



SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

LA SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Es el proceso de **determinación de la secuencia de nucleótidos que componen una molécula de ADN o de ARN** y que se representa por las iniciales de las bases nitrogenadas que portan.

Secuenciar una molécula de ADN consiste en determinar el orden (la secuencia) de los nucleótidos que la componen.

- En el caso de una **molécula monocatenaria** se transcribe como una **cadena de letras que se inicia en el extremo 5'** de la molécula y **finaliza en el extremo 3'**.
- En el caso de moléculas de **ADN bicatenario** se **transcribe solo la secuencia de la cadena 5'-----3'**, puesto que la secuencia 3'-----5' es la complementaria de la anterior.



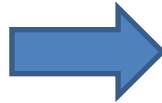
LA SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La secuenciación permite establecer el orden exacto de los nucleótidos que componen la secuencia concreta de ADN, esta información nos permite:

- Conocer los sitios de corte que tiene la secuencia de un gen, donde actúan distintas enzimas de restricción.
- Estudiar distintas variedades polimórficas, así como mutacionales, en un gen.
- Determinar la existencia de distintas alteraciones en los nucleótidos:
 - Mutaciones por sustitución de bases (con o sin cambio en el aminoácido)
 - Mutaciones por pérdida (delección)
 - Mutaciones por introducción (inserción)
 - Mutaciones por inversión del orden de disposición de los nucleótidos.
- Predecir la proteína codificada por el gen a través de la equivalencia proporcionada por el código genético entre tripletes de nucleótidos (codones) y aminoácidos.
- Obtener información en el estudio de un gen sobre las regiones que codifican una proteína (exones) y las que no lo hacen (intrones).

HISTORIA DE LA SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

MÉTODO QUÍMICO Y MÉTODO ENZIMÁTICO



Técnicas manuales basadas en reacciones químicas o enzimáticas que valieron el premio Nobel en 1980 a sus inventores: **Walter Gilbert** y **Frederick Sanger**.

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE PRIMERA GENERACIÓN



Con el desarrollo de la *PCR* y la *electroforesis capilar*, los métodos enzimáticos demostraron ser más eficientes y fácilmente automatizables

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE SEGUNDA GENERACIÓN



Los procesos automáticos se perfeccionaron y se diseñaron nuevas metodologías enzimáticas, como la *pirosecuenciación*.

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE TERCERA GENERACIÓN



En la actualidad empiezan a aparecer equipos de tercera generación, capaces de secuenciar una única molécula de ADN.

HISTORIA DE LA SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

- **Descubrimiento de las enzimas de restricción de tipo II en 1970.** Supuso un paso importante en el desarrollo de los métodos de secuenciación de ADN estas enzimas reconocen y cortan el ADN en secuencias específicas (en general entre 4 y 6 bases de largo). Estas enzimas **proporcionaron un método general para fragmentar largas moléculas de ADN en pequeñas piezas para luego ser separadas por electroforesis en geles de agarosa.**
- A mediados de la década del 70, Frederick Sanger publica el “plus-minus method” que permitía la **secuenciación de fragmentos de ADN utilizando la enzima ADN polimerasa de *E. coli*.**
- A fines de esta misma década, Maxxam y Gilbert publican un método alternativo de secuenciación de ADN (**método químico**) y el mismo Frederick Sanger publica el método que luego se convertiría en el más utilizado durante los siguientes 30 años (**método enzimático**)

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Frederick Sanger (1918-)



Courtesy of Dr. F. Sanger, MRC, Cambridge.
Noncommercial, educational use only.

Frederick Sanger nació en Rendcombe, Inglaterra en 1918. De padre médico, se esperaba que Fred siguiera sus pasos, sin embargo en la Universidad de Cambridge decidió realizar una carrera en Ciencias. Continuó su formación en Cambridge realizando un Ph.D. con Albert Neuberger, en metabolismo de aminoácidos. Luego continuó trabajando con C. Chibnall identificando los aminoácidos de la insulina, en el transcurso de la investigación, Sanger imaginó las formas en las cuáles se ordenan los aminoácidos en la proteína.

Fue la primera persona en obtener la secuencia de aminoácidos de una proteína (la insulina). Probó que las proteínas eran moléculas ordenadas y, por analogía, los genes y el ADN que codifica estas proteínas deberían tener un orden o secuencia. Por este trabajo obtuvo su primer premio Nobel (1958).

En 1962, Sanger comienza a trabajar en el laboratorio de Biología Molecular, también en Cambridge, dónde Francis Crick, John Kendrew y otros trabajaban con problemas relacionados con el ADN. Resolver como obtener la secuencia de ADN era la extensión natural de su trabajo anterior. Fue así, como estudiando primero la forma de secuenciar ARN (una molécula más pequeña) logró obtener una técnica aplicable luego al ADN (el método de secuenciación por dideoxinucleótidos). En 1980, obtuvo por ello su segundo premio Nobel también en Química compartido con Walter Gilbert (método de secuenciación química) y Paul Berg (ADN recombinante).

En 1992, el Wellcome Trust y el Medical Research Council establecieron el Sanger Institute, uno de los centros de secuenciación dónde se llevó adelante el proyecto Genoma Humano.

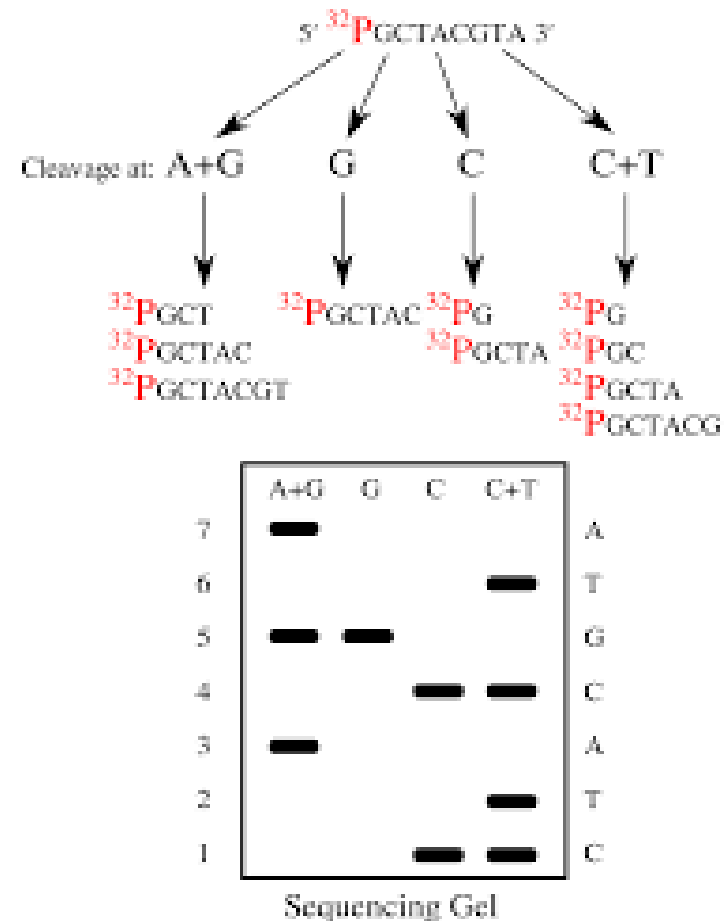
En 1985 se retiró y se dedica principalmente al cuidado de su jardín.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS

MÉTODO QUÍMICO DE MAXAM Y GILBERT

Este método de secuenciación se basa en la **modificación de las bases nitrogenadas mediante reacciones químicas específicas.**

Antes de comenzar se debe **fragmentar el ADN genómico**, el método **más utilizado** es el **corte enzimático**, utilizando **enzimas de restricción**, pero también puede emplearse cualquier otro método de fragmentación selectiva.



SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

MÉTODO QUÍMICO DE MAXAM Y GILBERT

- El protocolo consta de **5 fases**:

FASE 1: Marcaje de uno de los extremos de la molécula con isótopo radioactivo ^{32}P . → Lo más habitual es **marcar el extremo 5'**.

- Primero se elimina el fosfato en posición 5' del primer nucleótido de la cadena mediante una **fosfatasa alcalina**
- Se fosforila de nuevo mediante una **polinucleótido kinasa** y **ATP marcado con ^{32}P** .
- El extremo 3' también puede ser marcado radiactivamente.
- Actualmente se han desarrollado fluorocromos para marcar ambos extremos y así facilitar la detección del marcaje.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

MÉTODO QUÍMICO DE MAXAM Y GILBERT

FASE 2: Reacciones de modificación química de las bases nitrogenadas

→ La concentración de los reactivos y las condiciones en las que se realizan las reacciones **determinan que se modifique un número pequeño de bases en cada molécula de ADN.**

- La muestra se divide en 4 alícuotas y en cada una de ellas se lleva a cabo una reacción química distinta:
 - Tubo 1: modificación de **guaninas** por acción de **dimetil sulfato** (DMS)
 - Tubo 2: modificación de **purinas** (adenina y guanina) por **ácido fórmico**
 - Tubo 3: modificación de las **pirimidinas** (citosina y timina) con **hidracina**
 - Tubo 4: modificación de **citocinas** con **hidracina + sales** (NaCl 2 M)
- Finalizada la modificación de las bases, a los tubos de reacción se les añade **piperidina**, que rompe la cadena a nivel de las bases modificadas.
- Así, en cada tubo se obtiene una mezcla de fragmentos, marcados y sin marcar, de longitudes variables.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS

MÉTODO QUÍMICO DE MAXAM Y GILBERT

FASE 3: Electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución (10-20%)

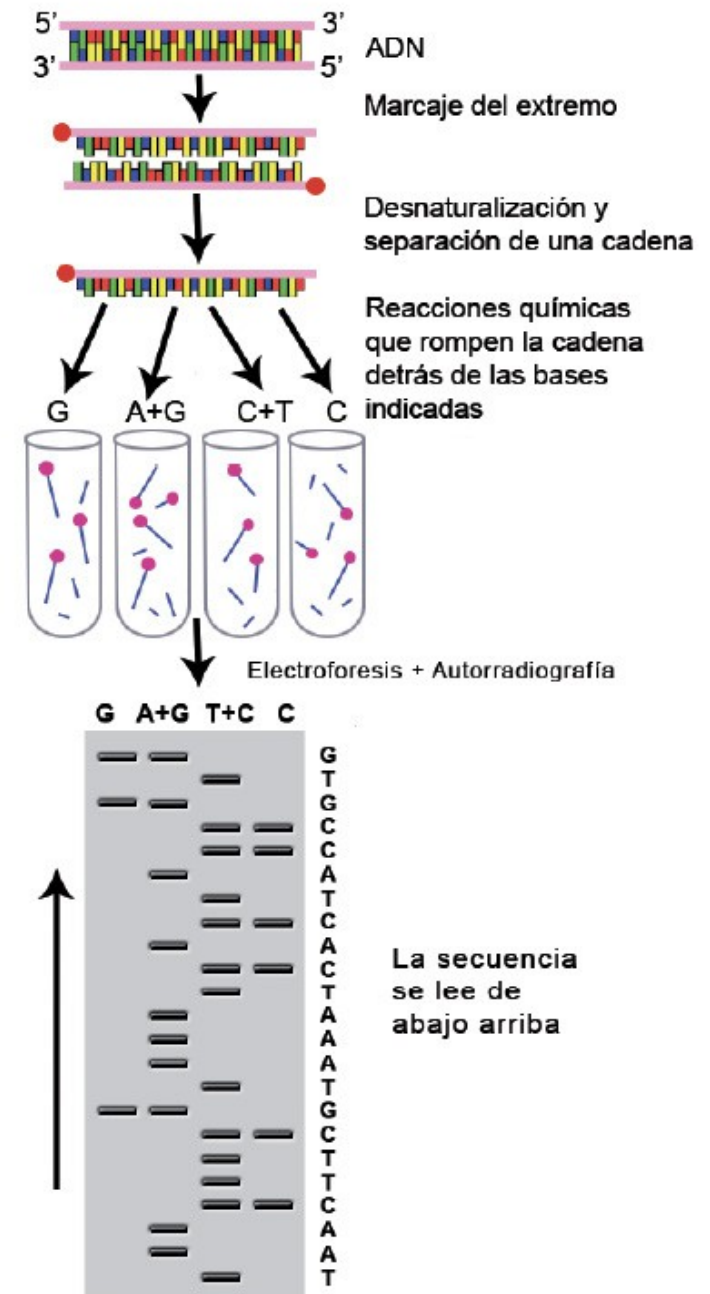
→ En condiciones desnaturalizantes, para separar por tamaño los fragmentos presentes en cada tubo, los productos de las cuatro reacciones químicas corren en paralelo en calles adyacentes del mismo gel.

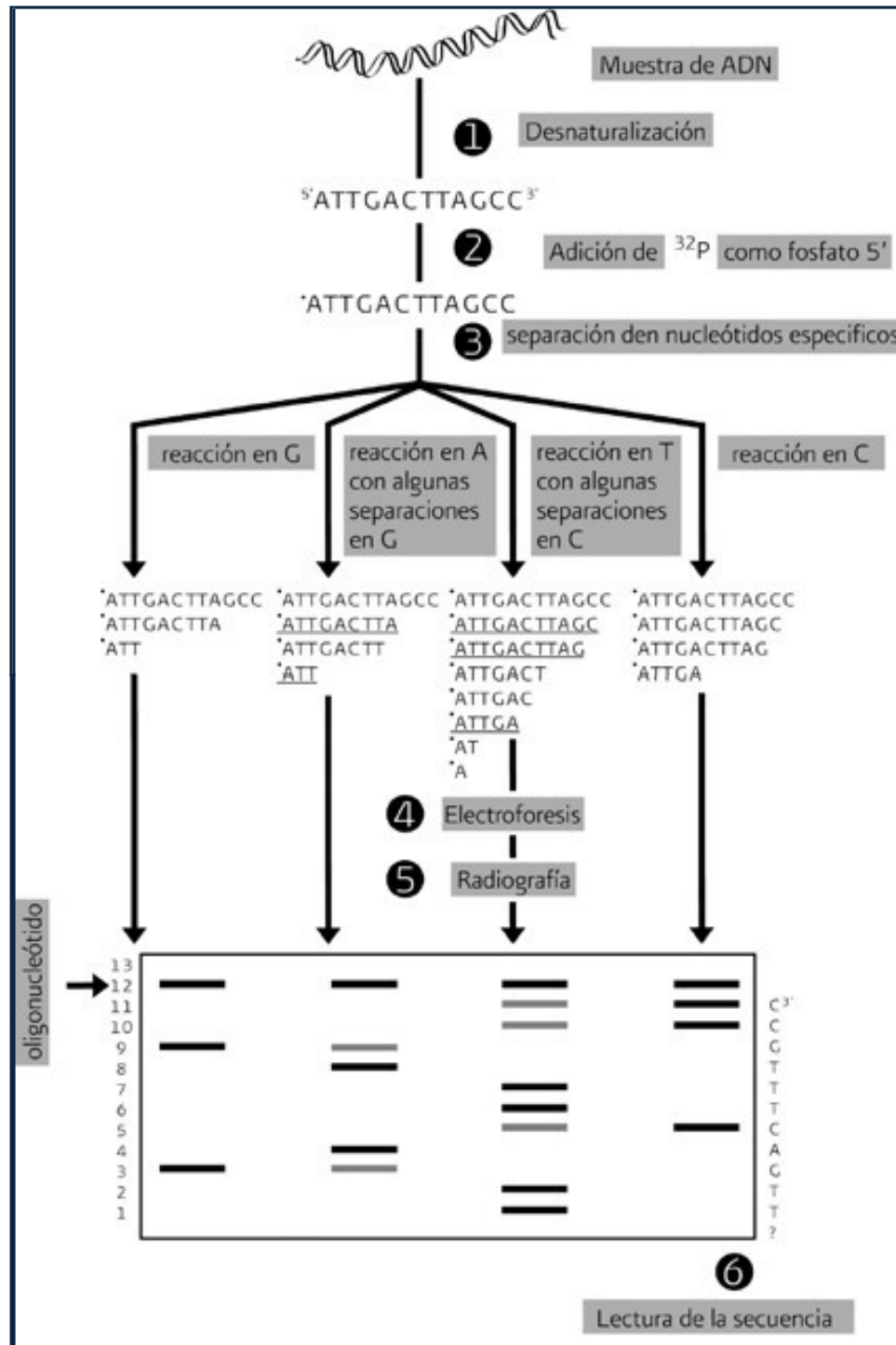
FASE 4: Autorradiografía del gel.

Proporciona una serie de bandas oscuras en cada una de las cuatro calles del gel, correspondientes a los fragmentos marcados obtenidos en cada tubo.

FASE 5: Análisis de la autorradiografía.

Permite descifrar la secuencia de la molécula en estudio según el orden escalonado de las bandas oscuras en las cuatro calles de la autorradiografía





SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

MÉTODO ENZIMÁTICO DE SANGER

Los métodos de terminación de cadena son métodos enzimáticos basados en reacciones de polimerización de cadenas complementarias a la que se quiere secuenciar.

El método de secuenciación diseñado por Sanger para secuenciar fragmentos cortos de ADN monocatenarios consta de cuatro fases, las tres últimas comunes al método químico:

- ***Reacciones de polimerización***
- ***Electroforesis en gel***
- ***Autorradiografía***
- ***Análisis de los resultados***

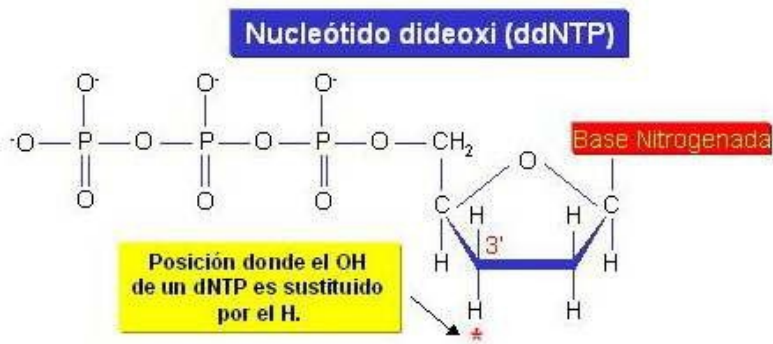
SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

MÉTODO ENZIMÁTICO DE SANGER

REACCIONES DE POLIMERIZACIÓN	<ul style="list-style-type: none">➤ La muestra se divide en 4 alícuotas para la realización de cuatro reacciones de polimerización, una para cada base nitrogenada.➤ Cada tubo contiene: hebra molde de ADN, cebador marcado en su extremo 5' con ³²P, ADN polimerasa, los cuatro dNTP y uno de los cuatro ddNTP.➤ La ADN polimerasa extiende el cebador marcado, sintetizando una cadena de ADN complementaria de la hebra molde, hasta que, por azar, incorpora un ddNTP, lo que detiene la elongación de la cadena.
ELECTROFORESIS	<ul style="list-style-type: none">➤ Las cadena de nueva síntesis se someten a <u>electroforesis de alta resolución en gel de poliacrilamida</u>.➤ En estas condiciones, los fragmentos marcados se separan por tamaño con una resolución de un solo nucleótido.
AUTORRADIOGRAFÍA DEL GEL	<ul style="list-style-type: none">➤ Proporciona en las cuatro calles del gel un patrón de bandas oscuras, correspondientes a los distintos fragmentos producidos en las reacciones de polimerización.
ANÁLISIS DE LA AUTORRADIOGRAFÍA	<ul style="list-style-type: none">➤ Se puede determinar la secuencia completa según el orden escalonado de las bandas en las cuatro calles del gel, realizando la lectura de abajo arriba de la autorradiografía.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

MÉTODO ENZIMÁTICO DE SANGER



La secuenciación de ADN utilizando el "método dideoxi" de Sanger (ó "método enzimático de terminación de cadena") **emplea nucleótidos modificados (didesoxinucleótidos), que no poseen el grupo hidroxilo (-OH) en el extremo 3'.**

- El ADN se sintetiza *in vitro* utilizando, colocando en un tubo:
 - **Un molde: la cadena que se desea secuenciar,**
 - **Los cuatro nucleótidos desoxi (dNTPs)**
 - **Una pequeña cantidad de didesoxinucleótido específico (ddNTP)**
 - **Un cebador**
 - **La ADN polimerasa.**

El resultado de la reacción de síntesis son cadenas de distinta longitud.

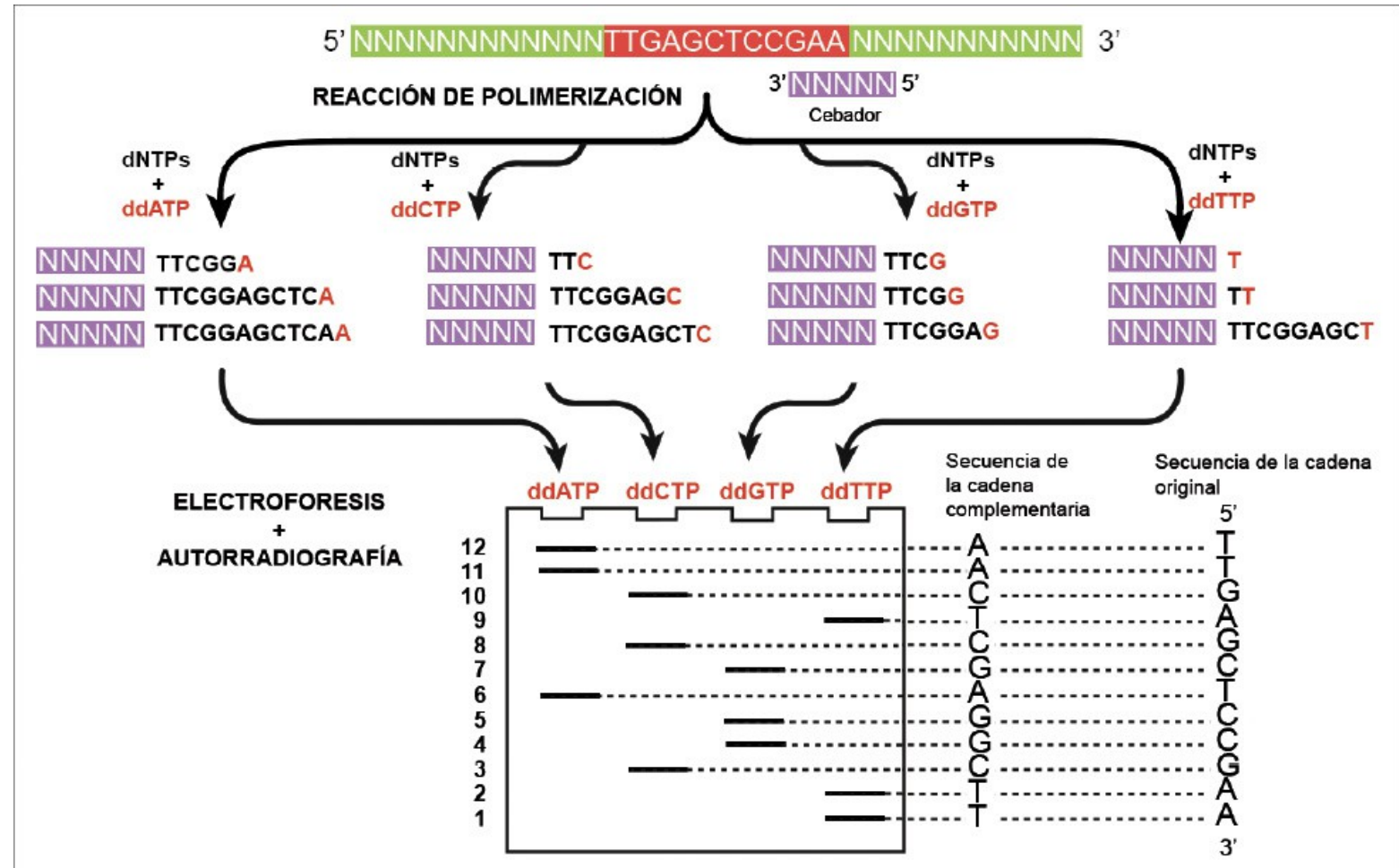
- **La incorporación de un nucleótido dideoxi hará que termine el proceso de síntesis.** Esto se debe a que la polimerasa necesita un grupo hidroxilo en la posición 3' para poder agregar el siguiente nucleótido (si este grupo no está presente, la polimerasa no puede continuar con la síntesis).

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

MÉTODO ENZIMÁTICO DE SANGER

En cada mezcla de reacción se producen una serie de moléculas de ADN de nueva síntesis:

- De diferente longitud
- Que terminan todas en el mismo nucleótido
- Marcadas todas radiactivamente por el extremo 5' (todas contienen en el extremo 5' el cebador utilizado).



SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

VARIACIONES DEL MÉTODO DE SANGER

- Las principales modificaciones del método de secuenciación de Sanger **están relacionadas con la manera de marcar los fragmentos sintetizados en las reacciones de polimerización.**
- Como **alternativa al marcaje del cebador**, se puede utilizar:
 - dNTP marcados
 - ddNTP marcados
- El **marcaje** puede ser:
 - Radiactivo con ^{32}P
 - Fluorescente.
- La utilización de **marcadores fluorescentes** simplifica y acorta el método, (se elimina el paso de la autorradiografía).
 - Para analizar el gel se **ilumina con luz UV y se obtiene una fotografía.**
 - Hace posible la **automatización** de algunos procesos y la **lectura de la secuencia a través de programas informáticos**, dando lugar a la primera generación de procesos de secuenciación automática.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE 1ª GENERACIÓN

Se basa en el método enzimático de terminación de cadena de sanger y en el uso de cuatro **fluoróforos** como marcadores. → **SECUENCIACIÓN DE SANGER**

SECUENCIACIÓN CON TERMINADORES FLUORESCENTES

En 1986 Hood y colaboradores publican el primer reporte de automatización de secuenciación de ADN, que establece la secuenciación con **terminadores fluorescentes** como variante del método de Sanger.

Esta variante utiliza una **molécula fluorescente diferente unida a cada didesoxinucleótido**, y **permite realizar la reacción en un único tubo**.

Asimismo, la secuencia puede ser leída a través de un ordenador.

Las secuencias obtenidas, con esta nueva variante eran de un largo de entre 500 y 1000 nucleótidos.

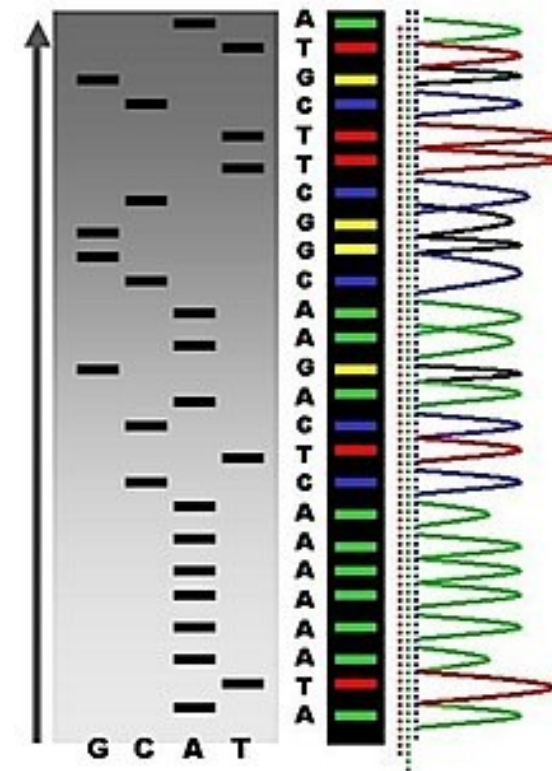


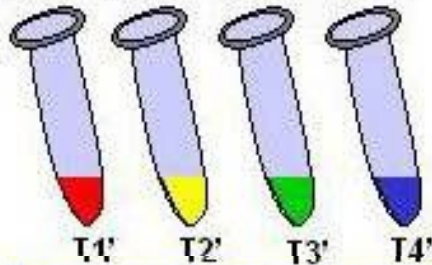
Figura 6. En esta figura se ejemplifica como en lugar de 4 carriles (uno para cada base) (a), se corren todas las reacciones en un único carril del gel (cada color representa una base) (b) y se desarrollan algoritmos para convertir esas señales en "electroferogramas" que representan la secuencia de ADN (c). La flecha a la izquierda indica la dirección de lectura 5'-3'.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE 1ª GENERACIÓN

Secuenciación automática

ddTTP ddATP ddCTP ddGTP



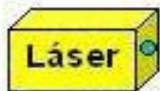
Gracias al empleo de 4 fluorocromos diferentes, se puede combinar el resultado de las 4 reacciones y aplicar la mezcla a un mismo pocillo del gel de electroforesis.

Desnaturalización para separar Las hebras de ADN

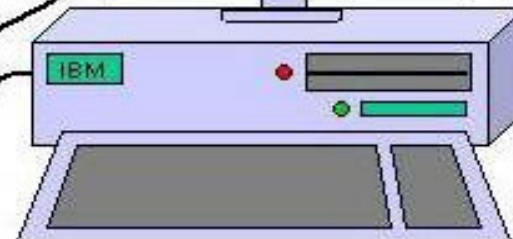
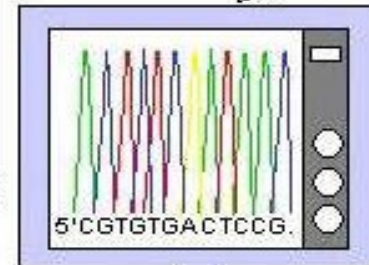
El color de cada banda corresponde al del dideoxinucleótido 3'-terminal de ese fragmento.

No sólo se pueden detectar los 4 colores tras acabar la separación electroforética, sino que incluso según va transcurriendo ésta el detector puede medir la presencia de las bandas que van pasando por el haz láser y su color.

Se genera un registro informatizado de los 4 perfiles de color, que combinados se interpretan como una secuencia.

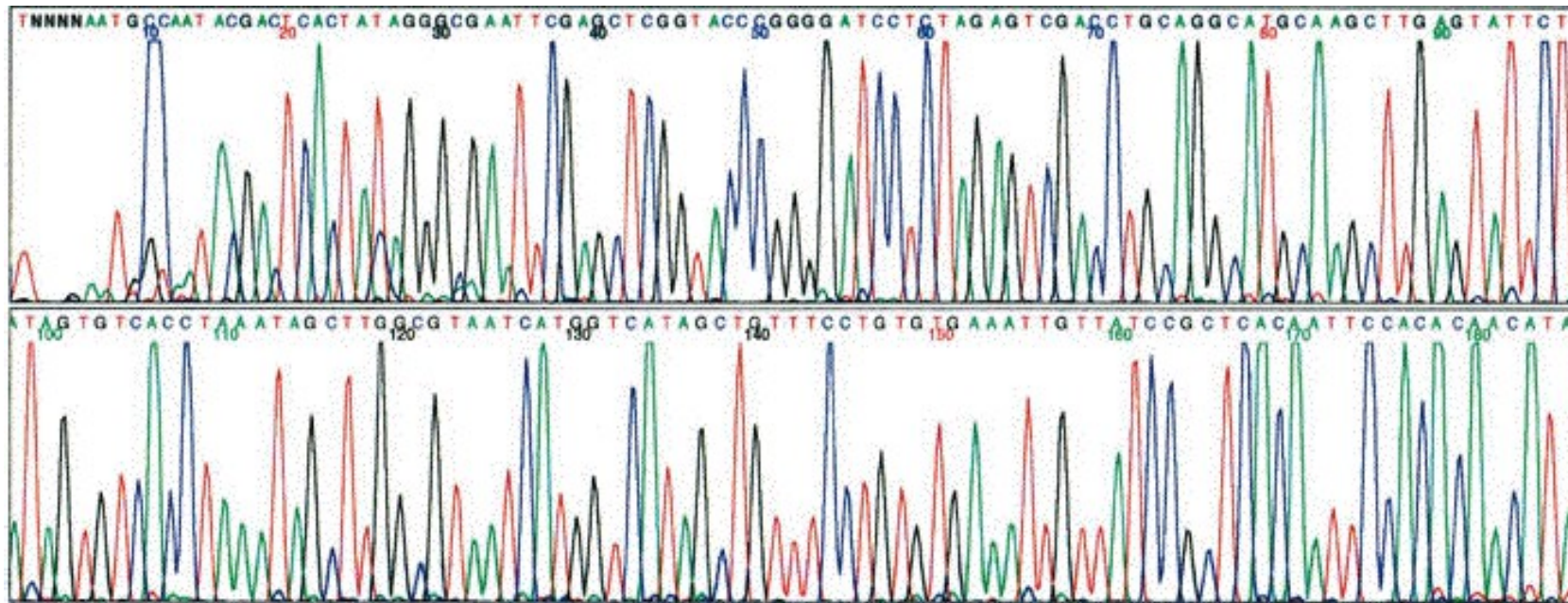


Electroforesis



SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE 1ª GENERACIÓN



SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

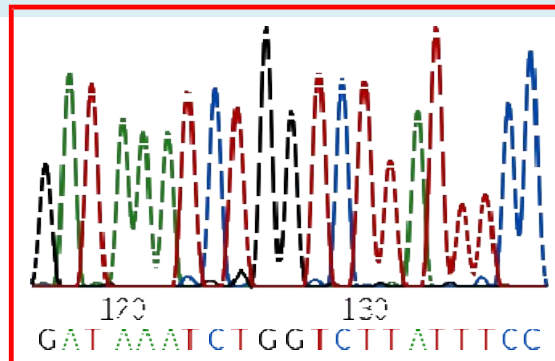
SECUENCIACIÓN DE ÚLTIMA GENERACIÓN

En los últimos años los avances tecnológicos han conducido al desarrollo de una secuenciación de última generación (**next generation sequencing, NGS**) y han logrado que el número de pares de bases nitrogenadas que se pueden secuenciar haya crecido exponencialmente.

De forma eficiente incluso se ha podido obtener el genoma completo de un individuo.

En estos momentos existen en el mercado distintas plataformas de NGS que difieren en distintos aspectos técnicos. Salvando estas diferencias técnicas, el fundamento de todas ellas es bastante similar.

Se espera que el alto coste de la secuenciación masiva se vaya reduciendo y que esta técnica se convierta en un futuro próximo en un procedimiento de uso común en cualquier centro científico.



SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

SECUENCIACIÓN DE 3ª GENERACIÓN

Secuenciación ion torrent

- Detecta microvariaciones de pH producidas en una reacción de polimerización.
- El ADN molde que se va a secuenciar, unido a un cebador y una ADN polimerasa se inmoviliza en un micropocillo que contiene un sensor de pH.
- Cuando un dNTP se incorpora a una cadena en crecimiento, se libera un ion hidrógeno (H^+) que produce una microvariación en el pH de la solución
- Esta variación es detectada por el sensor de pH incluido en el pocillo y registrada por el software del secuenciador.

Secuenciación por nanoporos

- Es un método de secuenciación en tiempo real sin reacción de polimerización y sin marcajes, basado en biosensores.
- Cada biosensor consta de una membrana bicapa, resistente eléctricamente y sometida a cierto voltaje, atravesada por un nanoporo proteico con un microelectrodo.
- Por el nanoporo fluye de manera continua una corriente iónica que genera una corriente eléctrica basal detectada por el electrodo. Cualquier molécula que atraviese el nanoporo provoca una alteración en la corriente basal, cuya magnitud es característica de la molécula en cuestión, lo que permite identificarla.
- Para secuenciar una molécula de ADN, basta con hacer pasar una de las cadenas por el nanoporo.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

SECUENCIACIÓN DE ARN

Los métodos enzimáticos directos de secuenciación de ARN.

- Son métodos de terminación de cadena igual que el método de Sanger para secuenciar ADN.
- Se utiliza una mezcla de dNTP y ddNTP (terminadores de cadena) en una reacción de transcripción inversa catalizada por una retrotranscriptasa.
- La molécula de ARN que se quiere secuenciar actúa de molde y los fragmentos de nueva síntesis son de ADNc.
- El marcaje de los fragmentos puede ser radiactivo (^{32}P) o fluorescente y se pueden marcar los cebadores o los ddNTP.
- Los fragmentos generados en la reacción de transcripción inversa se separan mediante electroforesis y los geles se analizan mediante autorradiografía o con luz UV, según el marcaje.
- La secuencia leída en el gel será la correspondiente al ADNc complementario al ARN que se estudia y en sentido opuesto. Al transformar la secuencia de ADNc a ARN hay que tener en cuenta que el complementario de A es U.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

SECUENCIACIÓN DE ARN

Los métodos indirectos de secuenciación de ARN.

- Se basan en la obtención previa de un ADNc mediante transcripción inversa.
- El ADNc es luego secuenciado por cualquiera de los métodos de secuenciación de ADN y la secuencia obtenida se traduce a ARN teniendo en cuenta la complementariedad de bases.