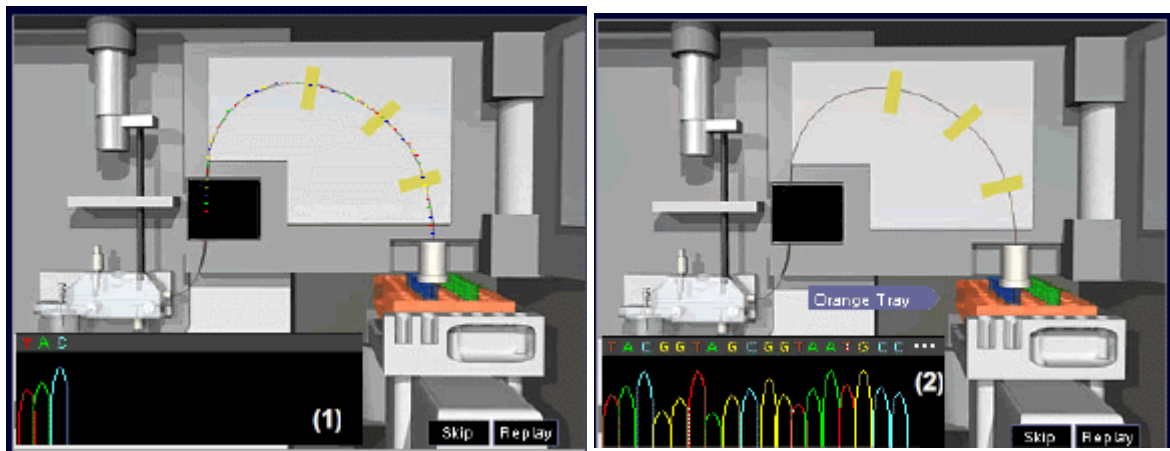


[[Principal](#)] [[Preparación de la muestra](#)] [[Amplificación por la PCR](#)] [[Purificando el producto de la PCR](#)] [[Preparando la secuenciación](#)] [[Secuenciando el ADN](#)] [[Identificando la bacteria](#)]

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

Parte 5 - Secuenciando el ADN

En la última etapa tenemos 12 tubos que contienen el producto final de la PCR, una mezcla de pedazos de ADN de longitud variable. Todos los ADN en cada tubo comienzan con el mismo *primer* pero finalizan con un nucleótido diferente con un marcador fluorescente (con un color diferente para cada nucleótido A, T, G y C). El trabajo que queda es separar las piezas individuales de ADN e identificar el nucleótido final.



Esto se realiza utilizando un secuenciador automático que realiza la electroforesis en gel del ADN de cada tubo. La electroforesis en gel es un método que permite separar moléculas basadas en diferencias de tamaño. En este ejemplo el secuenciador posee un fino tubo capilar insertado en el extremo de un mecanismo tipo jeringa con buffer en su interior. El tubo se llena con el buffer y su otro extremo se inserta en uno de los tubos que contienen las piezas de ADN. Se aplica corriente eléctrica en manera tal que el extremo del tubo en contacto con el ADN tenga carga negativa y la jeringa carga positiva. Dado que el ADN se encuentra cargado negativamente se mueve a lo largo del tubo en dirección del extremo positivo (la jeringa). Los pedazos de menor tamaño obviamente se mueven más rápido que los más grandes. Cerca del extremo el tubo capilar pasa por un rayo laser que excita a los marcadores fluorescentes y detectores ópticos determinan el color de la fluorescencia.

Podemos asumir que en un conjunto de pedazos de ADN (generados en la etapa anterior) tenemos todos los diferentes tamaños, que se diferencian correlativamente exactamente en un nucleótido. La menor pieza que contiene una marca fluorescente corresponde al nucleótido adyacente al *primer*. Este fragmento de ADN correrá más rápido que los otros, leyendo el color de la fluorescencia (ROJA) se determina (en el ejemplo) que el primer nucleótido y la base es timidina (T), la próxima pieza fluoresce en verde y determina que la base es adenina (A) así, a medida que pasan frente al rayo laser, se reconstruye la secuencia de bases del ADN (1) y (2).

El secuenciador automáticamente elimina el buffer se mueve al otro tubo, repite el procedimiento y así sucesivamente con los 12 tubos. Un programa de computación colecta los resultados y reconstituye la secuencia completa del ADN correspondiente al gen del ARNr 16S.

[[Atrás](#)] [[Siguiente](#)]