

[[Principal](#)] [[Preparación de la muestra](#)] [[Amplificación por la PCR](#)] [[Purificando el producto de la PCR](#)] [[Preparando la secuenciación](#)] [[Secuenciando el ADN](#)] [[Identificando la bacteria](#)]

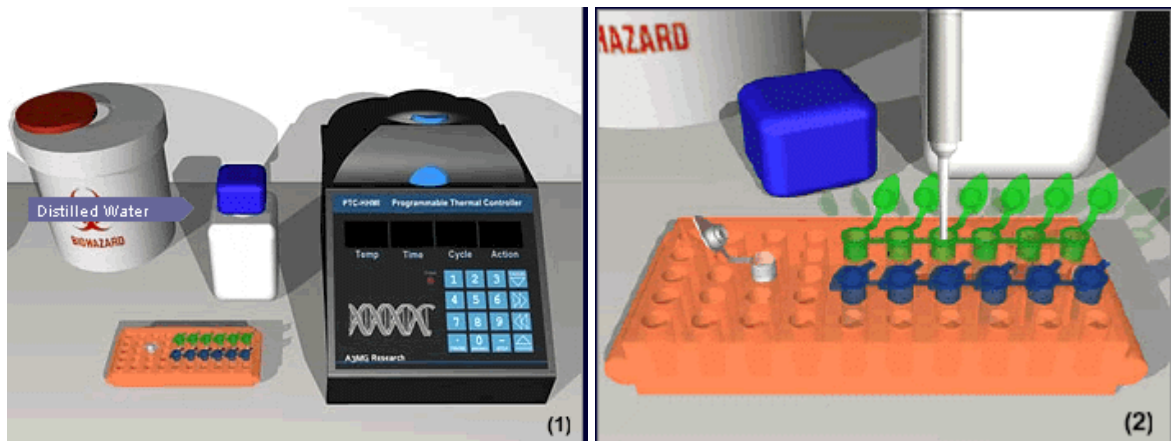
**Tema desarrollado a partir de las animaciones de:
The Virtual Bacterial ID Laboratory
De la Fundación Howard Hugues: <http://www.hhmi.org/biointeractive/>**

Parte 4 - Preparando la secuenciación

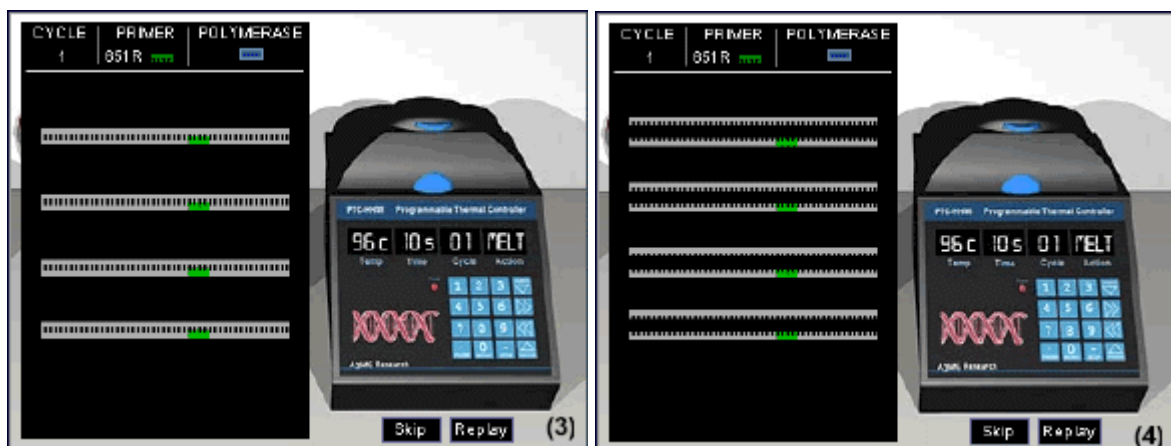
Ahora que la muestra esta purificada todo el producto de la PCR contiene el ADN correspondiente al ARNr 16S. Ahora podemos prepara la muestra para la secuenciación automática. La tecnología de secuenciación del ADN es otra área de la biología molecular que ha adquirido en los últimos tiempos un enorme grado de refinamiento. El método predominante se denomina Secuenciación por ciclación.

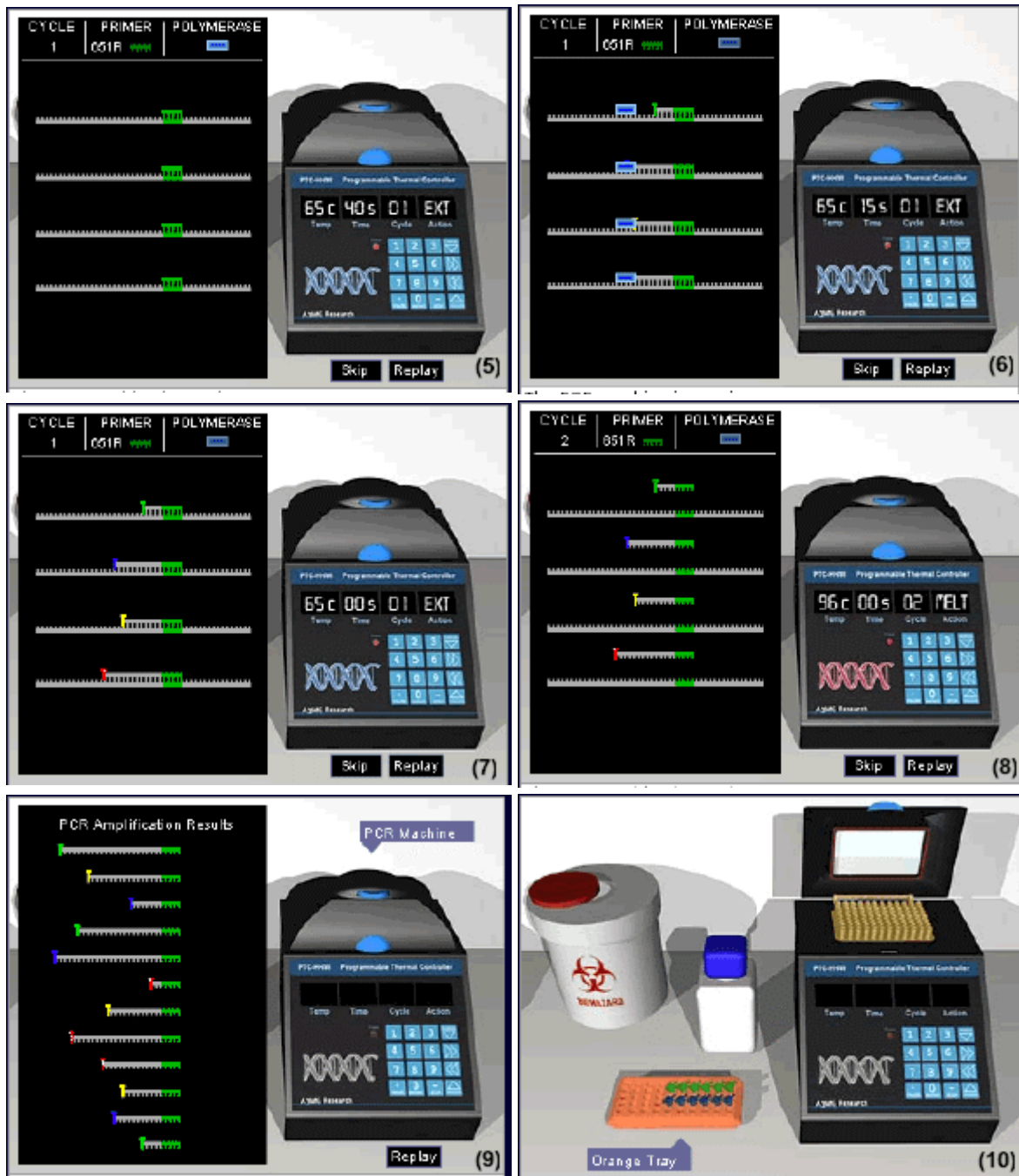
En este ejemplo se utiliza un grupo de 12 *primers*; seis por cada hebra de ADN. En teoría es posible utilizar un solo *primer*, pero no es aconsejable para secuencias largas . Con múltiples *primers* se secuencian **secuencias superpuestas de ADN** (*overlapping sections*) hasta obtener la secuencia completa. Por otra parte no es necesario secuenciar ambas cadenas ya que se generan datos redundantes pero, sin embargo, secuenciar ambas hebras reduce posibles errores.

El número exacto y la localización de lo *primers* usados dependen de disponibilidad de primers adecuados. Los *primers* que se describen aquí corresponden a los de fuentes comerciales y "pegan" en la regiones conservadas del gen del ADN correspondiente al ARNr 16S. Ellos deberían ser aptos para pegarse a secuencias del mismo independientemente de la fuente bacteriana que sirva de muestra.



Cada tubo (1) contiene una mezcla secuenciadora: buffers, *primers* (uno diferente en cada tubo), ADN polimerasa, nucleótidos, y terminadores fluorescentes en proporciones adecuadas. El producto de la PCR de la etapa anterior se agrega a cada tubo (2) y se corre otra PCR.





El objetivo en este caso no es producir copias idénticas de ADN sino muchas copias de diferentes longitudes (9). Las figuras (3,4,5,6,7,8,9 y 10) ilustran parcialmente lo que sucede un tubo que contienen el *primer* 651R. Cada cadena de ADN "pega" el primer en un extremo y finaliza con un "terminator" fluorescente en el otro extremo.

Secuenciación por ciclación

En la secuenciación por ciclación la primera etapa consiste en crear mediante el ciclador muchas copias del ADN "blanco" pero con un "complemento": las copias, durante la replicación, se terminan aleatoriamente en un punto, por lo que **las copias son secuencias parciales de diferentes longitudes**. La mezcla de reacción contiene desoxinucleótidos normales (A, C, G, y T) y didesoxinucleótidos "especiales" (A*, C*, G*, y T*) que han sido marcados con una molécula fluorescentes. Los marcadores fluorescentes difieren para cada base, y cada uno fluoresce en un color diferente. Los didesoxinucleótidos pueden sustituir a un desoxynucleótido normal durante la replicación pero, si por casualidad esa sustitución ocurre, la cadena no puede seguir alargándose, terminando dicha hebra de ADN en ese punto. Los didesoxinucleótidos son llamados **terminadores** ("terminators").

Miremos un ejemplo específico, para secuenciar una hebra de ADN (de cadena simple) de 6 bases de

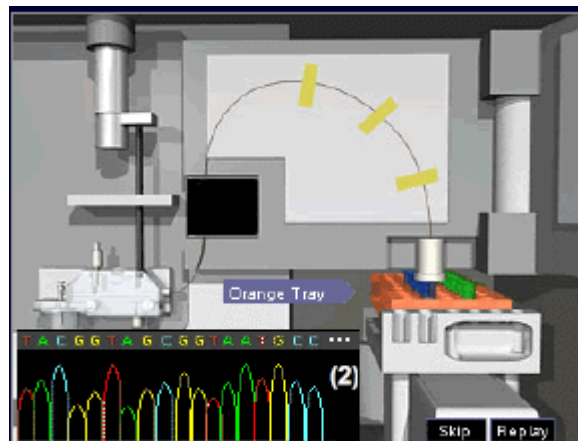
longitud de la siguiente secuencia:

3' A-C-G-T-T-G 5'

Con este método, se comienzan a generar "pedazos" desde uno a seis bases de longitud. En razón que la ADN polimerasa extiende la copia desde del ADN desde el extremo 5' al 3' (desde el final 3' al final 5' del ADN molde), esas piezas van a ser: (recuerde que A aparea con T y C aparea con G)

T*
 T-G*
 T-G-C*
 T-G-C-A*
 T-G-C-A-A*
 T-G-C-A-A-C*

En todos estos fragmentos la última base (el final 3') es un didesoxinucleótido. Una vez que están sintetizados los fragmentos, los mismos pueden ser separado por su tamaño usando una versión muy sensible de la electroforesis en gel.



En razón que cada "pedazo" termina con una base específica (por ejemplo T-G-C* termina en C*), fluorecerá con un color específico, registrando el color de los fragmentos de ADN de tamaño creciente, se puede deducir la secuencia del ADN complementario (T-G-C-A-A-C), desde se puede inferir la secuencia original.

Por supuesto, para este trabajo la replicación siempre debe comenzar en el mismo punto del ADN "blanco". En el ejemplo de arriba uno no querría pedazos tales como G-C-A* (posición 2-3-4) flotando por ahí.... Por otra parte, la muestra normal contiene ADN a doble cadena, lo cual significa que no solo tenemos el "molde" que necesitamos (3' A-C-G-T-T-G 5'), sino además su complementario (5' T-G-C-A-A-C 3'). La hebra complementaria puede originar pedazos tales como G-T-T*, lo cual es indeseable. Estos problemas se solucionan usando *primers* que anillan a secuencias específicas (y conocidas) de una sola de las hebras. En el ejemplo, considere por ejemplo en vez de seis bases una con diez bases, cuatro mas que las originales en la dirección 3'

3' T-G-T-A-A-C-G-T-T-G 5'

Usando como *primer* la secuencia 3' A-C-A-T, la replicación siempre empieza en el mismo sitio y los ADN formados son:

A-C-A-T-T*
 A-C-A-T-T-G*
 A-C-A-T-T-G-C*
 A-C-A-T-T-G-C-A*
 A-C-A-T-T-G-C-A-A*
 A-C-A-T-T-G-C-A-A-G*

Dado que la incorporación de los terminadores ocurre al azar, resulta difícil hacer una copia larga si uno desea hacer una copia corta en la misma reacción.

Por otra parte la separación de cadenas largas por electroforesis en base a un nucleótido de diferencia es bastante difícil.

Por lo tanto para secuenciar una sección grande del ADN se utilizan muchos diferentes *primers*, cada uno en su propio tubo, de esta manera se secuencian en paralelo varias secciones parcialmente superpuestas (*overlapping sections*) y el resultado se compila para obtener la secuencia completa.

[[Atrás](#)] [[Siguiete](#)]