



Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger.

DNA sequencing by Sanger chain-termination method.

Ongay-Larios, Laura<sup>1\*</sup> y Códiz Huerta, Guadalupe<sup>1</sup>.

1. Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

\*Correspondencia. Instituto de Fisiología Celular, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacan, CDMX, México.  
CP. 04510 Tel. +52 (55) 56 22 5656, longay@ifc.unam.mx

### Resumen

La secuenciación de ADN permite determinar el orden de los nucleótidos (A, G, C, T) en una molécula.

El descubrimiento de la estructura de la molécula de ADN como una doble hélice de cadenas complementarias y la demostración de que esta molécula contiene la información genética, puso en evidencia la importancia de descifrar el orden de los nucleótidos en la cadena de ADN. La mayoría de las técnicas de secuenciación a baja escala que se usan actualmente se basan en el método de síntesis enzimática conocido como método Sanger o de terminación de la cadena. El principio de este método es la incorporación selectiva de dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTPs), estos nucleótidos carecen del OH en el extremo 3', por lo que si se incorporan durante la síntesis se impide la incorporación de un nuevo nucleótido y se termina la elongación de la cadena, de esta forma se generan fragmentos de distintos tamaños que terminan en todos los nucleótidos de la molécula de ADN, los cuales son separados por electroforesis para determinar la secuencia a partir del ddNTP incorporado y el tamaño de los fragmentos.

Las técnicas actuales utilizan dideoxynucleótidos marcados con fluorocromos, para la identificación de los fragmentos. Se emplean ADN polimerasas termoestables que permiten hacer la reacción de secuencia por termo-ciclaje. Los productos de la reacción se separan por electroforesis capilar en

### Abstract

DNA sequencing is a process used to determine the order of the four nucleotides (A, G, C, T) along the molecule.

After the structure of DNA double helix was elucidated and the demonstration that DNA carries the genetic information, it became evident that a way to figure out the order of the nucleotides in the DNA strands was important. Most sequencing techniques for small scale sequencing projects used today are based on the Sanger enzymatic method, also called "chain termination method". The key point of this method is the selective incorporation of dideoxynucleotides triphosphates (ddNTPs) by a DNA polymerase during DNA synthesis in vitro. Since ddNTPs lack the 3'OH group, once one of these nucleotides is incorporated during the synthesis process, no further nucleotides can be added, and DNA chain elongation is terminated. This results in the production of many fragments of different length. The fragments are then separated by electrophoresis and the sequence of the DNA is determined from the order of the fragments and the specific ddNTP at the end of each fragment.

There have been technical improvements to the method; like labeling the ddNTPs with fluorescent dyes, a different dye for each ddNTP, the use of thermo stable DNA polymerases which allows performing the reaction by thermo-cycling techniques, and the use of capillary-based electrophoresis. These changes have reduced

secuenciadores automáticos. Estas modificaciones han incrementado la velocidad del proceso, la longitud de lectura y reducido significativamente los tiempos de corrida. Este tipo de secuenciación tiene alta eficiencia, es muy precisa y reproducible. Este método es útil para la secuenciación de genes o fragmentos individuales de ADN y en proyectos de secuenciación a baja escala que involucran un número reducido de fragmentos.

*Palabras claves:* Secuenciación Sanger, dideoxinucleótidos, electroforesis capilar.

significantly run times, increased the speed of sequencing and the length of the reads. The process is highly efficient and reproducible. This method is useful for sequencing single genes or fragments, and for small-scale projects that involve few samples.

*Keywords:* Sanger sequencing, dideoxynucleotides, capillary electrophoresis.

## Introducción

La secuenciación de ADN permite determinar el orden de los nucleótidos (A, G, C, T) de una molécula de ADN, esto es importante, ya que este orden es el que determina la información genética para el funcionamiento de los organismos.

El ADN es un polímero lineal de nucleótidos, los cuales están constituidos por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada que puede ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T). Fue identificado originalmente por Mieschner en 1867, quien determinó que era una molécula muy larga, ácida y rica en fosfatos [1]. La estructura de la molécula fue determinada por Watson y Crick en 1953 [2] como una doble hélice de cadenas polinucleotídicas que se aparean por complementariedad de bases, las dos cadenas están dispuestas de manera antiparalela formando una especie de escalera en la que el eje de azúcar fosfato está en el exterior y las bases se encuentran orientadas hacia el interior de la hélice de manera perpendicular al eje, las dos cadenas están unidas por puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de los nucleótidos; dos puentes entre A y T y tres entre G y C.

La demostración de que la molécula de ADN contiene la información para la expresión génica [3] y que es precisamente el orden en que se disponen las bases nitrogenadas lo que codifica esa información impulsó el desarrollo de técnicas de secuenciación. Debido a las propiedades químicas de la molécula de ADN y la longitud de las cadenas, se demoró el poder secuenciarla, y fue hasta mediados de los 1960s que se pudo secuenciar un ARN de transferencia gracias a su tamaño pequeño [4]. El descubrimiento de las enzimas de restricción tipo II en los 1970s proporcionó un método para fragmentar las moléculas de ADN de manera controlada en fragmentos manejables para las técnicas de secuenciación. A finales de los 1970's se describen

dos técnicas efectivas para la secuenciación de ADN, el método químico descrito por Maxam y Gilbert [5] y el método enzimático de Sanger y colaboradores [6], ambas técnicas están basadas en dos principios, la generación de un conjunto de moléculas anidadas de distintos tamaños marcadas radiactivamente, que terminan en todos los nucleótidos posibles del fragmento de ADN que se quiere secuenciar, y la separación de estos fragmentos por electroforesis de alta resolución en geles desnaturalizantes de poliácridamida que permite diferenciar moléculas de ADN con diferencias de un solo nucleótido. La secuencia es inferida mediante el análisis de migración de los fragmentos de ADN revelados por autorradiografía como bandas oscuras en la placa de rayos-X, que representan la secuencia de ADN en dirección 5'-3' al leerlas del frente del gel hacia los pozos.

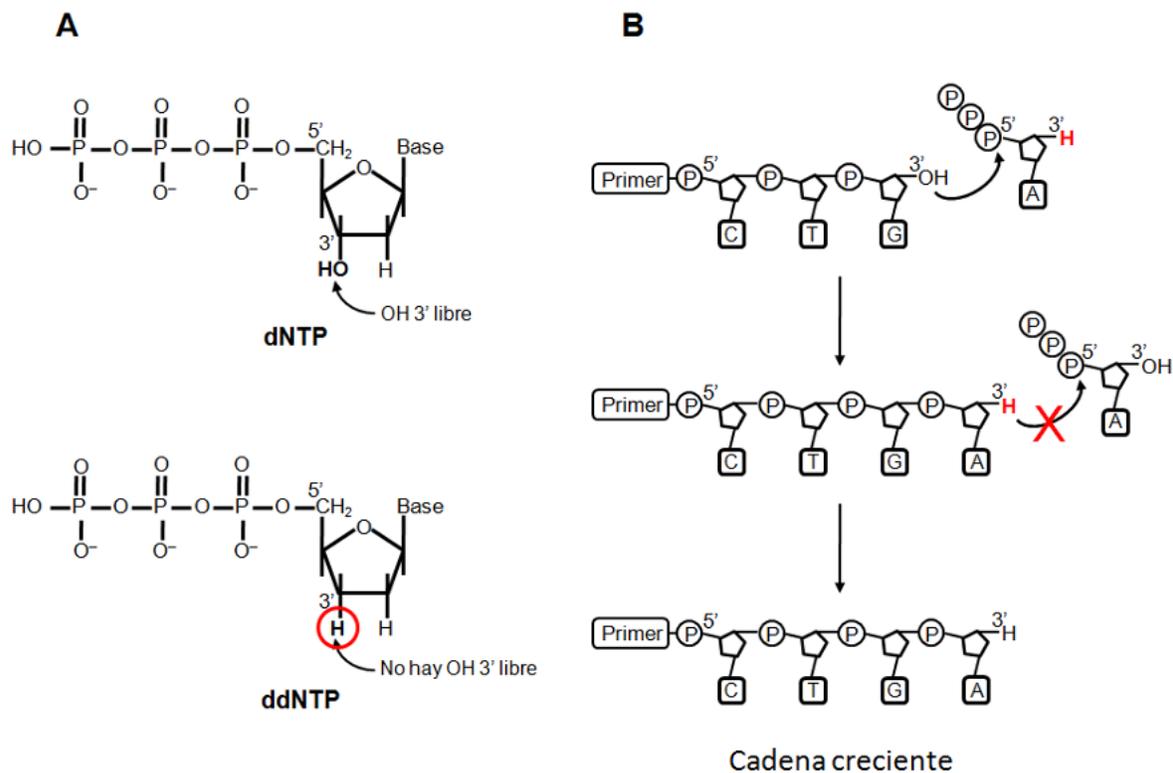
El método químico [5] se basa en modificación y escisión específica de bases nitrogenadas en las cadenas sencillas de ADN marcadas radiactivamente en uno de los extremos y posteriormente el corte en el sitio de escisión. Haciendo cuatro reacciones químicas que cortan específicamente en uno o dos de los cuatro nucleótidos (C, C + T, G y G + A) se genera un conjunto de fragmentos marcados, los cuales fueron cortados en nucleótidos conocidos, posteriormente se lleva a cabo la electroforesis y la autorradiografía para definir la secuencia de la molécula de ADN. Una desventaja de la técnica es que es compleja y requiere el uso de productos químicos peligrosos [7].

### *Método de Sanger*

Sanger y colaboradores propusieron el método de secuenciación enzimática, la primera versión se publicó en 1975 [8], ésta fue mejorada y sustituida por el método conocido como de terminación de la cadena, que se convirtió en el método más utilizado para la secuenciación de ADN y se sigue utilizando en la actualidad. Este método se basa en la síntesis

enzimática de ADN con una ADN polimerasa y en presencia de nucleótidos modificados [6], dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTPs) (Fig. 1) que carecen del hidroxilo en el carbono 3' del azúcar, que es esencial para que se pueda llevar a cabo el enlace fosfodiéster entre los nucleótidos durante la síntesis de la cadena de ADN. Para el protocolo de Sanger se prepara una mezcla de reacción que contiene el ADN molde de cadena sencilla, un iniciador (*primer*), la ADN polimerasa y los cuatro deoxinucleótidos (dNTPs) con uno de ellos marcado radiactivamente. Esta mezcla se divide en cuatro reacciones y a cada reacción se añade uno de los ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP). La ADN polimerasa es capaz de incorporar los ddNTPs, pero una vez que se incorporan se detiene la extensión de la cadena, lo que conlleva a la generación de fragmentos de ADN

de distintos tamaños acotados en el extremo 5' por el *primer* y en el extremo 3' por el ddNTP o terminador específico de esa reacción. Con un balance adecuado entre los dNTPs y los ddNTPs se obtiene un conjunto de fragmentos de diferentes tamaños que terminan en todos los nucleótidos de la molécula complementaria a la cadena de ADN que se quiere secuenciar. Los fragmentos son separados por electroforesis, corriendo cada reacción en carriles independientes adyacentes, obteniéndose un patrón de bandas a partir del cual se puede leer la secuencia. La velocidad de migración de los fragmentos en el gel es inversamente proporcional a su tamaño, lo que permite determinar el orden de los nucleótidos en la molécula de ADN. Una ventaja de esta técnica es que es más eficiente y rápida que el método químico [7].



**Figura 1. Dideoxynucleótidos o terminadores.** A) estructura general de los deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) y dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTP) los cuales carecen del OH en el extremo 3' del azúcar. B) Cuando se incorpora un ddNTP durante la síntesis enzimática se termina la extensión de la cadena.

### Automatización

Avances técnicos y metodológicos en el siguiente par de décadas permitieron introducir una serie de mejoras al método de Sanger. Se han implementado tres estrategias de marcaje; la utilizada en el trabajo original de Sanger en el que uno de los dNTPs está marcado, se puede utilizar el *primer* marcado en el

extremo 5' [9], o se pueden usar los ddNTPs marcados, esta última estrategia es la más utilizada actualmente. Este método tiene la ventaja de que evita que se detecten moléculas de ADN que terminaron su extensión prematuramente por otros problemas, como puede ser estructura secundaria de las cadenas de ADN y no por la adición del terminador [1]. Así mismo se cambió el uso de

marcaje radiactivo por marcaje fluorescente, que en conjunción con el marcaje en los terminadores incrementa la capacidad de secuenciación, ya que las reacciones se pueden hacer en un solo tubo y correr en un solo carril en lugar de cuatro reacciones independientes.

El advenimiento de las enzimas termoestables permitió hacer las reacciones de secuencia por ciclaje en termocicladores, de manera semejante a lo que se hace en la PCR, lo que redujo significativamente la cantidad de ADN templado necesario para secuenciar. Por otra parte se introdujo el uso de ADN polimerasas modificadas por ingeniería genética que incorporan los ddNTPs con mayor eficiencia. Otro avance muy importante fue la implementación del uso de electroforesis capilar en lugar de la secuenciación basada en geles, con el uso de capilares se pueden aplicar voltajes mayores que con los geles de poliacrilamida, por lo que la velocidad de la electroforesis es significativamente más rápida, reduciendo drásticamente el tiempo de secuenciación, además se puede incrementar la longitud de lectura [10].

Todos estos avances permitieron el desarrollo de secuenciadores automáticos con sistemas ópticos para la detección de las marcas fluorescentes y la designación de bases mediante algoritmos que interpretan matrices de fluorescencia y migración. El sistema es controlado por medio de computadoras y programas específicos [9].

### *Secuenciación genómica*

Los avances y mejoras en la técnica de secuenciación Sanger hicieron posible la secuenciación de genomas de varios organismos, incluido el genoma humano. En 1990 se presentó el proyecto del Genoma Humano, en este proyecto se planteó secuenciar el genoma humano y el de varios organismos modelo. El proyecto tendría una duración de unos 15 años y se llevaría a cabo por un consorcio público (*International Human Genome Sequencing Consortium*) constituido por varias organizaciones de distintos países, posteriormente, en 1998, la compañía *Celera Genomics* inició también un proyecto de secuenciación del genoma [11]. Ambos grupos publicaron la secuencia casi completa en 2001 [12,13]. El proyecto de secuenciación del genoma humano fue un esfuerzo titánico que involucró muchos laboratorios, mucho tiempo y tuvo un costo sumamente elevado, por lo que se planteó la necesidad de desarrollar metodologías y herramientas más eficientes, rápidas y baratas. A partir de entonces se han desarrollado y se siguen desarrollando

técnicas de secuenciación de alto paralelismo que permiten secuenciar cientos de miles a millones de moléculas de ADN simultáneamente en tiempos muy cortos, con lo que se ha iniciado una verdadera era de secuenciación genómica, estas tecnologías se conocen genéricamente como secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés).

A pesar de que los métodos de secuenciación de siguiente generación son los métodos actualmente usados para los grandes proyectos genómicos, la secuenciación por el método de Sanger o de terminadores se sigue utilizando ampliamente para experimentos de menor escala, secuenciación de regiones pequeñas o unos cuantos genes y para completar regiones que con otras metodologías aún son difíciles de secuenciar [10,14].

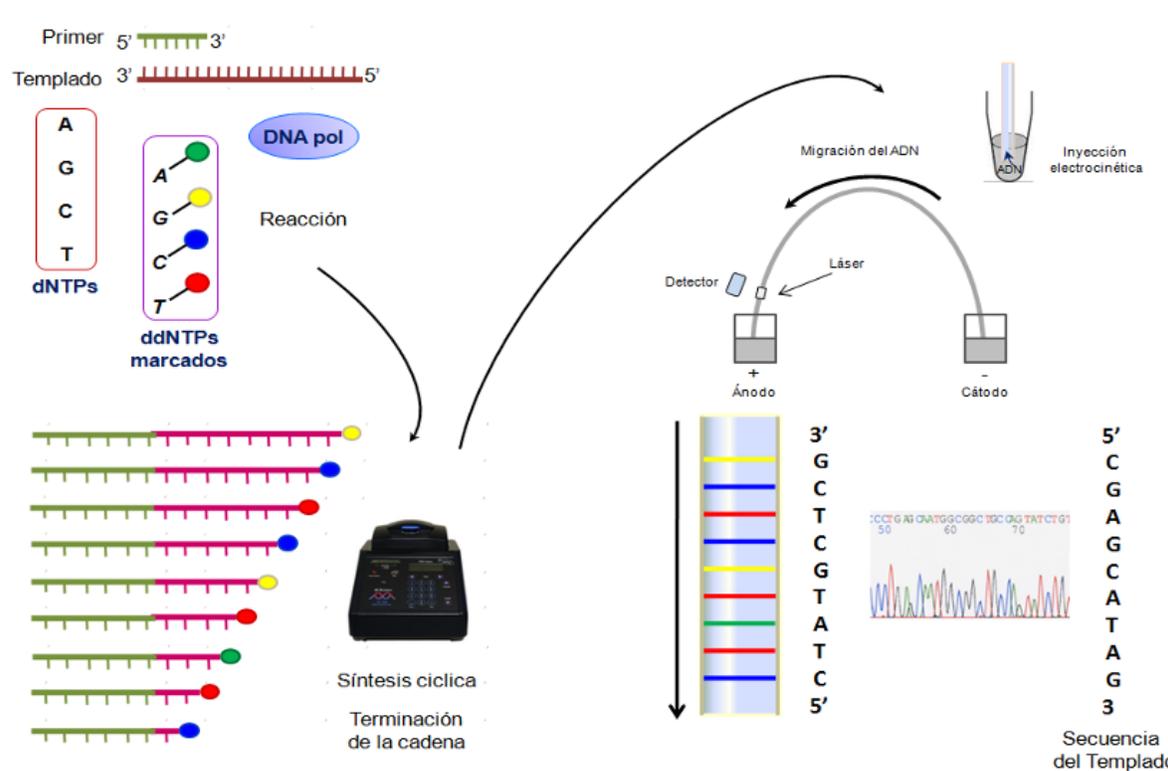
El método de secuenciación de terminación de la cadena se realiza actualmente por síntesis cíclica usando los ddNTPs marcados, con un fluorocromo distinto para cada uno de los cuatro terminadores (Fig. 2). Los fragmentos generados, de distintos tamaños, son separados por electroforesis capilar. Durante el proceso las moléculas de ADN son inyectadas a los capilares electrocinéticamente usando un voltaje bajo. Posteriormente se aplica un voltaje alto para generar una corriente eléctrica entre el electrodo del ánodo y los electrodos del cátodo que hace que las moléculas de ADN cargadas negativamente migren a través del polímero a lo largo de los capilares. Los fragmentos se desplazan de acuerdo a su tamaño, migrando más rápidamente los fragmentos pequeños. Conforme las moléculas pasan por la ventana de detección de los capilares, localizada cerca del electrodo positivo (ánodo), los fluorocromos son excitados por el láser, la fluorescencia específica emitida por cada uno de ellos es recibida por el detector (sistema CCD). Esta fluorescencia es interpretada por el *software* para la asignación de bases y producir el electroferograma de la secuencia (gráfico de intensidad de fluorescencia de los distintos fluorocromos a lo largo del tiempo de corrida, y asignación de bases) [15].

### **Materiales y reactivos**

DNA templado, iniciadores (*primers*), *BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix* (TRRM) (AB - Applied Biosystems) (el cual contiene: *Dye terminators*, dNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub> en amortiguador Tris-HCl a pH 9.0), amortiguador de dilución 5X para *BigDye v3.0* (AB), plásmido control pGEM 3Zf(+), *primer* M13 (-21), formamida HiDi (AB), polímero POP7 y amortiguadores del cátodo y del ánodo para

secuenciador de la serie 3500 (AB), agua MiliQ estéril, EtOH absoluto frío, EtOH al 70% frío. Amortiguador TAE 50X (Bio-Rad), agarosa (Gibco), amortiguador de carga, marcadores de peso molecular:  $\lambda$  digerido con *Hind*III y *Eco*RI, y 100bp

(Invitrogene). Puntas para micropipetas de diferentes volúmenes, microtubos de diferentes volúmenes, placas de 96 pozos, tapas (septa) y bases para placas del secuenciador. Arreglo de 8 capilares para secuenciador de la serie 3500 (AB).



**Figura 2. Secuenciación enzimática Sanger-capilar.** La reacción de secuencia con los ddNTPs marcados con fluorocromos se realiza por termo-ciclaje. Los ddNTPs actúan como terminadores lo que produce fragmentos de ADN de distintos tamaños, éstos se introducen a los capilares por electro inyección y son separados mediante electroforesis capilar, la fluorescencia es detectada conforme pasan las moléculas por la ventana de detección y se determina la secuencia. El resultado de la secuencia obtenida se presenta como un electroferograma.

## Equipos

- Secuenciador automático de ADN 3500 *Genetic Analyzer* de Applied Biosystems de 8 capilares (Fig. 3). El equipo es un sistema basado en fluorescencia y tecnología de electroforesis capilar [15]. Componentes: Horno de temperatura controlada para el arreglo de capilares que se conecta al bloque del polímero y al cátodo. Puerto para la ventana de detección de los capilares, en donde se encuentra el láser de estado sólido a 505nm y el sistema CCD que colecta y genera la imagen de la fluorescencia emitida por los fluorocromos con que están marcados los fragmentos de ADN. Sistema de inyección del polímero, con una bomba de zafiro que inyecta el polímero de manera homogénea a los capilares. *Autosampler* para colocar las placas con las muestras y el contenedor del amortiguador del cátodo y agua, el *autosampler* se mueve para posicionar el

amortiguador y las muestras en los capilares durante los pasos del proceso de electroforesis. Puerto del amortiguador del ánodo con el electrodo correspondiente. Sistema de identificación de radiofrecuencia para determinar las condiciones de los consumibles y reportar información crítica. Computadora con los programas *Data Collection software* v1.0 y *DNA Sequencing Analysis software* v5.1 para secuenciadores de la serie 3500 (AB). La plataforma 3500 puede correr aplicaciones de secuenciación y de análisis de fragmentos.

- Otros equipos: termociclador *DNA Engine* (Bio-Rad), centrífuga Eppendorf 5415D, espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), juego de micropipetas de diferentes volúmenes, cámaras de electroforesis horizontal, fuente de poder, vórtex.

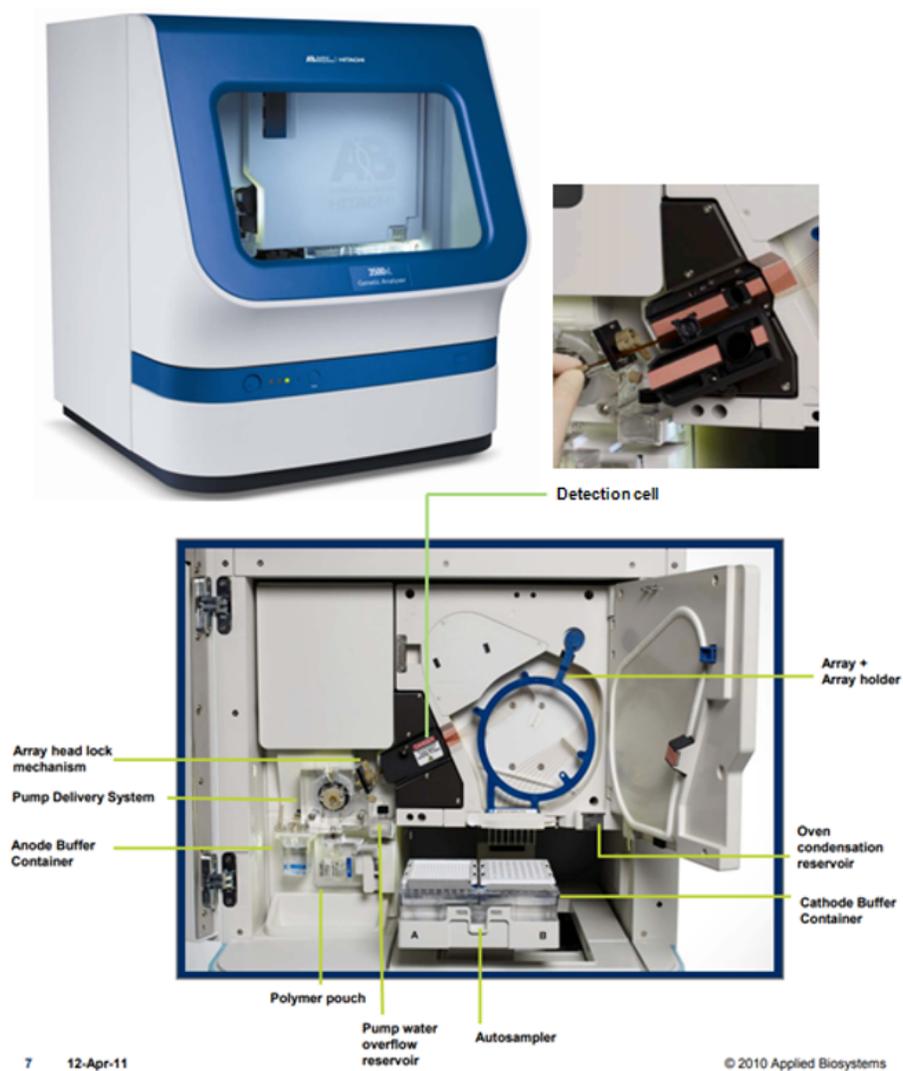


Figura 3. Componentes de secuenciador automático. 3500 *Genetic Analyzer*. (Tomado del manual de usuario).

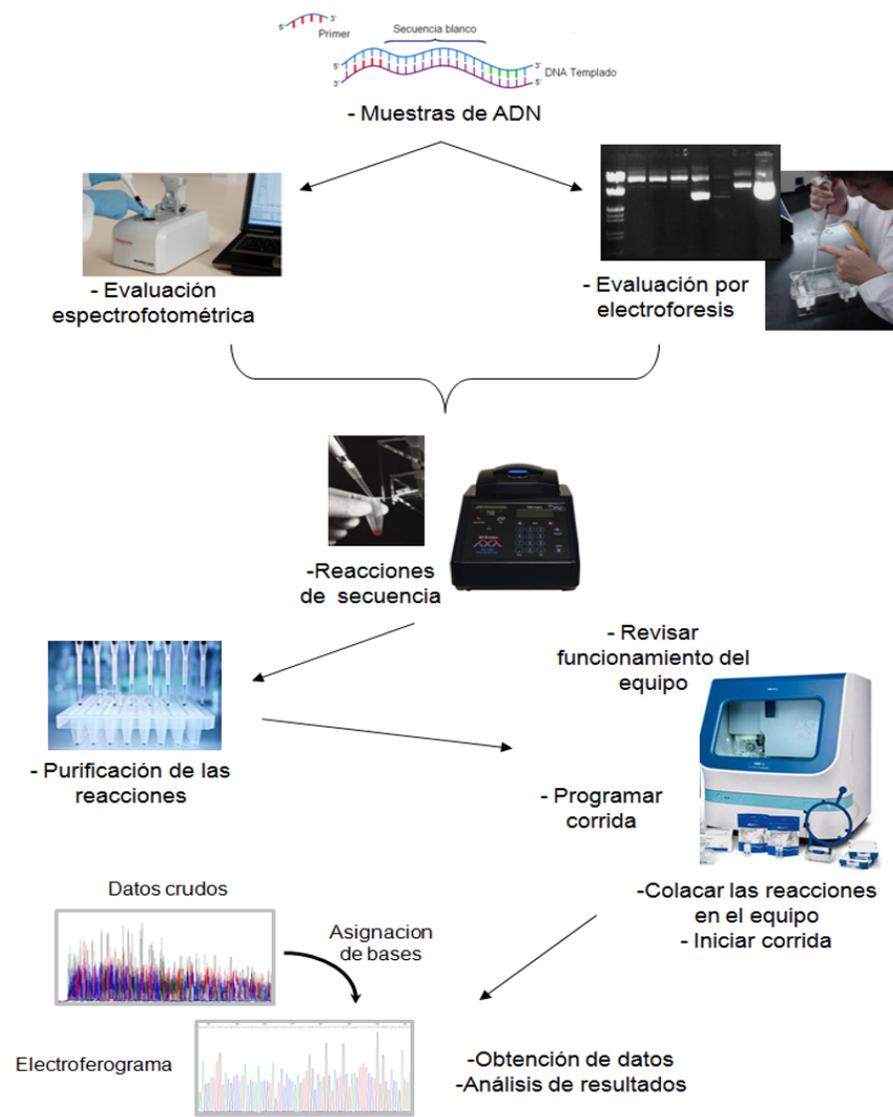
## Procedimiento

En la figura 4 se muestra el esquema general del procedimiento. Previo a la secuenciación se verifican los templados mediante geles de agarosa y espectrofotometría para determinar la calidad y cantidad de ADN. La calidad y cantidad del ADN son cruciales para obtener una buena secuencia. Se recomienda que la purificación de los templados de ADN se haga con kits comerciales de buena calidad y que el ADN se resuspenda o eluya con agua destilada estéril, y no en amortiguador.

## Reacciones de secuencia

Una vez determinada la calidad y cantidad de ADN templado se hacen las reacciones de secuencia (protocolo estándar) y se purifican:

1. Diluir el TRRM en una proporción 1:2.5 con amortiguador de dilución. Colocar 3  $\mu$ l de esta mezcla en tubo de 0.2ml, añadir la cantidad necesaria de templado de acuerdo a las recomendaciones en la tabla 1, añadir la cantidad de *primer* requerido de acuerdo al tipo de reacción, (ver Tabla 1), ajustar el volumen de reacción a 15 $\mu$ l con agua MiliQ estéril. Mezclar perfectamente evitando formar burbujas



**Figura 4. Esquema general del procedimiento.** Las muestras de ADN son evaluadas para determinar su concentración, pureza y calidad, se realiza la secuenciación por termo-ciclaje, posteriormente se purifican las reacciones y se colocan en el secuenciador, el cual ha sido previamente verificado para su correcto funcionamiento. Finalmente se hace la verificación de los resultados obtenidos.

**Tabla 1. Condiciones recomendadas para la reacción de secuencia**

Tipo de plantilla	Cantidad	Concentración de primer	TTRM diluido
Producto de PCR	Depende del tamaño del producto: 2-3 ng / 100pb hasta un máximo de 60ng para productos > a 2000pb	10 µM	3µl
ADN de doble cadena (i.e. plásmidos)	150 - 300 ng	20 µM	3 µl
ADN de alto peso molecular	1 – 3 µg	40 µM	6 µl

2. Colocar los tubos en el termociclador con las siguientes condiciones de ciclaje:

96°C por 5 min	} 25 ciclos
96°C por 10 seg	
50°C por 5 seg	
60°C por 4 min	
25°C por tiempo indefinido	

**Nota:** si no se van purificar las reacciones de secuencia, almacenarlas a -20°C protegidas de la luz.

3. Purificar las reacciones de secuencia por precipitación alcohólica; transferir la reacción de secuencia a tubos de 1.6ml, añadir 20 µl de agua MiliQ y 65µl de EtOH al 100% frío, mezclar perfectamente. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 11,000xg por 20 minutos. Retirar el sobrenadante y lavar la pastilla de ADN con 200µl de EtOH al 70% frío, centrifugar a 11,000xg por 10 minutos y retirar completamente el sobrenadante. Dejar secar la pastilla de ADN al aire por 5 minutos o hasta que se haya evaporado todo el alcohol remanente.

**Nota:** si no se van correr las reacciones de secuencia, almacenarlas a -20°C protegidas de la luz.

4. Resuspender perfectamente la pastilla de ADN en 15µl de formamida HiDi evitando formar burbujas. Transferir las muestras a la placa de 96 pozos, asegurar que la muestra está perfectamente colocada en el fondo del pozo de la placa, eliminar cualquier burbuja que pueda haber, ya sea con una punta de pipeta o mediante un pulso de centrifugación. Sellar la placa con los septa.

**Nota:** El protocolo estándar funciona para la mayoría de las muestras, sin embargo hay algunas modificaciones que se pueden hacer para muestras complicadas, por ejemplo para muestras ricas en GC, o que adoptan estructura secundaria se recomienda agregar 0.5µl de DMSO, éste debe ser añadido al final. Para muestras modificadas con desbalance de bases o alto número de repetidos y de muy alto peso molecular se puede añadir DMSO y hacer modificaciones en el programa de ciclaje, como bajar la temperatura de extensión y aumentar el número de ciclos.

### Electroforesis

Las reacciones ya purificadas se colocan en el secuenciador para llevar a cabo la electroforesis. Previo a la corrida se verifica el funcionamiento del secuenciador:

1. Verificar las condiciones de los reactivos en el secuenciador, esto es la cantidad que se tiene, la caducidad y el tiempo que han permanecido en el equipo, en caso necesario substituir los reactivos. Utilizar el sistema de identificación de los reactivos RFID que proporciona este tipo de información automáticamente, indicando cuales reactivos deben ser cambiados.
2. Verificar que los canales de la bomba de inyección y el polímero no tengan burbujas que puedan interferir durante la electroforesis. Eliminar todas las burbujas del sistema utilizando el programa específico (*wizard*) en el menú de mantenimiento del software *Data Collection*.
3. Tapar la placa con el septa y colocarla en la base. Colocarla en la charola del autosampler del secuenciador. Cerrar la puerta del equipo.
4. Utilizando el software *Data Collection* seleccionar el paso de crear o editar una placa de corrida y programar el equipo con el módulo de corrida adecuado de acuerdo a las características de la reacción de secuencia, el tipo de polímero y capilar instalados en el equipo, así como la longitud de lectura requerida, siguiendo las indicaciones del programa. Vincular la placa con el módulo de corrida. Iniciar la corrida. Es conveniente verificar en la pantalla de monitoreo de la corrida los primeros pasos de la electroforesis para asegurar que el proceso inició de manera correcta.

Una vez terminada la electroforesis, los resultados obtenidos son revisados con el programa *DNA Sequencing Analysis*, para verificar que el proceso se realizó de manera correcta, se hace una revisión de la secuencia para valorar la calidad de la corrida y la asignación de bases.

### Puntos clave

- No exponer el TRRM excesivamente a la luz, ya que este reactivo contiene los ddNTPs marcados con los fluorocromos que son sensibles a la luz.

- Mantener la mezcla TRRM en hielo, ya que contiene la enzima (ADN polimerasa).
- La concentración de EtOH durante la precipitación es muy importante, por lo que el alcohol que se usa no debe ser abierto repetidamente, se recomienda tener alícuotas del EtOH al 100% a -20°C.
- Durante el proceso de precipitación de las muestras, tener cuidado de no perturbar o absorber la pastilla de ADN, ya que esta no será visible, es importante tener presente en que posición del tubo se encuentra para no perder las muestras.
- Es muy importante que no haya burbujas en las muestras que se colocarán en el secuenciador para evitar que estas se introduzcan en los capilares y alteren la electroforesis.
- El diseño del primer es semejante al de los primers para PCR, es importante que sea altamente específico, que se diseñe unos 30-50 nucleótidos corriente arriba de la región de interés y se recomienda que la Tm sea de 50 a 55°C.
- Los productos de PCR deben ser purificados independientemente de que sean banda única, ya que es importante eliminar los reactivos de la PCR, enzima, primers y sales, para que no interfieran con la secuenciación.
- En la purificación de la reacción de secuencia se recomienda precipitar 20 minutos, precipitación por tiempos menores resultará en la pérdida de los fragmentos cortos y por tiempos mayores incrementa la precipitación de dye terminators no incorporados y la formación de burbujas de fluorocromos por asociación inespecífica de los terminadores con los fragmentos de ADN.

#### Servicio

Para el servicio de secuenciación en la UBM se llena la solicitud correspondiente con la información requerida, especificar el nombre del templado y del primer con que se realizará la secuencia con un máximo de 10 caracteres para cada uno, no utilizar símbolos, en el caso de primers proporcionados por el usuario escribir la secuencia del mismo en el recuadro correspondiente. Las muestras y primers deben estar de acuerdo a las condiciones y concentraciones recomendadas. El servicio puede incluir la preparación de reacciones de secuencia y electroforesis, o solo la electroforesis de reacciones de secuencia listas para correr en el equipo.

Los resultados son enviados por correo electrónico como archivo con extensión .abl y pueden ser analizados con programas que permitan abrir este tipo de archivos, como *Chromas* y *BioEdit* para PC (*Windows*) o *4Peaks* para MacOS, con versiones de acceso libre. Se recomienda revisar cuidadosamente el electroferograma antes de hacer otro tipo de análisis o ensayos.

#### Resultados

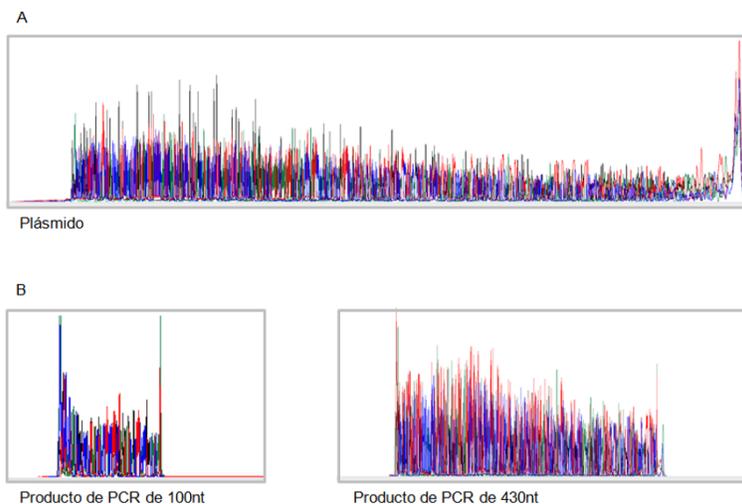
El sistema genera un archivo con los resultados de la corrida, este contiene los datos crudos de fluorescencia, el electroferograma con la asignación de bases y la calidad de asignación, y el texto de la secuencia. El análisis de los datos crudos nos da información sobre la corrida en general, se revisa que la intensidad de fluorescencia sea adecuada, suficiente para la asignación de bases, pero sin saturar el detector, así mismo se evalúa que la intensidad sea correcta a lo largo de toda la corrida (Fig. 5).

El electroferograma presenta la secuencia obtenida como una gráfica de picos de colores, que corresponden a la fluorescencia de las distintas bases en dirección 5'-3', de izquierda a derecha, el programa de análisis calcula para cada base un valor de calidad de asignación (QV), que puede ser verificado en el electroferograma, este valor indica la probabilidad de que la asignación de la base haya sido correcta, se revisa manualmente la asignación de bases, particularmente al inicio y final de la secuencia que son las regiones más difíciles de determinar, para verificar que no haya algún error en la asignación.

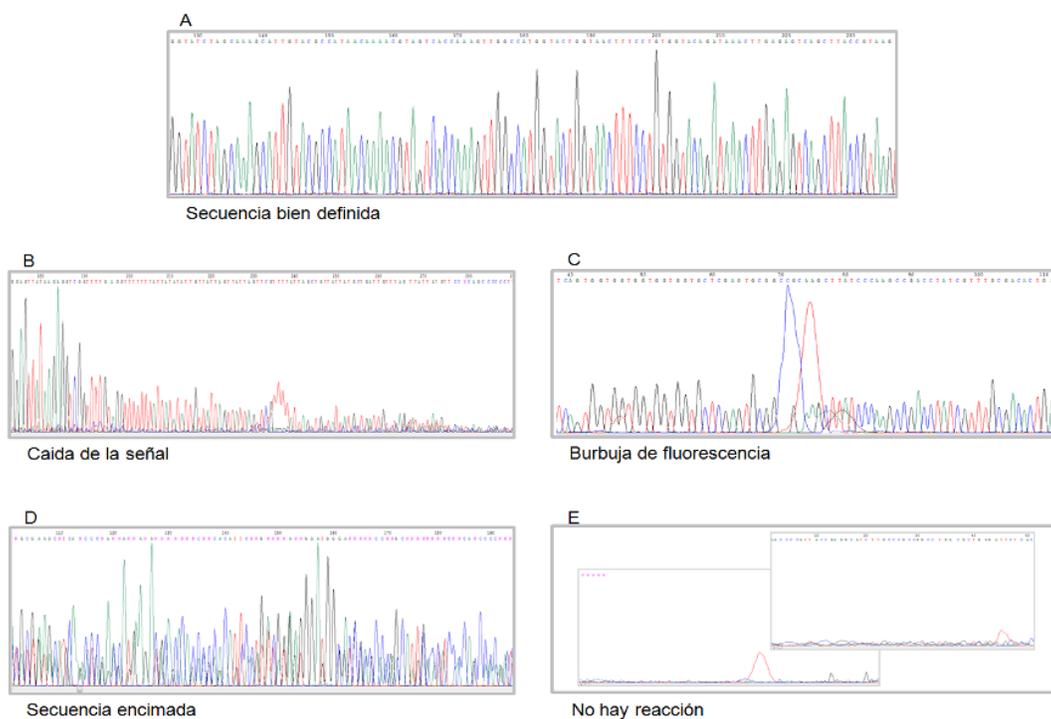
En la figura 6 se puede observar algunos resultado de reacciones de secuencia con diferente calidad: A) secuencia con alta calidad, se puede ver una buena definición de los picos de fluorescencia para las distintas bases, la secuencia es limpia sin ruido basal; B) la señal de fluorescencia disminuye gradualmente, esto puede deberse a la presencia de contaminantes, como sales o carbohidratos; C) presencia de burbujas de fluorocromos que puedan enmascarar la señal en regiones particulares, estas pueden deberse a una mala calidad del templado o a una purificación deficiente de las reacciones de secuencia; D) secuencias con picos encimados a los que no se les puede asignar una base única, esto indica que en la muestra hay una mezcla de templados, esto puede producirse por varias razones, por ejemplo, en el caso de plásmidos puede deberse a que el ADN no se purificó a partir de una clona

aislada, para los productos de PCR indica la presencia de más de un producto o problemas con los primers; E) ausencia de secuencia o señal baja a lo largo de la secuencia que impide o dificulta la asignación de bases, esto puede ocurrir cuando el

templado es de muy mala calidad, que se haya utilizado una concentración sumamente baja de templado, o que el primer no tenga un buen alineamiento y estabilidad con el templado.



**Figura 5. Perfiles de fluorescencia de los datos crudos.** Se observa la intensidad de fluorescencia de los cuatro fluorocromos a lo largo de toda la corrida. A) perfil de los datos de la secuenciación de un plásmido. B) perfiles de productos de PCR de diferente longitud.



**Figura 6. Electroferogramas de secuencias de plantillas de diferente calidad.** A) ADN de buena calidad, los picos están bien definidos y no se observa ruido basal, los valores de calidad (QV) son altos para casi todas las bases a lo largo de la secuencia. B) ADN contaminado con sales, se observa una disminución gradual de la fluorescencia. C) En este gráfico se observa una burbuja de fluorescencia que afecta la asignación de bases. D) Secuencia con bases mezcladas, se observan picos dobles, indican la presencia de más de un templado en la muestra. E) Plantillas de muy mala calidad, secuencias con señal sumamente baja, prácticamente no se identifican picos de fluorescencia.

## Conclusiones

La técnica de secuenciación Sanger o de terminación de la cadena es un método efectivo para determinar el orden de los nucleótidos en cadenas de ADN, lo que es de gran importancia dado que este orden es lo que determina la información genética y como se regula su expresión.

El uso de terminadores marcados con fluorocromos, de ADN polimerasas termoestables, la automatización y el cambio a electroforesis capilar han mejorado sustancialmente la especificidad, la eficiencia y la velocidad de secuenciación. El método Sanger-capilar es el más utilizado actualmente para

la secuenciación de fragmentos individuales y para proyectos de secuenciación de baja escala.

Este método es altamente preciso y reproducible, con el que se pueden obtener secuencias de muy alta calidad, con longitudes de lectura de hasta unos 900 nucleótidos de manera confiable. La calidad del templado es uno de los factores que más contribuyen para obtener un buen resultado.

Por este método se pueden secuenciar distintos tipos de ADN, como son plásmidos, productos aislados de PCR, cósmidos, virus, e incluso DNA genómico de bacterias.

## Referencias

1. de Necochea, R., y Canul, J.C. (2004) Métodos físico-químicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-47
2. Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**(4356), 737-738
3. Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. *J. Exp. Med.* **79**, 137-158
4. Greif, G. Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos. Unidad de Biología Molecular. Instituto Pasteur Montevideo. 1-16 (consultado 15 de febrero 2021)
5. Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**(2), 560-564
6. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**(12), 5463-5467
7. Integrated DNA Technologies (1911) DNA sequencing. Integrated DNA Technologies (IDT), 1-9
8. Sanger, F, and Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**(3), 441-448
9. Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H., and Hood, L.E. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**:674-679
10. Valderrama Martín, J.M., Ortigosa, F., y Cañas, R.A. (2020) Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. *Encuentros en la Biología*. Vol. XIII, No.173:19-25
11. Hutchinson III C.A. (2007) DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nuc. Ac. Res.* **35**:6227-6237. doi:10.1093/nar/gkm688
12. Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M. *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**,860-921
13. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A. *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351
14. Hert, D.G., Fredlake, C.P., and Barron, A.E. (2008) Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis* **29**:4618-4626
15. Applied Biosystems (2009) Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer. User guide. Life Technologies Corporation



### **DRA. LAURA ONGAY LARIOS**

Bióloga egresada de la Facultad de Ciencias de la UNAM, realizó estudios de posgrado, Maestría y Doctorado, en la Universidad de Southampton en Inglaterra.

Fue Profesor-Investigador durante 5 años en la Universidad de Guanajuato, México. Posteriormente

se incorporó al Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM, actualmente es Técnico Académico Titular C, Jefe de la Unidad de Biología Molecular (UBM) del IFC y pertenece al Sistema Nacional de Investigadores.

Desde su incorporación a la UBM se ha especializado en técnicas de Biología Molecular. Ha contribuido a la formación de recursos humanos como asesor de seis tesis de licenciatura y una de maestría, ha participado como profesor en diferentes cursos teóricos y teórico-prácticos en Biología Celular y Molecular, tanto de licenciatura, como de posgrado.

Proporciona asesoría especializada en técnicas de Biología Molecular y también ha dado varios entrenamientos en el uso y aplicaciones de equipos para la síntesis y secuenciación de ADN.

Ha publicado 29 artículos en revistas internacionales indizadas, 2 artículos en revistas nacionales y un capítulo de libro.