

Uso de Clustal / Bioedit

1. Descargar el programa Bioedit en: <https://bioedit.software.informer.com/Descargar-gratis/>

A. Alineamiento Multiple

2. Se realizará el alineamiento de cistein sintasas (CisK).
 - a. Con este fin hemos seleccionado 5 secuencias de la base de datos en formato txt (Cisk.txt) con las que realizaremos el alineamiento múltiple.
 - b. Inmediatamente abierto el archivo en formato txt, las secuencias se dispondrán en la ventana del programa, pero aún no están alineadas.
 - c. Para aplicar el algoritmo ClustalW se va a la barra de herramienta en Accesory/Application y se elige ClustalW/Multiple alignment.
 - d. Inmediatamente se abre una ventana en la cual se indican por defecto algunos parámetros, los cuales pueden ser elegidos según criterio del investigado, entre ellos lo recomendable es seleccionar la opción *Output Clustal format clustal consensus*.
 - e. Y luego *Run ClustalW*, haciendo clic en el link de la parte inferior del panel.
 - f. Para finalmente obtener el alineamiento de las secuencias proteicas de interés.

Observe la línea que dice *Clustal Consensus* (última línea del alineamiento), allí puede ver 3 opciones, que significan:

- Asterisco (*), indican que en dicha posición los residuos son 100% idénticos.
- Dos puntos (:), indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas.
- Punto (.), indican sustituciones menos conservativas.

La secuencia consenso nos da una muy buena idea acerca de las características de nuestro alineamiento, en última instancia lo que queremos evaluar con un alineamiento múltiple es el nivel y lugar de conservación de nuestras secuencias.

B. Alineamiento entre dos secuencias

- a. Seleccionar dos secuencias del alineamiento anterior y abrir en Sequence y elegir la matriz a usarse Biosum62.
- b. Luego elegir *Pairwise alignment* y elegir *Align two sequences*.
- c. Se obtendrá los resultados de identidad y similitud entre las dos secuencias comparadas.

Uso de Mega

1. Descargar el programa Mega en: <https://www.megasoftware.net/> . Admitir como student of University.
2. Abrir el programa y aplicar *Align*, luego *Edit/Build Alignment*, se abrirá la ventana de Alignment Editor y se debe seleccionar *Retrieve a sequence from a file*. Elegir el archivo (Cisk.txt).
3. Se cargaran las secuencias proteicas en la ventana MX: Alignment Explorer.
4. Para aplicar el algoritmo ClustalW se va a la barra de herramienta en Alignment y se elige Align by ClustalW.
5. Para finalmente obtener el alineamiento de las secuencias proteicas de interés. Exportar el alineamiento en formato Mega y guardar.
6. Ir en la barra de Herramienta en *Distance* y aplicar *Compute Pairwise Distance* y seleccionar el archivo guardado en Mega.
7. Discutir los parámetros y analizar los resultados.
8. Explorar las herramientas disponibles.