

ANEXO 1

Protocolo para la PCR para la amplificación del mtDNA en 10 fragmentos solapantes:

Se prepara la siguiente mezcla:

- Tampón (TRIS 100 mM, MgCl₂ 12 mM, KCl 500 mM, pH 8,3): 10X
- dNTPs : 10 mM (cada uno)
- Oligonucleótidos: 25 µM
- Taq polimerasa (Roche): 5U/µl
- DNA 100 ng
- H₂O Hasta completar un volumen de 50 µl

El programa térmico que debe llevar a cabo el termociclador es el siguiente:

- 94º C – 5min
 - 94º C – 45s
 - 56º C * – 30s
 - 72º C – 3min
 - 72º C – 5min
 - 4º C – ∞
- } 35 ciclos

* Este paso para F6, F4A, F4B y F4C es a 62º C.

ANEXO 2

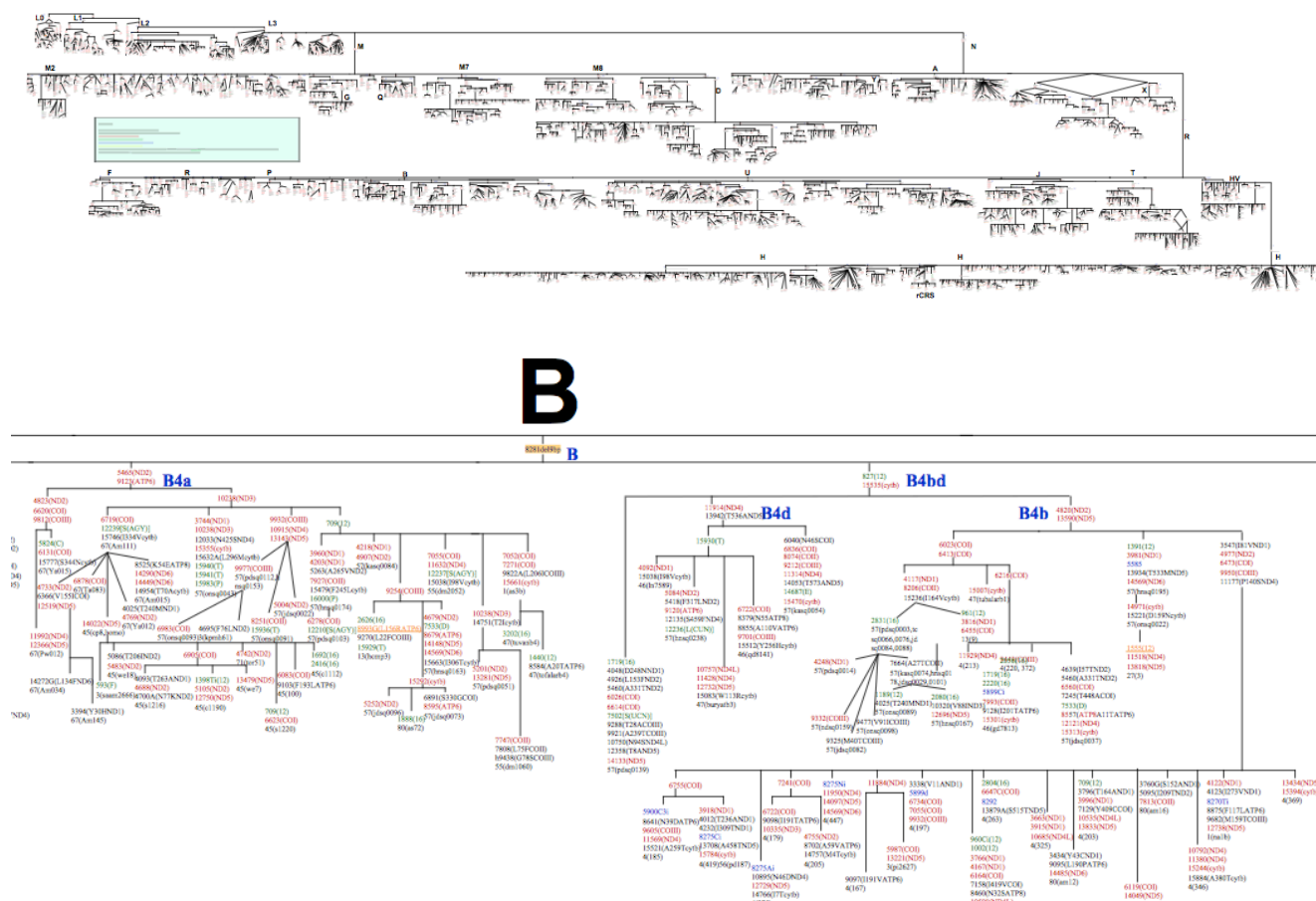
Tabla que recoge los oligonucleótidos empleados para la amplificación del DNA y su posterior secuenciación.

FRAGMENTO	OLIGO 5' - 3'	Hebra	SECUENCIA 5' --> 3'	TAMAÑO (pb)
F1	hmtL 569	L	AACCAAACCCCAAAGACACC	2452
	hmtH2982	H	CTGATCCAACATCGAGGTCG	
F2	hmtL2797	L	GTCCTAAACTACCAAACCTGC	2417
	hmtH5174	H	GTGTTAGTCATGTAGCTTG	
F3	hmtL5061	L	AGCAGTTCTACCGTACAACC	2476
	hmtH 7497	H	TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC	
F4A	hmtL7336	L	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC	955
	hmtH 8251	H	GCTATAGGGTAAATACGGGC	
F4B	COIIL 8018	L	CCGATTGAAGCCCCATTCTG	1272
	COH9250	H	GGGCTGGGTTTTACTATATG	
F4C	hmtL 8815	L	CTCATTTACACCAACCACCC	1140
	L6H	H	CTTCGAAGCCAAAGTGAT	
F5	hmtL 9611	L	TCCCACTCCTAAACACATCC	2539

	hmtH 12111	H	AAACCCGGTAATGATGTCGG	
F6	L1L	L	TACTCTTCAATCAGCCACAT	2811
	hmtH 14559	H	GATTGTTAGCGGTGTGGTCG	
F7	hmtL 14130	L	TCTTCCCACTCATCCTAACC	2590
	hmtH 112	H	ACAGATACTGCGACATAGGG	
F8	hmtL 15591	L	TTCGCCTACACAATTCTCCG	1643
	hmtH 626	H	TTTATGGGGTGATGTGAGCC	

ANEXO 3

La siguiente imagen corresponde al árbol filogenético de mtDNA, con el haplogrupo B ampliado. (Extraído de: <http://www.mitomap.org>).



ANEXO 4

Protocolo de la PCR larga:

Preparar el MIX de PCR usando los siguientes reactivos y proporciones:

Usamos, de la casa comercial FINNZYMES, el *kit Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer* (F-532L)

	Concentración	(Volumen final)	Concentración Final
2X Phusión Master Mix	2X	25 μ l	1X
Oligo L	25 μ M	1 μ l	0.5 μ M
Oligo H	25 μ M	1 μ l	0.5 μ M
DNA (100 ng)		X μ l	100 ng
H₂O		Añadir hasta 50 μ l	

Pareja de oligos: Fragmento amplificado de 12 Kb

- **ND2-Long L:** 5'-TTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTACTC-3' (Posición 4471)
- **Long H:** 5'-CGGATACAGTTCACCTTTAGCTACCCCAAGTG-3' (Posición 16486)

Repartimos el MIX en los tubos de PCR, añadimos el DNA y lo llevamos al termociclador usando el siguiente programa de amplificación:

Desnaturalización inicial:	98°C	30 seg	} 30 ciclos
Desnaturalización:	98°C	10 seg	
Extensión:	72°C	8 min 15seg	
Extensión final:	72°C	10min	

4°C

ANEXO 5

Protocolo del *Urea Assay Kit* de Abcam®:

Preparación de a curva estándar

Diluir Urea estandar a 0,5 mM añadiendo 5 μ l del de 100mM a 995 μ l de agua.
Añadir 0-2-4-6-8-10 μ l en cada pocillo, ajustar el volumen a 50 μ l para generar 0-1-3-4-5 nmol/pocillo de urea standard

Mix de reacción:

Para cada pocillo preparar 50 μ l de la reaction mix:

	muestra	muestra control
Tampón de ensayo	42 μ l	44 μ l

Sonda OxiRed	2 μ l	2 μ l
Mix de enzima	2 μ l	2 μ l
Revelador	2 μ l	2 μ l
Enzima convertidora	2 μ l	---

Añadir 50 μ l del mix de reacción en cada pocillo que contiene los estándares de Urea y las muestras. Y añadir el mix control al pocillo a los controles. Incubar 60 min. Proteger de la luz.

Medida

OD_{570nm} en un lector de placas.

ANEXO 6

Preparación de los estándares para el *Albumin Human ELISA Kit*.

Se deben elaborar justo antes del uso. Preparar suficiente como para hacer un duplicado de cada punto.

- 200 ng/mL albumina estándar #1.
 - 1º consulta el vial de albúmina estándar para determinar la masa de proteína en el vial.
 - Calcula el volumen apropiado de 1X Diluent N para añadir al resuspender el vial de albúmina estándar para producir 200ng/mL de albúmina estándar #1 usando la siguiente ecuación:

$$(C_s/C_f) \cdot 1,000 = V_D$$

Mediante diluciones seriadas se obtienen todos los puntos de la recta estándar:

Estándar #	Volumen para diluir (μ l)	Volumen diluyente N (μ l)	Volumen total (μ l)	Concentración inicial (ng/ml)	Concentración final (ng/ml)
1	Obtener una muestra 200ng/mL				200.0
2	120	120	240	200.0	100.0
3	120	120	240	100.0	50.00
4	120	120	240	50.00	25.00
5	120	120	240	25.00	12.50
6	120	120	240	12.50	6.250
7	120	120	240	6.250	3.125
8	-	120	120	-	0

ANEXO 7

La siguiente tabla muestra los loci amplificados, sus localizaciones cromosómicas y sus correspondientes marcajes fluorescentes.

Loci	Localización cromosómica	Alelos incluidos en el AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit	Marcaje
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	VIC®
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	NED™
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET®
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	

Huella genética de las células HepG2:

