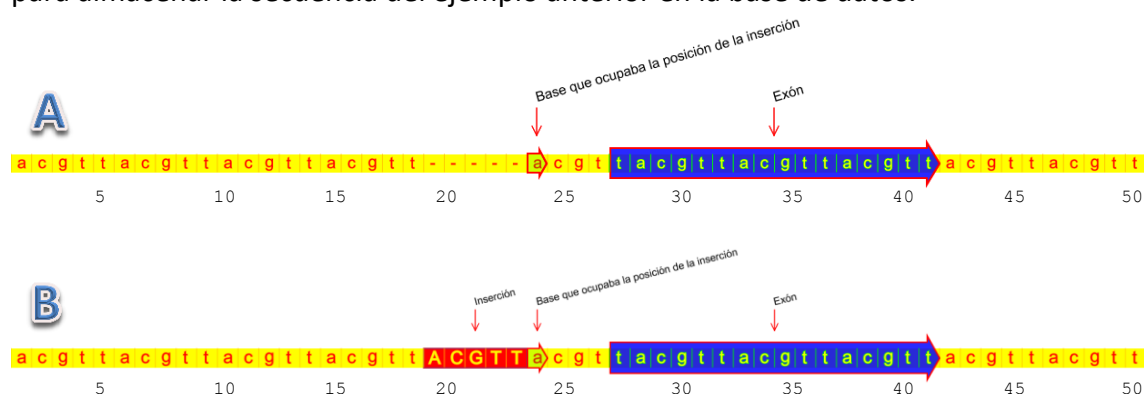


Figura 120: Ejemplo del sistema de almacenamiento de una inserción en la base de datos.

En esta imagen puede compararse cómo se modifican las coordenadas de la característica Exón antes (A) y después (B) de insertar 5 bases ACGTT entre las bases 20 y 21 con el sistema utilizado en la base de datos. Bajo cada secuencia se imprime una guía con los números de posición de las bases. Las posiciones de todos los nucleótidos y secuencias se mantienen alineadas mediante guiones.

Este sistema de referencia permite en todo momento comparar las posiciones de fragmentos equivalentes entre todas las secuencias que estén alineadas.

El peaje de este sistema es una capa adicional de trabajo para asegurar que las secuencias se introducen y mantienen alineadas en la base de datos. Algunas de las funciones de la base de datos son muy sensibles a la pérdida de alineamiento de las secuencias y podrían llevar a resultados erróneos. Para minimizar estos casos, se ha dotado a la base de datos de funciones que permiten la manipulación masiva de secuencias. El formulario de secuencias está programado para realizar automáticamente la inserción, delección y modificación de un fragmento tanto en las secuencias consenso como en las secuencias generadoras del alineamiento (más información en “Más Secuencias Consenso”, página 320, Anexo I). También actualiza la tabla de características de cada secuencia (para más información ver “Edición de la secuencia”, página 325, Anexo I). Los alineamientos, a su vez, se pueden alinear en una secuencia de referencia global. Para ello basta con añadir un incremento a las posiciones del alineamiento. Este proceso también ha sido automatizado (para más información ver “Modificar Incremento”, página 339, Anexo I).

Al estar todas las posiciones sincronizadas, es posible importar características desde una secuencia a otra. También se han dispuesto controles automáticos para realizar este proceso (para más información ver “Importar Características”, página 333, Anexo I).

Con el sistema empleado, las secuencia génica no guarda sólo información de la sucesión de nucleótidos de una muestra sino, también, de la posición relativa de ese nucleótido con respecto a los de otras secuencias similares (que alinean con ella). Para almacenar esta información basta con introducir el resultado del alineamiento de la secuencia en la base de datos.

Algunas características de las secuencias sólo se detectan por comparación con otras secuencias con las que alinea (ej. regiones muy conservadas). Si 2 animales son homocigotos en una posición pero el nucleótido que presentan es distinto puede pensarse que en esa posición hay un SNP. Al asignar una característica a la secuencia consenso del alineamiento, implícitamente se está asignando esa característica a cada una de las secuencias que forman ese alineamiento. Esta es la base del sistema de genotipado. Al almacenarse las secuencias alineadas entre sí, sabiendo la posición de los SNPs de interés se puede pedir al sistema la lista de nucleótidos que ocupan cada una de las posiciones de estos SNPs. La lista de SNPs se puede extraer de la lista de características de cada una de las secuencias. Con esta mecánica, se puede pedir el genotipado para cualquier tipo de característica introducida en la base de datos. Por ejemplo, ha resultado útil también genotipar para las inserciones/delecciones de las secuencias.

El programa puede comparar los patrones de bandas producidos por SSCP con los genotipos obtenidos para las muestras que presentan esos patrones y han sido secuenciadas. Así, se puede establecer la relación genética que hay entre el fenotipo de SSCP y el genotipo de la secuenciación. En teoría, debería poderse establecer una relación entre cada patrón de SSCP y un genotipo. Sin embargo, pueden darse circunstancias en que esta relación no se encuentre. El caso menos edificante es que se haya producido un error al introducir la información en alguno, o varios, de los múltiples pasos necesarios para registrar los datos de una muestra (para más información ver “Asistente Para Añadir Muestras”, página 262, Anexo I) de forma que muestras de un mismo patrón sean asignadas a genotipos diferentes. El programa está dotado de consultas que permiten comprobar si todas las muestras de un mismo

patrón están asignadas a un mismo genotipo (“Ver Genotipado de Patrones Definitivo”, página 283, Anexo I) y de otras que permiten entrar más en el detalle de las muestras que generan cada patrón para revisar aquellas cuyos resultados puedan ser conflictivos (“Ver Genotipado de Patrones”, página 283, Anexo I). Si, tras investigar los pasos previos del cálculo del genotipo de los patrones, aún no se pueden resolver las discrepancias, se puede marcar un patrón como ambiguo para denotar posibles problemas en el establecimiento de la relación entre el genotipo y el fenotipo (el patrón de SSCP).

Este sistema de genotipado se ha creado para experimentos de tipo SSCP. A finales de la década de los noventa el SSCP era considerado una técnica muy prometedora. El abaratamiento de los costes y el incremento de la productividad de la secuenciación ha relegado a la técnica de SSCP a la obsolescencia, se publican muchos menos trabajos que la utilicen: el número de trabajos registrados en la base de datos Pubmed (National Center for Biotechnology Information, 2015) que contienen el término “SSCP” ha caído de 1145 en el año 1998 a 151 en el 2014.

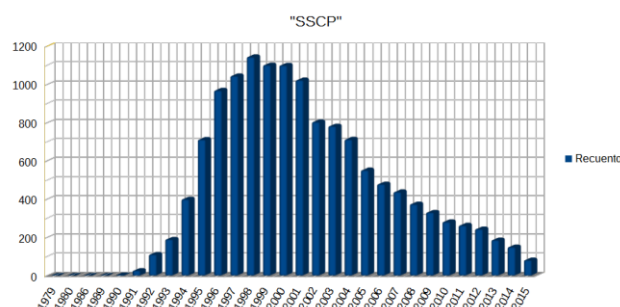


Figura 121: Evolución del recuento de trabajos publicados sobre SSCP

Este gráfico recoge el número de trabajos publicados en la base de datos Pubmed que contienen el término “SSCP”.

Sin embargo, el sistema de genotipado que proponemos aquí no está restringido al SSCP. Puede ser utilizado para establecer la relación genotípica entre los resultados de cualquier prueba bioquímica y el genotipo que los genera. El único requerimiento es modificar el título de las tablas y replantear la lista de campos específicos para definir esa prueba. Por ejemplo, se podrían genotipar patrones de restricción en vez de patrones de SSCP. Los automatismos de la base de datos, las consultas y los sistemas de detección de errores podrían ser utilizados con muy pocas modificaciones porque el sistema de genotipado es suficientemente flexible.

CONCLUSIONES

6 Conclusiones

PRIMERA:

La técnica de detección de polimorfismos mediante el análisis de la conformación de las cadenas sencillas de ADN (SSCP) es eficiente para detectar variabilidad genética en genes candidatos relacionados con los caracteres de la producción de leche. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica es variable, siendo muy eficiente en los polimorfismos de tipo inserción-delección y menor en los SNPs. La complejidad del análisis de algunos patrones electroforéticos, la necesidad de verificación de dichos patrones mediante secuenciación y el abaratamiento de las técnicas de secuenciación han relegado a esta técnica en los últimos años.

SEGUNDA:

La variabilidad genética detectada en los genes candidatos analizados es elevada. Destaca el polimorfismo de tipo número variable de copias encontrado en la hormona de crecimiento que implicaba la detección de un número muy elevado de polimorfismos al ser analizado mediante SSCP. En el presente trabajo hemos desarrollado un procedimiento de estimación del número de copias de este gen mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) que incluye un proceso de testado y normalización de la reacción de amplificación mediante el clonado de un fragmento del gen a analizar y otro del gen de referencia, que puede ser generalizado en otros experimentos de cuantificación del número de copias.

TERCERA:

Se ha encontrado una asociación entre el número de copias del gen de la hormona de crecimiento ovina y determinados caracteres funcionales relacionados con la producción de leche en la oveja como son el recuento de células somáticas y la verticalidad de los pezones. Así, los animales con 4 copias por genoma (2 en cada haplotipo) presentan pezones más verticales y un menor recuento de células. En nuestra opinión, éste podría ser un efecto pleiotrópico del gen GH, ya que los animales con ubres mejor conformadas para el ordeño mecánico sufrirían un menor traumatismo en el ordeño y, por lo tanto, existiría un menor número de células del epitelio mamario descamadas. Dado que el efecto del número de copias del gen GH es bajo en todos los niveles estudiados y que los valores óptimos se corresponden con los más representados en la población (4 copias por genoma diploide), la inclusión del carácter “número de copias del gen GH” como información complementaria del programa de selección genética tendría un efecto muy limitado.

CUARTA:

Se ha diseñado una herramienta informática para seguir el flujo de trabajo diario de un laboratorio de genética molecular. Esta aplicación informática permite almacenar los diferentes tipos de información generada durante el trabajo de laboratorio (identificación y localización de las muestras; diferentes condiciones de PCRs, SSCP, secuenciación, análisis de SNPs, etc.) de forma más satisfactoria que en el clásico cuaderno de laboratorio. Aunque la herramienta ha sido diseñada “ad hoc” para este trabajo, es muy flexible y puede adaptarse, sin grandes dificultades, para poder ser utilizada de forma general en un laboratorio de diagnóstico genético con un flujo de trabajo intermedio.

BIBLIOGRAFÍA

7 Bibliografía

- ABI, 1997. ABI PRISM 7700 User Bulletin #2. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. PE Applied Biosystems, Foster City.
- Adams, T.E., 1995. Differential expression of growth hormone receptor messenger RNA from a second promoter. *Mol Cell Endocrinol* 108, 23–33.
- Affimetrix, 2005. Fidelity PCR Master Mix (2X) [web]. URL: http://www.affymetrix.com/estore/browse/brand/usb/product.jsp?navMode=34000&productId=131139#1_1
- Aguilera Gámiz, C., Barco Sánchez, A., Gascón Luna, F., Cruz Ruiz, M., González Olle, C., Poyatos Andújar, A., 2014. Sistema informático del laboratorio: aspectos relativos a la gestión e implantación en la estructura corporativa informática andaluza. GT2 sistemas informáticos de laboratorio.
- Ainsworth, P.J., Surh, L.C., Coulter-Mackie, M.B., 1991. Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Res* 19, 405–406.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Amadei, M., 2014. UCanAccess-A Pure Java JDBC Driver for Access [web]. URL: <http://ucanaccess.sourceforge.net/site.html>
- ANCHE, 2015. Inicio y FERIA | Anche [web]. URL: <http://www.anche.org/>
- Apache Software Foundation, 2000. Apache Subversion [web]. URL: <https://subversion.apache.org/>
- Applied Biosystems, 2010. Custom TaqMan® Assays For New SNP Genotyping and Gene Expression Assays. Design and Ordering Guide.
- Arranz, J.J., Coppieters, W., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Mezer, C., Riquet, J., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Georges, M., 1998. A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: a confirmation. *Anim Genet* 29, 107–115.
- Barbosa, E.P.A., 2009. Factores genéticos y ambientales de los niveles de ácidos grasos en la leche de oveja de raza Churra. Universidad de León.
- Barroso, a, Dunner, S., Cañón, J., 1999. Technical note: use of PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for detection of bovine beta-casein variants A1, A2, A3, and B. *J. Anim. Sci.* 77, 2629–32.
- Bastos, E., Cravador, A., Azevedo, J., Guedes-Pinto, H., 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed “Churra da Terra Quente.” *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5, 7–15.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015a. {lme4}: Linear mixed-effects models using {Eigen} and {S4}.

- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B.M., Walker, S., 2015b. Fitting Linear Mixed-Effects Models using {lme4}.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GeneBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36–D42.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., Wheeler, D.L., 2000. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 28, 15–18. doi:10.1093/nar/28.1.15
- Bignon, C., Binart, N., Ormandy, C., Schuler, L.A., Kelly, P.A., Djiane, J., 1997. Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents. *J Mol Endocrinol* 19, 109–120.
- Blanco-Favela, F., Legorreta-Haquet, M.V., Huerta-Villalobos, Y.R., Chávez-Rueda, K., Montoya-Díaz, E., Chávez-Sánchez, L., Zenteno-Galindo, E., 2012. Participación de la prolactina en la respuesta inmune. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 69, 329–336.
- Blott, S., Kim, J.J., Moiso, S., Schmidt-Kuntzel, A., Cornet, A., Berzi, P., Cambisano, N., Ford, C., Grisart, B., Johnson, D., Karim, L., Simon, P., Snell, R., Spelman, R., Wong, J., Vilkki, J., Georges, M., Farnir, F., Coppieters, W., 2003. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics* 163, 253–266.
- Bodenes, C., Laigret, F., Kremer, A., 1996. Inheritance and molecular variants of PCR-SSCP fragments in pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Theor Appl Genet* 93, 348–354.
- Byrne, C.R., Wilson, B.W., Ward, K. a, 1987. The isolation and characterisation of the ovine growth hormone gene. *Aust. J. Biol. Sci.* 40, 459–68.
- Cai, Q.-Q., Touituo, I., 1993. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. *Nucleic Acids Res.* 21, 3909–3910.
- Camper, S.A., Luck, D.N., Yao, Y., Woychik, R.P., Goodwin, R.G., Lyons, R.H.J., Rottman, F.M., 1984. Characterization of the bovine prolactin gene. *DNA* 3, 237–249.
- Cappelletti, C.A., Rozen, F.M.B., De La Fuente Crespo, L.F., San Primitivo, F., 2006. Extension factors for part-lactation in Churra sheep breed. *Small Rumin. Res.* 63, 282–287. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.03.001
- Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.-W., Myers, M.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welchi, C.B., Lusisi, A.J., Erickson, S.K., Robert V. Farese, J., 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 13018–13023.
- Chu, M.X., Wang, X.C., Jin, M., Di, R., Chen, H.Q., Zhu, G.Q., Fang, L., Ma, Y.H., Li, K., 2009. DNA polymorphism of 5' flanking region of prolactin gene and its association with litter size in sheep. *J Anim Breed Genet* 126, 63–68. doi:10.1111/j.1439-0388.2008.00763.x
- Clackson, T., Wells, J.A., 1995. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* (80-.). 267, 383–386.

- Coppieters, W., Riquet, J., Arranz, J.J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Nezer, C., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Georges, M., 1998. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. *Mamm Genome* 9, 540–544.
- Cornish-Bowden, A., 1985. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Res.* 13, 3021–3030.
- Costa, F., Khatkar, M.S., Thomson, P.C., Tammen, I., Raadsma, H.W., 2008. QTL Map - Combined QTL Map of Dairy Cattle Traits.
- De La Fuente, L.F., Barbosa, E., Carriedo, J.A., Gonzalo, C., Arenas, R., Fresno, J.M., San Primitivo, F., 2009. Factors influencing variation of fatty acid content in ovine milk. *J. Dairy Sci.* 92, 3791–3799. doi:10.3168/jds.2009-2151
- Dear, S., Staden, R., 1992. A standard file format for data from DNA sequencing instruments. *DNA Seq* 3, 107–110.
- Deng, L., He, K., Wang, X., Yang, N., Thangavel, C., Jiang, J., Fuchs, S.Y., Frank, S.J., 2007. Determinants of Growth Hormone Receptor Downregulation. *Mol Endocrinol.*
- Díez Navarro, A., 1731. Quadernos de leyes y privilegios del Honrado Concejo de la Mesta (edición facsímil), 1994th ed.
- Dmitriev, D.A., Rakitov, R.A., 2008. Decoding of superimposed traces produced by direct sequencing of heterozygous indels. *PLoS Comput. Biol.* 4. doi:10.1371/journal.pcbi.1000113
- Etherton, T.D., Bauman, D.E., 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 78, 745–761.
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186–94. doi:10.1101/gr.8.3.186
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M., Green, P., 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assesment. *Genome Res.* 8, 175–185.
- Falaki, M., Prandi, A., Corradini, C., Sneyers, M., Gengler, N., Massart, S., Fazzini, U., Burny, A., Portetelle, D., Renaville, R., 1997. Relationships of growth hormone gene and milk protein polymorphisms to milk production traits in Simmental cattle. *J Dairy Res* 64, 47–56.
- Fernández, G., Baro, J.A., de la Fuente, L.F., San Primitivo, F., 1997. Genetic parameters for linear udder traits of dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 80, 601–605. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)75976-9
- Fernández García, M., 2011. Estudio de genes candidatos para la composición de ácidos grasos de la leche de oveja. Universidad de León.
- Fontaine, T., 2014. SDF (Scientific Data File) Viewer [web]. URL: <http://sourceforge.net/projects/sdf/lib/>
- Fox, J., Weisberg, S., 2011. An {R} Companion to Applied Regression, Second. ed. Sage, Thousand Oaks {CA}. Disponible en: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>

- García Gámez, E., 2012. Mapeo fino de regiones genómicas portadoras de QTL con influencias de caracteres de producción de leche en el ganado ovino.
- García-Fernández, M., Gutiérrez-Gil, B., García-Gámez, E., Sánchez, J.P., Arranz, J.J., 2010. Detection of quantitative trait loci affecting the milk fatty acid profile on sheep chromosome 22: Role of the stearoyl-CoA desaturase gene in Spanish Churra sheep. *J. Dairy Sci.* 93, 348–357. doi:10.3168/jds.2009-2490
- García-Fernández, M., Gutiérrez-Gil, B., Sánchez, J.P., Morán, J. a, García-Gámez, E., Alvarez, L., Arranz, J.J., 2011. The role of bovine causal genes underlying dairy traits in Spanish Churra sheep. *Anim. Genet.* 42, 415–20. doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02162.x
- Gautheron, V., Auffret, A., Mattson, M.P., Mariani, J., Vernet-der Garabedian, B., 2009. A new and simple approach for genotyping Alzheimer's disease presenilin-1 mutant knock-in mice. *J. Neurosci. Methods* 181, 235–40. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.05.009
- Gene Link, I., 2015. PCR Additives & Enhancers [web]. URL: www.genelink.com/Literature/ps/M40-3021-PCR_Additives_Ver5.1.pdf
- Genome Compiler Corporation, 2015. Genome Compiler.
- Georges, M., Nielsen, D., Mackinnon, M., Mishra, A., Okimoto, R., Pasquino, A.T., Sargeant, L.S., Sorensen, A., Steele, M.R., Zhao, X., al., et, 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139, 907–920.
- Georges, M.A.J., Coppieters, W.H.R., Grisart, B.M.-J.J., Snell, R.G., Jean Reid, S., Ford, C.A., Spelman, R.J., 2009. Marker assisted selection of bovine for improved milk production using diacylglycerol acyltransferase gene DGAT1. United States Pat.
- Geospiza, 2006. FinchTV [web]. URL: http://jblseqdat.bioc.cam.ac.uk/gnmweb/download/soft/FinchTV_1.4/doc/
- Goffin, V., Kelly, P., 1997. The Prolactin/Growth Hormone Receptor Family: Structure/Function Relationships. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2, 7–17. doi:10.1023/A:1026313211704
- Gordon, D., 2003. Viewing and editing assembled sequences using Consed. *Curr Protoc Bioinforma.* Chapter 11, Unit11 2. doi:10.1002/0471250953.bi1102s02
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P., 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 8, 195–202.
- Green, P., 1994. PHRAP documentation [web]. URL: <http://www.phrap.org>
- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M., Snell, R., 2001. Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine DGAT1 Gene with Major Effect on Milk Yield and Composition. *Genome Res.* 12, 222–231.
- Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Cambisano, N., Kim, J.-J., Kvasz, A., Mni, M., Simon, P., Frère, J.-M., Coppieters, W., Georges, M., 2004. Genetic and functional

- confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2398–2403. doi:10.1073/pnas.0308518100
- GSL Biotech, 2015. SnapGene software [web]. URL: snapgene.com
- Gutiérrez-Gil, B., Alvarez, L., de la Fuente, L.F., Sanchez, J.P., San Primitivo, F., Arranz, J.J., 2011. A genome scan for quantitative trait loci affecting body conformation traits in Spanish Churra dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 94, 4119–4128. doi:10.3168/jds.2010-4027
- Guyton, A.C., Hall, J.E.C.N.-Q.. G. 1996 Q.T. 104 G. 1996 612 M.Q.. G. 1996, 1996a. Textbook of medical physiology, 9th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Guyton, A.C., Hall, J.E.C.N.-Q.. G. 1996 Q.T. 104 G. 1996 612 M.Q.. G. 1996, 1996b. Tratado de Fisiología médica, 9th ed. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA, Madrid.
- Han, M., Robinson, M.A., 2004. PCR-SSCP Analysis of Polymorphism, in: Bartlett, J.M.S., Stirling, D. (Eds.), *Methods in Molecular Biology. PCR Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 327–333.
- Hayashi, K., 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1, 34–38.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7276–7280. doi:10.1073/pnas.88.16.7276
- Hongyo, T., Buzard, G.S., Calvert, R.J., Weghorst, C.M., 1993. "Cold SSCP": a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 21, 3637–3642.
- Hu, Z.Z., Meng, J., Dufau, M.L., 2001. Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *J Biol Chem* 276, 41086–41094. doi:10.1074/jbc.M102109200
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6, 279–284.
- Hull, K.L., Harvey, S., 2000. Growth hormone: A reproductive endocrine-paracrine regulator? *Rev. Reprod.* 5, 175–182.
- Illingworth, R.S., Bird, A.P., 2009. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 583, 1713–20. doi:10.1016/j.febslet.2009.04.012
- Invitrogen, 2006. TOPO® PCR Cloning [web]. URL: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/TOPO-PCR-Cloning.html>
- Jiang, H., Lucy, M.C., 2001. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene* 265, 45–53.

- Jurka, J., 2000. Repbase Update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet.* 16, 418–420. doi:10.1016/S0168-9525(00)02093-X
- Kasuga, T., Cheng, J., Mitchelson, K.R., 1995. Metastable single-strand DNA conformational polymorphism analysis results in enhanced polymorphism detection. *PCR Methods Appl* 4, 227–233.
- Khatkar, M.S., Thomson, P.C., Tammen, I., Raadsma, H.W., 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet Sel Evol* 36, 163–190. doi:10.1051/gse:2003057 g4202 [pii]
- Kirkpatrick, B.W., Hart, G.L., 1994. Conformation polymorphisms and targeted marker development. *Anim. Genet.* 25, 77–82.
- Kohany, O., Gentles, A.J., Hankus, L., Jurka, J., 2006. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics* 7, 474. doi:10.1186/1471-2105-7-474
- Kühn, C., Thaller, G., Winter, A., Bininda-Emonds, O.R.P., Kaupe, B., Erhardt, G., Bennewitz, J., Schwerin, M., Fries, R., 2004. Evidence for Multiple Alleles at the DGAT1 Locus Better Explains a Quantitative Trait Locus With Major Effect on Milk Fat Content in Cattle. *Genetics* 167, 1873–1881.
- Kukita, Y., Tahira, T., Sommer, S.S., Hayashi, K., 1997. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat* 10, 400–407.
- Kuznetsova, A., Bruun Brockhoff, P., Haubo Bojesen Christensen, R., 2015. lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models.
- Labrenz, J., Gehman, C., Baybayan, P., Cook, L.L., Doan, Q., Egan, A., Fry, G., Gibbs, R.A., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Mardis, E.R., Moore, S.M., Muzny, D.M., Pradhan, A., Schneider, S., Scott, G.B.I., Sorenson, J., Steffen, D.L., Villasana, D.M., Wheeler, D., Yang, S.-P., 2003. Longer Reads and More Robust Assemblies with the KB Basecaller / P135.
- Lagziel, A., Lipkin, E., Ezra, E., Soller, M., Weller, J.I., 1999. An MspI polymorphism at the bovine growth hormone (bGH) gene is linked to a locus affecting milk protein percentage. *Anim Genet* 30, 296–299.
- Lagziel, A., Lipkin, E., Soller, M., 1996. Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. *Genetics* 142, 945–951.
- Le Provost, F., Leroux, C., Martin, P., Gaye, P., Djiane, J., 1994. Prolactin gene expression in ovine and caprine mammary gland. *Neuroendocrinology* 60, 305–313.
- Lee, B.K., Lin, G.F., Crooker, B.A., Murtaugh, M.P., Hansen, L.B., Chester-Jones, H., 1996. Association of somatotropin (BST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows. *Domest Anim Endocrinol* 13, 373–381.
- Lesueur, L., Edery, M., Ali, S., Paly, J., Kelly, P.A., Djiane, J., 1991. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 824–828.

- Liew, S.-N., Lazaruk, K., Wong, L., Stevens, J., Livak, K., 2005. Determining the Copy Number of Genes Using Real-Time Quantitative PCR.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lombard, V., Camon, E.B., Parkinson, H.E., Hingamp, P., Stoesser, G., Redaschi, N., 2002. EMBL-Align: a new public nucleotide and amino acid multiple sequence alignment database. *Bioinformatics* 18, 763–764. doi:10.1093/bioinformatics/18.5.763
- López, A., 2012. Sistemas de información del laboratorio clínico, in: *Unidas Sociedad Española de Informática de la Salud, N.A.-S. (Ed.), Manual de Salud Electrónica Para Directivos de Servicios Y Sistemas de Salud. Naciones Unidas*, pp. 109–134.
- Lu, G., 2004. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief. Bioinform.* 5, 378–388. doi:10.1093/bib/5.4.378
- Lynch, M., Walsh, B., 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits*, Sinauer Associates; 1 edition. 980p. Disponible en: http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/RinconLiterario/2011/febrero/AG_8.pdf \npapers2://publication/uuid/E7628713-9EB8-4A23-8D6B-A803AC014830
- Maj, A., Zwierzchowski, L., 2006. Molecular evolution of coding and non-coding sequences of the growth hormone receptor (GHR) gene in the family Bovidae. *Folia Biol* 54, 31–36.
- Marchler-Bauer, A., Bryant, S.H., 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* 32, W327–31.
- Marqués Martínez, M., 1999. Análisis funcional de regiones implicadas en la regulación transcripcional del gen de la b-caseína ovina. *Prod. Anim. I. Universidad de León, León*.
- Marteens, I., 1999. La cara oculta de C++ Builder. Disponible en: http://terawiki.clubdelphi.com/Builder/Manuales?download=La_Cara_Oculta_De_C%2B%2B_Builder.pdf
- Mathey, L.I.P., Denes, J.M., N, V.G., Kessal, K., Aranda-Abreu, G.E., Estudillo, C.A., Aguilar, M.H., 2009. Prolactina: mecanismos intracelulares involucrados en la función prostática. *Rev. Médica la Univ. Veracruzana* 9, 36–40.
- Matzura, O., Wennborg, A., 1995. RNAdraw [web]. URL: <http://www.rnadraw.com/>
- Microsoft Corporation, 2015a. Access [web]. URL: <https://products.office.com/es-es/access>
- Microsoft Corporation, 2015b. Proteger los datos con procesos de copia de seguridad y restauración [web]. URL: <https://support.office.com/es-es/article/Proteger-los-datos-con-procesos-de-copia-de-seguridad-y-restauraci%C3%B3n-96539a81-5984-4d56-99ca-ee81f8d6356c?ui=es-ES&rs=es-ES&ad=ES>
- Microsoft Corporation, 2015c. What happened to user-level security? [web]. URL: <https://support.office.com/en-ca/article/What-happened-to-user-level-security->

dcb633f8-70c1-45d3-a373-2f3eafa904a5

Microsoft Corporation, 2015d. Información acerca de los tipos de datos y propiedades de campo que pueden utilizarse en una base de datos de Access.

Microsoft Corporation, 2014. SQL Server [web]. URL: <http://www.microsoft.com/es-es/server-cloud/products/sql-server/>

Microsoft Corporation, 2013a. Office VBA language reference [web]. URL: <https://msdn.microsoft.com/en-us/library/office/gg264383.aspx>

Microsoft Corporation, 2013b. SQL Server Migration Assistant for Access [web]. URL: [https://msdn.microsoft.com/en-us/library/hh302874\(v=sql.105\).aspx](https://msdn.microsoft.com/en-us/library/hh302874(v=sql.105).aspx)

Microsoft Corporation, 2011. Introduction to Scientific DataSet. A managed library and viewer for scientific data.

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215.

Moradian, C., Mohamadi, N., Razavi-Sheshdeh, S.A., Hajihosseini, A., Ashrafi, F., 2013. Effects of genetic polymorphism at the growth hormone gene on growth traits in Makoei sheep. *Eur. J. Exp. Biol.* 3, 101–105.

Morán Pérez, J.A., Arranz, J.J., Marqués Martínez, M., San Primitivo, F., 2007. Determinación del número de copias del gen de la hormona de crecimiento ovina mediante PCR a tiempo real: diseño de una construcción plasmídica de referencia., in: XXXVI Congreso de La Sociedad Española de Genética. León.

Morán Pérez, J.A., Tirados, F.S.P., Arranz, J.J., Morán, J.A., Arranz, J.J., San Primitivo, F., 2003. Análisis de la variabilidad del gen de la oxitocina ovina en la raza churra, in: X jornadas sobre producción animal. ITEA, Zaragoza, pp. 444–446.

National Center for Biotechnology Information, 2015. PubMed [web]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Neibergs, H.L., Dietz, A.B., Womack, J.E., 1993. Single-strand conformation polymorphisms (SSCPs) detected in five bovine genes. *Anim Genet* 24, 81–84.

Nguyen, K.D., 2012. On the edge of web-based multiple sequence alignment services. *Tsinghua Sci. Technol.* 17, 629–637. doi:10.1109/TST.2012.6374364

Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.J., 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distrib. por el autor <https://psc.edu/index.php/user-resources/software/genedoc>.

Nickerson, D.A., Tobe, V.O., Taylor, S.L., 1997. PolyPhred: Automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res.* 25, 2745–2751. doi:10.1093/nar/25.14.2745

Nielsen, H., n.d. SignalP 4.1 Server [web]. URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166–7. doi:10.1093/bioinformatics/bts091

- Oracle Corporation, 2015. MySQL [web]. URL: <https://www.mysql.com/>
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2766–2770.
- Orti, G., Hare, M.P., Avise, J.C., 1997. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol Ecol* 6, 575–580.
- Paccoud, B., Bourguignon, J., Diarra-Mehrpour, M., Martin, J.P., Sesboue, R., 1998. Transverse formamide gradients as a simple and easy way to optimise DNA single-strand conformation polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res* 26, 2245–2246.
- Pariset, L., Cappuccio, I., Joost, S., D’Andrea, M., Marletta, D., Ajmone Marsan, P., Valentini, a, 2006. Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as evidence of selection. *Anim. Genet.* 37, 290–2. doi:10.1111/j.1365-2052.2006.01441.x
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786. doi:10.1038/nmeth.1701
- Prlić, A., Yates, A., Bliven, S.E., Rose, P.W., Jacobsen, J., Troshin, P. V, Chapman, M., Gao, J., Koh, C.H., Foisy, S., Holland, R., Rimsa, G., Heuer, M.L., Brandstätter-Müller, H., Bourne, P.E., Willis, S., 2012. BioJava: an open-source framework for bioinformatics in 2012. *Bioinformatics* 28, 2693–2695. doi:10.1093/bioinformatics/bts494
- R Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rahmatalla, S., Müller, U., Strucken, E., Reissmann, M., Brockmann, G., 2011. The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle. *J. Appl. Genet.* 52, 459–465. doi:10.1007/s13353-011-0051-3
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., Moorman, A.F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339, 62–66.
- Riquet, J., Coppieters, W., Cambisano, N., Arranz, J.-J., Berzi, P., Davis, S.K., Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Mni, M., Simon, P., Taylor, J.F., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Womack, J.E., Georges, M., 1999. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9252–9257.
- Ron, M., Heyen, D.W., Weller, J.I., Band, M., Feldmesser, E., Pasternak, H., Da, Y., Wiggans, G.R., Vanraden, P.M., Ezra, E., Lewin, H.A., 1998. Detection and analysis of a locus affecting milk concentration in the us and Israeli dairy cattle populations, in: *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Armidale NSW Australia, (6WCCALP Congress, Armidale, Australia), pp. 422–425.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J., Moorman, A.F., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the

- analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37, e45. doi:gkp045 [pii] 10.1093/nar/gkp045
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944–945.
- Rutledge, R.G., Côté, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31, e93.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, New York.
- Sansinforiano, M.E., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Parejo, J.C., Mendoza, M.H. de, Padilla, J.Á., 2001. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. *Rev. Iberoam. Micol.* 18, 65–69.
- Sarkar, D., 2008. *Lattice: Multivariate Data Visualization with R.* Springer, New York. Disponible en: <http://lmdvr.r-forge.r-project.org>
- Sarkar, F.H., Valdivieso, M., Borders, J., Yao, K.L., Raval, M.M., Madan, S.K., Sreepathi, P., Shimoyama, R., Steiger, Z., Visscher, D.W., al., et, 1995. A universal method for the mutational analysis of K-ras and p53 gene in non-small-cell lung cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 4, 266–273.
- Sarkar, G., Yoon, H.S., Sommer, S.S., 1992. Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res* 20, 871–878.
- Scatà, M.C., Napolitano, F., Casu, S., Carta, a., De Matteis, G., Signorelli, F., Annicchiarico, G., Catillo, G., Moioli, B., 2009. Ovine acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1- molecular characterization, polymorphisms and association with milk traits. *Anim. Genet.* 40, 737–742. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01909.x
- Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E., Sandstrom, D.W., Stone, E.M., 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16, 325–332.
- solid IT, 2015. DB-Engines Ranking of Relational DBMS [web]. URL: <http://db-engines.com/en/ranking/relational+dbms>
- Sourceforge, 2015. Windows Data Formats Software [web]. URL: <http://sourceforge.net/directory/development/data-formats/os:windows/freshness:recently-updated/>
- Spinardi, L., Mazars, R., Theillet, C., 1991. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 19, 4009.
- Staden, R., Beal, K.F., Bonfield, J.K., 2000. The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.* 132, 115–130. doi:10.1385/1-59259-192-2:115
- Stratagene, 2006. pBlueScript II Vectors [web]. URL: <http://www.genomics.agilent.com/en/Cloning-Vectors/pBlueScript-II-Vectors/?cid=AG-PT-115&>

- The PostgreSQL Global Development Group, 2015. PostgreSQL [web]. URL: <http://www.postgresql.org/>
- TortoiseSVN team, 2004. TortoiseSVN - Home [web]. URL: <http://tortoisesvn.net/>
- Valinsky, A., Shani, M., Gootwine, E., 1990. Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number. *Anim. Biotechnol.* 1, 135–144.
- Varejão, M. do C., 2003. Estudo do gne da hormona do crescimento em caprinos da raça Serrana Transmontana. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Vila Real (Documento científico no publicado).
- Varma, S., Kwok, S., Ebner, K.E., 1989. Cloning and nucleotide sequence of ovine prolactin cDNA. *Gene* 77, 349–359.
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S*, Fourth. ed. Springer, New York. Disponible en: <http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4>
- Wallis, M., Lioupis, A., Wallis, O.C., 1998. Duplicate growth hormone genes in sheep and goat. *J. Mol. Endocrinol.* 21, 1–5.
- Waters, S.M., McCabe, M.S., Howard, D.J., Giblin, L., Magee, D.A., MacHugh, D.E., Berry, D.P., 2011. Associations between newly discovered polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein–Friesian dairy cattle. *Anim. Genet.* 42, 39–49. doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02087.x
- Wells, J.A., 1996. Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1–6.
- Westburg, 2015. MDE Gel Solution for SSCP and heteroduplex analysis › Westburg [web]. URL: <https://www.westburg.eu/products/genomics-research/dna-genome-analysis/snp-genotyping/mde-gel-solution>
- Wikipedia, 2015. Scientific Data formats [web]. URL: http://fileformats.archiveteam.org/wiki/Scientific_Data_formats
- Winter, A., Kraämer, W., Werner, F.A.O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J.E., Thaller, G., Fries, R., 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *PNAS* 99, 9300–9305.
- Wood, D.C., Salsgiver, W.J., Kasser, T.R., Lange, G.W., Rowold, E., Violand, B.N., Johnson, A., Leimgruber, R.M., Parr, G.R., Siegel, N.R., Kimack, N.M., Smith, C.E., Zobel, J.F., Ganguli, S.M., Garbow, J.R., Bild, G., Krivi, G.G., 1989. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PITUITARY BOVINE SOMATOTROPIN. *J. Biol. Chem.* 264, 14741–14747.
- Yamano, Y., Abe, M., Sakai, S., Komano, T., Utsumi, K., Iritani, A., 1991. Structural Analysis of Repetitive DNA Sequences in the Goat Growth Hormone Gene Region. *Agric. Biol. Chem.* 55, 633–639.
- Yeh, T.C., Pellegrini, S., 1999. The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and

their role in signaling. *Cell Mol Life Sci* 55, 1523–1534.

ANEXOS

8 Anexos.

8.1 Anexo I. Ayuda de la Base de Datos de Experimentos.

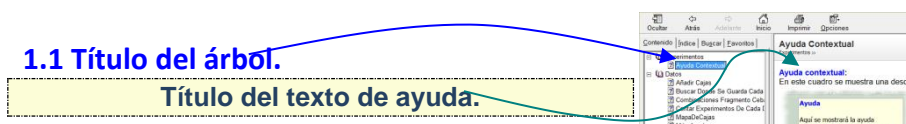
8.1.1 Introducción

Este documento contiene la ayuda completa de la Base de Datos de Experimentos. Esto es: la recopilación de todos los textos de ayuda de los diferentes formularios, consultas, tablas e informes que están contenidos en el archivo de ayuda en línea del programa (extensión *.chm*; se puede consultar al pulsar la tecla F1).

Los textos se presentan ordenados por secciones que corresponden con las pestañas del formulario Inicio. El orden de las subsecciones es alfabético.

En el capítulo de Introducción se presentan las pautas para comprender y utilizar mejor este documento.

Cada texto de ayuda es específico de un formulario, consulta, tabla o informe de la base de datos. Para cada uno se muestran 2 títulos: el del árbol lateral, en color azul y el del texto de ayuda (recuadrado). Estos son los formatos:



El “título del árbol lateral” es el texto que se muestra en el árbol lateral del archivo de ayuda. Su numeración representa al esquema jerárquico que tiene en este documento. Suele ser corto y telegráfico, para que pueda visualizarse en el limitado espacio horizontal de que se dispone. Además, pretende ser lo más parecido posible al texto del botón que lo lanza.

El “título del texto de ayuda” suele ser similar al anterior pero no necesita respetar la limitación de espacio.

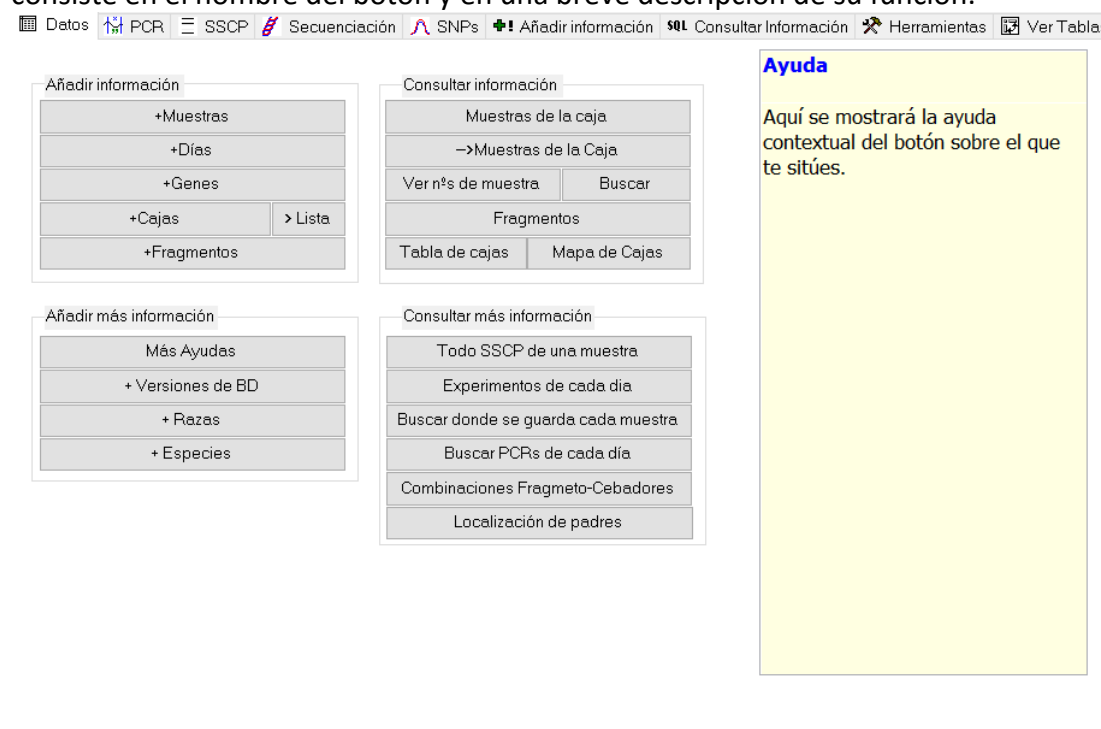
La abreviatura para el ácido desoxirribonucleico es ADN en español. Equivale al inglés DNA. Dado que este documento está escrito en español, se utiliza la abreviatura ADN en los textos. Sin embargo, como en el laboratorio es más frecuente utilizar la abreviatura inglesa (DNA), se ha utilizado DNA en los títulos y textos de la Base de Datos de Experimentos. Por ello, en este documentos se pueden encontrar ambas formas. La abreviatura DNA se utiliza en los títulos y botones de la base de datos; la abreviatura ADN se utiliza en los textos que explican su función.

El final de cada texto de ayuda se indica mediante una barra horizontal como esta:

8.1.2 Experimentos

Esta es la ayuda de la base de datos de experimentos.

El formulario "Inicio" es el cuadro de mandos de la aplicación. Desde él se puede introducir y consultar la información de la base de datos. Cuando el ratón pasa sobre cada botón aparece la [ayuda contextual](#) en el cuadro de la derecha. Esta ayuda consiste en el nombre del botón y en una breve descripción de su función.



Actualmente, la base de datos recoge información general del laboratorio y de experimentos de PCR, SSCP, secuenciación y SNPs. El programa permite consultar y añadir información. Para facilitar el acceso a la información, el formulario de inicio está organizado en pestañas. Algunas pestañas son específicas de un tipo de experimento (PCR, SSCP, Secuenciación, SNPs). Otras son específicas de un tipo de operación (Añadir o consultar). Como norma general, las pestañas de cada tipo de experimento se subdividen según el tipo de operación y las pestañas de cada tipo de operación agrupan sus controles en función del experimento al que hacer referencia. Además hay pestañas que contienen utilidades para la base de datos y accesos directos a la información en bruto (tablas).

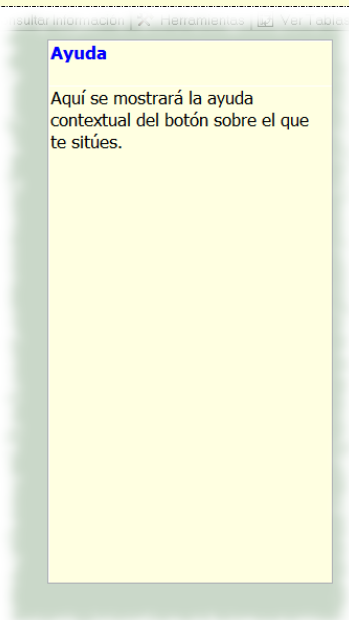
En detalle, estas pestañas son:

- **Datos:** Esta pestaña almacena datos generales del laboratorio y del programa. Los controles de consulta y de adición de información están agrupados (Añadir información y Consultar información). Los controles menos habituales se agrupan bajo el epígrafe "más información" (Añadir más información y Consultar más información).
- **PCR:** Esta pestaña almacena datos de PCRs. La agrupación de los controles es similar a la pestaña Datos. Además tiene un botón que permite buscar rápidamente condiciones de PCR en las que, posiblemente, haya algún error de temperatura.

- **SSCP:** Esta pestaña permite controlar los datos de los experimentos de SSCP. La agrupación de los controles es similar a la de la pestaña Datos. Desde aquí se puede lanzar un asistente para introducir datos de SSCP.
- **Secuenciación:** Esta pestaña permite controlar los datos de secuenciación. La agrupación de los controles es similar a la pestaña Datos.
- **SNPs:** Esta pestaña permite controlar los datos de experimentos de SNPs. La agrupación de los controles es similar a la pestaña Datos. Además contiene controles para manejar datos de genotipado externos.
- **Añadir Información:** En esta pestaña se agrupan controles que permiten añadir información a la base de datos. Es un extracto de los controles habituales de las pestañas anteriores, y como tal se agrupan.
- **Consultar Información:** En esta pestaña se agrupan controles que permiten consultar información de la base de datos. Es un extracto de los controles habituales de las pestañas anteriores, y como tal se agrupan.
- **Herramientas:** Los controles de esta pestaña permiten acceder a herramientas de utilidad para la base de datos. Suelen ser herramientas externas al programa.
- **Ver tablas:** Esta pestaña contiene botones que dan acceso a los datos, en bruto, de cada tabla. Esto permite consultar o modificar la información tal y como se almacena en la base de datos.

8.1.2.1 Ayuda Contextual

Ayuda contextual:



En este cuadro se muestra una descripción de la función del botón sobre el que está el ratón.

En azul se imprime el nombre del último botón sobrevolado.

Debajo, en negro, se presenta una descripción más de tallada de la función del botón.

8.1.3 Datos

En esta pestaña se manejan y consultan los datos generales del programa.

Los botones están agrupados de la siguiente manera:

- **Añadir información:** Estos botones lanzan los formularios de adición de información más habituales. Permiten manipular los datos más importantes de la aplicación.
- **Añadir más información:** Estos botones también permiten añadir información a la base de datos pero su uso es menos frecuente.
- **Consultar información:** Estos botones lanzan las consultas e informes más habituales. Permiten consultar los datos más importantes de la aplicación.
- **Consultar más información:** Estos botones lanzan consultas que pueden resultar útiles en determinados momentos pero que no son tan habituales como los del grupo anterior.

8.1.3.1 Añadir Cajas


Añadir Cajas:

Formulario para declarar los nombres de las cajas de muestras utilizadas en los estudios. Se considera caja a cualquier agrupación de muestras, pero debe tener un nombre único, diferente a las demás.

Los datos requeridos para añadir una caja son:

- Caja: El Nombre con el que se conocerá a la caja en la base de datos.
- Fecha de creación: Fecha de creación de la caja.
- Comentarios. Información adicional.

Este formulario contiene una serie de **botones adicionales** para el manejo de las cajas:


-  **Abrir Formulario:** Este botón muestra el [formulario de información de la caja](#). Representa los pocillos ocupados de cada una de las cajas en un color diferente según la raza a la que pertenezcan. Pulsando en cada botón se accede a la información de la muestra.

Fecha: Caja:

Comentarios:


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

Leyenda: Churra, Assaf, Awassi, Castellana, Lacaune, Latxa, Manchega, Merino, Milchscharf, Arouquesa, Cachena, Frisona, Lidia, Maronês, Mirandês, Sayaguesa,

-  **Ejecutar consulta:** Este botón muestra la tabla dinámica "Tabla de cajas". Esta tabla permite consultar y combinar los datos de 1 ó más cajas de la base de datos. Para cada posición se visualizan el número ID y el nombre de la muestra.

Caja:

	6	7	8	9
Nomb - Mues - Nomb - Mues - Nomb - Mues - Nomb - Mues -	LACHA	285 AE-804	293 LE 5540	301 SM 41
L 2	286 ES 019	294 SA 9798	302 SM 42	309 69808 (L
L 3	287 RB 715	295 SA 8274	303 SM 43	310 GW 797
L 4	288 JL+324	296 SA 7868	304 SM 44	311 GE-102
MI 1	289 AC-713	297 P 5419	305 SM 45	312 BR-102
MI 2	290 JR 701	298 SA 1031	306 SM 39	313 DQ-102
MI 3	291 FN 9507	299 P 4738	307 SM 40	314 BR 9701
MI 4	292 TM 865	300 VA 4082	308 SM 48	315 K. 9730
LA 2	275 LA 2	283 MI 3	291 FN 9507	299 P 4738
LA 5	276 LA 5	284 MI 4	292 TM 865	300 VA 4082

-  **Ver muestras:** Crea una consulta de las muestras de una caja. Permite seleccionar la caja a consultar:

Caja:

Y después muestra la tabla de información de la caja.

Caja	Nombre	Fila	Columna	Número	Raza	Muestra
PadresDeOAR22	BR10330	A	1	1	Churra	3182
PadresDeOAR22	BR10432	A	3	17	Churra	3183
PadresDeOAR22	BR10448	A	5	33	Churra	3184

-  **Ver las muestras de una caja:** Crea un informe con los datos de una caja.

Permite seleccionar la caja a consultar:

Caja: 11 primeros machos de churra 1.1

Consultar 11 primeros machos de churra 1.1

Y después crea el informe sobre esa caja.

Caja

Muestra

Lunes, 8 de mayo de 2006

10

SEA DE UN SOLO TIPO DE ANIMALES DE DNA EN 100% DE LOS CASOS. SI EL VOLUMEN DE LOS DATOS ES DE 100, LOS DATOS.

11 primeros machos de churra 1.1			
Número	Nombre	Porción	Raza
1	BR 10330	A1	Churra
2	BR 10432	B1	Churra
3	BR 10448	C1	Churra
4	BR 10500	D1	Churra
5	BR 10500	E1	Churra
6	BR 10500	F1	Churra
7	BR 10500	G1	Churra
8	BR 10500	H1	Churra
9	BR 10500	I1	Churra
10	BR 10500	J1	Churra

Lunes, 21 de agosto de 2006

Página 1 de 1

8.1.3.2 Buscar Donde Se Guarda Cada Muestra

Buscar donde se guarda cada muestra:

Esta consulta permite localizar todas las cajas en las que se ha empleado una muestra a partir del nombre que la identifica en el laboratorio.

En primer lugar se muestra un formulario para elegir el nombre de la muestra seleccionada.

Animal:

Al pulsar en "Consultar ..." se presenta una tabla con los datos de las cajas en las que se ha utilizado esa muestra.

Nombre	Caja	Raza	Número	Fila	Columna
54900	Muestras para variabilidad	Churra	77 E	10	
54900	2 Muestras para variabilidad	Churra	69 E	10	

Esta figura muestra un error de asignación del número. En la caja "2 Muestra para variabilidad" se ha asignado el número 69 a la posición E10 cuando debería ser el 77. Para corregir este error se debe abrir el formulario [Añadir Muestras](#) y corregirlo. Al volver a pulsar en este botón, la consulta muestra que los datos se han corregido.

Nombre	Caja	Raza	Número	Fila	Columna
54900	Muestras para variabilidad	Churra	77 E	10	
54900	2 Muestras para variabilidad	Churra	77 E	10	

8.1.3.3 Buscar Números de Muestra

Buscar números de muestra:

Sirve para localizar la posición en la caja de los padres introducidos en la base de datos. Llama al [formulario de búsqueda del número de muestras](#).

8.1.3.4 Combinaciones Fragmento Cebador

Combinaciones de fragmento más cebadores UP y DN:

Abre un formulario que recoge los accesos a las consultas que permiten organizar las asignaciones de los fragmentos a sus cebadores UP y DN. Permite detectar errores como la misma combinación de cebadores asignada a distintos fragmentos o fragmentos que tienen asignada más de una combinación de cebadores.

Combinaciones de fragmentos y cebadores UP y DN.

Buscar:

Ejecutar:

Este formulario tiene 3 botones para realizar distintos tipos de consultas (Combinaciones, Programas y Fragmento) y uno para ejecutar una modificación masiva de datos (Ejecutar).

Combinaciones: Este botón permite ver la cantidad de combinaciones de cebadores que se han asignado a un fragmento. En principio, cada fragmento está definido en esta base de datos como la secuencia comprendida entre una pareja de cebadores. Si se encontrase más de una combinación para cada fragmento se habría detectado un error que debería ser corregido.

En primer lugar se permite elegir el fragmento a consultar:

Fragmento:

DGAT1-E1

Consultar DGAT1-E1

Después se muestra la combinación de fragmentos que lo definen.

Fragmento	Cebador UP	Cebador DN	Recuento	PrimeroDeProtocolo PCR
DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN	11	PCR-DGAT1-E1<483

Además de los cebadores UP y DN se muestra el número de protocolos de PCR en los que ha participado y el primero de ellos.

Programas: Consulta los programas de PCR para un fragmento.

En primer lugar se permite elegir el fragmento a consultar:

Fragmento:

DGAT1-E1

Consultar DGAT1-E1

Al pulsar en Consultar ... se muestra la lista de los programas de PCR para ese fragmento y los cebadores utilizados en él.

Protocolo PCR	Fragmento	Cebador UP	Cebador DN
PCR-DGAT1-E1<483	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<485	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<494	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<496	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<502	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<504	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<517	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<518	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<519	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<560	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
PCR-DGAT1-E1<807	DGAT1-E1	DGAT1-E1 UP	DGAT1-E1 DN
*			

Fragmento: Consulta la lista de fragmentos que se ha registrado entre una combinación de un fragmento UP y otro DN.

En primer lugar se piden los cebadores UP y DN que delimitarán al fragmento.

Cebador:

DGAT1-E3 UP

Consultar DGAT1-E3 UP

Cebador:

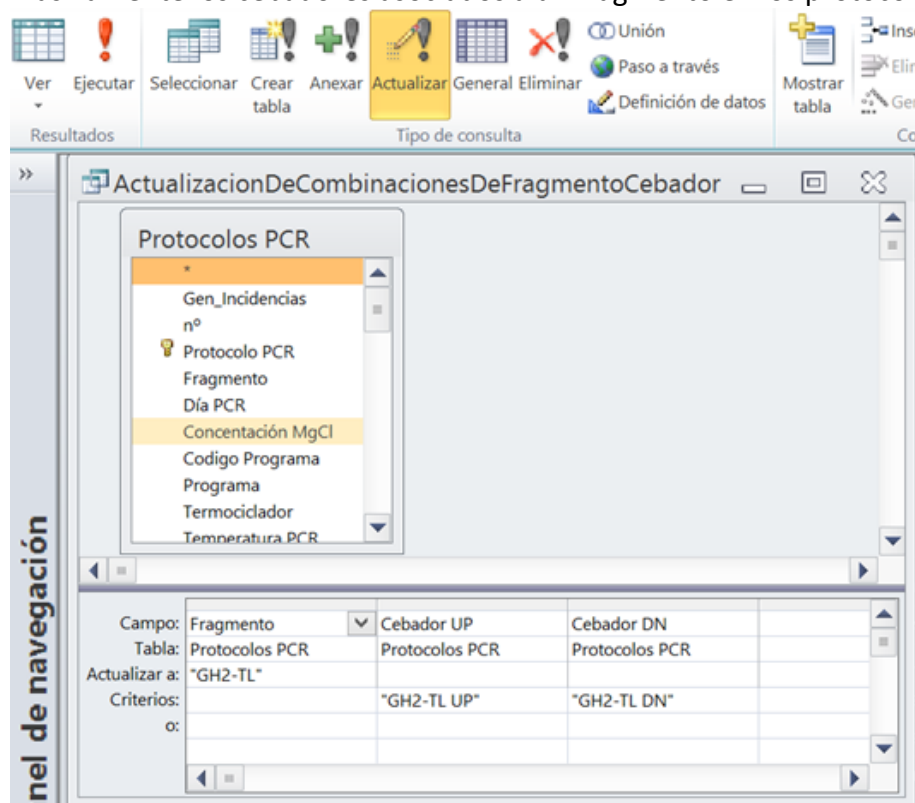
DGAT1-E3 DN

Consultar DGAT1-E3 DN

Después se muestra la lista de fragmentos que están registrados con esa combinación de fragmentos. Si se encontrase más de una se habría localizado un error.

Cebador UP	Cebador DN	Fragmento	Número de PCRs
DGAT1-E3 UP	DGAT1-E3 DN	DGAT1-E3	3

Ejecutar: Este botón crea una consulta, en modo de actualización, para modificar masivamente los cebadores asociados a un fragmento en los protocolos de PCR.



Este tipo de consultas requiere saber utilizar el editor visual de consultas de Access (que es muy intuitivo) o el lenguaje de consultas SQL.

Pulsando el botón Ver se pueden comprobar las filas que van a verse afectadas por la consulta.

Pulsando el botón Ejecutar se corre la consulta y se fijan los cambios.

8.1.3.5 Contar Experimentos De Cada Día

Experimentos de cada día:

Abre una consulta que recuenta los experimentos de SSCP registrados cada día.

Día	Experimentos realizados
30/09/2005	1
03/10/2005	1
04/10/2005	2
07/10/2005	1
10/10/2005	1
11/10/2005	2
13/10/2005	2
14/10/2005	3
17/10/2005	1
18/10/2005	6
20/10/2005	2
30/10/2005	1
02/11/2005	1
03/11/2005	1
07/11/2005	4

8.1.3.6 MapaDeCajas

Mapa de cajas:

Este formulario representa los pocillos ocupados de cada una de las cajas en un color diferente según la raza a la que pertenezcan.

Fecha: Caja:

Comentarios:

Está formada por los tubos de DNA stock.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

Leyenda: Churra, Assaf, Awassi, Castellana, Lacaune, Latxa, Manchega, Merino, Milchscharf, Arouquesa, Cachena, Frisona, Lidia, Maronês, Mirandês, Sayaguesa,

Tiene los siguientes campos:

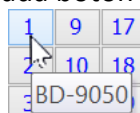
Caja: El nombre de la caja.

Fecha: La fecha de creación de la caja.

Comentarios: Información adicional.

Botones de muestras: Para cada muestra se dispone de un botón colocado en las mismas coordenadas que dicha muestra, cuyo número se corresponde con el número de la posición de la muestra y cuyo color depende de la raza de dicha muestra. Al pulsar en el botón de cada muestra se lanza el [formulario de edición de muestras](#) con sus datos cargados en él.

Cuando el ratón pasa por encima de cada botón se presenta el nombre del animal.



8.1.3.7 Más Ayudas

Añadir Ayudas:

Formulario para redactar o consultar los textos de ayuda de la base de datos.

Cada formulario de la base de datos puede llamar a un texto de ayuda específico. Estos formularios están dotados de un botón “?” que llama al texto de ayuda específico para dicho formulario. El usuario de la base de datos puede consultar, corregir, agregar o eliminar el texto de ayuda. Cuando el usuario encuentra que un texto está incompleto o incorrecto puede completarlo o corregirlo.

Al estar almacenados en la base de datos pueden ser consultados y editados de forma rápida y dinámica por los usuarios reales del sistema. La idea es que, con este procedimiento, se vayan recogiendo y curando las anotaciones necesarias para crear ayudas y documentación de la base de datos, y que estos textos sean realmente útiles para el usuario y no un mero listado de controles. Así, resolverán problemas reales que al usuario se le puedan plantear.

Título

2 Categoría: **Ayuda general para el formulario: añadir muestras secuenciadas**

+ ayuda

Ayuda:

Instrucciones:

- Rellena sólo los campos con fondo blanco. Los demás son de información para que resulte más fácil comprobar que se han introducido los datos correctamente.
- La orientación marca el sentido en que está almacenada la secuencia. Así UP indica 5'→3' y DN 3'→5'.
- La secuencia de referencia es la secuencia en la que se basa y que puede servir para establecer un origen de coordenadas con el que numerar las bases para navegar. Suele elegirse como secuencia de referencia la secuencia consenso del alineamiento. Conviene que la secuencia de referencia contenga todas las inserciones del

Los campos necesarios para introducir una ayuda en la base de datos son:

Categoría: Especifica el tipo de ayuda de que se trata.

Título: Una frase, lo más descriptiva posible, que resume el contenido del texto de ayuda.

Ayuda: El texto completo de ayuda.

Además, el formulario está dotado con el siguiente botón:

Más categorías: Llama al formulario que permite declarar más categorías de ayudas en la base de datos.

Categoría de ayuda

ayuda

Características

ayuda en general

El formulario permite introducir estos campos:

- **Categoría de ayuda:** Nombre de la categoría de ayudas.
- **Características:** Descripción de la categoría. Un breve texto que indica el objeto de esta categoría.

8.1.3.8 Más Días

Añadir días:

Abre un formulario que organiza los días de realización de los experimentos. Permite declarar nuevas *variantes de día* y consultar los experimentos recogidos en cada una de ellas.

Nombre del día: 29/10/03-1 nº: de variantes de este día: 7 Ver día: 29/10/2003

Día: 29/10/03 Variante: 1 Crear más variantes de este día:

Hoy Más protocolos de PCR PCR-GHR-E10<87 Verlo

Más protocolos de secuenciación SEC-GHR-E10<41 Verlo

Más protocolos de SSCP Verlo

Observaciones

Recuento de	Día	Variante
Protocolos de PCR	7	1
Protocolos Secuenciación	2	1
Protocolos de SSCP		
Muestras Secuenciadas	6	3
Experimentos SNP		
Protocolos MegaBACE		
Protocolos ABI		
Condiciones de carga MegaBACE		
Condiciones de carga ABI		

[Ayuda general del formulario +Días:](#)

-Este formulario sirve para indicar el día en el que has realizado un experimento, generando un número de variante, único, que debe ser asignado a cada experimento. Los nombres de día pueden repetirse entre los distintos tipos de experimento (PCR, secuenciación, etc.) pero no deberían hacerlo entre experimentos del mismo tipo porque se generaría una ambigüedad que el programa no es capaz de resolver.

El mecanismo de utilizar variantes de día puede parecer exótico o poco intuitivo. Para entender por qué se emplea hay que entender que esta base de datos pretende modelar un cuaderno de laboratorio. El eje que vertebra a todo diario es la fecha de cada entrada. De igual modo, el parámetro día es uno de los más importantes para el modelado de los datos recogidos en este programa. La forma más intuitiva de diferenciar unas entradas de otras es por fecha. Si varias entradas ocurren el mismo día se puede pedir al usuario que introduzca la hora, minutos y segundos de dicha ocurrencia. Es muy poco probable que en un laboratorio se generen varios experimentos en el mismo momento. Por consiguiente, una hora precisa podría ser utilizada como identificador único en la base de datos. Sin embargo, exigir al usuario que refleje con exactitud el momento en que se produce cada entrada es poco práctico. La dinámica de laboratorio a veces es frenética y los pasos de recogida de datos deben ser encajados en los huecos libres que dejan otros más urgentes. Es más práctico que el usuario anote que es la 2ª PCR del día (variante 2 del día) que anote que es la PCR de las 11:35 AM dado que este último dato podría dar una falsa sensación de precisión.

Es necesario entender que en la base de datos no puede haber 2 experimentos del mismo tipo con el mismo código de variante de día. Es especialmente importante que cada fragmento secuenciado el mismo día tenga una variante de día única porque, si no, es imposible saber el fragmento al que corresponde cada Muestra Secuenciada.

Modo de utilización:

-Introduce la fecha en la que se ha realizado el experimento en el cuadro correspondiente (los demás cuadros son consultas que se actualizarán cuando recargues el formulario). Se ha programado el formulario para que seleccione el mejor nombre de día posible. En principio no debería hacer falta modificar el nombre seleccionado. A partir de entonces ya se puede usar este nombre de día en los distintos experimentos. Debe tenerse en cuenta que el nombre de día es una cadena de texto, compuesta por la fecha en formato "dd/mm/aa", guión (-), y el número de orden (1, 2, 3, ...). Como identificador del día, en principio, debería valer con la cadena de texto de la fecha. Si hay más de una entrada por día es cuando se añade la variante al nombre, para diferenciarlo. En caso de que se realice más de un experimento, del mismo tipo, en un mismo día debe modificarse el nombre de la variante del día añadiendo el sufijo -1 y se crea otra variante de día con la misma fecha y el la extensión -2. Así se puede continuar hasta donde sea necesario.

- El botón "Crear más variantes de este día" introduce en la base de datos tantas variantes de día como estén especificadas en el cuadro adjunto. Se genera según la formula expuesta anteriormente a partir del número siguiente al último introducido. Por ejemplo, si se pide crear una variante de un día que sólo tiene una:

Crear más variantes de este día:

Se obtiene la variante número 2:

Voy a añadir de la variante 2 a la 2

Aceptar Cancelar

Si se pide añadir 5 variantes más:

Crear más variantes de este día: 5

Se obtiene las variantes de la 3 a la 7:

Voy a añadir de la variante 3 a la 7

Aceptar Cancelar

Controles adicionales:

-El "nº de variantes de este día" es un campo calculado que te informa de la cantidad de ellas que tiene el día seleccionado.

-“Ver día” sirve para filtrar, de manera gráfica y rápida, todos los datos para un día concreto.

-El botón “Hoy” escribe la fecha actual en el cuadro de texto “Día”. Si el formulario ya contiene un día, pide confirmación para evitar sustituciones accidentales.

-Las flechas azules que hay junto al botón “Hoy” permiten filtrar el formulario para que únicamente muestre sendos días anterior o posterior al actual. Las flechas rojas permiten navegar entre las variantes anterior o posterior a la actual respectivamente. Se desactivan cuando no hay datos en la posición a la que se debería navegar.



-El botón "Actualizar" vuelve a consultar los datos del día y actualiza la información que se muestra en el formulario.

Detección de errores:

-Se ha colocado una tabla informativa en la que se recuentan el número de apariciones de cada día, y de sus variantes, en cada tipo de experimentos de esta base de datos.

Podría servir para detectar errores en la introducción de datos en el programa. Así, sólo debería haber una variante para los protocolos de PCR, secuenciación y SSCP. El número se destaca en rojo en caso de haber más, indicando que los datos de ese día deberían ser revisados. Para todos los días deberían encontrarse al menos 2 datos, el nº de apariciones en el día en, al menos, uno de los experimentos y el número de apariciones de la variante del día. Si no es así, ese día deberá revisarse.

8.1.3.9 Más Especies

Añadir Especies:

Formulario para declarar las especies a las que pertenecen las muestras.

Para declarar una especie son necesarios estos datos:

- Especie: El nombre con el que se conocerá a la especie en la base de datos. Equivale al nombre común en la vida real.

- Nombre científico: Nombre científico de la especie. Reconocido Internacionalmente.
- Comentarios: Información adicional sobre la especie.

Especie	Oveja
Nombre científico	<i>Ovis aries</i>
Comentarios	<div style="border: 1px solid black; height: 40px;"></div>

La especie es el nivel taxonómico superior que maneja esta base de datos.

La taxonomía completa es:

Especia > Raza > Muestra.

8.1.3.10 Más Fragmentos

Añadir Fragmentos:

Formulario para declarar los nombres de los fragmentos. Puede ser fragmento cualquier segmento de un gen. El fragmento se define como la secuencia entre los dos cebadores de PCR, el UP y el DN. Dada esta definición, no debería haber más de 1 combinación de cebadores para cada fragmento.

Los datos necesarios para declarar un fragmento son:

- **Fragmento:** El nombre del fragmento.
- **Gen:** El gen al que pertenece ese fragmento.
- **Comentarios:** Información adicional.

Fragmento

Gen ▼

Comentarios: ▲

Cebadores empleados en PCR

<input type="button" value="▶"/>	GH2-5'2 UP	<input type="button" value="ver"/>	GH2-E2 DN	<input type="button" value="ver"/>
----------------------------------	------------	------------------------------------	-----------	------------------------------------

Los cebadores que se emplean para amplificar el fragmento se asignan en el formulario de creación de protocolos de PCR. El formulario de creación de cebadores sugiere el nombre de cada uno en función del nombre del fragmento que amplifican y su orientación. Al elegir un nombre de fragmento adecuado y único para cada combinación de fragmentos se facilita el procesamiento informático de los datos de las PCRs.

Para amplificar un mismo trozo de un gen (fragmento en terminología genética) pueden diseñarse varias combinaciones de cebadores distintos. Con objeto de mantener la información ordenada y facilitar el procesamiento informático conviene

dar a cada una de estas combinaciones un nombre de fragmento distinto. Se recomienda añadir sufijos o números al nombre para cada una de las variantes. Si se detecta más de una combinación de cebadores para un mismo fragmento de la base de datos, conviene crear un fragmento nuevo para cada nueva combinación de cebadores.

El botón “Ver PCRs” muestra los datos de las PCRs almacenadas para el fragmento actual.

Fragmento	Funciona	Falla	Protocolo PCR	Programa	Termociclador	Tª 2ª p	Día PCR	MgC	Betain	Glicero	Caja	Incidencias
GH-5prima2-E2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	PCR-GH-5prima2-E2<863	58-2 copiasf	2	58	25/05/05-5	0	0	0	Muestras para variabilidad 5'	
GH-5prima2-E2	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	PCR-GH-5prima2-E2<864	58-2 copiasf	2	58	25/05/05-6	0	0,7	0	Muestras para variabilidad 5' +Betaina	

8.1.3.11 Más Genes

Añadir Genes:

Formulario para declarar los genes en estudio.

Gen:

Abreviatura:

Nº de Fragmentos: 19

<input checked="" type="checkbox"/>	DGAT1-E1	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E10	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E11	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E12	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E13	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E14	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E15	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E16	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E17	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E2	ver
<input type="checkbox"/>	DGAT1-E3	ver

Los datos necesarios para declarar un gen son:

- **Gen:** El nombre del gen.
- **Abreviatura:** La abreviatura con la que se mostrará este gen en el programa. Los nombres de los fragmentos de este gen se sugerirán a partir de esta abreviatura.

El formulario muestra el número y nombre de los fragmentos del gen.

Pulsando el botón "Ver" de cada fragmento se carga el formulario de edición de dicho fragmento.

8.1.3.12 Más Muestras

Añadir muestras:

Abre un formulario para añadir los datos de cada muestra.

Los datos de una muestra son los siguientes:

- **Muestra:** El número de la muestra. Este es un código autonumérico generado por la base de datos. Será el identificador que represente a la muestra en esta base de datos.
- **Caja:** La caja de ADN en la que se encuentra la muestra.
- **Nombre:** Nombre de la muestra. Este nombre debería coincidir con el nombre que está anotado en el tubo de ADN.
- **Número:** Numero de la muestra. En una placa de 96 pocillos, los números se asignan consecutivamente por columnas. Así, la posición A1 tendrá el 1, la B1 el 2, ..., la A2 el 9, etc. Este formulario puede calcular automáticamente este número. Al introducir la información este campo se salta y se rellena automáticamente después de introducir los datos de posición. Si se encuentra un error en el campo basta con reescribir el campo "Columna" de los datos de posición y pulsar al intro. Este número se actualizará con los datos correctos para una placa de 96 pocillos. Si lo que se quiere es recalcular en número que corresponde a las coordenadas de posición basta con hacer doble clic.
- **Posición:** Este dato contiene las coordenadas del pocillo:

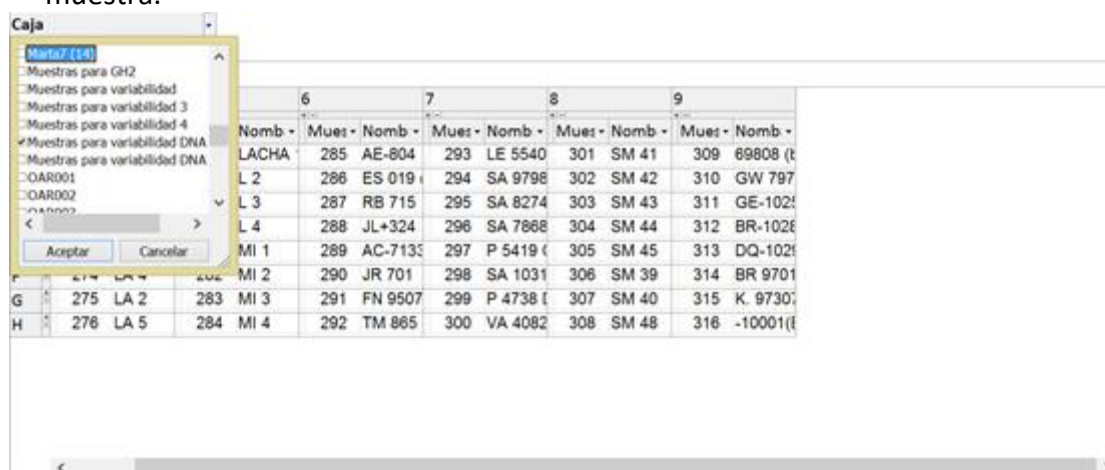
- Fila: La asignada a su fila (En una placa de 96 pocillos la coordenada fila varía entre la A y la H).
- Columna: El número de columna (En una placa de 96 pocillos la coordenada columna varía entre el 1 y el 12).
- **Raza:** Raza del animal.
- **Sexo:** Sexo del animal.
- **Año de valoración:** Año en que se realizaron las valoraciones registradas de leche y proteína.
- **Valoración leche:** Valoración genética del animal para la producción de leche.
- **Valoración proteína:** Valoración genética de la animal para la producción de proteína.
- **Padre:** Nombre del padre.
- **Madre:** Nombre de la madre.
- **Animal:** Código del animal en la base de datos de la que se extrajo la valoración. Lo ideal sería que coincidiese con el valor del campo Nombre, sin embargo, puede haber circunstancias que hagan que los códigos de identificación no coincidan exactamente.
- **Concentración del DNA Stock:** Concentración del ADN en microgramos / litro del ADN de partida.
- **nº intrafamiliar:** Código adicional empleado en el laboratorio para identificar a una muestra dentro de su familia.
- **Comentarios:** Información adicional.

Muestra	4084	+Cajas	Tabla de cajas
Caja	11-Elsa		
Nombre	PD04417	Número	30
Posición	F 4	Raza	churra
Sexo	Hembra	Año de valoración	2011
Valoración leche	28,97	Valoración proteína	-0,23 %
Padre	PADRE_GE10363	Madre	
Animal	PD04417		
Otros datos	Concentración DNA stock: 30 ng/microlitro		
	Tampón de Dilución: T10E0,5		
	nº intrafamiliar: 95		
Comentario	Familia 9		

Además de los datos, este formulario tiene varios botones que permiten realizar la siguientes acciones:

- **+Cajas** **Más cajas:** Permite añadir más [cajas](#) a la base de datos. Está pensado para acceder rápidamente al formulario de creación de una nueva caja desde muestras que pertenecen a una caja que aún no ha sido registrada en la base de datos.
- **Tabla de cajas** **Tabla de cajas:** Este botón muestra la tabla dinámica "Tabla de cajas". Esta tabla permite consultar y combinar los datos de 1 ó más cajas de la

base de datos. Para cada posición se visualizan el número ID y el nombre de la muestra.



- **Más Experimentos de SSCP:** Permite acceder rápidamente al formulario de edición de [muestras para experimentos de SSCP](#).

8.1.3.13 Más Razas

Añadir Razas:

Este formulario sirve para declarar razas y asignarlas a una especie.

Los datos necesarios para declarar una raza son los siguientes:

- Raza: El nombre de la raza.
- Especie: La especie a la que pertenece.

Raza	<input type="text" value="Arouquesa"/>
Especie	<input type="text" value="Bos taurus"/> <input type="button" value="+ Especies"/>

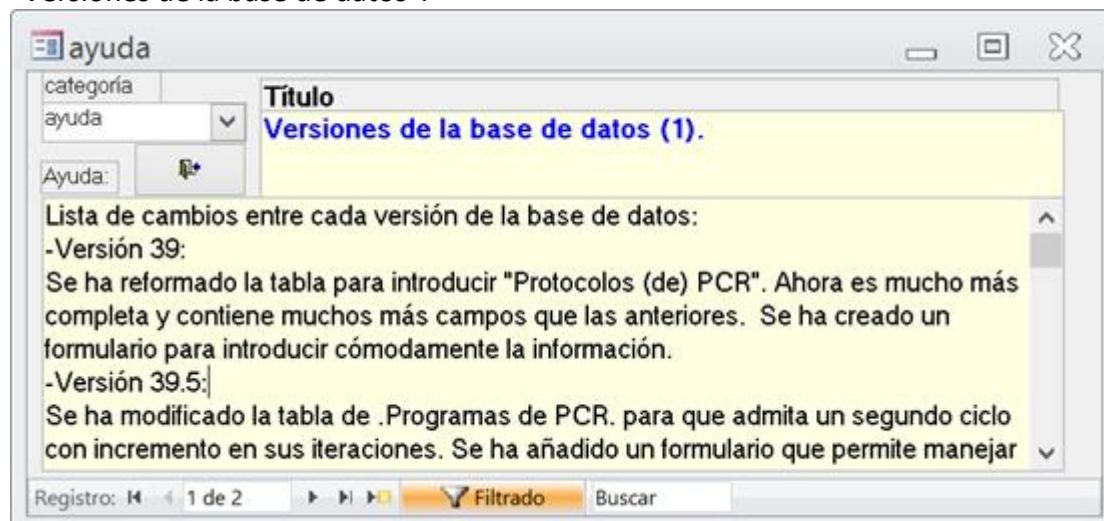
El botón "[+ Especies](#)" sirve para añadir una nueva especie a la base de datos.

8.1.3.14 Más Versiones Base De Datos

Añadir Versiones de la base de datos:

El sistema de ayuda permite recoger los cambios introducidos en la base de datos.

Mediante este botón se filtran los textos de ayuda cuyo título comienzan por "Versiones de la base de datos".



Esto constituye un rudimentario sistema que puede utilizarse como log para anotar los cambios que se van haciendo en la base de datos.

Como los cambios pueden ser muy abundantes y el texto en los campos está limitado por el sistema, esta bitácora se ha dividido en varios registros.

La bitácora completa se regenera anexando los textos de cada uno de los registros cuyo título comienza por "Versiones de la base de datos", en el orden indicado por el número entre paréntesis.

Este sistema tan simple permite que los desarrolladores de la base de datos incorporen el registro de cambios en la base de datos. El usuario de la base de datos no tiene por qué modificar estos registros.

El botón  cierra el formulario.

8.1.3.15 Ver Fragmentos

Ver fragmentos:

Consulta los fragmentos almacenados en la base de datos.

Fragmento	Gen
DGAT1-E1	Aciltransfera
DGAT1-E10	Aciltransfera
DGAT1-E11	Aciltransfera
DGAT1-E12	Aciltransfera
DGAT1-E13	Aciltransfera
DGAT1-E14	Aciltransfera
DGAT1-E15	Aciltransfera
DGAT1-E16	Aciltransfera
DGAT1-E17	Aciltransfera
DGAT1-E2	Aciltransfera
DGAT1-E3	Aciltransfera
DGAT1-E4	Aciltransfera
DGAT1-E5	Aciltransfera
DGAT1-E6	Aciltransfera
DGAT1-E7	Aciltransfera
DGAT1-E8	Aciltransfera
DGAT1-E8/2	Aciltransfera

Muestra el fragmento y el gen al que pertenece.

8.1.3.16 Ver Lista de Cajas

Ver Lista de Cajas:

Muestra una lista de cajas almacenadas. Desde ella se pueden consultar los datos de cada una de las cajas.

Lista de Cajas			
Caja	Fecha de creación	Comentarios	
Hijas de los machos de churra	12-ago.-00	DNA diluído al 5% en T10E0,2	
Juanjo SSCP	14-sep.-00	Esta es una caja de ADN de composición desconocida. Se utilizó co	
Muestras para variabilidad	20-sep.-00	Los "machos de churra con hijas", columnas 10 y 11, se añadieron a	
Assaff y Merino	20-sep.-00	Cuidado: Pudiera ser que algunas muestras adicionales (no assaf o	

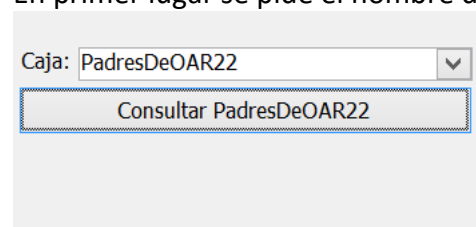
Al pinchar en el nombre de la caja se muestra el [formulario de adición de cajas](#) con los datos de la caja actual cargados en él.

8.1.3.17 Ver Muestras De La Caja

Ver las muestras de la caja:

Consulta las muestras de una caja.

En primer lugar se pide el nombre de la caja a consultar:



Caja:

Después se muestra una tabla con los datos de las muestras de esa caja:

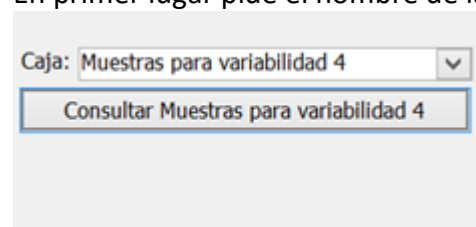
Caja	Nombre	Fila	Columna	Número	Raza	Muestra
PadresDeOAR22	BR10330	A	1	1	Churra	3182
PadresDeOAR22	BR10432	A	3	17	Churra	3183
PadresDeOAR22	BR10440	A	5	22	Churra	3184

8.1.3.18 Ver Muestras De La Caja Informe

Ver las muestras de la caja:

Consulta las muestras de una caja. Genera un informe idóneo para imprimir.

En primer lugar pide el nombre de la caja deseada.



Caja:

Al pulsar en el botón "Consultar ..." se genera el informe con la lista de muestras de esa caja, la fecha de creación de la caja y, si hubiera, los comentarios sobre esa caja.

Caja **Muestra:**
mañana 28 de noviembre de 2008 72

Muestras para variable 4

Número	Nombre	Partida	Eje	ID
1000001	A1	Churra	2059	
1000002	B1	Churra	2059	
1000003	C1	Churra	2059	
1000004	D1	Churra	2059	
1000005	E1	Churra	2059	
1000006	F1	Churra	2059	
1000007	G1	Churra	2059	
1000008	H1	Churra	2059	
1000009	I1	Churra	2059	
1000010	J1	Churra	2059	
1000011	K1	Churra	2059	
1000012	L1	Churra	2059	
1000013	M1	Churra	2059	
1000014	N1	Churra	2059	
1000015	O1	Churra	2059	
1000016	P1	Churra	2059	
1000017	Q1	Churra	2059	
1000018	R1	Churra	2059	
1000019	S1	Churra	2059	
1000020	T1	Churra	2059	
1000021	U1	Churra	2059	
1000022	V1	Churra	2059	
1000023	W1	Churra	2059	
1000024	X1	Churra	2059	
1000025	Y1	Churra	2059	
1000026	Z1	Churra	2059	
1000027	A2	Churra	2059	
1000028	B2	Churra	2059	
1000029	C2	Churra	2059	
1000030	D2	Churra	2059	
1000031	E2	Churra	2059	
1000032	F2	Churra	2059	
1000033	G2	Churra	2059	
1000034	H2	Churra	2059	
1000035	I2	Churra	2059	
1000036	J2	Churra	2059	
1000037	K2	Churra	2059	
1000038	L2	Churra	2059	
1000039	M2	Churra	2059	
1000040	N2	Churra	2059	
1000041	O2	Churra	2059	
1000042	P2	Churra	2059	
1000043	Q2	Churra	2059	
1000044	R2	Churra	2059	
1000045	S2	Churra	2059	
1000046	T2	Churra	2059	
1000047	U2	Churra	2059	
1000048	V2	Churra	2059	
1000049	W2	Churra	2059	
1000050	X2	Churra	2059	
1000051	Y2	Churra	2059	
1000052	Z2	Churra	2059	
1000053	A3	Churra	2059	
1000054	B3	Churra	2059	
1000055	C3	Churra	2059	
1000056	D3	Churra	2059	
1000057	E3	Churra	2059	
1000058	F3	Churra	2059	
1000059	G3	Churra	2059	
1000060	H3	Churra	2059	
1000061	I3	Churra	2059	
1000062	J3	Churra	2059	
1000063	K3	Churra	2059	
1000064	L3	Churra	2059	
1000065	M3	Churra	2059	
1000066	N3	Churra	2059	
1000067	O3	Churra	2059	
1000068	P3	Churra	2059	
1000069	Q3	Churra	2059	
1000070	R3	Churra	2059	
1000071	S3	Churra	2059	
1000072	T3	Churra	2059	
1000073	U3	Churra	2059	
1000074	V3	Churra	2059	
1000075	W3	Churra	2059	
1000076	X3	Churra	2059	
1000077	Y3	Churra	2059	
1000078	Z3	Churra	2059	
1000079	A4	Churra	2059	
1000080	B4	Churra	2059	
1000081	C4	Churra	2059	
1000082	D4	Churra	2059	
1000083	E4	Churra	2059	
1000084	F4	Churra	2059	
1000085	G4	Churra	2059	
1000086	H4	Churra	2059	
1000087	I4	Churra	2059	
1000088	J4	Churra	2059	
1000089	K4	Churra	2059	
1000090	L4	Churra	2059	
1000091	M4	Churra	2059	
1000092	N4	Churra	2059	
1000093	O4	Churra	2059	
1000094	P4	Churra	2059	
1000095	Q4	Churra	2059	
1000096	R4	Churra	2059	
1000097	S4	Churra	2059	
1000098	T4	Churra	2059	
1000099	U4	Churra	2059	
1000100	V4	Churra	2059	
1000101	W4	Churra	2059	
1000102	X4	Churra	2059	
1000103	Y4	Churra	2059	
1000104	Z4	Churra	2059	
1000105	A5	Churra	2059	
1000106	B5	Churra	2059	
1000107	C5	Churra	2059	
1000108	D5	Churra	2059	
1000109	E5	Churra	2059	
1000110	F5	Churra	2059	
1000111	G5	Churra	2059	
1000112	H5	Churra	2059	
1000113	I5	Churra	2059	
1000114	J5	Churra	2059	
1000115	K5	Churra	2059	
1000116	L5	Churra	2059	
1000117	M5	Churra	2059	
1000118	N5	Churra	2059	
1000119	O5	Churra	2059	
1000120	P5	Churra	2059	
1000121	Q5	Churra	2059	
1000122	R5	Churra	2059	
1000123	S5	Churra	2059	
1000124	T5	Churra	2059	
1000125	U5	Churra	2059	
1000126	V5	Churra	2059	
1000127	W5	Churra	2059	
1000128	X5	Churra	2059	
1000129	Y5	Churra	2059	
1000130	Z5	Churra	2059	
1000131	A6	Churra	2059	
1000132	B6	Churra	2059	
1000133	C6	Churra	2059	
1000134	D6	Churra	2059	
1000135	E6	Churra	2059	
1000136	F6	Churra	2059	
1000137	G6	Churra	2059	
1000138	H6	Churra	2059	
1000139	I6	Churra	2059	
1000140	J6	Churra	2059	
1000141	K6	Churra	2059	
1000142	L6	Churra	2059	
1000143	M6	Churra	2059	
1000144	N6	Churra	2059	
1000145	O6	Churra	2059	
1000146	P6	Churra	2059	
1000147	Q6	Churra	2059	
1000148	R6	Churra	2059	
1000149	S6	Churra	2059	
1000150	T6	Churra	2059	
1000151	U6	Churra	2059	
1000152	V6	Churra	2059	
1000153	W6	Churra	2059	
1000154	X6	Churra	2059	
1000155	Y6	Churra	2059	
1000156	Z6	Churra	2059	
1000157	A7	Churra	2059	
1000158	B7	Churra	2059	
1000159	C7	Churra	2059	
1000160	D7	Churra	2059	
1000161	E7	Churra	2059	
1000162	F7	Churra	2059	
1000163	G7	Churra	2059	
1000164	H7	Churra	2059	
1000165	I7	Churra	2059	
1000166	J7	Churra	2059	
1000167	K7	Churra	2059	
1000168	L7	Churra	2059	
1000169	M7	Churra	2059	
1000170	N7	Churra	2059	
1000171	O7	Churra	2059	
1000172	P7	Churra	2059	
1000173	Q7	Churra	2059	
1000174	R7	Churra	2059	
1000175	S7	Churra	2059	
1000176	T7	Churra	2059	
1000177	U7	Churra	2059	
1000178	V7	Churra	2059	
1000179	W7	Churra	2059	
1000180	X7	Churra	2059	
1000181	Y7	Churra	2059	
1000182	Z7	Churra	2059	
1000183	A8	Churra	2059	
1000184	B8	Churra	2059	
1000185	C8	Churra	2059	
1000186	D8	Churra	2059	
1000187	E8	Churra	2059	
1000188	F8	Churra	2059	
1000189	G8	Churra	2059	
1000190	H8	Churra	2059	
1000191	I8	Churra	2059	
1000192	J8	Churra	2059	
1000193	K8	Churra	2059	
1000194	L8	Churra	2059	
1000195	M8	Churra	2059	
1000196	N8	Churra	2059	
1000197	O8	Churra	2059	
1000198	P8	Churra	2059	
1000199	Q8	Churra	2059	
1000200	R8	Churra	2059	
1000201	S8	Churra	2059	
1000202	T8	Churra	2059	
1000203	U8	Churra	2059	
1000204	V8	Churra	2059	
1000205	W8	Churra	2059	
1000206	X8	Churra	2059	
1000207	Y8	Churra	2059	
1000208	Z8	Churra	2059	
1000209	A9	Churra	2059	
1000210	B9	Churra	2059	
1000211	C9	Churra	2059	
1000212	D9	Churra	2059	
1000213	E9	Churra	2059	
1000214	F9	Churra	2059	
1000215	G9	Churra	2059	
1000216	H9	Churra	2059	
1000217	I9	Churra	2059	
1000218	J9	Churra	2059	
1000219	K9	Churra	2059	
1000220	L9	Churra	2059	
1000221	M9	Churra	2059	
1000222	N9	Churra	2059	
1000223	O9	Churra	2059	
1000224	P9	Churra	2059	
1000225	Q9	Churra	2059	
1000226	R9	Churra	2059	
1000227	S9	Churra	2059	
1000228	T9	Churra	2059	
1000229	U9	Churra	2059	
1000230	V9	Churra	2059	
1000231	W9	Churra	2059	
1000232	X9	Churra	2059	
1000233	Y9	Churra	2059	
1000234	Z9	Churra	2059	
1000235	A0	Churra	2059	
1000236	B0	Churra	2059	
1000237	C0	Churra	2059	
1000238	D0	Churra	2059	
1000239	E0	Churra	2059	
1000240	F0	Churra	2059	
1000241	G0	Churra	2059	
1000242	H0	Churra	2059	
1000243	I0	Churra	2059	
1000244	J0	Churra	2059	
1000245	K0	Churra	2059	
1000246	L0	Churra	2059	
1000247	M0	Churra	2059	
1000248	N0	Churra	2059	
1000249	O0	Churra	2059	
1000250	P0	Churra	2059	
1000251	Q0	Churra	2059	
1000252	R0	Churra	2059	
1000253	S0	Churra	2059	
1000254	T0	Churra	2059	
1000255	U0	Churra	2059	
1000256	V0	Churra	2059	
1000257	W0	Churra	2059	
1000258	X0	Churra	2059	
1000259	Y0	Churra	2059	
1000260	Z0	Churra	2059	
1000261	A1	Churra	2059	
1000262	B1	Churra	2059	
1000263	C1	Churra	2059	
1000264	D1	Churra	2059	
1000265	E1	Churra	2059	
1000266	F1	Churra	2059	
1000267	G1	Churra	2059	
1000268	H1	Churra	2059	
1000269	I1	Churra	2059	
1000270	J1	Churra	2059	
1000271	K1	Churra	2059	
1000272	L1	Churra	2059	
1000273	M1	Churra	2059	
1000274	N1	Churra	2059	
1000275	O1	Churra	2059	
1000276	P1	Churra	2059	
1000277	Q1			

8.1.3.20 Ver PCRs De Cada Día

Ver PCRs de cada día:

Busca los protocolos de PCR realizados cada día.

En primer lugar se pide el día en que se realizó la PCR.

Día: ▼

Pulsando el botón “Consultar ...” se obtiene un listado con los protocolos de PCR que se realizaron ese día y el código de día asociado a dicho protocolo.

Día ▼	Código de día ▼	Protocolo PCR
11/11/2008	11/11/08-1	PCR-OXT_PCRa<951
11/11/2008	11/11/08-10	PCR-OXT_PCRb<960
11/11/2008	11/11/08-11	PCR-OXT_PCRb<961
11/11/2008	11/11/08-12	PCR-OXT_PCRb<962
11/11/2008	11/11/08-13	PCR-OXT_PCRb<963
11/11/2008	11/11/08-14	PCR-OXT_PCRb<964
11/11/2008	11/11/08-15	PCR-OXT_PCRb<965
11/11/2008	11/11/08-16	PCR-OXT_PCRb<966
11/11/2008	11/11/08-17	PCR-OXI-E2<967
11/11/2008	11/11/08-18	PCR-OXI-E2<968
11/11/2008	11/11/08-19	PCR-OXI-E2<969
11/11/2008	11/11/08-2	PCR-OXT_PCRa<952
11/11/2008	11/11/08-20	PCR-OXI-E2<970
11/11/2008	11/11/08-3	PCR-OXT_PCRa<953
11/11/2008	11/11/08-4	PCR-OXT_PCRa<954
11/11/2008	11/11/08-5	PCR-OXT_PCRa<955

8.1.3.21 Ver Tabla De Cajas

Ver tabla de cajas:

Presenta una tabla dinámica que representa las muestras de cada caja, o combinación de ellas, según su posición en la caja. Cada caja es una cuadrícula de 8 filas x 12 columnas. Para cada posición se visualizan el número ID y el nombre de la muestra.

Caja:

	6	7	8	9
Nomb	Mues	Nomb	Mues	Nomb
LACHA	285 AE-804	293 LE 5540	301 SM 41	309 69808 (t
L 2	286 ES 019	294 SA 9798	302 SM 42	310 GW 797
L 3	287 RB 715	295 SA 8274	303 SM 43	311 GE-102
L 4	288 JL+324	296 SA 7868	304 SM 44	312 BR-102
MI 1	289 AC-713	297 P 5419	305 SM 45	313 DQ-102
MI 2	290 JR 701	298 SA 1031	306 SM 39	314 BR 9701
G	275 LA 2	291 FN 9507	299 P 4738	307 SM 40
H	276 LA 5	284 MI 4	292 TM 865	300 VA 4082
			308 SM 48	316 -10001

Seleccionando más de una caja se puede comparar el contenido de varias cajas de forma muy visual:

Al pulsar en "Aceptar" se presenta una tabla con las muestras contenidas en cada pocillo, para las 2 cajas:

Caja												
(Varios elementos)												
	Columna											
	4		5		6		7		8		9	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Fila	Muestri	Nombre	Muestri	Nombre	Muestri	Nombre	Muestri	Nombre	Muestri	Nombre	Muestri	Nombre
A	269	M 1	277	LACHA 1	285	AE-804	293	LE 5540 G	301	SM 41	309	69808 (b)
	2117	M 1	2125	LACHA 1	2133	AE-804	2141	LE 5540 G	2149	4.1 Merinc	2157	69808 (b)
B	270	M 2	278	L 2	286	ES 019 (n	294	SA 9798 F	302	SM 42	310	GW 7976
	2118	M 2	2126	Lx 6	2134	ES 019 (n	2142	SA 9798 F	2150	SM 42	2158	GW 7976
C	271	M 49	279	L 3	287	RB 715	295	SA 8274 F	303	SM 43	311	GE-10254
	2119	M 49	2127	L 3	2135	RB 715	2143	SA 8274 F	2151	SM 43	2159	GE-10254
D	272	M 4	280	L 4	288	JL+324	296	SA 7868 F	304	SM 44	312	BR-10289
	2120	M4	2128	L 4	2136	JL+324	2144	SA 7868 F	2152	4.4 Merinc	2160	BR-10289
E	273	LA 3	281	MI 1	289	AC-7133	297	P 5419 Cc	305	SM 45	313	DQ-10296
	2121	LA 3	2129	MI 1	2137	AC-7133	2145	P 5419 Cc	2153	35.5 Merir	2161	DQ-10296
F	274	LA 4	282	MI 2	290	JR 701	298	SA 1031 E	306	SM 39	314	BR 97010
	2122	LA 4	2130	MI 2	2138	JR 701	2146	SA 1031 E	2154	35.3 Merir	2162	BR 97010
G	275	LA 2	283	MI 3	291	FN 95072	299	P 4738 Dc	307	SM 40	315	K. 97307
	2123	LA 2	2131	MI 3	2139	FN 95072	2147	P 4738 Dc	2155	MDBB 4-1	2163	K. 97307
H	276	LA 5	284	MI 4	292	TM 865	300	VA 4082 E	308	SM 48	316	-10001(B)
	2124	LA 5	2132	MI 4	2140	TM 865	2148	VA 4082 E	2156	MDBB 5-1	2164	-10001(B)

8.1.3.22 Ver Todo SSCP De Una Muestra

Todo SSCP de una muestra:

Muestra toda la información de SSCP disponible para una muestra. Es una consulta que permite modificar la información mostrada.

En primer lugar se pide el nombre del animal que se desea consultar.

Pulsando el botón "Consultar ..." se genera una tabla que integra la información de SSCP disponible para ese animal:

Muestra	Caja	Nombre	Fila	Columna	Nú	W	nº Geles	Matriz del gel	concentri	Prot
235 2 Muestras para variabilidad	BR 10154	A	10	65	15	2 Acrilamida 37,5:1	5 6-15			
235 2 Muestras para variabilidad	BR 10154	A	10	65	30	4 MDE	6-30			
235 2 Muestras para variabilidad	BR 10154	A	10	65	30	4 MDE	6-30			

8.1.4 PCR

En esta sección se pueden manejar las condiciones de PCR utilizadas y diseñar nuevas reacciones.

The interface includes a top navigation bar with tabs: Datos, PCR, SSCP, Secuenciación, SNPs, Añadir información, Consultar información, Herramientas, and Ver Tablas. The main content area is divided into several sections:

- Añadir información:** Contains buttons for '+Cebadores', '+Programas PCR', '+2 Ciclos', '+Protocolos PCR', and '=reducido'.
- Añadir más información:** Contains buttons for 'Más Termocicladores', '+ Tipos de PCR', '+Taq', and '+ Aditivos'.
- Consultar información:** Contains buttons for 'Cebadores', 'Programas de PCR', 'Programas de PCR por tipo de Taq', and '→Ver toda PCR de 1 fragmento'.
- Consultar más información:** Contains a link 'Abrir Protocolos de PCR', 'Buscar condiciones de PCR x fragmento', and 'Ver condiciones de PCR x fragmento'.
- Detección de errores:** Contains a button 'de Temperatura'.

A yellow box on the right contains the text: **Añadir protocolos de PCR:** Completísimo formulario para calcular y almacenar los datos de cada PCR. Está dotado de utilidades para simplificar la introducción de datos de PCRs similares mediante copiar y pegar. Puede comprobar la correcta introducción de los datos y permite imprimir los protocolos introducidos. Es más conveniente hacer los cálculos con este formulario, almacenarlos e imprimirlos antes de hacer los experimentos, que registrarlos después de haberlos experimentado.

Los botones están agrupados de la siguiente manera:

- **Añadir información:** Estos botones lanzan los formularios de adición de información más habituales. Permiten manipular los parámetros más importantes de la PCR.
- **Añadir más información:** Estos botones también permiten añadir información sobre las PCRs pero su uso es menos frecuente.
- **Consultar información:** Estos botones lanzan las consultas e informes más habituales.
- **Consultar más información:** Estos botones lanzan consultas o archivos que pueden resultar útiles en determinados momentos pero que no son tan habituales como los del grupo anterior.
- **Detección de errores:** Esta sección incorpora botones para detectar errores en los protocolos de PCR.

8.1.4.1 Más Aditivos

Añadir aditivos:

Almacena las características de los aditivos usados en los experimentos. Se utiliza para aditivos de PCR y para geles de SSCP.

Aditivo: ☐ Matriz de Gel

Unidad: ☒ PCR

Pureza del Stock:

Concentraciones utilizadas en los experimentos:

Concentración	Unidad
0,5	M
0,91	M
0	M
1	M
*	0

Registro: 5 de 5 Sin f

Los campos necesarios para almacenar un aditivo son los siguientes:

Aditivo: Identificador único con el que se conocerá al aditivo en la base de datos.

Unidad: Unidad de medida con la que se almacenará el aditivo en la base de datos.

Pureza del stock: Concentración del stock de ese aditivo.

Matriz de Gel: Indica a la base de datos que el aditivo puede utilizarse como matriz de gel. Así, en los lugares donde se requiera utilizar una matriz de gel, la base de datos propondrá a aquellos aditivos que tengan marcada esta casilla.

PCR: Indica a la base de datos que el aditivo puede utilizarse como aditivo de PCR. Así, en los lugares donde se requiera utilizar un aditivo de PCR, la base de datos propondrá a aquellos aditivos que tengan marcada esta casilla.

Además, el formulario muestra una lista con todas las concentraciones registradas en la base de datos, para el aditivo actual, bajo el epígrafe "Concentraciones utilizadas en los experimentos:".

8.1.4.2 Más Cebadores

Añadir cebadores:

Formulario para introducir los datos de los cebadores de PCR.

Muestra los experimentos de PCR y de secuenciación en los que se ha utilizado el cebador.

<p>Cebador: <input type="text" value="GHR-E4 UP"/> ?</p> <p>Fragmento: <input type="text" value="GHR-E4"/> + fragmentos</p> <p>Variante: <input type="text"/> Orientación: <input type="text" value="UP"/> Longitud: <input type="text" value="22"/></p> <p>Características: <input type="text"/></p> <p>Secuencia: <input type="text" value="GCCCAGAGAAACAGCATTTCTA"/></p> <p>Tm (°C): <input type="text" value="64.2"/> T₂ PCR: <input type="text"/> Marceje: <input type="text"/> Quencher: <input type="text"/></p> <p>Día de creación: <input type="text" value="19/05/2003"/> 60 <input type="text"/></p>		<p>Información:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Fragmentos De PCR</th> <th>Protocolos De Secuenciación</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>▶ GHR-E4 ver</td> <td>▶ SEC-GHR-E4<29 ver</td> </tr> <tr> <td></td> <td>SEC-GHR-E4<43 ver</td> </tr> <tr> <td></td> <td>SEC-GHR-E4<47 ver</td> </tr> <tr> <td></td> <td>SEC-GHR-E4<69 ver</td> </tr> <tr> <td></td> <td>SEC-GHR-E4<73 ver</td> </tr> </tbody> </table>	Fragmentos De PCR	Protocolos De Secuenciación	▶ GHR-E4 ver	▶ SEC-GHR-E4<29 ver		SEC-GHR-E4<43 ver		SEC-GHR-E4<47 ver		SEC-GHR-E4<69 ver		SEC-GHR-E4<73 ver
Fragmentos De PCR	Protocolos De Secuenciación													
▶ GHR-E4 ver	▶ SEC-GHR-E4<29 ver													
	SEC-GHR-E4<43 ver													
	SEC-GHR-E4<47 ver													
	SEC-GHR-E4<69 ver													
	SEC-GHR-E4<73 ver													

Ayuda general:

Este formulario permite introducir datos de los cebadores de PCR. Se recogen 2 temperaturas de la PCR: la T_m, que es la temperatura media, calculada por el programa que lo diseñó (un valor teórico); la temperatura de PCR, que es la temperatura a la que este cebador funciona bien en las PCRs (un valor empírico). Este valor es orientativo y no hay ningún método de calcularlo. Suele ocurrir que la hoja de control de calidad de los cebadores recoja una T_m diferente de la del programa de diseño. En ocasiones simplemente se introducen 2 T_m que parecen funcionar. En este caso serían orientativas.

Modo de utilización:

Debe introducirse, al menos, el fragmento génico que es delimitado por el cebador, la orientación y la secuencia nucleotídica del oligo.

La longitud se calcula automáticamente a partir de la secuencia.

Las variantes y sus características son totalmente opcionales. Se recogen sólo para casos especiales. Le sirven al programa para determinar el nombre adecuado del cebador y evitar duplicados.

En Marcaje se almacena el nombre del colorante "reporter" de las sondas Taqman, en Quencher se almacena el nombre de esta molécula en dichas sondas.

Los listados de fragmentos y protocolos de secuenciación son generados automáticamente y muestran los registros de la base de datos en los que aparece el cebador del formulario. Pulsando en el botón "Ver" se puede acceder al protocolo de secuenciación especificado. Para acceder al fragmento basta con pulsar sobre el nombre del fragmento, que se muestra subrayado y de color azul, emulando a un enlace.

Descripción de los campos:

Cebador: Es el nombre del cebador que se está introduciendo en la base de datos. Este nombre debe ser único en la base de datos y lo más descriptivo posible. Salvo que exista un buen motivo para ello, este campo no debe alterarse ya que es calculado por el programa siguiendo este algoritmo:

NombreDelFramento+Variante+"Espacio"+Orientación

Este campo se actualiza automáticamente al modificar cada uno de los campos implicados en su formulación

Fragmento: Es el nombre del fragmento al que pertenece el cebador. Debe elegirse de los registrados en la base de datos mediante una lista desplegable. En caso de que el fragmento no se encuentre registrado en la base de datos se puede añadir uno nuevo pulsando el botón "[+ fragmentos](#)". Al hacer doble clic en el nombre del fragmento se muestra el formulario de edición de fragmentos para dicho fragmento.

Variante: Este es un campo de texto que identifica una nueva variante para el fragmento. Permite crear múltiples cebadores para amplificar un mismo fragmento de ADN.

Orientación: El selector desplegable permite elegir entre las 2 orientaciones posibles:

- UP: El cebador se une a la secuencia en dirección 5' -> 3'.
- DN: El cebador se une a la secuencia en dirección 3' -> 5'.

Longitud: Es un campo autocalculado que muestra la longitud de la secuencia del cebador. Se actualiza automáticamente cuando esta cambia.

Secuencia: Secuencia de bases del cebador. Al igual que el resto de secuencias de la base de datos, se introduce en dirección 5' -> 3'.

Tm (°C): Temperatura media del cebador. Es la Tm calculada por el programa de diseño de fragmentos. Se expresa en grados Celsius.

Día de creación: Día en que se creó o diseñó el cebador.

Tª PCR: Temperatura de PCR a la que funciona el fragmento. Este dato es empírico. Debería rellenarse después de haberlo probado. Se expresa en grados Celsius.

Marcaje: Nombre del colorante con el que está marcado el cebador, si existe. Ej: FAM, VIC, ... Tanto este campo, como el siguiente son de utilidad para el registro de sondas TaqMan®.

Quencher: Nombre del "Quencher" del cebador, si existe. Ej: MGB, NFQ, ... Tanto este campo, como el anterior son de utilidad para el registro de sondas TaqMan®.

8.1.4.3 Abrir Protocolos De PCR

Abrir protocolos de PCR:

Abre una hoja de cálculo que permite hallar las cantidades de cada reactivo de la PCR*. Este es un archivo externo a la base de datos y el sistema operativo puede enviar mensajes con alerta de seguridad. Esto es normal y estas alertas pueden ser ignoradas. La hoja de cálculo contiene varias hojas que permiten realizar algunos cálculos básicos de forma rápida:

- **Composición de la PCR:** Esta hoja permite calcular los datos de una PCR habitual. Permite seleccionar los parámetros más habituales de la PCR. El usuario suele querer modificar el número de muestras y el de μl por muestra. El resultado de los cálculos es la receta para el protocolo de PCR que se genera con los datos de la columna " μl para un volumen final total =". El volumen total se muestra en la casilla de al lado. En la columna de la izquierda se muestra la composición para una PCR de $5\mu\text{l}$. Esta permite comparar fácilmente distintas PCRs porque los datos están corregidos para un mismo volumen. La hoja de cálculo está protegida de forma que el usuario sólo puede introducir datos en las casillas habilitadas para ello y no puede sobrescribir accidentalmente una casilla calculada.

	nº muestras μl x muestra			
	1	10	(tampón)	
Componente	μl para un volumen de tampón de $5\mu\text{l}$	μl para un volumen final total =	10	
H ₂ O	1,82	3,64		Parámetros: Para 1 sólo muestra. Vf = $5\mu\text{l}$
Tampón 10x	1	2		1 μl Tampón 10x
dNTP	1	2		1 μl dNTP
Cebador UP	0,25	0,5		0,25 μl Cebador UP
Cebador DN	0,25	0,5		0,25 μl Cebador DN
MgCl ₂	0,6	1,2		3 [MgCl ₂] (mM) final
Taq	0,08	0,16		0,08 μl Taq
Total		10		
				Datos:
				50 [MgCl ₂] (mM) en el tubo "stock"

Composición de la PCR

regla de 3

Con Aditivos

MDE

Concentraciones

- **Regla de 3:** Esta es una hoja más completa con la que calcular los datos de la reacción por regla de 3 con respecto a otra PCR previa (original). Esto permite adaptar PCRs a nuevos volúmenes o número de muestras, o calcular ligeras variaciones para optimizarla.

Transformador de cantidades por regla de 3			
28-agosto-2014			
Cantidades originales		Cantidades finales	
H ₂ O	40,04	H ₂ O	20,02
Tampón 10x	22	Tampón 10x	11
dNTP	22	dNTP	11
Cebador UP	5,5	Cebador UP	2,75
Cebador DN	5,5	Cebador DN	2,75
MgCl ₂	13,2	MgCl ₂	6,6
Betaina	0	Betaina	0
Glicerol	0	Glicerol	0
Taq	1,76	Taq	0,88

Datos	Volumen Preparado de PCR	
Volumen inicial	110	110
Volumen final		55
	ó	
nº de muestras	11	55
µl x muestra	5	;-)

Mezcla x muestra	5	µl de DNA x muestra	5
DNA x muestra			
nº muestras inicio	4		

Datos :	
Betaina utilizada:	5 M
Betaina final	0 M
Glicerol utilizado:	87 %
Glicerol final	0 % (v/v)
[MgCl ₂] utilizado:	50 mM
[MgCl ₂] final	3 mM
[Tampón] utilizado	10 x
[Tampón] final	1 x
Vf de cada reacción	10 µl

La hoja contiene varios comentarios que ayudan a entender su funcionamiento y el significado de los colores. Son estos:

Datos :	Jose Alejandro:
Betaina utilizada:	Los datos de color azul no deben ser modificados. Los calcula el programa.
Betaina final	Los datos en letra negra pueden ser modificados. En general, no suelen cambiar mucho porque en el laboratorio casi siempre se compran los productos con la misma concentración.
Glicerol utilizado:	
Glicerol final	0 % (v/v)
[MgCl ₂] utilizado:	50 mM
[MgCl ₂] final	3 mM
[Tampón] utilizado	10 x
[Tampón] final	1 x
Vf de cada reacción	10 µl

"Los datos de color azul no deben ser modificados. Los calcula el programa. Los datos en letra negra pueden ser modificados. En general, no suelen cambiar mucho

porque en el laboratorio casi siempre se compran los productos con la misma concentración."

Datos		Volumen Preparado de PCR	
Volumen inicial	110		110
Volumen final			55
		ó	
nº de muestras	11		55
µl x muestra	5		;-)

J. Alejandro:
 Este es el volumen de preparado de PCR que se mezclará con DNA para iniciar la reacción.

[MgCl ₂] utilizado:	
[Tampón] final	
Vf de cada reacción	

"Este es el volumen de preparado de PCR que se mezclará con DNA para iniciar la reacción." Se muestra en rojo. Nótese en esta foto la casilla con una "ó" y la casilla blanca con el emoticono sonriente. La "ó" indica que se puede elegir el método superior o el inferior para determinar el volumen final de la reacción. El emoticono sonriente indica que los datos son coherentes. En la parte superior el usuario declara el volumen inicial de la PCR y el deseado (final). En la parte inferior el volumen final se calcula a partir de la multiplicación del número de muestras con los µl por muestra, que son los valores que debe introducir el usuario.

Datos		Volumen Preparado de PCR	
Volumen inicial	110		110
Volumen final	55		55
		ó	
nº de muestras	11		55
µl x muestra	5		;-)

[MgCl ₂] utilizado:	50 mM
[MgCl ₂] final	3 mM
[Tampón] utilizado	10 x
[Tampón] final	1 x
Vf de cada reacción	10 µl

		µl de DNA x muestra	
Mezcla x muestra	5	DNA x muestra	5
DNA x muestra			
nº muestras inicio	4		

Si se rellenan ambos datos de forma que se declare el mismo volumen final en las casillas superiores que el calculado en las inferiores no hay problemas en los cálculos. Sin embargo, si estos datos no fuesen consistentes, el emoticono cambiaría y se mostrarían mensajes de error:

Error: los volúmenes no coinciden

Datos		Volumen Preparado de PCR	
Volumen inicial	110		110
Volumen final	95		95
		ó	
nº de muestras	11		55
µl x muestra	5		;-)

[MgCl ₂] utilizado:	50 mM
[MgCl ₂] final	3 mM
[Tampón] utilizado	10 x
[Tampón] final	no sé x
Vf de cada reacción	no sé µl

		µl de DNA x muestra	
Mezcla x muestra	5	DNA x muestra	5
DNA x muestra			
nº muestras inicio	4		

- "Error: los volúmenes no coinciden". En este caso se ha declarado un volumen final de 95µl pero se calcula otro de $11 \times 5 = 110\mu\text{l}$. El sistema genera un mensaje de error y sustituye los valores finales por "no sé" que indica que el ordenador no es capaz de discernir cual es el volumen final deseado. El emoticono ha cambiado.

Error: Rellena todos los dato

Datos		Volumen Preparado de PCR	
Volumen inicial	110		110
Volumen final			0
	ó		
nº de muestras	11		0
µl x muestra			:-(
		µl de DNA x muestra	
Mezcla x muestra	0	DNA x muestra	0
DNA x muestra			
nº muestras inicio	4		

[MgCl ₂] utilizado:	50 mM
[MgCl ₂] final	#¡DIV/0! mM
[Tampón] utilizado	10 x
[Tampón] final	no sé x
Vf de cada reacción	no sé µl

- "Error: Rellena todos los datos". En este caso el error viene de que no se ha declarado el volumen final deseado ni se ha introducido el valor del número de microlitros por muestra. El ordenador no tiene datos suficientes para calcular el volumen final de la reacción. En este caso el mensaje es azul porque no tiene por qué ser un error grave si se completan los datos faltantes.

µl de DNA x muestra	
Mezcla x muestra	5
DNA x muestra	5
nº muestras inicio	4

J. Alejandro:
Introducir el número de microlitros de DNA que se le añade a cada muestra sólo en caso de que no sea el mismo que de preparado de PCR. Si esta casilla queda en blanco el programa interpreta que se utilizará la misma cantidad de DNA que de tampón de PCR.

"Introducir el número de microlitros de DNA que se le añade a cada muestra sólo en caso de que no sea el mismo que de preparado de PCR. Si esta casilla queda en blanco el programa interpreta que se utilizará la misma cantidad de ADN que de tampón de PCR.". Es habitual que los volúmenes de mezcla y de ADN sean similares; en este caso no es necesario rellenar esta casilla.

µl de DNA x muestra	
Mezcla x muestra	5
DNA x muestra	5
nº muestras inicio	4

J. Alejandro:
Introduce el número de muestras para el que se hizo el cálculo inicial.

"Introduce el número de muestras para el que se hizo el cálculo inicial." Este parámetro configura el número de muestras para el que se calculó la PCR y cuyos datos se recogen en la columna "Cantidades originales".

- **Con aditivos:** Esta hoja es similar a la de "Composición de la PCR" pero permite añadir aditivos de PCR como la Betaína y el Glicerol.

n° muestras		μl x muestra		(tampón)	
4		10			
Componente	μl para un volumen de tampón de 5 μl	μl para un volumen final total =	40		
H ₂ O	1,82	14,56	Parámetros: Para 1 sólo muestra. Vf = 5 μl		
Tampón 10x	1	8	Tampón 10x	1 μl Tampón 10x	
dNTP	1	8	dNTPs	1 μl dNTPs 2 mM	
Cebador UP	0,25	2	Cebador UP	0,25 μl Cebador UP (10 μM)	
Cebador DN	0,25	2	Cebador DN	0,25 μl Cebador DN (10 μM)	
MgCl ₂	0,6	4,8	Taq	0,08 μl Taq de 5 U/μl	
Betaina	0	0	[MgCl ₂] usada	50 (mM) en el tubo "stock"	
Glicerol	0	0	[MgCl ₂] final	3 (mM) final	
Taq	0,08	0,64	Betaina usada	5 M	
			Betaina final	0 M	
	Total	40	Glicerol usado	87 %	
			Glicerol final	0 % (v/v)	

Esta hoja también contiene algunos comentarios que sirven para explicar mejor su funcionamiento:

n° muestras		μl x muestra	
4		10	
μl para un volumen de tampón de		μl para un volumen final total =	40

J. Alejandro:
Microlitros de tampón de PCR de la muestra. A estos hay que añadirles otro tanto de DNA.

"Microlitros de tampón de PCR de la muestra. A estos hay que añadirles otro tanto de DNA." Indica que este es el volumen final de mezcla por muestra.

Parámetros:		J. Alejandro:	
Tampón 10x		Estas son las cantidades que se utilizan en una sola muestra de PCR. Las cantidades iniciales (negras) no suelen variar y las finales se muestran en color (azul).	
dNTPs			
Cebador UP			
Cebador DN	0,25	μl Cebador DN (10 μM)	
Taq	0,08	μl Taq de 5 U/μl	
[MgCl ₂] usada	50 (mM) en el tubo "stock"		
[MgCl ₂] final	3 (mM) final		
Betaina usada	5 M		
Betaina final	M		
Glicerol usado	87 %		
Glicerol final	0 % (v/v)		

"Estas son las cantidades que se utilizan en una sola muestra de PCR. Las cantidades iniciales (negras) no suelen variar y las finales se muestran en color (azul)." Indica que los parámetros de las casillas que están en letra negra pueden ser modificados por el usuario.

n° muestras μl x muestra			
	4	10	(tampón)
Componente	μl para un volumen de tampón de 5 μl	μl para un volumen final total =	40
H ₂ O	1,82	14,56	Parámetros: Para 1 sólo muestra. Vf = 5 μl
Tampón 10x	1	8	Tampón 10x 1 μl Tampón 10x
dNTP	1	8	dNTPs 1 μl dNTPs 2 mM
Cebador UP	0,25	2	Cebador UP 0,25 μl Cebador UP (10 μM)
Cebador DN	0,25	2	Cebador DN 0,25 μl Cebador DN (10 μM)
MgCl ₂	0,6	4,8	Taq 0,08 μl Taq de 5 U/ μl
Betaina	0	0	[MgCl ₂] usada 50 (mM) en el tubo "stock"
Glicerol	0	0	[MgCl ₂] final 3 (mM) final
Taq	0,08	0,64	Betaina usada 5 M
			Betaina final M
	Total	40	Glicerol usado 87 %
			Glicerol final 0 % (v/v)

J. Alejandro:
Estas son las concentraciones reales de los componentes de la reacción si se usan las cantidades indicadas. Estos datos sólo aparecen cuando es imposible lograr las concentraciones pedidas.

J. Alejandro:

Estas son las concentraciones reales de los componentes de la reacción si se usan las cantidades indicadas. Estos datos sólo aparecen cuando es imposible lograr las concentraciones pedidas.

"Estas son las concentraciones reales de los componentes de la reacción si se usan las cantidades indicadas. Estos datos sólo aparecen cuando es imposible lograr las concentraciones pedidas." Este mensaje se aplica a la zona debajo de la de Parámetros, que no tiene dibujados los límites de las celdas. En este lugar aparece una tabla con los datos reales que se obtendrían si se empleasen las condiciones de PCR calculadas por la hoja de cálculo. Estos datos sólo se muestran cuando no coinciden con los pedidos. Este caso puede producirse, por ejemplo, cuando la concentración final de un aditivo es tal que el volumen necesario para conseguirlo, sumado al del resto de la mezcla, sobrepasa el volumen final disponible.

n° muestras		μl x muestra		
4		10	(tampón)	
Componente	μl para un volumen de tampón de 5 μl	μl para un volumen final total =	40	
H ₂ O	-4,18	-33,44	Parámetros:	Para 1 sólo muestra. Vf = 5 μl
Tampón 10x	1	8	Tampón 10x	1 μl Tampón 10x
dNTP	1	8	dNTPs	1 μl dNTPs 2 mM
Cebador UP	0,25	2	Cebador UP	0,25 μl Cebador UP (10 μM)
Cebador DN	0,25	2	Cebador DN	0,25 μl Cebador DN (10 μM)
MgCl ₂	0,6	4,8	Taq	0,08 μl Taq de 5 U/ μl
Betaina	6	48	[MgCl ₂] usada	50 (mM) en el tubo "stock"
Glicerol	0	0	[MgCl ₂] final	3 (mM) final
Taq	0,08	0,64	Betaina usada	5 M
			Betaina final	3 M
	Total	106,88	Glicerol usado	87 %
			Glicerol final	0 % (v/v)
			Datos:	
			[MgCl ₂] final	1,12275449 mM
			Betaina final	1,12275449 mM
			Glicerol final	0 %

En esta captura se muestra un estado de error causado porque se desea una concentración final de Betaína de 5M. Esta mezcla es imposible de realizar porque requiere más volumen del disponible. Dado que el volumen sobrante se rellena con agua, se muestran cantidades negativas de agua. En caso de que se crease la mezcla (sin añadir agua) las cantidades finales no serían las pedidas, sino que los aditivos quedarían diluidos. La concentración final de dichos aditivos se muestra en la tabla Datos (con fondo amarillo).

- **MDE:** Esta hoja sirve para calcular las composiciones de una mezcla de la matriz de gel MDE. El usuario puede seleccionar el volumen final del gel y la concentración de MDE.

Preparación de	70	ml de MDE	0,5 x
MDE	17,5	ml	
TBE 10x	4,2	ml	
H2O	48,3	ml	
TMED	61,3	μl	
APS (10%)	463,8	μl	

Composición de la PCR / regla de 3 / Con Aditivos / **MDE** / Concentraciones

- **Concentraciones:** Esta hoja sirve para calcular la concentración final de un reactivo. El usuario sólo debe rellenar los datos de las casillas cuya fuente es de color azul. El resultado se muestra en forma de una línea de texto en la parte baja de la hoja.

Esta hoja sirve para calcular la concentración final de un reactivo stock en la reacción de PCR.

μl de reactivo stock	
1,8 μl	
concentración del reactivo stock (mM)	
10 mM	
volumen final de la reacción (μl)	
20 μl	
moles de reactivo en toda la reacción	
1,80E-08 moles	
moles /μl de reactivo en la reacción	
9,00E-10 moles/μl	
concentración final del reactivo (mM)	
0,9 mM	

Resultado:
1,8 microlitros de un stock de concentración 10 mM se disuelven en 20 microlitros produciendo una disolución de concentración final 0,9 mM.

Composición de la PCR / regla de 3 / Con Aditivos / MDE / **Concentraciones**

* **Nota:** Esta hoja de cálculo es el germen de la aplicación en Access y se ha quedado muy obsoleta, además es complicado almacenar la información de las reacciones realizadas. El programa en Access tiene formularios mucho más potentes que ayudan a establecer las condiciones de nuevas PCRs y a consultar los resultados de las antiguas.

8.1.4.4 Más Programas PCR

Añadir programas de PCR:

Formulario para registrar los programas de PCR almacenados en los termocicladores. Simula la pantalla de un termociclador Applied Biosystems 9600. Sirve para programas con un solo ciclo³⁴:

³⁴ Ciclo: Se considera ciclo a cada conjunto de iteraciones repetidas. No debe confundirse con el uso habitual de la palabra ciclo para referirse a cada una de esas iteraciones.

Programa: 1-45, 45. Termociclador: 1. Comentarios: ?

T_m: 45, Taq: normal

n^o iteraciones: 30, > 2 ciclos

Temperatures and times: 94 (5 minutos), 94 (0,5 minutos), 45 (0,67 minutos), 40 (0,67 minutos), 72 (0,67 minutos), 72 (60 minutos), 3600 (4 segundos), 99999.

Duración (min): 5 + 55 + 60 = 120 minutos. Inicial: 5, 30 Ciclos, Final: 60. 2 Horas 0 minutos 0 segundos.

O para programas con 2 ciclos:

Programa: 1-58-61 auto, 58-61 auto. Termociclador: 1. Comentarios: ?

T_m: 58, Taq: fideiTaq

n^o iteraciones: 10, < 1 ciclo, en el Ciclo2: 20

Temperatures and times: 93 (2 minutos), 93 (0,75 minutos), 58 (0,5 minutos), 30 (5 minutos), 68 (0,5 minutos), 30 (0,5 minutos), 61 (5 minutos), 68 (7 minutos), 420 (4 segundos), 99999.

Incrementos: Pasos 1^a, 2^a, 3^a. x ciclo (seg): 20, total (seg): 3800.

Duración (min): 2 + 62,5 + 183,33333 + 7 = 254,833333 minutos. Inicial: 2, 10 Ciclos, 20 Ciclos, Final: 7. 4 Horas 14 minutos 50 segundos.

Ayuda general:

En este formulario puedes introducir los datos de los programas cargados en los termocicladores.

Hay dos modelos de formulario para que se pueda utilizar la interfaz que más agrade, o convenga. Los controles están dispuestos como la pantalla de un termociclador ABI 9600. Un segundo formulario permite introducir programas especiales: con 2 tipos de ciclos de PCR diferentes y con autoincrementos en el 2º ciclo.

Para utilizar adecuadamente los formularios debe tenerse en cuenta que:

- La unidad de tiempo es el segundo. Todos los datos, por tanto, deben ser introducidos en segundos. Para facilitar la conversión de minutos a segundos se ha programado que las casillas multipliquen su valor por 60 cuando se hace doble clic en ellas. De esta forma se puede introducir la cantidad en minutos y hacer doble clic para que se convierta en segundos. El resultado se puede comprobar en las etiquetas inferiores que muestran en todo momento la duración en minutos.
- Debajo del formulario se muestra la duración orientativa del programa de PCR. Esta no tiene en cuenta la rampa del termociclador: (el tiempo que tarda en alcanzar la temperatura deseada).

Modo de utilización:

Se pueden rellenar todas las casillas con fondo blanco. Las demás las calcula el programa. Las unidades de tiempo son los segundos y las de temperatura los grados Celsius.

Los cuadros desplegables de tipo de Taq y nombre de termociclador tienen valores fijos, para ampliarlos debe desplegarse un nuevo formulario de introducción de datos, pulsando en el botón "+" correspondiente. Si no apareciese el nuevo valor deberá recargarse el formulario.

La Tm del programa es la Tª del paso intermedio del ciclo (Temperatura de anillamiento).

Descripción de los campos:

En detalle, estos son los campos de los que se compone el formulario de 2 ciclos (El de 1 es igual salvo que no tiene los controles del 2º ciclo.)

Programa: Es el código de identificación único del programa. El código del programa será el que aparece en la casilla gris. El usuario no necesita introducirlo porque es autocalculado por el formulario al rellenar el campo "Programa" y "Termociclador". Se sigue este algoritmo:

Termociclador-Programa

Termociclador: Es el nombre del termociclador en el que se ha realizado el programa de PCR. Debe elegirse de la lista desplegable. Para introducir un nuevo termociclador que no se encuentre en la base de datos se puede pulsar el botón "+" adjunto. Este abre el formulario de introducción de termocicladores.

Taq: Permite registrar el nombre de la enzima Taq polimerasa que se ha utilizado en el programa. Debe elegirse de la lista desplegable. Para introducir un nuevo tipo de Taq que no se encuentre en la base de datos puede usarse el botón "+" adjunto. Este abre el formulario de introducción de tipos de Taq.

Comentarios: Información adicional.

nº iteraciones: Permite registrar el número de veces que se repite el primer ciclo.

en el ciclo 2: Permite registrar el número de veces que se repite el segundo ciclo.

El resto de controles están distribuidos como se verían en la pantalla de un termociclador para que resulte más intuitivo. Para cada paso de la reacción hay 2 controles:

- El superior es la temperatura de ese paso.
- El que se encuentra debajo de la raya horizontal es la duración, en segundos, de ese paso.

Los pasos están agrupados mediante líneas verticales de la siguiente manera:

- El primer grupo representa el ciclo inicial, que contiene un sólo paso de desnaturalización:

93

120

2 minutos

- El segundo grupo representa el primer ciclo. Este contiene 3 pasos:

n° iteraciones: 10
 93
 45
 0,75 minutos
 58
 30
 0,5 minutos
 68
 300
 5 minutos

- 1º; Desnaturalización: Suele tener la temperatura más elevada que los demás porque así se separan las cadenas de la doble hélice y quedan accesibles a la maquinaria de replicación.
- 2º; Alineamiento o unión del cebador: La temperatura de este paso debe estar optimizada para que se unan eficientemente los cebadores de la PCR. Suele ser la temperatura más baja de los 3 ciclos y es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta a la hora de optimizar una reacción de PCR.
- 3º; Extensión: Es la temperatura a la que tiene lugar la polimerización. Suele utilizarse la temperatura óptima para el tipo de Taq que se haya elegido.
- El tercer grupo representa el segundo ciclo. Estos controles están pensados para modelar protocolos de PCR más sofisticados, que necesitan, además de los pasos normales de amplificación de la PCR, otro grupo de pasos que pueden incrementar su duración en cada ciclo. Esto se modela introduciendo en la tabla de incrementos, el número de segundos que se incrementa en cada iteración el paso indicado. Esto es: Cada iteración es x segundos más larga que la anterior.

en el Ciclo2: 20
 93
 30
 0,5 minutos
 61
 30
 0,5 minutos
 68
 300
 5 minutos

Incrementos:

Pasos	1º	2º	3º
x ciclo (seg)			20
total (seg)			3800

- El Cuarto grupo muestra el último ciclo de la PCR, Este suele consistir en un paso de extensión más largo, que sirve para completar las polimerizaciones, y un último paso a temperatura de frigorífico que sirve para que la PCR se conserve hasta que sea recogida y almacenada o procesada. Es habitual que este paso tenga una longitud indeterminada, hasta que el técnico la recoja. Esto se suele reflejar en los cuadernos de laboratorio con el símbolo ∞ (infinito). En este programa, por convención, se utiliza el código 99999 para representar este valor. Este paso no será tenido en cuenta a la hora de calcular la duración de la PCR.

En la parte baja del formulario se muestra un cuadro resumen con la duración estimada de la reacción completa.

Duración (min)	2	+	62,5	+	183,33333	+	7	=	254,83333	minutos
	Inicial		10 Ciclos		20 Ciclos		Final		4 Horas 14 minutos 50 segundos	

Debe tenerse en cuenta que este cálculo omite el tiempo de rampa (aquel que el aparato tarda en cambiar de una temperatura a la siguiente), por tanto, esta duración puede considerarse como aproximada.

Adicionalmente, cada formulario contiene un botón que permite intercambiarlo con el otro.

>2 ciclos: Este botón se encuentra en el formulario de 1 ciclo. Al pulsarlo se carga el de 2 ciclos.

<1 ciclo: Este botón se encuentra en el formulario de 2 ciclos. Al pulsarlo se carga el de 1 ciclo.

Ambos formularios modifican los datos de la misma tabla de la base de datos. Así, el formulario de 1 ciclo deja en blanco todos los datos relacionados con el segundo ciclo y no es capaz de visualizar estos valores en las tuplas que los tengan rellenos. Cuando ocurre esta circunstancia, se muestra un mensaje de advertencia rojo en la parte baja del formulario:

8.1.4.5 Más Programas PCR Columnas

Añadir programas de PCR (En columnas):

Formulario para registrar los programas de PCR almacenados en los termocicladores. Sólo sirve para programas con un solo ciclo.

Los cuadros de texto están ordenados en columnas.

Programa	1-45		Termociclador	Comentarios:		=	> 2 ciclos	?
	45		1					
nº iteraciones	30	Tªm:	45	Taq:	normal			
Tª Paso inicial	94	segundos:	300					
Tª 1er paso central	94	segundos:	30					
Tª 2º paso central	45	segundos:	40					
Tª 3er paso central	72	segundos:	40					
Tª 1er paso final	72	segundos:	3600					
Tª 2º paso final	4	segundos:	99999					
Duración (min)	5	+	55	+	60	=	120	
	Inicial		Ciclo		Final		minutos	

Dado que esta ordenación de los campos es menos intuitiva, habitualmente se prefiere utilizar cualquiera de los otros 2 [formularios de introducción](#) de datos de PCR.




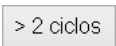
El significado de los controles es el mismo que el de estos otros 2 formularios pero los ciclos están ordenados de arriba a abajo en vez de en horizontal. Cada uno de los ciclos está separado por rayas negras horizontales.

En comparación con los otros formularios, hay que tener en cuenta estas salvedades:

A lo que en los otros formularios se llama "ciclo" aquí se llama "paso". Así, el "paso inicial" se corresponde con el "ciclo inicial", el "paso central" se corresponde con el "primer ciclo" y el "paso final" se corresponde con el ciclo final.

El campo "nº de iteraciones", al igual que en los demás formularios, se refiere al paso central.

En este formulario hay estos botones adicionales:

-  Permite lanzar el cuadro de búsqueda de Access. La búsqueda se aplica al campo en el que se encuentre actualmente el cursor.
-  Permite repetir la última búsqueda.
-  Este botón lanza el formulario de introducción de datos de PCR de un sólo ciclo. Este es equivalente al cuadro actual y más intuitivo.
-  Este botón lanza el formulario de introducción de datos de PCR de 2 ciclos. Este es el más completo porque permite ver y modificar la totalidad de los datos de un programa de PCR.

Dado que el formulario actual sólo sirve para programas de PCR de 1 ciclo cuando se visualiza un programa que tenga 2 ciclos se mostrará un mensaje de advertencia rojo en la parte inferior de la pantalla.

Programa	1-58-61auto		Termociclador	Comentarios: = > 2 ciclos ?	
58-61auto			1		
nº iteraciones	10	Tªm: 58	Taq: fideiTaq		
Tª Paso inicial	93	segundos: 120			
Tª 1er paso central	93	segundos: 45			
Tª 2º paso central	58	segundos: 30			
Tª 3er paso central	68	segundos: 300			
Tª 1er paso final	68	segundos: 420			
Tª 2º paso final	4	segundos: 99999			
Duración (min) 2 + 62,5 + 7 = 71,5 minutos					
Error en el cálculo: Este programa tiene 2 ciclos. Utiliza el otro formulario para visualizarlo.					

8.1.4.6 Más Protocolos PCR

Añadir protocolos de PCR:

Este es un completísimo formulario para calcular y almacenar los datos de cada protocolo de PCR.

Protocolo PCR	PCR-GHR-E5<105		Copiar Valores	Pegar Valores	VerPCRs																																																																																																																					
Fragmento	GHR-E5		Código Día	19/07/04-3 verlo																																																																																																																						
Día:	19/07/2004	Variante:	3	+Días																																																																																																																						
µl de PCR:	220	Funciona	<input checked="" type="checkbox"/>	DNA:	11 Primeros Machos de Churra																																																																																																																					
Nº de muestras:	11	µl de tampón:	10	µl de DNA:	10 (x muestra)																																																																																																																					
Calcular PCR	<input checked="" type="checkbox"/> comprobar datos de PCR	+ Programas PCR	Ver variantes de día																																																																																																																							
H2O.....	40,04	Programa	60	Tª PCR	60																																																																																																																					
Tampón 10 x	22	Termociclador	2	[MgCl2]	3 mM																																																																																																																					
dNTPs.....	22	nº	105	Tipo de PCR:	Secuenciación																																																																																																																					
Cebador UP.....	5,5	GHR-E5 UP		+ Tipos de PCR																																																																																																																						
Cebador DN.....	5,5	GHR-E5 DN		+ Cebadores																																																																																																																						
[MgCl2] 50 mM	13,2	Comentarios	Localización gel: 202 Ver cebadores																																																																																																																							
Betaina	0	Ver página 200 y foto en la 202.																																																																																																																								
Glicerol	0																																																																																																																									
Taq: normal	1,76																																																																																																																									
+ Aditivos																																																																																																																										
Muestras: 10	Sin Muestras																																																																																																																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>\</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>A</th> <td>1</td> <td>9</td> <td>17</td> <td>25</td> <td>33</td> <td>41</td> <td>49</td> <td>57</td> <td>65</td> <td>73</td> <td>81</td> <td>89</td> </tr> <tr> <th>B</th> <td>2</td> <td>10</td> <td>18</td> <td>26</td> <td>34</td> <td>42</td> <td>50</td> <td>58</td> <td>66</td> <td>74</td> <td>82</td> <td>90</td> </tr> <tr> <th>C</th> <td>3</td> <td>11</td> <td>19</td> <td>27</td> <td>35</td> <td>43</td> <td>51</td> <td>59</td> <td>67</td> <td>75</td> <td>83</td> <td>91</td> </tr> <tr> <th>D</th> <td>4</td> <td>12</td> <td>20</td> <td>28</td> <td>36</td> <td>44</td> <td>52</td> <td>60</td> <td>68</td> <td>76</td> <td>84</td> <td>92</td> </tr> <tr> <th>E</th> <td>5</td> <td>13</td> <td>21</td> <td>29</td> <td>37</td> <td>45</td> <td>53</td> <td>61</td> <td>69</td> <td>77</td> <td>85</td> <td>93</td> </tr> <tr> <th>F</th> <td>6</td> <td>14</td> <td>22</td> <td>30</td> <td>38</td> <td>46</td> <td>54</td> <td>62</td> <td>70</td> <td>78</td> <td>86</td> <td>94</td> </tr> <tr> <th>G</th> <td>7</td> <td>15</td> <td>23</td> <td>31</td> <td>39</td> <td>47</td> <td>55</td> <td>63</td> <td>71</td> <td>79</td> <td>87</td> <td>95</td> </tr> <tr> <th>H</th> <td>8</td> <td>16</td> <td>24</td> <td>32</td> <td>40</td> <td>48</td> <td>56</td> <td>64</td> <td>72</td> <td>80</td> <td>88</td> <td>96</td> </tr> </tbody> </table>						\	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89	B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90	C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91	D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92	E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93	F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94	G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95	H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
\	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																														
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89																																																																																																														
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90																																																																																																														
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91																																																																																																														
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92																																																																																																														
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93																																																																																																														
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94																																																																																																														
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95																																																																																																														
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96																																																																																																														

Ayuda general:

El formulario está dotado de utilidades para simplificar la introducción de datos de PCRs similares mediante copiar y pegar. Puede comprobar la correcta introducción de los datos y permite imprimir los protocolos introducidos. Es más conveniente hacer los

cálculos con este formulario antes de hacer los experimentos, que registrarlos después de haberlos realizado.

Se considera protocolo a cada una de las combinaciones de condiciones experimentales tendientes a realizar una Reacción en Cadena de la Polimerasa. El cambio de cualquiera de los parámetros entre dos muestras de ADN implica el registro de un nuevo protocolo. El registro de protocolos similares, o de las distintas variantes de condiciones que se generan en los protocolos de optimización de PCR, ha sido simplificado al máximo mediante el procedimiento de "Copiar Valores" -> "Registro Siguiente" -> "Pegar valores".

Este formulario sigue las convenciones del resto de formularios de la base de datos. A saber:

- Los campos en los que el usuario puede querer introducir datos tienen un fondo blanco.
- Los campos autocalculados tienen un fondo amarillo claro.
- Los campos que lanzan formularios de edición del valor tienen una tipografía de color azul.

Modo de utilización:

El método habitual de registro de un nuevo protocolo de PCR consiste en rellenar los datos de la PCR, imprimir el protocolo, realizar la PCR, evaluarla y volver a la base de datos para indicar si el protocolo funciona o falla.

Los datos que el usuario debería rellenar tienen el fondo de color blanco. No todos los campos son igual de importantes. Aquellos que se refieren a los stocks de los componentes de la PCR no varían porque el laboratorio suele comprar a los mismos proveedores en las mismas concentraciones. Normalmente, aquellos campos que tienen controles desplegados muestran una lista de opciones prefijada. Para aumentarla habitualmente hay que acceder a un formulario externo. Este se carga haciendo doble clic en los campos cuya tipografía es de color azul.

Cuando se rellenan los datos necesarios, se realizan los cálculos de la mezcla de PCR. Una vez establecidas todas las condiciones, el protocolo puede ser impreso para su utilización.

Se puede establecer a qué muestras de la caja de ADN afecta el protocolo pulsando sobre sus números en la placa inferior.

Cuando se hacen placas que contienen muestras tratadas con varios protocolos, como las de optimización, por ejemplo, es útil utilizar el procedimiento "Copiar Valores" -> "Registro Siguiente" -> "Pegar valores". Esto consiste en rellenar en un formulario los datos de uno de los protocolos de PCR y pulsar sucesivamente los botones "Copiar Valores", "Registro Siguiente" y "Pegar valores". El botón "Copiar Valores" copia la mayoría de datos del protocolo, omite aquellos que son específicos de cada protocolo. El botón "Registro Siguiente" cambia al siguiente registro de la base de datos, cuando se está introduciendo datos en un registro nuevo el siguiente es un nuevo registro. El botón "Pegar valores" pega los valores, que habían sido copiados, en el registro actual. Así, el usuario sólo tiene que introducir los parámetros que varían de un protocolo al siguiente (Es habitual variar la concentración de $MgCl_2$ o la temperatura en los protocolos de optimización).

Cuando se revisan registros antiguos puede ser útil pulsar el botón CalcularPCR para que re-calcule las cantidades de la mezcla de PCR y así comprobar si fueron correctamente introducidas. También puede ser útil pulsar "comprobar datos de PCR"

porque realiza una serie de comprobaciones y, si detecta algún problema en el registro, informa de ello.

Descripción de los campos:

Los controles de este formulario están divididos en regiones:

The screenshot shows a complex web form for PCR protocols. It is divided into several functional areas, each highlighted with a green number:

- 1 (Top Left):** Fields for 'Protocolo PCR' (PCR-GHR-E5<105), 'Fragmento' (GHR-E5), 'Código Día' (19/07/04-3), 'Día' (19/07/2004), 'Variante' (3), and 'DNA' (11 Primeros Machos de Churra).
- 2 (Top Middle):** Action buttons: 'Copiar Valores', 'Pegar Valores', 'VerPCRs', 'CalcularPCR', 'comprobar datos de PCR', '+ Programas PCR', and 'Ver variantes de día'.
- 3 (Middle Left):** Input fields for reagent volumes: 'H2O' (40.04), 'Tampón' (10 x), 'dNTPs' (22), 'Cebador UP' (5.5), 'Cebador DN' (5.5), '[MgCl2]' (50 mM), 'Betaina' (0 M), 'Glicerol' (0), and 'Taq' (normal, 1.76).
- 4 (Middle Right):** Fields for 'Programa' (60), 'Tª PCR' (60), 'Termociclador' (2), '[MgCl2]' (3 mM), 'nº' (105), 'Tipo de PCR' (Secuenciación), and 'Tipos de PCR' (GHR-E5 UP, GHR-E5 DN).
- 5 (Top Right):** 'Más datos' section with 'Protocols Secuenciación' and various stock concentrations: Betaina stock (5 M), 2ª Aditivo stock (87 %), dNTPs stock (2 mM), dNTPs final (0.2 mM), Cebador UP stock (10 µM), Cebador UP final (0.25 µM), Cebador DN stock (10 µM), Cebador DN final (0.25 µM), Tampon final (1 x), Taq stock (5 U/µl), and Taq final (0.04 U/µl).
- 6 (Bottom Left):** A 96-well plate grid with columns 1-12 and rows A-H. Cells are color-coded (blue, green, yellow) to indicate which positions were used in the PCR.
- 7 (Bottom Right):** A large empty yellow box intended for displaying program messages.

1. La zona 1 contiene controles para registrar datos específicos del protocolo de PCR.
2. La zona 2 agrupa a botones de acción
3. La zona 3 contiene el protocolo de PCR. Es la receta de laboratorio que se utilizó en ese protocolo de PCR. Este formulario puede ser utilizado para calcular las cantidades de reactivos necesarias para llevar a cabo la PCR. Aquí se muestra el resultado de ese cálculo.
4. La zona 4 contiene los datos del programa de PCR y los cebadores utilizados.
5. La zona 5 almacena datos adicionales como las concentraciones de los stocks de reactivos, el código del programa de PCR o los códigos de los operarios que realizan la PCR.
6. La zona 6 representa la placa de 96 pocillos y marca en color aquellas posiciones que se han utilizado en la PCR. El color de la tipografía de los botones puede variar en función de la raza a la que pertenezca el animal cuyo ADN se almacena.
7. La zona 7 es aquella en la que se mostrarán los mensajes del programa.

En detalle, estas son las funciones de cada uno de los controles de estas zonas. En la zona 1 se encuentran estos controles:

Protocolo PCR: Es el identificador único del protocolo de PCR. Es un campo de texto que debería identificar de forma inequívoca el protocolo de PCR en la base de datos. El usuario no tiene por qué modificarlo. Para evitar inconsistencias, el formulario genera automáticamente el código utilizando esta fórmula:

PCR-Fragmento<NúmeroDeIdentificacion

Fragmento: Es el código del fragmento que se va a amplificar en esta PCR. El usuario debe elegirlo de la lista desplegable. Al hacer doble clic sobre este campo se carga un formulario con las características del fragmento actual. Si se desea añadir un nuevo fragmento se puede hacer en este mismo formulario.

Día: Día que tuvo lugar la PCR. Al pulsar en el botón "Ver PCRs de este día" se muestran sólo las PCRs registradas en el día actual.

Variante: Variante del día en que tuvo lugar la PCR. El código de identificación único de un día está compuesto por los dígitos que constituyen la fecha de ese día (en formato DD/MM/AA) separados por un guion de la variante. La variante del día es un número correlativo que identifica de manera única al día en la base de datos. Dado que el día es una variable tan importante en el almacenamiento de los datos y que en un mismo día se pueden hacer varios experimentos de un mismo tipo, la base de datos requiere que el código de identificación del día sea único. La manera de almacenar los datos permite que el código de identificación se repita entre experimentos de distinto tipo, pero debe ser único para discriminar experimentos del mismo tipo. Para el usuario esto puede resultar poco intuitivo y puede ser difícil saber la variante del día que le corresponde. El programa facilita las cosas porque antes de poder utilizar un nuevo día, este debe ser declarado. Para declararlo se debe pulsar en el botón "+Días". Este abre el formulario de introducción de días. Dicho formulario calcula automáticamente la variante del día. Una vez registrado el día ya se puede utilizar en el campo Variante.

µl de PCR: Este es un campo calculado que indica el volumen final de la PCR. El usuario no debe hacer nada para introducirlo ya que se calcula multiplicando el número de muestras por la suma de las cantidades de tampón de PCR y de ADN.

Funciona: Indica que la PCR ha funcionado satisfactoriamente. alguna de las muestras ha amplificado como se espera: ha producido una sola banda y es del tamaño adecuado.

Falla: Indica que ninguna de las muestras ha amplificado correctamente. Se puede considerar que el protocolo no es funcional.

Si no se encuentran marcadas ninguna de las 2 casillas (Funciona o Falla) quiere decir que no se ha registrado la evaluación del resultado de la PCR. En principio, estas casillas no se marcan hasta no haber comprobado los resultados de la PCR.

DNA: Caja de ADN del que proceden las muestras. En ocasiones se hacen placas de PCR de 96 pocillos cuyo ADN proviene de varias cajas. La forma correcta de modelar esto en la base de datos es crear un nuevo protocolo para cada caja de ADN.

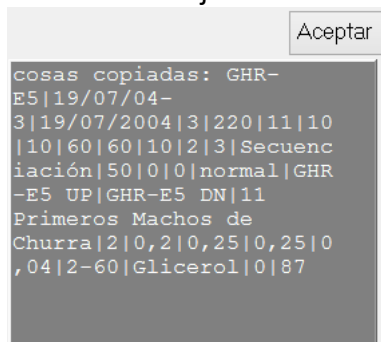
Nº de muestras: El número de muestras afectadas por el protocolo de PCR.

μl de tampón: El número de μl de tampón de PCR que se empleará en cada una de las muestras.

μl de DNA: El número de μl de ADN que se empleará en cada una de las muestras.

Además de estos campos, en esta región del formulario también se encuentran una serie de botones:

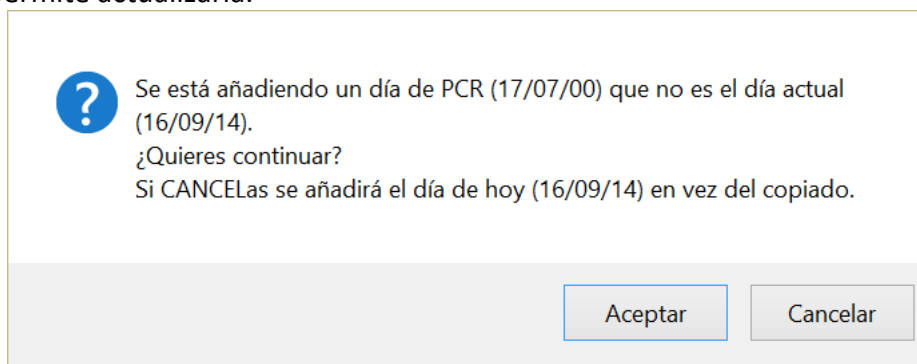
Copiar Valores: Copia todos los campos del protocolo actual necesarios para clonar la PCR. Al copiar los valores se genera un mensaje en la zona de notificación que informa de los valores copiados. Pulsando el botón "Aceptar", o cambiando de registro, se borra este mensaje.



La lista de datos copiados es la siguiente: fragmento, código de día, Día, Variante, μl Totales, numero de Muestras, μl Tampón, μl DNA, Programa de PCR, Temperatura, concentración Tampón, Termociclador, concentración de MgCl₂, tipo de PCR, concentración MgCl₂ Stock, Betaína, Glicerol, Tipo de Taq, Cebador UP, Cebador DN, Caja, Concentración dNTPs Inicial, Concentración dNTPs Final, Concentración Cebador UP Final, Concentración Cebador DN Final, Taq Final, Programa PCR, Nombre del Segundo Aditivo, Cantidad del Segundo, y Stock del Segundo Aditivo.

Registro Siguiente: Cambia al siguiente registro de la base de datos. Si se encontrase en el último registro generaría el formulario necesario para introducir un nuevo registro.

Pegar Valores: Pega todos los campos copiados mediante el botón "Copiar Valores". Este botón pega la fecha de los datos copiados y si no coincide con el día actual permite actualizarla.



Este comportamiento se diseñó así porque es habitual copiar las condiciones de un protocolo anterior para realizar los cálculos de la PCR actual. Un ejemplo claro es cuando se realiza una PCR de amplificación a partir de una PCR de optimización que funciona correctamente.

VerPCRs

Ver PCRs: Este botón lanza una consulta que indica los protocolos de PCR que se han registrado en ese día. Es útil para consultar el número de variantes del día disponibles.

En primer lugar se pregunta por el día buscado: El día debe introducirse en formato de fecha corta: DD/MM/AAAA.

¿que día buscas?

A continuación se muestra el resultado de la consulta:

Día	Código de día	Protocolo PCR
19/07/2004	19/07/04-1	PCR-GHR-E5<102
19/07/2004	19/07/04-2	PCR-GHR-E4<104
19/07/2004	19/07/04-3	PCR-GHR-E5<105

En la columna "Código de día" se muestra el identificador único del día para cada protocolo de PCR.

verlo

verlo: Este botón, anexo al control de selección del código de día sirve para lanzar el formulario de introducción de días con los datos del seleccionado cargados en él:

Nombre del día	19/07/04-3	nº. de variantes de este día	3	Ver día	19/07/2004	?	
Día	19/07/04	Variante:	3	Crear más variantes de este día:			
Hoy	◀ ▶	Más protocolos de PCR	PCR-GHR-E5<105	Verlo	Recuento de	Día	Variante
Más protocolos de secuenciación		Verlo	Protocolos de PCR		3	1	
Más protocolos de SSCP		Verlo	Protocolos Secuenciación				
Observaciones		Verlo	Protocolos de SSCP				
		Verlo	Muestras Secuenciadas				
		Verlo	Experimentos SNP				
		Verlo	Protocolos MegaBACE				
		Verlo	Protocolos ABI				
		Verlo	Condiciones de carga MegaBACE				
		Verlo	Condiciones de carga ABI				

Este formulario muestra la variante 3 del día 10/07/2004. Indica que en esta variante está registrado el protocolo PCR-GRH-E5<105, que en ese día se han recontado 3 variantes de protocolos de PCR y que en esta variante sólo hay registrado un protocolo de PCR. Dado que el correcto funcionamiento de la base de datos sólo permite un protocolo de PCR por variante, si hubiese más de una, el número se mostraría en color rojo para llamar la atención del usuario e instarle a que lo corrija.

+Días

Más Días: Lanza el [formulario de introducción de días](#) para la introducción de nuevos datos.

Nombre del día		nº. de variantes de este día	0	Ver día		?	
Día		Variante:		Crear más variantes de este día:			
Hoy	◀ ▶	Más protocolos de PCR		Verlo	Recuento de	Día	Variante
Más protocolos de secuenciación		Verlo	Protocolos de PCR				
Más protocolos de SSCP		Verlo	Protocolos Secuenciación				
Observaciones		Verlo	Protocolos de SSCP				
		Verlo	Muestras Secuenciadas				
		Verlo	Experimentos SNP				
		Verlo	Protocolos MegaBACE				
		Verlo	Protocolos ABI				
		Verlo	Condiciones de carga MegaBACE				
		Verlo	Condiciones de carga ABI				

?

Actualizar: Recarga los datos de los controles de los formularios. Permite utilizar cómodamente datos registrados mediante formularios externos.

?

?: Botón para mostrarla ayuda del formulario registrada en la base de datos.



Vista previa del informe: Lanza un informe que permite imprimir los datos de la PCR en un formato adecuado para adjuntarlo al cuaderno de laboratorio.

PCR-GHR-E5<105				19/07/04-3				
Funciona:		<input checked="" type="checkbox"/>	11 Primeros Machos de Churra					
nº muestras		11	µl tampón:		10	µl DNA:		10
Agua		40,04		Programa		60		
Tampon		22		Termociclador		2		60 °C
dNTPs		22		DB		105		[MgCl2]
CebadorUP		5,5		GHR-E5 UP		3		mM
CebadorDN		5,5		GHR-E5 DN		Secuenciación		
[MgCl2]		13,2		Ver página 200' y foto en la 202.				
Betaina		0						
Glicerol		0						
Taq normal		1,76						

Este informe es una tabla compacta con todos los datos necesarios para realizar la reacción de PCR. Todos los datos están expresados en µl. La celda DB indica el código numérico que el protocolo tiene en la base de datos. Se corresponde con el campo "nº".

El informe puede contener varios protocolos de PCR consecutivos. Por tanto, en primer lugar se pide el código del primer protocolo:

Numero del primer protocolo

Aceptar
 Cancelar

A continuación se pide el del último protocolo de la serie:

Numero del último protocolo

Aceptar
 Cancelar

Al pulsar en el botón "Aceptar" se obtiene el informe con la lista de protocolos deseada:

Este comportamiento permite obtener juntos protocolos de reacciones que están muy relacionadas. Por ejemplo, cuando se realiza una placa de optimización de la PCR, en la que se incluyen varias condiciones diferentes y cada una de ellas requiere registrar un protocolo distinto, es útil imprimirlas todas juntas para tener la recetas en el laboratorio en el momento de realizar la reacción.

La zona 2 contiene botones que pueden resultar útiles para el manejo de los datos de la PCR.

CalcularPCR

comprobar datos de PCR

+ Programas PCR

Ver variantes de día

CalcularPCR

CalcularPCR: Permite re-calcular la composición final de la PCR. Al introducir los datos, el formulario realiza de forma automática los cálculos de la PCR. Este botón se usa para forzar la repetición de esos cálculos. Si se detectasen errores en los datos de la PCR, se mostrarían los mensajes de error correspondientes. Si se modifica alguno de los valores almacenados se muestra en rojo la modificación y se indica en la salida.

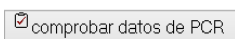
H2O.....	36,5	
Tampón 10 x	10	
dNTPs.....	0	
Cebador UP.....	1,25	
Cebador DN.....	1,25	
[MgCl2] 25 mM	0	
Betaina 0 M	0	
Glicerol 0	0	
Taq: normal	1	

μl

Cuidado:

La cantidad de Agua almacenada: 39 no coincide con la calculada: 36,5.

Aceptar



☑ comprobar datos de PCR: Realiza las validaciones de los datos de la PCR. Si se detecta algún error se informa al usuario. Estas validaciones son ejecutadas automáticamente al introducir los datos en el formulario. Este botón sirve para repetirlas en registros pretéritos. Al pulsarlo se mostrará un resumen con el recuento de errores y alertas en la parte superior y una lista detallada de los mensajes a tener en cuenta en el cuadro inferior.

Los errores se clasifican en 2 tipos: Errores y Alertas. Los errores indican aquellas circunstancias que deberían ser corregidas. Las alertas, aquellas que deberían tenerse en cuenta.

En este caso:

Betaina	▼	M	0
Glicerol	▼	▼	0

se indica un error que, aunque no afecta a los cálculos (porque los datos faltantes se toman como 0), podría afectar a otras consultas que se le hiciesen a la base de datos.

Errores:2 Alertas:0 Aceptar

Error grave: No se ha rellenado la concentración de Betaina final.

Error grave: No se ha rellenado la concentración de Glicerol final.

Una vez corregidos los errores:

Betaina	0	▼	M	0
Glicerol	▼	0	▼	0

El resultado de la comprobación mejora:

Correcto. Aceptar

La función de comprobación de los datos de PCR evalúa si existen los datos necesarios para realizar los cálculos de la PCR y hace algunas comprobaciones adicionales. Las comprobaciones que se realizarán son las siguientes:

- Que no se ha marcado las casillas Funciona y Falla a la vez. Generará este mensaje: "Error: Es ilógico que un protocolo funcione y falle a la vez. Elije sólo una de las 2 opciones".
- Que se ha introducido la temperatura de PCR. Generará este mensaje: "Alerta: Falta la temperatura de PCR."
- Que la temperatura del protocolo de PCR coincida con la temperatura del programa del termociclador. Generará este mensaje: "Alerta: Las temperaturas no coinciden. La del programa de PCR es ... °C. La almacenada en este formulario es ..."

°C.". Es de esperar que la temperatura del programa de PCR, la del protocolo de PCR o ambas deban ser revisadas. Aunque el parámetro de la temperatura es muy importante para una reacción de PCR, se ha clasificado este error como una alerta porque no influye en los cálculos de las cantidades de PCR y porque el origen del error podría ser externo a los datos del protocolo de PCR (podría estar mal el programa).

- Que se ha introducido la cantidad de tampón de PCR. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado los microlitros totales de tampón."
- Que se ha rellenado la concentración del tampón stock. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la Concentración de Tampón en stock."
- Que se ha rellenado la concentración del MgCl_2 stock. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la Concentración MgCl_2 en stock."
- Que se ha rellenado la concentración del MgCl_2 final. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la Concentración MgCl_2 final."
- Que la concentración final de MgCl_2 no sea 0. Generará este mensaje: "Alerta: Me parece extraño que la concentración de MgCl_2 final sea 0. El Mg es un activador de la polimerasa muy importante."
- Que se ha rellenado la concentración de dNTPs final. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la concentración de dNTPs final."
- Que se ha rellenado la concentración de Betaína final. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la concentración de Betaína final."
- Que se ha rellenado la concentración de Glicerol final. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la concentración de Glicerol final."
- Que se ha rellenado la concentración de dNTPs stock. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la concentración de dNTPs en stock."
- Que se ha rellenado la concentración de Cebador UP stock. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la concentración del Cebador UP en stock."
- Que se ha rellenado la concentración de Cebador UP final. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la concentración del Cebador UP final."
- Que se ha rellenado la concentración de Cebador DN stock. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la concentración del Cebador DN en stock."
- Que se ha rellenado la concentración de Cebador DN final. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la concentración del Cebador DN final."
- Que se ha rellenado la proporción de Tampón final. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la proporción de Tampón final."
- Que se han rellenado las unidades de Taq en stock. Generará este mensaje: "Error grave: No se han rellenado las unidades de Taq en stock."
- Que se ha rellenado la concentración final de Taq. Generará este mensaje: "Error grave: No se ha rellenado la concentración final de Taq."
- Que se ha rellenado el número de muestras. Generará este mensaje: "Alerta: No se ha rellenado el número de muestras."
- Que el número de muestras es mayor que 0. Generará este mensaje: "Alerta: 0 son pocas muestras ¿verdad?."

- Que se ha rellenado el número de microlitros de tampón por cada muestra. Generará este mensaje: "Alerta: No se han rellenado los microlitros de tampón por muestra."
- Que se ha rellenado el número de microlitros de tampón de PCR por cada muestra. Generará este mensaje: "Alerta: Menuda PCR vas a hacer si no añades tampón de PCR a cada muestra."
- Que se ha rellenado el número de microlitros de ADN por cada muestra. Generará este mensaje: "Alerta: No se han rellenado los microlitros de DNA por muestra. Se considerará que son los mismos que de mezcla de PCR.". En este caso los cálculos pueden realizarse porque se considera que es práctica habitual no rellenar el número de microlitros de ADN por muestra cuando es el mismo que el de mezcla de PCR.
- Que el número de microlitros de ADN no es 0. Generará este mensaje: "Alerta: No añades nada de DNA a cada muestra."
- Que el volumen total registrado para la PCR no coincide con el calculado mediante la fórmula: $\text{NumeroDeMuestras} * (\text{MicrolitrosDeTampón} + \text{MicrolitrosDeDNA})$. Generará este mensaje: "Alerta: El volumen total de la PCR no coincide con el calculado a partir del número de muestras por la suma del tampón y el DNA por muestra."
- Que las cantidades de los reactivos no sean negativas. Generará los mensajes: "Alerta: Una cantidad de agua negativa es físicamente imposible.", "Alerta: Una cantidad de tampón negativa es físicamente imposible.", "Alerta: Una cantidad de dNTPs negativa es físicamente imposible.", "Alerta: Una cantidad de cebador (UP) negativa es físicamente imposible.", "Alerta: Una cantidad de cebador (DN) negativa es físicamente imposible.", "Alerta: Una cantidad de MgCl₂ negativa es físicamente imposible.", "Alerta: Una cantidad de Betaína negativa es físicamente imposible.", "Alerta: Una cantidad de 2º aditivo negativa es físicamente imposible." o "Alerta: Una cantidad de Taq negativa es físicamente imposible."
- Que no se hayan intercambiado las concentraciones de Glicerol y DMSO. Generará este mensaje: "Alerta: La concentración stock de DMSO suele ser del 100 %. El 87 % suele corresponder a la de Glicerol."
- Que no se hayan intercambiado las concentraciones de Formamida y Glicerol. Generará este mensaje: "Alerta: La concentración stock de Formamida suele ser del 100 %. El 87 % suele corresponder a la de Glicerol."
- Que la concentración de Glicerol stock sea del 87%. Generará este mensaje: "Alerta: La concentración stock de Glicerol suele ser del 87 %."
- Que las cantidades de reactivos de la PCR coinciden con las calculadas. En caso de que no sea así, se marcan en rojo las que no coinciden y se informa de ello mediante un mensaje de este tipo: "La cantidad de ALGO almacenada: XXX no coincide con la calculada: YYY."

+ Programas PCR

Más Programas PCR: Muestra el formulario para [añadir más programas de PCR](#). Es de utilidad si el protocolo de PCR que se está registrando no utiliza ninguno de los programas de PCR de la base de datos.

Ver variantes de día

Ver variantes del día: Permite consultar las variantes que tiene un día. En primer lugar se pregunta por el día de interés.

¿que día buscas?

19-7-2004

Aceptar Cancelar

En este campo se puede introducir la fecha en cualquiera de los formatos admitidos por la base de datos.

Se obtiene la lista de variantes registradas para ese día:

Código de día
19/07/04-1
19/07/04-2
19/07/04-3

La zona 3 cumple una de las funciones más importantes del formulario: contiene los resultados de los cálculos de la composición de la PCR.

H2O	40.04
Tampón 10 x	22
dNTPs	22
Cebador UP	5.5
Cebador DN	5.5
[MgCl ₂] 50 mM	13.2
Betaina	0
Glicerol	0
Taq: normal	1.76
μl	

+ Aditivos

Los controles que suele manipular el usuario son los siguientes:

Tampón 10 x

Concentración de tampón stock: En este cuadro se indica la concentración del tampón de PCR antes de ser mezclado con el resto de componentes para formar la mezcla de PCR. Habitualmente el tampón de PCR se almacena concentrado x veces. En este caso 10 veces. La concentración en la mezcla final será de 1x.

[MgCl₂] 50 mM

Concentración de MgCl₂ stock: La concentración del stock de MgCl₂. Se expresa en unidades mM.

Betaina 0 M

Concentración de Betaína final: Es la concentración final de betaína en la mezcla de reacción.

Glicerol 0

Nombre del 2º aditivo: Es el nombre de un segundo aditivo. El cuadro desplegable permite elegir entre los nombres de los aditivos registrados en la base de datos.

Glicerol 0

Concentración final del 2º aditivo: Es la concentración del segundo aditivo en la mezcla de reacción. El cuadro desplegable permite elegir entre las concentraciones de los segundos aditivos registradas en la base de datos. Se expresa en las unidades en las que esté registrado en la base de datos.

Taq:

Tipo de Taq: Tipo de enzima Taq polimerasa empleada en la reacción.

El resto de controles indican los μ l finales de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción. El total de la mezcla se distribuirá en tantos pocillos como muestras se hayan declarado y en cada uno se añadirá un volumen de ADN igual al indicado. Estos componentes son: H_2O , Tampón de PCR, mezcla de dNTPs, Cebador UP, Cebador DN, $MgCl_2$, Betaína, el 2º componente y la enzima Taq polimerasa.

Al pulsar el botón "CalcularPCR", los valores son recalculados y se pueden reescribir. Aunque los valores de estos controles pueden ser calculados automáticamente a partir del resto de parámetros de la PCR, son almacenados en la base de datos. De esta forma, el usuario puede almacenar valores distintos de los que realmente se calculan. Este comportamiento no es el recomendado y, si de forma excepcional se llevase a cabo, debería anotarse el motivo que lo provoca. Para ello se dispone del cuadro de comentarios.

El botón "[+ Aditivos](#)" llama al formulario de edición de aditivos.

La zona 4 contiene información importante sobre la PCR.

The screenshot shows a web form for PCR protocol configuration. At the top, there are dropdown menus for 'Programa' (set to 60) and 'Termociclador' (set to 2), and input fields for 'Tª PCR' (60) and '[MgCl2]' (3 mM). Below these are fields for 'nº' (105) and 'Tipo de PCR' (Secuenciación). A section with two dropdowns, 'GHR-ES UP' and 'GHR-ES DN', is highlighted with a large blue number '4'. To the right of these are buttons for '+ Tipos de PCR', '+ Cebadores', and 'Ver cebadores'. At the bottom, there are fields for 'Comentarios' and 'Localización gel' (202), and a text area for 'Ver página 200' y foto en la 202.

Los campos que deben rellenarse en esta zona son:

Programa: El código del programa de PCR. Puede elegirse de la lista desplegable. Al hacer doble clic sobre el cuadro se muestra el formulario de edición de los programas de PCR con la información del programa actual cargada en él. Si el programa deseado no se encontrase en la base de datos habría que añadirlo. Esto se puede hacer desde el formulario de edición de los programas de PCR, pulsando el botón "nuevo registro":



Tª PCR: Es la temperatura del segundo paso del ciclo central de la PCR (unión del cebador). Indica la temperatura a la que funcionan bien los cebadores de la PCR.

Termociclador: Nombre del termociclador empleado para la PCR. Cada termociclador debe tener un nombre que será único en la base de datos.

[MgCl₂]: Concentración de $MgCl_2$, expresado en unidades mM. El cuadro desplegable permite elegir entre el resto de concentraciones utilizadas en la base de datos.

nº: Identificador único del protocolo en la base de datos. Este número lo genera el programa automáticamente al introducir un nuevo protocolo. Será empleado como parte del nombre del protocolo de PCR, que también se genera automáticamente.

Tipo de PCR: Indica la clase de PCR que se está realizando. El tipo de PCR indica la finalidad de dicha PCR. Actualmente hay registrados 3 tipos:

- **Amplificación:** Para multiplicar la cantidad de ADN de un fragmento. Normalmente esta PCR ya funciona correctamente y se usa para multiplicar el fragmento en estudio en un conjunto de muestras.
- **Optimización:** Pertenece a un conjunto de PCRs con condiciones variantes que intenta encontrar aquellas en las que funciona mejor la PCR.
- **Secuenciación:** Para obtener ADN para la primera PCR de la secuenciación. Esta PCR ya debería estar muy optimizada y funcionar perfectamente.

Para añadir tipos adicionales se puede utilizar el botón "+Tipos de PCR" que llama al formulario "[Más Tipos De PCR](#)".

Cebador UP: El siguiente control es un selector que permite elegir el nombre del cebador UP de la PCR. Este cebador es el que alinea con el extremo 5' del fragmento que se está amplificando. El desplegable muestra los nombres de todos los cebadores UP registrados en la base de datos.

Cebador DN: El siguiente control es un selector que permite elegir el nombre del cebador DN de la PCR. Este cebador es el que alinea con el extremo 3' del fragmento que se está amplificando. El desplegable muestra los nombres de todos los cebadores DN registrados en la base de datos.

El botón "[Más cebadores](#)" llama al formulario de edición de cebadores para la inserción de uno nuevo.

El botón "[Ver cebadores](#)" lanza la consulta que muestra todos los cebadores registrados en la base de datos.

Localización gel: Breve texto para indicar dónde se puede localizar el gel de agarosa de comprobación de la PCR. En este caso, en la página 202.

Comentarios: Información adicional.

La zona 5 contiene parámetros adicionales. En general, estos parámetros varían muy poco entre unas PCRs y otras.

Más datos

+ Protocolos Secuenciación

Betaina stock:	5 M
2º Aditivo stock:	87 %
dNTPs stock:	2 mM
dNTPs final:	0,2 mM
Cebador UP stock:	10 μ M
Cebador UP final:	0,25 μ M
Cebador DN stock:	10 μ M
Cebador DN final:	0,25 μ M
Tampón final:	1 x
Taq stock:	5 U/ μ l
Taq final:	0,04 U/ μ l

Código del programa de PCR

2-60

Usuarios

Diseñador: Ale

Operador: Ale

Los campos que se pueden rellenar en esta zona son los siguientes:

Betaina stock: Concentración de la betaína que se añade a la reacción de PCR.

2º Aditivo stock: Concentración del segundo aditivo que se añade a la reacción de PCR.

dNTPs stock: Concentración de la mezcla de dNTPs que se añade a la reacción.

dNTPs final: Concentración final de dNTPs en la reacción de PCR.

Cebador UP stock: Concentración del cebador UP que se añade a la mezcla de reacción.

Cebador UP final: Concentración final del cebador UP en la reacción de PCR.

Cebador DN stock: Concentración del cebador DN que se añade a la mezcla de reacción.

Cebador DN final: Concentración final del cebador DN en la reacción de PCR.

Tampón final: Concentración final del tampón de PCR.

Por la propia definición de la unidad, lo normal es que la concentración final sea 1x.

Taq stock: Cantidad de enzima Taq polimerasa que se añade a la reacción de PCR. Se mide en unidades de enzima por microlitro de reacción.

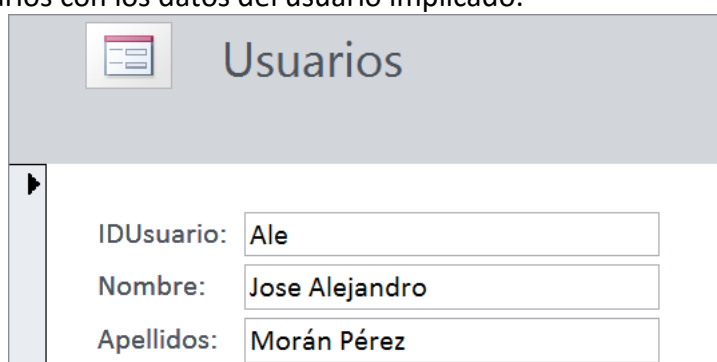
Taq final: Concentración final de la enzima Taq polimerasa en la mezcla de reacción. Se mide en unidades de enzima por microlitro de reacción.

Código del programa de PCR: Este cuadro muestra el identificador único del programa de PCR. Se actualiza solo cuando se modifican el programa o el termociclador. Al hacer doble clic sobre el campo se muestra el programa de PCR.

Diseñador: Código de identificación del usuario de la base de datos que diseñó la reacción de PCR: eligió fragmento, cebadores, Tm y demás condiciones.

Operador: Código de identificación del usuario que llevó a cabo la reacción de PCR en el laboratorio.

Al hacer doble clic en cualquiera de estos 2 campos se muestra el formulario de edición de usuarios con los datos del usuario implicado.



El formulario muestra los datos de un usuario en tres campos de texto:

- IDUsuario: Ale
- Nombre: Jose Alejandro
- Apellidos: Morán Pérez

El campo IDUsuario recoge el código de identificación del usuario en la base de datos. Este mismo formulario se puede emplear para crear nuevos usuarios.

La zona 6 contiene los controles de manejo de las muestras:

Sin Muestras												
Muestras: 10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

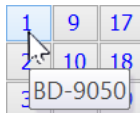
“Muestras” indica el número de muestras de la placa a las que se le aplica el protocolo de PCR.

Los controles simulan la disposición de las muestras en una placa de 96 pocillos. Los botones son de los siguientes tipos:

Numéricos: Cada una de las posiciones de la placa está identificada por un número correlativo. Al activar cada uno de estos botones se está indicando a la base

de datos que esa muestra se amplificó en el protocolo de PCR actual. Los botones que tienen la letra de color negro no están activados. Aquellos que tienen la tipografía de otro color se encuentran activados. Aquellas muestras que pertenecen a la misma raza no comparten el mismo color. El color indica la raza a la que pertenece la muestra.

Al pasar el ratón por una celda ocupada se muestra el nombre del animal:

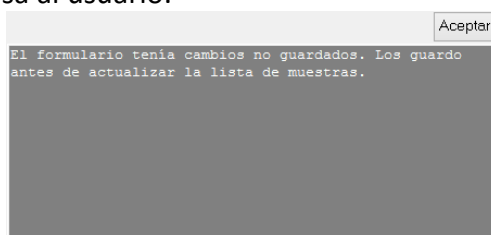


A Cambiar Fila: Estos botones contienen el nombre de la fila de la placa (de la A a la H). Al pulsar este tipo de botón se activan o desactivan todas las muestras de la fila que contenga la placa de PCR. El botón invierte el estado de activación de cada una de las muestras afectadas.

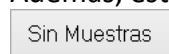
1 Cambiar Columna: Estos botones contienen el nombre de la columna de la placa (del 1 al 12). Al pulsar este tipo de botón se activan o desactivan todas las muestras de la columna que contenga la placa de PCR. El botón invierte el estado de activación de cada una de las muestras afectadas.

\ Cambiar toda la placa: Este botón cambia (activa o desactiva) todas las muestras de la placa. Invierte el estado de activación de todas las muestras afectadas.

Si se pulsa alguno de estos botones antes de guardar los cambios, el formulario lo detecta, los guarda y avisa al usuario:



Además, esta zona contiene un botón adicional:



Sin muestras: Este botón llama a otra versión del mismo formulario en la que no hay controles para manejar las muestras afectadas por el protocolo de PCR:

Protocolo PCR: PCR-GHR-E5<105 Copiar Valores Pegar Valores VerPCRs

Fragmento: GHR-E5 Código Día: 19/07/04-3 verlo

Día: 19/07/2004 Variante: 3 +Días

µl de PCR: 220 Funciona: [X] Falla: [] DNA: 11 Primeros Machos de Churra

Nº de muestras: 11 µl de tampon: 10 µl de DNA: 10 (x muestra)

CalcularPCR [X] comprobar datos de PCR + Programas PCR Ver variantes de día

H2O: 40.04 Programa: 60 Tª PCR: 60

Tampón: 10 x 22 Termociclador: 2 [MgCl2]: 3 mM

dNTPs: 22 nº: 105 Tipo de PCR: Secuenciación

Cebador UP: 5.5 GHR-E5 UP + Tipos de PCR

Cebador DN: 5.5 GHR-E5 DN + Cebadores

[MgCl2]: 50 mM 13.2 Comentarios: Ver página 200' y foto en la 202

Betaina: 0 Ver cebadores

Glicerol: 0

Taq: normal 1.76

+ Aditivos Con Muestras Más datos

+ Protocolos Secuenciación

Betaina stock: 5 M

2º Aditivo stock: 87 %

dNTPs stock: 2 mM

dNTPs final: 0.2 mM

Cebador UP stock: 10 µM

Cebador UP final: 0.25 µM

Cebador DN stock: 10 µM

Cebador DN final: 0.25 µM

Programa de PCR

Código: 2-60 Actualizar

Tª: 60 Tª central: 60

Taq: normal

Usuarios

Diseñador: Ale

Operador: Ale

Este formulario contiene un grupo de controles adicionales para el manejo del programa de PCR:

Programa de PCR

Código: 2-60 Actualizar

Tª: 60 Tª central: 60

Taq: normal

Al introducir cualquier código de programa de PCR en la casilla "Código" y pulsar en "Actualizar" se consultan, en la base de datos, los datos más relevantes del programa de PCR: Tª, Tª central y tipo de Taq. Estos controles son útiles para realizar búsquedas rápidas de los programas disponibles para una nueva PCR. El campo "Código" se actualiza automáticamente al modificar los campos "Código" o "Termociclador" de protocolos de PCR.

8.1.4.7 Más Protocolos PCR reducido

Añadir protocolos de PCR (Reducido):

Formulario básico para almacenar los datos de las PCRs. No calcula las cantidades de reactivos en la mezcla final. Tampoco permite modificar las concentraciones de los stocks. Este formulario se emplea embebido dentro del "[Asistente para añadir muestras de SSCP](#)".

Este formulario se considera obsoleto para la introducción de datos de PCR. Se recomienda utilizar el formulario "[Más Protocolos PCR](#)" en su lugar.

Protocolo PCR	PCR-GHR-E5<105	nº	105	Betaína		M	+ Aditivos
Fragmento	GHR-E5	Funciona	<input checked="" type="checkbox"/>	Glicerol		%	
Día PCR	19/07/04-3	Falla	<input type="checkbox"/>	[MgCl2]	3	mM	
Caja DNA	11 Primeros Machos de Churra	Código Programa de PCR		2-60			
Programa	60	Termocicla	2	Prog	60		
Termociclador	2	Tª central	60	Tª	60		
Tª PCR	60	Taq	normal	Cod	2-60		
Cebador UP	GHR-E5 UP	Registro: 1 de 1		Sin filtro			
Cebador DN	GHR-E5 DN	+ Protocolos Secuenciación		Actualizar			
Incidencias	Ver página 200' y foto en la 202.		+ Cebadores		Ver cebadores		
				> Versión ampliada			

Los campos que contiene son los siguientes:

Protocolo PCR: Es el identificador único del protocolo de PCR. Es un campo de texto que debería identificar de forma inequívoca en protocolo de PCR en la base de datos. El usuario no tiene por qué modificarlo. Para evitar inconsistencias, el formulario genera automáticamente el código utilizando esta fórmula:

PCR-Fragmento<NúmeroDeIdentificacion

Fragmento: Es el código del fragmento que se va a amplificar en esta PCR. El usuario debe elegirlo de la lista desplegable. Al hacer doble clic sobre este campo se carga un formulario con las características del fragmento actual. Si se desea añadir un nuevo fragmento se puede hacer en este mismo formulario.

Día PCR: Código del día que tuvo lugar la PCR.

Caja DNA: Caja de ADN del que proceden las muestras. En ocasiones se hacen placas de PCR de 96 pocillos cuyo ADN proviene de varias cajas. La forma correcta de modelar esto en la base de datos es crear un nuevo protocolo para cada caja de ADN.

Programa: El código del programa de PCR. Puede elegirse de la lista desplegable.

Tª PCR: Es la temperatura del segundo paso del ciclo central de la PCR (unión del cebador). Indica la temperatura a la que funcionan bien los cebadores de la PCR.

Cebador UP: Es un selector que permite elegir el nombre del cebador UP de la PCR. Este cebador es el que alinea con el extremo 5' del fragmento que se está amplificando. El desplegable muestra los nombres de todos los cebadores UP registrados en la base de datos.

Cebador DN: Es un selector que permite elegir el nombre del cebador DN de la PCR. Este cebador es el que alinea con el extremo 3' del fragmento que se está amplificando. El desplegable muestra los nombres de todos los cebadores DN registrados en la base de datos.

Incidencias: Información adicional.

nº: Identificador único del protocolo en la base de datos. Este número es generado automáticamente por el programa al introducir un nuevo protocolo. Será empleado como parte del nombre del protocolo de PCR, que también se genera automáticamente.

Betaína: Es la concentración final de betaína en la mezcla de reacción. El cuadro desplegable permite elegir entre las concentraciones utilizadas en la base de datos.

Nombre 2º Aditivo: Es el nombre del segundo aditivo. El cuadro desplegable permite elegir entre los aditivos de la base de datos.

Concentración 2º Aditivo: Es la concentración del segundo reactivo en la mezcla de reacción. El cuadro desplegable permite elegir entre las concentraciones utilizadas en la base de datos. Al elegir un nuevo valor de 2º aditivo se actualiza automáticamente la unidad con aquella registrada en la tabla de aditivos.

[MgCl₂]: Concentración de MgCl₂, expresado en unidades mM. El cuadro desplegable permite elegir entre las concentraciones utilizadas en la base de datos.

Funciona: Indica que la PCR ha funcionado satisfactoriamente. alguna de las muestras ha amplificado como se espera: ha producido una sola banda y es del tamaño adecuado.

Falla: Indica que ninguna de las muestras ha amplificado correctamente. Se puede considerar que el protocolo no es funcional.

Si no se encuentran marcadas ninguna de las 2 casillas (Funciona o Falla) quiere decir que no se ha registrado la evaluación del resultado de la PCR. En principio, estas casillas no se marcan hasta no haber comprobado los resultados de la PCR.

Código Programa de PCR: El identificador del programa de PCR utilizado. El cuadro que está debajo de este control permite consultar los datos más importantes del programa de PCR.

Código Programa de PCR	
Termocicla	2
Prog	60
Tª central	60
Tª	60
Taq	normal
Cod	2-60

Registro: 1 de 1 Sin filtro Actualizar

Al introducir un código en el campo "Código Programa de PCR" y pulsar en el botón "Actualizar" se consultan los datos de dicha PCR y se muestran en el cuadro. Esto está pensado para comprobar que el código es correcto o para buscar el adecuado.

Además de estos campos también hay botones para llamar a formularios que pueden resultar útiles.

- **Más Aditivos:** Llama al formulario de introducción de [aditivos](#).
- **Más Protocolos Secuenciación:** Llama al formulario de introducción de [protocolos de secuenciación](#).
- **Más Cebadores:** Llama al formulario de introducción de [cebadores](#).
- **Ver Cebadores:** Lanza una consulta sobre la base de datos que crea una lista con todos los [cebadores](#) registrados en ella.
- **> Versión Ampliada:** Llama al formulario más moderno de introducción de [protocolos de PCR](#). Este contiene más controles y permite manipular el juego completo de datos de los protocolos de PCR.

8.1.4.8 Más Termocicladores

Añadir termocicladores:

Formulario registrar las características de los termocicladores. Este formulario se muestra como lista de registros.

Termociclador	1
Marca	PERKIN ELMER
Modelo	GeneAmp PCR System 9700
Termociclador	2
Marca	PERKIN ELMER
Modelo	GeneAmp PCR System 9700
Termociclador	2700 LTI
Marca	ABI
Modelo	2700
Termociclador	3
Marca	PERKIN ELMER
Modelo	GeneAmp PCR System 9600
Termociclador	4
Marca	Applied Biosystems
Modelo	9800 Fast Thermal Cycler

Los datos necesarios para registrar un termociclador son:

Termociclador: El identificador único del termociclador en la base de datos.

Marca: Marca del termociclador.

Modelo: Modelo del termociclador.

8.1.4.9 Más Tipos De PCR

Añadir tipos de PCR:

Este formulario sirve para declarar la finalidad con la que se diseñan las PCRs. Se muestra como una lista de campos.

▶ Tipo de PCR	Amplificación
Características	Para multiplicar la cantidad de DNA de un fragmento. Normalmente esta PCR ya funciona correctamente y se usa para multiplicar el fragmento en estudio en un conjunto de muestras.
Tipo de PCR	Optimización
Características	Pertenece a un conjunto de PCRs con condiciones variantes que intenta encontrar aquellas en las que funciona mejor la PCR.
Tipo de PCR	Secuenciación
Características	Para obtener DNA para la primera PCR de la secuenciación. Esta PCR ya debería estar muy optimizada y funcionar perfectamente.

Los campos necesarios son:

Tipo de PCR: El nombre del tipo de la PCR.

Características: Una descripción de lo que ese nombre significa, de la finalidad de ese tipo de PCR.

8.1.4.10 Más Taq

Añadir tipos de Taq:

Para declarar diferentes clases de Taq polimerasa.

Tipo de Taq	<input type="text" value="fideiTaq"/>
Características	<input type="text" value="Enzima del 2º kit de fragmentos grandes"/>

Los campos para registrarlas son:

Tipo de Taq: Identificador único de la Taq. Este es el nombre que se usará en el resto de la base de datos para referirse a la Taq.

Características: Descripción de la Taq.

8.1.4.11 Ver Cebadores

Consultar cebadores:

Consulta los datos de los cebadores de la base de datos.

Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Tª PCR
136 DN	CTGCAGCTGGAGCAGTGGTA		
136 UP	GATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGC		
154 DN	GATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGG		
154 UP	CATGAGCAGGCCTCTTATACATTTT		
171 DN	TGTTGACACAGTCATGCACAAAG		
171 UP	GTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGA		
DGAT12-E8 DN	TGGGGGCGAAGAGGAAGTAGTAG	64,2993	
DGAT12-E8 UP	CCAAGGCCAAGGCTGGTGAG	63,5881	
DGAT1-E1 DN	AAAGGTTAGGGGTCACGCGCAC	61	64,5
DGAT1-E1 UP	GCGGCGGCGCGGGCGGCTCC	87,3	64,5
DGAT1-E10 DN	CCCAGAGTCCCCCCCCCCCC	70,5	63,5
DGAT1-E10 UP	TCACTGTCCGCTTGCTTCTTCCCC	66,9	63,5
DGAT1-E11 DN	CTGACCCCGGAACCCACCTG	64,1	60,6
DGAT1-E11 UP	GGGGCCGTTGGGGAGCTGACT	65	60,6
DGAT1-E12 DN	CCACGCGTCCCCACCCAGCAG	68,2	61,7
DGAT1-E12 UP	GTTCCGGGGTCAGGGCTGAGG	63,5	61,7
DGAT1-E13 DN	CGCCCCGGCAAGGCCACCCAC	72,4	64,9

Se muestra una lista con los siguientes campos:

Cebador: El nombre del cebador en la base de datos. El nombre del cebador suele construirse con el nombre del fragmento al que amplifica seguido de un espacio y la orientación del cebador.

Secuencia: La secuencia de nucleótidos del cebador, en orientación 5' -> 3'.

Tm (°C): Temperatura media del cebador, determinada por el programa con el que se diseñó el cebador. Se expresa en grados Celsius.

Tª PCR: Temperatura de PCR. Es la temperatura del segundo paso del ciclo central de la PCR. Este dato es empírico. Se expresa en grados Celsius.

8.1.4.12 Ver Condiciones De PCR x Fragmento

Consultar condiciones de PCR por fragmento:

Consulta las principales condiciones de PCR de un fragmento.

En primer lugar se pide el fragmento que se quiere consultar

Fragmento:

Selecciona un fragmento

Al seleccionar el fragmento el botón inferior muestra su nombre:

Fragmento:

Consultar OXI-E1

Al pulsar en él se muestran las condiciones en una lista que puede ser copiada y pegada en otros documentos como hojas de cálculo o procesadores de texto.

Fragmento	Fu	Protocolo PCR	Programa	Ter	T ²	Día PCR	MgCl	Be	Gl	Caja	Incide
OXI-E1	<input checked="" type="checkbox"/>	PCR-OXI-E1<28	60	1		60 2/06/02-1	1,5	0,5		5 2 Muestras para variabilidad SSCP	
OXI-E1	<input type="checkbox"/>	PCR-OXI-E1<30	60	1		60 5/06/02-1	1,5	0,5		5 2 Muestras para variabilidad	
OXI-E1	<input checked="" type="checkbox"/>	PCR-OXI-E1<31	60	2		60 20/06/02-1	3	0,91		0 Machos de churra	muy poco in
OXI-E1	<input checked="" type="checkbox"/>	PCR-OXI-E1<33	60	2		60 28/06/02-1	1,5	0,91		0 Machos de churra	Para SSCP
OXI-E1	<input checked="" type="checkbox"/>	PCR-OXI-E1<69	60	2		60 19/07/01-1	1,5	0,91		Machos de churra	

Esta consulta contiene sólo los datos principales de cada PCR, para obtener una lista más detallada se puede utilizar la consulta "[Ver Condiciones de PCR x Fragmento Ampliada](#)".

8.1.4.13 Ver Condiciones De PCR x Fragmento Ampliada

Consultar condiciones de PCR por fragmento (Ampliada):

Consulta las condiciones de PCR de un fragmento. Información ampliada.

En primer lugar se pide el fragmento que se quiere consultar

Fragmento:

Consultar OXI-E1

Al pulsar sobre "Consultar ..." se muestran las condiciones en una lista que puede ser copiada y pegada en otros documentos como hojas de cálculo o procesadores de texto.

Fragmento	Protocolo PCR	Día PCR	Conc	Codigo Progr	Temp	Cebador UP	Cebador DN	Funciona	Betaina	
OXI-E1	PCR-OXI-E1<28	2/06/02-1	1,5 1-60		60	OXI-E1 UP	OXI-E1 DN	<input checked="" type="checkbox"/>	0,5	
OXI-E1	PCR-OXI-E1<30	5/06/02-1	1,5 1-60		60	OXI-E1 UP	OXI-E1 DN	<input type="checkbox"/>	0,5	
OXI-E1	PCR-OXI-E1<31	20/06/02-1	3 2-60		60	OXI-E1 UP	OXI-E1 DN	<input checked="" type="checkbox"/>	0,91	
OXI-E1	PCR-OXI-E1<33	28/06/02-1	1,5 2-60		60	OXI-E1 UP	OXI-E1 DN	<input checked="" type="checkbox"/>	0,91	
OXI-E1	PCR-OXI-E1<69	19/07/01-1	1,5 2-60		60	OXI-E1 UP	OXI-E1 DN	<input checked="" type="checkbox"/>	0,91	
nº ciclos	Caja	T² Paso inici	Paso inicial	T² 1er paso	1er pa	T² 2º paso c	2º paso cent	T² 3er paso	3er paso cen	T² 1er paso f
30 2 Muestras par	94	300	94	30	60	40	72	40	72	
30 2 Muestras par	94	300	94	30	60	40	72	40	72	
30 Machos de chu	94	300	94	30	60	40	72	40	72	
30 Machos de chu	94	300	94	30	60	40	72	40	72	
30 Machos de chu	94	300	94	30	60	40	72	40	72	
1er paso fin	T² 2º paso fi	2º paso final	T² del progr	Tipo de Taq						
3600	4	99999	60 normal							
3600	4	99999	60 normal							
3600	4	99999	60 normal							
3600	4	99999	60 normal							
3600	4	99999	60 normal							

Esta lista es más exhaustiva que la que se obtiene mediante la consulta "[Ver Condiciones de PCR x Fragmento](#)". Abarca la totalidad de los datos de cada PCR.

8.1.4.14 Ver Errores De Temperatura

Detectar errores de temperatura:

Consulta que muestra aquellos protocolos de PCR cuya temperatura (del protocolo) no coincide con la temperatura del 2º paso central (que es la que se usa como referencia para determinar la temperatura del protocolo). Cada uno de los protocolos mostrados debería ser revisado para comprobar si tiene sentido o es un error de introducción de datos.

Codigo Programa	Día PCR	Protocolo PCR	Temperatura PCR	Tª 2º paso central	Tª del programa
1-58-61auto	8/11/05-1	PCR-GH2-E5-3prima<607	61	58	58
1-58-61auto	15/11/05-1	PCR-GH2-E5-3prima<613	61	58	58
1-58-61auto	16/11/05-1	PCR-GH2-E5-3prima<614	61	58	58
1-58-61auto	25/11/05-2	PCR-GH2-E5-3prima<630	61	58	58
1-58-61auto30	11/11/05-2	PCR-GH2-E5-3prima<611	61	58	61

8.1.4.15 Ver Programas PCR

Consultar Programas de PCR:

Muestra los datos numéricos de los programas del termociclador que elijas.

Esta consulta no muestra aquellos programas que están marcados con la etiqueta "viejo" en su nombre. Así, se considera que si un protocolo lleva en su nombre la palabra viejo es un protocolo que ya no se utiliza y que se mantiene en la base de datos por motivos documentales.

En primer lugar se pide el nombre del termociclador en que se está interesado.

Termociclador: ▼

Al pulsar en el botón "Consultar ..." se muestra la lista de datos de los programas registrados en ese termociclador.

Tipo de Taq	Tª	Programa	nº ciclos	Tª	Paso	Tª	1e	Tª	2º	Tª	3er	nºC	Tª1	1er	Inc	T	2ºPa	Inc	Tª3a	3er	Inc	Tª	1e	Tª	2º p	
Certamp Enhar	55	55-enhanced	35	94	180	94	30	55	60	72	180											72	600	4	99999	
ELT	50	50-2 copias 1	10	93	120	93	30	50	30	68	720	20	93	30			50	30		68	720	20	72	3600	4	99999
ELT	52	52-2 copias 1	10	93	120	93	30	52	30	68	720	20	93	30			52	30		68	720	20	72	3600	4	99999
ELT	55	55-2 copias	10	93	120	93	10	55	30	68	900	20	93	15			55	30		68	900	20	68	420	4	99999
ELT	62	62-2 copias	10	93	120	93	600	62	30	68	720	20	93	15			62	30		68	900	20	68	420	4	99999
fidelitaq	58	58-2 copiasf	35	93	60	94	60	58	30	68	900											68	180	4	99999	

Los títulos de los campos están condensados para que quepan en una misma pantalla y facilitar su visualización. Si se desea leer el nombre de alguna columna basta con hacer doble clic en la barra separadora que hay a su derecha. La lista de campos mostrados es esta:

"Tipo de Taq", "Tª del programa", "Programa", "nº ciclos", "Tª Paso inicial", "Paso inicial (seg)", "Tª 1er paso central", "1er paso central (seg)", "Tª 2º paso central", "2º paso central (seg)", "Tª 3er paso central", "3er paso central (seg)", "nºCiclosCiclo2", "Tª1erPasoCiclo2", "1erPasoCiclo2(seg)", "Incremento1erPasoCiclo2", "Tª2ºPasoCiclo2", "2ºPasoCiclo2(seg)", "Incremento2ºPasoCiclo2", "Tª3erPasoCiclo2", "3erPasoCiclo2(seg)", "Incremento3erPasoCiclo2", "Tª 1er paso final", "1er paso final (seg)", "Tª 2º paso final" y "2º paso final (seg)". Los campos "nº ciclos" y

"nºCiclosCiclo2" se refieren, respectivamente, al número de iteraciones del primer ciclo de la PCR y del 2º ciclo. Se mantiene el nombre "ciclo" usado en el laboratorio para referirse tanto a las iteraciones como al conjunto de pasos.

8.1.4.16 Ver Programas PCR Por Tipo De Taq

Informe de programas de PCR por tipo de Taq:

Crea un informe con los programas de PCR de un termociclador ordenados por tipo de Taq. Este es el informe que se imprime como guía (índice) de los programas de cada termociclador. Para cada programa muestra los datos de tiempo en segundos y, debajo, en formato horas:minutos:segundos. Este informe está pensado para imprimir, de manera lo más compacta posible, el listado de ciclos de un termociclador de forma que puedan ser consultado rápidamente en el laboratorio. No tiene soporte para mostrar el segundo ciclo de aquellos protocolos que lo incluyen. En primer lugar se pide el nombre del termociclador de interés:

Termociclador: ▼

Programas del termociclador 2

Tipo	Tª · Programa	iterac...	Tª · i* (seg)	Tª · 1c (seg)	Tª · 2º c (seg)	Tª · 3c (seg)	Tª · 1f (seg)	Tª · 2 f (seg)
Advantage-GC								
52, 52-1000	40	94 . 300	94 . 30	52 . 60	72 . 120	72 . 3600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:01:00	00:02:00	1:00:00	Infinito	
52, 52-1000	40	94 . 300	94 . 30	52 . 60	72 . 120	72 . 3600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:01:00	00:02:00	1:00:00	Infinito	
55, 55	30	94 . 300	94 . 30	55 . 40	72 . 40	72 . 3600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:00:40	00:00:40	1:00:00	Infinito	
54, 54-1000	36	94 . 300	94 . 30	54 . 40	72 . 120	72 . 3600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:00:40	00:02:00	1:00:00	Infinito	
Advantage-GC								
60, 60-gc	36	95 . 180	94 . 30	60 . 60	.	0 . 60 . 180	4 . 99999	
		00:03:00	00:00:30	00:01:00	00:00:00	00:03:00	Infinito	
65, 65-gc	30	94 . 60	94 . 30	65 . 60	.	0 . 65 . 180	4 . 99999	
		00:01:00	00:00:30	00:01:00	00:00:00	00:03:00	Infinito	
Certamp Enhanced								
55, 55-enhanced	36	94 . 180	94 . 30	55 . 60	72 . 180	72 . 600	4 . 99999	
		00:03:00	00:00:30	00:01:00	00:03:00	00:10:00	Infinito	
ELT								
50, 50-2 copias 12	10	93 . 120	93 . 30	50 . 30	68 . 720	72 . 3600	4 . 99999	
Cuidado: Tiene 2 ciclos->	20	00:02:00	00:00:30	00:00:30	00:12:00	1:00:00	Infinito	
52, 52-2 copias 12	10	93 . 120	93 . 30	52 . 30	68 . 720	72 . 3600	4 . 99999	
Cuidado: Tiene 2 ciclos->	20	00:02:00	00:00:30	00:00:30	00:12:00	1:00:00	Infinito	
55, 55-2 copias	10	93 . 120	93 . 30	55 . 30	68 . 900	68 . 420	4 . 99999	
Cuidado: Tiene 2 ciclos->	20	00:02:00	00:00:30	00:00:30	00:15:00	00:07:00	Infinito	
52, 52-2 copias	10	93 . 120	93 . 30	52 . 30	68 . 720	68 . 420	4 . 99999	
Cuidado: Tiene 2 ciclos->	20	00:02:00	00:00:30	00:00:30	00:12:00	00:07:00	Infinito	
Advantage								
58, 58-2 copias	36	93 . 60	94 . 60	58 . 30	68 . 900	68 . 180	4 . 99999	
		00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:15:00	00:03:00	Infinito	
58, 58-2 copias	36	93 . 60	94 . 60	58 . 30	68 . 900	68 . 180	4 . 99999	
		00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:15:00	00:03:00	Infinito	
58, 58-1000	36	93 . 60	94 . 60	58 . 30	68 . 120	68 . 180	4 . 99999	
		00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:02:00	00:03:00	Infinito	
58, 58-2 copias	36	93 . 60	94 . 60	58 . 30	68 . 900	68 . 180	4 . 99999	
		00:01:00	00:01:00	00:00:30	00:15:00	00:03:00	Infinito	
60, 60-2 copias	36	93 . 60	94 . 30	60 . 30	68 . 900	68 . 900	4 . 99999	
		00:01:00	00:00:30	00:00:30	00:15:00	00:15:00	Infinito	
64, 64-2 copias	36	93 . 60	94 . 30	64 . 180	68 . 240	68 . 900	4 . 99999	
		00:01:00	00:00:30	00:03:00	00:04:00	00:15:00	Infinito	
Advantage								
44, 44-1000	36	95 . 300	94 . 30	44 . 40	72 . 40	72 . 600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:00:40	00:00:40	00:10:00	Infinito	
47, 47-1000	36	95 . 300	94 . 30	47 . 40	72 . 40	72 . 600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:00:40	00:00:40	00:10:00	Infinito	
48, 48-1000	36	95 . 300	94 . 30	48 . 40	72 . 40	72 . 600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:00:40	00:00:40	00:10:00	Infinito	
50, 50-1000	36	94 . 300	94 . 30	50 . 40	72 . 40	72 . 3600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:00:40	00:00:40	1:00:00	Infinito	
52, 52-1000	36	95 . 300	94 . 30	52 . 40	72 . 40	72 . 3600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:00:40	00:00:40	1:00:00	Infinito	
55, 55-1000	36	94 . 300	94 . 30	55 . 40	72 . 40	72 . 3600	4 . 99999	
		00:06:00	00:00:30	00:00:40	00:00:40	1:00:00	Infinito	

*i = paso inicial, c = ciclos centrales, f = pasos finales

hora, 8 de septiembre de 2014

Página 1 de 2

Después se genera al informe correspondiente al termociclador:

En detalle, el contenido del informe es el siguiente:

Programas del termociclador 2

Tipo	Tª · Programa	iterac...	Tª · i* (seg)	Tª · 1c (seg)	Tª · 2º c (seg)	Tª · 3c (seg)	Tª · 1f (seg)	Tª · 2 f (seg)
Advantage-GC								
60 . 60+gc	35	95 . 180	94 . 30	60 . 60	.	0 . 60 . 180	4 . 99999	
		00:03:00	00:00:30	00:01:00	00:00:00	00:03:00	Infinito	
65 . 65+gc	30	94 . 60	94 . 30	65 . 60	.	0 . 65 . 180	4 . 99999	
		00:01:00	00:00:30	00:01:00	00:00:00	00:03:00	Infinito	
Certamp Enhanced								
55 . 55-enhanced	35	94 . 180	94 . 30	55 . 60	72 . 180	72 . 600	4 . 99999	
		00:03:00	00:00:30	00:01:00	00:03:00	00:10:00	Infinito	
ELT								
50 . 50-2 copias 12	10	93 . 120	93 . 30	50 . 30	68 . 720	72 . 3600	4 . 99999	
Cuidado: Tiene 2 ciclos->	20	00:02:00	00:00:30	00:00:30	00:12:00	1:00:00	Infinito	

El título del informe incluye, en rojo, el nombre del termociclador.

La lista está dividida en secciones según el tipo de Taq utilizada. El nombre de la Taq es el título de cada sección.

Cada uno de los programas ocupa una de las filas dobles.

En azul claro muestra la Temperatura del protocolo.

En violeta, tras un punto rojo, el nombre del protocolo

Si el protocolo tuviese más de un ciclo se mostraría un mensaje de advertencia debajo de estos campos para no incitar a error al usuario.

A continuación el número de iteraciones del primer ciclo.

Las siguientes casillas muestran los datos numéricos de cada una de las fases de la PCR.

En primer lugar se muestra la fase inicial. El primer número, antes del punto rojo es la temperatura expresada en grados Celsius. Le sigue la duración, en segundos, del paso.

Debajo, con fondo amarillo, se muestra la duración del paso en un formato más intuitivo: horas:minutos:segundos.

A continuación se muestran los 3 pasos del ciclo central de la PCR. La disposición y formato de los números es idéntica al caso anterior. Aquellos pasos que se muestran sin temperatura y duración de 0 segundos son inexistentes.

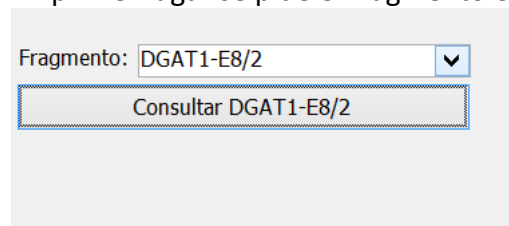
En la parte derecha de la tabla se muestra la fase final de la PCR, con idéntica disposición y formato de los dígitos. Por convención se utiliza el número 99999 como sinónimo de infinito. Como la zona inferior está destinada a un formato más intuitivo se traduce dicho número por "Infinito".

En la parte baja de cada hoja del informe se muestra la fecha de generación, una leyenda para identificar el significado de las letras usadas en los códigos de cada paso, el número de página actual y el total de páginas del informe.

8.1.4.17 Ver Toda La PCR De 1 Fragmento

Informe PCRs de un fragmento:

Crea un informe en el que se muestran, gráficamente, todos los protocolos de PCR a los que se ha sometido a un fragmento. En primer lugar los que funcionan y en segundo lugar los que no funcionan. No puede mostrar protocolos de más de un ciclo. En primer lugar se pide el fragmento en que se está interesado.



Fragmento: ▼

A continuación se genera el informe de los protocolos de PCR utilizados con ese fragmento.

Ver todas las condiciones de PCR
Fragmento DGAT1-E8/2

Si funcionan:

Protocolo PCR	Día PCR	Código Programa	Cebador UP	Cebador DN	Tipo de Taq
PCR-DGAT1-E8/2<797	23/05/02-1	1-60	DGAT1-E8/2 UP	DGAT1-E8/2 DN	normal

Tª PCR

Caja	[MgCl ₂]	Betaina	Glicerol
60	3	0,5	5

2 Muestras para variabilidad

Funciona: ☒
Falla: ☐
Tipo de PCR: Optimización

lunes, 8 de septiembre de 2014

Página 1 de 10

En detalle, el contenido del informe es el siguiente:

Ver todas las condiciones de PCR

Fragmento DGAT1-E8/2

Si funcionan:

Protocolo PCR	Día PCR	Código Programa	Cebador UP	Cebador DN	Tipo de Taq
PCR-DGAT1-E8/2<797	23/05/02-1	1-60	DGAT1-E8/2 UP	DGAT1-E8/2 DN	normal

Tª PCR

Caja	[MgCl ₂]	Betaina	Glicerol
60	3	0,5	5

2 Muestras para variabilidad

Funciona: ☒
Falla: ☐
Tipo de PCR: Optimización

lunes, 8 de septiembre de 2014

Página 1 de 10

Bajo el título se muestra el nombre del fragmento,

Los protocolos de PCR se agrupan según su evaluación. Aquellos que funcionan se muestran a continuación del epígrafe "Si funcionan:".

Cada una de las fichas representa a uno de los protocolos. En la zona superior, cada uno de los valores de las variables está bajo su nombre. En la zona inferior hay una representación gráfica de un programa de PCR. Los valores sobre la línea roja son los °C de cada paso, los valores bajo la línea roja son los segundos que dura cada paso. Al lado se indica si el protocolo funciona o falla y el tipo de PCR que es.

En la parte inferior de cada hoja del informe se muestra la fecha de generación, el número de página actual y el total de páginas del informe.

8.1.5 SSCP

Esta sección comprende formularios y consultas diseñados para manejar los datos de experimentos de SSCP.

Asistente para añadir muestras:

Completísimo asistente para guiar a un usuario inexperto a añadir muestras de SSCP. Para ello basta con seguir un procedimiento ordenado consistente en añadir...

- 1) El gen
- 2) El fragmento
- 3) Los cebadores
- 4) Los días de los experimentos
- 5) Los protocolos de PCR
- 6) Los Patrones de SSCP
- 7) Los resultados de los experimentos de SSCP

Los botones están agrupados de la siguiente manera:

- **Añadir información:** Estos botones lanzan los formularios de adición de información de SSCP.
- **Consultar información:** Estos botones lanzan las consultas e informes más habituales.
- **Consultar más información:** Estos botones lanzan consultas o archivos que pueden resultar útiles en determinados momentos pero que no son tan habituales como los del grupo anterior.

8.1.5.1 Asistente Para Añadir Muestras

Asistente para añadir muestras:

Este es un asistente para guiar a un usuario inexperto en la tarea de añadir muestras de SSCP. Se ha creado para guiar al usuario en el procedimiento adecuado de introducción de los datos. Cuando se realiza un experimento de SSCP, y se quieren registrar los datos de dicho experimento, lo más intuitivo es lanzar el formulario de introducción de resultados del experimento. Sin embargo, el sistema de protección de datos del programa no permite usar patrones de experimentos que no hayan sido registrados previamente, lo mismo ocurre para la fecha del experimento. La idea es que cada dato se registre una sola vez y se utilice en toda la base de datos. Esto garantiza la consistencia de los datos al evitar duplicados y errores mecanográficos. Así, hay una red de dependencias que se deben cumplir antes de rellenar un dato concreto. Por ejemplo, para registrar un protocolo de PCR antes hay que registrar el fragmento de PCR que, a su vez, depende de que se haya registrado previamente el gen al que pertenece. El registro del gen no tiene ninguna dependencia. Por ello es el candidato ideal para iniciar el proceso. El procedimiento va de lo más genérico (el gen)

a lo más específico (la muestra). Para añadir las muestras de los experimentos de SSCP basta con seguir un procedimiento ordenado consistente en añadir ...

- 1) El gen
- 2) El fragmento
- 3) Los cebadores
- 4) Los días de los experimentos
- 5) Los protocolos de PCR
- 6) Los patrones de SSCP
- 7) Los resultados de los experimentos de SSCP

El asistente crea un formulario especial que guía al usuario en estos pasos:

Asistente para la introducción de muestras de SSCP.

Desde este menú, el usuario puede saltar al paso que le interese o, si quiere añadir muestras completamente nuevas, basta con pulsar el botón "Siguiete ->". En cualquier momento puede cerrar el asistente pulsando en el botón correspondiente.

En detalle, estos pasos son los siguientes:

1º. Añadir el Gen: El primer paso para poder registrar una muestra en la base de datos es añadir el gen al que pertenece. Este paso del asistente muestra el [formulario de adición de genes](#) para poder comprobar si el gen está registrado en la base de datos o añadirlo, si procede.

Sobre el formulario se visualiza un texto de ayuda que resume el objeto de este paso del procedimiento.

En la zona inferior se muestran 3 botones:

- Principio: Al pulsarlo se vuelve al primer paso del Asistente.
- Siguiete->: Al presionarlo se continúa con el siguiente paso.
- Cerrar: Al hacer clic sobre él se cierra el asistente.

2º. Añadir el Fragmento: El siguiente paso es registrar el nombre del fragmento que se está estudiando. En este paso, el asistente embebe el [formulario de adición de fragmentos](#) para poder comprobar si el fragmento está registrado en la base de datos o añadirlo, si procede.

Sobre el formulario se visualiza un texto de ayuda que resume el objeto de este paso del procedimiento.

En la zona inferior se muestran 3 botones:

- Principio: Al pulsarlo se vuelve al primer paso del Asistente.
- Siguiente->: Al presionarlo se continúa con el siguiente paso.
- Cerrar: Al hacer clic sobre él se cierra el asistente.

3º. Añadir los Cebadores: El 3^{er} paso es registrar los cebadores utilizados para realizar la PCR del fragmento que se está estudiando. En este paso, el asistente embebe el [formulario de adición de cebadores](#) para poder comprobar si cada cebador está registrado en la base de datos o añadirlo, si procede.

Sobre el formulario se visualiza un texto de ayuda que resume el objeto de este paso del procedimiento.

En la zona inferior se muestran 3 botones:

- Principio: Al pulsarlo se vuelve al primer paso del Asistente.
- Siguiente->: Al presionarlo se continúa con el siguiente paso.
- Cerrar: Al hacer clic sobre él se cierra el asistente.

El formulario embebido sólo muestra la zona de introducción de datos, a la derecha tiene una zona de consulta que, en principio, no es necesaria para el procedimiento actual. Si el usuario quisiese visualizarla podría desplazar horizontalmente el formulario mediante la barra de desplazamiento de la zona inferior derecha del formulario embebido.

4º. Añadir los Días de los experimentos: El 4º paso es el de añadir el día en que se realizó el experimento de SSCP. En este paso, el asistente embebe el [formulario de adición de días](#).

Recuento de	Día	Variante
Protocolos de PCR	1	1
Protocolos Secuenciación		
Protocolos de SSCP	1	1
Muestras Secuenciadas		
Experimentos SNP		
Protocolos MegaBACE		
Protocolos ABI		
Condiciones de carga MegaBACE		
Condiciones de carga ABI		

Sobre el formulario se visualiza un texto de ayuda que resume el objeto de este paso del procedimiento.

En la zona inferior se muestran 3 botones:

- Principio: Al pulsarlo se vuelve al primer paso del Asistente.
- Siguiente->: Al presionarlo se continúa con el siguiente paso.
- Cerrar: Al hacer clic sobre él se cierra el asistente.

5º. Añadir los Protocolos de PCR: En este paso se añade el protocolo con el que se realizó la PCR del experimento de SSCP. Para ello, el asistente embebe el [formulario de adición de protocolos de PCR reducido](#).

Protocolos de PCR

Introduce los protocolos de PCR utilizados para amplificar el fragmento.

Protocolo PCR	PCR-DGAT1-E8/2<23	nº	23	Betaina	0	M	+ Aditivos
Fragmento	DGAT1-E8/2	Funciona	<input checked="" type="checkbox"/>	Glicerol	5	%	
Día PCR	24/05/02-1	Falla	<input type="checkbox"/>	[MgCl2]	1.5	mM	
Caja DNA	2 Muestras para variabilidad	Código Programa de PCR	1-60				
Programa	60	Termocicla	1	Prog	60		
Termociclador	1	Tª central	60	Tª	60		
Tª PCR	60	Taq	normal	Cod	1-60		
Cebador UP	DGAT1-E8/2 UP	Registro:	1 de 1				
Cebador DN	DGAT1-E8/2 DN	+ Protocolos Secuenciación Actualizar					
Incidencias							
							+ Cebadores Ver cebadores
							> Versión ampliada

Registro: 1 de 118 Filtrado Buscar

Principio Siguiente-> Cerrar

Sobre el formulario se visualiza un texto de ayuda que resume el objeto de este paso del procedimiento.

En la zona inferior se muestran 3 botones:

- Principio: Al pulsarlo se vuelve al primer paso del Asistente.
- Siguiente->: Al presionarlo se continúa con el siguiente paso.
- Cerrar: Al hacer clic sobre él se cierra el asistente.

6º. Añadir los Patrones de SSCP: El sexto paso consiste en añadir los patrones de SSCP obtenidos. Para ello, el asistente embebe el [formulario de adición de patrones de SSCP](#).

Patrones

Añade los patrones de SSCP si no se encuentran en la base de datos.

Mutante	2	Nombre	2DGAT1-E8/2
Fragmento	DGAT1-E8/2		
Genotipo	DGAT1-E8/2>117AAA		
Nombre en geles	M2	Esquema	
Hay ambigüedades	<input type="checkbox"/>		
Muestras del patrón:	5		
<div>+ Fragmentos</div> <div>+ Genotipos</div> <div>Muestras</div>			
Comentarios:			

Registro: 7 de 172 Sin filtrar Buscar

Principio Siguiente-> Cerrar

Sobre el formulario se visualiza un texto de ayuda que resume el objeto de este paso del procedimiento.

En la zona inferior se muestran 3 botones:

- Principio: Al pulsarlo se vuelve al primer paso del Asistente.
- Siguiente->: Al presionarlo se continúa con el siguiente paso.
- Cerrar: Al hacer clic sobre él se cierra el asistente.

7º: Añadir los resultados de los Experimentos: En el 7º paso se pueden registrar los resultados de los experimentos de SSCP. Para ello, el asistente embebe el [formulario de adición de experimentos de SSCP](#). Este permite añadir cada muestra junto con el patrón obtenido cada día.

8º. Fin: Llegados a este paso, la información sobre los SSCPs ya se encuentra registrada en la base de datos. El formulario que se muestra propone varias opciones para continuar:

Consultar información: Este botón llama a la pestaña de [consultar información](#) del formulario inicio..

Pantalla principal de la base de datos: Este botón devuelve el control al [inicio](#).

Reiniciar Asistente: Vuelve al inicio del asistente.

Terminar: Cierra el asistente.

8.1.5.2 Buscar Características de Patrones

Buscar características de las secuencias de los patrones:

Muestra las características registradas en la base de datos para las secuencias que han sido genotipadas por SSCP y que pueden ayudar a establecer el genotipo de cada patrón. Son aquellas de tipo SNP, Variación, Base modificada, Inserción, Deleción, Microsatélite, Región repetida y Transposón.

En primer lugar se pide el nombre del fragmento de interés.

Fragmento: ▼

Al pulsar en “Consultar ...” se muestra la lista de características génicas de ese fragmento.

Patrón	Fragmento	Clave de muestra	muestra	Nombre muestra	Secuencia de referencia	Orientación	Tipo	Nombre	Inicio	Final
20XI-E2	OXI-E2	341	194 AW 4		SEQ-OXI-E2>20020725	UP	SNP	Heterocigoto S (G o C)	1333	1333
30XI-E2	OXI-E2	342	174 MX-9073		SEQ-OXI-E2>20020725	UP	SNP	Heterocigoto S (G o C)	1333	1333

Los campos de la tabla son los siguientes:

Patrón: Patrón de SSCP que presenta la muestra.

Fragmento: Fragmento al que pertenece el patrón.

Clave de muestra: Código de identificación en la base de datos de la muestra secuenciada (identificación del experimento de secuenciación).

Muestra: Código de identificación en la base de datos de la muestra de ADN (Identificación del tubo de ADN).

Secuencia de referencia: Nombre de la secuencia de referencia para la muestra secuenciada.

Orientación: Orientación de la secuenciación.

Tipo: Tipo de característica identificada.

Nombre: Nombre de la característica génica.

Inicio: Inicio de la característica génica.

Final: Última base, incluida, abarcada por la característica génica.

8.1.5.3 Buscar Muestras Secuenciadas de 1 Patrón

Buscar muestras secuenciadas de un patrón:

Consulta las muestras que presentan un patrón y han sido secuenciadas.

En primer lugar se pide el nombre del patrón de interés:

Patrón: ▼

Al pulsar en “Consultar ...” se presenta la lista de muestras secuenciadas de ese patrón.

Clave del pat	IDMuestraSe	Mutante	Nombre en e	Fragmento	Muestra	Nombre	día de secu	NombreEnAlineamien
20XI-E2	340 2	M2	OXI-E2		239 54900		25/07/02-1	239_340_UP_0_54900_2
20XI-E2	357 2	M2	OXI-E2		239 54900		25/07/02-2	239_357_UP_0_54900_2
20XI-E2	1211 2	M2	OXI-E2		239 54900		21/08/02-1	07-M2-54900_UP

Los campos de la tabla son los siguientes:

Clave del patrón: Nombre del patrón de SSCP.

IDMuestraSecuenciada: Código de identificación de la muestra secuenciada.

Mutante: Número de mutante del patrón de SSCP.

Nombre en esquemas: Nombre que se le asignó al patrón en los esquemas de SSCP.

Fragmento: Fragmento al que pertenece el patrón.

Muestra: Identificación única de la muestra de ADN.

Nombre: Nombre de la muestra de ADN.

día de secuenciación: Código del día de secuenciación de la muestra.

NombreEnAlineamiento: Nombre que se le dio a la muestra secuenciada en el alineamiento de las secuencias.

8.1.5.4 Buscar Patrones De 1 Gen

Buscar patrones de un gen:

Consulta los patrones detectados en un gen.

En primer lugar se pide el nombre del gen.

Gen: Prolactina

Consultar Prolactina

Al pulsar en el botón "Consultar ..." se muestra la tabla con los patrones del gen.

Fragmento	Clave del patrón	Nombre en esquemas
PRL2-E2	10PRL2-E2	M9
PRL2-E2	PatrónPRL2-E2	
PRL2-E2	9PRL2-E2	M8

Los campos de esta tabla son los siguientes:

Fragmento: El nombre del fragmento que presenta el patrón.

Clave del patrón: Identificador único del patrón en la base de datos.

Nombre en esquemas: Nombre que recibió el patrón en los esquemas del laboratorio.

En la imagen se muestra el "PatrónPRL2-E2" que no recibió ningún nombre en los esquemas de laboratorio. Este es un patrón sintético que acumula todas las bandas observadas en los patrones del fragmento PRL2-E2.

8.1.5.5 Buscar Patrones De 1 Gen Informe

Buscar patrones de un gen, informe:

Este informe lista los patrones que hay registrados para un gen.

En primer lugar se pide el nombre del gen:

Gen: Oxitocina

Consultar Oxitocina

Al pulsar el botón "Consultar ..." se muestra el informe que recoge los datos del gen interrogado.

<i>Patrones para el gen: Oxitocina</i>		
<i>Patrón / Fragmento / Nombre en esquemas</i>		
<i>OXI-E1</i>		
100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
1900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
2900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
3900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
4900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
5900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
6900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
7900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
8900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
9900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
10900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
11900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
12900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
13900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
14900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
15900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16600XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16700XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16800XI-E1		
OXI-E1		
M10		
16900XI-E1		
OXI-E1		
M10		
17000XI-E1		
OXI-E1		
M10		
17100XI-E1		
OXI-E1		
M10		
17200XI-E1		
OXI-E1		
M10		
17300XI-E1		
OXI-E1		
M10		
17400XI-E1		
OXI-E1		
M10		
17500XI-E1		
OXI-E1		
M10		
17600XI-E1		
OXI-E1		

8.1.5.6 Buscar Posiciones de las Características

Buscar posiciones de las características de las secuencias de los patrones:

Muestra las posiciones de las características registradas en la base de datos para las secuencias que han sido genotipadas por SSCP y que pueden ayudar a establecer el genotipo de cada patrón. Son aquellas de tipo SNP, Variación, Base modificada, Inserción, Deleción, Microsatélite, Región repetida y Transposón.

En primer lugar se pide el nombre del fragmento de interés.

Fragmento: ▼

Al pulsar en "Consultar ..." se muestra la lista de características génicas de ese fragmento.

Fragmento ▼	Nombre ▼	Tipo ▼	Inicio ▼	Final ▼	nº Secuencias ▼
OXI-E2	Y(Ct)	Variación	1156	1156	9
OXI-E2	Y(Ct)	Variación	1186	1186	9
OXI-E2	R(Ag)	SNP	1193	1193	31

Los campos de la tabla son los siguientes:

Fragmento: Nombre del fragmento al que pertenece la característica génica.

Nombre: Nombre de la característica génica.

Tipo: Tipo de característica génica.

Inicio: Primera base cubierta por la característica.

Final: Última base cubierta por la característica.

nº Secuencias: Número de secuencias en las que se encuentra la característica.

8.1.5.7 Contar Genotipos De Un Fragmento

Contar genotipos de un fragmento:

El botón "Recontar" lanza una consulta en la que se recuenta los genotipos para cada una de las condiciones.

En primer lugar se pide el fragmento de interés.

Fragmento: ▼

El cuadro desplegable sólo mostrará aquellos fragmentos que tengan genotipos registrados.

Al pulsar sobre el botón "Consultar ..." se mostrará la tabla de resultados.

Fragmento ▼	Genotipo ▼	Raza ▼	Caja ▼	Clave del patrón ▼	Recuento de genotipos ▼
OXI-E2	OXI-E2>AGAGA	Churra	2 Muestras para variabilidad	12OXI-E2	1
OXI-E2	OXI-E2>AGAGA	Churra	2 Muestras para variabilidad	1OXI-E2	16
OXI-E2	OXI-E2>AGAGA	Churra	2 Muestras para variabilidad	4aOXI-E2	2
OXI-E2	OXI-E2>AGAGA	Churra	Machos de churra	11OXI-E2	12

Contiene los siguientes campos:

Fragmento: El nombre del fragmento estudiado.

Genotipo: El nombre del genotipo.

Raza: El nombre de la raza del animal.

Caja: La caja de ADN donde se encuentra.

Clave del patrón: El nombre del patrón que mostró el genotipo en los experimentos de SSCP.

Recuento de genotipos: El número de muestras registradas que coinciden en todos los parámetros anteriores.

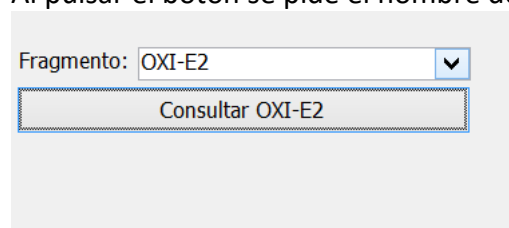
Para ver el detalle de la muestras que comparten cada genotipo se puede utilizar el formulario "[Ver Genotipos de Un Fragmento](#)".

8.1.5.8 Contar Mutantes De 1 Fragmento

Contar mutantes de un fragmento:

Cuenta los mutantes (patrones) de un fragmento.

Al pulsar el botón se pide el nombre del fragmento de interés.



Fragmento: OXI-E2

Consultar OXI-E2

El cuadro desplegable sólo mostrará aquellos fragmentos que tienen registrados genotipos en la base de datos.

Tras pulsar el botón "Consultar ..." se mostrará la tabla de resultados.

Clave del patrón	Nombre en esquemas	Recuento de muestras
11OXI-E2	M11	12
12OXI-E2	M12	2
13OXI-E2	M13	1
1OXI-E2	M1	79
2OXI-E2	M2	40

Esta contiene los siguientes campos:

Clave del patrón: Nombre del patrón de SSCP. La clave del patrón es única para toda la base de datos y su formato es generado por el formulario de introducción de datos correspondiente.

Nombre en los esquemas: Nombre que se le dio al patrón en el laboratorio. En el laboratorio suelen diferenciarse los patrones dentro del mismo fragmento. El algoritmo consiste en poner una letra M (de Mutante) y un número correlativo. Así, el M1 es el primer patrón que se identifica, el M2 el segundo, etc. Como estos nombre sólo son únicos dentro del fragmento, no se pueden utilizar como identificadores dentro de la base de datos. No obstante, se mantienen para poder establecer la correspondencia con los esquemas del laboratorio.

Recuento de muestras: Número de muestras que hay registradas con ese patrón.

8.1.5.9 Contar Mutantes de 1 Gen

Contar mutantes de un gen:

Cuenta los mutantes (patrones) de un gen.

En primer lugar se pide el nombre del gen.

Gen: ▼

Al pulsar en el botón "Consultar ..." se muestra la tabla en la que se recuenta el número de mutantes registrados para cada patrón de la base de datos.

Gen ▼	Clave del patrón ▼	Nombre en esquemas ▼	Recuento de muestras ▼
Oxitocina	13OXI-E2	M13	1
Oxitocina	10XI-E1	M1	250
Oxitocina	10XI-E2	M1	79

Esta tabla contiene los siguientes datos:

Gen: El nombre del gen.

Clave del patrón: Identificador único del patrón en la base de datos.

Nombre en los esquemas: Nombre que recibió el patrón en los esquemas del laboratorio.

Recuento de muestras: Cantidad de muestras registradas con dicho patrón en la base de datos.

8.1.5.10 Contar Patrones de SSCP por Raza

Contar patrones de SSCP por raza:

Esta consulta cuenta los individuos de cada raza que muestran cada uno de los patrones de un fragmento.

Es una consulta que pide un filtro antes de ejecutarse. Por ejemplo, si se quisiesen ver todos los patrones que contienen la 'GHR' en su nombre se pondría: *GHR*

* es un comodín, significa: 0 ó más caracteres.

Filtro del patrón:

Al pulsar el botón "Aceptar" se muestra una tabla con los resultados de la consulta.

Fragmento ▼	Clave del patrón ▼	Patrón ▼	Raza ▼	Nº de animales ▼
OXI-E2	11OXI-E2	M11	Churra	12
OXI-E2	12OXI-E2	M12	Churra	2
OXI-E2	13OXI-E2	M13	Churra	1
OXI-E2	10XI-E2	M1	Awassi	2

Los campos de esta tabla son los siguientes:

Fragmento: El nombre del fragmento estudiado.

Clave del patrón: El nombre del patrón que mostró el genotipo en los experimentos de SSCP.

Patrón: Nombre que se le dio al patrón en el laboratorio.

Raza: El nombre de la raza del animal.

Nº de animales: El número de muestras de la base de datos que comparten todas las variables de cada fila. Así, en la ilustración hay 12 muestras del fragmento "OXI-E2" que tienen el patrón "11OXI-E2", que en el laboratorio se llamaba "M11" y que son de raza Churra.

8.1.5.11 Más Experimentos SSCP

Añadir experimentos de SSCP:

Formulario para introducir las muestras de los experimentos de SSCP.

Muestra:

Caja: + Cajas

Nombre:

Posición: A 1 Número: 1

Experimentos de SSCP

Patrones disponibles

+ Protocolos

+ Patrones

+ Días

Día	Código	Patrón	Estac	Dia	Variant	Protocolo
1/01/1901-1	1GHR-E10.4	B	01/01/1901	1		
1/01/1901-1	1GHR-E10.3	B	01/01/1901	1		
27/11/01-1	1PRL-E3	R	27/11/2001	1		
4/12/01-1	1PRL-E3	B	04/12/2001	1	PRL-E3_15-12-5	
17/04/01-1	1PRL-E1	B	17/04/2001	1		
1/01/1901-1	1GHR-E10.1	B	01/01/1901	1		
29/09/00-1	1GHR-E10.2	B	29/09/2000	1	GHR-E10.2_41_8--5:53:00	
*						

Los datos necesarios para introducir las muestras de SSCP son los siguientes:

Muestra: Es el código de identificación único de la muestra en la base de datos. Este código lo elige automáticamente la base de datos con cada nuevo registro.

Caja: La caja de ADN donde se encuentra la muestra.

Nombre: Nombre de la muestra. Suele utilizarse el código anotado en el tubo de ADN.

Posición: Este dato contiene las coordenadas del pocillo:

- Fila: La asignada a su fila (En una placa de 96 pocillos la coordenada fila varía entre la A y la H).
- Columna: El número de columna (En una placa de 96 pocillos la coordenada columna varía entre el 1 y el 12).

Número: Numero de la muestra. En una placa de 96 pocillos, los números se asignan consecutivamente por columnas. Así, la posición A1 tendrá el 1, la B1 el 2, ..., la A2 el 9, etc.

Además, el formulario dispone de los siguientes botones

Patrones disponibles

Patrones disponibles: Este botón lanza una consulta sobre la base de datos para recuperar el listado de patrones que tiene cada uno de los fragmentos. En primer lugar se interroga por el fragmento de interés.

Fragmento:

Al pulsar el botón "Consultar ..." se muestra el listado de patrones del fragmento elegido.

Clave del patrón ▾	Nombre en esquemas
10OXI-E2	M10
11OXI-E2	M11
12OXI-E2	M12

Este listado muestra tanto el nombre clave en la base de datos como el de los esquemas del laboratorio.

+ Cajas

Más cajas: Este botón llama al [formulario de introducción de datos de las cajas](#) de ADN.



Informe de muestras: Este botón muestra un informe con toda la información de SSCP de una muestra.

En primer lugar pide el nombre del animal de interés.

Animal: ▾

Al pulsar el botón "Consultar ..." se muestra un informe con los datos más relevantes de los experimentos de SSCP de un animal:

Experimentos

Datos válidos de la muestra: BD-9050 Raza: Chama

Caja: 2 Muestras para variabilidad Posición: A1 Número: 1 Muestra: 171

Fragmento: OXI-E1 **Protocolo PCR:** PCR-OXI-E1-30

Protocolo SSCP: 6-15-4-00 **secuencia:** SEQ-OXI-E1>

Matriz del gel: Acritamida 37.5:1

W: 15

[glicerol]: 5

n° Geles: 2

Estado: 6

Patrón: 2OXI-E1

Genotipo: OXI-E1>

Fragmento: OXI-E1 **Protocolo PCR:** PCR-OXI-E1-30

Protocolo SSCP: 6-15-4-00-2° **secuencia:** SEQ-OXI-E1>

Matriz del gel: Acritamida 37.5:1

W: 15

[glicerol]: 5

n° Geles: 2

Estado: 6

Patrón: 2OXI-E1

Genotipo: OXI-E1>

Fragmento: OXI-E3 **Protocolo PCR:** PCR-OXI-E3-36

Protocolo SSCP: 6-15-4-00-2 **secuencia:** SEQ-OXI-E3>

Matriz del gel: MDE

W: 15

[glicerol]:

n° Geles: 2

Estado: 6

Patrón: 1OXI-E3

Genotipo: OXI-E3>

Caja: Muestras para variabilidad 3 Posición: A1 Número: 1 Muestra: 317

Jueves, 11 de septiembre de 2014

Página 1 de 2

En detalle, el contenido del informe es el siguiente:

Experimentos

Datos válidos de la muestra: BD-9050

Raza: Churra

Caja: 2 Muestras para variabilidad

Posición: A₁ **Número:** 1

Muestra: 171

Fragmento: OXI-E1

Protocolo PCR: PCR-OXI-E1<30

Protocolo SSCP: 6-15-4:00

Secuencia: SEQ-OXI-E1>

Matriz del gel: Acrilamida 37,5:1

W: 15

[glicerol]: 5

nº Geles: 2

Estado: B

Patrón: 2OXI-E1

Genotipo: OXI-E1>

```

CCGAGAGACGGCCGAGTCCCCGGCCCGAGCCCAGC
GCGTCTGCACCATGGCAGGTTCCAGCCTCGCCTGCTGC
CTGCTCGGCCTCCTGGCGTTGACCTCCGCCTGCTACATT
CAGAACTGCCCCCTGGGCGGCAAGCGTGCGGTGCTGG
ACCTCGACGTGCGCACGGTGAGCGCCCGCCCTCGTCC
CGTGGCTCTCGGGGCTGGCAGGCCCGCTGCCACAGGG
TCGCCCCCGCGCCCTTTCCCGCCCTGACCGCGTAC
CGGCCCCACCT
    
```

jueves, 11 de septiembre de 2014

Página 1 de 2

Bajo el título se indica el nombre de la muestra y la raza.

Los experimentos están agrupados según la caja de ADN en la que se encontraba la muestra empleada. En el título de cada grupo se recoge el nombre de la caja, la posición de la muestra en esa caja así como el número de identificación de esa muestra en la base de datos.

Los campos que se visualizan, para cada experimento, son los siguientes:

En la columna de la izquierda:

Fragmento: El fragmento que se está estudiando.

Protocolo de SSCP: El nombre del protocolo de SSCP empleado.

Matriz del gel: Nombre de la matriz del gel empleada en el SSCP.

W: Varios a los que se corrió la electroforesis del SSCP.

[glicerol]: Concentración de glicerol empleada en el SSCP.

nº Geles: Número de geles que se corrieron en el SSCP.

Estado: Estado de la muestra. Los estados válidos son:

B: Bien. El SSCP es correcto.

R: Repetir: Esta muestra debería repetirse.

M: Mal. El SSCP no funciona.

Patrón: Código del patrón de SSCP.

Genotipo: Genotipo asignado a este patrón de SSCP.

En el medio se muestra una representación gráfica del patrón de SSCP obtenido.

A la derecha se recogen los campos:

Protocolo de PCR: Nombre del protocolo de PCR empleado.

Secuencia: Nombre de la secuencia del genotipo. Bajo este campo se muestra dicha secuencia génica.

En la parte baja de cada hoja del informe se muestra la fecha de generación, el número de página actual y el total de páginas del informe.

+ Protocolos

Más protocolos: Este botón llama al [formulario de adición de protocolos de SSCP](#).

+ Patrones

Más patrones: Este botón llama al [formulario de adición de patrones de SSCP](#).

+ Días

Más Días: Este botón llama al [formulario de adición de días](#).

En la parte inferior del formulario se inserta un subformulario que sirve para introducir los datos de cada uno de los experimentos de SSCP a los que se sometió la muestra:

Día Código ▾	Patrón ▾	Estac ▾	Día ▾	Variant ▾	Protocolo ▾
1/01/1901-1 ▾	1GHR-E10.4	B	01/01/1901	1	
1/01/1901-1	1GHR-E10.3	B	01/01/1901	1	
27/11/01-1	1PRL-E3	R	27/11/2001	1	
4/12/01-1	1PRL-E3	B	04/12/2001	1	PRL-E3__15-12-5

Los campos que incluye son los siguientes:

Día Código: El código de identificación único del día en la base de datos. Al actualizar este valor se actualizan automáticamente los campos "Día" y "Variante" de la misma tupla. También se rellena automáticamente el protocolo de SSCP, si ha sido declarado el mismo día. Al hacer doble clic sobre el campo se muestra el [formulario de días](#) con los datos del día actual cargado en él.

Patrón: Para registrar el patrón mostrado en el experimento. Al hacer doble clic sobre el campo se muestra el [formulario de patrones](#) con los datos del patrón actual cargado en él.

Estado: Indica el estado de la muestra. Los estados posibles son:

B: Bien. El SSCP es correcto.

R: Repetir: Esta muestra debería repetirse.

M: Mal. El SSCP no funciona.

Día: Día en que se realizó el experimento de SSCP. Al actualizar este valor se actualiza automáticamente el campo "Día Código" de la misma tupla.

Variante: Variante del Día en que se realizó el experimento de SSCP. Este valor debería ser único dentro de los experimentos de SSCP de un mismo día. Al actualizar este valor se actualiza automáticamente el campo "Día Código" de la misma tupla.

Protocolos SSCP: Muestra el protocolo de SSCP empleado ese día. Al hacer doble clic sobre el campo se muestra el [formulario de protocolos de SSCP](#) con los datos del actual cargados en él. Este campo puede rellenarse automáticamente, al actualizar el campo Día Código, si hay un protocolo de SSCP declarado el mismo día.

8.1.5.12 Más Patrones

Añadir patrones:

Formulario para introducir los patrones de SSCP.

Los campos requeridos son los siguientes:

Mutante: Nombre del mutante. Suele emplearse un número correlativo. En algunos registros aparece como nombre del mutante "Patrón". En este caso indica que no es un patrón real, visto en el laboratorio sino que es el patrón resumen, que agrupa todas las bandas de los patrones vistos en las muestra reales.

Nombre: Nombre del patrón. Es el identificador único del patrón en la base de datos.

Fragmento: Nombre del fragmento que se

está estudiando.

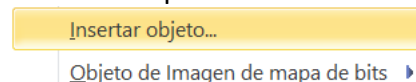
Genotipo: Genotipo mostrado por el patrón.

Nombre en geles: Es el nombre que recibe el patrón en los geles y en los esquemas de laboratorio. Es un código que identifica al patrón entre los patrones de un mismo fragmento, pero que no puede identificarlo entre los patrones registrados en la base de datos. El nombre suele componerse mediante el algoritmo que consiste en poner una letra M (de Mutante) y un número correlativo. Así, el M1 es el primer patrón que se identifica, el M2 el segundo, etc. Como estos nombre sólo son únicos dentro del fragmento no se pueden utilizar como identificadores dentro de la base de datos. No obstante, se mantienen para poder establecer la correspondencia con los esquemas del laboratorio.

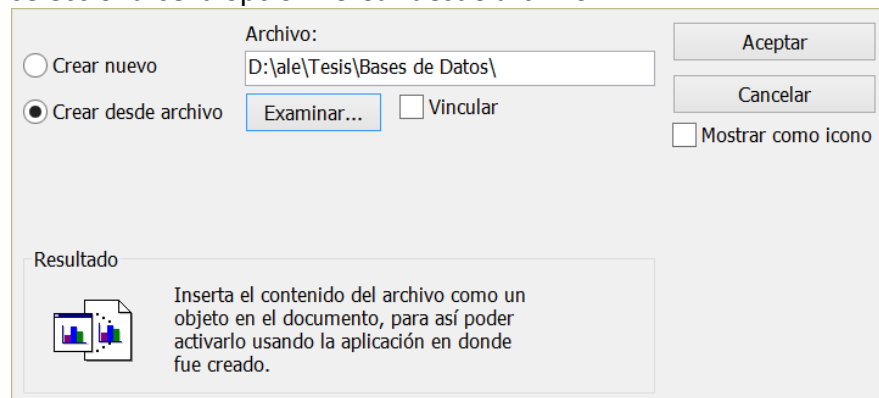
Hay ambigüedades: Al marcar esta casilla se indica que no se puede establecer con certeza la relación entre el patrón y el genotipo.

Muestras del patrón: Indica el número de muestras registradas con este patrón.

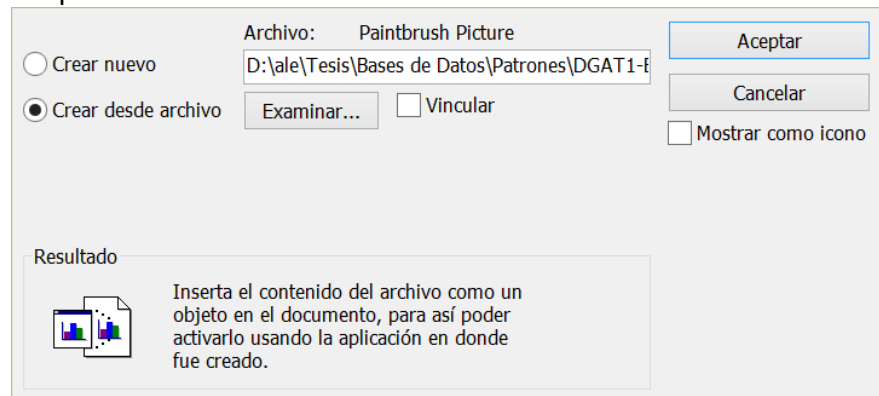
Esquema: Esta casilla muestra una representación pictórica del patrón. Esta representación debe ser realizada en un programa de dibujo externo. conviene guardarla en formato de mapa de bits (*.bmp). Para incluir este archivo en la base de datos debe pulsarse con el botón derecho sobre el campo donde irá el dibujo:



Se desplegará un menú secundario. Al elegir el comando "Insertar objeto...". Debe seleccionarse la opción "Crear desde archivo".



Se muestra el formulario de elección de archivo insertado. Para especificar el archivo se puede pulsar el botón examinar. Esto carga el diálogo común de selección de archivos del sistema. Se utilizará para navegar y seleccionar el archivo con la imagen del patrón.



El nombre del archivo aparecerá en el cuadro "Archivo:". Al pulsar en el botón "Aceptar" se introducirá la imagen en la base de datos.

Comentarios: Información adicional.

Además de estos controles, el formulario está dotado de los siguientes botones:

Fragmento **Ver sólo este fragmento:** Filtra el formulario para que sólo muestre el fragmento actual.

Genotipo **Ver sólo este genotipo:** Filtra el formulario para que sólo muestre el genotipo actual.

+ Fragmentos

Más fragmentos: Llama al [formulario de adición de fragmentos](#).

+ Genotipos

Más genotipos: Llama al [formulario de adición de genotipos](#).

Muestras

Muestras: Llama a la consulta que lista las muestras que presentan el patrón.

Fragmento	Patrón	Nombre	Raza	Estado	Caja	Fila	Columna	Núm.	Tm (°C) UP	Tm (°C) DN	T* PCR	Código Día	Muestra	Orientación
DGAT1-E8/2	2DGAT1-E8/2	BR-5493	Churra	B	Machos de churra	H	10	80	59,1	55,6		62,3 26/02/03-1	154 UP	
DGAT1-E8/2	2DGAT1-E8/2	GL 5540	Assaf	B	Assaf y Lacauene de Susana	D	5	36	59,1	55,6		62,3 20/03/03-1	536 UP	
DGAT1-E8/2	2DGAT1-E8/2	LA 3	Lacaune	B	Muestras para variabilidad 3	E	4	29	59,1	55,6		62,3 10/02/03-1	345 UP	

Consideraciones sobre patrones:

A la hora de dibujar los patrones se pueden utilizar cuantos recursos pictóricos sean necesarios para mejorar la comprensión del resultado obtenido. Estos son algunos ejemplos de los dibujos y los recursos empleados:



En este patrón se han utilizado bandas de varios grosores intentando simular los obtenidos en el laboratorio. El color negro indica bandas más intensas, el color gris se emplea para bandas más débiles. La línea roja vertical separa 2 zonas alternativas que no pueden ser dibujadas a la vez. Esto es: las muestras del laboratorio que siguen el patrón de la izquierda presentan 5 bandas intensas en la parte baja separadas en 2 grupos, de 2 y 3 bandas respectivamente; las muestras que siguen el patrón de la derecha presentan 6 bandas débiles en la parte baja, separadas en 2 grupos, de 2 y 4 bandas respectivamente.



En este caso se muestra la zona de ADN de cadena simple en los colores habituales (negro y gris). Los patrones de SSCP habitualmente muestran el esquema de bandas de esta zona. Sin embargo, como en este patrón se detectó variaciones en la zona de ADN de cadena doble, se representan estas variaciones en color azul, bajo el epígrafe ADNdc.

8.1.5.13 Más Protocolos SSCP

Añadir protocolos de SSCP:

Formulario para introducir los protocolos de SSCP.

Protocolo SSCP	77_6-20-3:30:00			+ PCR's
Fragmento	GHR-E3			+ Dias
Nº de protocolo PCR:	77	Protocolo PCR	PCR-GHR-E3<77	
Día SSCP	1/07/03-1	Día	01/07/2003	Variante: 1
Temperatura	6 °C	Matriz:	MDE	0.5 x
W	20 W	[glicerol]	0 %	+ Aditivos
Tiempo electroforesis	3:30 HH:mm	nº de Geles	2	
Incidencias				

Muestra	Nombre	Nº	Día	Código	Patrón	Estado	Día	Varian	Protocolo	Caja
322 JK+94.01		6	1/07/03-1	2GHR-E3	B		01/07/2003	1 77	6-20-3:30:00	Muestras para variabilidad 3
323 IQ 9314		7	1/07/03-1	1GHR-E3	B		01/07/2003	1 77	6-20-3:30:00	Muestras para variabilidad 3
324 BR+00046		8	1/07/03-1		R		01/07/2003	1 77	6-20-3:30:00	Muestras para variabilidad 3

Los datos necesarios para modelar un protocolo de SSCP son los siguientes:

Protocolo SSCP: Es el nombre del protocolo de SSCP. Este nombre debe ser único en la base de datos. Este campo es actualizado automáticamente por el formulario al rellenar el resto de los parámetros, por eso no está incluido en el ciclo de tabulación. El algoritmo utilizado para generar estos nombres es el siguiente:

"Nº de protocolo PCR"_"Temperatura"-"Vatios"-"Tiempo_de_electroforesis"

El tiempo de electroforesis se representa en formato horas:minutos:segundos, aunque la información de los segundos no se tiene en cuenta. Se puede usar para generar nombres de protocolos distintos en el improbable caso de que hubiese más de un protocolo con los demás valores iguales.

Fragmento: El fragmento de ADN que se está estudiando.

Nº de protocolo PCR: Identificador único del protocolo de PCR que se empleó en el SSCP. Al introducir este dato se calcula automáticamente el nombre del protocolo de PCR según el algoritmo habitual de la base de datos y se introduce en la casilla "Protocolo PCR".

Día SSCP: Código de día en que se hizo el SSCP. Este valor normalmente se establece automáticamente al seleccionar Día y Variante. Por eso no está incluido en el ciclo de tabulación. Al hacer doble clic en él se muestran los datos del día cargados en el [formulario de edición de días](#).

Temperatura: Temperatura a la que corrió la electroforesis del SSCP.

W: Vatios a los que corrió la electroforesis del SSCP.

Tiempo electroforesis: Tiempo que duró la electroforesis del SSCP.

Incidencias: Información adicional.

Protocolo PCR: Código del protocolo de PCR empleado en el SSCP. Habitualmente esta casilla no es necesario introducirla porque se ha actualizado automáticamente al introducir el código en el campo "Nº de protocolo PCR". Por ello, la casilla no está incluida en el ciclo de tabulación. Al hacer doble clic en él se muestran los datos del protocolo de PCR cargados en el [formulario de edición de protocolos de PCR reducido](#).

Día: Día en que se hizo la PCR. Al actualizar el valor de esta casilla se recalcula el valor de "Día SSCP".

Variante: Variante del día que se empleó en la PCR. Al actualizar el valor de esta casilla se recalcula el valor de "Día SSCP".

Matriz: Matriz de gel utilizada. El cuadro desplegable permite elegir entre las almacenadas en la base de datos.

Concentración: Concentración de la matriz utilizada.

[glicerol]: Concentración del glicerol utilizado en el SSCP.

nº de Geles: Número de geles corridos en la misma electroforesis.

Además, el formulario está dotado de los siguientes botones:



Actualizar: Vuelve a consultar los datos del protocolo y actualiza la información que se muestra en el formulario.

+ PCR's

Más PCRs: Este botón llama al [formulario de adición de protocolos de PCR reducido](#).

+ Días

Más Días: Este botón llama al [formulario de adición de días](#).

Fragmento

GHR-E3



Filtrar: ver sólo datos de este formulario:

Este botón crea un filtro en el formulario de forma que sólo se muestran los protocolos de SSCP del fragmento seleccionado.

+ Aditivos

Más aditivos: Este botón llama al [formulario de adición de aditivos](#).

Buscar

Buscar: Llama al [formulario de búsqueda del número de muestras](#).

La tabla de muestras de protocolo se puede rellenar desde este formulario. Tiene estos campos:

Muestra: Código de la muestra de ADN en la base de datos. Al rellenar este campo se rellenan automáticamente el resto de los campos que se pueden consultar a través de él: Nombre, Número y Caja.

Nombre: Nombre del animal. Este dato se rellena automáticamente al introducir el código de muestra.

Número: Número del animal en la caja. Este dato se rellena automáticamente al introducir el código de muestra.

Día código: Código del día en que se realiza el experimento de SSCP. Se rellena automáticamente con los datos del experimento que se han introducido en el formulario.

Patrón: Patrón de SSCP que resulta del experimento. El cuadro desplegable permite elegir entre los patrones registrados para el fragmento anotado en el formulario principal.

Estado: Estado de aceptación de la muestra. Los valores posibles son Bien, Mal o Repetir. Se pueden utilizar las iniciales de los estados.

Día: Día del experimento de SSCP.

Variante: Variante del día del experimento de SSCP. Representa el orden del experimento de SSCP en el día consignado. No debe repetirse entre los experimentos de SSCP del mismo día.

Protocolo: Código del protocolo de SSCP al que se sometió la muestra. Este dato se rellena automáticamente con los valores consignados en el formulario principal.

Caja: Caja de ADN a la que pertenece la muestra. Este dato se rellena automáticamente al introducir el código de muestra.

8.1.5.14 Ver Experimentos SSCP de 1 Día

Buscar experimentos de SSCP de 1 día:

Esta consulta permite ver las condiciones de los experimentos de SSCP de un día.

En primer lugar pregunta por el día de interés:

Día: ▼

El cuadro desplegable muestra 2 columnas...

Día	Entradas
28/06/2002	48
04/07/2002	96
11/07/2002	48
16/07/2002	24
17/07/2002	68
05/02/2003	24

Día es el parámetro que utilizará en la búsqueda. La columna "Entradas" indica en número de muestras que hay registradas para ese día.

Al elegir un día y pulsar el botón "Consultar ..." se muestra una tabla con los parámetros de SSCP del día seleccionado.

Día	Muestra	Protocolo SSCP	Patrón	Estado	Número	Fila	Columna	Nombre	Caja
05/02/2003	383	6-6-3:00	1DGAT1-E8/2	B	67	C	9	GE-10254	Muestras para variabilidad 3
05/02/2003	384	6-6-3:00	1DGAT1-E8/2	B	68	D	9	BR-10289	Muestras para variabilidad 3

Esta tabla tiene los valores:

Día: El día que se realizó el experimento.

Muestra: El código de la muestra de ADN empleada.

Protocolo SSCP: Nombre del protocolo de SSCP empleado.

Patrón: Nombre del patrón de SSCP obtenido.

Estado: Estado de la muestra. Los estados posibles son:

B: Bien. El SSCP es correcto.

R: Repetir: Esta muestra debería repetirse.

M: Mal. El SSCP no funciona.

Número: Número de la muestra en la placa de 96 pocillos.

Fila: Fila que ocupaba la muestra en la placa de 96 pocillos.

Columna: Columna que ocupaba la muestra en la placa de 96 pocillos.

Nombre: Nombre de la muestra. Es el código del animal que se utiliza en el laboratorio.

Caja: Caja en la que se encuentra el ADN que se utilizó en el experimento de SSCP.

8.1.5.15 Ver Genotipado de Patrones

Ver genotipado de los patrones:

Tabla dinámica con los genotipos de los patrones en función de las muestras secuenciadas introducidas en la base de datos. La tabla muestra información detallada de cada muestra secuenciada para cada patrón.

Tipo ▾	Fragmento ▾	Estado ▾	Alineada ▾	Revisada ▾						
SNP	OXI-E2	B	Verdadero	Todas						
					Inicio ▾					
					646	1193	1254	1263	1333	1393
					+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Patrón ▾	Nombre ▾	Muestra ▾	MuestraSec ▾		Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾
11OXI-E2	MX-9023	106	305	+		A	G	A	G	
			368	+		A	G	A	G	
	VS-803	117	350	+			G	A	g	M
			367	+		A	g	A	G	
			379	+			G	A	G	M
			384	+			G	A	G	M
12OXI-E2	BD-8053	79	304	+		A	G	A	G	
			352	+			G	a	G	A
			369	+		A	G	A	G	

La tabla contiene la base almacenada para cada una de las posiciones secuenciadas de un patrón. Como las mutaciones son puntuales sólo se indica el inicio de la característica (que coincide con el final).

Los campos de la tabla son:

Patrón: Nombre del patrón de SSCP que presentan las muestras.

Nombre: Nombre de la muestra:

Muestra: Código de identificación de la muestra de ADN.

MuestraSecuenciada: Código de identificación de la secuenciación de la muestra.

Inicio: Aquí equivale a la posición que ocupa el SNP en la secuencia del fragmento.

Esta tabla se puede filtrar por Tipo (de característica), Fragmento, Estado (Bien o Repetir), Alineada (si la muestra secuenciada está alineada con su referencia o no) y revisada (si el alineamiento ha sido revisado o no).

8.1.5.16 Ver Genotipado de Patrones Definitivo

Ver genotipos definitivos de los patrones:

Tabla dinámica con el genotipo definitivo de cada patrón en función de las muestras secuenciadas de la base de datos. Si hubiera más de un genotipo por patrón deberían revisarse sus muestras secuenciadas o marcarse como ambiguo.

Tipo ▾	Fragmento ▾										
Todas	OXI-E2										
		Inicio ▾									
		1193	1254	1263	1333	1393					
		+ -	+ -	+ -	+ -	+ -					
Patrón ▾	Genotipo ▾	Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾	Sei ▾					
☐ 11OXI-E2	OXI-E2>AGAGM	⁺ ₋	A	G	A	G	M				
☐ 12OXI-E2	OXI-E2>AGAGA	⁺ ₋	A	G	A	G	A				

La tabla contiene la combinación de nucleótidos que se le asigna a cada patrón de SSCP en función de los resultados de las secuenciaciones almacenadas. Muestra el

código del patrón, el genotipo asignado y la composición de ese genotipo: nucleótidos y posiciones ambiguas.

Esta tabla se puede filtrar por fragmentos y por tipo de mutación (SNP, Inserción).

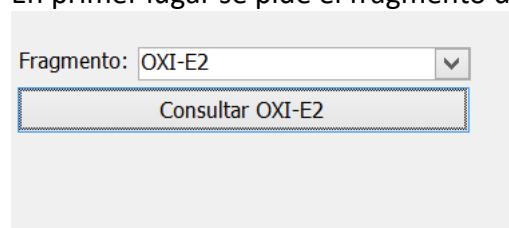
La tabla es muy sensible a errores en la introducción de datos. Estos podrían producir más de un genotipado definitivo por patrón. Si ocurriese esto, deben revisarse todas las muestras que producen el genotipado o marcar el patrón como ambiguo. Para esta revisión es útil el formulario de "[Ver genotipado de los patrones](#)" porque indica que muestras son las discrepantes.

8.1.5.17 Ver Genotipos De Un Fragmento

Consultar genotipos de un fragmento:

Lanza una consulta que muestra los genotipos registrados para un fragmento, ordenados por patrones.

En primer lugar se pide el fragmento de interés.



El cuadro desplegable sólo mostrará aquellos fragmentos que tengan genotipos registrados.

Al pulsar sobre el botón "Consultar ..." se mostrará la tabla de resultados.

Caja ▾	Raza ▾	Código Día ▾	Muestra ▾	Fragmento ▾	Clave del patrón ▾	Genotipo ▾
2 Muestras par Churra		11/06/02-1	185	OXI-E2	4aOXI-E2	OXI-E2>AGAGA
Machos de chu Churra		28/06/02-1	96	OXI-E2	4bOXI-E2	OXI-E2>AGAGM
Machos de chu Churra		28/06/02-1	98	OXI-E2	4bOXI-E2	OXI-E2>AGAGM
Machos de chu Churra		28/06/02-1	104	OXI-E2	4bOXI-E2	OXI-E2>AGAGM
2 Muestras par Milchscharf		11/06/02-1	209	OXI-E2	7OXI-E2	OXI-E2>AGAGA

En la tabla se muestran los siguientes campos:

Caja: La caja de ADN donde se encuentra.

Raza: El nombre de la raza del animal.

Código de Día: Marca la fecha en la que se realizó el experimento.

Muestra: Número ID de la muestra estudiada.

Fragmento: El nombre del fragmento estudiado.

Clave del patrón: El nombre del patrón que mostró el genotipo en los experimentos de SSCP.

Genotipo: El nombre del genotipo.

Para ver un recuento del número de muestras que componen cada genotipo se puede utilizar el formulario "[Contar Genotipos De Un Fragmento](#)".

8.1.5.18 Ver Información Genotipo

Consultar información de un genotipo:

Consulta la información de un genotipo. Esta consulta muestra mucha información de aquellos genotipos que están relacionados con experimentos de SSCP.

En primer lugar se pide el genotipo de interés. El cuadro desplegable permite elegir solamente aquellos genotipos que están relacionados con datos de experimentos de SSCP.

Genotipo: ▼

Al pulsar el botón "Consultar ..." se muestra la tabla con los resultados:

Muestra	Caja	Nombre	Fila	Columna	Número	W	nº Geles	Matriz del gel	Concei	Protocolo SSCP
80 Machos de churra		BD-8055	F		1 6	22	4	Acrilamida 37,5	5	6-22-4:30
81 Machos de churra		BD-8061	G		1 7	22	4	Acrilamida 37,5	5	6-22-4:30
86 Machos de churra		BD-7070	D		2 12	22	4	Acrilamida 37,5	5	6-22-4:30
Patrón	Estado	Genotipo	Fragmento	Nombre de la secuencia			Secuencia			
1DGAT1-E8/2	B	DGAT1-E8/2>	DGAT1-E8/2	SEQ-GH2-5'-2'-3'>			CAAGGCTGGTGAGGGCTCCCTCGGGCTG			
1DGAT1-E8/2	B	DGAT1-E8/2>	DGAT1-E8/2	SEQ-GH2-5'-2'-3'>			CAAGGCTGGTGAGGGCTCCCTCGGGCTG			
1DGAT1-E8/2	B	DGAT1-E8/2>	DGAT1-E8/2	SEQ-GH2-5'-2'-3'>			CAAGGCTGGTGAGGGCTCCCTCGGGCTG			
Protocolo PCR	Raza									
PCR-DGAT1-E8/2 Churra										
PCR-DGAT1-E8/2 Churra										
PCR-DGAT1-E8/2 Churra										

Esta consulta obtiene los siguientes datos:

Muestra: Código de la muestra estudiada.

Caja: Caja de ADN donde se encuentra la muestra.

Nombre: Nombre de la muestra.

Fila: Fila que ocupa la muestra en la caja.

Columna: Columna que ocupa la muestra en la caja.

Número: Número de la posición de la muestra en la caja.

W: Varios a los que corrió la electroforesis del SSCP.

nº Geles: Número de geles corrieron en su misma electroforesis.

Matriz de gel: Nombre de la matriz de gel empleada en el SSCP.

Protocolo SSCP: Nombre del protocolo de SSCP empleado.

Patrón: Patrón de SSCP obtenido.

Estado: Estado de la muestra. Los estados posibles son:

B: Bien. El SSCP es correcto.

R: Repetir: Esta muestra debería repetirse.

M: Mal. El SSCP no funciona.

Genotipo: Nombre del genotipo de la muestra.

Fragmento: Nombre del fragmento que se está estudiando.

Nombre de la secuencia: Nombre de la secuencia de ese genotipo.

Secuencia: Cadena de nucleótidos del genotipo.

Protocolo de PCR: Protocolo de PCR empleado para amplificar el fragmento.

Raza: Raza del animal.

8.1.5.19 Ver Muestras A Repetir

Buscar muestras a repetir:

Consulta las muestras marcadas para ser repetidas. Estas son aquellas que en el campo "Estado" tienen el valor "R" o "Repetir". Se crea una lista con todas las muestras marcadas para ser repetidas. Esta lista está ordenada por fragmentos.

Muestra ▾	Fila ▾	Columna ▾	Caja ▾	Código Día ▾	Fragmento ▾
99 A		4	Machos de churra	28/06/02-1	OXI-E2
99 A		4	Machos de churra	4/07/02-1	OXI-E1

La información que se recoge es la siguiente:

Muestra: El número de la muestra en la base de datos.

Fila: La fila en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Columna: Columna en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Código Día: Código de identificación del día en la base de datos.

Fragmento: Fragmento sobre el que se realizó el experimento de SSCP.

8.1.5.20 Ver Muestras A Repetir Por Fragmentos

Buscar muestras a repetir, por fragmentos:

Consulta las muestras marcadas para ser repetidas de un fragmento. Estas son aquellas que en el campo "Estado" tienen el valor "R" o "Repetir". Se crea una lista con todas las muestras marcadas para ser repetidas.

En primer lugar se pregunta por el fragmento de interés.

Fragmento:

Al pulsar el botón "Consultar ..." muestra la tabla con los resultados de la consulta.

Muestra ▾	Nombre ▾	Caja ▾	Número ▾	Fila ▾	Columna ▾	Estado ▾	Código Día ▾	Fragmento ▾
173 MX+9010		2 Muestras para variabilidad	3	C		1 R	10/06/02-1	OXI-E1
176 DQ+98168		2 Muestras para variabilidad	6	F		1 R	7/06/02-1	OXI-E1

La información que se recoge es la siguiente:

Muestra: El número de la muestra en la base de datos.

Nombre: Nombre de la muestra.

Caja: Caja de ADN donde se encuentra la muestra.

Número: Número de la posición de la muestra en la caja.

Fila: La fila en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Columna: Columna en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Código Día: Código de identificación del día en la base de datos.

Fragmento: Fragmento sobre el que se realizó el experimento de SSCP.

8.1.5.21 Ver Muestras A Repetir Conocidas

Ver muestras a repetir conocidas:

Consulta todas las muestras que han sido marcadas para repetir, tanto corregidas como pendientes, a las que se les ha asignado un patrón.

Fragmento ▾	Clave del patrón ▾	Nombre ▾	Código Día ▾	Caja ▾	Fila ▾	Columna ▾
DGAT1-E8/2	1DGAT1-E8/2	M1	4/03/03-1	Machos de inseminación juvenes	H	6
DGAT1-E8/2	1DGAT1-E8/2	M1	6/02/03-1	Muestras para variabilidad 3	F	1
GHR-E4	1GHR-E4	M1	12/06/03-1	Muestras para variabilidad 3	A	5

Los campos que se listan son los siguientes:

Fragmento: Nombre del fragmento que se está analizando.

Clave del patrón: Identificador único del patrón en la base de datos.

Nombre en esquemas: Nombre en los esquemas del laboratorio que se asigna al patrón de la muestra.

Código de día: Fecha del experimento en que fueron marcadas para repetir.

Caja: Caja de ADN en la que se localiza la muestra.

Fila: Fila de la caja en la que se encuentra la muestra.

Columna: Columna de la caja en la que se encuentra la muestra.

8.1.5.22 Ver Muestras De 1 Patrón

Buscar muestras de un patrón:

Consultar las muestras que presentan un mismo patrón. Sólo se listan las muestras que están en buen estado.

En primer lugar se pregunta por el patrón de interés:

Al pulsar el botón "Consultar ..." se listan aquellas muestras que comparten ese mismo patrón de SSCP.

Fragmento	Patrón	Nombre	Raza	Estado	Caja	Fila	Columna	Nú	Tm (°C) UP	Tm (°C) DN	Tª PCR	Código Día	Muestra
GHR-E10.1	1GHR-E10.1	AW 4	Awassi	b	Muestras para variabilidad	H		3	24	58 63,5		19/10/00-1	24
GHR-E10.1	1GHR-E10.1	BD 8086	Churra	b	2 Muestras para variabilidad	B		1	2	58 63,5		17/10/00-1	172

La información que recoge la tabla es la siguiente.

Fragmento: Nombre del fragmento estudiado.

Patrón: Patrón de SSCP encontrado en la muestra.

Nombre: Nombre de la muestra.

Raza: Raza a la que pertenece el animal.

Estado: Estado del experimento. Esta consulta sólo lista las muestras que están en buen estado (Esto es "B", "b" o "Bien").

Caja: Caja de ADN donde se encuentra la muestra.

Fila: La fila en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Columna: Columna en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Número: Número de la posición de la muestra en la caja.

Tm (°C) UP: Temperatura media del cebador UP del SSCP. Es la Tm calculada por el programa de diseño de fragmentos. Se expresa en grados Celsius.

Tm (°C) DN: Temperatura media del cebador DN del SSCP. Es la Tm calculada por el programa de diseño de fragmentos. Se expresa en grados Celsius.

Tª PCR: Es la temperatura del segundo paso del ciclo central de la PCR (unión del cebador). Indica la temperatura a la que funcionan bien los cebadores de la PCR.

Código Día: Código del día en que se realizó el SSCP.


Muestra: Código de identificación de la muestra en la base de datos.

8.1.5.23 Ver Muestras De 1 Patrón Informe

Buscar muestras de un patrón, informe:

Informa de las muestras que presentan un mismo patrón y están en buen estado.

En primer lugar se pide el patrón de interés.

Patrón: 

[Consultar 1GHR-E10.1](#)

Al pulsar en "Consultar ..." se presenta la información de las muestras de ese patrón.

Muestras con el patrón 1GHR-E10.2

Patrones		1GHR-E10.2		
Partición	Código	Caja	Nombre	Tm PO TPCR
Caja: Muestras para control de calidad				
1	1GHR-E1	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E004	51
2	1GHR-E2	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E005	51
3	1GHR-E3	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E006	51
4	1GHR-E4	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E007	51
5	1GHR-E5	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E008	51
6	1GHR-E6	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E009	51
7	1GHR-E7	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E010	51
8	1GHR-E8	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E011	51
9	1GHR-E9	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E012	51
10	1GHR-E10	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E013	51
11	1GHR-E11	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E014	51
12	1GHR-E12	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E015	51
13	1GHR-E13	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E016	51
14	1GHR-E14	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E017	51
15	1GHR-E15	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E018	51
16	1GHR-E16	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E019	51
17	1GHR-E17	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E020	51
18	1GHR-E18	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E021	51
19	1GHR-E19	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E022	51
20	1GHR-E20	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E023	51
21	1GHR-E21	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E024	51
22	1GHR-E22	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E025	51
23	1GHR-E23	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E026	51
24	1GHR-E24	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E027	51
25	1GHR-E25	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E028	51
26	1GHR-E26	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E029	51
27	1GHR-E27	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E030	51
28	1GHR-E28	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E031	51
29	1GHR-E29	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E032	51
30	1GHR-E30	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E033	51
31	1GHR-E31	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E034	51
32	1GHR-E32	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E035	51
33	1GHR-E33	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E036	51
34	1GHR-E34	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E037	51
35	1GHR-E35	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E038	51
36	1GHR-E36	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E039	51
37	1GHR-E37	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E040	51
38	1GHR-E38	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E041	51
39	1GHR-E39	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E042	51
40	1GHR-E40	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E043	51
41	1GHR-E41	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E044	51
42	1GHR-E42	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E045	51
43	1GHR-E43	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E046	51
44	1GHR-E44	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E047	51
45	1GHR-E45	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E048	51
46	1GHR-E46	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E049	51
47	1GHR-E47	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E050	51
48	1GHR-E48	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E051	51
49	1GHR-E49	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E052	51
50	1GHR-E50	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E053	51
51	1GHR-E51	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E054	51
52	1GHR-E52	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E055	51
53	1GHR-E53	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E056	51
54	1GHR-E54	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E057	51
55	1GHR-E55	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E058	51
56	1GHR-E56	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E059	51
57	1GHR-E57	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E060	51
58	1GHR-E58	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E061	51
59	1GHR-E59	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E062	51
60	1GHR-E60	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E063	51
61	1GHR-E61	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E064	51
62	1GHR-E62	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E065	51
63	1GHR-E63	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E066	51
64	1GHR-E64	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E067	51
65	1GHR-E65	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E068	51
66	1GHR-E66	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E069	51
67	1GHR-E67	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E070	51
68	1GHR-E68	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E071	51
69	1GHR-E69	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E072	51
70	1GHR-E70	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E073	51
71	1GHR-E71	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E074	51
72	1GHR-E72	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E075	51
73	1GHR-E73	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E076	51
74	1GHR-E74	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E077	51
75	1GHR-E75	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E078	51
76	1GHR-E76	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E079	51
77	1GHR-E77	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E080	51
78	1GHR-E78	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E081	51
79	1GHR-E79	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E082	51
80	1GHR-E80	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E083	51
81	1GHR-E81	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E084	51
82	1GHR-E82	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E085	51
83	1GHR-E83	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E086	51
84	1GHR-E84	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E087	51
85	1GHR-E85	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E088	51
86	1GHR-E86	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E089	51
87	1GHR-E87	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E090	51
88	1GHR-E88	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E091	51
89	1GHR-E89	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E092	51
90	1GHR-E90	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E093	51
91	1GHR-E91	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E094	51
92	1GHR-E92	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E095	51
93	1GHR-E93	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E096	51
94	1GHR-E94	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E097	51
95	1GHR-E95	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E098	51
96	1GHR-E96	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E099	51
97	1GHR-E97	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E100	51
98	1GHR-E98	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E101	51
99	1GHR-E99	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E102	51
100	1GHR-E100	Muestra con el patrón 1GHR-E10.2	1G-E103	51

Izumi, 15 de septiembre de 2010

Página 1 de 2

En detalle, el contenido de este informe es el siguiente:

Muestras con el patrón 1GHR-E10.2

<i>Patrón 1GHR-E10.2</i>				
<i>Posición</i>	<i>Fragmento</i>	<i>Caja</i>	<i>Nombre</i>	<i>Tm (°C) Tª PCR</i>
<i>Caja: Muestras para variabilidad</i>				
B 1	GHR-E10.2	Muestras para variabilidad	BD 8086	61
F6	GHR-E10.2	Muestras para variabilidad	JR 701	61
B6	GHR-E10.2	Muestras para variabilidad	JL+9743	61

lunes, 15 de septiembre de 2014

Página 1 de 2

En el título de cada página se muestra, en rojo, el nombre del patrón.

La tabla tiene estos campos:

Posición: Coordenadas (fila y columna) de la muestra en la caja.

Fragmento: Fragmento que se está amplificando.

Caja: Nombre de la caja de ADN en la que se encuentra la muestra.

Nombre: Nombre de la muestra.

Tª PCR: Es la temperatura del segundo paso del ciclo central de la PCR (unión del cebador). Indica la temperatura a la que funcionan bien los cebadores de la PCR.

Tm (°C): Temperatura media del cebador del SSCP (si la hubiera). Es la Tm calculada por el programa de diseño de fragmentos. Se expresa en grados Celsius.

En el pie de cada página se muestra la fecha de impresión del informe así como en número de página y el total de páginas del informe.

8.1.5.24 Ver Muestras En Buen Estado

Buscar muestras en buen estado:

Consulta las muestras en buen estado.

Nombre	Fila	Columna	Número	Caja	Estado	Patrón
TM 865	H	6	48	Muestras para variabilidad 3	B	10GHR-E9
BD-603	D	8	60	Machos de churra	B	10PRL-E2

Los campos listados son los siguientes;

Nombre: Nombre de la muestra.

Fila: La fila en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Columna: Columna en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Número: Número de la posición de la muestra de en caja.

Caja: Caja de ADN donde se encuentra la muestra.

Estado: Estado del experimento. Esta consulta sólo lista las muestras que están en buen estado (Esto es "B" o "Bien").

Patrón: Patrón de SSCP encontrado en la muestra.

8.1.5.25 Ver Muestras Repetidas Corregidas

Buscar repetidas y corregidas:

Consulta las muestras que han sido repetidas y corregidas.

Los resultados se ordenan por el nombre de la muestra.

Fragmento	Nombre	Muestra	Caja	Fila	Columna	Número
DGAT1-E8/2	BR-10342	431	Machos de inseminación jovenes	C	6	43
OXI-E1	BR-6151	155	Machos de churra	A	11	81

Los campos listados son los siguientes.

Fragmento: Nombre del fragmento estudiado.

Nombre: Nombre de la muestra.

Muestra: Código de identificación de la muestra en la base de datos.

Caja: Caja de ADN donde se encuentra la muestra.

Fila: La fila en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Columna: Columna en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Número: Número de la posición de la muestra en la caja.

8.1.5.26 Ver Muestras Repetidas Corregidas Por Fragmentos

Buscar repetidas y corregidas, por fragmentos:

Consulta las muestras que han sido repetidas y corregidas de un fragmento.

Fragmento	Nombre	Muestra	Caja	Fila	Columna	Número
OXI-E1	DQ+98168	176	2 Muestras para variabilidad	F	1	6
OXI-E1	MX+9010	173	2 Muestras para variabilidad	C	1	3

Los campos listados son los siguientes.

Fragmento: Nombre del fragmento estudiado.

Nombre: Nombre de la muestra.

Muestra: Código de identificación de la muestra en la base de datos.

Caja: Caja de ADN donde se encuentra la muestra.

Fila: La fila en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

Columna: Columna en la que se encuentra la muestra dentro de la caja de ADN.

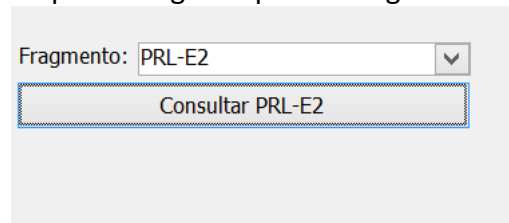
Número: Número de la posición de la muestra en la caja.

8.1.5.27 Ver Patrones De 1 Fragmento

Buscar patrones de un fragmento:

Consulta los patrones de un fragmento.

En primer lugar se pide el fragmento de interés.



Fragmento: PRL-E2

Consultar PRL-E2

Al pulsar en "Consultar ..." se muestra una tabla con los patrones registrados para ese fragmento.

Clave del patrón	Nombre en esquemas
10PRL-E2	M9
11PRL-E2	M10
12PRL-E2	M11

Los campos de la tabla son:

Clave del patrón: El código del patrón en la base de datos.

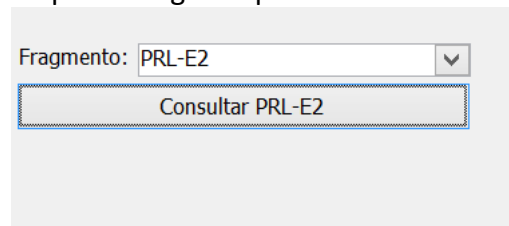
Nombre en esquemas: Nombre del patrón en los esquemas de laboratorio.

8.1.5.28 Ver Patrones De 1 Fragmento Informe

Buscar patrones de un fragmento, informe:

Informa de los patrones de un fragmento.

En primer lugar se pide el nombre del fragmento de interés.



Fragmento: PRL-E2

Consultar PRL-E2

Al pulsar en "Consultar ..." se presenta un informe con los patrones que aparecen en el fragmento.

Patrones para el fragmento PRL-E2

<i>Clave del patrón</i>	<i>Nombre en esquemas</i>	
10PRL-E2	M9	
10PRL-E2	M10	
10PRL-E2	M11	
10PRL-E2	M12	
10PRL-E2	M13	
10PRL-E2	M14	
10PRL-E2	N1	
20PRL-E2	M1	
20PRL-E2	M2	
40PRL-E2	M3	
50PRL-E2	M4	
60PRL-E2	M5	
70PRL-E2	M6	

miércoles, 17 de septiembre de 2014 Página 1 de 2

En detalle, el contenido de este informe es el siguiente:

Patrones para el fragmento PRL-E2

<i>Clave del patrón</i>	<i>Nombre en esquemas</i>	
10PRL-E2	M9	

miércoles, 17 de septiembre de 2014

Página 1 de 2

El encabezado del informe contiene el nombre del fragmento.

En la tabla de datos se muestran los siguientes campos: "Clave del patrón", "Nombre en esquemas" y la representación gráfica del patrón.

En el pie de la página se recoge la fecha de impresión, el número de página actual y el total de páginas del informe.

8.1.5.29 Ver Patrones Distintos

Buscar patrones distintos:

Consulta todos los patrones almacenados en la base de datos.

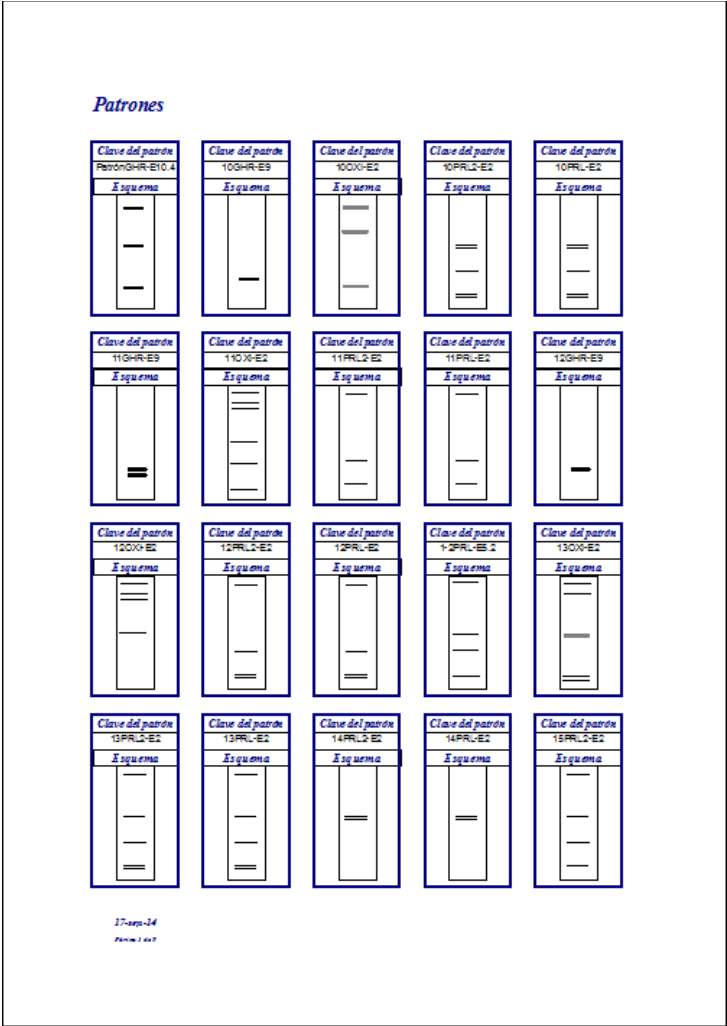
Patrones
10GHR-E9
10PRL-E2
11GHR-E9

Se muestra únicamente el código de cada patrón.

8.1.5.30 Ver Patrones Distintos Informe

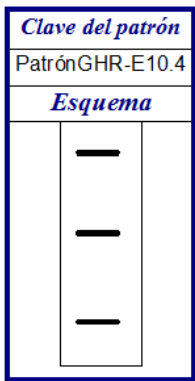
Buscar patrones distintos, informe:

Informa de todos los patrones almacenados en la base de datos.



En detalle, el contenido del informe es el siguiente:

Patrones



17-sep.-14

Página 1 de 9

Para cada patrón se presenta su clave en la base de datos y el esquema, gráfico, de dicho patrón.

En el pie de cada página se recoge la fecha de impresión, el número de página actual y el total de páginas.

8.1.5.31 Ver Secuencia De Las Muestras

Consultar la secuencia de las muestras:

Lista la secuencia que corresponde a cada muestra según el genotipo de su patrón de SSCP.

Ambigüedad	Experimento	Patrón	Nomb	Genotipo	secuencia
	-2129641797	1DGAT1-E8/2	M1	DGAT1-E8/2>	CAAGGCTGGTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCCACTGGGCTGCCACCTGCCGCGGGACCGGACGGGGCTCGGCTCACCCCGCCCCGCC
	-2124457774	1DGAT1-E8/2	M1	DGAT1-E8/2>	CAAGGCTGGTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCCACTGGGCTGCCACCTGCCGCGGGACCGGACGGGGCTCGGCTCACCCCGCCCCGCC
	-2115148490	1DGAT1-E8/2	M1	DGAT1-E8/2>	CAAGGCTGGTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCCACTGGGCTGCCACCTGCCGCGGGACCGGACGGGGCTCGGCTCACCCCGCCCCGCC

Los campos que muestra la tabla son los siguientes:

Ambigüedad: Indica si el patrón de SSCP está considerado como ambiguo.

Experimento: Número de identificación de la muestra de SSCP en la base de datos. Es un número autogenerado aleatorio y único.

Patrón: Código del patrón de la muestra en la base de datos.

Nombre: Nombre del patrón en los esquemas del laboratorio.

Genotipo: Genotipo asignado al patrón de la muestra.

Secuencia: Secuencia del genotipo asignado al patrón de la muestra.

8.1.5.32 Ver Todo SSCP de 1 Muestra

Consultar todos los datos de SSCP de una muestra:

Consulta la información almacenada en la base de datos sobre los experimentos de SSCP de una muestra.

En primer lugar pide el nombre de la muestra.

Animal: ▼

Al pulsar el botón "Consultar ..." se presenta la información de SSCP de una muestra.

Muestra	Nombre	Caja	Fila	Columna	Nú	W	nº Geles	Matriz del gel	Concentr	Protocolo SS	Patrón	Estado
235 BR 10154	2 Muestras para variabilidad	A	10	65	15	2	Acrilamida 37,5:1	5 OXI-E1_30_6-1	OXI-E1	B		
235 BR 10154	2 Muestras para variabilidad	A	10	65	30	4	MDE	OXI-E3_36_6-3	OXI-E2	B		
235 BR 10154	2 Muestras para variabilidad	A	10	65	30	4	MDE	OXI-E3_36_6-3	OXI-E3	B		
Foto	Genotipo	Fragmento	Nombre de la secuencia			Secuencia			Protocolo PC	Raza		
Bitmap Image OXI-E1>	OXI-E1	SEQ-OXI-E1>	CCGAGAGACGGCCGACGTCCCGGCCCG			PCR-OXI-E1<30			Churra			
Bitmap Image OXI-E2>AGAGA	OXI-E2	SEQ-OXI-E2>GAGA	CAGTGTCTCCCTGCGGCCCGGGGGCA			PCR-OXI-E3<36			Churra			
Bitmap Image OXI-E3>	OXI-E3	SEQ-oxi-e3>	ACTCGGCTGTCTGTGCAGACGGCTGC			PCR-OXI-E3<36			Churra			

Esta tabla contiene los siguientes campos:

Muestra: Código de la muestra en la base de datos.

Nombre: Nombre de la muestra.

Caja: Caja en la que se encuentra la muestra que se haya estudiado.

Fila: Fila de la caja en la que se encuentra la muestra.

Columna: Columna de la caja en la que se encuentra la muestra.

Número: Número de la posición de la muestra en la caja.

W: Vativos a los que corre la electroforesis.

nº Geles: Número de geles corridos en la misma electroforesis.

Matriz del gel: Nombre de la matriz del gel empleada en la electroforesis.

Concentración de glicerol: Concentración final de glicerol en el gel de la electroforesis.

Protocolo SSCP: Nombre del protocolo de SSCP.

Patrón: Patrón de SSCP observado en la muestra.

Estado: Estado de la muestra. Los estados posibles son:

B: Bien. El SSCP es correcto.

R: Repetir: Esta muestra debería repetirse.

M: Mal. El SSCP no funciona.

Foto: Indica si hay una imagen asociada al patrón de electroforesis. Este campo es útil cuando esta consulta se usa como origen de datos para un formulario o informe que puede representar la imagen del patrón.

Genotipo: Genotipo asociado al patrón de electroforesis.

Fragmento: Fragmento que se ha amplificado para el SSCP.

Nombre de la secuencia: Nombre de la secuencia asignada al genotipo.

Secuencia: Secuencia de nucleótidos del genotipo.

Protocolo PCR: Protocolo de PCR utilizado en el SSCP.

Raza: Raza a la que pertenece el animal.

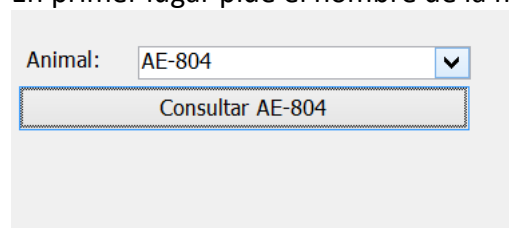
Esta consulta es la que provee de datos a un informe que permite visualizar o imprimir los datos de [SSCP de una muestra](#).

8.1.5.33 Ver Todo SSCP de 1 Muestra Informe

Consultar todos los datos de SSCP de una muestra, informe:

Informa gráficamente sobre los experimentos de SSCP de una muestra almacenados en la base de datos.

En primer lugar pide el nombre de la muestra.

El formulario tiene un campo de texto etiquetado como 'Animal:' con el valor 'AE-804' y un icono de flecha hacia abajo. Debajo de este campo hay un botón rectangular con el texto 'Consultar AE-804'.

Al pulsar el botón "Consultar ..." se presenta un informe con los datos de SSCP almacenados para esa muestra.

Experimentos SSCP

En el encabezado del informe se muestra el nombre y la raza de la muestra.
Los datos están agrupados según la caja de ADN en la que se encuentra cada muestra.
En el encabezado de cada grupo se recogen estos datos:

Caja: Caja en la que se encuentra la muestra que se haya estudiado.

Posición: Coordenadas de la posición de la muestra en esta caja. Las coordenadas de posición están formadas por los datos

- Fila: Letra que identifica a la fila de la caja en la que se encuentra la muestra.
- Columna: Número que identifica a la columna de la caja en la que se encuentra la muestra.

Número: Número de la posición de la muestra en la caja.

Muestra: Código de la muestra en la base de datos.

Los datos que se representan en cada entrada son los siguientes.

Protocolo SSCP: Nombre del protocolo de SSCP.

Matriz del gel: Nombre de la matriz del gel empleada en la electroforesis.

W: Varios a los que corre la electroforesis.

[glicerol]: Concentración final de glicerol en el gel de la electroforesis.

nº Geles: Número de geles corridos en la misma electroforesis.

Estado: Estado de la muestra. Los estados posibles son:

B: Bien. El SSCP es correcto.

R: Repetir: Esta muestra debería repetirse.

M: Mal. El SSCP no funciona.

Patrón: Patrón de SSCP observado en la muestra.

Genotipo: Genotipo asociado al patrón de electroforesis.

Foto: Imagen del patrón de electroforesis.

Protocolo PCR: Protocolo de PCR utilizado en el SSCP.

Secuencia: Nombre de la secuencia asignada al genotipo. Debajo se muestra la secuencia de nucleótidos del genotipo.

8.1.5.34 Tabla de Mutaciones SSCP

Tabla de mutaciones SSCP:

Crea una tabla dinámica con las mutaciones genotipadas por SSCP para cada muestra.

Sexo ▾ Estado ▾		Fragmento ▾ Posición ▾						
Todas	Todas							
				OXI-E2				
				1193	1254	1263	1333	1393
				+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Nombre ▾	Patrón ▾	SNP ▾	SNP ▾	SNP ▾	SNP ▾	SNP ▾	SNP ▾	SNP ▾
54900	2OXI-E2	A	G	A	S	A		
AC+7117	1OXI-E2	A	G	A	G	A		
AE-804	1OXI-E2	A	G	A	G	A		

La tabla muestra el nucleótido que ocupa la cada SNP de un patrón de SSCP.

Los campos de la tabla son:

Nombre: Identificación de la muestra.

Patrón: Patrón de SSCP que presenta la muestra.

Fragmento: Fragmento al que pertenecen las posiciones.

Posición: Número de la base que ocupa el SNP para en el fragmento.

Esta tabla permite filtra los datos por Sexo, Estado, Fragmento y Posición.

8.1.6 Secuenciación

En esta sección se pueden manejar los datos de las secuencias almacenadas.

Los botones están agrupados de la siguiente manera:

- **Añadir información:** Estos botones lanzan los formularios de adición de información de secuenciación.
- **Consultar información:** Estos botones lanzan las consultas e informes más habituales.
- **Consultar más información:** Estos botones lanzan consultas o archivos que pueden resultar útiles en determinados momentos pero que no son tan habituales como los del grupo anterior.

8.1.6.1 Buscar Características De Muestras Secuenciadas

Buscar características de las muestras secuenciadas:

Consulta las características registradas en la base de datos para las muestras secuenciadas. Son aquellas de tipo SNP, Variación, Base modificada, Inserción, Delección, Microsatélite, Región repetida y Transposón.

Clave de muestra	Muestra	Nombre mue	IncrementoC	Secuencia de referencia	Orientación	Fragmento	Tipo	Nombre	Inicio	Final	Revisada	Alineada
1172	333	EO-5176		6942 SEQ-DGAT1-E8/2>20030211	UP	DGAT1-E8/2	Inserción	Insercion AAA -	7053	7055	✓	✓
1189	345	LA 3		6934 SEQ-DGAT1-E8/2>20030218	DN	DGAT1-E8/2	Inserción	AAA -> Lys	7053	7055	✓	✓

Los campos listados son los siguientes:

Clave de muestra: Código de identificación de la muestra secuenciada.

Muestra: Código de identificación de la muestra de ADN.

Nombre muestra: Nombre del animal del que proviene la muestra.

IncrementoGeneral: El incremento que tiene el alineamiento con respecto a su secuencia de referencia.

Secuencia de referencia: Nombre de la secuencia de referencia del alineamiento de la muestra que presenta la característica.

Orientación: Orientación de la secuenciación que generó la muestra secuenciada. Puede ser UP o DN.

Fragmento: Nombre del fragmento secuenciado.

Tipo: Tipo de característica.

Nombre: Nombre de la característica génica anotada.

Inicio: Base inicial cubierta por la característica.

Final: Base final cubierta por la característica.

Revisada: Indica si el alineamiento entre la muestra secuenciada y la secuencia consenso ha sido revisado.

Alineada: Indica si el alineamiento ha sido alineado con su secuencia de referencia. Dicho de otro modo: si comparten el mismo sistema de coordenadas para establecer la posición de las características.

8.1.6.2 Buscar Posiciones De Las Características

Buscar posiciones de las características de las muestras secuenciadas:

Muestra las posiciones de las características registradas en la base de datos. Son aquellas de tipo SNP, Variación, Base modificada, Inserción, Delección, Microsatélite, Región repetida y Transposón.

Fragmento	Nombre	Tipo	Inicio	Final	Revisada	Alineada
OXI-E2	S(Gc) (Gly) n 189	SNP	1333	1333	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
OXI-E2	W (A o T) (Asn-Ile) n119	SNP	1263	1263	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Los campos listados son los siguientes:

Fragmento: Nombre del fragmento al que pertenece la característica.

Nombre: Nombre de la característica.

Tipo: Tipo de característica.

Inicio: Primera base de la característica.

Final: Última base cubierta por la característica. En el caso de los SNPs coincide con el Inicio.

Revisada: Indica si el alineamiento en el que se encuentra la característica está revisado o no.

Alineada: Indica si el alineamiento del que procede la característica está alineado con su secuencia de referencia o no.

8.1.6.3 Contar Secuenciaciones De Cada Muestra

Contar secuenciaciones de cada muestra:

Consulta el número de veces que una muestra ha sido secuenciada para cada uno de los fragmentos.

Muestra	Nombre	Fragmento	Recuento
553 GE 69794		GH2	26
3200 GE10117		OXT_PCRa	11
2247 MI 1		GH-I1-I4	10

Esta contiene los siguientes campos:

Muestra: Código ID de la muestra en la base de datos.

Nombre: Nombre de la muestra en la base de datos.

Fragmento: Nombre del fragmento que se ha secuenciado.

Recuento: Número de secuencias que hay de ese fragmento para esa muestra.

8.1.6.4 Dibujar Secuencias

Dibujar Secuencias:

Genera un informe con los códigos necesarios para que cualquier programa que lea el formato GeneBank, pueda dibujar las secuencia y posicionar sus características. Muestra las secuencias almacenadas en la base de datos que contienen características.

Dibujos de secuencias.				
<p>Instrucciones para Transformar en dibujo: Exportar a Word, copiar los códigos de representación y pegarlos en un archivo independiente. Guardarlo con formato texto. Si se exporta directamente a archivo de texto deben eliminarse los textos de ayuda y las líneas vacías. Este archivo puede ser representado gráficamente en programas de visualización como Artemis, Unipro Ugene, Vector NTI, etc Código para representación con programa externo: 1ª orientación 23-06-05</p>				
LOCUS	1ª orientación	8249 bp	INA	linear
ID	1ª orientación 23-06-05			
FEATURES				
	Location/Qualifiers			
source	1..8900			
CAAT_signal	3682..3690			/label="Caja CAAT"
CDS	6155..7015			/label="Amp (R) "
CDS	5343..6137			/label="Kan (R) "
exon	3974..3986			/label="Exón 1"
misc_difference	2310..2656			/label="Región seleccionada en Oveja"
misc_feature	3892..3922			/label="Sec que alinea con el 5' del gen GH de oveja"
misc_feature	2616..2952			/label="Sec que alinea con el cromosoma de vaca"
misc_feature	1319..2615			/label="Seq de vaca AAPC0138911"
misc_feature	2616..3922			/label="Insero de Yamano"
misc_feature	2966..3389			/label="Esto alinea con AC147927"
misc_feature	3401..3891			/label="Secuencia del Insero"
				/nota="Según Yamano"
polyA_signal	152..157			/label="Señal de Poliadenilación"
primer	complement(4388..4407)			/label="T7 primer"
primer	complement(4415..4430)			/label="MG3 (-20) forward primer"
primer	8160..8176			/label="MG3 reverse primer"
primer	complement(4434..4450)			/label="MG3 (-40) forward primer"
primer_bind	384..405			/label="Cebador GH2I-NIR"
primer_bind	4299..4318			/label="Cebador GH2x-E2 DN"
primer_bind	1..22			/label="Cebador GH2n-E5 UP"

La estructura de este informe es la siguiente:

La **cabecera** contiene el título del informe e instrucciones para la utilización de los códigos generados:

Dibujos de secuencias.

Instrucciones para Transformar en dibujo:

Exportar a Word, copiar los códigos de representación y pegarlos en un archivo independiente. Guardarlo con formato texto. Si se exporta directamente a archivo de texto deben eliminarse los textos de ayuda y las líneas vacías.

Este archivo puede ser representado gráficamente en programas de visualización como Artemis, Unipro Ugene, Vector NTI, etc

El **cuerpo** contiene la sucesión de los códigos de representación de las características, separados por el título de cada una (en azul).

Código para representación con programa externo: AY588290

LOCUS AY588290 707 bp DNA linear

```

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..836
     CDS               <531..>668
                     /label="CDS_1"
     exon              531..668
                     /label="Exon_4"
     mRNA              <531..>668
                     /label="mRNA_1"
     primer             567..582
                     /label="GLCO-Taqman-E4-VIC-MGB"
     primer             complement(647..664)
                     /label="GLCO-Taqman-E4 DN"
     primer             535..556
                     /label="GLCO-Taqman-E4 UP"
     source            1..707

```

BASE COUNT 197 a 168 c 158 g 184 t

ORIGIN

```

1  ttcgattcaa taaactaact ctgaccccat gtgttgagg aggaaacaga aacccactcc
61  actattcctg cctggaaaat tccatggaca gtggagcctg gcaggctaca gtccatgggg
121  tcccagagtg agcgacggag tacgcacaca cggcccaga tgtacaaatg acaagctgct
181  gctttgtctg caagtggcat ggcacagtag atggccctca cacttttgga ctgaagtaag
241  ggcagcttta agaattaatg acacagacaa gcggaagagg tgaaaatggg tcaactgggtg
301  gagtgaaggga gcttagcctc ccttaattgt cgtagactg ccccatcaa ccttactcc
361  caataattaa tgtagctttc tggtagagt cctacacacc ctcactctcc caaatctccc
421  tctaagcccc ctccacacag aatccagaac ccgaagctgc cattgcttat aggtgagaac
481  catattgcta aagagacaga tcttcaattt aactttcaca tttctttcag gaataacatt
541  gccaaacgtc atgatgaatt tgagagacat gctgaaggga cctttaccag tgatgtaagt
601  tcttatttgg aaggccaagc tgccaaggaa ttcattgctt ggctggtgaa aggccgagga
661  aggcgagagt aagtctgtac atccttattt aatttttttt tttttt
//

```

El **pie** del informe contiene el recuento de páginas y la fecha de impresión. Esta información no se incluye entre cada página para que, si se decide exportar a Word, no interfiera en caso de querer copiar algún código de representación.

martes, 27 de enero de 2015

Página 753 de 753

Para obtener información más detallada de cómo utilizar estos códigos de representación se puede consultar el tema "[Dibujar Secuencia](#)" del formulario de introducción de secuencias consenso.

8.1.6.5 Elegir Muestras Secuenciadas

Elegir muestras secuenciadas:

Es una consulta especial que lista las muestras secuenciadas pero añade columnas con códigos de formato en "HTML" que permite, mediante una macro de "Word", generar archivos de secuencias en formato "FASTA". Estos pueden ser alineados mediante programas como "ClustalX".

A continuación se mostrará en detalle el procedimiento:

Al ejecutar la consultas se muestran los campos necesarios para que la macro transforme la secuencias en archivos válidos para Clustal:

Inicio ▾	Marca ▾	Clave ▾	Muestra ▾	Nombre ▾	Día de sec ▾	Orienta ▾	Increme ▾	Clon ▾	Salto ▾	Secuencia ▾
 	>	798	353 MI 1	20/10/05-2	UP	241			 	CACAGCTTTGGGTtTTTAGGGyTTCYGAATGYGAACA'
 	>	817	2129 MI 1	13/01/06-1	UP	0 6D			 	TCCCCTCCATTAGCGTGTCTAAGGGAAGTATGCGGG
 	>	818	2129 MI 1	13/01/06-1	UP	0 7D			 	TCCCCTCCATTAGCGTGTCTAAGGGGGTATGCGGG
 	>	819	2129 MI 1	13/01/06-1	UP	0 10D			 	TCCCCTCCATTAGCGTGTCTAAGGGGGTATGCGGG

El contenido de esta tabla es:

Inicio: Esta columna contiene el símbolo "
" que será utilizado por la macro para indicar que debe insertarse una nueva línea.

Marca inicial: Esta columna contiene el símbolo ">" que es el código que utiliza el formato FASTA para indicar que se comienza una nueva secuencia con la línea del título.

Clave: Código de identificación de la secuencia en la base de datos. Formará parte del título de la secuencia.

Muestra: Código de identificación de la muestra en la base de datos. Formará parte del título de la secuencia.

Nombre: Nombre de la muestra. Formará parte del título de la secuencia.

Día de secuenciación: Día que se realizó la reacción de secuenciación.

Orientación: Orientación en la que se obtuvo la secuencia. UP significa 5'→3'; DN significa 3'→5'. Formará parte del título de la secuencia.

Incremento: Número de bases que hay que añadir a la secuencia para que alinee con su secuencia de referencia. Formará parte del título de la secuencia.

Clon: Nombre del clon al que pertenece. Este campo tiene interés para muestras que provienen de experimentos en los que el ADN se ha amplificado clonalmente. Formará parte del título de la secuencia.

Salto: Esta columna contiene el símbolo "
" que será utilizado por la macro para indicar que debe insertarse una nueva línea.

Secuencia: Secuencia de nucleótidos. Constituirá la línea de secuencia del formato fasta.

De esta consulta se deben copiar los registros deseados.

Para convertirlos en un documento de secuencias en formato FASTA, se deben pegar en un documento de Word:

```
<br> > 798 353 MI 1 20/10/05-2 UP 241 <br>
CACAGCTTTGGGTtTTTAGGGyTTCYGAATGYGAACATAGGTATCTRCACCC

<br> > 817 2129 MI 1 13/01/06-1 UP 0 6D <br>
TCCCCTCCATTAGCGTGTCTAAGGGAAGTATGCGGGGGGCCCTGCCGATGGATGTG
TCCACAGCTTTGGGTtTTTAGGGCTTCTGAATGTGAACATAGGTATCTGCACCC*GACATTGGC
CAAGTTTGAAATATTCTCAGTCCCTGGAGGGAAGGGCAGGCGGGG*CTGGCAGGAGATCAG
GCGTCTAgCTCTCTGGGCCCTCCGTCGCGGCCCTCTGgTCTCTCCCTagGCCCCCGACCTCC
CTGCTCCT

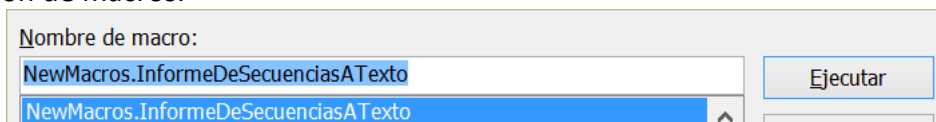
<br> > 818 2129 MI 1 13/01/06-1 UP 0 7D <br>
TCCCCTCCATTAGCGTGTCTAAGGGGGTATGCGGGGGGCCCTGCCGATGGATGTG
TCCACAGCTTTGGGTtTTTAGGGCTTCTGAATGTGAACATAGGTATCTGCACCC*GACATTGGC
CAAGTTTGAAATGTTCTCAGTCCCTGGAGGGAAGGGCAGGCGGGG*CTGGCAGGAGATC

<br> > 819 2129 MI 1 13/01/06-1 UP 0 10D <br>
TCCCCTCCATTAGCGTGTCTAAGGGGGTATGCGGGGGGCCCTGCCGATGGATGTG
TCCACAGCTTTGGGTtTTTAGGGTTTCCGAATGCAAACATAGGTATCTACACCCAGACATTTGGC
CAAGTTTGAAATGTTCTCAGTCCCTGGAGGGAAGGGCAGGCGGGGGCTGGCAGGAGA
```

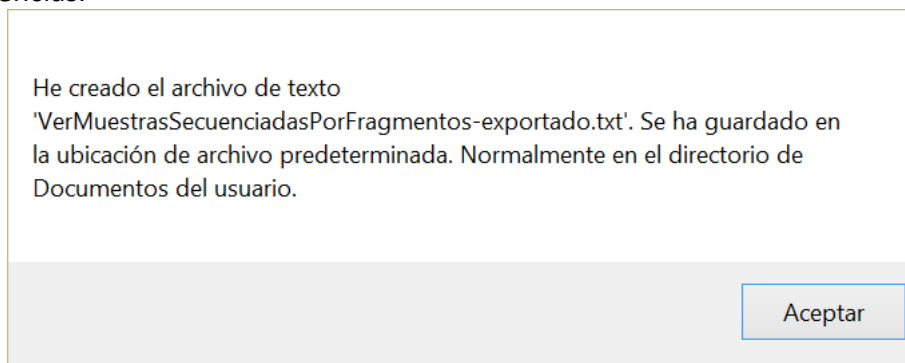
El Word debe disponer de una macro para convertir este código en un archivo de texto. No es difícil construir una macro que realice sustituciones de las marcas del

informe para generar un archivo de texto. El código de la macro utilizada puede consultarse en la página 363.

La macro debe estar disponible en Word y el documento debe tener permisos de ejecución de macros.



Al pulsar en “Ejecutar”, la macro informa de que se ha creado un archivo de texto con las secuencias.



Además, el contenido del documento se ha modificado para adoptar el formato FASTA.



El título de la secuencia es un código que contiene la información de la secuencia condensada.

Este texto puede copiarse y pegarse en un editor de texto para ser modificado. Alternativamente, se puede utilizar el archivo de texto generado:

```

1
2 >798353MI-120/10/05-2UP241
3 CACAGCTTTGGGTtTTTAGGGyTTCYGAATGYAACATAGGTATCTRCACCC
4 >8172129MI-113/01/06-1UP06D
5 TCCCTCCATTAGCGTGTCTAAGGGAGTGATGCGGGGGGCCCTGCCGATGGATGTGTCCACAGCTTTGGGTTTTAGGGCTTC
6 TGAATGTGAACATAGGTATCTGCACCC*GACATTTGGCCAAGTTTGAATATTCTCAGTCCCTGGAGGGAAGGGCAGGCGGGG
7 *CTGGCAGGAGATCAGGCGTCTAgCTCTCTGGGCCCTCCGTCGCGGCCCTCTGgTCTCTCCCTagGCCCCGACCTCCCT
8 GCTCCT
9 >8182129MI-113/01/06-1UP07D
10 TCCCTCCATTAGCGTGTCTAAGGGGGTGATGCGGGGGGCCCTGCCGATGGATGTGTCCACAGCTTTGGGTTTTAGGGCTTC
11 TGAATGTGAACATAGGTATCTGCACCC*GACATTTGGCCAAGTTTGAATATTCTCAGTCCCTGGAGGGAAGGGCAGGCGGGG
12 *CTGGCAGGAGATC
13 >8192129MI-113/01/06-1UP010D
14 TCCCTCCATTAGCGTGTCTAAGGGGGTGATGCGGGGGGCCCTGCCGATGGATGTGTCCACAGCTTTGGGTTTTAGGGTTTC
15 CGAATGCAAACATAGGTATCTACACCCAGACATTTGGCCAAGTTTGAATATTCTCAGTCCCTGGAGGGAAGGGCAGGCGGGG
16 GCTGGCAGGAGA

```

Este archivo puede abrirse directamente con el programa ClustalX para producir un alineamiento de las secuencias:



8.1.6.6 Informe De Base En La Posición


Informe para comparar las bases de una determinada posición:

Muestra las bases de la posición pedida en un fragmento.

Se crea un informe indicando la base que tiene cada una de las muestra secuenciadas para un fragmento en una determinada posición.

En este informe se muestran todas las secuencias consenso para el fragmento indicado.

En primer lugar se pide el nombre del fragmento de interés.

Fragmento: 

[Consultar GH-I1-I4](#)

Al pulsar el botón "Consultar ..." se pide la posición en la secuencia de interés.

Posición

266

Aceptar Cancelar

Al pulsar el botón "Aceptar" se muestra el informe con las muestras secuenciadas para esa posición, en ese fragmento.

Informe de SNPs en la posición 266

Fragmento GH-11-14

Nombre secuencia de referencia: HJQ-11-14-1

Posición: 666

Secuencia de referencia: L Longitud: 172

CCCTGTTGTCACACATGCTCTG

En detalle, el contenido de este informe es el siguiente:

Informe de SNPs en la posición 266

[illegible]

En el encabezado del informe se muestra la posición informada y el nombre del fragmento.

Para cada secuencia de referencia se presenta nombre de la secuencia, la posición, la longitud y se muestra la secuencia en sí.

A continuación se refiere una lista con todas las muestras secuenciadas para dicha secuencia de referencia. La información de cada muestra es la siguiente:

- **Número** de identificación de la muestra en la base de datos.
- **Nombre** de la muestra.
- **Secuencia** de la muestra. Se informa sólo de una sección de la secuencia de la muestra. Esta sección está compuesta por la posición de interés rodeada, anterior y posteriormente, por 14 bases. La tipografía de la base de interés es mayúscula, lo demás se dibuja en minúscula.
- El **incremento**. El número de bases que se han de añadir a la secuencia para que alinee con su secuencia de referencia.
- **Base** en la posición: La base interrogada. Cuando el incremento es mayor que la posición interrogada aparece una "n" porque no se tiene información sobre esa posición en esa muestra y puede ser cualquier nucleótido.

En el pie de cada página se presenta la fecha de generación del informe, el número de página y el total de páginas del documento.

8.1.6.7 Informe De Base En La Posición Por Secuencia Consenso

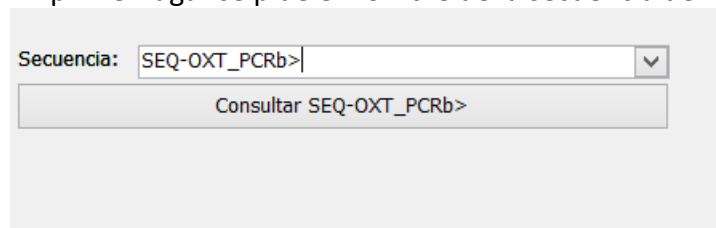
Informe de base en la posición (por secuencia consenso):

Muestra las bases de la posición pedida en una secuencia consenso.

Se crea un informe indicando la base que tiene cada una de las muestra secuenciadas en una determinada posición.

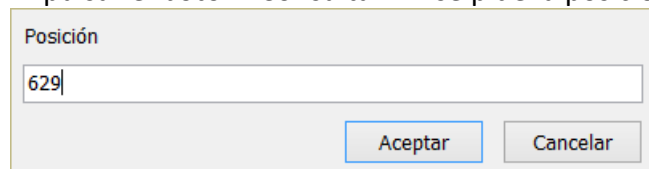
En este informe sólo se muestran las secuencias que pertenecen a la secuencia consenso indicada.

En primer lugar se pide el nombre de la secuencia de interés.



Formulario de selección de secuencia. Incluye un campo de texto con el valor "SEQ-OXT_PCRb>" y un botón de selección. Debajo hay un botón que dice "Consultar SEQ-OXT_PCRb>".

Al pulsar el botón "Consultar ..." se pide la posición en la secuencia de interés.



Formulario de entrada de posición. Incluye un campo de texto con el valor "629" y dos botones: "Aceptar" y "Cancelar".

Al pulsar el botón "Aceptar" se presenta el informe con las muestras secuenciadas para esa posición, en esa secuencia.

**Informe de SNPs en la posición 629
para SEQ-OXT PCRB>**

Fragmento OXT PCRb

[illegible]

Muestra	Secuencia	Orientación	Incremento	Base en posición 629
1096	3197 BR10330	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	DN	483 A
1092	3211 VS10303	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	DN	363 G
1088	3208 FI10219	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	UP	513 G
1089	3211 VS10303	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	508 n
1090	3211 VS10303		UP	35
1091	3211 VS10303	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	DN	408 G
1099	3198 BR10432	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	UP	35 r
1093	3197 BR10330	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	1075 n
1084	3207 IJ10429	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	1075 n
1095	3197 BR10330	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	UP	957 n
1086	3207 IJ10429	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	UP	535 G
1098	3198 BR10432	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	848 n
1100	3198 BR10432	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	UP	923 n
1101	3198 BR10432	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	DN	310 r
1102	3198 BR10432	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	DN	0 r
1103	3199 BR10448	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	826 n
1104	3199 BR10448	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	UP	923 n
1105	3199 BR10448	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	DN	477 G
1106	3199 BR10448	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	UP	531 r
1118	3204 GE10362	acgcgttcgcgcacacgcggcgcgcggcggtt	UP	517 G
1114	3201 GE10214	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	UP	926 n

lunes, 20 de octubre de 2014

Página 1 de 2

En detalle, el contenido de este informe es el siguiente:

Informe de SNPs en la posición 629 para SEQ-OXT PCRb>

Fragmento **OXT** **PCRb**

Nombre secuencia consenso:		SEQ-OXT_PCRb>	Posición:	629
Secuencia consenso:	Longitud: 1600	Incremento:		
<p>GTAGCTGTTGTAATGCAATAGGAGGATATCAGCCATTTTCAGTTTGTGACGAAGTCACAGGTATTGCAAATTCCTACTGTGGTTTG TGCCTACTCTTATAGTTTGAGGAAAGGCTGGATTTCACTTAGAAGAGAGAAAAATAAATCTTTTCATATCCAAGAGCCTCCTCCAG GTAAATGGATGTTGGTGTAGGGAGCCGGGCTGGGGTTCAGGAAATCAGATTTGAGGAAGAACTTCTTGCAGAGGGGAGCTA GGGGGTGTGTGTGGCTTGCCCAAGAGGGCAGATGGGGGAGTCTTAAACAAATCTCTTCTCGCCTGGAGGGCCGAGTGTTCATCTC GACCCCTCACCCCAAAGGAATGAGAGAGTCTCGGTTGGGCGCAGCCCCCATACTCCCTGTCCCACCGTAGGACCCAGGCCAC GCACAGGCTCCCTGCCCCAGAGCTCTTGCTTCCCTAGCGCGCTCGCTATCATCTCCCGTAACATTAGCCATTAGCAGACATA CCTTGACCCGCGCACAGCCCTGCAATAGAGGGGCGCGCGGGGCGCAGGGCTTGACCCGCGCGCGCTGTGACCACTGAC CGCGCTCGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCGCCACRGGCGCGCGGGTCTAAAGAGGCCAGACCGGAGAGACGGCCKAGTCCCCG CGGAGCCCGAGCGCTCTGCACCATGGCAGGTTCACAGCCTCGCCTGCTGCTCGCTCGGCTCTGGCGTTGACCTCCGCCCTGCT CATTCAGAACTGCCCCCTGGCGCGCAAGCGTGCCTGCTGACCTCGACGTCGCGCACGGTGAGCGCCCGCCGCTCGTCCCGTGG TCTCGGGCTGGCAGGCCCGCTGCCACAGGTGCGCCCGCGCCCTTTCCCGCCTGACCGCTACCGGGCCCACTAGCCT GGGAATCGAGGGAGCGGAGGAGCTTTTGAAGTCCCTCCTTCGACCAATTCTGAGCCCAAAGAGAGCGGGGAAGACCCGCTATCT CGCGCTCTCTCAGGCGCCGCTCGCCCGCGGGCTCAGCCCCCAACCCACAGGGTCTCTCCCTCCCGGGCGGGTCCCTCCGCGGC CGGCTCATCCCCCGCCCTGCCCTCAGTGTCTCCCTTGCGGCCCGGGGCAAGGCGCTGCTTCCGGCCAGCAGTCTGCTGGG GACGAGTCTGGGCTGCTTCTGTGGGCAGCGCGAGGCGCTGCGCTGCGAGAGAGAACTACCTGCCGTGCCCTGCCAGTCTCGGC AGAAGCCCTGCGGGAGCGGGGCGGCTGCGCGCGCGCGGGATCTGCTGCAGCCCGGGTGAGTCCGGCAGGGGCGGAGACGGGG CGGGGCTCCGGAACACAGCGGGGCGGGCCAGGGTGGCCCTGACTCGGCGTCTCTGTGACAGACGGCTGCCACCGGGATCCCGC TGCGACCCCGAGGCGCCTTCTCCAGCACTGAGACCGRCCGCCCCCTGACACCATCGGAGCACAGCTCACTCCCTCTGTAAT CATCCCCAGGAATTATGACAATGAAATAAGCCCTTTTTTCCCTCCACACAGCCTCGTGTCTGAGTGTAT</p>				

Muestra		Secuencia	Orientación	Incremento	Base en posición 629
1096	3197 BR10330	accgttcgcccacAcggcgcgcgggctt	DN	483	A
1092	3211 VS10303	accgttcgcccacGcggcgcgcgggc	DN	363	G
1088	3208 PI10219	accgttcgcccacGcggcgcgcgggctt	UP	513	G
1089	3211 VS10303	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	808	n
1090	3211 VS10303		UP	35	
1091	3211 VS10303	accgttcgcccacGcggcgcgcgggctt	DN	408	G
1099	3198 BR10432	accgttcgcccacRcggcgcgcgggctt	UP	35	r
1093	3197 BR10330	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	1075	n
1084	3207 IJ10429	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	1075	n
1095	3197 BR10330	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	UP	957	n
1086	3207 IJ10429	accgttcgcccacGcggcgcgcgggctt	UP	535	G
1098	3198 BR10432	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	848	n
1100	3198 BR10432	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	UP	923	n
1101	3198 BR10432	accgttcgcccacRcggcgcgcgggctt	DN	310	r
1102	3198 BR10432	accgttcgcccacRcggcgcgcgggctt	DN	0	r
1103	3199 BR10448	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	DN	826	n
1104	3199 BR10448	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	UP	923	n
1105	3199 BR10448	accgttcgcccacGcggcgcgcgggctt	DN	477	G
1106	3199 BR10448	accgttcgcccacRcggcgcgcgggctt	UP	531	r
1118	3204 GE10362	accgttcgcccacGcggcgcgcgggctt	UP	517	G
1114	3201 GE10214	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	UP	926	n

lunes, 20 de octubre de 2014

Página 1 de 2

En el encabezado del informe se muestra la posición informada y el nombre del fragmento.

Para cada secuencia de referencia se informa del nombre de la secuencia, la posición, la longitud y de la secuencia de nucleótidos.

A continuación se refiere una lista con todas las muestras secuenciadas, para dicha secuencia de referencia. La información de cada muestra es la siguiente:

- **Número** de identificación de la muestra en la base de datos.
- **Nombre** de la muestra.
- **Secuencia** de la muestra. Se informa sólo de una sección de la secuencia de la muestra. Esta sección está compuesta por la posición de interés rodeada, anterior y posteriormente, por 14 bases. La tipografía de la base de interés es mayúscula, lo demás se dibuja en minúscula. La secuencia vacía indica que la posición pedida está después del final de la secuencia mostrada. La secuencia que se muestra como una sucesión de N's indica que la posición pedida está antes de la zona secuenciada para la muestra (zona que se denomina incremento).
- El **incremento**. El número de bases que se han de añadir a la secuencia para que alinee con su secuencia de referencia.
- **Base** en la posición: La base interrogada. Cuando el incremento es mayor que la posición interrogada aparece una "n" porque no se tiene información sobre esa posición en esa muestra: puede ser cualquier nucleótido.

En el pie de cada página se muestra la fecha de generación del informe, el número de página y el total de páginas del documento.

8.1.6.8 Más Características

Añadir características:

Formulario para añadir características. Permite anotar características en las secuencias.

Posteriormente podrá ser generado un archivo apropiado para ser interpretado por programas de visualización como el "[Artemis](#)" (Rutherford et al., 2000).

Característica	Secuencia	Copiar Valores	Pegar Valores
367	SEQ-GHR-E10>Consenso11-11-2003		
Nombre:	Y(O) Pro->Ser		
Inicio	7131 pb	<input type="checkbox"/> Indefinido	Complementaria
Final	7131 pb	<input type="checkbox"/> Indefinido	+ Tipos
Tipo	SNP		
Referencia:	Capra hircus growth hormone receptor gene, exon 10 and partial cds		
CodigoNCBI:	DQ179245		
	Crear Hipervínculo		
Nombre Interno:	Y1486		
Comentarios:	Yct: Cct->Pro Tct->Ser		

Los campos disponibles son los siguientes:

Característica: Código de la característica en la base de datos.

Secuencia: Nombre de la secuencia a la que pertenece la característica.

Nombre: Nombre de la característica.

Inicio: Posición inicial de la característica en la secuencia. El inicio es la primera base cubierta por la característica.

Inicio Indefinido: La casilla indefinido situada al lado del inicio indica que el inicio es indefinido. Esto es, que el inicio de la característica almacenado en la base de datos puede no ser el inicio real de la característica. Es útil para características que, biológicamente, se extienden más allá de la secuencia recogida en la base de datos.

Final: Posición final de la característica en la base de datos. Es la última posición de la base cubierta por la característica. Al introducir un valor, se comprueba que no sea inferior al valor inicial, en caso contrario se informa al usuario:

Característica	Secuencia	Copiar Valores	Pegar Valores
8584			
Nombre:			
Inicio	24 pb		
Final	22 pb		
Tipo			
Referencia:			
CodigoNCBI:			
	Crear Hipervínculo		
Nombre Interno:			

Error en la introducción de datos

Revisa el valor que acabas de introducir, no puede ser menor que el valor de inicio

Aceptar

gistro: 47 de 47

Final **Indefinido**: La casilla indefinido situada al lado del final indica que el final es indefinido. Esto es, que el final de la característica almacenado en la base de datos puede no ser el final real de la característica. Es útil para características que, biológicamente, se extienden más allá de la secuencia recogida en la base de datos.

Complementario: Indica que la característica se aplica a la cadena complementaria de la secuencia.

Tipo: Permite seleccionar el tipo de característica de que se trate. El cuadro desplegable permite elegir los tipos registrados en la base de datos. El nombre del tipo se muestra traducido.

Referencia: Nombre o datos de otra secuencia que sirva de referencia para la característica actual. Es útil cuando se anota una característica nueva por comparación de la secuencia actual con otra secuencia con la que alinea. Esta otra secuencia es la referencia.

Código NCBI: Es el número de identificación único de la secuencia de referencia en la base de datos del NCBI. Al pinchar sobre él se carga la página del NCBI que muestra la información completa sobre la secuencia de referencia (Ver figura).

NCBI Resources How To Sign In to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Limits Advanced Help

Display Settings: GenBank Send:

Change region shown

Customize view

Basic Features

- ☒ Default features
- ☐ Gene, RNA, and CDS features only

Features added by NCBI

- ☒ 1 conserved domain

Display options

- ☒ Show sequence
- ☐ Show reverse complement

Update View

Analyze this sequence

- Run BLAST
- Pick Primers
- Highlight Sequence Features
- Find in this Sequence

Related information

- Related Sequences
- Component Of
- Map Viewer
- Protein
- Taxonomy

Recent activity

- Capra hircus growth hormone receptor gene, exon 10 Nucleotide
- Ovine growth hormone receptor prepropeptide, cDNA Nucleotide

See more...

Go to:

LOCUS DQ179245.1 1227 bp DNA linear MM 01-JAN-2006

DEFINITION Capra hircus growth hormone receptor gene, exon 10 and partial cds.

ACCESSION DQ179245

VERSION DQ179245.1 GI:83317188

KEYWORDS .

SEGMENT 5 of 5

SOURCE Capra hircus (goat)

ORGANISM Capra hircus

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Caprinae; Capra.

REFERENCE 1. (bases 1 to 1227)

AUTHORS Zhang, C., Luo, H. and Jia, Z.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-AUG-2005) Animal Science and Technology, China Agricultural University, No. 2 Yuanmingyuan Xi Lu, Haidian, Beijing 100094, China

FEATURES

Location/Qualifiers

source 1..1227

/organism="Capra hircus"

/mol_type="genomic DNA"

/db_xref="taxon:9925"

mRNA <104..>1075

/product="growth hormone receptor"

<104..1075

/codon_start=1

/product="growth hormone receptor"

/protein_id="ABC02757.1"

/db_xref="GI:83317188"

/translation="EGKLEEVNITLAIHNDNYKHEFYNDSDWVEFELDIDDPDEKTEG SUTDRLLSDHKEKSLIFGAKDDSGRTSCYEPDILETFHVSMDCDTSEVAQFQRL KGEADLLCLHQKNNNSPNDADAPASQSPVILVEENKFRPLPIGSGTESTHQAVHTQL SHPSSLANIDFYAQVSDITFAGNVVLSGLKNNKTNPCQDTHFEVVTSPQANFINDSA YFCEVDKRYIALAFDVEAEASHVEFSFNQEDIIITTESLTTAGRSGTAEHVFSEIP VEDYTSIHVQSPQGLVNLALPLPQRELLSCGVSTQGLNKIMP"

misc_feature 104..1021

/note="Growth hormone receptor binding; Region: GHBF; pfam1272"

/db_xref="CCD:257288"

exon 104..>1075

/number=10

ORIGIN

1 tggtaacatg ttgtttatat gatttttgta ctgattagac toaatattat ttgttaaatc

61 aattgttgtt agtttatatt catagatott ttctatttta tagaaggaa aattagaaga

121 ggtgaataca attattagaca ttoatgaca ctataaaca gaattctaca atgatgactc

181 ttgggttgaa ttatttgaa tagatatgga tgacccogat gagaagactg aagggtcaga

241 cacagacagg ctcttaagca atgacacatg aaatcaactc agtatcttg gggcaagaa

301 tggatgactt ggggtacaca gctgttatga aactgacatt ctggagactg attccatgt

361 cagtgaactt tgcgatgga cctcagaggt tgcctagcca caaaggataa aagggaagac

421 agatattctt tgccttcatc agaagaatca aaataactca ccttctaatg atgtgcccc

481 tggtagcag cagccacatg ctatcctagt agaggaac aaaccagac cacttctat

541 tggtagaact gactcaactc atcagctgtt cactacacag ctacgcaactc caagtctatt

601 ggcacaactt gatttttatg cccaggttaag gcacattaca ccagcagga atggtgtctt

661 ttccacagag ctaagaataa agactgggaa cccacaggtt gacacgcaac cagaagtgtt

721 cacacccagc caagcaaat tcatcatgga agcaggttac ttctgagag tagatgcaaa

781 aaagtcaatt gcoctggccc ctgatgtgga ggtgaatca catgtagag caagcttaa

841 ccaggagagc atttaccatc ccacagaaga cttacacact acagcaggga ggtcaggagc

901 agcagaacat gttccaagct ctgagatacc tgtccagat tatacttcca ttcatatagt

961 acagtctcca cagggtctgt tactcaatga gactgcoctg ccttgcctg caaagagatt

1021 tctcttctca tgtgtgatg tgagacaga caaactgaac aaatcatgct cgtatctttt

1081 ctttgatttc coactgacta ccaattgaat ggcacaggtt tggctgggg atgaatgott

1141 aaaccacaac aatgtttaaa ctttttggg gaggggggat gagttaggg tgggaatat

1201 gaattctaaa tgcctttctc tgaatat

//

You are here: NCBI > DNA & RNA > Nucleotide Database Write to the Help Desk

GETTING STARTED

- NCBI Education
- NCBI Help Manual
- NCBI Handbook
- Training & Tutorials

RESOURCES

- Chemicals & Bioassays
- Data & Software
- DNA & RNA
- Domains & Structures
- Genes & Expression
- Genetics & Medicine
- Genomes & Maps
- Homology
- Literature
- Proteins
- Sequence Analysis
- Taxonomy
- Training & Tutorials
- Variation

POPULAR

- PubMed
- Bookshelf
- PubMed Central
- PubMed Health
- BLAST
- Nucleotide
- Genome
- SNP
- Gene
- Protein
- PubChem

FEATURED

- Genetic Testing Registry
- Public Health
- GenBank
- Reference Sequences
- Gene Expression Omnibus
- Map Viewer
- Human Genome
- Mouse Genome
- Influenza Virus
- Primer-BLAST
- Sequence Read Archive





NCBI INFORMATION

- About NCBI
- Research at NCBI
- NCBI News
- NCBI FTP Site
- NCBI on Facebook
- NCBI on Twitter
- NCBI on YouTube

Copyright | Disclaimer | Privacy | Browsers | Accessibility | Contact

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine

8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

Nombre interno: Es el nombre interno de la característica en el laboratorio. Las características más importantes suelen tener nombres más cortos que se utilizan en el día a día del laboratorio. Este campo permite registrar esos nombres.

Además de estos campos, el formulario también dispone de los siguientes botones:

Copiar Valores: Este botón copia los valores que no suelen cambiar entre características que se introducen a la vez en la base de datos. Estos datos "constantes" son el tipo de característica, la secuencia de referencia y el código NCBI de la secuencia de referencia.

Pegar Valores: Este botón pega los valores que no suelen cambiar entre características que se introducen a la vez en la base de datos. Estos datos "constantes" son el tipo de característica, la secuencia de referencia y el código NCBI de la secuencia de referencia.

Más Tipos: Permite registrar más tipos de características en la base de datos. Para ello llama al formulario [Añadir tipos de característica](#):

Crear hipervínculo: Crea el hipervínculo necesario para cargar en el navegador la secuencia de referencia al pulsar en su código. Asocia el código NCBI a la URL necesaria para buscarlo. Esta URL es la almacenada en la variable global "[PrefijoDireccionBusquedaNCBI](#)". Este es un botón que el usuario no debería tener que pulsar porque su función se ejecuta al actualizar la información del campo Código NCBI. Si se cambia la dirección de búsqueda de los códigos de secuencia se puede usar este botón para probar si la nueva dirección funciona.

Comentarios: Información adicional.

8.1.6.8.1 Añadir Tipos De Características

Añadir tipos de características:

Permite registrar nuevos tipos de característica en la base de datos.

Tipo de característica:	<input type="text" value="SNP"/>
Código NCBI:	<input type="text" value="variation"/>
Descripción:	<input type="text" value="Mutación puntual"/>

Los campos requeridos son:

Tipo de característica: Nombre con el que se conocerá a la característica en la base de datos. Este nombre podrá estar traducido al idioma del usuario.

Código NCBI: Código de la característica en el formato Gene Bank.

Descripción: Información adicional.

8.1.6.9 Más Delecciones

Añadir delecciones:

Formulario para introducir delecciones.

Delección	<input type="text"/>
Genotipo	<input type="text" value="↓"/>
Posición de la delección	<input type="text"/>
Longitud de la delección	<input type="text"/>
Secuencia consenso:	<input type="text" value="↓"/>

Los campos requeridos son:

Delección: Nombre de la delección.

Genotipo: Nombre del genotipo al que pertenece.

Posición de la delección: Primera base de la secuencia consenso que se encuentra delecionada.

Longitud de la delección: Número de bases afectadas por la delección.

Secuencia consenso: Secuencia consenso a la que se aplica la delección.

8.1.6.10 Más Genotipos

Añadir genotipos:

Formulario para introducir genotipos. Un genotipo es una combinación específica de alelos para una secuencia. El formulario muestra la secuencia que se asigna al genotipo.

Los datos requeridos son:

Genotipo: Nombre del genotipo.

Fragmento: Fragmento al que corresponde. Al hacer doble clic se lanza el [formulario de edición de fragmentos](#) con el fragmento indicado cargado en él.

Secuencia: Secuencia concreta que se asigna al genotipo. Al hacer doble clic sobre ella se lanza el [formulario de edición de secuencias](#) con esta secuencia cargada en él. La cadena de nucleótidos se muestra en el cuadro siguiente.

Comentarios: Información adicional.

Además, el formulario está dotado de los siguientes botones:

Día de secuenciación: Lanza la consulta que permite [ver los días de secuenciación](#).

Más SNPs: Llama al formulario para [añadir mutaciones puntuales](#) de tipo SNP.

Más inserciones: Llama al [formulario para añadir inserciones](#).

Más delecciones: Llama al [formulario para añadir delecciones](#).

Más fragmentos: Llama al [formulario para edición de fragmentos](#).

Más secuencias: Llama al [formulario de edición de secuencias](#).

Más protocolos de secuenciación: Carga el formulario para [añadir protocolos de secuenciación](#).

Debajo, en la zona de pestañas se muestran detalles de las mutaciones registradas para el genotipo. Junto a los nombres de las pestañas se muestra un recuento del número de mutaciones que tiene el genotipo. Para datos concretos de cada tipo debe seleccionarse la pestaña correspondiente. El contenido de cada pestaña es el siguiente:

- **SNPs:** Esta pestaña sirve para consultar y modificar los datos de las mutaciones de tipo SNP asignadas al genotipo actual. Los campos disponible son:
 - **Mutación puntual:** Nombre que recibirá el SNP.
 - **Posición:** Número del pb afectado por la mutación.
 - **Base inicial:** Código de una letra que representa al nucleótido que ocupa la posición indicada en la secuencia consenso.
 - **Base final:** Código de una letra que muestra el nucleótido que está presente en el genotipo en la posición indicada. Si no coincide con la inicial se resalta en rojo. En ocasiones conviene marcar como SNPs posiciones homocigotas de un genotipo para compararlas con las de otros en las que si hay variación. El resaltado en rojo permite distinguir rápidamente las posiciones que varían en un genotipo.
- **Inserciones:** Esta pestaña contiene una lista de formularios para consultar las inserciones presentes en el genotipo. Al final de la lista hay un formulario vacío donde introducir nuevas inserciones. Los campos disponibles en el formulario son:
 - **Inserción:** Nombre de la inserción.
 - **Genotipo;** Nombre del genotipo.
 - **Posición de la inserción:** Posición de la base donde se produce la inserción. Esta posición será donde comience la secuencia insertada en el genotipo.
 - **Secuencia Insertada:** Secuencia que se encuentra en el genotipo y que no está presente en la secuencia consenso.
 - **Secuencia consenso:** Nombre de la secuencia consenso a la que se aplica la inserción. Dado que cada genotipo tiene asignada una secuencia este campo no es necesario para las mutaciones de los genotipos porque se entiende que se aplican a la secuencia de dicho genotipo.

SNPs	Inserciones	Deleciones	SNPs:0 Inserciones:1 Deleciones:0										
<table border="1"> <tr> <td>Inserción</td> <td>113-INS-AAA-DGAT1-E8/2>113AAA</td> </tr> <tr> <td>Genotipo</td> <td>DGAT1-E8/2>113AAA</td> </tr> <tr> <td>Posición de la inserción</td> <td>113</td> </tr> <tr> <td>Secuencia insertada</td> <td>AAA</td> </tr> <tr> <td>Secuencia consenso:</td> <td></td> </tr> </table>				Inserción	113-INS-AAA-DGAT1-E8/2>113AAA	Genotipo	DGAT1-E8/2>113AAA	Posición de la inserción	113	Secuencia insertada	AAA	Secuencia consenso:	
Inserción	113-INS-AAA-DGAT1-E8/2>113AAA												
Genotipo	DGAT1-E8/2>113AAA												
Posición de la inserción	113												
Secuencia insertada	AAA												
Secuencia consenso:													
<table border="1"> <tr> <td>Inserción</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Genotipo</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Posición de la inserción</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Secuencia insertada</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Secuencia consenso:</td> <td></td> </tr> </table>				Inserción		Genotipo		Posición de la inserción		Secuencia insertada		Secuencia consenso:	
Inserción													
Genotipo													
Posición de la inserción													
Secuencia insertada													
Secuencia consenso:													

- **Deleciones:** Esta pestaña contiene una lista de formularios para consultar las deleciones presentes en el genotipo. Al final de la lista hay un formulario vacío donde introducir nuevas deleciones. Los campos disponibles en el formulario son:
 - **Delección:** Nombre de la delección.
 - **Genotipo:** Nombre del genotipo.
 - **Posición de la delección:** Posición de la primera base de la secuencia consenso que se elimina en la delección.
 - **Secuencia consenso:** Nombre de la secuencia a la que se aplica la delección. Dado que cada genotipo tiene asignada una secuencia este campo no es necesario para las mutaciones de los genotipos porque se entiende que se aplican a la secuencia de dicho genotipo.

SNPs	Inserciones	Deleciones	SNPs:0 Inserciones:1 Deleciones:0
<div> <div>▶</div> <div>Delección</div> <div>Genotipo</div> <div>Posición de la delección</div> <div>Longitud de la delección</div> <div>Secuencia consenso:</div> </div>			

8.1.6.11 Más Inserciones

Añadir Inserciones:

Formulario para introducir inserciones.

Inserción	111-INS-A-GH-I1-I4
Genotipo	GH-I1-I4
Posición de la inserción	111
Secuencia insertada	A
Secuencia consenso:	

Los campos disponibles son:

Inserción: Nombre de la inserción.

Genotipo: Nombre del genotipo al que pertenece la inserción. Si procede.

Posición de la inserción: Posición de la base donde se produce la inserción. Esta posición será donde comience la secuencia insertada en el genotipo.

Secuencia Insertada: Secuencia que se encuentra en el genotipo y que no está presente en la secuencia consenso.

Secuencia consenso: Nombre de la secuencia consenso a la que se aplica la inserción. La inserción se puede anotar para cada secuencia pero, como quiera que se manifiesta por comparación entre varias secuencias, el campo se llama secuencia consenso para recalcar que debería ser aplicada, al menos, a la secuencia consenso de dicha comparación de secuencias.

8.1.6.12 Más Muestras Secuenciadas

Añadir muestras secuenciadas:

Formulario que permite introducir información sobre las muestras secuenciadas. Está diseñado para manejar los datos relevantes de la secuenciación, con independencia del aparato donde fueron obtenidos. Esta información es la secuencia obtenida. Se entiende que esta secuencia ha sido curada mediante los programas y métodos adecuados del sistema de secuenciación empleado.

En el formulario hay 2 tipos de campos: los que tienen fondo blanco son aquellos que el usuario puede modificar. Los que tienen fondo amarillo sirven para consultar información adicional sobre los datos introducidos.

Id de la secuencia: 515 línea: 21 Ver en forma de tabla

Código de la muestra: 553 Buscar muestras +Muestras

Secuenciación: +Días

Día de secuenciación: 28/06/04-2 Día: 28/06/2004 Variante: 2

Secuencia: Navegador de secuencias

Secuencia: Orientación: DN Longitud: 260

GCCAGAGAAACAGCATTTCTAGAAGTGATTGCTCTTGATCACTTTAAATATGTGTCTCA
TTAGGACCAyCCATTACCTCCTGATTTTCATGACTTGTCTT-----
TTTATTCTGCAGATTCTTCyGGGAATCTTAAATTACCAAGTGCCGTTACCTGAACCTGG
AGACTTTCTCATGTCACTGGACAGATGGGGCTAATCACAGTTTACAGAGCCCAGGATCTG
TACAGATGTTCTATATCAGAAGGTATGGGCTTCA

Clon: Nombre en alineamiento:

Comentarios:

Referencia: +Secuencias de referencia

Secuencia consenso: SEQ-GHR-E4-Consenso28-6-04> Incremento: 1598

Datos de la muestra

Nombre: GE 69794

Posición: D12 Número: 5

Caja: 11 Primeros Machos de Churra

Datos de la secuenciación

Fragmento: GHR-E4

Cebador: GHR-E4 DN

Protocolo de secuenciación: 48

Los campos disponibles son:

ID de la secuencia: Código de identificación único de la secuencia en la base de datos.

Línea: Número de línea en la que se carga la secuencia. Este campo es útil para indicar la posición de la muestra en el aparato de secuenciación. En un aparato de secuenciación con cristales como el ABI 377 hace referencia a la línea del gel. En un aparato de secuenciación capilar haría referencia al capilar en que se carga la muestra.

Código de la muestra: Código de la muestra secuenciada en la base de datos. Al hacer doble clic se presenta el [formulario de edición de muestras](#) con los datos de la muestra cargados en él. Al desplegar el cuadro se presenta información adicional sobre cada muestra que ayuda a elegir el código adecuado:

Muestra	Nombre	Caja
553	GE 69794	11 Primeros Machos de Churra
2073	GE 69794 A	11 primeros machos de churra 1.2
2087	GE 69794 A	11 primeros machos de churra 1.3
2241	GE 69794 A	11 primeros machos de churra 1.4

Esta información es:

- Muestra: El código de la muestra buscado.
- Nombre: Nombre de la muestra en el laboratorio.
- Caja: Caja de ADN de donde se obtuvo la muestra.

Día de secuenciación: Código del día de secuenciación en la base de datos: Día y variante. Al hacer doble clic en el campo se muestra el [formulario de edición de días](#) con los datos del código de día de secuenciación cargados en él. Al desplegar el cuadro se presenta el fragmento de secuenciación asignado al código de día. Así se ayuda a elegir el código de día de secuenciación adecuado:

28/06/04-2	
Día de secuenciación	Fragmento
28/06/04-2	GHR-E4
23/07/04-7	GHR-E4
23/07/04-8	GHR-E4

Día: Fecha en la que se realizó la secuenciación.

Variante: Variante del día de secuenciación.

Orientación: Orientación de la secuenciación. UP indica dirección 5' -> 3'; DN indica 3' -> 5'.

Secuencia: Secuencia de nucleótidos obtenida. Se entiende que está editada y curada. Siempre se almacena en sentido 5' -> 3'. Suele ser habitual el convenio de introducir en mayúsculas los nucleótidos de alta calidad y en minúsculas aquellos donde la calidad de secuenciación es inferior.

Clon: Nombre del clon del que se obtiene la secuencia. Es útil para muestras obtenidas a partir de experimentos de clonación.

Nombre en el alineamiento: Es el nombre de la secuencia en el alineamiento original del programa de alineamiento. Suele coincidir con el nombre del fichero. Sirve para localizarlo fácilmente en dicho programa. Cuando se alinean varias secuencias se obtiene una secuencia de referencia y una lista de posiciones heterocigotas. Cada una de las secuencias que intervienen en el alineamiento se identifica de forma única. Este campo recoge el identificador de la secuencia en su alineamiento.

Comentarios: Información adicional. Admite texto con formato.

Secuencia consenso: Nombre de la secuencia consenso del alineamiento al que pertenece la muestra. La es una secuencia de referencia que sirve para establecer un origen de coordenadas con el que numerar las bases al navegar. Conviene que la secuencia consenso contenga todas las inserciones del alineamiento. La posición de las bases de la secuencia consenso es la que marca la numeración de las secuencias que alinean con ella. De esta forma se establece un sistema de coordenadas coherente que permite referir a cada una de las bases de una secuencia por su posición.

Al hacer doble clic en el campo se muestra el [formulario de secuencias](#) con los datos de la secuencia cargados en él.

Incremento: Valor de ajuste al origen de coordenadas de la secuencia de referencia. Esto es: el número de bases que está desplazada la muestra actual con respecto a su secuencia de referencia. Dicho de otro modo: el número de bases que habría que añadir a la izquierda de la secuencia de la muestra para que alinee con su secuencia de referencia.

Al hacer doble clic se muestra el formulario "[comparador de secuencias](#)". Ejemplo:

Al pulsar "INTRO" se listan los números de muestra asignados a ese animal y la caja de ADN a la que pertenece.

Selecciona el nombre de un animal, aparecerá una lista de los números de muestra asignados en cada caja. Pulsa la X para cerrar.

Animal: GE 69794

Datos de GE 69794:

Muestra	Caja
553	11 Primeros Machos de Churra
2250	Muestras para GH2

Copiado 553 al portapapeles.

Si se selecciona uno de los códigos se copia su valor en el portapapeles para poder pegarlo en el formulario que corresponda.

+Muestras **Más muestras:** Llama al formulario de [adición de muestras](#). Permite añadir nuevas muestras de ADN a la base de datos.

Copiar Valores **Copiar valores:** Copia los valores de día de secuenciación, orientación, secuencia de referencia y clon. Estos valores no suelen variar entre muestras del mismo alineamiento. Quedan disponibles para ser pegados mediante el botón "Pegar Valores"

Pegar Valores **Pegar valores:** Pega los valores copiados mediante el botón "Copiar Valores" en los campos correspondientes.

? **Ayuda:** Muestra la ayuda específica del formulario. Este texto de ayuda es editable para que el usuario pueda mejorarlo.

+Días **Más días:** Llama al [formulario de adición de días](#) para poder añadir más.

Navegador de secuencias **Navegador de secuencias:** Llama al formulario [Navegador de secuencias](#) con los datos de la secuencia actual cargados en él. Esto permite explorar la secuencia en más profundidad.

Navegador de Secuencias ? Buscar:

Alinear 2 secuencias ☐ CoordenadasRelativas ☐

Posición relativa ☐

Secuencia: 1717 a 1847 Ver TCYGGGAATCTTAAATTCACC. Borrar Longitud: 260 Incremento 1598

GCCCCAGAGAAACAGCATTTCTAGAAAGTGATTGCTCTTGATCACTTTAAATATGTGCTCTATTAGGAACCCATTACCCCTCTGATTTCATGACTTGTCTT-----TTTATTCTGCAGATTCTTCYGGGAATCTTAAATTCACCAAGTGCCGTTCACTCTGAACCTGGAGACTTTCTCATGTCTACTGGACAGATGGGGCTAAATCAGATTTACAGAGCCAGGATCTGTACAGATGTTCTATATCAGAAAGGTATGGGCTTCA

Muestra secuenciada

Características

Traducir> Salida: Longitud: 1853

Código

1- A

3- Aaa

Marco

1

2

3

Ver

AA

NN

Ambas

AAATCAGAGTTTACAGAGCCAGGATCTGTACAGATGTTCTATATCAGAAAGGTATGGAsnHisSerLeuGlnSerProGlySerValGlnMetPheTyrIleArgArgTyr

118pb 131pb 11pb => Exón

Características de la secuencia SEQ-GHR-E4-Consenso28-6-04>:

Inicio	Final	Tipo	Nombre
1717	1847	Exón	Exón 4
1673	1673	SNP	Y(Tc)
1724	1724	SNP	Y(Tc) (tcT->tcC) Ser
1873	1873	SNP	Y(Tc)

< **Sentido de la orientación:** Este botón con forma de flecha indica la orientación en la que se ha leído la secuencia. Al hacer doble clic en él se cambia la orientación de la secuencia y, como la secuencia siempre debe almacenarse en sentido 5' -> 3', se invierte automáticamente la secuencia almacenada en el campo "Secuencia".

+Secuencias de referencia **Más secuencias de referencia:** Este botón llama al formulario de edición de [secuencias de referencia](#).

8.1.6.13 Más Mutaciones

Añadir Mutaciones:

Formulario para introducir mutaciones puntuales. Las mutaciones puntuales son aquellas en las que se produce un cambio de nucleótido en una posición de una secuencia.

Mutación puntual	A119-OXI-E2>
Genotipo	OXI-E2>AGAGA
Posición	119
Base inicial	A
Base final	
Secuencia consenso:	SEQ-OXI-E2>GAGA

Los campos disponibles son los siguientes:

Mutación puntual: Nombre de la mutación puntual. Para mantener la coherencia de nombres, el nombre de la mutación se establece automáticamente al establecer los datos de los demás campos. Para ello se sigue este algoritmo: $Mutación_puntual = Base_inicial + Posición + Base_final + GUIÓN + Fragmento$

Genotipo: Nombre del genotipo que genera. Al actualizar los datos de este control también se actualiza el nombre de la mutación.

Posición: Posición de la secuencia consenso afectada por la mutación. Al actualizar los datos de este control también se actualiza el nombre de la mutación.

Base inicial: Base que se encuentra en la secuencia consenso en la posición. Al actualizar los datos de este control también se actualiza el nombre de la mutación.

Base final: Base que se encuentra en las secuencias mutadas en la posición. Al actualizar los datos de este control también se actualiza el nombre de la mutación.

Secuencia consenso: Nombre de la secuencia a la que se aplica la mutación.

8.1.6.14 Más Protocolos De Secuenciación

Añadir protocolos de secuenciación:

Formulario para introducir los datos de los protocolos de secuenciación.

Este formulario está diseñado para guardar los datos de secuenciación en el secuenciador de geles. Cuando se registra el secuenciador capilar algunos datos pueden quedar en blanco. Se entiende, por ejemplo, que se secuencia con los 2 cebadores a la vez a no ser que se diga lo contrario. Sin embargo, es más conveniente, para el correcto funcionamiento de la base de datos, registrar 2 protocolos: uno para el cebador UP y otro para el DN. Así quedarán almacenados de forma similar a como se almacenan los experimentos de secuenciación en el secuenciador de geles.

El color de los textos de cada campo indica su función. Así, al activar los campos de color azul se realizan consultas y al activar los de color rojo se realizan acciones.

Añadir Protocolos de secuenciación ?

Doble click en los campos de color azul se realizan consultas, en los de color rojo se realizan acciones (ver barra de estado.).

Protocolo Secuenciación	SEC-PRL-E5.2<127	nº	127
Fragmento	PRL-E5.2		
Protocolo de PCR	PCR-PRL-E5.2<15	verlo	+Protocolos PCR

← PCR de secuenciación →

Día de secuenciación	1/02/02-4	+Días	Variantes de día
Dye Terminators	v 3.0		
Cebador 2º	PRL-E5.2 DN	verlo	+Cebadores
Programa 2º	1-secuencia-57		+Programas
Incidencias	Este protocolo sustituye al 117 (SEC-PRL-E5.2<117) porque es un nuevo análisis de las mismas muestras.		

En forma de tabla

En detalle, los campos disponibles son los siguientes:

Protocolo de secuenciación: Nombre del protocolo de secuenciación. Este debe ser único en la base de datos puesto que es el identificador único del protocolo. Este nombre se genera automáticamente, cuando se actualizan otros campos del formulario, siguiendo este algoritmo: `Protocolo de Secuenciación = "SEC-" + Fragmento + "<" + Número`.

Número: Un número único, autogenerado para cada registro, que asegurará que el nombre del protocolo de secuenciación no se repite.

Fragmento: Nombre del fragmento que se está secuenciando. Al hacer doble clic sobre el nombre del fragmento se muestra el formulario de edición de fragmentos con los datos del actual cargados en él.

Protocolo de PCR: Código del protocolo de PCR que se utilizó para amplificar el fragmento. Al hacer doble clic infiere el nombre del protocolo de PCR a partir de los datos del fragmento. Si se han seguido las convenciones de nombre automáticas de la base de datos sólo será necesario añadir el número del protocolo de PCR al nombre inferido.

Día de secuenciación: Código del día en que se realizó la secuenciación. Al hacer doble clic en él se muestra el formulario de edición de [días](#) con los datos del actual cargados en él.

Dye Terminators: Química utilizada para la secuenciación.


Cebador 2º: Cebador de la segunda PCR de secuenciación. Si el cebador tiene orientación UP, al hacer doble clic en el campo se cambia a DN. Esto es útil cuando se copian los datos de una secuenciación UP y se quiere registrar también la orientación DN.


Programa 2º: Programa de la 2ª PCR de secuenciación. Al hacer doble clic en él se muestra el formulario de edición de programas de PCR con los datos del programa de la segunda secuenciación cargados en él.

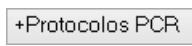
Incidencias: Información adicional.


Además de los campos, el formulario está dotado de los siguientes botones:

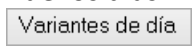
? **Ayuda:** Muestra la ayuda específica del formulario. Este texto de ayuda es editable para que el usuario pueda mejorarlo.

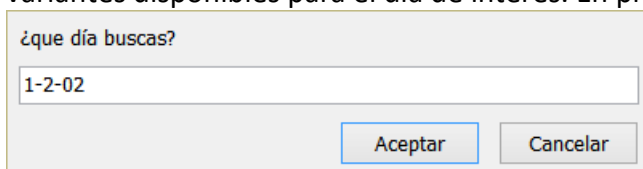
 **Ver protocolos de este fragmento:** Filtra los datos para que sólo se muestren los protocolos de secuenciación que comparten fragmento con el actual.

 **Ver protocolos de PCR:** Muestra el formulario de edición de [protocolos de PCR](#) con los datos del actual cargados en él.

 **Más protocolos de PCR:** Muestra el formulario reducido de adición de [protocolos de PCR](#). Esto permite insertar rápidamente protocolos de PCR cuando el utilizado en la primera PCR de secuenciación no está disponible.

 **Más días:** Llama al formulario de adición de [días](#). En él se pueden declarar nuevos días.

 **Variantes de día:** Este botón crea una consulta que sirve para buscar las variantes disponibles para el día de interés. En primer lugar se pide el día de interés:




¿que día buscas?

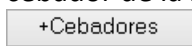
1-2-02

Aceptar Cancelar


Al pulsar en aceptar se muestran las variantes del días elegido.

Código de día
1/02/02-1
1/02/02-2
1/02/02-3

 **Ver cebador 2º:** Llama al [formulario de edición de cebadores](#) con los datos del cebador de la 2ª PCR de secuenciación cargados en él.

 **Más cebadores:** Llama al [formulario de edición de cebadores](#) en modo de adición de nuevos cebadores.

 **Más programas:** Llama al formulario de adición de [programas de PCR](#).

 **En forma de tabla:** Se usa para poder utilizar directamente la tabla de datos y, de esa forma, poder copiar el registro de interés, pegarlo como uno nuevo y modificar lo que sea necesario. Es especialmente útil cuando las diferencias entre 2 registros son pocas. Hay que tener cuidado de introducir correctamente todos los datos, sobre todo el identificador, cuyo valor debe avanzar un número.

8.1.6.15 Más Secuencias Consenso

Añadir secuencias consenso:

Formulario para añadir secuencias consenso. Las secuencias consenso son aquellas formadas por las bases más habituales en un determinado alineamiento.

Introducción:

Para averiguar la variabilidad de un fragmento de ADN se suelen secuenciar amplificaciones de ese fragmento en varias muestras. Cada muestra se suele amplificar desde los extremos UP y DN de forma que se pueden obtener 2 secuencias por muestra. El conjunto de todas las secuencias para un mismo fragmento se suelen alinear y ensamblar de forma que se pueda distinguir la conservación de cada base. En cada posición suele haber un gran número de bases alineadas que confirman dicha base. Las variaciones puntuales se resumen mediante códigos de ambigüedad. La secuencia de bases confirmadas conforma la secuencia consenso. Por tanto, la secuencia consenso es un resumen muy completo de un alineamiento de secuencias.

Cuando existe información previa sobre la secuencia del fragmento es habitual alinear esa secuencia con aquellas provenientes de las muestras recién secuenciadas. La secuencia que sirve como patrón para el alineamiento se llama secuencia de referencia. La secuencia consenso de un alineamiento puede considerarse como secuencia de referencia de dicho alineamiento pero, como la referencia la decide el investigador, puede ser cualquier otra.

Cuando se ensamblan varios alineamientos se puede crear uno de mayor extensión que los originales. En estos ensamblamientos también se puede introducir secuencia de referencia. Así, la secuencia de referencia de un alineamiento puede tener, a su vez, otra secuencia de referencia.

Por todo esto se entiende que una secuencia consenso puede ser secuencia de referencia y también tener su propia secuencia de referencia.

Aquella información genética obtenida en el laboratorio o inferida por comparación con secuencias de referencia se anexiona a la secuencia de nucleótidos como una lista de características génicas. Las características tienen unos límites (inicio y fin), un tipo, un nombre y alguna información adicional. Es interesante posicionar sobre una secuencia los exones, las variaciones y aquellas características que tengan interés para la investigación. Por tanto, junto con la secuencia de nucleótidos de cada fragmento se asocia la tabla de características génicas para resumir así, toda la información extraída de dicha secuencia. Esta es la información que posteriormente se publicará y que se puede consultar en las bases de datos de libre acceso.

Cuando alinea una secuencia desconocida con una secuencia pública y anotada puedes asumir que las características de la secuencia notada se encuentran en la secuencia desconocida y transponer las anotaciones de aquella a esta.

Formulario de secuencias consenso.

Este formulario incluye todos los controles necesarios para introducir y manipular una secuencia anotada en la base de datos.

NombreIntern	Inicio	Final	Tipo	Nombre	Referencia	CodigoNCBI	Complementar	Comentario
163	163		SNP	Y(Tq) en el macho 15				
380	381		Insertión	Insertión AG en el macho 15				
423	423		SNP	M(Ca) en el macho 15				
646	646		SNP	R(GA)				Muy claro.
686	686		SNP	K(Tg) en macho 1				
721	840		Exón	OXT-E1	Sheep gene for oxyt. X55131.1			Marco de lectura +1.
1090	1101		Insertión	Insertión heterozigota TCCC				Insertión en machos 1 y 11. Ambos alelos se diferencian en la posesión de 2 repeti
1148	1348		Exón	OXT-E2				Marco de lectura +1.
1333	1333		SNP	S(Gc)				Muy claro.
1439	1495		Exón	OXT-E3				Marco de lectura +1.
1501	1501		SNP	R(Ga)				Muy claro. Según consed, ALEX10.ab1 es homocigoto GG.

Los campos disponibles son los siguientes:


Número: Número de la secuencia en la base de datos. Permite ordenar las secuencias por orden de introducción.

Nombre de la secuencia: Identificador único de la secuencia en la base de datos. Al hacer doble clic en el control se propone un nombre de secuencia mediante este algoritmo: "SEQ-" + Fragmento + ">"

Fragmento: Fragmento al que pertenece la secuencia. Al modificar su valor genera un nombre de secuencia automático si dicho nombre está vacío.

Incremento: Número de posiciones que hay que añadir a una posición de la secuencia para que alinee con la misma base de su secuencia de referencia. Esto implica que

aquella secuencia que sea designada como secuencia de referencia de la actual debe estar sincronizada con la secuencia de referencia. Esto es, por ejemplo, si una secuencia tiene una deleción, deberá sustituir cada base delecionada por el código de nucleótido ausente: el guion. La numeración de las bases tendrá en cuenta dicha deleción.

El formulario no permite modificar el incremento directamente para evitar errores de sincronización de la secuencia consenso con las de las muestras generadoras y con las características. Para modificar el valor del incremento se debe pulsar el botón "Modificar incremento ()" adyacente. Si fuese necesario modificar el valor de incremento únicamente, se puede desbloquear el cuadro de texto haciendo doble clic en él.

Secuencia de referencia: Secuencia con la que puede alinear la secuencia actual y que sirve de referencia. El desplazamiento entre las 2 secuencias se almacena en el campo incremento. Está pensada para incluir la secuencia consenso actual en un alineamiento más amplio. La secuencia de referencia debe estar sincronizada con la actual.

Grupo: Esta lista permite definir grupos a los que pertenece una secuencia. Una misma secuencia puede pertenecer a varios grupos. Cada grupo debería contener secuencias que estén relacionadas de alguna manera. Al hacer filtro por formulario se puede elegir aquellas secuencias que pertenecen a un mismo grupo de forma que sólo se muestren las que son de interés en un momento determinado. El cuadro desplegable permite elegir entre cada uno de los grupos definidos en la base de datos. Para definir nuevos grupos debe pulsarse el botón "[Más grupos](#)". Al pulsar en uno de los grupos se abre el formulario para "[Explorar grupos](#)" mostrando los datos del seleccionado.

Secuencia: Secuencia nucleótidos. Puede contener códigos de ambigüedad.

Comentarios: Información adicional.

Revisada: Indica que la secuencia y sus características han sido revisadas y están correctas.

Alinea con referencia: Indica si las coordenadas de la secuencia están alineadas con las de su secuencia de referencia.

Circular: Indica si la secuencia tiene topología circular. Si no está marcada indica que la topología es lineal.

Alineamiento: Dirección donde encontrar el fichero del alineamiento que genera esta secuencia consenso. Este fichero es el archivo de datos que deberá abrirse en el ordenador para consultar el alineamiento. Para que el ordenador pueda realizar esta consulta debe tener instalados los programas adecuados que permitan procesar los datos. El fichero de datos no se guarda en la base de datos, sólo se almacena el enlace a su dirección.

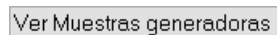
El formulario está dotado de varios controles para informar y facilitar la edición de las secuencias. Estos controles son los siguientes:



Ayuda: Muestra la ayuda específica del formulario. Este texto de ayuda es editable para que el usuario pueda mejorarlo.



Modificar incremento: Llama al formulario para [modificar incremento](#). Con él resulta fácil realizar correctamente esta complicada operación.



Ver muestras generadoras: Al pulsar este botón se carga el [formulario de edición de muestras secuenciadas](#) filtrado para que sólo muestre aquellas cuya secuencia de referencia sea la secuencia consenso actual.

>Alineadas **Ver secuencias generadoras alineadas:** Crea un informe con el que se puede extraer la lista de [secuencias generadoras alineadas](#) en un documento de texto.

Alineamiento **Alineamiento:** Llama a la consulta para "[ver el alineamiento](#)" al que pertenece la secuencia actual.

> Local **Alineamiento local:** Llama a la consulta para "[ver el alineamiento local](#)" al que pertenece la secuencia actual.

nº referencias: **Número de referencias:** Indica el número de secuencias que tienen a la actual como secuencia de referencia. Si la secuencia actual no es una secuencia de referencia se muestra 0 y el botón adjunto no pone nada. En caso de que si sea secuencia de referencia de otras, se indica el número de secuencias que tienen a la actual como secuencia de referencia y el botón adjunto cambia a "Verlas":


nº referencias: **Verlas**


Al pulsar en "[Verlas](#)" se carga la lista de secuencias que tienen a la actual como secuencia de referencia.

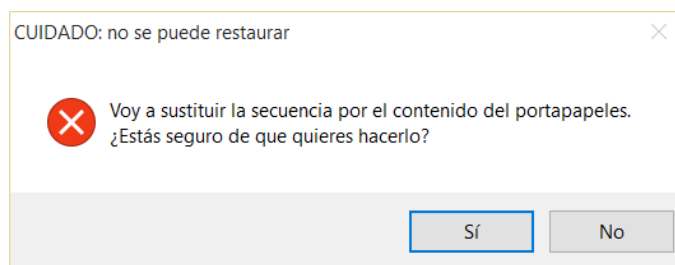
Listar Muestras Generadoras **Listar muestras generadoras:** Crea un informe con la [lista de muestras generadoras](#) para un fragmento.

+ Genotipos **Más genotipos:** Llama al [formulario de adición de genotipos](#).

+ Fragmentos **Más fragmentos:** Llama al [formulario de adición de fragmentos](#).

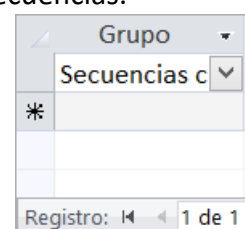
 **Copiar la secuencia:** Copia en el portapapeles todo el contenido del campo "Secuencia".

 **Pegar en la secuencia:** Sustituye el campo "Secuencia" por el contenido del portapapeles. Antes de hacerlo se asegura que el usuario no ha realizado la acción por accidente:

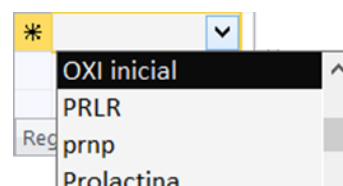


+ Grupos **Más grupos:** Llama al formulario de adición de grupos de secuencias.

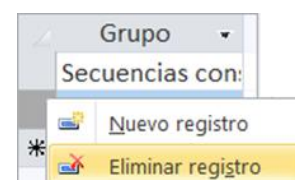
Bajo el botón grupo se encuentra el listado de grupos al que pertenece la secuencia.



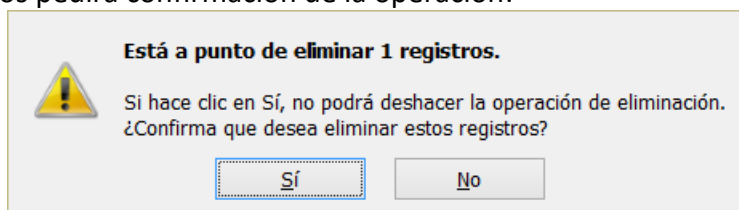
Para asignarla a un nuevo grupo basta con elegir su nombre del desplegable del último registro:



Para desagregar una secuencia de un grupo basta con seleccionar el nombre de dicho grupo en la lista y pulsar Botón derecho --> Eliminar Registro:



La base de datos pedirá confirmación de la operación:



Entre este listado y el campo "Secuencia" se encuentra el cuadro del navegador de secuencias:



Está pensado para mostrar rápidamente una sección de la secuencia actual, especialmente la posición de un SNP. Por ejemplo, si se quisiese interrogar la posición 629, habría que hacer lo siguiente:

Rellenar la posición en el cuadro de inicio:



Al pulsar el tabulador, para cambiar de cuadro, se selecciona automáticamente la misma posición en el cuadro de fin.



Como el contenido del cuadro está seleccionado, se puede introducir una nueva posición (si se deseara más de una base).

Al pulsar en "Ver", se mostrará la posición indicada de la secuencia actual en el cuadro inferior.

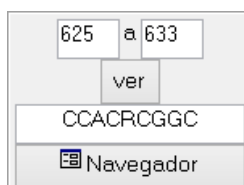


Si se hubiese elegido un rango de bases, se mostrarían las bases comprendidas entre el inicio y el fin (ambas incluidas)

Para obtener una experiencia de navegación por la secuencia mucho más completa se puede pulsar el botón **Navegador** (



). Se llamará al "[Navegador de secuencias](#)" con los datos de la secuencia actual cargados en él:




Importar características: Llama al [formulario de importación de características](#).

Dibujar: Llama al [informe de secuencia](#). Este informe contiene el código fuente de la secuencia en formato GeneBank. Si se copia en un archivo de texto o se exporta y se eliminan las líneas vacías, se puede manipular la secuencia con programas que puedan leer el formato gb (Como, por ejemplo, SnapGene, VectorNTI, Artemis).

La edición de la secuencia puede consistir en modificar nucleótidos, insertarlos o eliminarlos. Las 2 últimas operaciones implican un cambio en las coordenadas de las características que se sitúan en el punto de edición o aguas abajo. Hacer estas modificaciones a mano puede ser laborioso (dependiendo del número de características afectadas) y es muy proclive a errores. El formulario está dotado de controles para editar la secuencia de forma automatizada.

Acción: en la posición

- Insertar
- Eliminar
- Modificar

Para realizar la modificación simplemente hay que componer la frase de acción y pulsar en el botón "Hacerlo" ().

Ejemplificaremos el detalle del funcionamiento de estas acciones con el SNP en posición 646 de la secuencia del ejemplo:

TCGCTATCATCTCCCGTAACATTAGCCATTAGCAGACATAAACCTTGACCCGGCACAGCCOCTGCAAAATGAGGGGGCGCGCOGGGGGCGCAGGG
CCTGACCCCGGGGGCGCGCTGTGACCAGTCAATGCGGCTGCCCTCTTTAAGACACCGTTCCGCCACRCCGGCCCGCGGCTTAAAAAGGCCAGAC
CCGAGAGACGGCCCKAGTCCCCCGCCGGAGCCCAGCGGCTCTGCACCATGGCAGGTTCCAGCCTCGCCTGCTGCCTGCTCGGCCCTCTGGCG
MM1-06M2-06M3-06M4-06M5-06M6-06M7-06M8-06M9-06M10-06M11-06M12-06M13-06M14-06M15-06M16-06M17-06M18-06M19-06M20-06

630pb 1pb 971pb

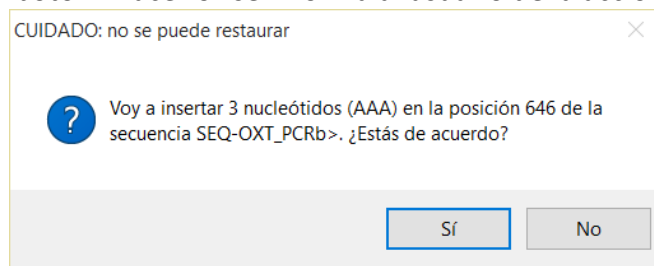
Características de la secuencia SEQ-OXT_PCRb>

Inicio	Final	Tipo	Nombre
1090	1101	Inserción	Inserción heterozigota TCCC
163	163	SNP	Y(Tc) en el macho 15
423	423	SNP	M(Ca) en el macho 15
646	646	SNP	R(GA)
686	686	SNP	K(T-) en macho 1

- **Insertión:** Debe componerse la frase Acción: Insertar NUCLEOTIDOS_A_INSERTAR en la posición POSICIÓN. Por ejemplo:

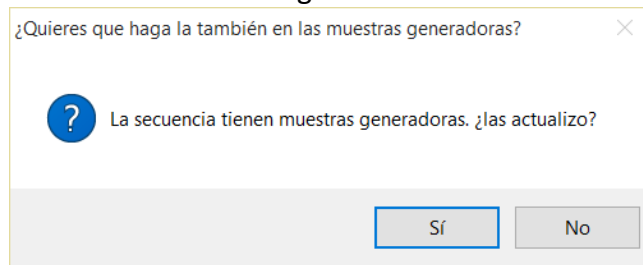
Acción: Insertar AAA en la posición 646

Al pulsar el botón "Hacerlo" se informa al usuario de la acción a realizar:

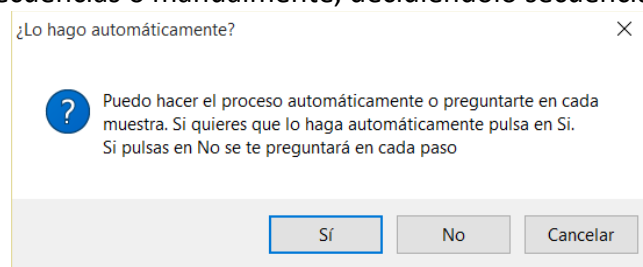


Al pulsar en "Sí" se obtiene la inserción de los 3 nucleótidos en la posición indicada.

Si la secuencia es la consenso de un alineamiento se ofrece la opción de actualizar también las secuencias generadoras de dicho alineamiento.



Al pulsar en "Aceptar" se ofrece la opción de hacerlo automáticamente en todas las secuencias o manualmente, decidiéndolo secuencia por secuencia:



Si se pulsase en "Cancelar" no se modificarían las secuencias generadoras. Al pulsar en "Sí", se realiza el proceso.

La secuencia modificada puede verse en el navegador:

CCTGACCCGCGGCGGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCACAAAACGGCCGCGGGCTTAAAGGCCA
GACCCGAGAGACGGCKCAGTCCCCGGCCCGAGCCAGCGCTCTGCACCATGGCAGGTTCCAGCCTCGCTGCTGCTCGGCTCCTG

633pb 1pb 971pb

Características de la secuencia SEQ-OXT_PCRb>:

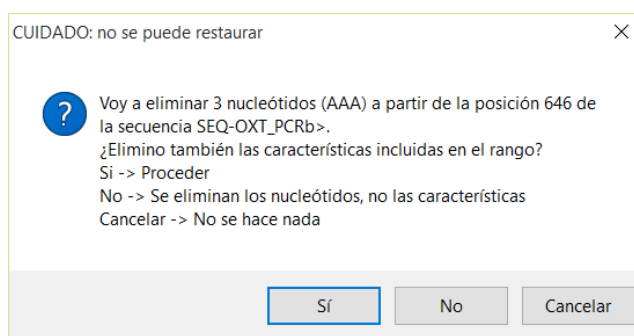
Inicio	Final	Tipo	Nombre
649	649	SNP	R(GA)
689	689	SNP	K(Tg) en macho 1
1336	1336	SNP	S(Gc)

Las características que están aguas abajo del punto de inserción se han movido 3 posiciones.

- **Eliminación:** Debe componerse la frase Acción: Eliminar NUCLEOTIDOS_A_ELIMINAR en la posición POSICIÓN. Por ejemplo:

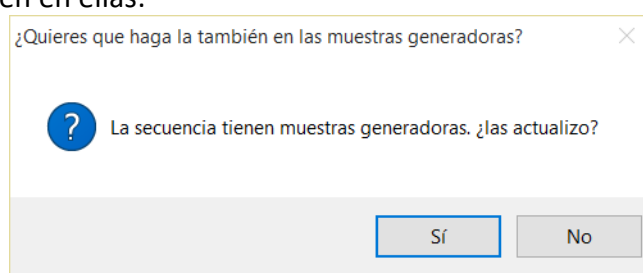
Acción: Eliminar AAA en la posición 646

Al pulsar el botón "Hacerlo" se informa al usuario de la acción a realizar:



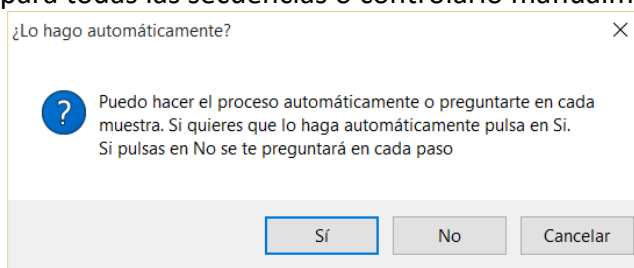
Al pulsar en "Sí" se eliminan los 3 nucleótidos. Si alguna característica estuviese incluida entre las posiciones 646 y 649 sería eliminada también. Para eliminar los nucleótidos pero mantener esta característica se puede pulsar en "No".

A continuación, si la secuencia tiene muestras generadoras, se pregunta si ejecutar la deleción en también en ellas:



Esto ocurre tanto si se ha ejecutado la deleción en la secuencia consenso como si no. De esta forma es posible eliminar regiones de las secuencias generadoras sin modificar la secuencia consenso.

En caso de responder afirmativamente, se pregunta si hacer el proceso automáticamente para todas las secuencias o controlarlo manualmente para cada una:



Como resultado, la secuencia deseada es eliminada de la consenso y/o las secuencias generadoras.

CCCA**C**RCGGCC

y las características posteriores al punto de inserción se desplazan aguas arriba.

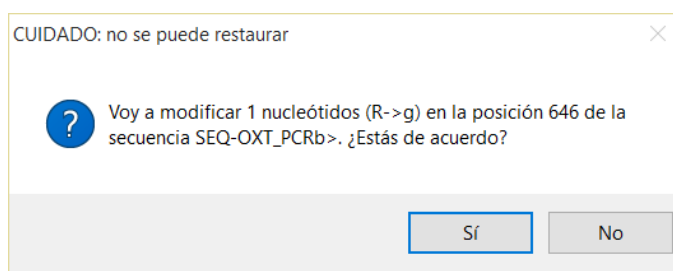
Inicio	Final	Tipo	Nombre
646	646	SNP	R(GA)
686	686	SNP	K(Tg) en macho 1
1333	1333	SNP	S(Gc)

Debe tenerse en cuenta que aquí se eliminan tantos nucleótidos como los que tenga la secuencia introducida, independientemente de si la secuencia de nucleótidos eliminada coincide con la introducida o no.

- **Modificación:** Debe componerse la frase Acción: Modificar NUEVO_NUCLEÓTIDO en la posición POSICIÓN. Por ejemplo:

Acción: Modificar en la posición

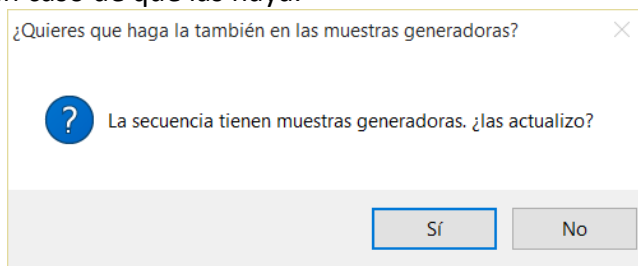
Al pulsar el botón "Hacerlo" se informa al usuario de la acción a realizar:



Al pulsar en "Sí" se modifica el nucleótido.

CCCACgCGGCC

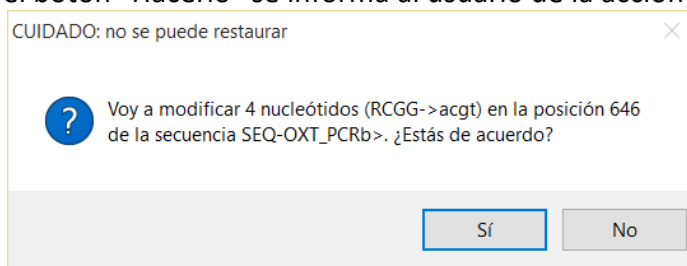
Tanto si se pulsa "Sí" como "No" se ofrece la opción de modificar las muestras generadoras, en caso de que las haya.



Esta opción también permite la modificación de un rango de nucleótidos. Por ejemplo:

Acción: Modificar en la posición ➔

Al pulsar el botón "Hacerlo" se informa al usuario de la acción a realizar:



Al pulsar en "Sí" se modifica el rango de nucleótidos.

CCCACacgtCC

Debe tenerse en cuenta que el botón modificar no cambia los límites de las características.

☐ Posición relativa **Posición relativa:** Indica que las coordenadas introducidas son relativas a la secuencia actual. Esto es, la primera base mostrada en el campo "Secuencia" es la nº 1; no se tiene en cuenta el incremento. En caso contrario, indicaría que se utilizan las coordenadas absolutas: alineadas con las de la secuencia de referencia.

Tabla de características.

Debajo de los campos que almacenan información sobre la secuencia se encuentra la tabla de características de la secuencia.

En cada línea de esta tabla se almacenan los datos principales de una de las características de la secuencia. Estos datos son los siguientes:

Nombre interno: Nombre interno del laboratorio. En algunos casos se denomina a una característica de forma coloquial en los cuadernos de laboratorio. Este campo permite recoger dicho nombre.

Inicio: Posición de la primera base afectada por la característica.

Inicio indefinido: Esta marca indica que el inicio real de la característica es anterior al inicio recogido o no se conoce.

Final: Posición de la última base afectada por la característica.

Final Indefinido: Esta marca indica que el inicio real de la característica es posterior a la posición recogida o no se conoce.

Tipo: Tipo de característica. El nombre del tipo está traducido al español.

Nombre: Nombre "oficial" de la característica.

Referencia: Referencia de la característica. Sirve para almacenar la fuente de información que permite definir esta característica como tal. Este formulario admite una referencia por característica. Está pensado, por ejemplo, para almacenar el nombre de una secuencia anotada que tenga definida la característica en secuencias homólogas a la actual.

Código NCBI de la referencia: Permite almacenar el identificador único de la secuencia de referencia en la base de datos del NCBI. Está pensado para generar un acceso rápido a aquellas referencias que son secuencias almacenadas en el NCBI. Al insertar un código se genera automáticamente un enlace a la web del NCBI en la que se muestra información sobre la secuencia de referencia. Al pinchar en el enlace se lanza el navegador con la dirección de la secuencia cargada en él.

Complementario: Indica que la característica se encuentra en la cadena complementaria. Esto es, debe leerse en dirección 3' -> 5'.

Comentario: Información adicional sobre la característica. Sirve para añadir información que no se ha recogido en los demás campos de la tabla.

8.1.6.15.1 Dibujar Secuencia

Ver código para dibujar secuencia:

Este formulario contiene el código, en formato GeneBank, de una secuencia consenso de la base de datos.

Está pensado para ser exportado a un documento de texto. El documento generado podrá ser abierto por cualquier programa que pueda manejar el formato gb.

Dado que la base de datos sólo incorpora funcionalidades básicas de dibujo de secuencias (mediante el formulario Navegador de secuencias), si se deseara obtener dibujos más detallados se puede utilizar cualquier programa que admita el formato gb (Como, por ejemplo SnapGene, VectorNTI, Artemis). Este formulario genera el código fuente necesario para que dichos programas representen gráficamente la secuencia.

Por ejemplo:

```

LOCUS      SEQ-OXT_PCRb>                1600 bp      DNA      linear
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1920
     exon            1422..1478
                     /label="OXT-E3"
                     /note="Marco de lectura +1."
     exon            1131..1331
                     /label="OXT-E2"
                     /note="Marco de lectura +1."
     exon            704..823
                     /label="OXT-E1"
                     /note="Marco de lectura +1."
     insertion_seq    1073..1084
                     /label="Inserción heterozigota TCCC"
                     /note="Inserción en machos 1 y 11. Ambos alelos se diferencian en 1"
     insertion_seq    365..366
                     /label="Inserción AG en el macho 15"

     variation        1484..1484
                     /label="R(Ga)"
                     /note="Muy claso. Según consed, ALEX10.ab1 es homocigoto GG."
     variation        1316..1316
                     /label="S(Gc)"
                     /note="Muy claso."
     variation        669..669
                     /label="K(Tg) en macho 1"

     variation        629..629
                     /label="R(GA)"
                     /note="Muy claso."
     variation        408..408
                     /label="M(Ca) en el macho 15"

     variation        148..148
                     /label="Y(Tc) en el macho 15"

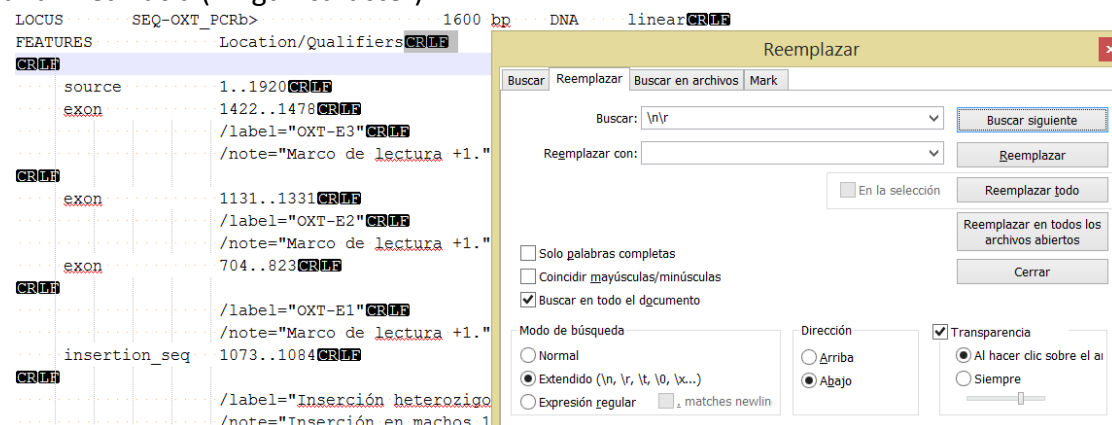
BASE COUNT   272 a   566 c   480 g   279 t
ORIGIN
1  GTAGCTGTTG TAATGCAATA GGAGGATAIC AGCCATTICA GTTTGTGACG AAGTCACAGG
61  TATGCAAAAT TCCACTGTGG TTGTGTGCTT ACCTTATAGT TGAAGGAAGG GCTGGATTTC
121  ACTTAGAAGA GAGAAATATA AATCTTTTCA TATCCAAAGG CTCTCTCCAG GTAAATGGAT
181  GTTAGGTAGG GAGAGCGGCG TGAGGTTCAC GGAATCAGA TTCAAGAGAG AGACTTGTCT
241  TCGAGAGGGG AGCTAGGGGG TGTGTGTGCT TGGCAGAGAG GGCAGATGGG GGAATCTTAA
301  ACCATCTCTT TCTGCTCTGG AGGCGCCGAG TGTTCATCCT GACCCCTCAC CCCAAGGAA
361  TGAGAGAGTC CTGCTGTGGG CCGCAGCCCC CATCTCCCTT GTCCCACCGT AGGACCCAGG
421  CCACCGCACA GGTCTCCTGC CCAAGCTGCG TTGCTTCGCC TAGCGGCGCT CGCTATCATC
481  TCCCCTAACA TTAGCCATTA GCAGACATAA CCTTGACCCG GCACAGCCCC TGCAAATGAG
541  GGGGCGCGCC GGGGCGCGAG GGCCTGACCC GCGGCGGCGC GCTGTGACCA GTCATGCGCG
601  TGCCCTCTTA AGACACCGTT CCGCCCAACR CCGCCCGCGG CTAAAGGCG CAGACCCGAG
661  AGACGGCCAC AGTCCCGCGC CCGGAGCCCA GCGCGTCTGC ACCATGGCAG GTTCCAGCCT
721  CGCTGCTGCG CTGCTCGGCT TCTTGGCGTT GACCTCCGCC TGCTACATTC AGAATCGCC
781  CTGCGGCGCC AAGCTGCG GGTCGTGCTC CAGCTGCGCG ACGGTGGGCG CCCCGCGCTC
841  GTCCCGTGGC TCTCGGGCT GGCAGCGCGC CTGCGCAGAG GTCCCGCGCG CGCGCCCTTT
901  TCCCGCGCTG ACCTGCTAC GGCCTGACCT AGCTTGGGAA TCGAGGAGAG GGAAGAGCTT
961  TTGACTGCCC TCTTCTGACC AATCTGAGC CCAAGAGAG GGGGAGAGC CGCCATCTCT
1021  CCGCGCTGCT CAGGCGCGCC TCGCCCGGCC GGTCTGAGCC CCGACCCAC AGGCTCTGCC
1081  TCCCGCGCGG GTCCCTCTCC GGCCTCGGCT CATCCCGGCC CTCCCGCCAG TGTCTCCCTT
1141  GCGCGCGCGG GGGCAAGGCG CGCTGCTTGC GGGCCAGCAT CTGCTGCGGG GACGAGCTGG
1201  GCTGCTTCTG GGGCAGCGCC GAGCGCGTGC GCTGCGGAGA GGAAGACTAC CTGCGCTGCG
1261  CTGCGCAGTC CGGCTAGAGC CCTTGCAGGA GCGGGGGCGG CTGCGCGGCC CGCGGGATCT
1321  GCTGCGAGCC GGTGAGTCT CCAGAGGGCC GAGAGCGGGC CGGGCTGCGG GAAACAGGCG
1381  GCGCGGGCCC GGTGAGTCT GACTCGGCTT CTTCTGTGCG AGACGCTGCG CACGCGGATC
1441  CCGCTGCGCA CCGCGTCCC AGCATGAGA CCGCTGCGCC CTTGAGAGCA CTGAGACAAA
1501  TCGAGACACA GCGCTCACTC CTTCTGTAAAT CATCCCGAG AATATGACA ATGAAATAAA
1561  GCGCTTTTIT CCCTCTCAAC AAGCTCTGTG TCTGAGTGTG
//

```

El informe muestra la lista de características y la secuencia de nucleótidos.

Al copiar y pegar este código en un nuevo archivo se obtiene un código fuente que puede ser representado por los programas que sean capaces de leer el formato .gb.

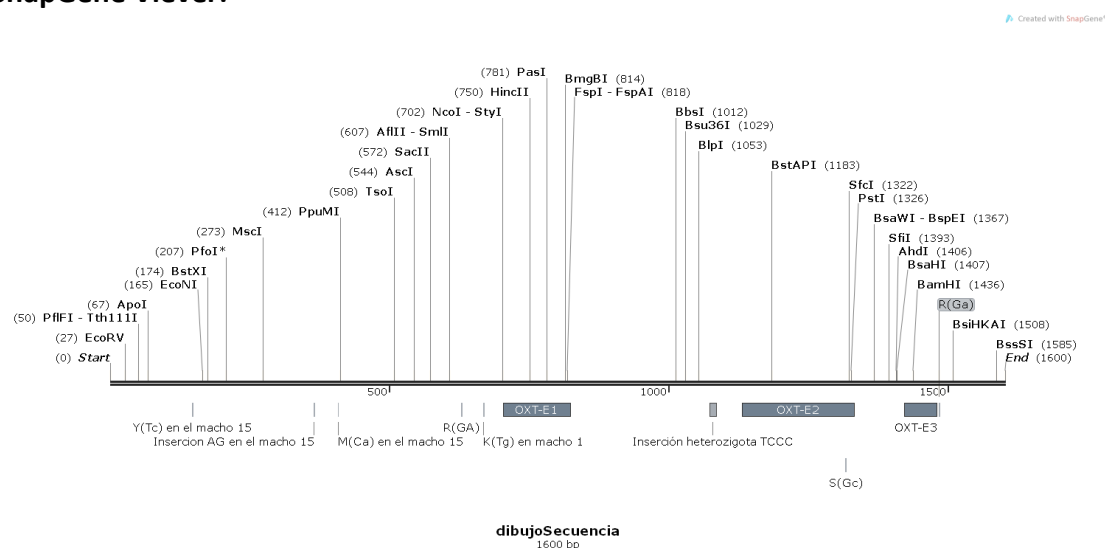
Es conveniente eliminar las líneas vacías de este archivo para incrementar la compatibilidad con los distintos programas. Por ejemplo, utilizando el editor de textos Notepad++, reemplazando los caracteres extendidos "\n\r" (en formato windows) por una línea vacía (ningún carácter):



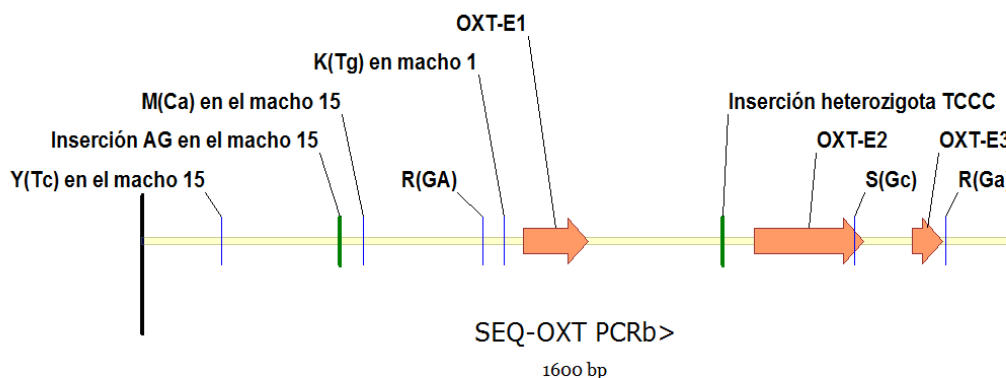
Al pulsar en Reemplazar todo se obtiene el código limpio de líneas vacías:

El archivo generado puede ser visualizado en varios programas:

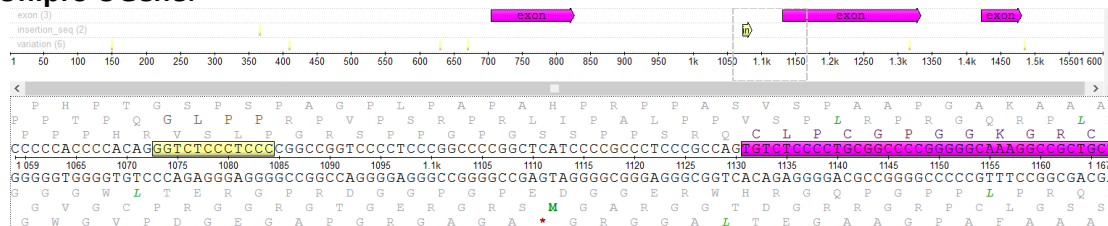
SnapGene Viewer:



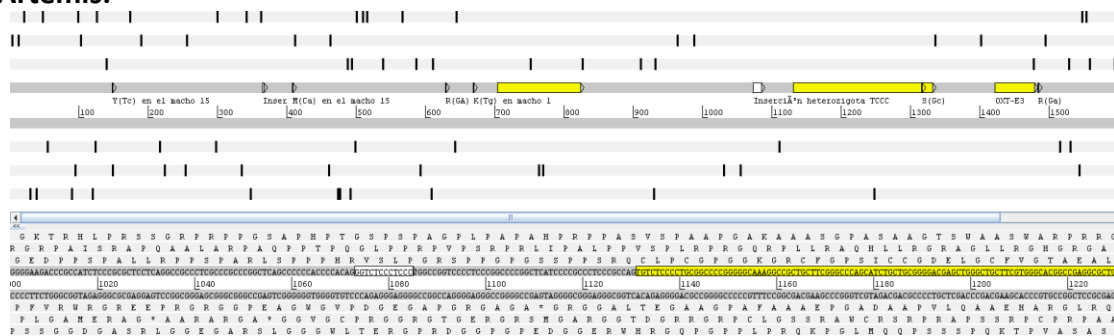
Vector NTI:



Unipro UGene:



Artemis:



Navegador de secuencias:



8.1.6.15.2 Explorar Grupos

Explorador de Grupos de secuencias:

Este es un formulario que permite consultar las secuencias de cada grupo.

Grupos de Secuencias

Ir a

Grupo

Descripción

Secuencia	Longitud	Circular	Incremento
Prolactina	9.245	<input type="checkbox"/>	0
AM161140	8.206	<input type="checkbox"/>	0
SEQ-PRL2-E3>	93	<input type="checkbox"/>	5.923
SEQ-PRL2-E4>	167	<input type="checkbox"/>	8.093
SEQ-PRL2-E2>23-01-2002	132	<input type="checkbox"/>	3.507

El contenido del formulario es:

Grupo: Nombre del grupo de secuencias.

Descripción: Descripción del criterio de agrupación de las secuencias.

La tabla de secuencias contiene estos campos:

Secuencia: Nombre de la secuencia. Al pinchar aquí muestra el formulario de "[Secuencias consenso](#)" con los datos de la secuencia.

Longitud: Longitud de la secuencia, en pb.

Circular: Indica si la secuencia es circular o no.

Incremento: Incremento de cada secuencia con respecto a su secuencia de referencia.

Además, el formulario está dotado con un cuadro desplegable "Ir a":

The image shows a web interface element. On the left, there is a dark blue button with the text 'Ir a' in white. To its right is a dropdown menu. The menu is currently open, showing two options: 'BaseDeDatosGHR' in blue text and 'DGAT' in white text on a black background. Above the dropdown is a small grey arrow pointing down, and below it is a small grey arrow pointing up.

En él se listan los grupos de secuencias almacenados en la base de datos.

Al seleccionar uno de ellos, se cargan sus datos en el formulario.

8.1.6.15.3 Importar Características

Importar características:

Este formulario permite importar características desde una secuencia a otra con la que alinea. Permite importar sólo las características de una sección de la secuencia. Es especialmente útil para importar todas las características anotadas en la secuencia de otro genotipo del mismo fragmento. También permite importar características por zonas de forma que se puede anotar una secuencia desde distintas fuentes.

The image shows a web form titled 'Importar características:'. It contains several input fields and a button. At the top, there is a label 'Nombre de secuencia de origen:' followed by a dropdown menu. Below this are three labels: 'Inicio del trozo importado', 'Final del trozo importado', and 'Incremento', each followed by a text input field. Below these fields is a paragraph of text: 'El incremento es el número de bases que hay que sumarle o, en caso de ser negativo, restarle a las coordenadas de las características de origen.' Below this text is another label 'Nombre de secuencia de destino' followed by a dropdown menu. At the bottom left is a label 'Salida' and at the bottom right is a button labeled 'Importar'. Below the 'Importar' button is a large, empty rectangular box.

Los campos necesarios son:

Nombre de la secuencia de origen: El nombre de una secuencia consenso registrada en la base de datos. Es la secuencia que dona las características.

Inicio del trozo importado: Primera base que incluye las características a importar.

Final del trozo importado: Última base que pueden cubrir las características a importar

Incremento: Diferencia en pb entre las coordenadas de las características de la secuencia donadora con respecto a la aceptora. Este valor debe conocerse previamente para no tener que editar las características una vez importadas. Suele ser útil alinear las secuencias, comprobar que no hay inserciones y deleciones en la zona a importar, buscar las coordenadas del principio de la zona importada en el navegador de secuencias y restar sus valores.

Nombre de la secuencia de destino: Es la secuencia en la que se van a insertar las características (aceptora). No puede ser la misma que la de origen.

Salida: Este es un campo en el que el programa escribe los resultados de las operaciones. El usuario no tiene que hacer nada en él.

El botón del formulario es:

Importar: Realiza el trabajo de importación. Los resultados del proceso se listarán en el campo de "Salida" del programa. Los mensajes más modernos se muestran primero.

Ejemplo de uso:

Para ejemplificar el uso del formulario suponemos que queremos insertar todas las secuencias que hay entre la base 645 y 850 de la secuencia OXT-PCR en la secuencia SEQ-OXT_PCRb>. Hemos alineado las secuencias y sabemos que en estos 196 pb no hay inserciones/deleciones. Comparando las posiciones del inicio de la zona (gccagtgtctcccc), en el navegador de secuencias, sabemos que el incremento es de 472 bases.

Con estos datos se rellena el formulario:

Nombre de secuencia de origen: OXT-PCR

Inicio del trozo importado: 654

Final del trozo importado:

Incremento:

El incremento es el número de bases que hay que sumarle o, en caso de ser negativo, restarle a las coordenadas de las características de origen.

Nombre de secuencia de destino:

Salida

Importar

Al introducir el valor del final, se informa de la longitud de la zona interrogada:

Nombre de secuencia de origen: OXT-PCR

Inicio del trozo importado: 654

Final del trozo importado: 850

Incremento:

El incremento es el número de bases que hay que sumarle o, en caso de ser negativo, restarle a las coordenadas de las características de origen.

Nombre de secuencia de destino:

Salida

Importar

196 pb.

En este caso son 196 pb. Si este no fuese el tamaño esperado deberíamos revisar las coordenadas.

Se rellenan los demás datos:

Nombre de secuencia de origen: OXT-PCR

Inicio del trozo importado: 654

Final del trozo importado: 850


Incremento: 472

El incremento es el número de bases que hay que sumarle o, en caso de ser negativo, restarle a las coordenadas de las características de origen.


Nombre de secuencia de destino: SEQ-OXT_PCRb>

Salida

Al pulsar en "Importar" se inicia el proceso. El programa informa de las características que se han encontrado:

 Voy a insertar 6 filas. Se mostrarán mensajes de confirmación para cada una. Si pulsas en cancelar estos mensajes se suprimiran. ¿Quieres ver los mensajes de confirmación?

Si se pulsa en "Aceptar" se muestra un mensaje de confirmación para cada característica a importar. De haber pulsado en "Cancelar" no se mostraría ningún mensaje de confirmación y se importarían todas las características:

 **Va a anexas 1 fila(s).**


Si hace clic en Sí, no podrá utilizar el comando Deshacer para deshacer los cambios. ¿Confirma que desea anexas las filas seleccionadas?

Si se pulsa en "No", la característica será omitida. Se pueden consultar los datos de la característica en el cuadro de "Salida".

Fila 1 a insertar = SEQ-OXT_PCRb> | 1275 | 1275 | 1292 | Cebador | | OXT_SeqF2 | | False | Primer de secuenciación UP.. Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb. | NombreInterno

¡Conexión establecida! Hay 6 características.

SELECT Características.Secuencia, Características.Inicio, Características.Final, Características.Tipo, Características.Referencia, Características.Nombre, Características.CodigoNCBIdeReferencia, Características.Comentario, Características.NombreInterno FROM Características WHERE

 **Va a anexas 1 fila(s).**

Si hace clic en Sí, no podrá utilizar el comando Deshacer para deshacer los cambios. ¿Confirma que desea anexas las filas seleccionadas?

Al acabar el proceso, el cuadro de salida muestra el log completo del proceso y el código SQL de la consulta lanzada contra la base de datos:

Fila 6 a insertar = SEQ-OXT_PCRb> | 1317 | 1317 | 1317 | Característica genérica | | Y(Gc) | | False | . Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb. | NombreInterno

...

Fila 1 a insertar = SEQ-OXT_PCRb> | 1275 | 1275 | 1292 | Cebador | | OXT_SeqF2 | | False | Primer de secuenciación UP.. Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb. | NombreInterno

¡Conexión establecida! Hay 6 características.

SELECT Características.Secuencia, Características.Inicio, Características.Final, Características.Tipo, Características.Referencia, Características.Nombre, Características.CodigoNCBIdeReferencia, Características.Comentario, Características.NombreInterno FROM Características WHERE

```
((Características.Secuencia)='OXT-PCR') AND ((Características.Inicio)>=654 ) AND ((Características.Final)<=850));
```

Como resultado, las nuevas características aparecen en la tabla de la secuencia de destino (En la imagen se muestran sombreadas en azul):

Inicio	Final	Tipo	Nombre	Referencia	CódigoNCBI	Complementario	Comentario
145	145	SNP	Y(Tc) en el macho 15				
408	408	SNP	M(Ca) en el macho 15				
365	366	Inserción	Inserción AG en el macho 15				
629	629	SNP	R(GA)				Muy claro.
669	669	SNP	K(Tg) en macho 1				
704	823	Exón	OXT-E1	Sheep gene fo	255131.1		Marco de lectura +1.
1073	1084	Inserción	Inserción heterocigota TOCC				Inserción en machos 1 y 11. Ambos alelos se diferencian en la posesión de 2 repeticiones TOCC
1131	1331	Exón	OXT-E2				Marco de lectura +1.
1316	1316	SNP	S(Gc)				Muy claro.
1422	1478	Exón	OXT-E3				Marco de lectura +1.
1484	1484	SNP	R(Ga)				Muy claro. Según consed, ALEX10ab1 es homocigoto GG.
1275	1292	Cebador	OXT_SeqF2				Primer de secuenciación UP. Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb.
1176	1176	Variación	R(Ag)				Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb.
1246	1246	SNP	Mutante W (A o T)				Mutante W del M13 cambia el aa N por I. Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb.
1237	1237	SNP	Mutante R (A o G)				Mutante R del M13. Cambia aa de R a G. Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb.
1316	1316	SNP	Heterocigoto S (G o C)				Heterocigoto S (G o C) No provoca cambio de aa. Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb.
1317	1317	Característica gen.	Y(Gc)				Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb.

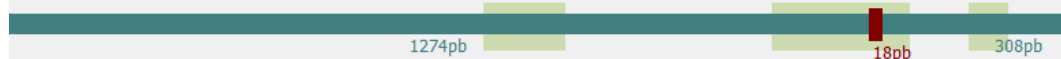
A cada nueva característica se le ha añadido un comentario para indicar que ha sido importada:

. Importado de OXT-PCR con un incremento de 472pb.

En el navegador de secuencias se puede comprobar la correspondencia entre las características:

Por ejemplo, El cebador OXT_SeqF2 en la secuencia de destino:

GCAAAGGCCGCTGCTTCGGGCCCAGCATCTGCTGCGGGGACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCACGGCCGAGGCGCTGCGCTGCCGAGAGGAGAACT
ACCTGCCGCTGCCCTGCCAGTCCGGC**CAGAAGCCCTGCGGGAGC**GGGGGCGCTGCGCGCCGCCGGGATCTGCTGCAGCCCGGGTGAGTCCG



Características de la secuencia SEQ-OXT_PCRb>:

1317	1317	Característica genérica	Y(Gc)
1275	1292	Cebador	OXT_SeqF2

tiene la misma secuencia de nucleótidos que el mismo cebador en la secuencia donadora:

ccccgggggcaaaggccgctgcttcgggcccagcatctgctgcggggacgagctgggctgcttcgtgggcacggccgagggcgctgcgctgccgaga
ggagaactaacctgcgctgcgcctgccagtcgggc**cagaagccctgcgggagc**gggggcgctgcgccgcccgggatctgctgcagcccggg



Características de la secuencia OXT-PCR:

803	820	Cebador	OXT_SeqF2
-----	-----	---------	-----------

Control de errores:

Si **faltan datos** por rellenar:

El formulario informa al usuario:

Nombre de secuencia de origen: OXT-PCR

Inicio del trozo importado

Final del trozo importado

Incremento

El incremento es el número de bases que hay que sumarle o, en caso de ser negativo, restarle a las coordenadas de las características de origen.

Nombre de secuencia de destino SEQ-OXT_PCRb>

Salida

Importar

Al pulsar en "Cancelar", se informa al usuario:

? No has rellenado adecuadamente los campos.
¿Estás seguro de que quieres continuar?

Aceptar

Cancelar

Al pulsar en "Cancelar", se informa al usuario:

Nombre de secuencia de origen: OXT-PCR

Inicio del trozo importado

Final del trozo importado

Incremento

El incremento es el número de bases que hay que sumarle o, en caso de ser negativo, restarle a las coordenadas de las características de origen.

Nombre de secuencia de destino: SEQ-OXT_PCRb>

Salida **Importar**

Cancelado por el usuario

Si las 2 secuencias son la misma el botón "Importar" no funciona y avisa al usuario:

Nombre de secuencia de origen: OXT-PCR

Inicio del trozo importado

Final del trozo importado

Incremento

El incremento es el número de bases que hay que sumarle o, en caso de ser negativo, restarle a las coordenadas de las características de origen.

Nombre de secuencia de destino: OXT-PCR

Salida **Importar**

Las secuencias de origen y destino son iguales. Cancelado.

8.1.6.15.4 Listar Muestras Generadoras

Listado de muestras generadoras:

Este informe presenta información sobre las muestras que generan la secuencia consenso desde la que se le llama:

Muestras de SEQ-OXT_PCRb>

muestreos, 29 de octubre de 2014 13:45:45

Nombre de secuencia consenso	Nombre de la muestra	Día	Nombre en el almacenamiento
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACH01-PCRb-DN
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACH01-PCRb-UP
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACH01-SEQF1-MAL
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACH01-SEQR1
SEQ-OXT_PCRb>		10/09/2009	OXTMACH01-SEQR2
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACH02-PCRb-DN
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACH02-PCRb-UP
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACH02-SEQF1
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXT-macho9-UP
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXT-mach011-DN
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXT-MACH011-SEQR1
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXT-mach011-UP
SEQ-OXT_PCRb>		07/09/2009	OXT-mach012-DN
SEQ-OXT_PCRb>		07/09/2009	OXT-mach012-UP
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACH015-PCRb-DN

Página 1 de 2

En detalle, el contenido del informe es el siguiente:



Muestras de SEQ-OXT_PCRb>

miércoles, 29 de octubre de 2014

18:46:45

Nombre de secuencia consenso	Nombre de la muestra	Día	Nombre en el alineamiento
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACHO1-PCRb-DN
SEQ-OXT_PCRb>		09/09/2009	OXTMACHO1-PCRb-UP

Página 1 de 2

En la cabecera del informe se recoge el nombre de la secuencia consenso, así como la fecha y hora de impresión del informe.

La tabla de datos está compuesta por 4 campos:

Nombre de la secuencia consenso: Nombre de la secuencia consenso en la base de datos.

Nombre de la muestra: Nombre del animal del que se ha obtenido la muestra.

Día: Día en que se realizó la secuenciación.

Nombre en el alineamiento: Nombre que tiene la muestra en el alineamiento de la base de datos.

8.1.6.15.5 Más Grupos

Más grupos:

Este formulario permite listar y añadir grupos de secuencias.

Un grupo de secuencias es un conjunto de secuencias consenso que tienen una característica común. Por ejemplo, todas las secuencias utilizadas para realizar un paseo cromosómico podrían agruparse en un mismo grupo llamado "paseo 1".

Cada secuencia consenso puede pertenecer a cualquier número de grupos distintos.

El formulario muestra la lista de todos los grupos registrados.

Para añadir uno nuevo basta con rellenar el campo final (indicado por una punta de flecha).

Grupos de Secuencias	
Grupo	Descripción
Internet	Secuencias descargadas de Internet.
OXI inicial	Grupo de la base de datos del Vector NTI. Separador: OXI.
PRLR	Grupo de la base de datos del Vector NTI.
prnp	Grupo de la base de datos del Vector NTI. Separador: OtrasSecuen
Prolactina	Grupo de la base de datos del Vector NTI. Separador: PRL.
Referencia	Secuencias de referencia de otras secuencias. Varias secuencias co
SecuenciacionesGH	Grupo de la base de datos del Vector NTI. Separador: GH.
Secuencias consenso.	Se generan como secuencia consenso de un alineamiento.

Los campos disponibles son los siguientes:

Grupo: Nombre del grupo en la base de datos. A pulsar en él se abre el formulario para "[Explorar Grupos](#)" con los datos del seleccionado.

Descripción: Indica la característica común que tienen las secuencias que pertenecen a este grupo.

8.1.6.15.6 Modificar Incremento

Modificar Incremento:

Este formulario ayuda al usuario a modificar el incremento de las secuencias consenso. Este valor estará sincronizado también con las características y con las muestras generadoras. Se modificarán los incrementos en las 3 tablas a la vez.

Este formulario permite modificar el incremento de todas las muestras de un alineamiento. Para ello rellena la secuencia que vas a modificar y el incremento.

El incremento es el número de bases que se le sumarán a las coordenadas actuales. Si es negativo, se restarán.

Nombre de secuencia: ▼

Incremento:

Salida

Para ejecutar la modificación basta con elegir el nombre de la secuencia consenso y el número de bases en que se incrementarán sus coordenadas.

Pulsando el “Modificar” se iniciará el proceso.

Por ejemplo, aumentar el incremento de la muestra SEQ-OXT PCRb> en 10 bases:

El incremento de la secuencia inicial es 0. Estos son los datos de la secuencia y de las características:

Número de secuencia: **SEQOUT_PCRB** [?] n° muestras generadoras: **38** Longitud: **1680**
 Fragmento: **OxT_PCRB** Incremento: **0** Ver Muestras generadoras xAlineadas x Genotipos

Número **65** Grupos x Secuencias de Referencia x Listar Muestras Generadoras x Fragmentos

Grupo x a ver

* Navegador

Registro: **H** 1 de 1 Comentarios El alineamiento de las secuencias traducidas de los exones produce 2 diferencias con respecto a la secuencia aminoácida almacenada en la

Alineamiento Acción Insertar + en la posición x Características Importar características Dibujar Revisado ✓

Duplicata Tempore/homologación/Integrado/OxT/Vetodo/OxT.Law

Nombre/Término	Inici	Final	Tipo	Nombre	Referencia	Código NCBI	Complementario
	146	149	SNP	(M)ca en el macho 15			
	408	408	SNP	(M)Ca en el macho 15			
	365	368	Insertión	Insertion AG en el macho 15			
	629	629	SNP	R(GA)			Muy claro.
	669	669	SNP	K(TP) en macho 1			
	704	703	Exón	OX-T-E1			
	1073	1084	Insertión	Insertion heterozigoto TOCG	Sheep gene fo: x51311 .		Marco de lectura
	1131	1331	Exón	OX-T-E2			Marco de lectura
	1316	1316	SNP	S(GC)			Muy claro.
	1422	1478	Exón	OX-T-E3			Marco de lectura
	1484	1484	SNP	R(GA)			Muy claro. Se

Se puede consultar el incremento de las secuencias generadoras:

 Muestras de SEQ-OUT_PCRb>		Resumen		
Nombre de secuencia consenso		Nombre de la muestra		Da
Nombre en el alineamiento		Incremento		
SEQ-OUT_PCRb>	B101030	09/08/2009	OTXMACHO1_PCRb-DN	1075
SEQ-OUT_PCRb>	B101030	09/08/2009	OTXMACHO1_PCRb-UP	87
SEQ-OUT_PCRb>	B101030	09/08/2009	OTXMACHO1_SEQ1-MAL	967
SEQ-OUT_PCRb>	B101030	09/08/2009	OTXMACHO1_SEQ1	2
SEQ-OUT_PCRb>	B101030	10/08/2009	OTXMACHO1_SEQ2	2
SEQ-OUT_PCRb>	B1010402	09/08/2009	OTXMACHO2_PCRb-DN	846
SEQ-OUT_PCRb>	B1010402	09/08/2009	OTXMACHO2_PCRb-UP	846
SEQ-OUT_PCRb>	B1010402	09/08/2009	OTXMACHO2_SEQ1	923
SEQ-OUT_PCRb>	B1010402	09/08/2009	OTXMACHO2_SEQ1	310
SEQ-OUT_PCRb>	B1010402	10/08/2009	OTXMACHO2_SEQ2	0
SEQ-OUT_PCRb>	B1010408	09/08/2009	OXT-mach08-DN	826
SEQ-OUT_PCRb>	B1010408	09/08/2009	OXT-MACH08_SEQ1	923
SEQ-OUT_PCRb>	B1010408	09/08/2009	OXT-MACH08_SEQ1	477
SEQ-OUT_PCRb>	B1010408	09/08/2009	OXT-mach08-UP	581
SEQ-OUT_PCRb>	GE10117	09/08/2009	OXT-MACH04_PCRb-UP	518
SEQ-OUT_PCRb>	GE10117	09/08/2009	OTXMACHO4_PCRb-UP	923
SEQ-OUT_PCRb>	GE10117	09/08/2009	OXT-MACH04_SEQ1	33
SEQ-OUT_PCRb>	GE10117	09/08/2009	OTXMACHO4_SEQ1	493
SEQ-OUT_PCRb>	GE10117	09/08/2009	OXT-MACH04_SEQ1	928
SEQ-OUT_PCRb>	GE10117	09/08/2009	OXT-mach04-UP	525
SEQ-OUT_PCRb>	GE10214	09/08/2009	OXT-MACH05_PCRb-UP	518
SEQ-OUT_PCRb>	GE10214	09/08/2009	OXT-MACH05_SEQ1	926
SEQ-OUT_PCRb>	GE10214	09/08/2009	OXT-MACH05_SEQ1	859
SEQ-OUT_PCRb>	GE10214	09/08/2009	OXT-mach05-UP	518
SEQ-OUT_PCRb>	GE10802	07/08/2009	OXT-mach08-DN	826
SEQ-OUT_PCRb>	GE10802	07/08/2009	OXT-mach08-UP	817
SEQ-OUT_PCRb>	GE10803	09/08/2009	OXT-MACH09_SEQ1	923
SEQ-OUT_PCRb>	GE10803	09/08/2009	OXT-MACH09_SEQ1	482
SEQ-OUT_PCRb>	GE10803	09/08/2009	OXT-mach09-UP	518
SEQ-OUT_PCRb>	J101429	09/08/2009	OXT-mach011-DN	1075
SEQ-OUT_PCRb>	J101429	09/08/2009	OXT-MACH011_SEQ1	923
SEQ-OUT_PCRb>	J101429	09/08/2009	OXT-mach011-UP	585
SEQ-OUT_PCRb>	P102119	07/08/2009	OXT-mach012-DN	818
SEQ-OUT_PCRb>	P102119	07/08/2009	OXT-mach012-UP	518
SEQ-OUT_PCRb>	V310303	09/08/2009	OTXMACHO15_PCRb-DN	808

Para hacer la modificación se llama al formulario y se elige la secuencia:

Este formulario permite modificar el incremento de todas las muestras de un alineamiento. Para ello rellena la secuencia que vas a modificar y el incremento.

El incremento es el número de bases que se le sumarán a las coordenadas actuales. Si es negativo, se restarán.

Nombre de secuencia:

Incremento:

Salida

Nombre de secuencia	Número	Incremento
SEQ-OXT_PCRb>	65	
SEQ-GHR-E5>Consenso23-7-04	64	2220
SEQ-GHR-E4>Consenso23-7-04	63	1597
SEQ-PRL-E1>Consenso11-07-01	62	641
SEQ-PRL-E5.2>Consenso1-2-02	61	9026

El cuadro desplegable muestra datos de las secuencias: Nombre, Número de identificación en la base de datos e Incremento. Se introduce el número de bases que se desea que se modifique el incremento.

Este formulario permite modificar el incremento de todas las muestras de un alineamiento. Para ello rellena la secuencia que vas a modificar y el incremento.

El incremento es el número de bases que se le sumarán a las coordenadas actuales. Si es negativo, se restarán.


Nombre de secuencia:

Incremento:

Salida

Al pulsar en "Modificar", se realiza el proceso. En primer lugar se pide al usuario confirmación de la acción:

Cuidado: acción (casi) irreversible

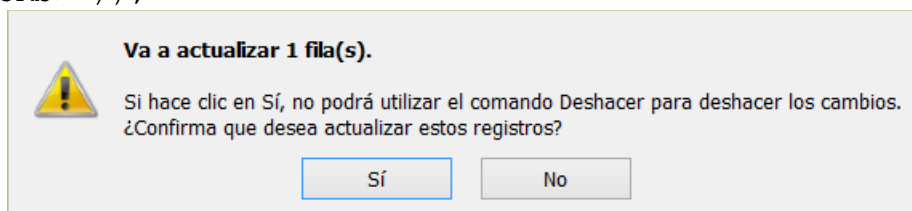


¿Estás seguro de que quieres actualizar la secuencia 'SEQ-OXT_PCRb>' incrementado 10 bases las coordenadas de sus muestras generadoras y de sus características?
El incremento general actual es 0 el nuevo incremento será 10.

Si se pulsa en "No" aparecerá el mensaje "Has decidido cancelar la actualización" en el cuadro de salida. Si se pulsa en "Si" se lanzan las consultas adecuadas para realizar los cambios. Se ofrece al usuario la posibilidad de cancelar cada una de ellas por separado. Lo normal sería que no se cancelase ninguna o, de hacerlo, cancelarlas todas. En caso contrario podrían producirse des-alineamientos.

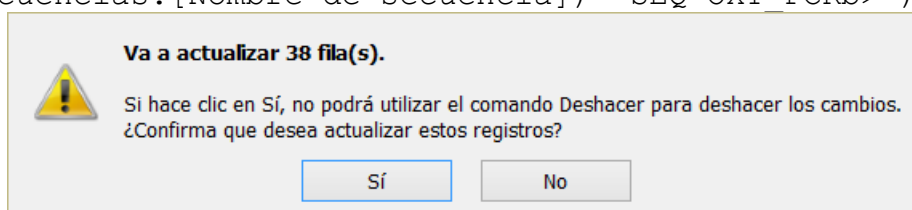
Pasol: Actualización de la secuencia...

```
UPDATE Secuencias SET Secuencias.IncrementoGeneral = 10
WHERE (((Secuencias.[Nombre de secuencia])='SEQ-
OXT_PCRb>'));
```



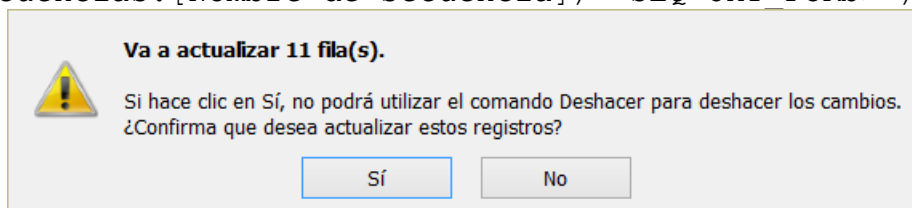
Paso2: Actualización de las muestras generadoras...

```
UPDATE Secuencias INNER JOIN [Muestras secuenciadas] ON
Secuencias.[Nombre de secuencia] = [Muestras
secuenciadas].[Secuencia de referéncia] SET [Muestras
secuenciadas].Incremento = [Incremento]+ 10 WHERE
(((Secuencias.[Nombre de secuencia])='SEQ-OXT_PCRb>'));
```



Paso3: Actualización de las características...

```
UPDATE Secuencias INNER JOIN Características ON
Secuencias.[Nombre de secuencia] =
Características.Secuencia SET Características.Inicio =
[Inicio]+ 10, Características.Final = [Final]+ 10 WHERE
(((Secuencias.[Nombre de secuencia])='SEQ-OXT_PCRb>'));
```



El proceso queda registrado en el cuadro de salida.

Realizado correctamente:

Paso3: Actualización de las características...

```
UPDATE Secuencias INNER JOIN Características ON
Secuencias.[Nombre de secuencia] =
Características.Secuencia SET Características.Inicio =
[Inicio]+ 10, Características.Final = [Final]+ 10 WHERE
(((Secuencias.[Nombre de secuencia])='SEQ-OXT_PCRb>'));
```

Paso2: Actualización de las muestras generadoras...

```
UPDATE Secuencias INNER JOIN [Muestras secuenciadas] ON
Secuencias.[Nombre de secuencia] = [Muestras
secuenciadas].[Secuencia de referéncia] SET [Muestras
secuenciadas].Incremento = [Incremento]+ 10 WHERE
(((Secuencias.[Nombre de secuencia])='SEQ-OXT_PCRb>'));
```

Paso1: Actualización de la secuencia...

```
UPDATE Secuencias SET Secuencias.IncrementoGeneral = 10
WHERE (((Secuencias.[Nombre de secuencia])='SEQ-
OXT_PCRb>'));
```

Como resultado, la secuencia, las muestras generadoras y las características han incrementado sus coordenadas en 10 bases.

Nombre de secuencia SEQ-OXT_PCRb ? n° muestras generadoras: 38 Longitud Incremento: 1600 10 Ver Muestras generadoras >Alineadas > Genotipos

Número Fragmento OXT_PCRb ? Secuencia de referencia ? Listar Muestras > Fragmentos

85

Grupos

Secuencias cl

Sequencia

OTACGTCTTTATATGCAATGAGAGGATATCAGCGATTCAGCTTTGTGAGAGAGTCACAGAGTATCCAAATTCCTCACTGTGGTTTGGCTACTCTATATGAGAGAAAGGCTGGATTTCCTTACCTATGAGAGAGAAATATAATCTTTTCATATCATCAGAGGCTCTCCCTCAAGTAAATGATGTTGGTGTAGAGGAGCGGGCTGGGGTTCACAGAAATCAGTTTCATGAGAGAGTCTGCTTCAGAGGGAGCATAGGGGGTGTGTGTGGTTGGCAGAGAGCAATGGGAGAGCTTAAACCAATCTCTCTGGCCCTGGAGGGGCCCGAGTCTTCATCTGACGCCCTCACCCCAAGAGGATGAGAGAGTCTCTGGTTGGGGCGACGCCCTACTGCTCTCCACACCTGAGAGCGACAGAGAGCTCTCTGCGCAGAGCTGCTCTCCCTCTAGGGGGCTGCTCTATCATCTCCGAAATGATCATTTAGAGCATTTAGCATTCAGATACCTTACACCCCGACACCGCTCCGAAATGAGGGGGCCGCGCGGGCCGAGGGCTGACCCCGGGCGGCGCTGACCCCGAGCATCAEstán alineados tanto en consed como en staden.

En los alineamientos también se incorporan las secuencias generadoras de OXT_PCRa (BD.2)

Comentarios

El alineamiento de las secuencias traducidas de los exones produce 2 diferencias con respecto a la secuencia enmascarada.

Alineamiento Acción Insertar ver en la posición Características Importar características Dibujar Revisado

D:\compant\tempore\Windows\integrated\OXT\staden\OXT.0.aux

Nombre	Interno	Inicié	Final	Tipo	Nombre	Referencia	CódigoNCBI	Complemento
	158	158	158	SNP	Y(Tc) en el macho 15			
	418	418	418	SNP	M(Ca) en el macho 15			
	375	376	376	Inserción	Inserción AG en el macho 15			
	639	639	639	SNP	R(GA)			
	679	679	679	SNP	K(Tg) en macho 1			
	714	833	833	Exón	OXT-E1	Sheep gene fo: X55131.1		
	1083	1084	1084	Inserción	Inserción heterozigota TCCC			
	1141	1141	1141	Exón	OXT-E2			
	1326	1326	1326	SNP	S(Gc)			
	1432	1432	1432	Exón	OXT-E3			
	1464	1464	1464	SNP	R(n/a)			

Registro: 4 1 de 11

Muestras de SEQ-OXT_PCRb>		viernes, 7 de noviembre de 2014 19:45:08		
Nombre de secuencia consenso	Nombre de la muestra	Da	Nombre en el alineamiento	Incremento
SEQ-OXT_PCRb>	BR10330	09/09/2008	OXTMACH01_PCRb-DN	1085
SEQ-OXT_PCRb>	BR10330	09/09/2008	OXTMACH01_PCRb-UP	47
SEQ-OXT_PCRb>	BR10330	09/09/2008	OXTMACH01-SEQF1-MAL	967
SEQ-OXT_PCRb>	BR10330	09/09/2008	OXTMACH01-SEQR1	493
SEQ-OXT_PCRb>	BR10330	10/09/2008	OXTMACH01-SEQR2	12
SEQ-OXT_PCRb>	BR10432	09/09/2008	OXTMACH02_PCRb-DN	858
SEQ-OXT_PCRb>	BR10432	09/09/2008	OXTMACH02_PCRb-UP	45
SEQ-OXT_PCRb>	BR10432	09/09/2008	OXTMACH02-SEQF1	983
SEQ-OXT_PCRb>	BR10432	09/09/2008	OXTMACH02-SEQR1	320
SEQ-OXT_PCRb>	BR10432	10/09/2008	OXTMACH02-SEQR2	10
SEQ-OXT_PCRb>	BR10448	09/09/2008	OXT-mach03-DN	836
SEQ-OXT_PCRb>	BR10448	09/09/2008	OXT-MACH03-SEQF1	983
SEQ-OXT_PCRb>	BR10448	09/09/2008	OXT-MACH03-SEQR1	487
SEQ-OXT_PCRb>	BR10448	09/09/2008	OXT-mach03-UP	541
SEQ-OXT_PCRb>	GE10117	09/09/2008	OXT-MACH04_PCRa-UP	528
SEQ-OXT_PCRb>	GE10117	09/09/2008	OXTMACH04_PCRb-UP	45
SEQ-OXT_PCRb>	GE10117	09/09/2008	OXT-MACH04-SEQF1	983
SEQ-OXT_PCRb>	GE10117	09/09/2008	OXTMACH04-SEQR1	983
SEQ-OXT_PCRb>	GE10117	09/09/2008	OXT-MACH04-SEQR1	498
SEQ-OXT_PCRb>	GE10117	09/09/2008	OXT-mach04-UP	335
SEQ-OXT_PCRb>	GE10214	09/09/2008	OXT-MACH05_PCRa-UP	528
SEQ-OXT_PCRb>	GE10214	09/09/2008	OXT-MACH05-SEQF1	986
SEQ-OXT_PCRb>	GE10214	09/09/2008	OXT-MACH05-SEQR1	487
SEQ-OXT_PCRb>	GE10214	09/09/2008	OXT-mach05-UP	529
SEQ-OXT_PCRb>	GE10382	07/09/2008	OXT-mach08-DN	836
SEQ-OXT_PCRb>	GE10382	07/09/2008	OXT-mach08-UP	527
SEQ-OXT_PCRb>	GE10383	09/09/2008	OXT-MACH09-SEQF1	983
SEQ-OXT_PCRb>	GE10383	09/09/2008	OXT-MACH09-SEQR1	492
SEQ-OXT_PCRb>	GE10383	09/09/2008	OXT-mach09-UP	528
SEQ-OXT_PCRb>	IJ10429	09/09/2008	OXT-mach011-DN	1085
SEQ-OXT_PCRb>	IJ10429	09/09/2008	OXT-MACH011-SEQR1	489
SEQ-OXT_PCRb>	IJ10429	09/09/2008	OXT-mach011-UP	545
SEQ-OXT_PCRb>	P110219	07/09/2008	OXT-mach012-DN	836
SEQ-OXT_PCRb>	P110219	07/09/2008	OXT-mach012-UP	523
SEQ-OXT_PCRb>	VS10303	09/09/2008	OXTMACH015_PCRb-DN	818

Control de errores:

Si se produjese algún error durante el crítico proceso de actualización, se mostraría un mensaje de aviso muy llamativo:

ERROR! en medio de la actualización de datos, la base de datos puede haber quedado inconsistente: 2185: No se puede hacer referencia a una propiedad o a un método para un control a menos que el control tenga el enfoque.

Este mensaje está compuesto por una explicación, el número de error y la descripción del error que envía el sistema. El error del ejemplo ha sido forzado para poder ilustrar el sistema de captura de errores. En un error real tanto el número como la descripción del error serán distintos.

En el menú “Datos” de Access está disponible una utilidad para exportar un informe a .rtf:



Word

Exportar el objeto seleccionado a texto enriquecido

El archivo generado se abre en Word:

~~-Eliminar-~~ **AlineamientoDeMuestrasSecuenciadas**

Composición del nombre: >Muestra:Clave Secuenciación:Clon:Orientación:Incremento:Nombre:Día Secuenciación

OXT_PCRb

--Eliminar--

```
> SEQ-OXT PCRb>
```


GTAGCTGTTGTAATGCAATAAAGGATATCAGCCATTCTCAGTTTGTGACGAAGTACAGGTAATTGCAAAATCCACTGTGGTTTGTGTCCTACCTTATAGTTGTAAGGAAGAAAGCTGGATTTCATCTTAGAAGAGAGAAATAAATCTTTTCATATCCAAGAGGCCTCTCCAGAGTAAATGATGATTTGGTGTAGGAGACCGGGCTGGGTTCCAGAAATCAGATTTCAGGAAGACGATGCTGCTGAGGGGAGTACGGGGGTGTGTGTGGTGTGGCCAAAGAGGCGACATGGGGAGCTCTAAACCAATCTCTTCTCGCTGGAGGGGCCGAGTGTTCATCCTGACCCCTACCCCAAAGGAATGAGAGAGCTCTCGTTGGGCGCAGCCCCATCTCTTCTCGCCAGTAGGACCGAGCCAGCCGACAGGCTCTGTCGCCAGAGTGCTGTTGCTTCCCTAGCGGGCTCGCTATCATCTCCCGTAACATTAGCCATTAGACAGACAATCCTTGACCCGGCACAGCCCTCGAAATGAGGGGGCGCGCGGGGCGCAGGGCTGACCCCGCGCGCGCGCTGCTGACCAATCATCGCGCTGCCCTCTAAGACAGCGTTTCGCCCGCAGCGGCGCGCGGGCTTAAAGAGCCAGACCCGAGAGCGGCTCAGTCCCGCGCCGAGGCCACGCGGTCTGCAACCATGGCAGGTTCCAGCCTCGCTGCTGCTCGGCTCCTGGCGTTGACCTCCGCTGCTACATTGAGAACTGCCCCCTGGGGGGAAGGCTGCGGTGTGTCGACCTCGAGCTGCGGCACGGTGTAGCGCCCGCCCTCGTCCGCTGGCTCTCGGGGCTGGCAGCCGCTGTCACCAAGGTCGCGCCCGCCGCCCTTTCCGCGCTGACCGCTGACCGGCTACCGGCCCACTAGCCTGGGAATCAGAGGACGGAGAGACCTTTTGACTCGCCTCCTTCGACCAATCTTGAGCCGCAAAAGAGACGGGGAGACCCGCACTCTCCGCGCTCTCCAGGCGCCCTCGCCCGCGCGCTGACGCCCCCAACCCCAAGGCTCTCCTCCCGGCGGCTCCCTCCGCGCCCGGCTCATCCGCGCCCTCCCGCAGTGTCTCCCTCGCGGCCCGGGGCAAGGCGCGTCTGCTCGGGCCAGCATCTGCTGCGGGAGACGCTGGGCTGCTTCTGTGGCAGCGCGAGGCGCTCGCTGCGGAGGAGAACTACGCTCGCTCGCTCGCAGTCCGGCAGAGCCCTGCGGGAGCGGGGCGCTGCGCGCGCGGGAGTCTGCTGACGCGCGGTGAGTCGCGGAGGGCGAGACGGGCGGGGCTCGGAAACAGCGCGCGCGGCGGCGGTGGCGCCTGACTCGGCGTCTCTGCTGTGCAGACGGCTGCCACGCGGATCCGCGGCTGCGACGGCTGAGGCCGCTCTCTCCGAGCACTGAGACCGRCGCGGCCGCTGACACCATCGGAGCAGCCCTCACTCCTCTGTAATCATCCCGAGGAATTATGACAAATGAAATAAAGCCTTTTTCCTCCCTCAACAAGCCTCGTGTCTGAGTGA

*<p>

> 3197 : 1097 : : DN : 2 : BR10330 : 10/09/09-6

AGCTGTTGTAATGCAATAGGAGGATATCAGCCATTTCAGTTTGTGACGAGTACACAGGTATTGCACAAATCCACTGTGGTCTTTTGCGCTACCTTTATA
GTGGAAGGAAAGGCTTCAGTTTCCATTTAGAAGAGAGAAATAAAATCTTTTCATATCCAAAGAGCCCTCTCCAGGTAAATGGATGTGGTGTAGGGAG
CCGGGCTGGGGTTCAGGAATACGATTTTCAGGAAGAGACTTGTCTGCAGAGGGAGCATAGGGGGTGTGTGTGGTGGCCAGAGGGCAGATGGG
GGAGTCTTAAACCAATCTCTCTCGCTGGAGGGCCGAGTGTTTCACTCCGACCTCACTCACCCAAACAGAGATGAGAGAGTCTCGTTGGGGCCGAC
CCCCATACCTCTGCCCACGTAGGACCCAGGACACGCGACAAGCTCTGCTGCGACAGTCTGTGTTTCCCTTCCGCGCTCGCATCATCTC
CGGTACATTTAGCCATTAGCAGACATACCTTTTGAACCGGACACGACCCCTGCATTAAGAGGGGGGCGCGGGGGCGACGGGCGTGAACCGCGCGCGGCG
GCGCTGTGACCAATCATGGGCTGCGCTCTTAAGACACCGTTCGCGCCACAGGCGCGGGGCTTAAAGAGCGCCAGA

 $\star \langle p \rangle$

> 3197 : 1093 : : DN : 1075 : BR10330 : 9/09/09-2

[illegible]

CTCCTCCCCCGGCCGGTCCCTCCCGGCCCGGGTCATCCCGCGCTCCCGCCAGTGTCTCCCCTGCGGCCCGCGGGGCAAGGCGCGTGTCTCGG
GCCACGATCTCTCTCGGGGAGCAGACTGGGCTCTTCTGTGGGACCGCGGAGCGCTCGCGTCTCGAGAGGAGAATCTCTCGCTCGCTCCGTCGCA
TCTCGCGCAAGAAAGTCTCGGGAGCGGGGGCCGCTTCGCGCCCGCGCGsATCTGTGACGACCGGGGTGAGTCTCGCGAGGCGGCGCAGCGGGCCGG
GGCTCCGGAAACAGGCGGGGCGGGCCAGGGTGGCCCTGACTCGGCGTCTCTCTGTGTCAGACGGCTGCACGCGGATCCCGCCTGCGACCCGAGGC
CGCTCTCTCCAGCACTGAGACGCGCGGGCCCTGACACCATCGGAGCACAGCCCTCACTCCCTCTGTAATCATCCCCAGGAATTATGCAATGAA
ATAAGG

 $\ast \langle p \rangle$

Una macro de Word puede transformar este texto en un documento de texto. Como ejemplo se muestra el código de una macro llamada “Informe de secuencias a Texto” cuyo código es igual al de la página 363.

No es complicado crear un botón en la barra de tareas para ejecutarlo automáticamente:

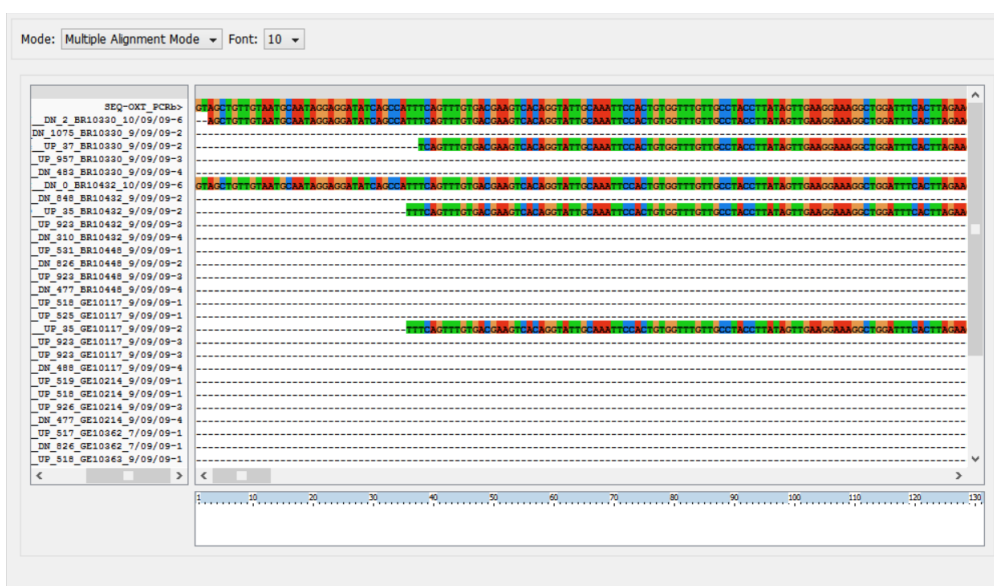
"\$" InformeDeSecuenciasATexto

Se muestra un cuadro de mensaje que informa del nombre de nuevo archivo, que se ha creado en el mismo directorio:

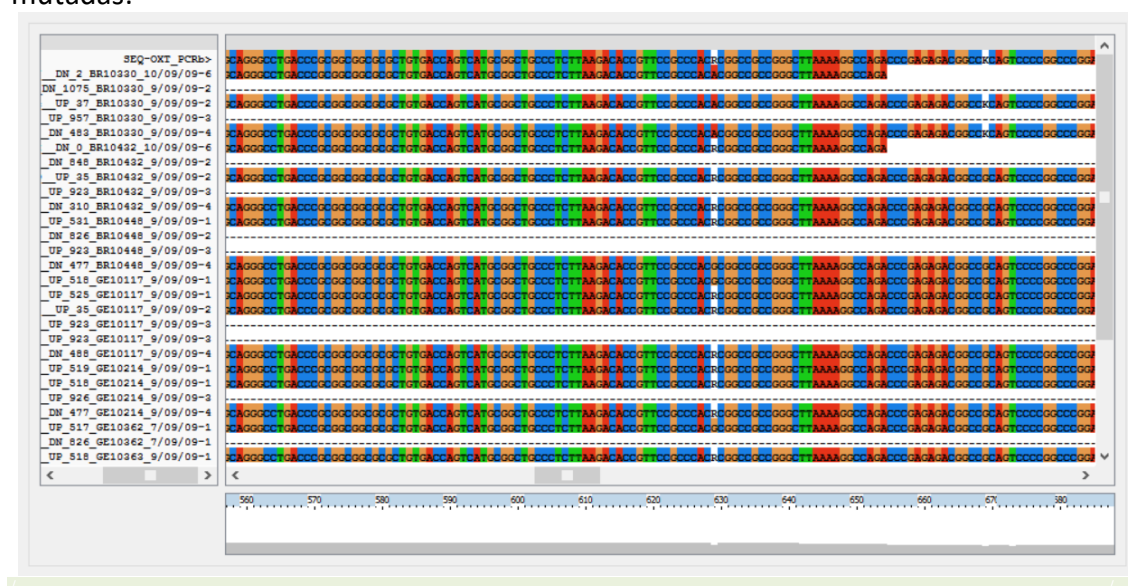
Los estudiantes son conscientes de que tanto en formato físico como en los documentos electrónicos:

Si este documento se abre con un editor de textos que no ajuste las líneas se puede apreciar mejor el alineamiento:

Este archivo se puede abrir directamente en ClustalX:



El coloreado de bases del ClustalX permite visualizar fácilmente las posiciones mutadas:



8.1.6.16 Ver Alineamientos

Ver alineamientos:

Crea una consulta que permite ver uno de los alineamientos directamente, sin necesidad de utilizar un script.

En primer lugar se pide el nombre de la secuencia consenso del alineamiento:

Secuencia:

La lista desplegable muestra el nombre de la secuencia, el fragmento al que pertenece y el incremento. Al pulsar en “Consultar ...” se lanza una consulta que muestra en cada línea, alineada, una de las secuencias que generan el alineamiento:

Clave	Nombre	
767	AW 1	GCCTTccCagCCATGTCCTTGTCCCGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTC
775	P 5419 CC	GCctTccCagCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTC
776	K. 97307 (A)	GCCTTccCagCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTC
777	LA 3	GCCTTccCagCCATGTCCTTGTCCCGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTC
778	MI 1	-----CAGCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTC
779	DQ-10296	-----AgCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTC
780	MI 3	-----cAtGtCCTTGTCCsGCCTgTTTGCCaACGCTGTGCTC
781	AC-7133	-----ATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTC

Los campos listados son:

Clave: Es el número de identificación de la muestra secuenciada.

Nombre: Nombre del animal al que pertenece la muestra.

Alineamiento: Muestra la secuencia obtenida de la secuenciación. A aquellas secuencias que tienen incremento se les agrega una cola con igual número de guiones. De esta forma se presentan alineadas. Lo normal es que los incrementos sean grandes. En este caso, sólo se verían las colas de guiones. Copiado todas las filas de la consulta se pueden pegar en un editor de texto para obtener el alineamiento. Por ejemplo, pegando el alineamiento anterior en el editor Notepad++ se obtiene:

Clave	Nombre	Alineamiento
767	AW 1	GCCTTccCagCCATGTCCTTGTCCCGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
775	P 5419 CC	GCctTccCagCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
776	K. 97307 (A)	GCCTTccCagCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
777	LA 3	GCCTTccCagCCATGTCCTTGTCCCGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
778	MI 1	-----CAGCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
779	DQ-10296	-----AgCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
780	MI 3	-----cAtGtCCTTGTCCsGCCTgTTTGCCaACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
781	AC-7133	-----ATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA

Si el editor tuviese configurado algún modo de resaltado compatible con alineamientos de secuencias se podría obtener una visión aún más útil de dicho alineamiento:

Clave	Nombre	Alineamiento
767	AW 1	GCCTTccCagCCATGTCCTTGTCCCGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
775	P 5419 CC	GCctTccCagCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
776	K. 97307 (A)	GCCTTccCagCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
777	LA 3	GCCTTccCagCCATGTCCTTGTCCCGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
778	MI 1	-----CAGCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
779	DQ-10296	-----AgCCATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
780	MI 3	-----cAtGtCCTTGTCCsGCCTgTTTGCCaACGCTGTGCTCCGGGGCTCA
781	AC-7133	-----ATGTCCTTGTCCsGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGGCTCA

8.1.6.17 Ver Alineamientos Locales

Ver alineamientos locales:

Presenta el alineamiento de las muestras generadoras de una secuencia consenso. Excluye el incremento.

Este botón sirve para comprobar rápidamente un alineamiento aislado de su secuencia de referencia. Cuando un alineamiento tiene un gran incremento, al pulsar en [“Ver Alineamientos”](#):

Secuencia:	<div><div></div><div></div></div>		
	Nombre de secuencia	Fragmento	Incremento
	SEQ-DGAT1-E8/2>20030211	DGAT1-E8/2	6942
	SEQ-DGAT1-E8/2>20030218	DGAT1-E8/2	6934
	SEQ-DGAT1-E8/2>20030327	DGAT1-E8/2	6941
	SEQ-GH2-E5-3prima>DN02-12-05	GH2-E5-3prima	0

Se obtiene una larga sucesión de guiones y los controles de la base de datos no son capaces de mostrar la zona informativa del alineamiento porque la cadena de texto excede en longitud al límite del cuadro de texto de Access:

Clave	Nombre
1166	EO-5176
1167	VG-8024
1168	GW 79764 (1)
1169	MI 4
1170	GW 79764 (1)
1171	VG-8024
1172	EO-5176
1173	MI 4
1174	LA 3
1175	LE 5540 GL

Sin embargo, al pulsar en “Ver alineamientos locales” (este control) y elegir el mismo alineamiento:

Secuencia:

se suprime la cola del incremento general y se obtiene:

1166	EO-5176	DN	AGGCTGCTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCACTGGGCTGCCACCTGCGCGGGACCGGCAAGGGGCTGGGTCACCCCGCCCGCCCGCTGCGCGCTTGTCTGTAGCTTT---GGCAGGTA
1167	VG-8024	DN	AGGCTGCTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCACTGGGCTGCCACCTGCGCGGGACCGGCAAGGGGCTGGGTCACCCCGCCCGCCCGCTGCGCGCTTGTCTGTAGCTTT---GGCAGGTA
1168	GW 79764 (1)	DN	AGGCTGCTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCACTGGGCTGCCACCTGCGCGGGACCGGCAAGGGGCTGGGTCACCCCGCCCGCCCGCTGCGCGCTTGTCTGTAGCTTT---GGCAGGTA
1169	MI 4	DN	AGGCTGCTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCACTGGGCTGCCACCTGCGCGGGACCGGCAAGGGGCTGGGTCACCCCGCCCGCCCGCTGCGCGCTTGTCTGTAGCTTT---GGCAGGTA
1170	GW 79764 (1)	UP	-----GCGGGACCGGCAAGGGGCTGGGTCACCCCGCCCGCCCGCTGCGCGCTTGTCTGTAGCTTT---GGCAGGTA
1171	VG-8024	UP	-----GCGGGACCGGCAAGGGGCTGGGTCACCCCGCCCGCCCGCTGCGCGCTTGTCTGTAGCTTT---GGCAGGTA
1172	EO-5176	UP	-----GCGGGACCGGCAAGGGGCTGGGTCACCCCGCCCGCCCGCTGCGCGCTTGTCTGTAGCTTT---GGCAGGTA
1173	MI 4	UP	-----GCGGGACCGGCAAGGGGCTGGGTCACCCCGCCCGCCCGCTGCGCGCTTGTCTGTAGCTTT---GGCAGGTA
1174	LA 3	DN	-----**GGCAGGTA
1175	LE 5540 GL	DN	-----**GGCAGGTA
CONSENSO	SEQ-DGAT1-E8/2>20030211	UP	AGGCTGCTGAGGGCTCCCTCGGGCTGGGGCACTGGGCTGCCACCTGCGCGGGACCGGCAAGGGGCTGGGTCACCCCGCCCGCCCGCTGCGCGCTTGTCTGTAGCTTT**GGCAGGTA

Las secuencias están alineadas con la secuencia consenso. (Los asteriscos indican zona de inserción heterocigota).

8.1.6.18 Ver Datos De Muestras Secuenciadas

Ver datos de muestras secuenciadas:

Consulta la información de las muestras secuenciadas.

Muestra	Patrón	Raza	F	C	Clave	Línea	Día de sec	Orient	Protocolo Secuenci	Fragmento	Secuencia
218 10XI-E1	Castellana	H	6	913	21 1/02/02-1	UP	SEC-PRL-E5.2<10	PRL-E5.2	CATTTCATCTATCCATT		
223 10XI-E1	Assaf	E	7	354	31 25/07/02-2	UP	SEC-OXI-E3<20	OXI-E3	ActGagACcgGCCGGCC		
223 10XI-E1	Assaf	E	7	371	63 25/07/02-4	DN	SEC-OXI-E3<128	OXI-E3	ActCGGCgtctctCtGTGC		
239 20XI-E2	Churra	E	10	325	7 21/08/02-1	UP	SEC-OXI-E2<18	OXI-E2	TTcgGGCCCaGCATCtGC		

Los campos de esta consulta son los siguientes:

Muestra: Código en la base de datos de la muestra de ADN.

Patrón: Nombre del patrón de electroforesis para experimentos de SSCP.

Fila: Letra de la fila en la que se almacena la muestra en la caja de ADN.

Columna: Número de la columna en la que se almacena la muestra en la caja de ADN.

Clave: Número de identificación de la muestra secuenciada en la base de datos.

Línea: Línea del aparato de secuenciación en la que se cargó la muestra secuenciada. Este campo sólo se aplica a aparatos de secuenciación que cargan las muestras en líneas.

Día de secuenciación: Clave del día en que se realizó la secuenciación. Está compuesta por los campos Fecha-Variante.

Orientación: Orientación en la que se secuenció la muestra. La orientación en la que se guarda la secuencia en la base de datos debería ser UP (5'→3') pero puede haber sido obtenida tanto en dirección UP como DN (3'→5').

Protocolo Secuenciación: Clave del protocolo de secuenciación con el que se obtuvo la muestra.

Fragmento: Nombre del fragmento que se estaba secuenciando.

Secuencia: Cadena de nucleótidos obtenida de la secuenciación.

8.1.6.19 Ver Días De Secuenciación

Consultar días de secuenciación:

Esta consulta muestra los días que ha habido secuenciación y los fragmentos que se han secuenciado.

Protocolo Secuenciación ▾	Fragmento ▾	Variante ▾	Día ▾
SEC-GH2<98	GH2	21/07/05-1	21/07/2005
SEC-GH2<99	GH2	7/07/05-1	07/07/2005
SEC-GH2-E5-3'<84	GH2-E5-3prima	2/12/05-1	02/12/2005
SEC-GH2-E5-3'<85	GH2-E5-3prima	2/12/05-2	02/12/2005

Los campos que se listan son los siguientes:

Protocolos de secuenciación: Nombre del protocolo de secuenciación.

Fragmento: Nombre del fragmento que se ha secuenciado.

Variante: Código de identificación de la variante del día.

Día: Fecha en que se realizó la secuenciación.

8.1.6.20 Ver Fragmentos Con Muestras Secuenciadas

Ver fragmentos con muestras secuenciadas:

Muestra aquellos fragmentos de los que hay registros de muestras secuenciadas en la base de datos. También cuenta el número de muestras para cada fragmento.

Fragmento ▾	Nº de muestra: ▾
DGAT1-E8/2	12
GH2	29
GH2-E5-3prima	16

Los campos que se listan son los siguientes:

Fragmento: Nombre del fragmento que se ha secuenciado.

Nº de muestras: Número de muestras que se ha secuenciado de ese fragmento.

8.1.6.21 Ver Longitud De La Secuencia Por Día

Ver la longitud de las secuencias por día:

Consulta la información de las secuencias de un mismo día. La longitud de la secuencia suele dar una idea de la calidad de la secuenciación.

Día:	<input type="text" value="09/09/2009"/>	▾
	Día	Nº de Protocolo: ^
	09/04/2001	1
	10/07/2001	2
	19/07/2001	2
	14/08/2001	2
	27/08/2001	1

El desplegable muestra el número de protocolos de secuenciación registrados para ese día.

Día:	<input type="text" value="09/09/2009"/>	▾
<input type="button" value="Consultar 09/09/2009"/>		

Al pulsar en "Consultar ..." se presenta una tabla que contiene los siguientes datos:

Día	Fragmento	Longitud	ID de sec	Muestra	Nombre	Número	Cebador	Día de secuenciación	Orientación	Secuencia
09/09/2009	OXT_PCRa	677	1100	3198	IR10432	2	OXT_Seal1 UP	9/09/09-3	UP	CCCACTAGCCTGGGAATCGAGGGAGCGGAGGAGCT
09/09/2009	OXT_PCRa	688	1106	3199	IR10448	3	OXT_PCRa UP	9/09/09-1	UP	GCAAATGAGGGGGCGCGCGGGGGCGCAGGGCTTG
09/09/2009	OXT_PCRa	614	1103	3199	IR10448	3	OXT_PCRa DN	9/09/09-2	UP	AGGCCCCGACCTCGTCCGTGGTCTGAGGAGCTGG
09/09/2009	OXT_PCRa	576	1104	3199	IR10448	3	OXT_Seal1 UP	9/09/09-3	UP	CCCACTAGCCTGGGAATCGAGGGAGCGGAGGAGCT

Día: Fecha de la secuenciación.

Fragmento: Nombre del fragmento estudiado.

Longitud: Longitud de la secuencia obtenida.

ID de secuencia: Código de identificación de la muestra secuenciada en la base de datos.

Muestra: Código de identificación de la muestra de ADN empleada en el experimento.

Nombre: Nombre del animal al que pertenece el ADN.

Número: Número que identifica la posición en la placa del ADN.

Cebador: Nombre del cebador con el que se realizó la 2ª PCR de secuenciación.

Día de secuenciación: Código de día de la secuenciación. Esto es: día-variante.

Orientación: Orientación en la que se obtuvo la secuencia. UP significa 5'→3', DN significa 3'→5'.

Secuencia: Secuencia de nucleótidos obtenida en la secuenciación.

8.1.6.22 Ver Longitud De La Secuencia Por Día Tabla

Ver la longitud de las secuencias por día, en tabla:

Consulta la información de las secuencias de un mismo día, en formato de tabla dinámica. La longitud de la secuencia suele dar una idea de la calidad de la secuenciación.

Día									
09/09/2009									
				Cebador					
				OXT_PCRa DN		OXT_PCRa UP		OXT_Seq1F UP	
				OXT_Seq1R DN					
Nombre		Número		Clave de la se		Longitud		Longitud	
BR10448	3	1103	+	614					
		1104	+			576			
		1105	+					560	
		1106	+		688				
GE10117	4	1107	+		785				
		1108	+	755					
		1109	+			673			
		1110	+			573			

El contenido de la tabla es el siguiente:

Día: Este campo indica el día que se desea consultar. Al pulsar sobre la flecha de la derecha se muestra un listado con los días almacenados en la base de datos. Si se selecciona más de un días se mostrarán los resultados de todos ellos en la base de datos (Ver foto lateral).

Nombre: Nombre del animal que se está secuenciando.

Número: Número de la posición del ADN en la placa.

Clave de la secuenciación: Código de la muestra secuenciada en la base de datos.

Cebador: Nombre del cebador utilizado en la segunda PCR de secuenciación.

Los datos mostrados en cada celda son las longitudes de las secuencias obtenidas en cada caso.

Día

☐ 20/01/2006

☐ 22/01/2006

☐ 26/01/2006

☐ 29/03/2006

☐ 30/03/2006

☐ 04/04/2006

☐ 06/04/2006

☐ 26/09/2008

☐ 26/11/2008

☒ 09/09/2009

☐ 10/09/2009

Aceptar Cancelar

8.1.6.23 Ver Longitud De Secuencia Por Fragmento

Ver longitud de secuencia por fragmento:

Consulta la información de las secuencias de un mismo fragmento.

Nombre de secuencia	Fragmento	Longitud	SecuenciaDeReferencia	IncrementoGeneral
SEQ-PRL2-E2>	PRL2-E2	132	Prolactina	3507
SEQ-PRL2-E2>21-01-2002	PRL2-E2	133	Prolactina	3505
SEQ-PRL2-E2>23-01-2002	PRL2-E2	132	Prolactina	3507
SEQ-PRL2-E2>Consenso6-11-01-DN	PRL2-E2	73	Prolactina	3506
SEQ-PRL2-E2>Consenso6-11-01-UP	PRL2-E2	75	Prolactina	3564

Los campos de esta consulta son:

Nombre de la secuencia: Nombre de la secuencia consenso.

Fragmento: Fragmento al que pertenece la secuencia.

Longitud: Longitud de la secuencia.

SecuenciaDeReferencia: Nombre de la secuencia de referencia con la que alinea la lista. Este campo es opcional. Sólo se aplica a aquellas secuencias consenso que, a su vez, se alinean entre sí para crear una secuencia mayor.

IncrementoGeneral: Incremento con el que alinean las secuencias con su secuencia de referencia. Esto es: Número de base que hay que sumar a cada posición de la secuencia para que alinee con la posición equivalente de la secuencia de referencia.

8.1.6.24 Ver Muestras De Las Secuencias Consenso

Ver muestras de las secuencias consenso:

Presenta, en forma de tabla, los nombres de las muestras que participan en el alineamiento que genera una secuencia consenso. También informa del día de secuenciación y del nombre de dicha muestra en el alineamiento.

En primer lugar se pide el nombre de la secuencia.

Nombre de la secuencia consenso:

Aceptar

Cancelar

Al pulsar en "Aceptar" se muestra una tabla con los nombres de las secuencias que han generado la consenso:

Nombre de secuencia	Nombre	Día	NombreEnAlineamiento
SEQ-OXT_PCRA>	BR10432	26/11/2008	ALEX5.ab1
SEQ-OXT_PCRA>	BR10432	26/11/2008	ALEX9.ab1
SEQ-OXT_PCRA>	BR10448	26/11/2008	ALEX10.ab1

El contenido de esta tabla es el siguiente:

Nombre de secuencia: Nombre de la secuencia consenso.

Nombre: Nombre del animal que se ha secuenciado.

Día: Día en que se produjo la secuenciación.

NombreEnAlineamiento Nombre de la muestra secuenciada en el alineamiento que generó la secuencia consenso.

8.1.6.25 Ver Muestras Entre Días

Ver muestras entre días:

Es una consulta que busca las muestras secuenciadas entre un intervalo de días que se pedirá al ejecutarla.

En primer lugar se pregunta por el día inicial del intervalo de tiempo deseado.

Día inicial del intervalo

Aceptar
Cancelar

Al pulsar en "Aceptar" se pide el día final del intervalo de tiempo.

Día final del intervalo

Aceptar
Cancelar

Al pulsar en "Aceptar" se muestra la información solicitada:

Identificación	Nombre	Día	Fragmento	Día de secuenciación	Cebador
931	GE10117	26/11/2008	OXT_PCRA	26/11/08-4	OXT_Seq1R DN
932	GE10214	26/11/2008	OXT_PCRA	26/11/08-4	OXT_Seq1R DN
1084	IJ10429	09/09/2009	OXT_PCRA	9/09/09-1	OXT_PCRA UP

El contenido de la tabla es el siguiente:

Identificación: Código de identificación de la muestra secuenciada.

Nombre: Nombre de la muestra secuenciada.

Día: Fecha de la secuenciación.

Fragmento: Fragmento que se amplificó en la secuenciación.

Día de secuenciación: Código del día de secuenciación. Esto es: día-variante.

Cebador: Cebador de la 2ª PCR de secuenciación.

8.1.6.26 Ver Muestras Secuenciadas

Consultar las muestras secuenciadas:

Lista información de las muestras secuenciadas.

Lista de información de las muestras secuestradas.											
Clave	Día	Día de sec	Fragmento	Línea	Orientación	Nombre	Caja	Fila	Col	Raza	
288	27/03/2003	27/03/03-1	DGAT1-E8/2	5	UP	BR-10221	Machos de inseminación jor E	2	Churra		GGCtgCCACctgCCGCGGGACCGGGCAI
295	27/03/2003	27/03/03-1	DGAT1-E8/2	19	DN	FW-10229	Machos de inseminación jor C	2	Churra		cggggCTAGCAGGCCAGGCCGCCGGG
294	27/03/2003	27/03/03-1	DGAT1-E8/2	17	DN	BR-10221	Machos de inseminación jor E	2	Churra		cggggCTAGCAGGCCAGGCCGCCGGG

El contenido de la tabla es el siguiente:

Clave: Clave de la muestra secuenciada.

Día: Fecha en la que se realizó la secuenciación.

Día de secuenciación: Código del día de secuenciación. Esto es día-variante.

Línea: Línea en la que se ha cargado la muestra. Este parámetro se aplica en algunos tipos de secuenciadores.

Orientación: Orientación en la que se obtuvo la secuencia. UP significa 5'→3'; DN significa 3'→5'. Para evitar errores, se recomienda que todas la secuencias sean almacenadas en dirección UP.

Nombre: Nombre del animal analizado.

Caja: Caja de ADN de la que se extrajo la muestra.

Fila: Fila de la caja en la que se encuentra el ADN.

Columna: Columna de la caja en la que se encuentra el ADN.

Raza: Raza del animal al que pertenece la muestra.

Secuencia: Secuencia de nucleótidos obtenida en la secuenciación.

8.1.6.27 Ver Muestras Secuenciadas Con Incremento

Consultar muestras secuenciadas con incremento:

Lista los datos de las muestras secuenciadas que tienen asociada información de su secuencia de referencia.

Antes de ejecutar la consulta se muestra un formulario que permite filtrar los datos por fragmentos. Sólo se presentan aquellos fragmentos que tienen datos.

Al pulsar en "Consultar ..." se exponen los siguientes datos de cada muestra secuenciada:

Nombre de secuencia de referencia	Clave	Muestra	Nombre	Día de secu	Orientación	Incremento	Clon	Secuencia de referencia	Secuencia
SEQ-OXT_PCRA>	918	3198	BR10432	26/11/08-1	UP		4	gacataaccttgacccGGCACAGCCCC1 taaccttgacccggcAcagCCCTGCaai	
SEQ-OXT_PCRA>	919	3199	BR10448	26/11/08-1	UP		0	gacataaccttgacccGGCACAGCCCC1 gacataaCcttgacccggcAcagCCCTG	
SEQ-OXT_PCRA>	920	3200	GE10117	26/11/08-1	UP		3	gacataaccttgacccGGCACAGCCCC1 ataaccttgacccggcacaGCCCTGCa	

Nombre de la secuencia de referencia: Nombre de la secuencia de referencia de la muestra.

Clave: Número de identificación de la muestra secuenciada en la base de datos.

Muestra: Código de identificación de la muestra de ADN en la base de datos.

Nombre: Nombre del animal del que proviene la muestra.

Día de secuenciación: Código del día de secuenciación. Esto es: día-variante.

Orientación: Orientación en la que se obtuvo la secuencia. UP significa 5'→3'; DN significa 3'→5'. Para evitar errores, se recomienda que todas las secuencias sean almacenadas en dirección UP.

Incremento: Número de posiciones que hay que desplazar las coordenadas la secuencia de las muestras, en dirección aguas abajo, para que alinee con su secuencia de referencia.

Clon: Nombre del clon al que pertenece la muestra secuenciada. Este parámetro sólo se aplica a aquellos experimentos que utilicen técnicas de clonación.

Secuencia de referencia: Cadena de nucleótidos de la secuencia de referencia de la muestra.

Secuencia: Cadena de nucleótidos de la muestra.


8.1.6.28 Ver Muestras Secuenciadas Con Incremento Formulario

Formulario para comparar muestras secuenciadas con su secuencia de referencia:

Carga un formulario que permite comparar la secuencia de cada muestra con la de su secuencia de referencia. Está pensado para poder comprobar cada base individualmente (Por ejemplo la posición de un SNP). Si las bases no coinciden se muestran el color rojo. También muestra las bases adyacentes al punto de interés. Así se puede comprobar si los datos del alineamiento están bien. Un error posible podría ser haber introducido erróneamente el valor de incremento. En este caso el alineamiento de ambas secuencias no se produciría en casi ninguna base.

El formulario está dividido en 3 zonas: En la parte superior se agrupan los controles del alineamiento, en la parte central se muestran los datos de la secuencia de referencia y

en la parte inferior se recogen los datos de la secuencia de la muestra secuenciada.

Fragmento: 

Este formulario permite comparar la base que hay en una posición de la secuencia con respecto a su secuencia de referencia. Para ello sólo hay que introducir la posición deseada en la casilla "Posición". El zoom permite ajustar el número de bases mostradas alrededor de la posición. Debe tenerse en cuenta el incremento de la secuencia. Las bases inesistentes se representan por n's.

Posición: Ver

10 Zoom

Referencia
Secuencia

Nombre de secuencia de consenso:	SEQ-DXT_PCRa	IncrementoGral:	Longitud seq de referencia	985
Secuencia de referencia:	gacataacccttgaccgcgcacagccctcgcaaatgagggggggccggggggggcagggcctgacccggcgggcgggcgctgtgaccagtcatacgccgtgccctcttaagacacgggttccggccac rggccggccggcgctttaaaggccagcagccgagagagagccagcgtcccgggccggagccacagcgcgctgcacattggcaggttgcacgtcgcgtctgcctggctcgcgcctctccggccttcgtgcac ctccggcctcgctattcagaaactgcacccctggagcgcagccgctgcggtctgtgacctcgacgtgacgcagcgtgagcggccggccgcttcgtctccgctgctcggggcttgagcagggccctgtgcacac gggctggccggcgccggcccttttcggcccttgacggcgccggccggccgacgtgacgtggagatcgaggagcgttttgactgcgcctcttgacacaaatttgagcccaaaagagagcga ggaagcagccggcattcttcggcgcttctcagcggcgccctgcgcggccggccacccacccacagaggtctccctccggcgggcgctccctccggcgccggcgctcattccggcgcttcgcggc agttgtctccctccggccggcgggggcgaagagccgcgtcttcggggccagacattctctgcggggacagactggcgctcgttcgtgggacagggccggggcgctgcgttcggcagagaggaacattcactg ccctcgccctctcgactgcgcagaaagcccttcggggagcggggggccgctgcgcggcccgccggaaattctctcagccggcgctgcgcagccggcgctgcgcagggccgagagcggccggcctcggaacagg cgggcgggcgagggggcgcttcgactgcgcgtctctctgtgtgagmgcgctgcacagcggaattccggcctgcgaccccgagggcgctctcttcgcagcacttgagagcgccgg			

3200
[GE10117] UP

día de secuenciación: 26/11/08-1

Los datos que aparecen en el formulario son los siguientes:

Controles del alineamiento:

Fragmento: Nombre del fragmento que se ha secuenciado.



Modificar filtro: Lanza el formulario de creación de consultas de Access. Con la consulta creada en él, se pueden establecer, de manera precisa, las condiciones que deben cumplir las muestras que se presentarán en el formulario. El empleo de este control requiere conocimientos de Access.

Posición: Indica la posición en la secuencia de referencia que se interrogará.

Ver

Ver: Presenta el alineamiento entre la muestra secuenciada y la referencia en la posición indicada.

10 Zoom

Zoom: Este control establece el número de bases que se mostrarán en el entorno alrededor de la posición de interés. Para cambiarlo basta con modificar el contenido del cuadro de texto y pulsar en el botón "Zoom". Por ejemplo: un alineamiento de 10 en la posición 126 se muestra así:

10	Zoom	Referencia	gcccacrcgg C cgccgggctt
		Secuencia	gcccacgcgg C cgccgggctt

Si se establece el valor del zoom, a 15, se mostrará así:

15	Zoom	Referencia	caccgttccgcccac	R	cggccgcgcgggctta
		Secuencia	caccgttccgcccac	G	cggccgcgcgggctta

Datos de la secuencia de referencia:

Nombre de la secuencia consenso: Nombre de la secuencia de referencia de la muestra secuenciada actual.

IncrementoGral: Incremento general de la secuencia de referencia. Esto es, el incremento que se aplicaría a las posiciones de la secuencia de referencia. Se utiliza para linear varias secuencias de referencia en una más general.

Longitud seq de referencia: Tamaño de la secuencia de referencia.

Base de la secuencia de referencia: Cuadro que mostrará la base de la secuencia de referencia en la posición indicada.

Datos de la secuencia de la muestras secuenciada:

secuencia: Código de la muestra secuenciada.

Fragmento:

Al pulsar en "Consultar ..." se lanza la consulta:

Secuencia	Fragmento	Muestra	Nombre	Clave	Orientación
atcatCtccgtacattagCcatTagCagacataaccttgaccggcacagccctgcaaatgagggggcGccgggggcagggc	OXT_PCRa	3200	GE10117	931	UP
ATGAgGGGCGCGCGGGGGCGAGGGCCTGACCcGCGGGCGCGCTGTGACcAGTCATGCGGCTGCCCT	OXT_PCRa	3207	IJ10429	1086	UP
CCCACCTAGCCTGGGaATCGAGGGAGCGGAGGAGCTTTTACTGCCCTCCTTCGACCAATTCTGAGCCCAAA	OXT_PCRa	3198	BR10432	1100	UP
CCCACCTAGCCTGGGaATCGAGGGAGCGGAGGAGCTTTTACTGCCCTCCTTCGACCAATTCTGAGCCCAAA	OXT_PCRa	3199	BR10448	1104	UP

Los campos de esta tabla son:

Secuencia: Secuencia de nucleótidos de la muestra.

Fragmento: Fragmento que se ha secuenciado.

Muestra: Código de la muestra secuenciada en la base de datos.

Nombre: Nombre del animal que se ha secuenciado.

Orientación: Orientación en la que se obtuvo la secuencia. UP significa 5'→3'; DN significa 3'→5'.

8.1.6.30 Ver Muestras Secuenciadas Por Fragmentos Informe

Informar de muestras secuenciadas por fragmentos:

Genera un informe con los datos de las muestras secuenciadas de un fragmento.

En primer lugar se pide el nombre del fragmento de interés.

Fragmento:

Al pulsar en "Consultar ..." se muestra un informe que contiene los códigos necesarios para generar la lista de secuencias:

Muestras Secuenciadas del Fragmento OXT_PCRa					
>	1096	3197	BR10330	OXT_PCRa	DN
CG TAACATTAAGCC ATTAGCAG ACATAGCTTGA ACCG GG CAC AG CCGCTG CAATGAG GG GG CCGG CCGG GG GG C					
CAGG GC CTG ACCG GCG GCG GCG GCG TGT GACCAATG CATG CCG CTG CCGCTT TTAG ACACCGT TCG CCGACAC					
G GCG CCGG GCTTAAAG GCG AG ACCGAG AG AGG CCG CAG TC CG CCG AGCGGAG CCGG TCTGACG					
ATG GCG GTTCCAGCTT CCGG TGC TGCCTGCTGCG					
<	1093	3197	BR10330	OXT_PCRa	UP
CTCGCTCGCGG GC CCG TCGCTCGCTCGCG CCGCG GCTCATCGCGG CCGCT CCGCGAG TG TG TCGG CTGC GG CCGG					
G GG GG CAAG GCGG CTG CTTC GG GCGGAG CAT CTG CTG CCG GG AGAGG TGG GCTGCTTG TG GG CAC GG CG					
G AG CCG CTG CCG CTGC CGAGAG GAG AACTACCTGCGG TG CCGTG CCACTCGCG CCGAGAG CCGT CCG GAGG G					
G GG GCGG CTG CCGG GCGG CCGG ATCTG CTG CAG CGC					
<	1095	3197	BR10330	OXT_PCRa	UP
G TTTT GACTG CCGCTG TCG ACCAAT TCTG AG CCGGAG AG AGG GG GAAGACCGG CCGATC CCGCG GCTC CTCAG					
G CCGCGG TCG CCGCGG GG CTGAGCG CCGGACCGGAG GTC TCGCTG CG					
<	1094	3197	BR10330	OXT_PCRa	UP
TC AG TTTGTGAGG AG TCACAGG TATTGCAATTC ACTGTGG TTTGTTCG TACCTTATAG TTGAAGG AAG GCTG					
G ATTTCAGT TAGAGAG AG AATATAAT GTT TTTATAT CCGAG AGCGT CCGTCCAG GTAAATG GATG TGG GTGTAG					
G GAGCG GCGCTG GG TCGAG GAAATCAGATT TCGAG AG AGACTT GCTTCCAG AG GG G AG CTAGG GG GT					
G TGTGG TTTGG CCGAG AGG GCGATG GG GG					
<	926	3198	BR10432	OXT_PCRa	UP
ACGCGGACAGG CTTGG AGG AGG GCG AG GAG GTTTT ACTGCG CTGCTTGG ACCAATCTG AG CCGAAGAG A					
G AG CCG GG AAGACCGG CCGATC TCGG GCG CTGCTGAG GG CCGCTCTGCG CCGCGG GCTCAGCGCG CCGACCGAC					
AGG GTCTCGCTCGCGG GCG GTCGCTCGG CCG CCGCGG CTG ATCGCGG CCGTCCG CCACTGTCTCGCTGCG					
G CCGCGG GG G CAAAGG CCG CTG CTG GCG CCGAGG					
<	1100	3198	BR10432	OXT_PCRa	UP
CGCAGCTAG CCGTGG AATC GAGG GAG CCG AG GAG GTTTT ACTGCG CCGCTTGG ACCAATCTG AG CCGAAG A					
AGG GTCTCGCTCGCGG GCG GTCGCTCGG CCG CCGCGG CTG ATCGCGG CCGTCCG CCACTGTCTCGCTGCG					
G CCGCGG GG G CAAAGG CCG CTG CTG GCG CCGAGG					
<	922	3198	BR10432	OXT_PCRa	UP
CGCTGCTAG CCGTGG AATC GAGG GAG CCG AG GAG GTTTT ACTGCG CCGCTTGG ACCAATCTG AG CCGAAG A					
AGG GTCTCGCTCGCGG GCG GTCGCTCGG CCG CCGCGG CTG ATCGCGG CCGTCCG CCACTGTCTCGCTGCG					
G CCGCGG GG G CAAAGG CCG CTG CTG GCG CCGAGG					
<	1098	3198	BR10432	OXT_PCRa	UP
G CTCTG GG GG CTG GCGAG CCGG CTG CCGAG GG TG CCGCGG CCG CCGCTTCTCGG CCGG AGCGG TACCG					
G CCGAGCTAG CCGTGG AATC GAGG GAG CCG AG GAG GTTTT ACTGCG CCGCTTGG ACCAATCTG AG CCGAAG A					
AGG GTCTCGCTCGCGG GCG GTCGCTCGG CCG CCGCGG CTG ATCGCGG CCGTCCG CCACTGTCTCGCTGCG					
G CCGCGG GG G CAAAGG CCG CTG CTG GCG CCGAGG					
<	918	3198	BR10432	OXT_PCRa	UP
TACCTGCTAG CCGTGG AATC GAGG GAG CCG AG GAG GTTTT ACTGCG CCGCTTGG ACCAATCTG AG CCGAAG A					
AGG GTCTCGCTCGCGG GCG GTCGCTCGG CCG CCGCGG CTG ATCGCGG CCGTCCG CCACTGTCTCGCTGCG					
G CCGCGG GG G CAAAGG CCG CTG CTG GCG CCGAGG					
<	918	3198	BR10432	OXT_PCRa	UP
TACCTGCTAG CCGTGG AATC GAGG GAG CCG AG GAG GTTTT ACTGCG CCGCTTGG ACCAATCTG AG CCGAAG A					
AGG GTCTCGCTCGCGG GCG GTCGCTCGG CCG CCGCGG CTG ATCGCGG CCGTCCG CCACTGTCTCGCTGCG					
G CCGCGG GG G CAAAGG CCG CTG CTG GCG CCGAGG					

En detalle, este informe contiene:

Un título en el que se añade el nombre del fragmento de interés en otra tipografía:

Muestras Secuenciadas del Fragmento OXT_PCRa

Los datos de cada una de las secuencias en un formato similar a FASTA:

```
> 1096 _ 3197 _ BR10330 _ OXT_PCRa _ DN <br>
CGTAACATTAGCCATTAGCAGACATAACCTTGACCCGGCACAGCCCTGCAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCG
CAGGGGCTGACCCGCGGCGGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCACAC
GGCCGCCGGGCTTAAAGGCCAGACCCGAGAGACGGCCkCAGTCCCGGCCCGGAGCCAGCGCGTCTGCACC
ATGGCAGGTTCCAGCCTCGCCTGCTGCCTGCTCGG
*<p>
```

La primera línea está compuesta por los siguientes datos:

- Carácter de título de línea en formato fasta (>)
- Código de identificación de la muestra secuenciada (1096).
- Código de identificación de la muestra de ADN (3197).
- Nombre del animal (BR10330).
- Fragmento secuenciado (OXT_PCRa).
- Orientación (DN)

La segunda línea contiene la secuencia de nucleótidos.

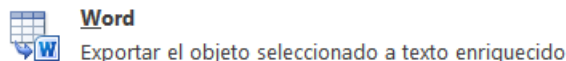
Hay una tercera línea que contiene el carácter asterisco (*) que significa final de secuencia en formato FASTA.

El pie de cada página recoge la fecha de impresión y el número de página del informe:

08/01/2015

Página 1 de 6

Para obtener un archivo de texto exportable se puede utilizar la función de exportar el informe a texto enriquecido:



Esto genera un archivo que puede ser leído por Microsoft Word o cualquier otro editor de texto compatible:

Muestras Secuenciadas del Fragmento OXT_PCRa

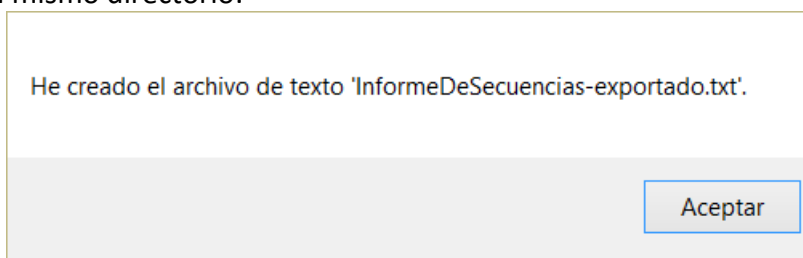
```
> 1096 _ 3197 _ BR10330 _ OXT_PCRa _ DN <br>
CGTAACATTAGCCATTAGCAGACATAACCTTGACCCGGCACAGCCCTGCAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCG
CAGGGGCTGACCCGCGGCGGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCACAC
GGCCGCCGGGCTTAAAGGCCAGACCCGAGAGACGGCCkCAGTCCCGGCCCGGAGCCAGCGCGTCTGCACCATG
CAGGTTCCAGCCTCGCCTGCTGCCTGCTCGG
*<p>
> 1093 _ 3197 _ BR10330 _ OXT_PCRa _ UP <br>
CTCCCTCCCGGCGGTCCTCCCGGCCCGGCTCATCCCGCCCTCCCGCCAGTGTCTCCCTGCGGCCCC
GGGGGCAAGGCCGCTGCTTCGGGCCAGCATCTGCTGCGGGGACGAGCTGGCTGCTTCGTGGGACGGCCGA
GGCGCTGCGCTGCCAGAGGAGAACTACCTGCCGCTGCCCTGCCAGTCCGGCCAGAAGCCCTGCGGGAGCGGG
GCCGCTGCGCCGCCCGGATCTGCTGCAGCCC
*<p>
> 1095 _ 3197 _ BR10330 _ OXT_PCRa _ UP <br>
CTTTTGACTGCCCTCCTTCGACCAATTCTGAGCCCAAGAGAGCGGGGAAGACCCGCCATCTCCGCGCTCCTCAGG
CCGCCCTCGCCCGCCGGCTCAGCCCCCACCCACAGGGTCTCCCTCCC
*<p>
> 1094 _ 3197 _ BR10330 _ OXT_PCRa _ UP <br>
TCAGTTTGTACCAAGTCACAGGTATTGCAATTCCTACTGTGTTTGTTCCTACCTTATAGTTGAAGGAAGGCTGGA
```

Para limpiar este archivo y generar un documento de texto plano se puede utilizar una macro. Por ejemplo, para Microsoft Word se puede crear una macro como la que se recoge en la página 363.

No es complicado crear un botón en la barra de tareas para ejecutarlo automáticamente:

"\$" InformeDeSecuenciasATexto

Se lanza un cuadro de mensaje que informa del nombre de nuevo archivo. Este se ha creado en el mismo directorio:



El documento de Word ahora contiene texto en un formato mucho más similar al formato FASTA:

```
>1096_3197_BR10330_OXT_PCRa_DN
CGTAACATTAGCCATTAGCAGACATAACCTTGACCCGGCACAGCCCCTGCAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGG
CCTGACCCGCGCGCGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCACACGGCCGCCGGG
CTTAAAGGCCAGACCCGAGAGACGGCCKCAGTCCC CGGCCGAGCCAGCGCGTCTGCACCATGGCAGGTTCCAGCC
TGCCTGCTGCCTGCTCGG*

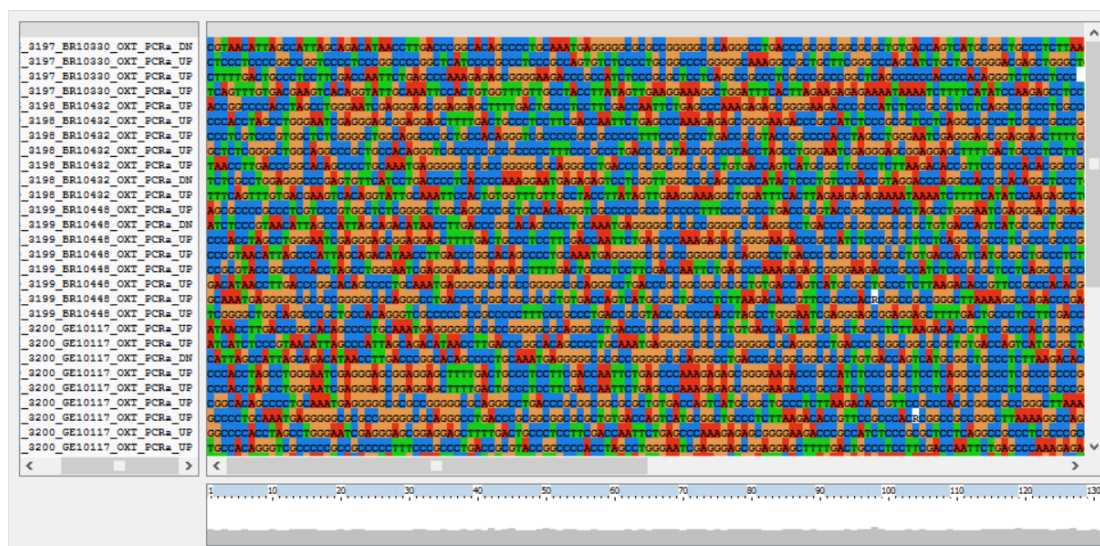
>1093_3197_BR10330_OXT_PCRa_UP
CTCCCTCCCCGGCCGGTCCCCTCCCGGCCCGGCTCATCCCCGCCCTCCCGCCAGTGTCTCCCTGCGGCCCGGGGG
CAAAGGCCGCTGCTTCGGGGCCAGCATCTGCTGCGGGGACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCACGGCCGAGGCCTGCG
CTGCCGAGAGGAGAACTACCTGCCGTGCGCCTGCCAGTCCGGCCAGAAGCCCTGCGGGAGCGGGGGCCGCTGCGCCG
CCGCCGGAATCTGCTGCAGCCC*

>1095_3197_BR10330_OXT_PCRa_UP
CTTTTGAAGTCCCTCCTTCGACCAATTCTGAGCCCAAGAGAGCGGGGAAGACCCGCCATCTCCCGCGCTCCTCAGGCCGC
y se ha generado un documento de texto, en el mismo directorio, que contiene la lista
```

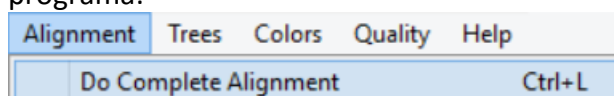
de secuencias en formato FASTA:

```
1 >1096_3197_BR10330_OXT_PCRa_DN
2 CGTAACATTAGCCATTAGCAGACATAACCTTGACCCGGCACAGCCCCTGCAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGCCTGA
3 CCCGCGCGCGCGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCACACGGCCGCCGGGCTTAAAGGCC
4 AGACCCGAGAGACGGCCKCAGTCCC CGGCCGAGCCAGCGCGTCTGCACCATGGCAGGTTCCAGCCTCGCTGCTGCCTGCT
5 CGG*
6 >1093_3197_BR10330_OXT_PCRa_UP
7 CTCCCTCCCCGGCCGGTCCCCTCCCGGCCCGGCTCATCCCCGCCCTCCCGCCAGTGTCTCCCTGCGGCCCGGGGGCAAAGG
8 CCGCTGCTTCGGGGCCAGCATCTGCTGCGGGGACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCACGGCCGAGGCCTGCGCTGCCGAGAGGA
9 GAACTACCTGCCGTGCGCCTGCCAGTCCGGCCAGAAGCCCTGCGGGAGCGGGGGCCGCTGCGCCGCCCGCGGsATCTGCTGCAG
10 CCC*
11 >1095_3197_BR10330_OXT_PCRa_UP
12 CTTTGAAGTCCCTCCTTCGACCAATTCTGAGCCCAAGAGAGCGGGGAAGACCCGCCATCTCCCGCGCTCCTCAGGCCGCCT
```

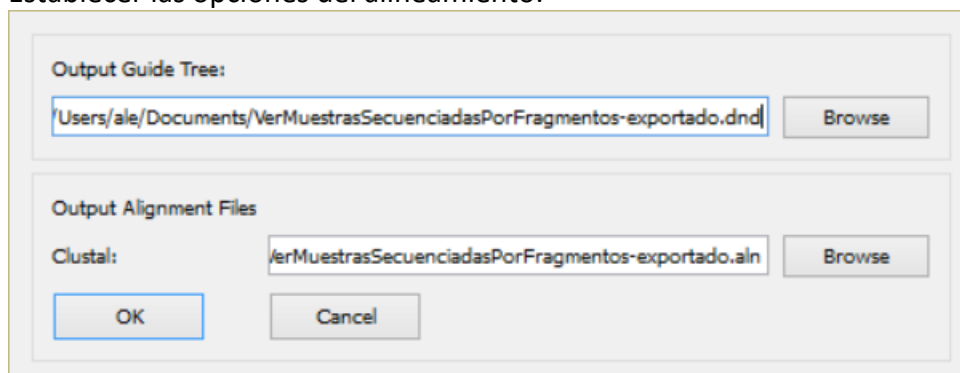
Este documento se puede abrir con los programas habituales de manejo de secuencias. Por ejemplo, puede querer abrirse con ClustalX2 para realizar un alineamiento.



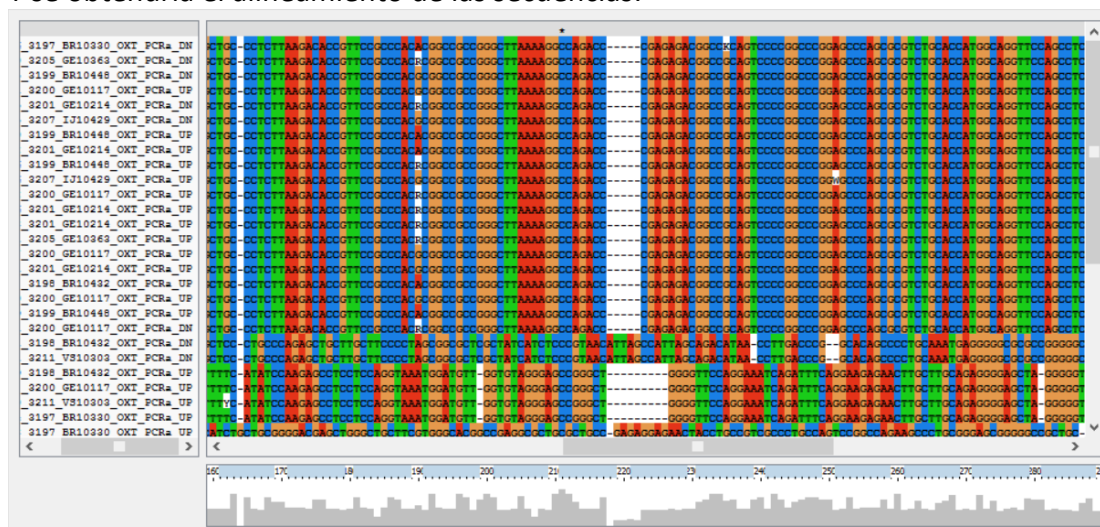
Dado que las secuencias no están alineadas habría que llamar al menú adecuado del programa:



Establecer las opciones del alineamiento:




Y se obtendría el alineamiento de las secuencias:



Si, como en este caso, hay secuencias de más de un tipo, puede querer ensamblarlas para ver los *contigs* que se identifican. Por ejemplo, usando el UGENE, versión 1.15.1, se obtiene:

Informe alineado de muestras secuenciadas por fragmentos:

Fragmento: 

[Consultar OXT_PCRA](#)

[illegible]

AlineamientoDeMuestrasSecuenciadas

Composición del nombre: >Muestra:ClaveSecuenciación:Clon:Orientación:Incremento:Nombre:DíaSecuenciación

OXT_PCRa

<-Eliminar--

> SEQ-OXT_PCRa>

gacataaoccttgacccGGCACAGCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGGCGCAGGGCCTGACCCGCGGCGCGCTGTGACCA
GTCTATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCCACRCGGCCGCGGGCTTAAAGGCCAGACCCGAGAGACGGCCGAGTCCCC
GGCCCGGAGCCAGCGCTCTGCACCATGGCAGGTTCCAGCCTCGCCTGCTGCTGCTCGGCCCTCCTGGCGTTGACCTCCGCTGCT
ACATTGAGAACTGCCCCCTGGGCGGCAAGCGTGCCTGCTGGACCTCGACGTGCGCACGGTGAGCGCCCCGCCCTCGTCCCGTGGCT
CTCGGGGCTGGCAGGCCGCTGCCACAGGGTGCCTCCGCGCCGCTTTCCCGCCTGACCGCGTACCGGGCCACCTAGCCTGGG
AATCGAGGGAGCGGAGGAGCTTTTGAAGTGCCTCCTTCGACCAATTCTGAGCCCAAAGAGAGCGGGGAAGACCCGCCATCTCCGCG
CTCCTCAGGGCGCCCTCGCCCGCCCGGCTCAGCCCCCACCCACAGGGTCTCCTCCCGCGCGGTCCCTCCCGGCCCGGCTCA
TCCCCGCCCTCCCGCCAGTGTCTCCCTGCGGGCCCGGGGGCAAGGCCGCTGCTTCGGGCCAGCATCTGCTGCGGGGACGAGCTG
GGCTGCTTCGTGGGCACGGCCGAGGCGCTGCGCTGCCGAGAGGAGAACTACCTGCCGTGCGCTGCGAGTCCGGCCAGAAGCCCTGC
GGGAGCGGGGGCCGCTGCGCCGCCCGGGSATCTGCTGCAGCCCGGGTGAGTCCGGCAGGGGCCGAGACGGGGCCGGGGCTCCGGAA
CCAGGCGGGCCGGGCCAGGGTGGCCCTGACTCGGCGTCTCTCTGTGACAGCGGTGCCACGCGGATCCCGCTGCGACCCGAGGCC
GcCTTCTCCcAGCACTGAgacgtrccgg

*<p>

> 3198 : 918 : :UP : 4 :BR10432 :26/11/08-1

taaccttgacccggcAcagCCCTGCAaaTGAGGGGGCGCGCCGGGGGGCGCAGGGCCTGACCCGCGGCGCGCTGTGACCAAGTTCATGCGGCTGC
CCTCTTAAGACACCGTTCCGCCCACacGGCCCGGGCTTAAAGGCCAGACCCGAGAGACGGCCGAGTCCCGGCCCGGAGCCAGGCGCTGTG
CACCATGGCAGGTTCCAGCCTCGCCTGCTGCTGCTCGGCCCTCCTGGCGTTGACCTCCGCTGCTACATTGAGAACTGCCCCCTGGGCGGCAAGCG
TGGGCTGCTGGACCTCGACGTGCGCACGGTGAGCGCCCGCCCTCGTCCCGTGGCTCTCGGGGCTGGCAGGCCGCTGCGACAGGGTCCGCCCCGC
CGCCCCCTTTCCCGCCCTGACCGCGTACCGGCCACCTAGCCTGGGAATCGAGGAGCGgaggaGCTTTTGAAGTGCCTcctcctCGAccAATTCTG
AGCCCAAGagagcggggAAGACCCGCACTCtcccgGCTcctcagggcgccCtgcggcgccgggctCAGcCccccacccCacaggggtcctcctcc
ccggcCggtcccCtcccgGcCcccgCtcaTccccccctcccgccagtgctccccTgcggccccgggggCaaagggcgctgcttcgggcccagca
tctgctgccccgggac

*<p>

> 3198 : 922 : :UP : 332 :BR10432 :26/11/08-2

Para limpiar este archivo y generar un documento de texto plano se puede utilizar una macro. Por ejemplo, para Microsoft Word se puede crear una macro como esta:


```

001 Sub InformeDeSecuenciasATexto()
002 '
003 ' InformeDeSecuenciasATexto Macro
004 ' Macro grabada el 05/03/2004 por Alejandro
005 '
006
007 Dim Salida As String
008 Selection.Find.ClearFormatting
009 Selection.Find.Replacement.ClearFormatting
010 With Selection.Find
011 .Text = "Vermuestrassecuenciadasporfragmentos"
012 .Replacement.Text = ""
013 .Forward = True
014 .Wrap = wdFindContinue
015 .Format = False
016 .MatchCase = False
017 .MatchWholeWord = False
018 .MatchWildcards = False
019 .MatchSoundsLike = False
020 .MatchAllWordForms = False
021 End With
022 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
023
024 With Selection.Find
025 .Text = "^t"
026 .Replacement.Text = ""
027 .Forward = True
028 .Wrap = wdFindContinue
029 .Format = False
030 .MatchCase = False
031 .MatchWholeWord = False
032 .MatchWildcards = False
033 .MatchSoundsLike = False
034 .MatchAllWordForms = False
035 End With
036 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
037
038 Rem eliminar el nuevo titulo
039 With Selection.Find
040 .Text = "Muestras Secuenciadas del Fragmento"
041 .Replacement.Text =
042 "MuestrasSecuenciadasdelFragmento"
043 .Forward = True
044 .Wrap = wdFindContinue
045 .Format = False
046 .MatchCase = False
047 .MatchWholeWord = False
048 .MatchAllWordForms = False
049 .MatchSoundsLike = False
050 .MatchWildcards = True
051 End With
052 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
053 With Selection.Find
054 .Text = "Explicacion: El salto de linea se codifica en
055 busqueda como '^13', en reemplazo como '^p'. Fuente:
056 http://word.mvps.org/fags/general/usingwildcards.htm"
057 .Replacement.Text = ""
058 .Forward = True
059 .Wrap = wdFindContinue
060 .Format = False
061 .MatchCase = False
062 .MatchWholeWord = False
063 .MatchAllWordForms = False
064 .MatchSoundsLike = False
065 .MatchWildcards = True
066 End With
067 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
068 Rem el otro titulo
069 With Selection.Find
070 .Text = "--Eliminar--"
071 .Replacement.Text = ""
072 .Forward = True
073 .Wrap = wdFindContinue
074 .Format = False
075 .MatchCase = False
076 .MatchWholeWord = False
077 .MatchAllWordForms = False
078 .MatchSoundsLike = False
079 .MatchWildcards = True
080 End With
081 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
082
083 With Selection.Find
084 .Text = "p"
085 .Replacement.Text = ""
086 .Forward = True
087 .Wrap = wdFindContinue
088 .Format = False
089 .MatchCase = False
090 .MatchWholeWord = False
091 .MatchWildcards = False
092 .MatchSoundsLike = False
093 .MatchAllWordForms = False
094 End With
095 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
096
097 With Selection.Find
098 .Text = "m"
099 .Replacement.Text = ""
100 .Forward = True
101 .Wrap = wdFindContinue
102 .Format = False
103 .MatchCase = False
104 .MatchWholeWord = False
105 .MatchWildcards = False
106 .MatchSoundsLike = False
107 .MatchAllWordForms = False
108 End With
109 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
110
111 With Selection.Find
112 .Text = "VerSecuenciasPorFragmentos"
113 .Replacement.Text = ""
114 .Forward = True
115 .Wrap = wdFindContinue
116 .Format = False
117 .MatchCase = False
118 .MatchWholeWord = False
119 .MatchWildcards = False
120 .MatchSoundsLike = False
121 .MatchAllWordForms = False
122 End With
123 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
124
125 With Selection.Find
126 .Text = "<br>"
127 .Replacement.Text = "^p"
128 .Forward = True
129 .Wrap = wdFindContinue
130 .Format = False
131 .MatchCase = False
132 .MatchWholeWord = False
133 .MatchWildcards = False
134 .MatchSoundsLike = False
135 .MatchAllWordForms = False
136 End With
137 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
138
139 With Selection.Find
140 .Text = ""
141 .Replacement.Text = ""^p"
142 .Forward = True
143 .Wrap = wdFindContinue
144 .Format = False
145 .MatchCase = False
146 .MatchWholeWord = False
147 .MatchWildcards = False
148 .MatchSoundsLike = False
149 .MatchAllWordForms = False
150 End With
151 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll 'esto
152 quita espacios
153 With Selection.Find
154 .Text = " "
155 .Replacement.Text = "-"
156 .Forward = True
157 .Wrap = wdFindContinue
158 .Format = False
159 .MatchCase = False
160 .MatchWholeWord = False
161 .MatchWildcards = False
162 .MatchSoundsLike = False
163 .MatchAllWordForms = False
164 End With
165 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
166
167 Rem para el nuevo formato de los 2 tipos de
168 secuencias
169 With Selection.Find
170 .Text = ""^p"
171 .Replacement.Text = ""
172 .Forward = True
173 .Wrap = wdFindContinue
174 .Format = False
175 .MatchCase = False
176 .MatchWholeWord = False
177 .MatchWildcards = False
178 .MatchSoundsLike = False
179 .MatchAllWordForms = False
180 End With
181 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
182
183 With Selection.Find
184 .Text = "<p>"
185 .Replacement.Text = ""^p"
186 .Forward = True
187 .Wrap = wdFindContinue
188 .Format = False
189 .MatchCase = False
190 .MatchWholeWord = False
191 .MatchWildcards = False
192 .MatchSoundsLike = False
193 .MatchAllWordForms = False
194 End With
195 Selection.Find.Execute Replace:=wdReplaceAll
196
197 ' Formato del documento
198 '
199 Selection.WholeStory
200 With Selection.ParagraphFormat
201 .SpaceBeforeAuto = False
202 .SpaceAfterAuto = False
203 .LineSpacingRule = wdLineSpaceSingle
204 .LineUnitBefore = 0
205 End With
206
207 ' Exportar documento
208 '
209 ActiveDocument.SaveAs FileName:= _
210 "InformeDeSecuencias-exportado.txt", FileFormat:=
211 wdFormatText, LockComments:=False, Password:="",
212 AddToRecentFiles:=True, _
213 WritePassword:="", ReadOnlyRecommended:=False,
214 EmbedTrueTypeFonts:=False, _
215 SaveNativePictureFormat:=False,
216 SaveFormsData:=False, SaveAsAOCELetter:=
217 False, Encoding:=1252, InsertLineBreaks:=False,
218 AllowSubstitutions:=False,
219 LineEnding:=wdCRLF
220 Salida = MsgBox("He creado el archivo de texto '
221 InformeDeSecuencias-exportado.txt'.", vbOKOnly, "Programa
222 ejecutado correctamente")
223
224 End Sub

```

No es complicado crear un botón en la barra de tareas para ejecutarlo automáticamente:

"\$" InformeDeSecuenciasATexto

Se lanza un cuadro de mensaje que informa del nombre de nuevo archivo, que se ha creado en el mismo directorio:

He creado el archivo de texto 'InformeDeSecuencias-exportado.txt'.

Aceptar

El documento de Word se encuentra ahora formateado correctamente:

>SEQ-OXT_PCRa>

```
gacataaccttgacccGGCACAGCCCCGTGCAAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGGCTGACCCGCGGCGGCGCGCTGTGACCACT
CATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCACACRCGGCCGCCGGGCTTAAAGGCCAGACCCGAGAGACGGCCGAGTCCCCGGCC
CGGAGCCAGCGCTGTGCACCATGGCAGGTTCAGCCTCGCCTGCTGCTGCTGCGGCTCCTGGCGTTGACCTCCGCTGTGACATTC
AGAACTGCCCTTGGGCGGCAAGCGTGCCTGACCTCGACGTGCGCACGGTGAGCGCCCGCCCTCGTCCGCTGGCTCTCGGGGCG
TGGCAGGCCCGCTGCCACAGGGTGCCTCCGCCGCCCGCTTCCCGCCCTGACCGGTACCGGCCCACTAGCCTGGGAATCGAGGGA
GCGGAGGAGCTTTGACTGCCCTCCTTCGACCAATTCTGAGCCCAAAGAGAGCGGGGAAGACCCGCCATCTCCCGCGCTCCTCAGGCCG
CCCTCGCCCGCCGGCTCAGCCCCCACCACAGGGTCTCCCTCCCGGCCGGTCCCTCCCGGCCGGCTCATCCCCGCCCTCCCG
CCAGTGTCTCCCTGCGGCCCGGGGGCAAGGCCGCTGCTTCGGGCCAGCATCTGCTGCGGGGACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCA
CGGCCGAGGCGCTGCGCTGCCGAGAGGAGAACTACCTGCCGTGCGCTGCGCAGTCCGGCCAGAACCCCTGCGGGAGCGGGGGCGCTGC
GCCGCCCGGSATCTGCTGCAGCCCGGGTGAGTCCGGCAGGGGCGAGACGGGGCGGGGCTCCGGAAACAGGCGGGCGGGCCAGGG
TGGCCCTGACTCGGCGTCTCTGTGTCAGAGGCTGCCACGCGGATCCCGCTGCGACCCGAGGCCGcCTTCTCCcAGCACTGAgaac
grccgg*
```

>3198:918::UP:4:BR10432:26/11/08-1

```
-----taaccttgacccggcAcagCCCCTGCAaaTGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGGCTGACCCGCGGCGGCGCGCTGTGACCACTGACGGCTG
CCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCCAcagGGCGCGGGGCTTAAAGGCCAGACCCGAGAGACGGCCGCGAGTCCCGGCCCGGAGGCCAGCGCTGTGA
CCATGGCAGGTTCAGCCTCGCTGCTGCTGCTGCGGCTCCTGGCGTTGACCTCCGCTGCTACATTCAGAACTGCCCTGGGCGGCAAGCGTGGCG
TGCTGAGCTTCGACGTGCGCAGCGTGAGCGCCCGCTGCTCCGCTGCTGCGGGCTGCGAGGCGCGCTGCCACAGGGTGCCTCCCGGCCCGCCCT
TTCCCGCTGACCGGTACCGGCCCACTAGCCTGGGAATCGAGGAGCGgaggaGCTTTGACTGcCctccttCGAccAATTCTGAGCCCAagag
agcggggAAGACCCGCTATCccgcGCTcctcagggcgccCtgcggcgccgggctCAGcCccccacccCacaggggtctcctccccggcGgttcccCt
ccggCcccgGCTcaTccccgcctcccgccagtgctccccTgcggcccgggggCaaagggcgctgctcggggccagcatctgctcgggggac*
```

>3198:922::UP:332:BR10432:26/11/08-2

Y se ha creado un nuevo archivo de lista de secuencias en formato FASTA, que puede ser abierto por cualquier programa de edición de texto:

1 >SEQ-OXT_PCRa>

```
2 gacataaccttgacccGGCACAGCCCCGTGCAAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGGCTGACCCGCGGCGGCGCGCTGTGA
CCAGTTCATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCACACRCGGCCGCCGGGCTTAAAGGCCAGACCCGAGAGACGGCCGCA
GTCCCGGCCCGGAGCCAGCGCTGTGCACCATGGCAGGTTCAGCCTCGCCTGCTGCTGCTGCTGCGGCTCCTGGCGTTGACCT
CGCGCTGCTCATTCAGAACTGCCCTTGGGCGGCAAGCGTGCCTGCTGACCTCGACGTGCGCACGGTGAGCGCCCGCCCT
CGTCCCGTGGCTCTCGGGCTGGCAGGCCGCTGCCACAGGGTGCCTCCGCCCGCGCCCTTTCCCGCCCTGACCGGTACCGGC
CCACCTAGCCTGGGAATCGAGGAGCGGAGGAGCTTTGACTGCCCTCCTTCGACCAATTCTGAGCCCAAAGAGAGCGGGGAA
GACCCGCCATCTCCCGCGCTCCTCAGGCCGCTCGCCCGCCCGGCTCAGCCCCCACCACAGGGTCTCCCTCCCGGCCG
TCCCTCCCGGCCCGGCTCATCCCCGCCCTCCCGCCAGTGTCTCCCTGCGGCCCGGGGGCAAGGCCGCTGCTTCGGGCC
AGCATCTGCTGCGGGGACGAGTGGGCTGCTTCGTGGGACGGCCAGGGCGTGCCTGCGGAGAGGAGAACTACCTGCCGTG
CCCTGCCAGTCCGGCCAGAACCTGCGGGAGCGGGGGCGCTGCGCCCGCGCGGSATCTGCTGCAGCCCGGGTGAGTCCGGC
AGGGGCGGAGACGGGGCGGGGCTCCGGAAACAGGCGGGCGGGCCAGGGTGGGCTGACTCGGCGTCTCTGTGTCAGAGGGC
TGCCACGCGGATCCCGCTGCGACCCGAGGCCGcCTTCTCCcAGCACTGAgaacgrccgg*
```

3 >3198:918::UP:4:BR10432:26/11/08-1

```
4 -----taaccttgacccggcAcagCCCCTGCAaaTGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGGCTGACCCGCGGCGGCGCGCTGTGA
CCAGTTCATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCCAcagGGCGCGGGGCTTAAAGGCCAGACCCGAGAGACGGCCGCA
GTCCCGGCCCGGAGCCAGCGCTGTGCACCATGGCAGGTTCAGCCTCGCCTGCTGCTGCTGCTGCGGCTCCTGGCGTTGACCT
CCGCTGCTGACATTCAGAACTGCCCTTGGGCGGCAAGCGTGCCTGCTGACCTCGACGTGCGCACGGTGAGCGCCCGCCCT
CGTCCCGTGGCTCTCGGGCTGGCAGGCCGCTGCCACAGGGTGCCTCCGCCCGCGCCCTTTCCCGCCCTGACCGGTACCGGC
CCACCTAGCCTGGGAATCGAGGAGCGgaggaGCTTTGACTGcCctccttCGAccAATTCTGAGCCCAagagagcggggAA
GACCCGCCATCTccgcGCTcctcagggcgccCtgcggcgccgggctCAGcCccccacccCacaggggtctcctccccggcGgttcccCt
cccgCcccgGCTcaTccccgcctcccgccagtgctccccTgcggcccgggggCaaagggcgctgctcggggccagcatctgctcgggggac*
```

5 >3198:922::UP:332:BR10432:26/11/08-2

6 -----

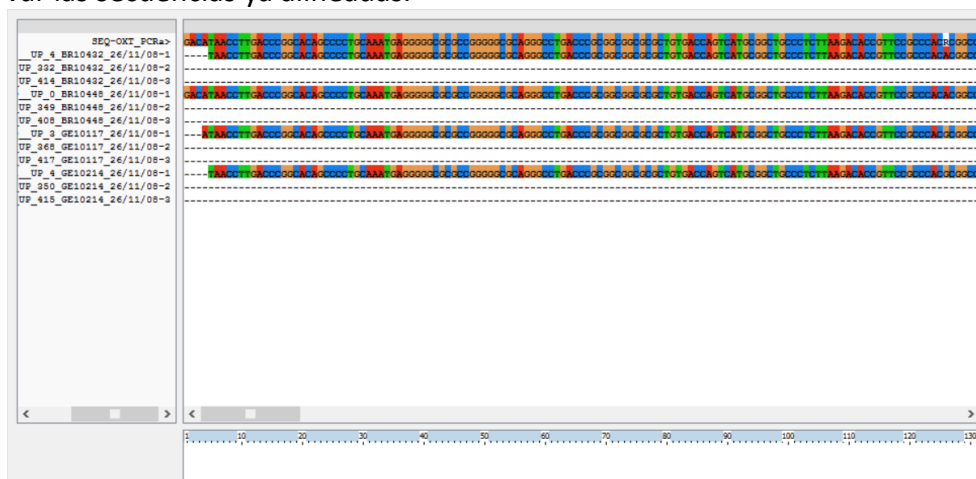
Si se quita el ajuste de línea, se puede ver que las secuencias están alineadas:

```

1 >SEQ-OXT_PCra>
2 gacataaccttgaccggcACAGCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGCCTGACCCGCGGGCGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCT
3 >3198:918::UP:4:BR10432:26/11/08-1
4 ----taaccttgaccggcAcagCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGCCTGACCCGCGGGCGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCT
5 >3198:922::UP:332:BR10432:26/11/08-2
6 -----
7 >3198:926::UP:414:BR10432:26/11/08-3
8 -----
9 >3199:919::UP:0:BR10448:26/11/08-1
10 gacataaCcttgaccggcAcagcCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGCCTGACCCGCGGGCGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCT
11 >3199:923::UP:349:BR10448:26/11/08-2
12 -----
13 >3199:927::UP:408:BR10448:26/11/08-3
14 -----
15 >3200:920::UP:3:GE10117:26/11/08-1
16 ---ataaccttgaccggcAcagcCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGCCTGACCCGCGGGCGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCT
17 >3200:924::UP:368:GE10117:26/11/08-2
18 -----
19 >3200:928::UP:417:GE10117:26/11/08-3
20 -----
21 >3201:921::UP:4:GE10214:26/11/08-1
22 ----taaccttgaccggcAcagcCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGCCGGGGGCGCAGGGCCTGACCCGCGGGCGCGCTGTGACCAAGTCATGCGGCT
23 >3201:925::UP:350:GE10214:26/11/08-2
24 -----

```

Al abrir este archivo en un programa de alineamiento, como ClustalX2, se pueden observar las secuencias ya alineadas.



8.1.6.32 Ver Mutaciones Puntuales

Consultar mutaciones puntuales:

Lista las mutaciones puntuales de la base de datos.

Fragmento	Mutación puntual	Genotipo	Posició	Base inicial	Base final	Secuencia
GH-I1-I4	T90C-GH-I1-I4	GH-I1-I4	90 T	C		TCCCCTCCATTAGCGTGTCTTAAGGGGGTC
GHR-E10	A682G-GHR-E10>	GHR-E10>	682 A	G		GGGTTTGTATATGATTTTGTACTGATTAC
GHR-E10	G934A-GHR-E10>	GHR-E10>	934 G	A		GGGTTTGTATATGATTTTGTACTGATTAC

El contenido de la tabla de resultados es el siguiente:

Fragmento: Nombre del fragmento al que pertenece la mutación.

Mutación puntual: Nombre de la mutación puntual. Es un nombre único que se le asigna a la mutación puntual. Suele seguir este convenio: Mutación_puntual = Base_inicial + Posición + Base_final + GUION + Fragmento.

Genotipo: Genotipo a que pertenece la mutación puntual.

Posición: Base en la que se localiza la mutación puntual. Esto es, la base de la secuencia a la que afecta.

Base inicial: Base que se encuentra en la secuencia no mutada en la posición indicada.

Base final: Base que se encuentra en la secuencia mutada en la posición indicada.

Secuencia: Secuencia de nucleótidos sobre la que localizar la posición de la mutación.


```

Genotipo      OXI-E2>AGAGA
secuencia     CAGTGTCTCCCTGCGGCCCGGGGGCAAAGGCCGCTGCTTCGGGCCAGCATCTG
                  CTGCGGGGACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCACGGCCGAGGCGCTGCGCTGCCGAG
                  AGGAGAACTACCTGCCCTGCCCTGCCAGTCCGGCCAGAAGCCCTGCGGGAGCGGG
                  GGCCGCTGCGCCCGCCCGGGATCTGCTGCAGCCCGGGTGAGTCCGGCAGGGGCCG
                  AGACGGGGCCGGGGCTCCGGAACAGGCGGGCCGGGCCAGGGTGCCCTGACTCGG
                  CGTCTCTCTGTGCA
--Código para representación con Artemis: --
LOCUS      OXI-E2      294 bp      DNA      linear
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..294
                        /note="Genotipo:OXI-E2>AGAGA"
     variation          49
                        /label="A"
                        /SNP="A"
     variation          110
                        /label="G"
                        /SNP="G"
     variation          119
                        /label="A"
                        /SNP="A"
     variation          189
                        /label="G"
                        /SNP="G"
     variation          249
                        /label="A"
                        /SNP="A"
BASE COUNT    33 a    103 c    120 g    38 t
ORIGIN
1  CAGTGTCTCC  CTTGCGGCC  CGGGGGCAA  GGCCGCTG  TCGGGCCAG  CATCTGCTG
61 GGGGACGAGC  TGGGCTGCT  CGTGGGCAC  GCCGAGGCG  TCGCTGCCG  AGAGGAGAAC
121 TACCTGCCGT  CGCCCTGCCA  GTCCGGCCAG  AAGCCCTGCG  GGAGCGGGG  CCGCTGCGCC
181 GCGCCCGGGA  TCTGCTGCAG  CCGGGGTGAG  TCCGGCAGGG  GCCGAGACGG  GGCCGGGGCT
241 CCGGAACCAG  GCGGGCCGGG  CCAGGGTGCC  CCTGACTCGG  CGTCTCTCTG  TGCA
//
--Fin del código para representación con Artemis: --

```

Los genotipos están agrupados por fragmentos.

El informe no contiene el número de página ni la fecha de impresión para evitar que interfieran en los códigos de representación que desborden la página en que comienzan. En caso contrario, al pegar estos códigos habría que limpiar esta información.

Para operar cómodamente con los datos del informe, debe ser convertido en un archivo de texto enriquecido. Para ello se pulsa en:



Word

Exportar el objeto seleccionado a texto enriquecido

Este puede ser abierto con editores de texto como el Word:

```

Genotipo      OXI-E2>AGAGA
secuencia     CAGTGTCTCCCTGCGGCCCGGGGGCAAAGGCCGCTGCTTCGGGCCAGCATCTG
                  CTGCGGGGACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCACGGCCGAGGCGCTGCGCTGCCGAG
                  AGGAGAACTACCTGCCCTGCCCTGCCAGTCCGGCCAGAAGCCCTGCGGGAGCGGG
                  GGCCGCTGCGCCCGCCCGGGATCTGCTGCAGCCCGGGTGAGTCCGGCAGGGGCCG
                  AGACGGGGCCGGGGCTCCGGAACAGGCGGGCCGGGCCAGGGTGCCCTGACTCGG
                  CGTCTCTCTGTGCA
--Código para representación con Artemis: --
LOCUS      OXI-E2      294 bp      DNA      linear
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..294
                        /note="Genotipo:OXI-E2>AGAGA"
     variation          49
                        /label="A"
                        /SNP="A"
     variation          110
                        /label="G"
                        /SNP="G"
     variation          119
                        /label="A"
                        /SNP="A"
     variation          189
                        /label="G"
                        /SNP="G"
     variation          249
                        /label="A"
                        /SNP="A"
BASE COUNT    33 a    103 c    120 g    38 t
ORIGIN
1  CAGTGTCTCC  CTTGCGGCC  CGGGGGCAA  GGCCGCTG  TCGGGCCAG  CATCTGCTG
61 GGGGACGAGC  TGGGCTGCT  CGTGGGCAC  GCCGAGGCG  TCGCTGCCG  AGAGGAGAAC
121 TACCTGCCGT  CGCCCTGCCA  GTCCGGCCAG  AAGCCCTGCG  GGAGCGGGG  CCGCTGCGCC
181 GCGCCCGGGA  TCTGCTGCAG  CCGGGGTGAG  TCCGGCAGGG  GCCGAGACGG  GGCCGGGGCT
241 CCGGAACCAG  GCGGGCCGGG  CCAGGGTGCC  CCTGACTCGG  CGTCTCTCTG  TGCA
//
--Fin del código para representación con Artemis: --

```

Se debe copiar el texto contenido entre las marcas "--Código para representación con Artemis--" y "--Fin del código para representación con Artemis--"

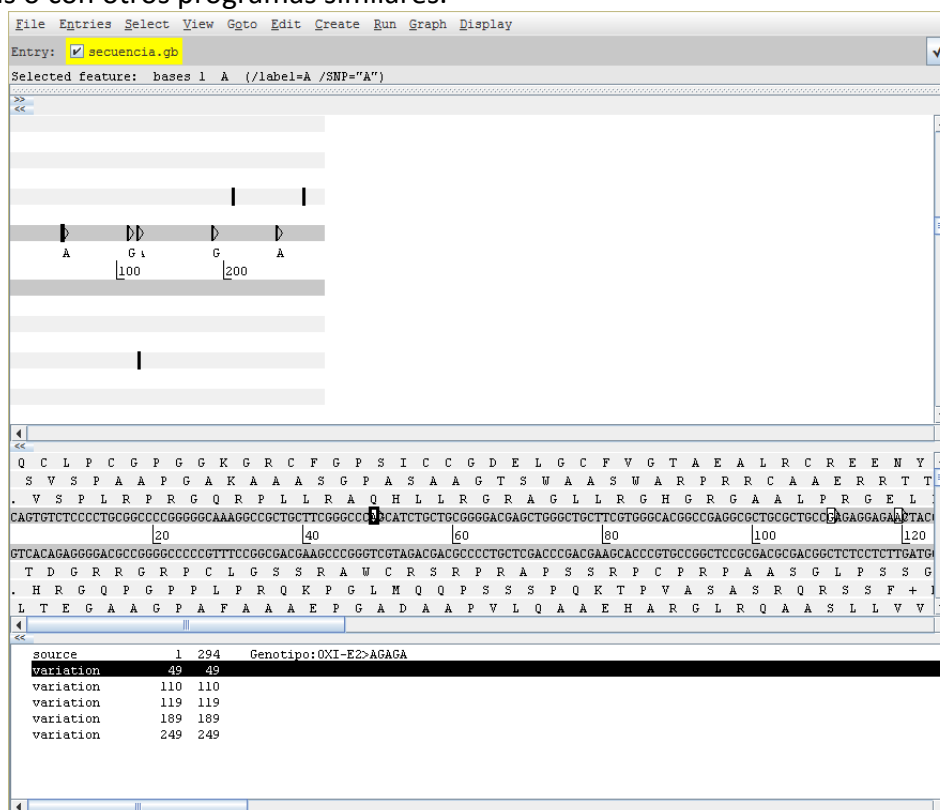
Al pegarlo en un documento de texto se obtiene un archivo de secuencia con la información almacenada:

```

1 LOCUS      OXI-E2                294 bp    DNA     linear
2 FEATURES                                Location/Qualifiers
3     source                1..294
4     variation              /note="Genotipo:OXI-E2>AGAGA"
5     variation              49
6     variation              /label="A"
7     variation              /SNP="A"
8     variation              110
9     variation              /label="G"
10    variation              /SNP="G"
11    variation              119
12    variation              /label="A"
13    variation              /SNP="A"
14    variation              189
15    variation              /label="G"
16    variation              /SNP="G"
17    variation              249
18    variation              /label="A"
19    variation              /SNP="A"
20 BASE COUNT   33 a   103 c   120 g   38 t
21 ORIGIN
22     1 CAGTGTCTCC CCTGCGGCC CGGGGGCAAA GGCCGCTGCT TCGGGCCCAG CATCTGCTGC
23     61 GGGGACGAGC TGGGCTGCTT CGTGGGCACG GCCGAGGCGC TCGCTGCCG AGAGGAGAAC
24    121 TACCTGCCGT CGCCCTGCCA GTCCGGCCAG AAGCCCTGCG GGAGCGGGGG CCGCTGCGCC
25    181 CGCGCCGGGA TCTGCTGCAG CCCGGGTGAG TCCGGCAGGG GCCGAGACGG GGCCGGGGCT
26    241 CCGGAACCAG GCGGGCCGGG CCAGGGTGGC CTGACTCGG CGTCTCTCTG TGCA
27 //

```

Este archivo puede ser procesado por programas de edición de secuencias como Artemis o con otros programas similares.



8.1.6.34 Ver Secuenciaciones De Las PCRs

Ver Secuenciaciones de las PCRs:

Lista los protocolos de secuenciación asignados a cada PCR.

nº	Protocolo PCR	Protocolo Secuenciación	Fragmento	Día de secue	Programa 2º	Incidenias	Tipo de PCR	Funciona	Falla
67	PCR-DGAT1-E8/2<67	SEC-DGAT1-E8/2<15	DGAT1-E8/2	27/03/03-1	1-60		Secuenciación	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
57	PCR-DGAT1-E8/2<57	SEC-DGAT1-E8/2<160	DGAT1-E8/2	11/02/03-1	1-secuencia60	El gel está marcado como que hubiera corrido el	Amplificación	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

El significado de los campos de la lista es el siguiente:

Nº: Número de identificación del protocolo de PCR.

Protocolo PCR: Código de identificación del protocolo de PCR. Es su nombre.

Protocolos Secuenciación: Código de identificación del protocolo de secuenciación.

Fragmento: Nombre del fragmento amplificado y secuenciado.

Día de secuenciación: Código del día en que se realizó la secuenciación.

Programa 2º: Programa de la PCR de secuenciación.

Incidenias: Información adicional.

Tipo de PCR: Tipo de PCR del protocolo de PCR.

Funciona: Si está marcado indica que el protocolo de PCR ha funcionado correctamente.

Falla: Si está marcado indica que el protocolo de PCR no funciona adecuadamente. No debería estar marcado a la vez que “Funciona”.

8.1.6.35 Ver Secuenciaciones De Las PCRs Por Número

Ver Secuenciaciones de las PCRs por número:

Lista los protocolos de secuenciación asignados a una PCR. Pide en número de identificación de la PCR deseada para filtrar la lista.

Nº de PCR

251

Aceptar Cancelar

Al pulsar en “Aceptar” muestra la lista de resultados. Lo habitual es obtener 2 registros que se corresponden con la secuenciación desde el extremo UP y desde el DN.

nº	Protocolo PCR	Protocolo Secuenciación	Fragmento	Día de secue	Programa 2º	Incidenias	Tipo de PCR	Funciona	Falla
251	PCR-PRL-I4<251	SEC-PRL-I4<141	PRL-I4	14/08/01-1			Amplificación	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
251	PCR-PRL-I4<251	SEC-PRL-I4<143	PRL-I4	14/08/01-2			Amplificación	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

El significado de los campos de la lista es el siguiente:

Nº: Número de identificación del protocolo de PCR.

Protocolo PCR: Código de identificación del protocolo de PCR. Es su nombre.

Protocolos Secuenciación: Código de identificación del protocolo de secuenciación.

Fragmento: Nombre del fragmento amplificado y secuenciado.

Día de secuenciación: Código del día en que se realizó la secuenciación.

Programa 2º: Programa de la PCR de secuenciación.

Incidenias: Información adicional.

Tipo de PCR: Tipo de PCR del protocolo de PCR.

Funciona: Si está marcado indica que el protocolo de PCR ha funcionado correctamente.

Falla: Si está marcado indica que el protocolo de PCR no funciona adecuadamente. No debería estar marcado a la vez que “Funciona”.

8.1.6.36 Ver Secuencias De Referencia

Ver secuencias de referencia:

Muestra las secuencias de referencia y la lista de secuencias consenso que las generan.

Secuencias de Referencia

Ir a

Secuencia

Comentarios

Referidoras	Longitud	Revisada	Alineada	Incremento
▶ SEQ-DGAT1-E8/2>20030211	273	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	6.942
SEQ-DGAT1-E8/2>20030218	282	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	6.934
SEQ-DGAT1-E8/2>20030327	276	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	6.941

Ir a: Muestra una lista desplegable con las secuencias de referencia registradas en la base de datos. Al seleccionar una se presentan los datos de dicha secuencia. Estos son:

Secuencia: Nombre de la secuencia. Es su código de identificación en la base de datos y debe ser único.

Comentarios: Información adicional.

Lista de secuencias **referidoras**. Estas son aquellas muestras consenso que tienen como referencia la actual. Se recogen los siguientes datos de cada secuencia:

Nombre: Nombre de la secuencia. Es su código de identificación en la base de datos y debe ser único.

Longitud: Longitud, en pb, de la secuencia consenso.

Revisada: Indica si el alineamiento de las muestras secuenciadas, que generan la muestra consenso, ha sido revisado o no.

Alineada: Indica si la secuencia consenso ha sido alineada con la secuencia de referencia. Dicho de otro modo: si comparten el mismo sistema de coordenadas para la numeración de los nucleótidos.

Incremento: Es el número de bases que hay que añadir a la secuencia consenso para que alinee con la de referencia.

8.1.6.37 Ver Secuencias Consenso

Consultar secuencias consenso:

Muestra las secuencias consenso almacenadas en la base de datos.

Fragmento	Nombre de secuencia	Longitud	secuencia	NºBD
GHR-E8	SEQ-GHR-E8>	345	tgtGgCTATCAAGTGAATCATTGACTTTAC	47
GHR-E8	SEQ-GHR-E8>consenso28-7-04	343	TGTGGCTATCAAGTGAATCATTGACTTTA	48
OXI-E1	SEQ-OXI-E1>	275	CCGAGAGACGGCCGAGTCCCCGGCCCGG	49
OXI-E2	SEQ-OXI-E2>GACA	295	CAGTGTCTCTCCCTGCGGCCCGGGGCAA	50

El contenido de esta consulta es el siguiente:

Fragmento: Fragmento al que pertenecen las secuencias.

Nombre de secuencia: Nombre de la secuencia consenso en la base de datos. Por convenio, aquellas que provienen del alineamiento de muestras secuenciadas

almacenadas en la base de datos se nombran mediante esta fórmula: "SEQ-" + genotipo.

Longitud: Número de pares de bases de la secuencia consenso.

Secuencia: Cadena de nucleótidos de la secuencia consenso.

NºBD: Número de la secuencia consenso en la base de datos.

8.1.6.38 Ver SNPs de Muestras Secuenciadas

Ver SNPs de muestras secuenciadas:

Tabla dinámica con los SNPs recogidos en las muestras secuenciadas. La consulta que la genera tiene muchos datos para poder emplearlos en la tabla que se desee.

genera todos los datos para poder imprimirlos en la tabla que se desea.									
Tipo ▾	Raza ▾	Revisada ▾							
SNP	Todas	Todas							
			Fragmento ▾	Inicio ▾					
			PRL2-E2						
			3559		3585		3617		
			+ -		+ -		+ -		
NombreMuestra ▾	Muestra ▾	Nucleótido ▾	Muestra ▾	Nucleótido ▾	Muestra ▾	Nucleótido ▾			
AW 2	+	-	283 A						
AW 4	+	-			119 C				
BD 8086	+	-			114 A				
BD-460	+	-	281 A						
			109 A						
BD-5025	+	-			122 c				
BD-6019	+	-			89 C				

La tabla presenta, para cada posición marcada en la secuencia, la base y el código de la muestra en la que se encuentra. Los resultados están agrupados por nombre de la muestra pues a un mismo animal se le puede haber extraído ADN en más de una ocasión (Ej. BD-460).

La tabla permite filtrar por Tipo (de característica, en este caso sólo se muestran los SNPs), Raza (del animal), Revisada (si el alineamiento está revisado o no), Fragmento e Inicio de la característica (en el caso de los SNPs es equivalente a la posición porque el inicio es igual al final).

8.1.6.39 Ver SNPs Y Valoración De Muestras Secuenciadas

Ver SNPs y Valoración de Muestras Secuenciadas:

Tabla dinámica con los SNPs recogidos en las muestras secuenciadas y la valoración genética. Esta consulta está optimizada para que no haya valores repetidos para cada animal y pueda ser copiada fácilmente a Excel.

animal y pueda ser copiada fácilmente a Excel.

Tipo ▾	Raza ▾	Revisada ▾	Alineada ▾										
(Varios elementos)	Todas	Todas	Todas										
				Fragmento ▾	Inicio ▾								
				OXI-E2									
				1193		1254		1263		1333		1393	
				+ -		+ -		+ -		+ -		+ -	
AnimalID ▾	ValorGLLeche ▾	ValorGProteína ▾		Nucleótido ▾	Nuecleótido ▾	Nuecleótido ▾	Nuecleótido ▾	Nuecleótido ▾	Nuecleótido ▾				
AW4	▢ (Vacías)	(Vacías)	+ -		G		A		s			A	
BD8016	▢ (Vacías)	(Vacías)	+ -	A	G		A		G				
BD8053	▢ (Vacías)	(Vacías)	+ -	A	G		A		G			A	

La tabla muestra el genotipo de los animales en cada una de las posiciones marcadas por los tipos de características seleccionados. Los campos empleados son:

AnimalID: Nombre del animal.

ValorGLEche: Valor genético para la producción de Leche.

ValroGProteína: Valor genético para la producción de Proteína.

Esta tabla se puede filtrar por los siguientes campos:

Tipo: Tipo de característica que se desea visualizar.

Raza: Raza del animal.

Revisada: Indica si el alineamiento con la secuencia consenso ha sido revisado o no.

Alineada: Indica si ha sido alineada con la secuencia de referencia. Si las secuencias no están alineadas los números de las posiciones podrían diferir por tener distinto origen de coordenadas.

Fragmento: Indica el fragmento de interés.

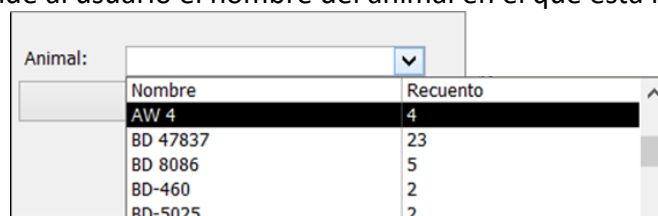
Inicio: Base inicial de la característica, que en el caso de SNPs coincide con la final y, por tanto, marca la posición del SNP.

8.1.6.40 Ver Toda La Secuenciación De 1 Muestra

Toda la secuenciación de una muestra:

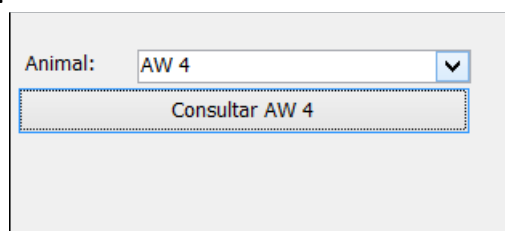
Genera un informe con todos los datos, válidos, de secuenciación de una determinada muestra. Para generarlo es necesario que se encuentren todos los datos requeridos para el informe, en caso contrario mostrará el mensaje advirtiéndolo de que no hay datos.

En primer lugar pide al usuario el nombre del animal en el que está interesado.



Nombre	Recuento
AW 4	4
BD 47837	23
BD 8086	5
BD-460	2
BD-5025	2

El cuadro desplegable muestra el recuento de secuencias registradas en la base de datos para cada animal.



Animal: AW 4

Consultar AW 4

Al pulsar en "Consultar ..." se presenta un informe con los datos de secuenciación de cada una de las muestras:

Experimentos: Datos de secuenciaciónDatos válidos de la muestra: *AW 4*Raza: *Awassi*Caja: *Muestras para variabilidad*Posición: *H3*Número: *24*Muestra: *24*

Fragmento:	PRL2-E2	Secuencia de referencia:	SEQ-PRL2-E2>
Protocolo secuenciación:	SEC-PRL2-E2<4	Incremento:	3508
Día de secuenciación:	16/01/02-1	Longitud:	83
Dye Terminators:	√ 3,0	Clave de muestra secuenciada:	131
Program. seq.:	1-secuencia-56	TCTTGCCTGCTGGTGGTGTCAAATCTACTCTTGTGTGTCAGGGTGTGGTCTCCACTCCTGTCTG TCCCAATGGGCTGGCAACTGC	
Cebador:	PRL2-E2 DN		
Orientación:	UP	Funciona	<input checked="" type="checkbox"/>
Día PCR:	14/01/02-3		
Temperatura PCR:	56		
Cebador UP:	PRL2-E2 UP		
Cebador DN:	PRL2-E2 DN		
[MgCl ₂]:	1,5	β:	0
Programa:	1-56		

Fragmento:	PRL2-E2	Secuencia de referencia:	SEQ-PRL2-E2>
Protocolo secuenciación:	SEC-PRL2-E2<144	Incremento:	3569
Día de secuenciación:	16/01/02-2	Longitud:	71
Dye Terminators:	√ 3,0	Clave de muestra secuenciada:	119
Program. seq.:	1-secuencia-56	TCTTGCCTGCTGGTGGTGTCAAATCTACTCTTGTGTGTCAGGGTGTGGTCTCCACTCCTGTCTG TCCCAATGGGCTGGCAACTGC	
Cebador:	PRL2-E2 UP		
Orientación:	UP	Funciona	<input checked="" type="checkbox"/>
Día PCR:	14/01/02-3		
Temperatura PCR:	56		
Cebador UP:	PRL2-E2 UP		
Cebador DN:	PRL2-E2 DN		
[MgCl ₂]:	1,5	β:	0
Programa:	1-56		

Fragmento:	PRL2-E1	Secuencia de referencia:	SEQ-PRL2-E1>Contenido11-07-01
Protocolo secuenciación:	SEC-PRL2-E1<150	Incremento:	351
Día de secuenciación:	16/07/01-2	Longitud:	109
Dye Terminators:	√ 3,0	Clave de muestra secuenciada:	133
Program. seq.:	1-secuencia-56	TCTTGCCTGCTGGTGGTGTCAAATCTACTCTTGTGTGTCAGGGTGTGGTCTCCACTCCTGTCTG TCCCAATGGGCTGGCAACTGC	
Cebador:	PRL2-E1 UP		
Orientación:	UP	Funciona	<input checked="" type="checkbox"/>
Día PCR:	16/07/01-1		
Temperatura PCR:	57		
Cebador UP:	PRL2-E1 UP		
Cebador DN:	PRL2-E1 DN		
[MgCl ₂]:	1,5	β:	0
Programa:	1-13-v-ep		

Jueves, 15 de enero de 2015

Página 1 de 2

En detalle, el contenido del informe es el siguiente:

Encabezado:

Experimentos: Datos de secuenciaciónDatos válidos de la muestra: *AW 4*Raza: *Awassi*Caja: *Muestras para variabilidad*Posición: *H3*Número: *24*Muestra: *24*

Contiene el título del informe, el nombre de la muestra, la raza de la muestra e información sobre la posición del ADN de la muestra: nombre de la caja, posición, número del pocillo y número de la muestra en la base de datos.

Listado de condiciones de secuenciación:

Fragmento:	PRL2-E2	Secuencia de referencia:	SEQ-PRL2-E2>
Protocolo secuenciación:	SEC-PRL2-E2<4	Incremento:	3508
Día de secuenciación:	16/01/02-1	Longitud:	83
Dye Terminators:	√ 3,0	Clave de muestra secuenciada:	131
Program. seq.:	1-secuencia-56	TCTTGCCTGCTGGTGGTGTCAAATCTACTCTTGTGTGTCAGGGTGTGGTCTCCACTCCTGTCTG TCCCAATGGGCTGGCAACTGC	
Cebador:	PRL2-E2 DN		
Orientación:	UP	Funciona	<input checked="" type="checkbox"/>
Día PCR:	14/01/02-3		
Temperatura PCR:	56		
Cebador UP:	PRL2-E2 UP		
Cebador DN:	PRL2-E2 DN		
[MgCl ₂]:	1,5	β:	0
Programa:	1-56		

Esta tabla contiene la información de cada una de las secuenciaciones:

Fragmento: Fragmento que se ha secuenciado.

Secuencia de referencia: Nombre de la secuencia de referencia de la muestra secuenciada.

Protocolo de secuenciación: Nombre del protocolo de secuenciación empleado.

Incremento: Número de bases que hay que desplazar la secuencia para que alinee con la secuencia de referencia.

Longitud: Longitud de la secuencia.

Día de secuenciación: Código del día que se realizó la secuenciación.

Clave de muestra secuenciada: Código en la base de datos de la muestra secuenciada.

Dye Terminators: Nombre (usualmente la versión) de los colorantes fluorescentes utilizados en la secuenciación.

Program. seq.: Nombre del programa de secuenciación.

Cebador: Nombre del cebador empleado en la 2ª PCR de secuenciación.

Orientación: Orientación en la que se obtuvo la secuencia. UP significa 5'→3'; DN significa 3'→5'.

Funciona: Indica si el protocolo de PCR ha sido marcado como que funciona en la base de datos. En principio, es de esperar que se secuencien PCRs que funcionen.

Día PCR: Día que se realizó la 1ª PCR de amplificación.

Temperatura PCR: Temperatura a la que se realizó la PCR de amplificación.

Cebador UP: Nombre del cebador UP.

Cebador DN: Nombre del cebador DN.

[MgCl₂]: Concentración de Cloruro Magnésico en la 1ª PCR de amplificación.

β: Cantidad de Betaína empleada en la 1ª PCR de amplificación.

Programa: Nombre del programa de la 1ª PCR de amplificación.

Secuencia: La secuencia de nucleótidos de la muestra secuenciada se muestra en el cuadro grande, inferior derecho.

Pié de página:

jueves, 15 de enero de 2015

Página 1 de 2

En el pie se registra el día de impresión del informe y el número de página.

8.1.7 SNPs

Esta sección permite manejar datos de experimentos de detección de SNPs.

The interface shows a top navigation bar with tabs: Datos, PCR, SSCP, Secuenciación, SNPs, Añadir información, Consultar Información, Herramientas, and Ver Tablas. Below this, there are several groups of buttons:

- Añadir información:** +Experimentos SNP, +MegaBACE, +ABI377.
- Añadir más información:** +Protocolos SNP, +ProtocoloCargaABI, +ProtocoloCargaMegaBACE.
- Genotipado KBioscience:** Fenotipos, Fenotipos y Genotipos, Genotipado KBioscience, Tabla de genotipos, Códigos Numéricos de SNPs, Cambiar carácter separador.
- Genotipado Número de copias:** Cuantificaciones, Fenotipos y Genotipos NC, Estadísticas de cuantificación.
- Consultar información:** Buenos, Repetir.

On the right, a yellow sidebar box titled **Añadir Experimentos de SNPs:** contains the text: "Formulario para introducir los datos de los experimentos de SNP. Sólo hace falta rellenar las casillas blancas."

Los botones están agrupados de la siguiente manera:

- **Añadir información:** Estos botones lanzan los formularios de adición de información de SNPs.
- **Consultar información:** Estos botones lanzan la consultas e informes más habituales.
- **Genotipado KBioscience:** Permite consultar datos de genotipado producidos por la empresa KBioscience.
- **Genotipado Numero de copias:** Permite consultar datos de genotipado del número de copias.

8.1.7.1 Más ABI 377

Añadir Protocolos del ABI377:

The form is titled "Añadir Protocolos del ABI377:" and includes the following fields and sections:

- Protocolo:** ABI377 (Nuevo)
- Kit:** 0 Día (dropdown)
- H2O:** 0 Acrilamida en gel 0 %
- Cebador:** 0 Programa2*PCR (+ días button)
- TotalCebador:** 0 (dropdown)
- Condiciones de carga:** (dropdown)
- CondicionCargaABI377 (Nuevo):** A table with columns for components and volume in µl.

Componente	µl
formamida	0
LIZ	0
azul dextrano	0
mezcla	0
DNA	0
cargado	0
- CodigoDia:** (dropdown)

At the bottom, it shows "Registro: 1 de 1" and navigation buttons.

Formulario para almacenar los protocolos de SNPs del secuenciador ABI377. Estos son unos protocolos de detección de SNPs llevados a cabo en el secuenciador de geles de Applied Biosystems® ABI377.

Los campos necesarios para almacenar el protocolo se encuentran sobre la superficie de color azul. Son los siguientes:

Protocolo: Este campo indica el tipo de protocolo (ABI377) y el código de

dicho protocolo. Este es un campo autonumérico, que se rellena automáticamente por el sistema al introducir un nuevo protocolo.

Kit: Cantidad de Kit de detección de SNPs utilizado en el protocolo.

H2O: Cantidad de H₂O de la mezcla de reacción, en microlitros.

Cebador: Cantidad, en microlitros, de cebador de la 2ª PCR. Sólo se refiere al cebador reflejado en el protocolo. Como cada protocolo sólo almacena uno de estos cebadores, hay que rellenar un protocolo distinto para cada uno de los cebadores que participan en una reacción de detección de SNPs.

TotalCebador: Volumen total del conjunto de cebadores, tanto el estudiado como los demás.

Día: Día de la segunda PCR.

Acrilamida en gel: Tanto por ciento de acrilamida en el gel.

Programa PCR: Programa de PCR de la segunda PCR.

Condiciones de carga: Número de identificación de las condiciones de carga utilizadas en el protocolo ABI377. Los detalles concretos de estas condiciones de carga se pueden consultar en el formulario embebido que tiene color rojizo. Al pulsar en el desplegable se muestran los datos de las condiciones de carga registradas para el mismo día que se haya seleccionado en el protocolo actual.

Además de estos campos, el formulario dispone de un botón:

Más días: Llama al [formulario de introducción de días](#) de experimentos.

8.1.7.2 Más Experimentos SNP

Añadir Experimentos de SNPs:

Formulario para introducir los datos de los experimentos de SNP. Sólo hace falta rellenar las casillas blancas.

Los campos necesarios para almacenar cada uno de los experimentos se muestran en la parte de la izquierda, sobre fondo gris. El recuadro de la derecha permite consultar los detalles de los protocolos empleados. Estos campos son los siguientes:

ID SNP: El código de identificación único del experimento del SNP. Es un campo autonumérico, que será rellenado automáticamente por el programa.

Código de día: Código del día de carga del experimento de SNP.

Día: Día de carga del SNP. Al actualizar el contenido de este campo se actualiza el código del día.

Variante: Variante del día de carga del experimento. 2 experimentos que compartan el mismo día no deberían compartir la misma variante para que, así, el código de día sea único. La variante puede seleccionarse como el orden del experimento en el día. Por tanto, el primer experimento tendría la variante 1, el 2º la 2 y así sucesivamente. El campo muestra las variantes disponibles para el día seleccionado. Al actualizar el contenido de este campo se actualiza el código del día.

Muestra: Código de identificación de la muestra de ADN analizada en el experimento. Al pulsar sobre el desplegable se lista la información de las muestras disponibles: Código, Nombre, Fila, Columna y Caja. Al modificar el valor de este campo se actualizan automáticamente los campos Fila y Columna.

Fila: Fila de la caja de ADN en la que se encuentra la muestra elegida. Este campo se actualiza automáticamente al cambiar el valor de "Muestra".

Columna: Número de la columna de la caja de ADN en la que se encuentra la muestra elegida. Este campo se actualiza automáticamente al cambiar el valor de "Muestra".

Primera PCR: Código de la primera PCR, de amplificación del ADN.

Cebador: Nombre del cebador que interroga al SNP.

[cebador]: Concentración del cebador, en micro molar.

Protocolo SNP: Código del protocolo de SNP que se ha utilizado. Al pulsar en el desplegable se muestran los datos de los protocolos de SNP registrados en la base de datos: Protocolo, Secuenciador, Día, ID, Carga. Al modificar este campo se actualizan los campos siguientes: Secuenciador y Día.

Secuenciador: Informa del secuenciador empleado en el protocolo de SNP.

Día: Informa del día del protocolo de SNP.

El grupo "Resultados" contiene los resultados del experimento:

Alelo1: Base obtenida como resultado de uno de los alelos. Puede ser A, C, G o T.

Alelo2: Base obtenida como resultado del otro de los alelos. Puede ser A, C, G o T. En blanco significa homocigoto: como el primer alelo.

Valoración: Valoración del investigador sobre el resultado del experimento. Los valores habituales son Bien o Mal. Indican, respectivamente, si el experimento ha salido bien o mal.

Acción recomendada: Acción posterior recomendada para el experimento. En caso de que haya salido mal se puede Repetir o Finalizar (Abandonar). Si el experimento ha salido bien se suele dejar en blanco.

Alelo3: Este campo sólo se rellena si hay más de 2 alelos en un individuo. Este hecho, por sí mismo, ya constituye un error o algo que debe ser revisado. Por eso, cualquier valor distinto de blanco se representa en color rojo. Puede ser A, C, G o T. En experimentos reales, se puede dar el caso de que un experimento de SNPs produzca más de 2 alelos cuando hay más de una copia de la secuencia que se está interrogando.


Alelo4: Este campo sólo se rellena si hay más de 3 alelos en un individuo. Este hecho, por sí mismo, ya constituye un error o algo que debe ser revisado. Por eso, cualquier


valor distinto de blanco se representa en color rojo. Puede ser A, C, G o T. En experimentos reales, se puede dar el caso de que un experimento de SNPs produzca más de 2 alelos cuando hay más de una copia de la secuencia que se está interrogando.

Comentarios: Información adicional.


El cuadro "Descripción del protocolo" embebe los formularios que permiten revisar los detalles del protocolo utilizado en el experimento de detección de SNPs.

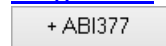
El formulario contiene los siguientes botones:


 **Añadir días:** Llama al [formulario de adición de días](#).

 **Abrir formulario PCR:** Muestra el [formulario de protocolos de PCR](#) con los datos de la primera PCR cargados en él.

 **Añadir protocolos del MegaBACE:** Llama al [formulario de adición de protocolos del MegaBACE](#).

 **Ver protocolo del MegaBACE:** Muestra el [formulario de adición de protocolos del MegaBACE](#) con los datos del protocolo actual cargados en él.

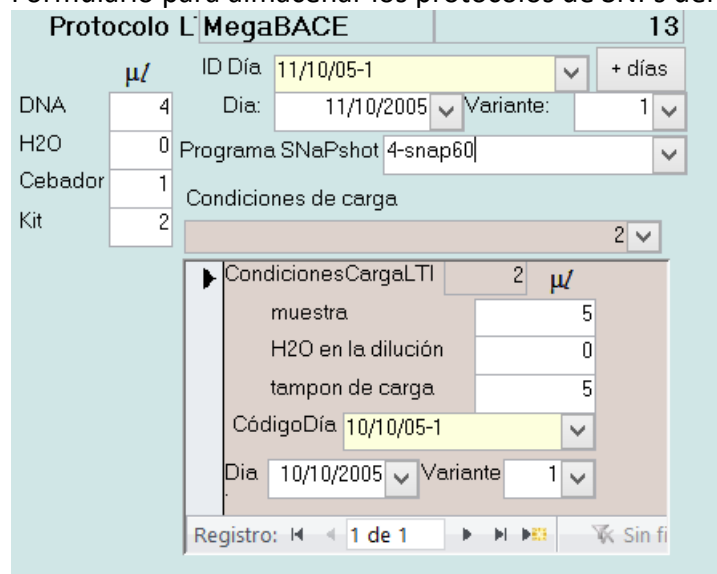
 **Añadir protocolos del ABI377:** Muestra el [formulario de adición de protocolos del ABI377](#).

 **Ver protocolos del ABI377:** Muestra el [formulario de adición de protocolos del ABI377](#) con los datos del protocolo actual cargados en él.

8.1.7.3 Más MegaBACE

Añadir Protocolos del MegaBACE:

Formulario para almacenar los protocolos de SNPs del secuenciador MegaBACE³⁵.



Protocolo L MegaBACE 13

μl

DNA 4 ID Día 11/10/05-1 + días

H2O 0 Día: 11/10/2005 Variante: 1

Cebador 1 Programa SNaPshot 4-snap60

Kit 2 Condiciones de carga

CondicionesCargaLTI 2 μl

muestra 5

H2O en la dilución 0

tampon de carga 5

CódigoDía 10/10/05-1

Día 10/10/2005 Variante 1

Registro: 1 de 1 Sin fi

Los campos necesarios para almacenar el protocolo se encuentran sobre la superficie de color azul. Son los siguientes:

³⁵ MegaBACE 1000 Sequencing System

Protocolo: Este campo indica el tipo de protocolo (MegaBACE) y el código de dicho protocolo. Este es un campo autonumérico, que se rellena automáticamente por el sistema al introducir un nuevo protocolo.

DNA: Microlitros de ADN de la PCR de amplificación utilizados en la 2ª PCR.

H2O: Cantidad de H₂O en la 2ª PCR, en microlitros.

Cebador: Cantidad, en microlitros, de cebador de la 2ª PCR.

Kit: Cantidad de kit de detección de SNPs utilizado en el protocolo.

ID Día: Código de identificación del día de elaboración de la 2ª PCR, de secuenciación.

Día: Día de realización de la 2ª PCR. Al actualizar el contenido de este campo se actualiza el código del día.

Variante: Variante del día de carga del experimento. 2 experimentos que compartan el mismo día no deberían compartir la misma variante para que, así, el código de día sea único. La variante puede interpretarse como el orden del experimento en el día. De esta forma, el primer experimento tendría la variante 1, el 2º la 2 y así sucesivamente. El campo muestra las variantes disponibles para el día seleccionado. Al actualizar el contenido de este campo se actualiza el código del día.

Programa SNaPshot: Programa de la 2ª PCR.

Condiciones de carga: Código de las condiciones de carga empleadas en el protocolo. Los detalles de las condiciones e muestran en el subformulario con fondo rojizo.

8.1.7.4 Más Protocolos Carga ABI 377

Añadir Protocolos de carga del ABI377:

Formulario para almacenar las condiciones de los protocolos de carga del secuenciador ABI377.

CondicionCargaABI377	1	μl
formamida		
LIZ		0
azul dextrano		0
mezcla		0
DNA		0
cargado		0
CodigoDía		

Los campos requeridos son los siguientes:

CondicionCargaABI377: Código de identificación de la condición de carga actual. Este es un campo autonumérico, que se rellena automáticamente al crear una nueva condición.

formamida: Microlitros de formamida en la mezcla de carga.

LIZ: Microlitros de LIZ en la mezcla de carga.

azul dextrano: Microlitros de azul dextrano en la mezcla de carga.

mezcla: Microlitros de mezcla de formamida, LIZ y azul dextrano mezclados con el ADN. Constituyen el tampón de carga.

DNA: Microlitros de la primera PCR de amplificación mezclados con el tampón de carga.

cargado: Microlitros cargados en cada pocillo (tras la desnaturalización).

CodigoDía: Código de identificación del día que se realiza la carga.

8.1.7.5 Más Protocolos Carga MegaBACE

Añadir Protocolos de carga del MegaBACE:

Formulario para almacenar los protocolos de carga del secuenciador MegaBACE.

Los campos requeridos son los siguientes:

muestra: Microlitros de la 2ª PCR cargados en el secuenciador.

H2O en la dilución: Microlitros de H₂O empleados para diluir el ADN.

tampón de carga: Microlitros de tampón de carga.

CódigoDía: Código de identificación del día de elaboración de la 2ª PCR, de secuenciación.

Día: Día de realización de la 2ª PCR. Al actualizar el contenido de este campo se actualiza el código del día.

Variante: Variante del día de carga del experimento. 2 experimentos que compartan el mismo día no deberían compartir la misma variante para que, así, el código de día sea único. La variante puede interpretarse como el orden del experimento en el día. De esta forma, el primer experimento tendría la variante 1, el 2º la 2 y así sucesivamente. El campo muestra las variantes disponibles para el día seleccionado. Al actualizar el contenido de este campo se actualiza el código del día.

8.1.7.6 Más Protocolos SNPs

Añadir Protocolos de SNPs:

Formulario para almacenar los protocolos de SNPs. Sirve para unificar los protocolos de los diferentes secuenciadores. Para ello, basta con que a un protocolo de SNPs se le asigne un protocolo de carga de uno de los secuenciadores. De esta forma la información equivalente de los protocolos de los distintos aparatos queda a disposición de las diferentes consultas de la base de datos.

Note: No debería haber más que un sólo protocolo de aparato por protocolo de SNP. Este diseño permite unir distintos protocolos de SNPs que comparten características similares.

La información que maneja este formulario es la que está impresa sobre fondo grisáceo. Los demás datos son el protocolo del aparato y las condiciones de carga que están representadas, respectivamente, sobre fondo azul y rojizo.

Únicamente hay 2 campos que se deben seleccionar:

Protocolo SNPs nº: Almacena el código de identificación del protocolo de análisis de SNPs. Este es un campo autonumérico, que será rellenado automáticamente por el sistema al crear un nuevo protocolo.

Del MegaBACE/Del ABI377: En cada una de estas pestañas hay un desplegable que permite asociar el protocolo de SNPs a un protocolo de aparato. Al elegir el código se muestra la información de dicho protocolo. Únicamente se debería elegir un código de aparato por código de protocolo de SNPs. La otra pestaña no debe ser rellenada: Aquella pestaña que tiene datos rellenos muestra su título entre asteriscos (Ejemplo: *Del MegaBACE*).

Además hay otro campo:

Observaciones: Información adicional.

Debe recordarse que el objeto de este formulario es unificar la información de los distintos protocolos. Por eso, lo único que debe hacer el usuario es asociar un código de SNPs (genérico) al código del aparato con el que se realizó el protocolo (específico).

+MegaBACE

Más MegaBACE: Este botón permite crear [más protocolos del secuenciador MegaBACE](#).

+ABI377

Más ABI377: Este botón permite crear [más protocolos del secuenciador ABI377](#).

8.1.7.7 Ver Buenos

Informe de protocolos en buen estado:

Informa de los protocolos en buen estado. No hay que repetirlos.

Experimentos SNP en Buen Estado												
Cebador	Protocolo	Muest	Alelos	ID	Día	1ª PCR	[cebador]Valor	Acción	Caja	Fila	Columna	
GHR-E10SNP1 DN	11	720	G G	40	7/10/05-1	PCR-GHR-E10<578	2	Bien	OAR002	B	1	
		721	A A	41	7/10/05-1	PCR-GHR-E10<578	2	Bien	OAR002	C	1	
	15	2240	G G	102	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	D
		2241	G G	103	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	E
		2242	G G	104	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	F
		2243	G G	114	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	G
		2244	G G	115	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	H
		2245	G G	116	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	A
		721	A A	37	7/10/05-1	PCR-GHR-E10<578	20	Bien	OAR002	C	1	
		2240	A A	105	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	20	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	D
		2241	A G	106	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	20	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	E
		2242	A A	107	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	20	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	F
GHR-E10SNP2 UP	15	2243	A A	117	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	20	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	G
		2240	T T	108	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	D
		2241	T T	109	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	E
		2242	T T	110	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	F
GHR-E10SNP3 DN	15	2240	A A	111	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	D
		2241	A G	112	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	E
		2242	G G	113	13/12/05-1	PCR-GHR-E10<639	2	Bien	Finalizar	11	primeros machos de churra 1.4	F
		720	G C	29	4/10/05-1	PCR-GH-14<625	2	Bien	OAR002	B	1	
GH-SNP2 UP	7	722	G C	30	4/10/05-1	PCR-GH-14<625	2	Bien	OAR002	D	1	
		722	G C	32	4/10/05-1	PCR-GH-14<625	2	Bien	OAR002	D	1	
GH-SNP4 UP	9	720	C C	33	4/10/05-1	PCR-GH-14<625	2	Bien	OAR002	B	1	

jueves, 19 de marzo de 2015

Página 1 de 1

El contenido de este informe es el siguiente:

La *cabecera*: indica el nombre del informe y los títulos de las columnas

Experimentos SNP en Buen Estado

Cebador	Protocolo	Muest	Alelos	ID	Día	1ª PCR	[cebador]Valor	Acción	Caja	Fila	Columna
GHR-E10SNP1 DN	11	720	G G	40	7/10/05-1	PCR-GHR-E10<578	2	Bien	OAR002	B	1
		721	A A	41	7/10/05-1	PCR-GHR-E10<578	2	Bien	OAR002	C	1

Información de cada experimento:

GHR-E10SNP1 DN	11	720	G G	40	7/10/05-1	PCR-GHR-E10<578	2	Bien	OAR002	B	1
		721	A A	41	7/10/05-1	PCR-GHR-E10<578	2	Bien	OAR002	C	1

Los campos contenidos son los siguientes:

Cebador: Cebador de la 2ª PCR, de secuenciación.

Protocolo: Código del protocolo de SNPs.

Muestra: Código de la muestra analizada.

Alelos: Combinación de alelos obtenida.

ID: Código de identificación del experimento de SNPs.

Día: Código del día de la 2ª PCR.

1ª PCR: Código de la primera PCR, de amplificación.

Cebador: Microlitros de cebador de la 2ª PCR.

Valoración: Valoración obtenida en el experimento. En este informe sólo se muestran los que están "Bien".

Acción: Acción recomendada. Cuando se encuentra vacío se entiende que se recomienda no hacer nada más o finalizar.

Caja: Caja de la muestra de ADN.

Fila: Coordenada de la fila de la caja en la que se encuentra la muestra de ADN.

Columna: Coordenada de la columna de la caja donde se encuentra la muestra de ADN.

El *pie* contiene información sobre el mismo:

jueves, 19 de marzo de 2015

Página 1 de 1

Fecha: Fecha de generación del informe.

Página: Página y número de páginas del informe.

Los datos están agrupados por cebador y número de protocolo.

8.1.7.8 Ver Repetir

Informe de protocolos a repetir:

Informa de los protocolos que hay que repetir.

Experimentos de SNP que se deben Repetir

Cebador	primera PCR	Protocolo ID	Día	Muestra	File: Column Cebador	Valoración	
GHR-E10SNP1 DN	PCR-GHR-EI 0-631	14	50	10/10/05-1	318	2 1 2 Total	
			49	10/10/05-1	317	Muestra para variabilidad 2	
			70	25/11/05-1	2083	Muestra para variabilidad 2	
	PCR-GHR-EI 0-627	13	72	25/11/05-1	2092	A 1 2 Total	
			71	25/11/05-1	2091	11 primeros madios d e chura 1.2	
			86	12/12/05-1	2237	A 2 2 Total	
	PCR-GHR-EI 0-628	16	101	12/12/05-1	2237	11 primeros madios d e chura 1.2	
			88	12/12/05-1	2239	A 1 2 Total	
			87	12/12/05-1	2238	11 primeros madios d e chura 1.4	
	PCR-GHR-EI 0-639	10	36	7/10/05-1	720	A 1 2 Total	
			34	7/10/05-1	720	DIAR.002	
			51	10/10/05-1	319	DIAR.002	
GHR-E10SNP2 UP	PCR-GHR-EI 0-631	14	51	10/10/05-1	319	Muestra para variabilidad 2	
			75	25/11/05-1	2092	A 2 2 Total	
			73	25/11/05-1	2083	11 primeros madios d e chura 1.2	
	PCR-GHR-EI 0-627	13	75	25/11/05-1	2092	A 2 2 Total	
			73	25/11/05-1	2083	11 primeros madios d e chura 1.2	
			74	25/11/05-1	2091	A 1 2 Total	
	PCR-GHR-EI 0-628	14	74	25/11/05-1	2091	11 primeros madios d e chura 1.2	
			91	12/12/05-1	2239	A 1 2 Total	
			90	12/12/05-1	2238	11 primeros madios d e chura 1.4	
	PCR-GHR-EI 0-639	16	91	12/12/05-1	2239	A 1 2 Total	
			90	12/12/05-1	2238	11 primeros madios d e chura 1.4	
			89	12/12/05-1	2237	A 1 2 Total	
GHR-E10SNP3 DN	PCR-GHR-EI 0-631	12	46	10/10/05-1	721	C 1 2 Total	
			45	10/10/05-1	720	DIAR.002	
			45	10/10/05-1	720	DIAR.002	
	PCR-GHR-EI 0-627	13	78	25/11/05-1	2092	A 2 2 Total	
			76	25/11/05-1	2083	11 primeros madios d e chura 1.2	
			77	25/11/05-1	2091	A 2 2 Total	
	PCR-GHR-EI 0-628	14	77	25/11/05-1	2091	11 primeros madios d e chura 1.2	
			92	12/12/05-1	2237	A 1 2 Total	
			93	12/12/05-1	2238	A 1 2 Total	
	PCR-GHR-EI 0-639	16	94	12/12/05-1	2239	11 primeros madios d e chura 1.4	
			94	12/12/05-1	2239	C 1 2 Total	
			96	12/12/05-1	2238	11 primeros madios d e chura 1.4	
GHR-E10SNP4 2	PCR-GHR-EI 0-631	12	48	10/10/05-1	721	C 1 2 Total	
			47	10/10/05-1	720	DIAR.002	
			47	10/10/05-1	720	DIAR.002	
	PCR-GHR-EI 0-627	13	81	25/11/05-1	2086	D 1 2 Total	
			79	25/11/05-1	2084	A 1 2 Total	
			80	25/11/05-1	2085	C 1 2 Total	
	PCR-GHR-EI 0-628	14	80	25/11/05-1	2085	11 primeros madios d e chura 1.2	
			97	12/12/05-1	2239	C 1 2 Total	
			95	12/12/05-1	2237	A 1 2 Total	
	PCR-GHR-EI 0-639	16	96	12/12/05-1	2238	11 primeros madios d e chura 1.4	
			96	12/12/05-1	2238	A 1 2 Total	
			96	12/12/05-1	2238	11 primeros madios d e chura 1.4	
GHR-E10SNP5 DN	PCR-GHR-EI 0-631	6	27	4/10/05-1	318	A 2 2 Total	
			28	4/10/05-1	319	Muestra para variabilidad 2	
			10	44	7/10/05-1	720	DIAR.002
			43	7/10/05-1	721	DIAR.002	
			42	7/10/05-1	720	DIAR.002	
			42	7/10/05-1	720	DIAR.002	

jueves, 19 de marzo de 2015

Página 1 de 2

jueves, 19 de marzo de 2015

Página 1 de 2

El contenido del informe es el siguiente:

La *cabecera*: indica el nombre del informe y los títulos de las columnas

Experimentos de SNP que se deben Repetir

Cebador	primera PCR	Protocolo	ID	Día	Muestra	Fila: Colum Caja	[cebador]	Valoración
Información de cada experimento:								
GHR-E10SNP1 DN	PCR-GHR-E10<581	14	50	10/10/05-1	318	B 1	2	Mal
			49	10/10/05-1	317	A 1	2	Mal
						Muestras para variabilidad 3		
						Muestras para variabilidad 3		

Los campos contenidos son los siguientes:

Cebador: Nombre del cebador de la 2ª PCR.

primera PCR: Código de la primera PCR.

Protocolo: Código de identificación del protocolo de SNPs.

ID: Código de identificación del experimento.

Día: Día de realización del experimento.

Muestra: Código de identificación de la muestra de ADN.

Fila: Coordenada de la fila de la caja de ADN donde se encuentra la muestra.

Columna: Coordenada de la columna de la caja de ADN donde se encuentra la muestra.

Caja: Nombre de la caja de ADN donde se encuentra la muestra. Este campo se imprime en una fila inferior a los últimos campos de la derecha.

[cebador]: Cantidad de microlitros de cebador empleados en la 2ª PCR.

Valoración: Valoración del resultado del experimento. En este informe sólo se muestran aquellos resultados con valoración "Mal".

El *pie* contiene información sobre el mismo:

jueves, 19 de marzo de 2015

Página 1 de 2

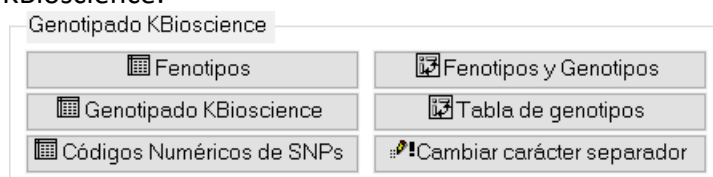
Fecha: Fecha de generación del informe.

Página: Página y número de páginas del informe.

Los datos están agrupados por cebador, primera PCR y protocolo.

8.1.7.9 Genotipado KBioscience

Este grupo contiene botones para mostrar las tablas y consultas necesarias para hacer el estudio de asociación a los datos de genotipado producidos por la empresa KBioscience:



Fenotipos:

Muestra una tabla que almacena la información de los fenotipos de las muestras.

Los datos de esta tabla provienen de fuentes externas (por ejemplo control lechero).

Genotipado KBioscience:

Muestra una tabla que almacena la información de genotipado suministrada por la empresa KBioscience. En esta tabla se pueden añadir nuevos datos.

Además de los datos de la empresa, la tabla contiene un campo adicional "NumeroProyecto" que sirve para distinguir unos proyectos de genotipado de otros. Este número debe ser introducido después de pegar los datos de genotipado.

Códigos Numéricos SNPs:

Muestra una tabla en la que se pueden establecer o consultar los códigos numéricos que van a tener cada uno de los SNPs, tanto de 1 número como de 2 números. Estos códigos son necesarios para generar el archivo que se utilizará en el script de análisis de R.

Tabla de genotipos:

Muestra la tabla generada por la empresa que realizó el genotipado.

Cambiar Carácter Separador:

Una consulta que cambia el carácter de separación de campos. Es útil si se quiere exportar los datos a un formato diferente al de datos separados por espacios.

Ver Fenotipos y Genotipos:

Presenta la tabla que relaciona los genotipos con los fenotipos de las muestras genotipadas. Copiando las filas de esta tabla y pegándolas en un archivo de texto, añadiendo una fila de títulos de campo y sustituyendo tabulaciones por espacios, se obtiene el archivo necesario para ser procesado por el script de R.

8.1.7.9.1 Fenotipos

Fenotipos:

Carga una tabla que almacena la información de los fenotipos de las muestras.

Los datos de esta tabla provienen de fuentes externas (por ejemplo control lechero).

Un ejemplo de un registro de dicha tabla es el siguiente:

Id	Animal_ID	C4:0	C10:0	C6:0	C8:0	C12:0	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1t11	C18:1c9	C18:2c	AGS	C18:3c	CLA	AGS_C
1	AB00204	2,72	7,26	2,33	3,96	5,32	11,3	0,93	19,13	1,22	9,8	2,49	15,4	3,93	69,47	1,78	1,79	16,27
AGS_M	AGS_L	AGI	Mufa	Pufa	AGI:AGS	W6:W3	C14_1:C14_0	C16_1/C16_0	C18:3c_6	C18_1/C18_0	CLA/C18:1t11	C20:4	RCS	Proteína				
19,83	33,37	30,51	21,87	8,64	0,439182381	2,623595506	0,082300885	0,063774177	0,07	1,571428571	0,718875502	0,67	6,41	7,07				
Grasa	Leche	HTD	DIM	AGE	PERM	ID_P	CS											
9,44	1120	14	5	6	1	GE85589												

El significado de cada uno de los campos de esta tabla debe estar definido en la documentación de la base de datos externa. Los campos más relevantes son:

Animal_ID: Código de identificación del animal al que se le aplican los datos fenotípicos. Es el campo que relaciona la base de datos de esta tabla con la base de datos de experimentos.

CS: Es el carácter separador para los archivos CVS generados. En el ejemplo es un espacio en blanco.

8.1.7.9.2 Genotipado KBioscience

Genotipado KBioscience:

Muestra una tabla que almacena la información de genotipado suministrada por la empresa KBioscience. En esta tabla se pueden añadir nuevos datos.

Id	DaughterPlate	Call	MasterPlate	MasterWell	SNPID	X	Y	SubjectID	Norm	Carrier	NumeroProyecto
1	KB471123	T:C	05_CHURRA Sep09		A01 SPP1_SNP01ex1_527	1,13756	0,64448	AB01126			575,008
2	KB471123	T:C	05_CHURRA Sep09		B01 SPP1_SNP01ex1_527	1,14431	0,65662	AB01134			575,008
3	KB471123	T:T	05_CHURRA Sep09		C01 SPP1_SNP01ex1_527	0,31691	0,77483	AB01139			575,008

Además de los datos de la empresa, la tabla contiene un campo adicional “NumeroProyecto” que sirve para distinguir unos proyectos de genotipado de otros. Este número debe ser introducido después de pegar los datos de genotipado.

Los campos más utilizados de esta tabla son:

Call: Es el resultado del genotipado. Informa de los 2 alelos encontrados en la posición.

SubjectID: El código de identificación del animal estudiado.

NumeroProyecto: Código de identificación del proyecto.

8.1.7.9.3 Códigos Numéricos SNPs

Códigos Numéricos SNPs:

Muestra una tabla en la que se pueden establecer o consultar los códigos numéricos que van a tener cada uno de los SNPs, tanto de 1 número como de 2 números. Estos códigos son necesarios para generar el archivo que se utilizará en el script de análisis de R. Un ejemplo del contenido de la tabla es el siguiente:

Id	Proyecto	SNP	Denominacion	Numeracion1Alelo	Numeracion2Alelo
1	575,008	OXT_SNP01_1484	G:G	1	11
2	575,008	OXT_SNP01_1484	A:G	2	12
3	575,008	OXT_SNP01_1484	A:A	3	22
4	575,008	OXT_SNP01_1484	Bad	0	00
5	575,008	OXT_SNP01_1484	NTC	0	00
6	575,008	OXT_SNP01_1484	?	0	00

Los campos de esta tabla son:

ID: Código de identificación del código numérico.

Proyecto: Código de identificación del proyecto al que se aplica el código numérico.

SNP: Nombre del SNP al que se le aplica el código numérico.

Denominación: Cadena de asignación alélica producida por la empresa de genotipado.

Numeracion1Alelo: Código de un número para el SNP.

Numeracion2Alelo: Código de 2 números para el SNP.

8.1.7.9.4 Tabla De Genotipos

Tabla de genotipos:

Muestra la tabla generada por la empresa que realizó el genotipado.

	SNPID ▾					
	OXT_SNP01_1484		OXT_SNP02_1316		OXT_SNP03_629	
	+ -		+ -		+ -	
SubjectID ▾	Call ▾		Call ▾		Call ▾	
VG02001	+ -	Bad		Bad		Bad
VG02155	+ -	G:G		G:G		G:G
VG02156	+ -	G:G		G:G		G:G

La tabla muestra la combinación de alelos detectados para cada uno de los SNPs testados (SNPID).

El nombre de los animales se presenta bajo el epígrafe SubjectID.


8.1.7.9.5 Cambiar Carácter Separador

Cambiar Carácter Separador:

Una consulta que cambia el carácter de separación de campos. Es útil si se quiere exportar los datos a un formato diferente al de datos separados por espacios.

En primer lugar se informa de que la consulta modificará los datos de una tabla.

Va a ejecutar una consulta de actualización que modificará los datos de la tabla.


 ¿Confirma que desea ejecutar esta consulta de acciones?
 Haga clic en Ayuda para obtener información sobre cómo evitar que aparezca este mensaje cada vez que ejecuta una consulta de acciones.

Mostrar Ayuda >>

[¿Le ha sido útil esta información?](#)

En concreto, sustituye todos los valores de la columna "CS" de la tabla "Fenotipos". En el ejemplo tiene valor en blanco:


Leche ▾	HTD ▾	DIM ▾	AGE ▾	PERM ▾	ID_P ▾	CS ▾
1120	14	5	6		1 GE85589	
800	9	5	6		1 GE85589	
1440	13	4	6		1 GE85589	

Al pulsar en "Sí", se pide el nuevo valor del carácter de separación:

Carácter de separación:

Aceptar
 Cancelar

Al pulsar en "Aceptar" se contabiliza el número de filas que van a ser afectadas:


Va a actualizar 2988 fila(s).
 Si hace clic en Sí, no podrá utilizar el comando Deshacer para deshacer los cambios.
 ¿Confirma que desea actualizar estos registros?

Sí
 No

Al pulsar en "Aceptar" se realiza la actualización:

Leche ▾	HTD ▾	DIM ▾	AGE ▾	PERM ▾	ID_P ▾	CS ▾
1120	14	5	6		1 GE85589	;
800	9	5	6		1 GE85589	;
1440	13	4	6		1 GE85589	;

8.1.7.9.6 Ver Fenotipos Y Genotipos

Ver Fenotipos y Genotipos:

Presenta la tabla que relaciona los genotipos con los fenotipos de las muestras genotipadas. Copiando las filas de esta tabla y pegándolas en un archivo de texto, añadiendo una fila de títulos de campo y sustituyendo tabulaciones por espacios, se obtiene el archivo necesario para ser procesado por el script de R.

El formato en que presenta los datos es el siguiente:

Cadena	SNPid ▾											
	OXT_SNP01_1484				OXT_SNP02_1316				OXT_SNP03_629			
	adit ▾	SNP ▾			adit ▾	SNP ▾			adit ▾	SNP ▾		
AB00204 2,55 7,34 2,28 3,93 5,98 10,15 0,87 16,85 1,34 12,65 2,03	+	2	12		+	2	12		+	2	12	
AB00204 2,68 8,93 2,31 3,09 6,07 12,11 0,77 23,8 1,02 8,02 2,15 13,	+	2	12		+	2	12		+	2	12	
AB00204 2,72 7,26 2,33 3,96 5,32 11,3 0,93 19,13 1,22 9,8 2,49 15,4	+	2	12		+	2	12		+	2	12	
AB00204 3,17 5,99 2,49 1,99 4,31 11,59 0,97 21,04 2,36 9,09 3,18 1	+	2	12		+	2	12		+	2	12	
AB00204 3,37 8,94 2,57 3,1 4,81 10,47 0,6 19,2 1,09 9,86 2,71 16,76	+	2	12		+	2	12		+	2	12	
AB00204 4,22 10,14 2,84 3,73 6,9 13,26 0,64 25,19 1,78 8,37 1,67 10	+	2	12		+	2	12		+	2	12	
AB01126 2,3 9,72 2,12 3,93 5,95 9,92 0,89 24,17 1,33 9 2,39 14,78 3	+	1	11		+	0	00		+	1	11	
AB01126 2,72 10,82 2,89 3,79 6,96 11,88 0,66 23,32 2,13 7,61 1,92	+	1	11		+	0	00		+	1	11	

En detalle, El contenido de la tabla es el siguiente:

Cadena: Este campo contiene toda la información fenotípica de una animal en formato de una sola cadena de texto.

AB00204 2,55 7,34 2,28 3,93 5,98 10,15 0,87 16,85 1,34 12,65 2,03 18,76 3,43 1,53 0,51 68,31 16,1 18,57 33,64 31,69 25,39 6,3 0,463914507 2,581699346 0,085714286 0,079525223 0,04 1,483003953 0,251231527 0,48 5,79 5,09 6,58 1963 12 2 6 1 GE85589 (Cadena)

La primera palabra de la cadena contiene el código del animal estudiado. Cada animal está registrado tantas veces como repeticiones de pruebas fenotípicas tenga. El genotipo es igual para todas las repeticiones de un mismo animal. Los datos están separados mediante el carácter separador "CS" de la tabla "Fenotipos" (En este ejemplo el carácter separador es el espacio en blanco).

El motivo para mostrar todos los datos como una única cadena de texto es para minimizar el uso de recursos informáticos. El gestor de bases de datos maneja la serie

completa de fenotipos como un sólo dato en vez de como varias decenas. Así se reduce la cantidad de recursos necesarios en el ordenador que ejecute la aplicación (que, en algunos casos, pueden colgar al sistema).

SNPid: Bajo este epígrafe se agrupan las columnas para cada uno de los SNPs estudiados. Cada una de estas columnas, se subdivide, a su vez, en otras 2:

- **adit:** Código de un sólo número del SNP. (En el script de R se usa como valor aditivo)
- **SNP:** Código de 2 números del SNP.

Para generar el archivo de entrada del script de R se deben seguir estos pasos:

Copiar las filas: Para copiar las filas de la tablas se debe pinchar en el campo cadena de la primera fila a copiar:

Cadena	SNPid					
	OXT_SNP01_1484		OXT_SNP02_1316		OXT_SNP03_629	
	adit	SNP	adit	SNP	adit	SNP
AB00204 2,55 7,34 2,28 3,93 5,98 10,15 0,87 16,85 1,34 12,65 2,03	2	12	2	12	2	12
AB00204 2,68 8,93 2,31 3,09 6,07 12,11 0,77 23,8 1,02 8,02 2,15 13,	2	12	2	12	2	12
AB00204 2,72 7,26 2,33 3,96 5,32 11,3 0,93 19,13 1,22 9,8 2,49 15,4	2	12	2	12	2	12
AB00204 3,17 5,99 2,49 1,99 4,31 11,59 0,97 21,04 2,36 9,09 3,18 11,	2	12	2	12	2	12
AB00204 3,37 8,94 2,57 3,1 4,81 10,47 0,6 19,2 1,09 9,86 2,71 16,76	2	12	2	12	2	12
AB00204 4,22 10,14 2,84 3,73 6,9 13,26 0,64 25,19 1,78 8,37 1,67 11,	2	12	2	12	2	12
AB01126 2,3 9,72 2,12 3,93 5,95 9,92 0,89 24,17 1,33 9 2,39 14,78 3	1	11	0	00	1	11
AB01126 2,72 10,82 2,89 3,79 6,96 11,88 0,66 23,32 2,13 7,61 1,92	1	11	0	00	1	11
AB01126 2,74 7,27 2,03 3,9 6,43 10,97 0,87 19,91 1,45 10,65 2,55 1,	1	11	0	00	1	11
AB01126 3,06 7,14 2,07 2,65 4,71 9,4 1,09 19,23 1,71 12,98 2,81 17,	1	11	0	00	1	11

Esto selecciona toda la fila.

Después, manteniendo pulsada la tecla "Shift" (Mayúsculas), se debe pinchar en la última fila del rango a copiar:

Cadena	SNPid					
	OXT_SNP01_1484		OXT_SNP02_1316		OXT_SNP03_629	
	adit	SNP	adit	SNP	adit	SNP
VG04093 2,88 9,62 2,42 3,7 5,77 11,14 0,77 23,63 1,3 9,91 2,04 13,6	1	11	1	11	1	11
VG04093 3,5 7,65 2,45 3,2 4,38 9,28 0,9 23,68 1,74 10,59 2,3 14,24	1	11	1	11	1	11
VG04095 2,92 7,72 2,12 3,78 4,91 8,37 0,97 21,22 1,52 11,53 3,06 1,	1	11	2	12	1	11
VG04095 3,44 9,35 2,72 3,72 5,61 11,84 0,75 23,29 1,58 9,61 1,81 1,	1	11	2	12	1	11
VG04164 2,63 9,45 2,2 3,2 4,01 11,9 1,04 22,52 1,7 9,17 2,14 13,25	0	00	0	00	0	00
VG04164 2,74 10,21 2 3,94 6,27 9,44 0,96 19,32 1,4 10 2,76 13,43 2,	0	00	0	00	0	00
VG04164 3,37 11,95 2,95 4,39 6,21 11,45 0,53 25,66 1,4 8,02 1,78 1,	0	00	0	00	0	00
VG04173 2,43 6,58 2,02 2,76 5,07 8,82 0,59 24,08 1,37 13,2 2,76 17,	2	12	2	12	2	12
VG04173 2,47 9,01 2,91 3,72 5,71 10,85 0,93 24,05 1,42 7,84 2,21 1,	2	12	2	12	2	12
VG04173 2,77 10,01 2,67 3,84 6,06 11,53 0,76 21,44 1,67 9,55 2,04	2	12	2	12	2	12
VG04173 2,82 9,87 2,54 3,33 4,38 9,6 0,61 25,93 1,42 8,56 2,39 15,8	2	12	2	12	2	12
VG04174 2,88 7,23 2,41 3,07 4,29 9,07 0,66 22,99 1,3 11,64 2,83 14,	1	11	1	11	1	11
VG04174 3,79 6,22 2,29 2,73 3,53 8 0,76 21,97 1,5 12,62 2,88 17,82	1	11	1	11	1	11
VG04179 2,85 7,37 2,14 3,56 4,55 8,45 0,9 22,43 1,58 11,14 2,92 15,	1	11	1	11	2	12
VG04179 2,93 10,17 2,03 3,8 5,26 9,73 0,75 22,29 1,5 10,34 2,47 15,	1	11	1	11	2	12
VG04180 2,44 9,98 3,22 4,09 5,85 10,55 0,77 25,71 1,24 9,04 1,94 1,	1	11	1	11	2	12
VG04180 2,8 7,99 2,46 3,92 4,87 8,37 1,07 20,65 1,62 10,75 3,2 13,7	1	11	1	11	2	12
VG04180 2,83 8,85 2,22 3,25 4,56 9,84 0,9 23,25 1,53 9,26 2,62 16,2	1	11	1	11	2	12
VG04180 3,91 9,8 3,03 4 5,61 10,59 0,56 24,61 1,5 10,64 1,95 12,07	1	11	1	11	2	12

Pulsar "Control+C" para copiar el contenido en el portapapeles.

Nota: Es posible que estos procesos aumenten notablemente la carga del procesador y se demoren algún tiempo cuando el número de filas a manejar es elevado.

Pegar el contenido del portapapeles en un editor de texto:

```

1 AB00204 2,55 7,34 2,28 3,93 5,98 10,15 0,87 16,85 1,34 12,65 2,03 18,76
3,43 1,53 0,51 68,31 16,1 18,57 33,64 31,69 25,39 6,3 0,463914507
2,581699346 0,085714286 0,079525223 0,04 1,483003953 0,251231527 0,48
5,79 5,09 6,58 1963 12 2 6 1 GE85589 2 12 2 12 2 12 CR LF
2 AB00204 2,68 8,93 2,31 3,09 6,07 12,11 0,77 23,8 1,02 8,02 2,15 13,32
3,73 2,25 0,97 73,16 17,01 20,99 35,16 26,82 18,74 8,08 0,366593767
1,875555556 0,063583815 0,042857143 0,04 1,66084788 0,451162791 0,45 5,85
5,58 5,79 1440 13 4 6 1 GE85589 2 12 2 12 2 12 CR LF

```

En el ejemplo se muestran los caracteres no imprimibles. Como puede apreciarse, los datos de los SNPs están separados por tabuladores en vez de por espacios.

Por eso es necesario **hacer una sustitución de los caracteres de tabulación por espacios**.

En el editor "Notepad ++" (y en muchos otros) este proceso se realiza así:

Pulsar "Buscar"->"Reemplazar" (o "Control+H"). En el cuadro que aparece, rellenar: Buscar = \t; Reemplazar con = (espacio en blanco) y marcar "Extendido ...".

The screenshot shows the 'Find and Replace' dialog in Notepad++. The 'Find what' field contains '\t'. The 'Replace with' field is empty. The 'Match case' checkbox is unchecked. The 'Search in selection' checkbox is unchecked. The 'Search in all open files' checkbox is unchecked. The 'Replace all' button is highlighted. The 'Extended search' checkbox is checked. The 'Search mode' is set to 'Normal'. The 'Direction' is set to 'Down'. The 'Transparency' checkbox is checked, and the 'Always lose focus' radio button is selected.

Al pulsar en "Reemplazar todo" se realiza la sustitución de todos los tabuladores del documento.

```

1 AB00204 2,55 7,34 2,28 3,93 5,98 10,15 0,87 16,85 1,34 12,65 2,03 18,76
3,43 1,53 0,51 68,31 16,1 18,57 33,64 31,69 25,39 6,3 0,463914507
2,581699346 0,085714286 0,079525223 0,04 1,483003953 0,251231527 0,48
5,79 5,09 6,58 1963 12 2 6 1 GE85589 2 12 2 12 2 12 CR LF
2 AB00204 2,68 8,93 2,31 3,09 6,07 12,11 0,77 23,8 1,02 8,02 2,15 13,32
3,73 2,25 0,97 73,16 17,01 20,99 35,16 26,82 18,74 8,08 0,366593767
1,875555556 0,063583815 0,042857143 0,04 1,66084788 0,451162791 0,45 5,85
5,58 5,79 1440 13 4 6 1 GE85589 2 12 2 12 2 12 CR LF

```

Este archivo se puede guardar para ser utilizado como entrada del script de R.

8.1.7.10 Genotipado Nº de Copias

Estas son las tablas y consultas necesarias para hacer el estudio de asociación a los datos de genotipado del número de copias:

The screenshot shows a window titled 'Genotipado Número de copias'. It contains three buttons: 'Cuantificaciones', 'Fenotipos y Genotipos NC', and 'Estadísticas de cuantificación'.

Cuantificaciones:

Esta tabla enlaza con una tabla de resultados de cuantificación del número de copias en una base de datos externa.

Estadísticas de cuantificación:

Esta consulta muestra valores estadísticos la cuantificación relativa.

Fenotipos y Genotipos NC:

Esta es la tabla dinámica de fenotipos y genotipos de la cuantificación del número de copias. Permite obtener los datos necesarios para ser analizados por un script de R. Los datos fenotípicos se obtienen de la tabla [Fenotipos](#).

8.1.7.10.1 Cuantificaciones

Cuantificaciones:

Esta tabla enlaza con una tabla de resultados de cuantificación del número de copias en una base de datos externa.

Proyecto	NombreMuestra	CiOptimoMedio	CiEndogenoMedio	IncrementoCiMedio	DobleIncrementoCiMedio	ValorCuantificacionRelativaMedio
Caja 1.2	GM03091	18,6261620870835	22,1027552039266	-3,47659311684313	-2,01115388157745	4,03104498037637
Caja 1.2	GM04026	19,3131621058774	21,6637958636856	-2,35063375780817	-0,88519452254249	1,84701364260251
Caja 1.2	IJ04031	19,0881218560006	21,6208914271874	-2,5327695711868	-1,06733033592112	2,09555202077696

Los campos más relevantes de esta tabla son:

NombreMuestra: Es el nombre del animal estudiado. El código coincide con el campo "Nombre" de la tabla "Muestras".

ValorCuantificacionRelativaMedio: Resultado de la cuantificación de la muestra. Aunque se incluyen todos los decimales del cálculo, debe entenderse que el valor estimado es el entero más próximo al valor obtenido.

8.1.7.10.2 Estadísticas de cuantificación

Estadísticas de cuantificación:

Esta consulta muestra valores estadísticos de la cuantificación relativa:

NombreMuestra	CuentaDeNo	Media	DesviaciónEstandar	Varianza
VA03288	1	2,12305101082686		
VA04098	3	2,03248703435462	3,44127577060238E-08	1,1842378929335E-15

En detalle, los resultados que muestra son los siguientes.

Nombre: Nombre del animal estudiado.

CuentaDeNo: Recuento del número de animales utilizados para hacer la estadística.

Media: Media de las cuantificaciones del número de copias.

DesviaciónEstandar: Desviación estándar de las cuantificaciones para el animal. Cuando sólo hay una repetición de la cuantificación este valor permanece vacío.

Varianza: Varianza de las cuantificaciones del número de copias. Cuando sólo hay una repetición de la cuantificación este valor permanece vacío.

8.1.7.10.3 Fenotipos y Genotipos NC

Fenotipos y Genotipos NC:

Esta es la tabla dinámica de fenotipos y genotipos de la cuantificación del número de copias. Permite obtener los datos necesarios para ser analizados por un script de R. Los datos fenotípicos se obtienen de la tabla [Fenotipos](#).

Cadena	NumeroCopias
AB03121 3,12 7,23 2,51 3,81 4,52 8,74 0,96 20,37 1,06 9,56 2,82 17,7	2,584434987
AB03124 2,39 7 2,14 3,69 4,34 8,98 0,73 20,42 1,81 10,81 2,71 16,7	5,155267446

Los campos mostrados son:

Cadena: Una cadena de texto que contiene todos los datos fenotípicos para una determinación de un animal.

AB03121 3,12 7,23 2,51 3,81 4,52 8,74 0,96 20,37 1,06 9,56 2,82 17,42 3,53 1,3 1,17 68,26 16,67 16,07 35,52 31,73 24,4 7,33 0,464840316 3,153846154 0,109839817 0,05203731 0,14 1,822175732 0,414893617 0,43 5,18 6,49 8,13 741 15 6 4 47 GE10214 (Cadena)

La primera palabra de la cadena contiene el código del animal estudiado. Cada animal está registrado tantas veces como repeticiones de pruebas fenotípicas tenga. El genotipo es igual para todas las repeticiones de un mismo animal. Los datos están separados mediante el carácter separador "CS" de la tabla "Fenotipos" (En este ejemplo el carácter separador es el espacio en blanco).

El motivo para mostrar todos los datos como una única cadena de texto es minimizar el uso de los recursos informáticos. El gestor de bases de datos maneja la serie completa de fenotipos como un sólo dato en vez de como varias decenas. Así se reduce la cantidad de recursos necesarios en el ordenador que ejecute la aplicación (que, en algunos casos, pueden colgar al sistema).

NumeroCopias: Estimación del número de copias del animal. Aunque se incluyen todos los decimales del cálculo, debe entenderse que el valor estimado es el entero más próximo al valor obtenido.

Para generar el archivo de entrada del script de R se deben seguir pasos análogos a los mostrados en el caso "[Ver Fenotipos y Genotipos](#)". Para cambiar el carácter separador de la "Cadena" se puede utilizar la consulta "[Cambiar Carácter Separador](#)".

8.1.8 Añadir Información

En esta pestaña se agrupan controles que permiten añadir información a la base de datos. Es un extracto de los controles habituales de las pestañas [Datos](#), [PCR](#), [SSCP](#), [Secuenciación](#) y [SNPs](#). Los botones se agrupan en función de la pestaña de la que provienen.

El botón "[Añadir Más](#)" abre un menú con más formularios de entrada de datos. Aquí se encuentran los formularios menos habituales de la base de datos.


8.1.8.1 Añadir Más Información

Añadir más información:

Abre un menú con más formularios de entrada de datos. Aquí se encuentran los formularios menos habituales de la base de datos.

El significado y funcionamiento de cada uno de los botones puede consultarse en sus respectivas secciones, salvo Modificar Variables Globales. El concepto de variable global se explica [aquí](#).

Al pulsar "[Modificar Variables Globales](#)" se lanza un formulario que permite su consulta y modificación.

El botón "Salir" () cierra el formulario.

8.1.8.1.1 Modificar Variables Globales

Formulario de modificación de Variables Globales:

Este formulario permite la consulta y modificación de las [Variables Globales](#) aunque no suele ser necesario hacerlo.

VariableGlobal	Valor	Lugar de utilización:	Explicación:
DirectorioAle	D:\ale\	Inicio	Determinar el lugar donde está el directorio origen de todas las rutas relativas.

Los campos disponibles para cada variable global son los siguientes:

VariableGlobal: Nombre de la Variable Global.

Valor: Valor de la Variable Global.

Lugar de utilización: Indica el nombre del formulario o informe donde se utiliza la variable. Este campo es opcional y sirve de indicación para que el programador busque el código que la utiliza.

Explicación: Descripción del uso o función de la variable global.

8.1.9 Consultar Información

En esta pestaña se agrupan controles que permite consultar información de la base de datos. Es un extracto de los controles habituales de las pestañas [Datos](#), [PCR](#), [SSCP](#), [Secuenciación](#) y [SNPs](#). Los botones se agrupan en función de la pestaña de la que provienen.

El botón "[Consultar Más](#)" abre un menú con más consultas. Aquí se encuentran las consultas menos habituales de la base de datos.

8.1.9.1 Consultar Más Información

Consultar más información:

Abre un menú con más consultas. Aquí se encuentran las consultas menos habituales de la base de datos.

El significado y funcionamiento de cada uno de los botones puede consultarse en sus respectivas secciones.

Los botones que no están duplicados en sus correspondientes pestañas son los siguientes:

La sección de consulta de "SSCP":

Patrones a genotipar

Patrones a genotipar: Crea una consulta que lista las muestras secuenciadas a las que se les ha asignado un patrón de SSCP. En esta lista se incluye el genotipo del patrón de forma que pueden verse aquellos que aún no han sido relacionados con un genotipo.

Fragmento	Muestra Secuenciada	Muestra	Nombre	Clave del patrón	Genotipo
PRL-E1	182	23	AW 3	2PRL-E1	PRL-E1>A
PRL-E4	1278	24	AW 4	2PRL-E4	
PRL-E5.2	974	9	GW 3141 PI	2PRL-E5.2	PRL-E5.2>CR

Los campos de la lista son:

Fragmento: Nombre del fragmento.

Muestra Secuenciada: Código de identificación de la muestra secuenciada.

Muestra: Código de identificación de la muestra de ADN.

Nombre: Nombre del animal.

Clave del patrón: Código de identificación del patrón de SSCP.

Genotipo: Genotipo asociado al patrón de SSCP.

> y Nucleótidos

Patrones a genotipar y Nucleótidos: Crea una tabla dinámica con la información de los patrones y los nucleótidos que se han genotipado.

Tipo ▾		la información de los patrones y los nucleótidos que se han genotipado.															
SNP																	
		Inicio ▾															
		1193			1254			1263			1333			1393			
		+ -			+ -			+ -			+ -			+ -			
Fragmento ▾	Patrón ▾	Genotipo ▾	Nue.	Caract ▾	Muestr ▾	Nue.	Caract ▾	Muestr ▾	Nue.	Caract ▾	Muestr ▾	Nue.	Caract ▾	Muestr ▾	Nue.	Caract ▾	Muestr ▾
OXI-E2 ▾	11OXI-E2 ▾	OXI-E2>AGAGM ▾	A	R(Ag)	304	G	R (A o G)	305	A	W (A o T)	304	G	S(Gc) (Gl)	304	M	M(Ac)	384
			A	R(Ag)	305	G	R (A o G)	304	A	W (A o T)	305	G	s(GC)	379		M (A o C)	304
			A	R(Ag)	367	g	Mutante	367	A	Mutante	368	G	S(GC)	384		M (A o C)	305
			A	R(Ag)	368	G	Mutante	368	A	Mutante	367	G	Heteroci	367	M	M(Ac)	379
				R(Ag)	350	G	Mutante	350	A	W(AoT) (379	G	S(Gc) (Gl)	305	M	Heteroci	350
					G	R (A o G)	379	A	Mutante	350	G	Heteroci	368		Heteroci	367	

En la tabla se recoge la base que ocupa cada posición, el nombre de la característica asignada en el alineamiento y el código de identificación de la muestra secuenciada.

La tabla se puede filtrar por los siguientes campos:

Tipo: Tipo de mutación.

Fragmento: Fragmento al que pertenece la secuencia.

Patrón: Nombre del patrón de las muestras.

Genotipo: Nombre del genotipo del patrón.

Inicio: Primera base cubierta por la característica. Para las características de tipo SNP, el inicio coincide con la posición.

Ver resultados y valoración de SSCP

Ver resultados y valoración de SSCP: Esta tabla muestra los resultados del SSCP junto con la valoración genética de los animales.

Caja	Nombre	NombreParaANCHE	Sexo	ValorGLeche	ValorGProtei	AñoValorac	Patrón
2 Muestras para variabilidad	DQ+98168	DQ98168	Hembra	19,22	0,04	2003	1GHR-E10.1
2 Muestras para variabilidad	DQ+98168	DQ98168	Hembra	19,22	0,04	2003	1OXI-E1
2 Muestras para variabilidad	DQ+98168	DQ98168	Hembra	19,22	0,04	2003	1OXI-E3

Los campos incluidos son:

Caja: Nombre de la caja donde se guarda la muestra de ADN.

Nombre: Nombre del animal.

NombreParaANCHE: Código del animal en la base de datos de donde provienen las valoraciones genéticas

Sexo: Sexo del animal.

ValorGLeche: Valoración genética para la producción de leche.

ValorGProteína: Valoración genética para la producción de proteína.

AñoValoracion: Año en que se produjo la valoración genética.

Patrón: Patrón de SSCP que presenta el animal.

Genotipado de patrones

Genotipado de patrones: Esta es una consulta similar a la consulta "[Genotipado de patrones](#)" de la pestaña SSCP pero obtiene la lista de las características de la secuencia consenso de un alineamiento en vez de la secuencia de referencia. Si ambas están alineadas, la lista debe ser igual, pero en esta consulta sólo se muestran las características que están presentes en el alineamiento.

> Definitivo

Genotipado de patrones Definitivo: Esta consulta es similar a la consulta "[Genotipado de patrones definitivo](#)" de la pestaña SSCP pero obtiene la lista de características de la secuencia consenso del alineamiento.

La sección de consulta de "Errores":

de Tª

Errores de Temperatura: Crea una consulta con los datos de los programas de PCR que están marcados con una Temperatura de PCR diferente a la del 2º paso central del programa de PCR.

Codigo Programa ▾	Día PCR ▾	Protocolo PCR ▾	Temperatura PCR ▾	Tª 2º paso central ▾	Tª del programa ▾
1-58-61auto	15/11/05-1	PCR-GH2-E5-3prima<613	61	58	58
1-58-61auto	25/11/05-2	PCR-GH2-E5-3prima<630	61	58	58

Esta es útil para detectar PCRs mal introducidas en la base de datos porque la temperatura de casi todos los protocolos de PCR debe ser igual a la del paso central de su programa.

Orientación de Muestras Secuenciadas

Errores de Orientación de Muestras Secuenciadas: Este botón lanza una consulta que permite detectar muestras secuenciadas que, probablemente, estén mal introducidas. En principio, la orientación de lectura de la muestra secuenciada debería ser la misma que la del cebador. Teóricamente sería posible llevar a cabo la segunda PCR de secuenciación con un cebador diseñado para otra secuencia, de la cadena complementaria (aunque es muy poco probable). En este caso, la orientación para la que se diseñó el cebador y la orientación de la secuenciación podrían no coincidir. Lo más frecuente es que al introducir los datos de una muestra secuenciada se seleccione una orientación errónea y deba ser corregida.

Clave de muestra ▾	Muestra ▾	Día de secuenciación ▾	Orientación Muestra ▾	Cebador ▾	OrientaciónCebador ▾	Evaluación ▾
1	17	1/02/02-1	UP	PRL-E5.2 UP	UP	OK
2	17	1/02/02-2	UP	PRL-E5.2 DN	DN	Revisar
3	43	1/02/02-1	UP	PRL-E5.2 UP	UP	OK

Los campos de esta consulta son los siguientes:

- **Clave de muestra:** Número de identificación de la muestra secuenciada.
- **Muestra:** Número de identificación de la muestra de ADN utilizada en la secuenciación.
- **Día de secuenciación:** Código del día que se realizó la secuenciación.
- **Orientación Muestra:** Orientación registrada en la muestra secuenciada. UP significa lectura en sentido 5'→3', DN significa lectura en sentido 3'→5'.
- **Cebador:** Nombre del cebador utilizado en la 2ª PCR de secuenciación.
- **Orientación del cebador:** Orientación del cebador de la 2ª PCR de secuenciación.

- **Evaluación:** Evaluación de la prueba. Si ambas orientaciones coinciden se evalúa a OK, si las orientaciones no coinciden se indica que se debe "Revisar" la muestra.

Corregir

Corregir: Este botón lanza una consulta que sincroniza automáticamente todas las orientaciones de las muestras secuenciadas con las orientaciones de sus cebadores de la 2ª PCR de secuenciación. Por ejemplo: dado este caso:

Clave de muestra	Muestra	Día de secuenciación	Orientación Muestra	Cebador	OrientaciónCebador	Evaluación
1	17	1/02/02-1	UP	PRL-E5.2 UP	UP	OK
2	17	1/02/02-2	UP	PRL-E5.2 DN	DN	Revisar
3	43	1/02/02-1	UP	PRL-E5.2 UP	UP	OK

La muestra número 2 tiene una orientación UP cuando debería ser DN. Al pulsar el botón "Corregir" aparece un diálogo que informa que se va a ejecutar una consulta de actualización:

Va a ejecutar una consulta de actualización que modificará los datos de la tabla.

¿Confirma que desea ejecutar esta consulta de acciones?
Haga clic en Ayuda para obtener información sobre cómo evitar que aparezca este mensaje cada vez que ejecuta una consulta de acciones.

Mostrar Ayuda >>

[¿Le ha sido útil esta información?](#)

Al pulsar en "Sí" se informa del número de filas que van a ser afectadas por la consulta:

Va a actualizar 1 fila(s).

Si hace clic en Sí, no podrá utilizar el comando Deshacer para deshacer los cambios.
¿Confirma que desea actualizar estos registros?

Al pulsar en "Sí" se ejecuta la actualización y se corrige el problema:

Clave de muestra	Muestra	Día de secuenciación	Orientación Muestra	Cebador	OrientaciónCebador	Evaluación
1	17	1/02/02-1	UP	PRL-E5.2 UP	UP	OK
2	17	1/02/02-2	DN	PRL-E5.2 DN	DN	OK
3	43	1/02/02-1	UP	PRL-E5.2 UP	UP	OK

Asignación de fragmento a secuencia

Asignación de fragmento a secuencia: Esta consulta comprueba si el fragmento al que pertenece la secuencia consenso es el mismo que el de su protocolo de secuenciación.

Nombre de secuencia	FragmentoSecuencia	Muestra secuenciada	muestra	FragmentoProtocolo	Comprobación
SEQ-OXT_PCRA>	OXT_PCRA	932	3201	OXT_PCRA	Correcto
SEQ-OXT_PCRA>	OXT_PCRA	1113	3201	OXT_PCRA	Error

Los campos mostrados son:

Nombre de secuencia: Nombre de la secuencia consenso.

FragmentoSecuencia: Fragmento de la secuencia consenso.

Muestra secuenciada: Código de identificación de la muestra secuenciada.

Muestra: Código de identificación de la muestra de ADN.

FragmentoProtocolo: Fragmento de la muestra secuenciada.

Comprobación: Resultado de la comprobación. Si ambos fragmentos son iguales devuelve correcto, en caso contrario devuelve "Error".

de asignación de fragmento a experimentos SSCP

Errores de asignación de fragmento a

experimentos de SSCP: Esta consulta muestra sólo aquellos experimentos de SSCP cuyo fragmento no coincide con el de su protocolo de SSCP.

Experimento	Código Día	Muestra	Patrón	Patrones.Fragmento	Protocolo SSCP	Protocolos SSCP.Fragmento	Revisión
478	14/12/01-1	58 2PRL-E4	PRL-E4		427_12-12-6:00:00	PRL2-E4	error

Los campos listados son:

Experimento: Código de identificación del experimento de SSCP.

Código Día: Código del día en que se realizó el experimento.

Patrón: Patrón resultante del experimento.

Patrones.Fragmento: Fragmento asignado al patrón.

Protocolo SSCP: Código del protocolo de SSCP.

Protocolos SSCP.Fragmento: Fragmento asignado al protocolo de SSCP.

Revisión: Resultado de la comprobación. Si ambos fragmentos son iguales devuelve "correcto", en caso contrario devuelve "error".

Ver protocolos SSCP sin experimentos

Ver protocolos SSCP sin experimentos: Lista los

datos de aquellos experimentos de SSCP que no tienen ningún registro en la tabla Experimentos SSCP. Este error es frecuente cuando se diseña un experimento el día antes de revelarlo y al registrar los datos no se sincroniza la información de los días.

Ver experimentos SSCP sin protocolo

Ver experimentos SSCP sin protocolo: Muestra

aquellos experimentos de SSCP a los que no se les ha asignado un protocolo de SSCP. Es una lista complementaria a la anterior.

>Días

Ver días de experimentos de SSCP sin protocolo: Lista únicamente los días que aparecen en la tabla anterior.

Secuencias consenso a revisar

Secuencias consenso a revisar: Crea un informe

que contiene un listado de secuencias consenso en el que se puede ver el estado de revisión de la secuencias. El listado está agrupado por fragmentos. Para cada secuencia se muestra el código de identificación de la secuencia (nº), el nombre de la secuencia, el estado de revisión, el nombre de su secuencia de referencia, su incremento general, el número de muestras secuenciadas, la localización del alineamiento que la genera y los comentarios.

Secuencias consenso a revisar

Fragmento

nº Nombre de secuencia Revisada Secuencia de referencia Incremento general
Localización del alineamiento Muestras secuenciada
Comentarios

659 SEQ-PRL-I1-I2>20011003 ☐ 0 3

..\TesisDatosBrutos\MAC\Geles%20del%20mac%204-2002\Run%20Folder%203-10-2001\Run%20Folder-3 10 01%2019.35\Run%20Folder-3 10 01%2019.35\baseDeDatosPRL-I1-I2.0.aux

asigno al fragmento ni a ninguna secuencia de referencia). Sin embargo, las secuencias son de muy alta calidad. No alinea con nada

DGAT1-E8/2

616 SEQ-DGAT1-E8/2>20030211 ☒ DGAT1-EU178818 6942 10

..\TesisDatosBrutos\MAC\Recuperadas\Run Folder-2-13-03-5-00-PM\Run Folder-2-13-03-5-00-PM\baseDeDatos.0.aux

Los asteriscos indican inserción heterozigota ---/AAA

619 SEQ-DGAT1-E8/2>20030218 ☒ DGAT1-EU178818 6934 12

..\TesisDatosBrutos\MAC\Recuperadas\Run Folder-2-18-03-6-48-PM\Run Folder-2-18-03-6-48-PM\baseDeDatos.0.aux

Los asteriscos indican inserción heterozigota ---/AAA

de alineamiento con referencia

Errores de alineamiento con la referencia: Esta consulta comprueba si las secuencias consenso tienen un incremento general adecuado. Para ello compara el valor del incremento general con el menor incremento de las muestras secuenciadas que han generado esa secuencia consenso.

Nombre de secuencia	IncrementoGeneral	incrementoMinimo	Coincide
SEQ-PRL2-E2>Secuenciacion17-01-02	3474	3506	NO
SEQ-DGAT1-E8/2>20030211	6942	6942	ok

El significado de los campos listados es el siguiente:

Nombre de secuencia: Nombre de la secuencia consenso. Es el identificador único en la base de datos.

IncrementoGeneral: Es el valor de incremento de la secuencia consenso para poder alinearse con su secuencia de referencia. Dicho de otro modo. Es el número de posiciones que hay que desplazar las coordenadas del alineamiento para que alinee, a su vez, con la secuencia de referencia.

IncrementoMínimo: Es el valor de incremento que tienen las muestras secuenciadas que se sitúan más aguas arriba en el alineamiento.

Coincide: Indica si ambos valores de incremento son iguales (ok) o si no lo son (NO).

Cebadores Mal Anotados

Cebadores Mal Anotados: Esta consulta busca en la base de datos las secuencias de los cebadores que pueden estar mal anotadas. La secuencia de los cebadores se registra en la base de datos en la tabla Cebadores. La tabla de características almacena los datos de las características génicas de las secuencias recogidas en la base de datos. Uno de los tipos de características es “Cebador”. Cuando el nombre de una característica de tipo Cebador coincide con uno de los cebadores de la base de datos se espera que la secuencia cubierta entre los dos límites, inicial y final, de la característica sea la misma que la secuencia del cebador de la base de datos. Esta consulta busca los casos en que esta premisa no se cumple. En concreto, busca aquellos cebadores cuya secuencia no coincide con la anotada ni de forma directa ni inversa. Podría ser que los límites de la secuencia anotada estuviesen mal establecidos y esto podría indicar que la tabla de características no está sincronizada con su secuencia. El resultado de la consulta es el siguiente:

Cebador	Secuencia	Inversa	Nombre de secuencia	SecuenciaAnotadaDelCebador	InversaAnotada
GHR-E10gap2 UP	atttaccaccacagaa	ttctgtgggtgataaat	GHR-AM161140	atttaccaccacagaa	ttctgtgggtgataaat
GHR-E10SNP3 DN	tatatatatggacaggtatctcagaacttgaacat	atgttccaagtcttgagatcctgtccatatatatata	GHR-AM161140	atgttccaagtcttgagatcctgtcc	ggacaggtatctcagaacttgaacat
GHR-E10SNP4 UP	atatatatatccacaggcctctgactcaat	attgagtcacagggcctgtgatatatat	GHR-AM161140	tcacaggcctctgactcaat	attgagtcacagggcctgtgga
IncluidaAnotadaDirectaEnSecuencia		IncluidaAnotadaInversaEnSecuencia	IncluidaSeqDirectaEnAnotada	IncluidaSeqInversaEnAnotada	
10		12			

El listado contiene estos campos:

Cebador: Nombre del cebador testado.

Secuencia: Secuencia del cebador.

Inversa: Secuencia invertida del cebador.

Nombre de secuencia: Nombre de la secuencia en la que está anotado el cebador.

SecuenciaAnotadaDelCebador: Secuencia de nucleótidos cubierta por la característica del cebador en la secuencia. Dicho de otro modo, es la secuencia real obtenida en la secuenciación.

InversaAnotada: Inversa de la secuencia anterior.

IncluidaAnotadaDirectaEnSecuencia: Este campo busca la secuencia anotada dentro de la secuencia del cebador. Si la encuentra recoge la base a partir de la que la encontró. En caso contrario no muestra nada. En el ejemplo, la secuencia del tercer cebador contiene una cola de poli-AT para facilitar que el producto de PCR se separe de otros. Esta cola es una adición que no puede alinear con la secuencia génica y, por tanto, no se anota. Así, la secuencia anotada del cebador es una parte de la secuencia completa del cebador diseñado.

atatatatatccacagggcctcgtaactcaat
tccacagggcctcgtaactcaat

IncluidaAnotadaInversaEnSecuencia: Busca la inversa de la secuencia anotada dentro de la secuencia del cebador. Si la encuentra recoge la base a partir de la que la encontró. En caso contrario no muestra nada. En el ejemplo, la secuencia del segundo cebador contiene una cola de poli-AT pero, al ser un cebador DN, la secuencia anotada es complementaria a la sección del cebador que no contiene la cola.

IncluidaSeqDirectaEnAnotada: Busca si la secuencia del cebador es una sección de la anotada. En caso afirmativo muestra la base a partir de la cual coinciden ambas secuencias.

IncluidaSeqInversaEnAnotada: Busca si la secuencia invertida del cebador es una sección de la secuencia anotada. En caso afirmativo muestra la base a partir de la cual coinciden.

PCRs que usan cebadores antes de ser creados

PCRs que usan cebadores antes de ser

creados: Esta consulta muestra aquellos protocolos de PCR cuya fecha es anterior a la fecha de diseño de los cebadores que emplean. Aquellos protocolos de PCR que aparezcan en esta consulta deberían ser revisados porque alguno de los datos está mal: la fecha de creación del protocolo de PCR, la fecha de diseño de los cebadores o la asignación de cebadores al protocolo de PCR. Los campos mostrados son:

nº: Número de la PCR. Es el número de identificación único del protocolo de PCR.

Día: Fecha de la PCR.

Cebador: Nombre del cebador de la PCR.

Día de creación: Día de creación del cebador de la PCR.

La sección de consulta de "PCR":

Ver PCRs que funcionan

Ver PCRs que funcionan: Esta consulta

lista los datos más importantes de las condiciones de PCRs que están marcadas con "Funciona" en la base de datos.

Fragmento	Cebador UP	Secuencia UP	Cebador DN	Secuencia DN	Temperatura	Concentración MgCl (nM)	Betaina (M)	2ºAditivo	Cantidad2ºA	Unidad
OXI-E1	OXI-E1 UP	AAAGGCCAGACCCGAGAGAC	OXI-E1 DN	TCGATTCCCAGGCTAGGTGG	60	3	0,91			
OXI-E2	OXI-E2 UP	CTCCCCCAGTGTCTCCCCCT	OXI-E2 DN	TGCACAGAGAGACGCCGAGT	60	1,5	0,5	Glicerol	5	%

Los campos listados son:

Fragmento: Nombre del fragmento que amplifica la PCR.

Cebador UP: Nombre del cebador UP.

Secuencia UP: Secuencia del cebador UP.

Cebador DN: Nombre del cebador DN.

Secuencia DN: Secuencia del cebador DN.

Temperatura: Temperatura de la PCR.

Concentración MgCl(nM): Concentración de MgCl₂, en nM.

Betaína: Concentración de betaína, en M.

2ºAditivo: Nombre del segundo aditivo (Si lo hubiera).

Cantidad2ºA: Cantidad del segundo aditivo.

Unidad: Unidad en la que se mide la cantidad del segundo aditivo.

La sección de consulta de "**Secuencias**":

Ver muestras entre días

Ver muestras entre días: Esta consulta lista las muestras secuenciadas entre 2 días determinados. Al pulsar el botón se piden las 2 fechas, inicial y final, del intervalo de días.

Explorar grupos

Explorar grupos: Llama al formulario que permite [explorar grupos](#) de secuencias.

Ver cebadores anotados

Ver cebadores anotados: Esta consulta muestra la lista de cebadores que han sido anotados en los resultados de las secuenciaciones.

Nombre	SecuenciaDelCebador	Nombre de secuencia	SecuenciaReal
OXI-E2 UP	ctccgcagtgctccct	OXT-PCR	CTCCGCCAGTGTCTCCCT
OXI-E1 DN	ccacctagcctgggaatcga	OXT-PCR	TCGATTCCCAGGCTAGGTGG

Los datos que se presentan son:

Nombre: Nombre del cebador.

SecuenciaDelCebador: Secuencia del cebador almacenada en la tabla Cebadores.

Nombre de secuencia: Nombre de la secuencia en la que está anotado.

SecuenciaReal: Secuencia de nucleótidos cubierta por la característica de tipo cebador que está anotada en la tabla de características de una secuencia de la base de datos.

Esta tabla se creó como intermedia para la detección de [cebadores mal anotados](#).

Ver muestras secuenciadas

Ver muestras secuenciadas: Lista las muestras secuenciadas en un día determinado. En primer lugar se pide el código de dicho día. Esto es: día + variante:

Código de día

9/09/09-1

Aceptar

Cancelar

Al pulsar en "Aceptar" devuelve la tabla de resultados de la consulta:

Muestra secuenciada	Caja	Día de sec	Secuencia de referencia	Nombre	NombreEnAlineamiento	Incremento	Secuencia
1084 Machos churra OAR		9/09/09-1	SEQ-OXT_PCRb>	IJ10429	OXT-macho11-DN	1092	CTCCCTCCCCGGCGGTCCCTCCCGCCCCGGCTCATCCCCGCCCT
1106 Machos churra OAR		9/09/09-1	SEQ-OXT_PCRb>	BR10448	OXT-macho3-UP	548	GCaAATGAGGGGGCGCGCCGGGGCGCAGGGCCTGACCCGCGGCG

Los campos presentados son:

Muestra secuenciada: Código de identificación de la muestra secuenciada en la base de datos.

Caja: Nombre de la caja en la que se almacena el ADN de la muestra.

Día de secuenciación: Código del día de secuenciación. El código está compuesto por la unión del día y la variante del día.

Secuencia de referencia: Nombre de la secuencia consenso del alineamiento al que pertenece la muestra secuenciada.

Nombre: Nombre del animal al que pertenece la muestra de ADN.

NombreEnAlineamiento: Nombre que se le dio a la muestra secuenciada en el alineamiento.

Incremento: Cantidad de bases que hay que añadir aguas arriba de la secuencia de la muestra secuenciada para que alinee con la secuencia de referencia.

Secuencia: Secuencia de nucleótidos de la muestra secuenciada.

El formulario está dotado de los siguientes botones adicionales:



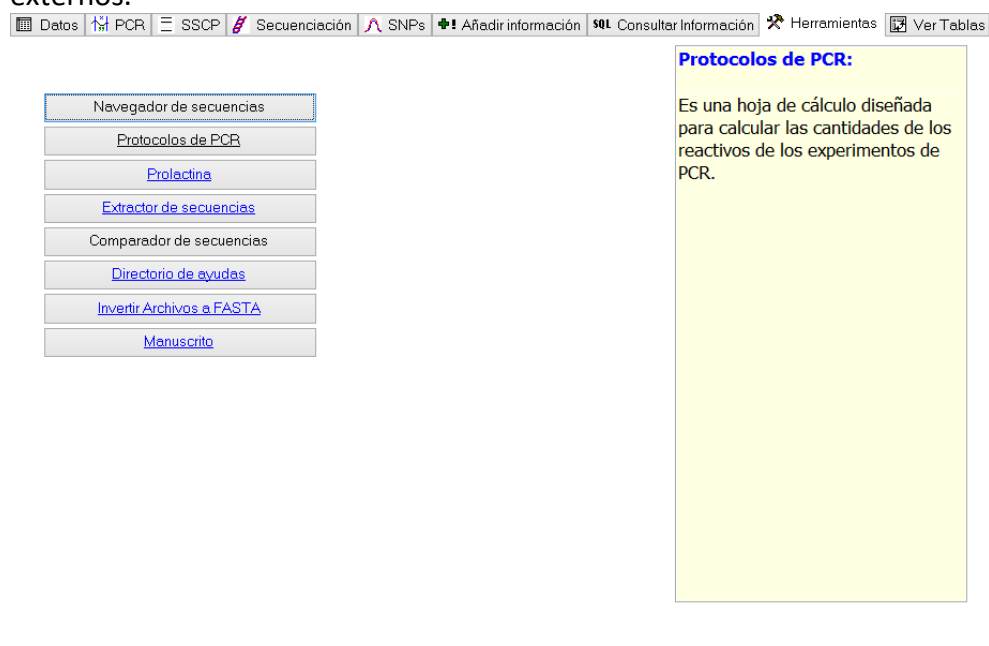
Ayuda: Lanza el formulario de [ayuda](#) de la base de datos para mostrar o anotar la ayuda específica del formulario actual.



Salir: Cierra el formulario.

8.1.10 Herramientas

Esta pestaña contiene botones que lanzan herramientas que pueden ser de utilidad para el manejo o análisis de los datos almacenados. Muchos son enlaces a recursos externos.



Contiene espacio para que el usuario pueda crear enlaces rápidos a las herramientas más utilizadas. Para crear estos botones es necesario tener conocimientos de programación en Visual Basic para Aplicaciones. Si estos conocimientos no son muy avanzados se puede analizar los ejemplos que se incluyen aquí:

Navegador de secuencias: Este botón enlaza al formulario "[Navegador de secuencias](#)" de la propia base de datos.

Protocolos de PCR: Una hoja de cálculo diseñada para calcular las cantidades de los reactivos de los experimentos de PCR.

Prolactina: Un enlace a un conjunto de archivos HTML que muestran información preliminar sobre los trabajos en el gen de la prolactina.

Extractor de secuencias: Un pequeño programa que convierte los datos de los alineamientos del paquete Staden en secuencias fácilmente integrables en la tabla "Muestras secuenciadas" de la base de datos.

Comparador de secuencias: Un formulario que permite comparar si 2 secuencias son iguales en una determinada posición. Se puede ver su funcionamiento [aquí](#).

Directorio de ayudas: Directorio que almacena los textos de ayuda del formulario de inicio de la base de datos. En él se guardan los archivos de ayuda en formato *rtf*.

Invertir Archivos a FASTA: Un programa externo que permite la inversión de secuencias de ADN tanto en memoria (para copiarlas al portapapeles) como de forma masiva a partir de los archivos de secuencia en texto plano. Genera archivos de secuencias en formato FASTA que pueden ser leídos directamente por *ClustalX*.

Manuscrito: Un enlace a un archivo que contiene las hojas escaneadas del cuaderno de laboratorio. Requiere conocer la contraseña de apertura.

8.1.10.1.1 Comparador De Secuencias

Comparador de secuencias:

Un formulario que permite comparar si una secuencia difiere de su secuencia consenso en una posición.

Fragmento:

Este formulario permite comparar la base que hay en una posición de una secuencia con respecto a su secuencia de referencia. Para ello sólo hay que introducir la posición deseada en la casilla "Posición". El zoom permite ajustar el número de bases mostradas alrededor de la posición. Debe tenerse en cuenta el incremento de la secuencia. Las bases inexistentes se representan por n's.

Posición:

Referencia: gtgtggacccccctattgcatcaagctaactagcaatggkg R tatttggatcataagtgtttctctgttgaggacataggt
 Secuencia: gtgtggacccccctattgcatcaagctaactagcaatggkg G tatttggatcataagtgtttctctgttgaggacataggt

Nombre de secuencia de consenso: SEQ-GHR-E5-Consenso28-6-04> Incremento: 2225 Longitud seq de referencia: 381

Secuencia de referencia: CTGTGCATAAAATCTGCTGCTGTTTATTGAATCTGACTCTTACGCAGCTTGTCTTGCCTTGCATATTGCATGATTGGGGAACAATCTTCTCTTTTACCTCCATTTCAGGGATATTCA
 AGAATGGAAGAATGCCCCGATTACGCTCTGCTGCTGTTGAAACAGCTGTTACTTTAATTCGTCATATACCTCCGTGTGGACCCCTATTGCATCAAGCTAACTAGCAATGGGkGtTATTGTGGATC
 ATAAGTGTCTTCTGTTGAGGACATAGTAAATCAGAGTTTGTGTTTATTGACATGCTTTAGATTACATAAGCAGGGAAGGCTGCAAGTCCAAAGTCAAGTAGGAAGACATTGGCA
 TTGCA

secuencia: 530 Incremento: 2318 Longitud secuencia: 255

550
 CT 54890 UP
 día de secuenciación:
 28/06/04-4

TTCCTTTTACCTCCATTTCAGGGATATTCAAGAATGGAAGAATGCCCCGATTACGCTCTGCTGCTGTTGAAACAGCTGTTACTTTAATTCGTCATATACCTCCGTGTGGACCCCTATTGCAT
 CAAGCTAACTAGCAATGGGkGTTATTGTGATCATAAGTGTCTGTTGAGGACATAGGTAATCAGAGTTTGTGTTTATTGACATGCTTTAGATTACATAAGCAGGGAAGGCTGCAAG
 TCCAA

La posición a interrogar se marca en el campo Posición.

El número de bases antes y después de la posición que quieren mostrarse alineadas con ella se marcan en el campo Zoom.

Al pulsar en el botón Ver se muestra la base en la posición deseada en cada secuencia. El fondo de la base que se está interrogando se colorea en rojo si difiere de su secuencia consenso.

8.1.10.1.2 Directorio De Ayudas

Directorio de Ayudas:

Este botón abre el directorio que almacena los textos de ayuda de la base de datos. En él se guardan los archivos de ayuda en formato *rtf*.

Modificando estos archivos no se actualizan automáticamente las ayudas contextuales. Estos archivos sirven para almacenar los textos de ayuda o proponer unos nuevos, que deben ser introducidos en la codificación del formulario de inicio por un programador.

8.1.10.1.3 Extractor De Secuencias

Extractor de secuencias:

Un pequeño programa que convierte los datos de los alineamientos del paquete Staden a secuencias fácilmente integrables en la tabla "Muestras secuenciadas" de la base de datos.

8.1.10.1.4 Invertir Archivos A Fasta

Invertir archivos a FASTA:

Un programa externo que permite la inversión de secuencias de ADN tanto en memoria (para copiarlas al portapapeles) como de forma masiva a partir de los archivos de secuencia en texto plano. Genera archivos de secuencias en formato FASTA que pueden ser leídos directamente por *ClustalX*.

8.1.10.1.5 Navegador De Secuencias

Navegador de secuencias:

Es un formulario que permite realizar mapas básicos de secuencias.

La función primaria de este formulario es localizar, en la secuencia, las distintas zonas de interés. Para ello, se trabaja sobre la secuencia del área de texto superior. Las

manipulaciones se la secuencia que se realicen en este formulario no quedan registradas en la base de datos.

Los resultados se muestran, formateados, en el área de texto inferior. Bajo estas áreas de texto aparece un mapa de la secuencia completa y una lista de características.

Navegador de Secuencias ? Buscar:

Alinear 2 secuencias ☐ CoordenadasRelativas

Posición relativa ☐ Secuencia: 1333 a 1333 Ver: G Borrar Longitud: 1602 Incremento 15

Secuencias

Muestra secuencias

Características

Traducir: ☐ Código ☐ 1- A ☒ 3- Aaa ☐ Marco ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 Ver ☐ AA ☐ NN ☒ Ambas

Salida: Longitud: 1602

Mayúsculas ☐

Exón =>

Características de la secuencia SEQ-OXT_PCRb>:

Inicio	Final	Tipo	Nombre
646	646	SNP	R(GA)
686	686	SNP	K(Tg) en macho 1
1333	1333	SNP	S(Gc)
1501	1501	SNP	R(Ga)

La función de los controles del formulario es la siguiente:

Secuencia: Es el área de texto que contiene la secuencia maestra sobre la que se trabaja. Las secuencia de nucleótidos que haya en este control es aquella que se tomará como base para la realización de cálculos y búsquedas. En la parte superior se recoge la longitud de la secuencia, en pb.

Navegador de Secuencias ? Buscar:

Alinear 2 secuencias ☐ secuencias

Posición relativa ☐ Secuencia: 1333 a 1333 Ver: G Borrar Longitud: 1602 Incremento 15

Secuencias

Muestra secuencias

Características

Traducir: ☐ Código ☐ 1- A ☒ 3- Aaa ☐ Marco ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 Ver ☐ AA ☐ NN ☒ Ambas

Salida: Longitud: 1602

Mayúsculas ☐

Exón =>

Características de la secuencia SEQ-OXT_PCRb>:

Inicio	Final	Tipo	Nombre
646	646	SNP	R(GA)
686	686	SNP	K(Tg) en macho 1
1333	1333	SNP	S(Gc)
1501	1501	SNP	R(Ga)

El campo **Longitud** calcula la longitud de la secuencia, en pb.

Salida: Es el área de texto donde se producirán las salidas textuales del resto de los controles. En la parte superior se informa de la longitud de la salida.

Navegador de Secuencias ? Buscar:

Alinear 2 secuencias ☐ secuencias

Posición relativa ☐ Secuencia: 1333 a 1333 Ver: G Borrar Longitud: 1602 Incremento 15

Secuencias

Muestra secuencias

Características

Traducir: ☐ Código ☐ 1- A ☒ 3- Aaa ☐ Marco ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 Ver ☐ AA ☐ NN ☒ Ambas

Salida: Longitud: 1602

Mayúsculas ☐

Exón =>

Características de la secuencia SEQ-OXT_PCRb>:

Inicio	Final	Tipo	Nombre
646	646	SNP	R(GA)
686	686	SNP	K(Tg) en macho 1
1333	1333	SNP	S(Gc)
1501	1501	SNP	R(Ga)

Este control admite texto formateado. En la imagen, la base G está en negrita y de color granate. Habitualmente, la secuencia encontrada se representa de este modo.

El campo **Longitud** calcula la longitud de la secuencia.

Mapa de secuencia: Esta zona del formulario representa, de manera lineal y a escala, la secuencia.



La barra horizontal que recorre toda la longitud, representa la secuencia total.

La barra rojo oscura representa la posición de la secuencia encontrada. Dado que este mapa está a escala, la longitud horizontal de esta barra es proporcional al tamaño relativo de la secuencia resaltada. Al pulsar en esta barra se muestra la secuencia afectada en el área de "Salida", formateada para facilitar su lectura. En el ejemplo sólo cubre una base:

Salida:

G

Las barras verde oscuro a izquierda y derecha de la barra roja representan las secuencias que hay a ambos lados de la secuencia resaltada. Al pulsar en esta barra se muestra la secuencia afectada en el área de "Salida", formateada para facilitar su lectura. En el ejemplo, al pulsar en la zona aguas abajo se obtiene:

Salida:	Longitud:	284						
ATCTCGGTGCA	GCCCGGGTGA	GTCGGCAGG	GCGCGAGACG	GGGCCGGGGC	TCCGGAACCA	60		
GGCGCGGCCG	GCCAGGGTGA	CCCTGACTCG	GGCTCTCTCT	GATGCACCGG	CTGCCACCGC	120		
GATCCCGGCT	GCCAGCCCGA	GGCGCGCTTC	TCCGACGACT	GAGCACCRCG	GTGCCCTGAC	180		
ACCATCCGGAG	CACAGCCCTC	ACTCCCTCTG	TAAATCATCC	CAGGAATTAT	GACAATGAAA	240		
TAAAGCCTTT	TTTCCGCTTC	CAACAAAGCT	CGTGCTGTAG	TGTA				

Las barras horizontales, anchas, verde claro representan la posición de las características de tipo exón que tenga la secuencia. La longitud horizontal de estas barras es proporcional a la longitud de cada uno de los exones representados. El número máximo de exones que este formulario puede representar es 40.

La longitud, en pb, de la secuencia resaltada se imprime bajo la zona resaltada, en color granate. En el ejemplo: 1pb.

Las longitudes de la secuencia anterior y posterior a la zona resaltada también se imprimen, centradas, bajo sus respectivas localizaciones; en color verde. En el ejemplo: 1315pb y 284pb.

Lista de características: Este es un listado de las características que contiene la secuencia. El título de la tabla informa del nombre de la secuencia a la que pertenecen cada una de las características. Cada fila representa a una de las características de la secuencia. El significado de cada columna es el siguiente:

1. Inicio de la característica. En la seleccionada 1316.
2. Fin de la característica: En la seleccionada 1316.
3. Tipo de la característica. En la seleccionada SNP.
4. Nombre de la característica. En la seleccionada S(Gc).

1317pb 1pb 284pb

Características de la secuencia SEQ-OXT_PCRb>:

Inicio	Final	Tipo	Nombre
646	646	SNP	R(GA)
686	686	SNP	K(Tg) en macho 1
1333	1333	SNP	S(Gc)
1501	1501	SNP	R(Ga)

Inicio | Final | Tipo | Nombre

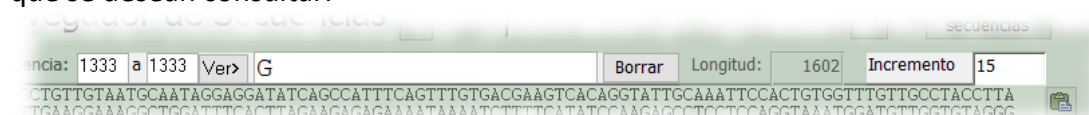
Al pulsar sobre una de las filas se muestra en el mapa la posición que ocupa dicha característica, así como su longitud y la de las bases que hay a los extremos de dicha secuencia. En el área de "Salida" se imprimen, resaltadas, las bases que ocupa la característica. Además dichas bases quedan seleccionadas. De esta forma se pueden copiar rápidamente para realizar operaciones posteriores con ellas. El inicio y el fin de

la secuencia se cargan en los recuadros de inicio y de fin y la secuencia que abarca la característica se carga en el cuadro de secuencia obtenida.

Al pasar el ratón sobre la lista se muestra un cuadro con el significado de cada una de las columnas (Inicio, Final, Tipo y Nombre).

La lista está disponible cuando el Navegador es llamado desde el [formulario de secuencias](#). Dado que el Navegador de Secuencias puede ser utilizado como herramienta independiente, cuando se lanza de esta manera la lista estará vacía. No hay forma de añadir características a una secuencia desde el Navegador. Para hacer esto debe usarse el formulario de secuencias.

Controles de selección: Estos controles permiten especificar las bases de la secuencia que se desean consultar.



La función de cada uno de ellos es la siguiente:

- **Inicio de sección:** El cuadro de inicio almacena la primera posición de la secuencia que se desea consultar, incluida. Debe tenerse en cuenta que a la posición de una base en la secuencia hay que sumarle el incremento.
- **Final de sección:** Última posición de la secuencia que se desea consultar, incluida. Si este campo permanece vacío, al pulsar "Ver>" se rellena con la misma posición que se encuentre en "Inicio de sección". Debe tenerse en cuenta que a la posición de una base en la secuencia hay que sumarle el incremento.
- **Ver>:** Al pulsar este botón se ejecuta la consulta y se muestra la zona seleccionada tanto en el cuadro de salida como en el mapa de la secuencia.

En el cuadro de salida se muestra toda la secuencia pero se resaltan, en color granate, las bases que están dentro del intervalo pedido. Si se introduce un valor de sección superior al número de bases de la secuencia se mostrará un mensaje de error indicándolo:

Secuencia:	1703	a	16001	Ver>	GGTCTCCCTCCC	Borrar	Longitud:	1602
<p>GTAGCTGTTGTAATGCAATAGGAGGATATCAGCCATTTTCAGTTTGTGACGAAGTCACAGGTATTGCAAAATCCACTGTGGT TAGTTGAAGGAAAGGCTGGATTTTCACTTAGAAGAGAGAAAAATAAAATCTTTTCATATCCAAAGAGCCTCCTCCAGGTAAAT AGCCGGGCTGGGTTCCAGGAAATCAGATTTCAGGAAGAGAACTTGCTTGCAGAGGGGAGCTAGGGGGTGTGTGTGTTG GGGGAGTCCCTAAACCAATCTCTTCTCGCCTGGAGGGCCCCAGTGTTCATCCTGACCCCTCACCCCAAGGAATGAGAGAG AGCCCCATACTCCCTGTCCACCGTAGGAGCCAGGCCACCGCACAGGCTCCCTGCCAGAGCTGCTTGCCTTCCCTAGC TCGCTATCATCTCCCGTAAACATTAGCCATTAGCAGACATAACCTTGACCCGGCACAGCCCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGC GACCCGCGGGCGCGCTGTGACCATGTCGCGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCCCACRCGGCCCGGGGCTTAA GACGGCKCAGTCCCGGGCCGGAGCCCCAGCGCTCTGCACCATGGCAGGTTCCAGCCTCGCCTGCTGCCTGCTCGGCTC GCCTGTACATTCAGAACTGCCCTTGGGCGGCAAGCGTGCGGTGCTGGACCTCGACGTGCGCACGGGTAGCGCCCCCGCC</p>								
Salida:							Longitud:	1602

La secuencia no es tan larga. Sólo tiene 1602pb

Si se pide un valor de base inválido, por ejemplo 0:

Secuencia:	0	a	177
------------	---	---	-----

Se obtiene un mensaje de error:

Secuencia:	0	a	177	Ver>	GGTCTCCCTCCC	Borrar	Longitud:	1602	Incremento	15
<p>GTAGCTGTTGTAATGCAATAGGAGGATATCAGCCATTTTCAGTTTGTGACGAAGTCACAGGTATTGCAAAATCCACTGTGGT TAGTTGAAGGAAAGGCTGGATTTTCACTTAGAAGAGAGAAAAATAAAATCTTTTCATATCCAAAGAGCCTCCTCCAGGTAAAT AGCCGGGCTGGGTTCCAGGAAATCAGATTTCAGGAAGAGAACTTGCTTGCAGAGGGGAGCTAGGGGGTGTGTGTGTTG GGGGAGTCCCTAAACCAATCTCTTCTCGCCTGGAGGGCCCCAGTGTTCATCCTGACCCCTCACCCCAAGGAATGAGAGAG AGCCCCATACTCCCTGTCCACCGTAGGAGCCAGGCCACCGCACAGGCTCCCTGCCAGAGCTGCTTGCCTTCCCTAGC TCGCTATCATCTCCCGTAAACATTAGCCATTAGCAGACATAACCTTGACCCGGCACAGCCCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGC GACCCGCGGGCGCGCTGTGACCATGTCGCGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCCCACRCGGCCCGGGGCTTAA GACGGCKCAGTCCCGGGCCGGAGCCCCAGCGCTCTGCACCATGGCAGGTTCCAGCCTCGCCTGCTGCCTGCTCGGCTC GCCTGTACATTCAGAACTGCCCTTGGGCGGCAAGCGTGCGGTGCTGGACCTCGACGTGCGCACGGGTAGCGCCCCCGCC</p>										
Salida:							Longitud:	1602		
<p>Error nº 5: Argumento o llamada a procedimiento no válida Este error podría deberse a que la secuencia esté mal alineada con sus características. Revisa el valor de incremento.</p>										

Este error también se produce cuando las características no están bien alineadas con la secuencia porque el valor de incremento no está bien establecido.

- **Texto de sección:** Muestra el texto contenido en la sección:

GGTCTCCCTCCC

- **Borrar:** Borra los datos del Inicio, Final y Texto de la sección.
- **Incremento:** Indica el número de posiciones que está desplazada la secuencia con respecto al origen de coordenadas. Así, si el incremento es de 10, la primera base de la secuencia tendrá la coordenada 11. (Esto es Incremento + posición).

Controles de traducción: Estos controles permiten configurar el modo de traducción de la secuencia. Debe tenerse en cuenta que sólo se traducen las bases comprendidas entre las posiciones "Inicio de sección" y "Final de sección".

Características	TCAG
Traducir>	Salida:
Código	TCCC
<input type="radio"/> 1- A	GGCC
<input checked="" type="radio"/> 3-Aaa	TCCC
Marco	TCAG
<input checked="" type="radio"/> 1	GGCC
<input type="radio"/> 2	TTGAG
<input type="radio"/> 3	GGCC
Ver	GCAC
<input type="radio"/> AA	GCAC
<input type="radio"/> NN	ACCT
<input checked="" type="radio"/> Ambas	1316
	1484

Traducir>: Traduce el código del campo "Secuencia". Muestra la traducción en el campo "Salida":

Salida:
GGTCTCCCT
GlyLeuPro

Debe tenerse en cuenta que sólo se traducen las bases comprendidas entre el Inicio y el Final de la sección. Si estos valores no están establecidos, se genera un error que informa de ello:

Secuencia: a Ver> Long

GTAGCTGTTGTAATGCAATAGGAGGATATCAGCCATTTTCAGTTTGTGACGAAGTCACAGGTATTGCAAA
TAGTTGAAGGAAAAGGCTGGATTTTCACTTAGAAGAGAGAAAATAAAATCTTTTCATATCCAAGAGCCTCC
AGCCGGGCTGGGGTTCCAGGAAATCAGATTTTCAGGAAGAGAACTTGCTTGCAGAGGGGAGCTAGGGGGT
GGGGAGTCCTAAACCAATCTCTTCTCGCCTGGAGGGGCGGAGTGTTCATCCTGACCCCTCACCCCAAG
AGCCCCCATACTCCCTGTCCACCGTAGGACCCAGGCCACCGCACAGGCTCCCTGCCAGAGCTGCTTG
TCGCTATCATCTCCGTAAACATTAGCCATTAGCAGACATAACCTTGACCCGGCACAGCCCTGCAAAATG
GACCCGCGGGCGGCGCTGTGACCAGTCATGCGGCTGCCCTCTTAAGACACCGTTCCGCCACRCGGCO
GACGGCKCAGTCCCGGGCCGGAGCCCAAGCGCTCTGCACCATGGCAGGTTCACAGCCTCGCCTGCTGO
GCCTGCTACATTGAGAACTGCCCCCTGGGCGGCAAGCGTGCGGTGCTGGAOCTCGACGTGCGCACGGTG.

Salida: Long

No puedo traducir. Revisa el inicio y el final de la zona a traducir.

El resto de controles permite configurar el modo de traducción:

Código: Permite seleccionar si usar el código de 1 ó de 3 aminoácidos:

- **A:** Indica que se desea utilizar el código de 1 aminoácido: G L P
- **3-Aaa:** Indica que se desea utilizar el código de 3 aminoácidos: GlyLeuPro

Marco: Indica el marco de lectura a utilizar:

- **1:** Se utilizará el marco de lectura 1: GlyLeuPro
- **2:** Se utilizará el marco de lectura 2: ValSer
- **3:** Se utilizará el marco de lectura 3: SerPro

Ver: Indica las secuencias que ver al efectuar la traducción:

- **AA:** Sólo se muestra la cadena de aminoácidos: GlyLeuPro
- **NN:** Sólo muestra la cadena de nucleótidos traducida: GGTCTCCCT
- **Ambas:** Muestra las 2 cadenas, nucleótidos y aminoácidos, alineadas:
 Salida:
 GGTCTCCCT
 GlyLeuPro

El algoritmo de traducción admite caracteres ambiguos. En caso de encontrarlos traduce todas las opciones posibles. Al representarlo añade los guiones necesarios para mantener el alineamiento. Por ejemplo, la secuencia "aaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaa" contiene una Y en la posición 17. La Y representa a los nucleótidos C o T. Al traducir la secuencia entre las bases 10 y 24 se obtiene:

Secuencia: 10 a 24 Ver> AAAAAAYAAAAAA

aaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaa

Salida:

AAAAAA(AYA---)AAAAAA
 LysLys(ThrIle)LysLys

En la línea de secuencia, el codón AYA se ha expandido 2 posiciones para alinear con las representación de las variantes alternativas.

En la línea de traducción, el código (ThrIle) significa que en esa posición pueden darse cualquiera de las 2 variantes Thr o Ile.

En todo momento se presentan todas las variantes posibles. Por ejemplo, en el mismo caso, si el código ambiguo fuese una N, que equivale a cualquiera de los 4 nucleótidos A, C, G o T, se obtendría:

Secuencia: 10 a 24 Ver> AAAAAAAAAAAAAAAAAA

aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Salida:

AAAAAA(---ANA-----)AAAAAA
LysLys(LysThrArgIle)LysLys

Esto es porque AAA => Lys, ACA => Thr, AGA => Arg y ATA => Ile. Como puede verse, el código de la secuencia se alinea, en lo posible, en la posición del codón central de la región ambigua.

Si coinciden más de un código de ambigüedad en un mismo codón se calculan todas las posibilidades. El caso más extremo es NNN, que produce todas las combinaciones posibles:

Secuencia: 10 a 24 Ver> AAAAAANNNAAAAAA Borrar Longitud: 33

aaaaaaaaaaaaaannnaaaaaaaaaaaaaa

Salida: Longitud: 33

AAAAAA(-----
LysLys(LysAsnLysAsnThrThrThrThrArgSerArgSerIleIleMetIleGlnHisGlnHisProProProProA
-----NNN-----
rgArgArgArgLeuLeuLeuLeuGluAspGluAspAlaAlaAlaAlaGlyGlyGlyGlyValValValVal * Tyr *
-----)AAAAAA
TyrSerSerSerSer * CysTrpCysLeuPheLeuPhe)LysLys


El signo * indica codón STOP.


Cuando los caracteres no son traducibles se muestra el signo ??: P P P J J J L L L N N N
? ? ? ?


Botones de la Salida: Estos botones son útiles para modificar el contenido del cuadro de Salida.



El cometido de estos botones es el siguiente:

 **Sincronizar:** Envía el contenido del área de salida al área de secuencia. Está pensado para fijar en la secuencia las posibles modificaciones que se hayan realizado en el área de salida. Dado que el área de salida muestra el texto formateado es fácil localizar aquí la región de interés. Esta región se puede modificar. Si se quieren realizar operaciones posteriores con la secuencia modificada hay que copiar la secuencia de este área y pegarla en la de salida. Este botón realiza el proceso automáticamente.

 **Copiar:** Selecciona todo el texto del área de salida y lo copia en el portapapeles del sistema.

 **Limpiar secuencia:** Limpia el contenido del panel de secuencia de forma que sólo deja los caracteres que pueden formar parte de una secuencia. Elimina las marcas HTML y cualquier carácter no alfabético.

Es habitual obtener secuencias formateadas para facilitar su legibilidad:


```
CGGCGGGTCC CCTCCGGGCC CCGGCTCATC CCGGCCCTCC CGCCAGTGTC TCCCCTGCGG 60
CCCCGGGGGC AAAGGCCGCT GCTTCGGGCC CAGCATCTGC TCGGGGACG AGCTGGGCTG 120
CTTCGTGGGC ACGGCCGAGG CGCTGCGCTG CCGAGAGGAG AACTACCTGC CGTCGCCCTG 180
CCAGTCCGGC CAGAAGCCCT GCGGGAGCGG GGGCCGCTGC GCGCCGCGG GGATCTGCTG 240
CAGCCCGGGT GAGTCCGGCA GGGGCCGAGA CCGGGCCGGG GCTCCGGAAC CAGGCGGGCC 300
GGGCCAGGGT GGCCTGACT CGGCGTCTCT CTGTGCAGAC GGCTGCCACG CGGATCCCGC 360
CTGCGACCCC GAGGCGCCCT TCTCCAGCA CTGAGACCGR CCGGCCCTG ACACCATCGG 420
AGCACAGCCC TACTCCCTC TGTAAATCAT CCCAGGAATT ATGACAATGA AATAAAGCCT 480
TTTTTCCCC TCCAACAAGC CTCGTGTCTG AGTGTA
```

Al pulsar "Limpiar secuencia" se eliminan los espacios y los números:

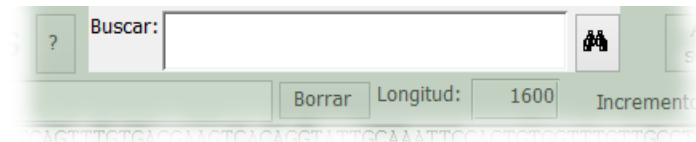
```
CGGCGGGTCCCTCCGGGCCCGGCTCATCCCGCCCTCCCGCCAGTGTCTCCCTCGCGCCCGGGGGCAAGGCCGCTGCTTCGGGCCAGCAT
TTGCTGCGGGGACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCAAGGCCGAGGCGCTGCGCTGCCGAGAGGAGAACTACCTGCGCTGCCCTGCCAGTCCGGCCA
GAAGCCCTGCGGGAGCGGGGCGCGTGCGCCCGCCCGGGATCTGTGCAGCCCGGGTGAGTCCGGCAGGGGCGGAGACGGGGCCGGGGCTCCGGA
ACCAAGCGGGGCGGGCCAGGGTGGCCCTGACTCGGGCTCTCTCTGTGCAGACGGCTGCCACGCGGATCCCGCTGCGACCCCGAGGCCGCTTCTC
CCAGCACTGAGACGRCGCGCCCTGACACCATCGGAGCACAGCCCTCACTCCCTCTGTAATCATCCCGAGGAATTATGACAATGAAATAAAGCCT
TTTTTCCCCTCCAACAAGCCTCGTGTCTGAGTGTA
```

Botones de Secuencia: Este botón aplica su acción sobre el cuadro de Secuencia.




 **Pegar:** Pega el contenido del portapapeles en el cuadro de Secuencia. Está pensado para ser utilizado en conjunción con el botón Copiar del área de salida. Sin embargo, la función de ambos puede ser suplida por el botón Sincronizar de dicho área.

Buscar: Permite realizar búsquedas dentro de la secuencia registrada en el cuadro Secuencia.



Para ello, se introduce la secuencia buscada y se pulsa en el botón "Buscar". Los resultados se muestran en un cuadro lateral:

Navegador de Secuencias

Buscar: 

Borrar Longitud: 1600 Incremento: 15

Secuencia: 1439 a 1495 Ver: Borrar Longitud: 1602 Incremento: 15

Inicio	Fin
411	414
417	420
449	452
471	474

Salida: Buscando tccc. (4 pb).
 Encontrada en la posición 411. Coordenadas: 396-414.
 Encontrada en la posición 417. Coordenadas: 402-420.
 Encontrada en la posición 449. Coordenadas: 434-452.
 Encontrada en la posición 471. Coordenadas: 456-474.
 Encontrada en la posición 498. Coordenadas: 483-501.
 Encontrada en la posición 690. Coordenadas: 675-693.
 Encontrada en la posición 859. Coordenadas: 844-862.
 Encontrada en la posición 918. Coordenadas: 903-921.

En el área de salida se muestra información detallada de la búsqueda:

```
Buscando tccc. (4 pb).
Encontrada en la posición 411. Coordenadas: 396-414.
Encontrada en la posición 417. Coordenadas: 402-420.
Encontrada en la posición 449. Coordenadas: 434-452.
...
Encontrada en la posición 1533. Coordenadas: 1533-1536.
Encontrada en la posición 1570. Coordenadas: 1570-1573.
Busqueda finalizada. Encontradas 21 coincidencias.
```

El cuadro "Resultados" lista las coincidencias obtenidas. Al pulsar en una de ellas se representa su posición en la Secuencia y en el Mapa:

Navegador de Secuencias

?

Buscar: TCCC

Alinear 2 secuencias

Coordenadas Relativas

Navegador de Secuencias

Secuencia: 411

a 414

Ver>

TCCC

Borrar

Longitud: 1602

Incremento 15

GTAGCTGTTGTAATGCAATAGGAGGATATCAGCCATTTCAGTTTGTGACGAAGTCACAGGTATTGCAAAATTCACCTGTGGTTTGTGGCTACCTTA

TAGTTGAAGGAAGAGGCTGGAATTCACITTAGAAGAGAGAAAAATAAACTCTTTTCATATCCGAAGAGCTCTCCAGGTAATGTGATGTTGGTGTAAGG

AGCCGGGCTGGGGTTTCAGGAATAACGATTTTCAGGAAGAGAACTTGCTTGCAGAGGGGAGCTAGGGGGTGTGTTGGTTGGCCAAAGGGGCAGATG

GGGGAAGTCTTAACCAACTCTCTTCTCGCTGGAGGGGCGAGTGTTCACTCTGACCCCTCACCCAAAGGAATGAGAGAGTCTCGGTTGGGGCGGC

AGCCCCCATACTCCCTGTCGCCACGCTAGGACCGAGGCCACCGCACAGGCTCCCTGCCACAGCTGCTTGCTTCCCTCAGGGCGGC---

TGCTATCATCTTCCCGTAACATTAGCCATTAGCAGACATAAACCCTTGACCCGGCAGCAGCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGGGGCGCAGGGGCT

GACCCCGGGCGGGCGCGCTGTGACAGCATCATCGGCTGCCCTCTTAAAGCACCGCTTCGCCGCCACRGGGCGCGGGCTTAAAAGGGCCAGACCGAGAGA

GAGCGGCKCAGTTCGCCGGCGGAGCGAGCGCTGTGACCATGGCAGSTTCCAGCTCGGCTGCTGCTGCTCGGCTCTTGGGCTGTGACTCT

GCGTGCTACATTAGAACTGCCCTTGGGGCGCAAGGTCGGTGCTGGAACCTGACGTGCGCAGCGGTGAGCGCCCGGCCCTCGTCCGTTGGCTCT

Resultados.

Inicio	Fin
411	414
417	420
449	452
471	474

Salida:

Longitud: 1602

GTAGCTGTTGTAATGCAATAGGAGGATATCAGCCATTTCAGTTTGTGACGAAGTCACAGGTATTGCAAAATTCACCTGTGGTTTGTGGCTACCTTA

TAGTTGAAGGAAGAGGCTGGAATTCACITTAGAAGAGAGAAAAATAAACTCTTTTCATATCCGAAGAGCTCTCCAGGTAATGTGATGTTGGTGTAAGG

AGCCGGGCTGGGGTTTCAGGAATAACGATTTTCAGGAAGAGAACTTGCTTGCAGAGGGGAGCTAGGGGGTGTGTTGGTTGGCCAAAGGGGCAGATG

GGGGAAGTCTTAACCAACTCTCTTCTCGCTGGAGGGGCGAGTGTTCACTCTGACCCCTCACCCAAAGGAATGAGAGAGTCTCGGTTGGGGCGGC

AGCCCCCATACTCCCTGTCGCCACGCTAGGACCGAGGCCACCGCACAGGCTCCCTGCCACAGCTGCTTGCTTCCCTCAGGGCGGC---

TGCTATCATCTTCCCGTAACATTAGCCATTAGCAGACATAAACCCTTGACCCGGCAGCAGCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGGGGCGCAGGGGCT

GACCCCGGGCGGGCGCGCTGTGACAGCATCATCGGCTGCCCTCTTAAAGCACCGCTTCGCCGCCACRGGGCGCGGGCTTAAAAGGGCCAGACCGAGAGA

GAGCGGCKCAGTTCGCCGGCGGAGCGAGCGCTGTGACCATGGCAGSTTCCAGCTCGGCTGCTGCTGCTCGGCTCTTGGGCTGTGACTCT

GCGTGCTACATTAGAACTGCCCTTGGGGCGCAAGGTCGGTGCTGGAACCTGACGTGCGCAGCGGTGAGCGCCCGGCCCTCGTCCGTTGGCTCT

395pb

4pb

1203pb

=> Exón

Además de los controles mostrados, el formulario tiene botones para llamar a otros formularios de la base de datos o configurar el navegador:

- Ayuda:** Lanza el formulario de [ayuda](#) de la base de datos para mostrar o anotar ayuda específica del formulario actual.
- Alinear 2 secuencias**
Alinear 2 secuencias: Llama al formulario "[Ver Muestras Secuenciadas Con Incremento](#)". Permite comprobar el alineamiento entre una secuencia y su referencia.
- Secuencias**
Secuencias: Llama al formulario de adición de [Secuencias](#).
- Muestra secuenciadas**
Muestras secuenciadas: Llama al formulario de adición de [Muestras Secuenciadas](#).
- Características**
Características: Llama al formulario de adición de [Características](#).

☐ **Posición relativa:** Configura el formulario para que utilice la posición relativa en las coordenadas de las secuencias. Esto es, ignora el incremento. Por ejemplo: la secuencia tiene un incremento de 15 bases y se piden las que van de la 1 a la 5. En el caso de usar coordenadas absolutas se obtiene un error por no coincidir en los límites de la secuencia:

Posición relativa	Secuencia: 1 a 5 Ver> GTAGC		Borrar	Longitud: 1602	Incremento 15
	GTAGCTGTTGTAATGCAATAGGAGGATATCAGCCATTTCAGTTTGTGACGAAGTCACAGGATTGCAAAATTCACACTGGTGTGTTGTTGCTACCTTA TAGTTGAAGGAAGAGGCTGGATTTCACCTTAGAAGAGAGAAAAATAAATCTTTTCATATCCCAAGAGGCTCCTCCAGGTAATAATGGATGTTGGTGATGGG AGCCGGCTCTGGGGTTCCAGGAATACAGATTTCAGGAAGAACTGCTTGCAGAGGGGAGCTAGGGGGGTGTGTTGTTGGCCAAAGAGAGGCGCAGATG GGGGAGTGCTATAACCAATCTCTTCTTCGCTGGAGGGGGCCGAGTGTTCATCTTGACCCCTCACCCCAAGGAATAGAGAGAGTCTCGGTTGGGCGCG AGCCCCATACTCCCTGTCCCAACCGTAGGAACCGACGGCCACCGCACAGGCTCCCTGCCAGAGCTGCTTGCCTCCCGTAGCTGGCGC— TCGCTATCATCTCCCGTAACCATATTAGCATTATGACACATAAATCTTGACCCGGCACAGCCCTGCAAAATGAGGGGGCGCGCGGGGGCGCAGGGCCT GACCCGCGCGCGCGCTGTGACAGCTCATCGCGCTGCCCTTTAAAGACACCGTTCCGCGCTACGCGCCCGCGGGCTAAAAGAGCCACAGCCGAGA CAGCGCCCKAGTCCCGCGCCGAGCCACGCGCTGTGCACCATGGCAGGTTCCAGGCTCGCTGCTGCTGCTGCGCTCCTCGCGTGTGACCTCC GCTGTGACATTGCAAACTGCCCCCTGGGCGGCAAGCGTGCGGTGTGAGCTCGAGTGGCAGCGTGAGCGCCCGCGCCTCGTCCGCTGGCTCT				
Secuencias					
Muestra secuenciadas					
Características					

En caso de marcar “Posición relativa” se toma el inicio de la secuencia como el inicio de coordenadas y no hay error:

☒ Posición relativa Secuencia: 1 a 5 Ver> GTAGC Borrar Longitud: 1602 Incremento 15

Secuencias

Muestra secuenciadas

Características

Salida: Longitud: 1602

Traducir> Código

CoordenadasRelativas

CoordenadasRelativas: Este botón indica el sistema de referencia contrario al usado actualmente. Si se está usando el sistema de referencia absoluto, el texto del botón es “CoordenadasRelativas”. Al pulsar en él se muestran las coordenadas de la región seleccionada en el sistema relativo. En el ejemplo anterior:

CoordenadasRelativas

-14 a -10
maximo:
1602

También indica el valor máximo que cubre la secuencia.

Si se cambiase al sistema de referencia relativo, el texto del botón cambiaría a “CoordenadasAbsolutas” y, al pulsar en él, mostraría las coordenadas de la selección en el sistema absoluto. En el ejemplo anterior:

CoordenadasAbsolutas

16 a 20
maximo:
1617

También indica el valor máximo que cubre la secuencia.

☒ **Mayúsculas** **Mayúsculas:** Si está seleccionado este control, al pulsar en “Ver” se resalta en mayúsculas la zona encontrada. Los extremos se capitalizan en minúsculas.

☒ Posición relativa Secuencia: 20 a 50 Ver> AGGAGGATATCAGCCATTTC Borrar Longitud: 1602 Incremento 15

Secuencias

Muestra secuenciadas

Características

Salida: Longitud: 1602

Traducir> Código

☒ Mayúsculas

Si no está seleccionado el modo mayúsculas no se cambia la capitalización.

8.1.10.1.6 Prolactina**Prolactina:**

Un enlace a un conjunto de archivos HTML que muestran información sobre los trabajos en el gen de la prolactina.

8.1.10.1.7 Protocolos De PCR**Protocolos de PCR:**

Es una hoja de cálculo diseñada para calcular las cantidades de los reactivos de los experimentos de PCR. El contenido de esta hoja se explica en la sección "[Abrir Protocolos De PCR](#)".

8.1.10.1.8 Manuscrito**Manuscrito:**

Un enlace a un archivo que contiene las hojas escaneadas del cuaderno de laboratorio. Requiere conocer la contraseña de apertura.

8.1.11 Tablas

En esta pestaña se recogen los botones de acceso directo a las tablas de la base de datos.

Cada botón de esta pestaña abre la tabla de nombre homónimo. Las tablas contienen la información en bruto. La introducción o consulta de información suele ser mucho más fácil y amigable a través de los formularios o consultas de la base de datos.

Puede, sin embargo, ser interesante acceder a las tablas cuando se pretende introducir grandes volúmenes de información. Este supuesto suele darse cuando la información procede de un soporte informático, y ya ha sido formateada en el ordenador para que coincida con el formato de la tabla de destino.

Datos

PCR

SSCP

Secuenciación

SNPs

! Añadir información

SQL Consultar Información

Herramientas

Ver Tablas

Aditivos	Mutaciones
Ayudas	Mutaciones deleciones
Características	Mutaciones inserciones
Cajas	Mutaciones puntuales
Cebadores	Patrones
Categorías	Programas de PCR
Concentraciones	Protocolos de PCR
Deleciones	Protocolos de secuenciación
Días	Protocolos de SSCP
Experimentos SSCP	Razas
Fragmentos	Secuencias
Genes	Sustituciones
Genotipos	SNPs
Inserciones	Termocicladores
Muestras	Tipo de Taq
Muestras Secuenciadas	Variables Globales

Ver: Protocolos de Secuenciación

Este botón abre la tabla Protocolos de Secuenciación. Las tablas contienen la información en bruto. La introducción o consulta de información suele ser mucho más fácil y amigable a través de los formularios o consultas de la base de datos.

Puede, sin embargo, ser interesante acceder a las tablas cuando se pretende introducir grandes volúmenes de información. Este supuesto suele darse cuando la información procede de un soporte informático, y ya ha sido formateada en el ordenador para que coincida con el formato de la tabla de destino.

8.1.11.1 VariablesGlobales

Variables Globales:

Esta tabla recoge las variables que necesita almacenar el código del programa para su correcto funcionamiento.

En general, no tiene sentido que el usuario cree variables globales. Estas son creadas por el programador como variables permanentes que se almacenan automáticamente en la memoria. Están pensadas para ser utilizadas por el código del programa.

La mayoría de ellas nunca deben ser modificadas por el usuario, son sobrescritas automáticamente por el código de los formularios.

Como excepción a esta regla, puede ser que el usuario esté interesado en modificar las siguientes variables:

DirectorioAle: La variable “DirectorioAle” determina el lugar donde está el directorio origen de todas las rutas relativas. Debe ser introducido manualmente al instalar el programa para que el formulario Inicio funcione correctamente. El valor de esta

variable debe ser una cadena de texto con la ruta de un directorio del sistema. Se considerará que las rutas relativas almacenadas en la base de datos cuelgan de este directorio.

Esto permite, por ejemplo, almacenar los archivos de alineamientos en subdirectorios del directorio en que se encuentre el archivo de la base de datos. Al ser enlazado de forma relativa en el formulario de secuencias, se pueden copiar y mover a otro directorio u ordenador sin que se pierda la posibilidad de consultarlos. Únicamente hay que modificar adecuadamente esta variable global.

PrefijoDireccionBusquedaNCBI: Esta variable almacena la cadena que se usa para crear la dirección del NCBI que se utiliza para consultar las secuencias almacenadas en dicha base de datos mediante un navegador.

Esta cadena es una URL a la que, al final, se le debe pegar el código del NCBI para crear la dirección completa. Si dicha dirección cambiase en el futuro se podría seguir consultando simplemente con cambiar esta variable. Si se prefiere usar otra base de datos bastaría con que dicha base de datos tenga un servicio REST equivalente y se podría usar modificando esta Variable Global.

8.1.12 Acerca De La Ayuda

Este archivo de ayuda está creado para la versión 57 de la base de datos.

Autor: Jose Alejandro Morán Pérez

8.2 Anexo II: Soluciones empleadas.

A continuación se recogen las disoluciones que se utilizaron de forma rutinaria en el laboratorio y su modo de preparación.

8.2.1 Tampones.

8.2.1.1 Tampón T₁₀E₁.

Este tampón es necesario para la dilución del ADN.

1. Mezclar:
 - Tris-HCl 1M -> 10 ml.
 - EDTA 0,5 M -> 2 ml.
 - dH₂O hasta 1 litro.

El tampón T₁₀E_{0,5} se hace igual, pero con la mitad de EDTA.

8.2.1.2 Tampón TBE 10x.

El tampón TBE es en el que se sumerge el gel de agarosa para correr los productos de PCR durante la electroforesis.

1. Añadir:
 - Tris 107,75 g.
 - Bórico 55 g.
 - EDTA 7,5 g ó 40 ml de dilución 0,5 M (Sambrook et al., 1989, pág. B11).
 - dH₂O hasta 1l, para una concentración 10× o hasta 2l para una concentración final 5×. Este tampón tiene la ventaja sobre el 10× que tarda mucho más en precipitar y se puede conservar durante más tiempo. El inconveniente es que ocupa el doble de volumen.

8.2.1.3 Tampón de carga de formamida.

Este tampón se añade al ADN antes de introducirlo en la cubeta. Tiene la función de dar densidad al ADN para evitar que se diluya en el tampón y caiga en el pocillo elegido. También tiene color para distinguir los pocillos cargados de los libres. Los colorantes migran como secuencias de ADN de tamaño conocido y son visibles durante la carrera. Así, es fácil evitar que las bandas de interés se salgan del gel.

1. Mezclar:
 - 10 ml de formamida.
 - 200 µl de EDTA 0,5M (pH 8,0).
 - 15 µl de xilencianol.
 - 3 mg de azul de bromofenol.

8.2.1.4 Ficoll 6x.

1. Para preparar 10 ml, mezclar:
 - 0,25% de azul de bromofenol (p/v)=0,025 g.
 - 0,25% de xilencianol = 0,025 g.
 - 15% de Ficoll = 1,5 g de Ficoll (Tipo 400: Pharmacia).
 - Hasta 10 ml de dH₂O.

8.2.1.5 Tampón Long Ranger.

Este es el tampón que se utiliza en el secuenciador de geles. Básicamente es un tampón TBE filtrado para eliminar impurezas.

1. Añadir:
Tris 108 g.
Bórico 55 g.
EDTA 7,44 g.
dH₂O hasta 1l.
2. Filtrarlo con un filtro de 45 µm.

8.2.2 Preparación de soluciones para PCR.

8.2.2.1 Tampón 10x PCR.

1. Mezclar:
KCl (1M) --> 2ml.
Tris HCl (pH 8,5) --> 400µl.
MgCl₂ (1M) --> 50µl.
Gelatina 2% --> 200µl.
dATP --> 80µl.
dTTP --> 80µl.
dCTP --> 80µl.
dGTP --> 80µl.
H₂O --> 1030µL.
Total 4µl.

8.2.2.2 Preparación de 500 µl de dilución de dNTP's (2mM).

1. Mezclar:
dATP 100 mM --> 10 µl.
dTTP 100 mM --> 10 µl.
dGTP 100 mM --> 10 µl.
dCTP 100 mM --> 10 µl.
H₂O estéril --> 460 µl.

8.2.2.3 Preparación de 1 ml de disolución de dNTP's (2mM).

1. Mezclar:
20 µl de stock.
980 µl de T₁₀E_{0,2}.

8.2.2.4 Dilución de marcadores de peso molecular.

Vienen de fábrica con un volumen de 200 µl.

1. Se diluyen 1:2 en EDTA (0,5 M, pH 8,0) con colorante Ficoll. En concreto, para 200 µl, añadir:
134 µl de EDTA 0,5 M, pH 8,0.
66 µl de Ficoll 6×.
200 µl de los marcadores de fábrica.
2. Hacer alícuotas de 50 µl.

8.2.2.5 Betaína 5M.

1. Diluir 0,676 ml de betaína por cada ml de H₂O.

8.2.3 Dilución del ADN.

El ADN se diluye al 5% en T₁₀E_{0,2}. Cantidades para 1 ml:
50 µl de ADN stock

950 μl $T_{10}E_{0,2}$

8.2.4 Dilución de los cebadores.

Vienen de fábrica liofilizados. Hay que rehidratarlos.

1. Se añade $T_{10}E_1$ (ó $T_{10}E_{0,2}$) para obtener una concentración 1mM. (Se corresponde con tantos μl como nmoles de ADN).
2. Vórtex 20 s
3. Centrífuga: 1 spin (10 seg).
4. Estufa: 30 minutos a 37 °C.
5. Vórtex 20 segundos.
6. Centrífuga: 1 spin.
7. Estufa 37 °C 30 minutos.
8. Ya tienen una concentración de 1 mM. Se diluyen en $T_{10}E_1$ a 10 μM . Es una dilución 1:100:
 10 μl de cebador
 990 μl de $T_{10}E_1$

8.2.5 Gel de agarosa.

Estos geles se utilizan para visualizar los productos de la PCR confirmando, en su caso, que se ha amplificado una única banda del tamaño adecuado. La concentración de agarosa puede variar según las condiciones de carrera que se deseen. Son habituales las concentraciones del 1 o 2 %.

La preparación del gel de agarosa se realiza de la siguiente forma:

1. Pesar 2 **g** de **agarosa**, para geles al 1 % ó 2 g para geles al 2 %.
2. **100 ml de TBE** (1×)
3. **Hervir:** Microondas, a 1000W; **45 s**
4. Añadir **7 μl** de **EtBr** cuando la temperatura sea menor de 60 °C.
5. **Cerrar el molde** con cinta de autoclave
6. Montar los peines.
7. **Esperar 20 minutos** a que la agarosa solidifique.

8.2.5.1 Carga del gel de agarosa.

La carga del producto de PCR en el gel se realiza de la siguiente manera:

1. **Mezclar 1 μl** de tampón **de carga** (6× **Ficoll**) **con 5 μl de muestra**.
2. **Depositarlo en los pocillos** cuando el gel esté sumergido en el tampón.

8.2.6 Bromuro de Etidio (EtBr).

El EtBr es un agente intercalante muy peligroso por su potencial carcinogénico. Debe manipularse con sumo cuidado y con las máximas medidas de protección. Para crear 40 ml dilución de EtBr (ver Sambrook et al., 1989, Apéndice B.11):

1. Mezclar 0,4 g de EtBr en 40 ml de H_2O . Conviene hacerlo en un tubo Falcon de 50 ml, con tapa hermética.
2. Agitar exhaustivamente en 2 periodos de 45 minutos. Para ello, resulta práctico pegarlo con cinta americana al vórtex y activarlo durante los 2 periodos. No debe escatimarse en cinta, debe asegurarse que está perfectamente adherido y, dada la peligrosidad del producto, no debe dejarse sin vigilancia mientras se agita.

8.2.7 Gel de acrilamida al 8%.

Para obtener una cantidad de 80 ml de gel, mezclar:

- 16 ml de acrilamida al 40%.
- 8 ml de TBE (10x).
- 56 ml de H₂O.
- 70 µl de TEMED.
- 530 µl de persulfato amónico al 10%.

8.2.8 Gel de acrilamida al 12%, con glicerol al 5%.

Para obtener una cantidad de 80 ml de gel, mezclar:

- 44 ml de dH₂O.
- 4 ml de glicerol.
- 8 ml de TBE (10x).
- 24 ml de acrilamida 37'5:1 (40%).
- 70 µl de TEMED.
- 530 µl de persulfato amónico al 10%.

Inmediatamente después de añadir el persulfato se vierte la mezcla en el molde del gel y se coloca un peine.

Este gel se deja polimerizar durante, al menos, 40 minutos.

8.2.9 MDE 0,5x.

Para 100 ml de esta matriz de gel se siguen estos pasos:

1. Mezclar:
 - 17,5 ml de solución de MDE³⁶ 2x.
 - 4,2 ml de TBE 10x.
2. Enrasar a 48,3 ml con H₂O (48,3 ml).
3. Añadir:
 - 61,3 µl de TEMED.
 - 463,8 µl de APS 10 % fresco.

8.2.10 Preparación de la acrilamida Long Ranger XL.

Esta es la matriz de los geles de secuenciación. Para prepararla

En un vaso de precipitados de 125 ml se vierten.

- + 18 g de urea.
- + 25 ml de dH₂O mili-Q.
- + 5,2 µl de acrilamida Long Ranger XL, 4,5%.
- + 5 ml de TBE 10x Long Ranger.

Agitar con una mosca para disolver todos los cristales de urea y filtrar al vacío con un filtro de un tamaño de poro de 0,45 µm.

8.2.11 Soluciones para tinción con nitrato de plata.

8.2.11.1 Fijador.

Se emplea ácido acético glacial 10% (v/v), compuesto por:

- 100 ml de ácido acético.
- 900 ml de dH₂O.

8.2.11.2 Solución de Impregnación.

Se emplea nitrato de plata (AgNO₃), compuesto por:

³⁶ <https://www.westburg.eu/products/genomics-research/dna-genome-analysis/snp-genotyping/mde-gel-solution>

6 ml de AgNO₃ en solución.
1 litro de agua destilada.

8.2.11.3 Revelador.

Se emplea carbonato sódico, compuesto por 30 g de carbonato sódico anhidro disueltos en 1 litro de dH₂O.

8.2.12 Soluciones para la clonación mediante el kit TOPO® TA Cloning.

Solución I: glucosa 50 mM; Tris-Cl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0.

Para 100 ml:

0,091 g de glucosa.
2,5 ml de Tris-Cl pH 8 de un stock de Tris-Cl 1M pH 8,0.
2 ml de EDTA pH 8 de un stock de EDTA 0,5 M pH 8,0.
hasta 100 ml con ddH₂O.

Esterilizar por filtración y conservar a 4 °C

Solución II: NaOH 0,2 M y SDS 1 %.

Para 100 ml:

2 ml de NaOH de un stock de NaOH 10 M.
10 ml de SDS de un stock de SDS 10 %.
hasta 100 ml de ddH₂O.

Conservar a temperatura ambiente

Solución III:

Para 100 ml:

60 ml de acetato potásico 5 M pH 5,8.
11,5 ml de ácido acético glacial.
28,5 ml de agua mili-Q.

Conservar a temperatura ambiente.

8.2.13 Medios de cultivo para la clonación.

8.2.13.1 LB (Medio de Luria-Bertani).

Es un medio de crecimiento rico y líquido (caldo de cultivo). Muy apropiado para bacterias. Composición: cantidades para 1 litro.

1. **Disolver**, en 800 ml de agua MiliQ, estas cantidades:

	Para 1 litro	Proporciones
Triptona	10 g	0,01 % p/v
Extracto de levadura	5 g	0,005 % p/v
NaCl	5 g	0,005 % p/v

Tabla 58. Composición del caldo Luria-Bertani (LB)

2. Ajustar el a **pH 7,0** con NaOH.
3. Completar el volumen **hasta 1 litro** con agua MiliQ.
4. **Repartir** el volumen total en 5 botellas de 200 ml.
5. **Esterilizar** en autoclave a **121° C, 15 min.**
6. **Dejar enfriar a temperatura ambiente antes de usar.**

8.2.13.2 Placas de LB/agar 2 % con ampicilina.

Es un medio de crecimiento rico y sólido. En él solo pueden crecer microorganismos resistentes a ampicilina.

1. Añadir **4 g de agar a** una botella de **200 ml de caldo LB** y esterilizar en autoclave.
2. Alternativamente, si estas placas han sido preparadas previamente y el agar está sólido, se puede **fundir** calentando la botella mediante microondas.
3. Dejar **enfriar** la botella de agar hasta 45 °C (a temperaturas inferiores el agar solidifica).
4. Durante este tiempo se pueden rotular 10 a 12 **placas de Petri** y disponerlas en la cabina de flujo laminar.
5. Disolver **ampicilina** en proporción 1:1000 (v/v). Esto es: 200 µl para cada botella de 200 ml de medio. Si la temperatura del agar es demasiado alta se puede degradar la ampicilina.
6. **Homogeneizar** volteando suavemente la botella, teniendo cuidado de no hacer burbujas.
7. Verter aproximadamente **20 ml de LB/agar** en cada placa y dejar solidificar.
8. **Esperar a que se solidifique**. Se depositan las placas en la superficie de la campana con la tapa abierta de forma que quede al aire al menos el 20 % de la superficie. Así se evita la condensación de vapor de agua en la tapa.
9. Almacenar al **4 °C** con las placas invertidas (para retrasar la deshidratación)/**almacenar** a -20 °C (según la necesidad de uso).

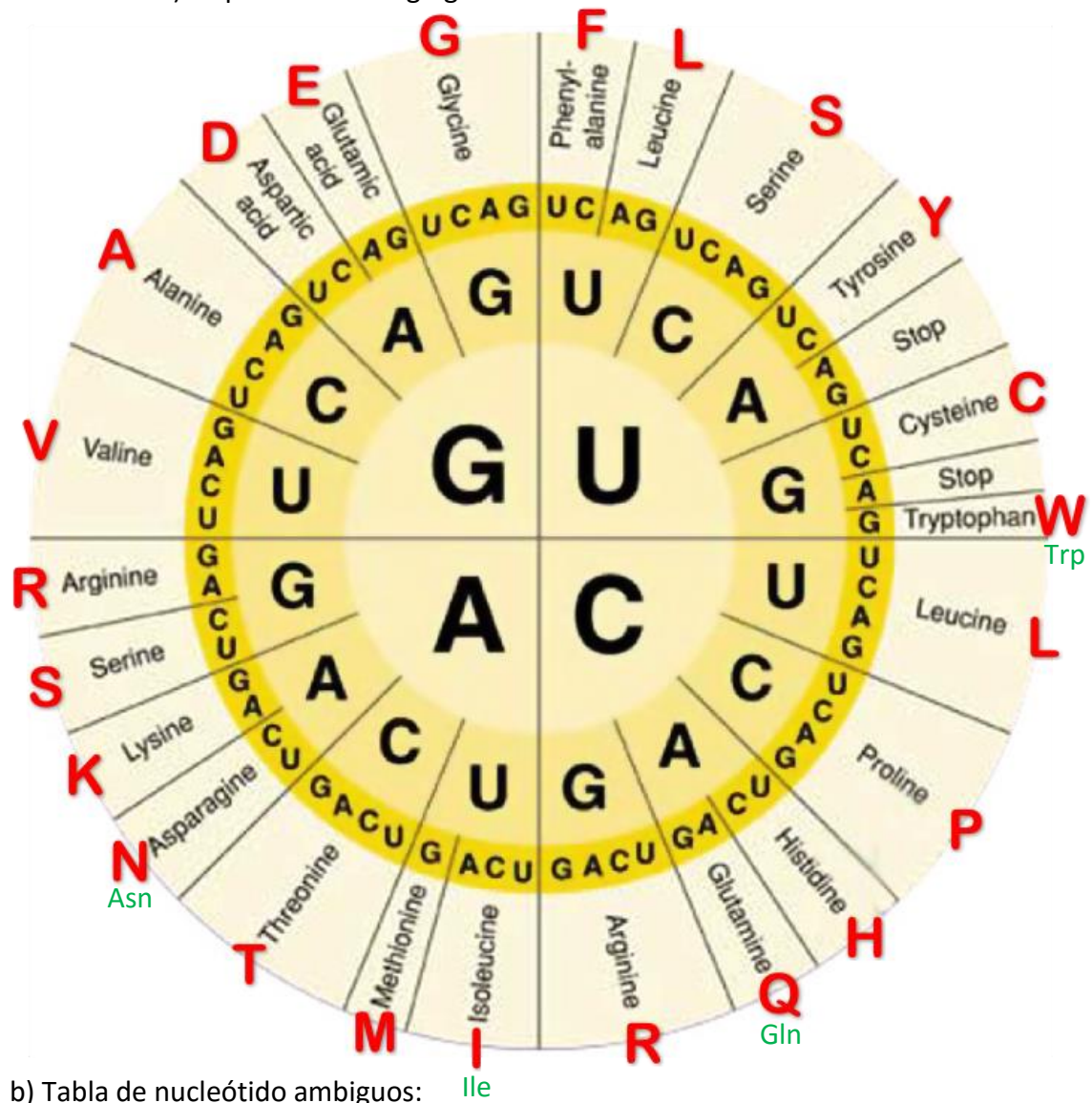
8.2.13.3 Adición de x-gal a las placas.

Si el vector lleva el polilinker en el gen LacZ es recomendable añadir x-gal a la placa para diferenciar las colonias que han incorporado el vector con inserto (de color blanco y usualmente mayoritarias) de aquellas que portan el vector recircularizado (azules y usualmente menos del 10 %). Para ello:

1. **Preparar** el número deseado de **placas** de LB + antibiótico precalentándolas a 37 °C.
2. Añadir **40 µl** de una solución 20 mg/µl **de x-gal** en N-N'-dimetilformamida por placa. Extenderla rápidamente por toda la superficie con un asa de siembra.
3. Almacenar a **4 °C**.

8.3 Anexo III: El código genético.

Este anexo tiene figuras de utilidad para la interpretación del significado de las secuencias. a) Esquema del código genético:



b) Tabla de nucleótido ambiguos: Ile

Código	Significado	Inverso
M	A o C	K
R	A o G	Y
W	A o T	W
S	G o C	S
Y	C o T	R
K	G o T	M
V	A o G o C	B
H	A o C o T	D
D	A o G o T	H
B	G o C o T	V
N	A o G o C o T	N