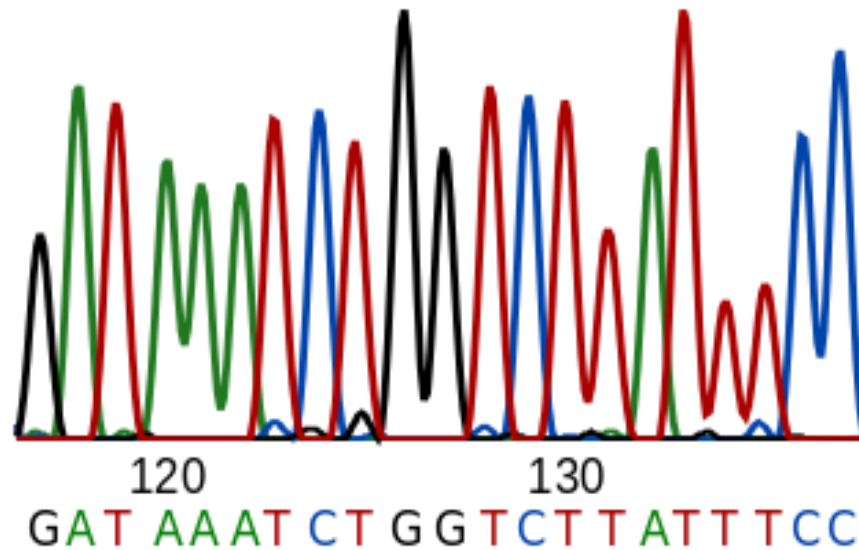


Métodos de secuenciación



Métodos de secuenciación

- ✓ *Sanger dideoxy (primer extension/chain-termination) method:*

Protocolo más conocido de secuenciación, adaptable a proyectos de secuenciación a gran escala.

- ✓ *Maxam-Gilbert chemical cleavage method:*

Marcación y clivaje del DNA de forma secuencia-específica. Protocolo no fácilmente escalable y tedioso.

- ✓ *Métodos más modernos:*

Secuenciación por síntesis

Secuenciación por ligamiento

Pirosecuenciación

Método de secuenciación de Sanger

(1977: F. Sanger y W. Gilbert - DNA Sequencing)

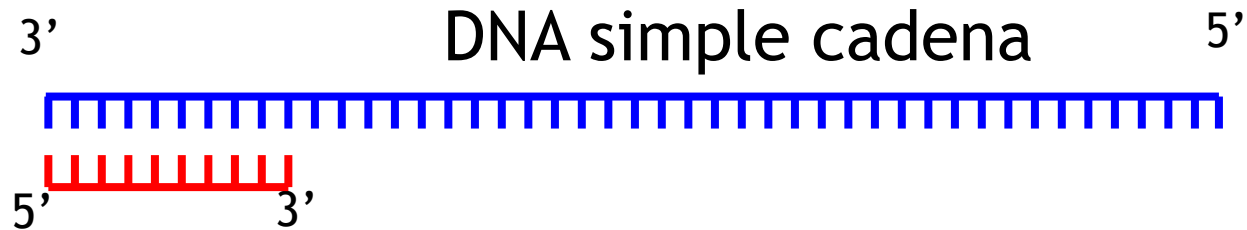
¿Qué se necesita?

- 1) Templado de DNA simple cadena (ssDNA, antes con fagoM13, en la actualidad por PCR)
- 2) “*Primer*” complementario al extremo del DNA
- 3) DNA polimerasa (carente de actividad exonucleasa)
- 4) Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y
dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs)

Método de secuenciación de Sanger

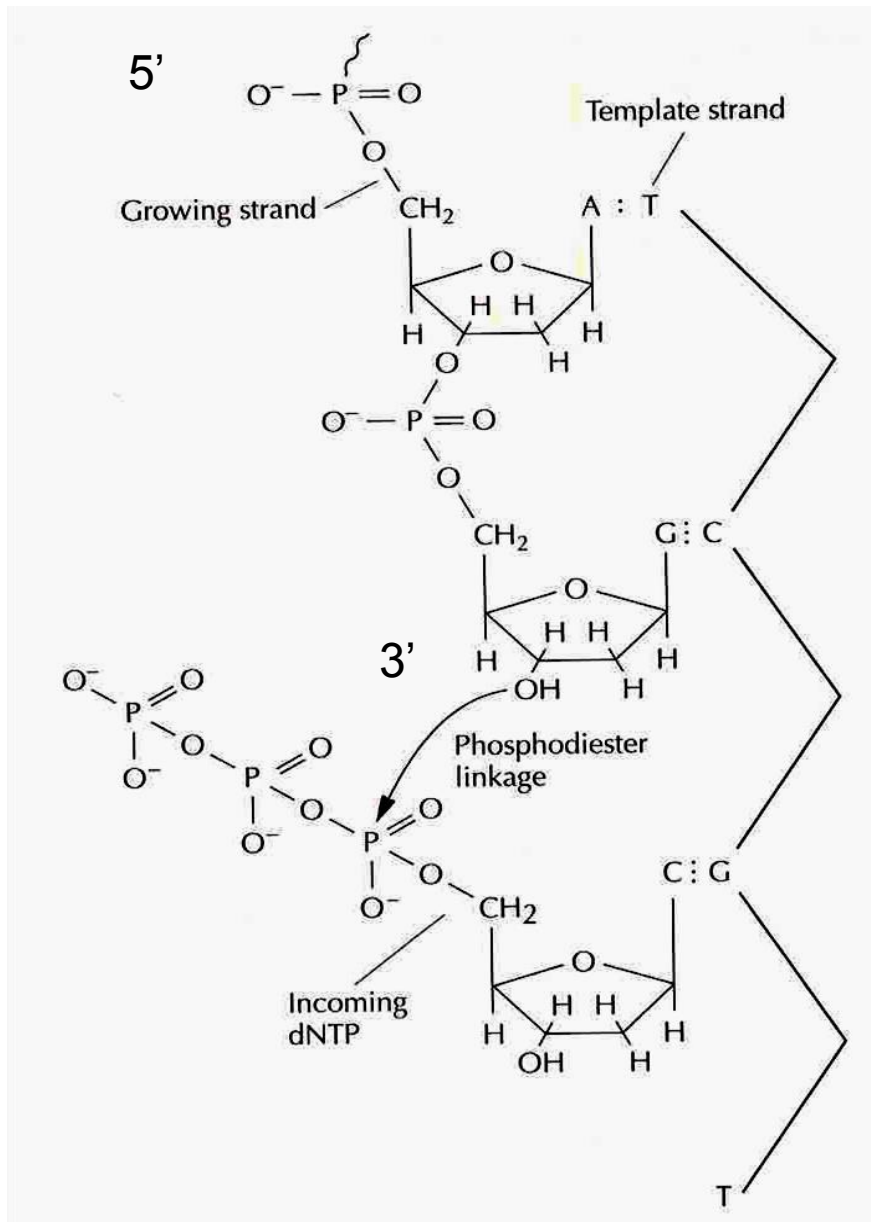
Pasos:

a) Annealing del primer



Método de secuenciación de Sanger

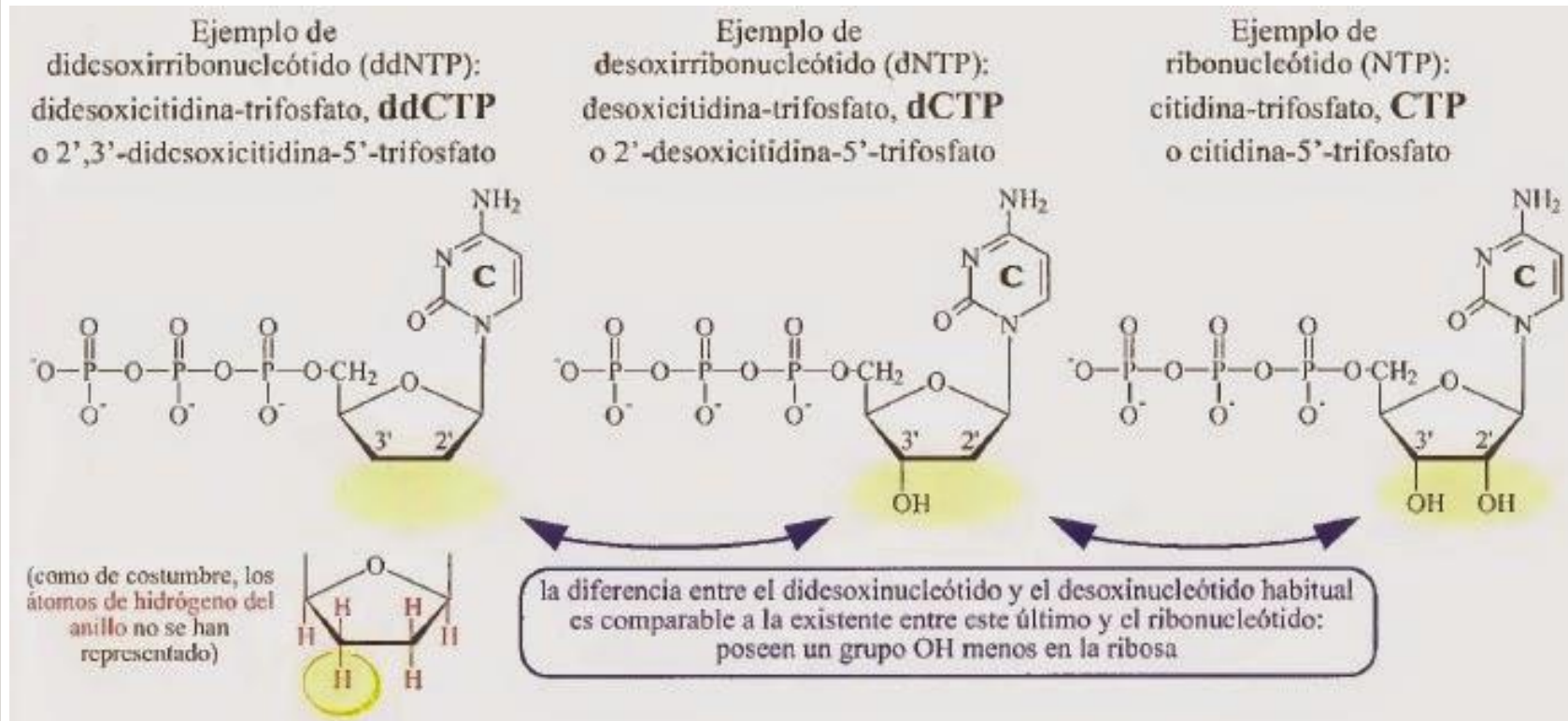
b) Extensión del primer por la DNA polimerasa en presencia de los 4 dNTPs, con una cantidad limitada de un dideoxi NTP (ddNTP)



Dirección de avance de la polimerasa

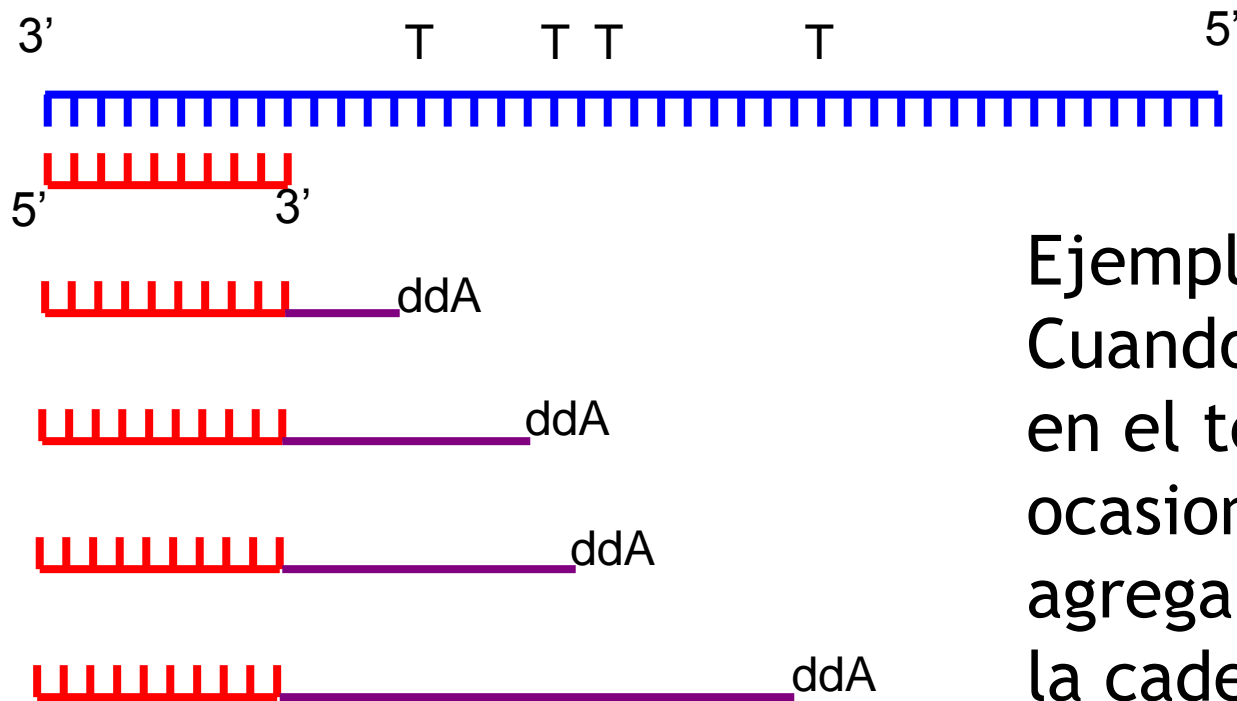


Método de secuenciación de Sanger



Cuando un ddNTP se incorpora a la cadena de DNA en crecimiento, esta cadena no puede continuar elongándose (ya que la DNA pol necesita un extremo 3' OH para añadir el siguiente nucleótido)

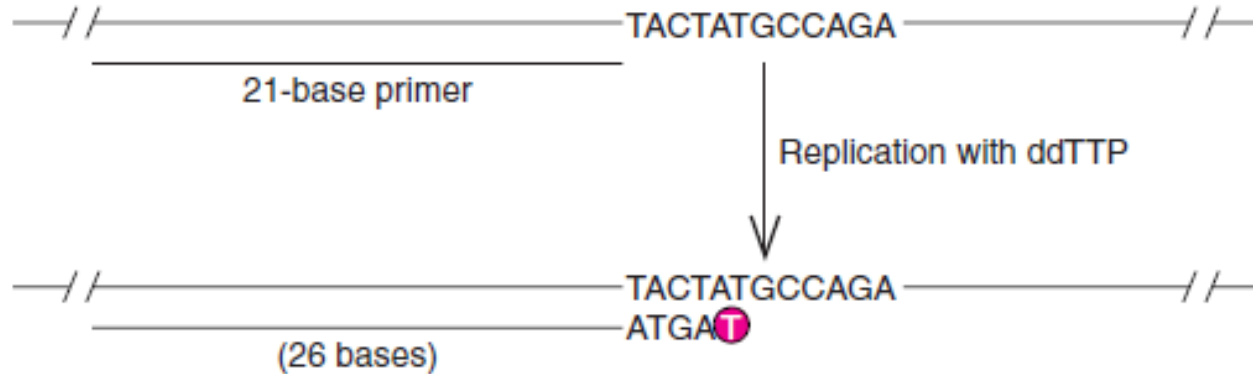
Método de secuenciación de Sanger



Ejemplo ddATP:
Cuando haya una T
en el templado,
ocasionalmente se
agregará un ddA a
la cadena en
crecimiento

Método de secuenciación de Sanger

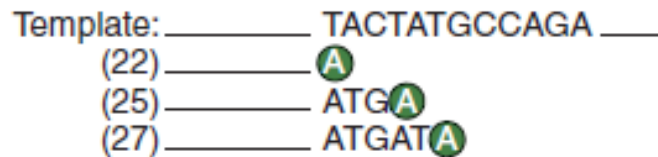
(a) Primer extension reaction:



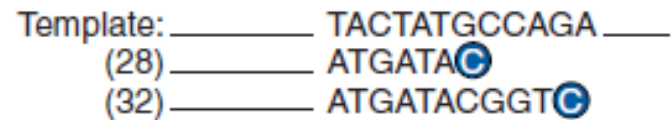
El resultado es una serie de fragmentos de distinta longitud en cada tubo

(b) Products of the four reactions:

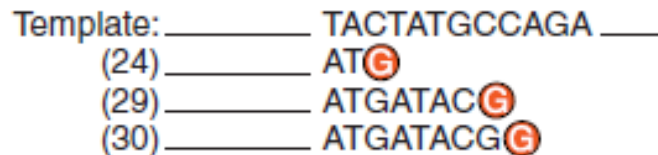
Products of ddA rxn



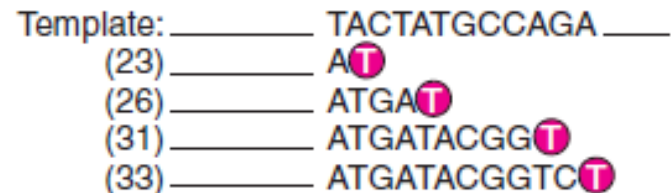
Products of ddC rxn



Products of ddG rxn



Products of ddT rxn



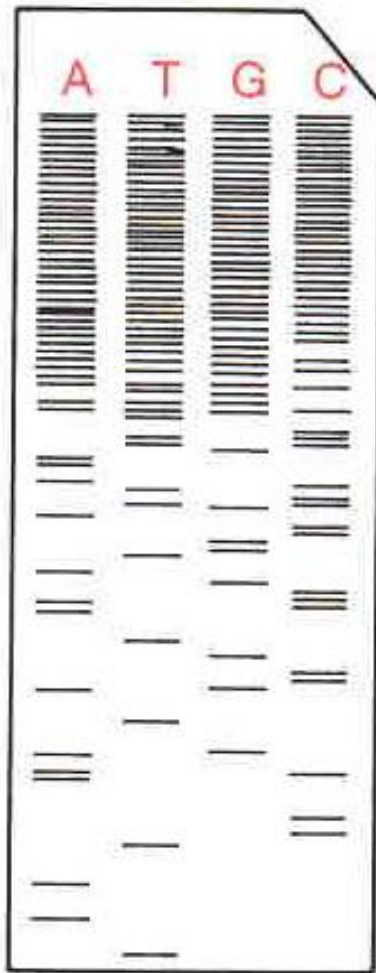
Método de secuenciación de Sanger

Visualización de los fragmentos de DNA:

- Radioactividad
 - Primers marcados (kinasa con ^{32}P)
 - dNTPs marcados (^{35}S o ^{32}P)
- Fluorescencia
 - ddNTPs marcados por fluorescencia
 - Cada uno de los 4 ddNTP fluoresce a distinta longitud de onda, permitiendo su identificación

Método de secuenciación de Sanger

ddNTP diferentes usados en reacciones separadas



Smaller fragments

Análisis de los fragmentos de DNA por SDS-PAGE y marca radioactiva del *primer* o de los dNTPs

Lectura:



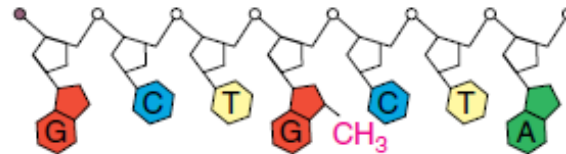
Con esta técnica en 1977 Sanger secuenció el primer genoma viral de DNA, ϕ X174, de aprox 5 500 pb

Método de Maxam-Gilbert (1977)

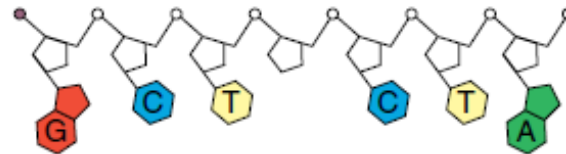
DNA labeled at one end with ^{32}P



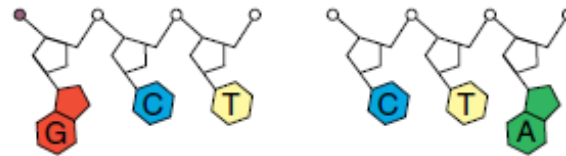
Base modification
(Guanina metilada)



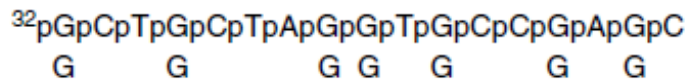
Release or displacement
of reacted bases



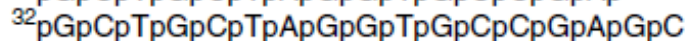
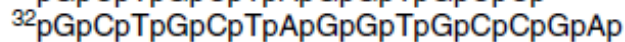
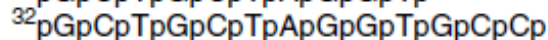
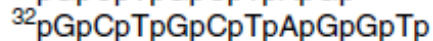
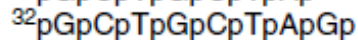
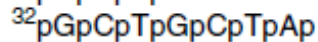
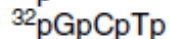
Strand scission



(b)



^{32}P



Se necesita:

-DNA marcado en un extremo

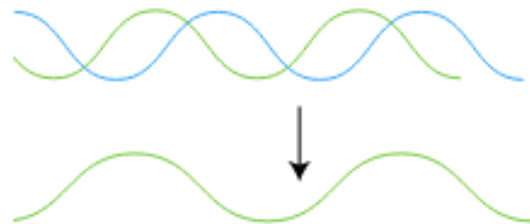
-Una base modificada (ej: metil-guanina) por cadena de DNA.

-Un agente que cliva la base modificada (ej: piperidina)

Esta reacción se realiza para otras bases (A+G, C y C+T).
Se muestra ejemplo para G

Los productos se detectan por electroforesis de forma similar que en el método de Sanger

Método de Maxam-Gilbert

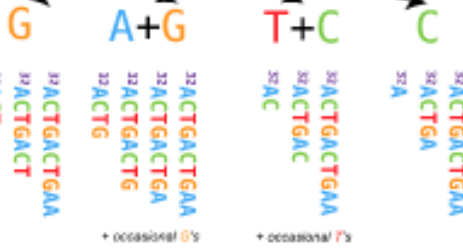


1) Obtain single stranded DNA

ACTGACTGAA

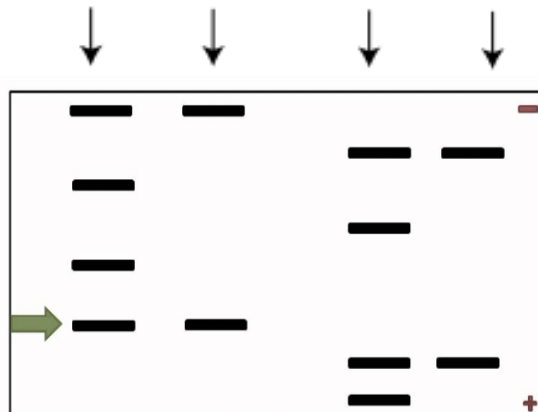
³²ACTGACTGAA

2) Add a ³²P to 5' end



3) Cleave at specific nucleotides

4) Differently sized DNA strands



5) Electrophoresis through high resolution acrylamide gels

6) Deduce DNA sequence

1-Se desnaturaliza el DNA

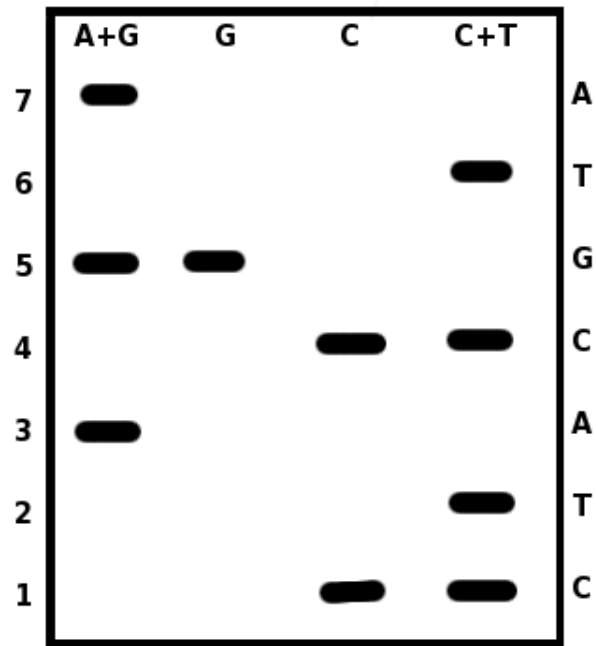
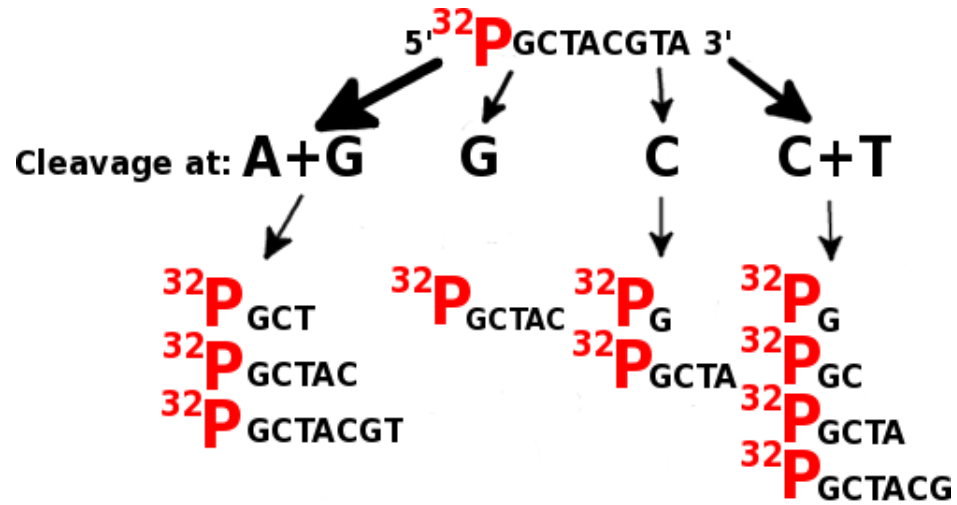
2-Se marca el extremo 5' con radioactividad

3-La muestra se divide en cuatro alícuotas que son tratadas con diferentes reactivos químicos que cortan al DNA en: G (piperidina), A+G (ácido fórmico), C+T (hidracina), C (hidracina + NaCl)

4-En cada alícuota, queda una colección de fragmentos de DNA de diferente tamaño que termina en una base específica.

5-Los fragmentos se separan electroforéticamente en un gel de poliacrilamida y se visualizan y analizan por medio de una radiografía.

Método de Maxam-Gilbert



Sequencing Gel

Sanger y Gilbert recibieron el premio Nobel en 1980

The Nobel Prize in Chemistry 1980



Paul Berg
Prize share: 1/2



Walter Gilbert
Prize share: 1/4



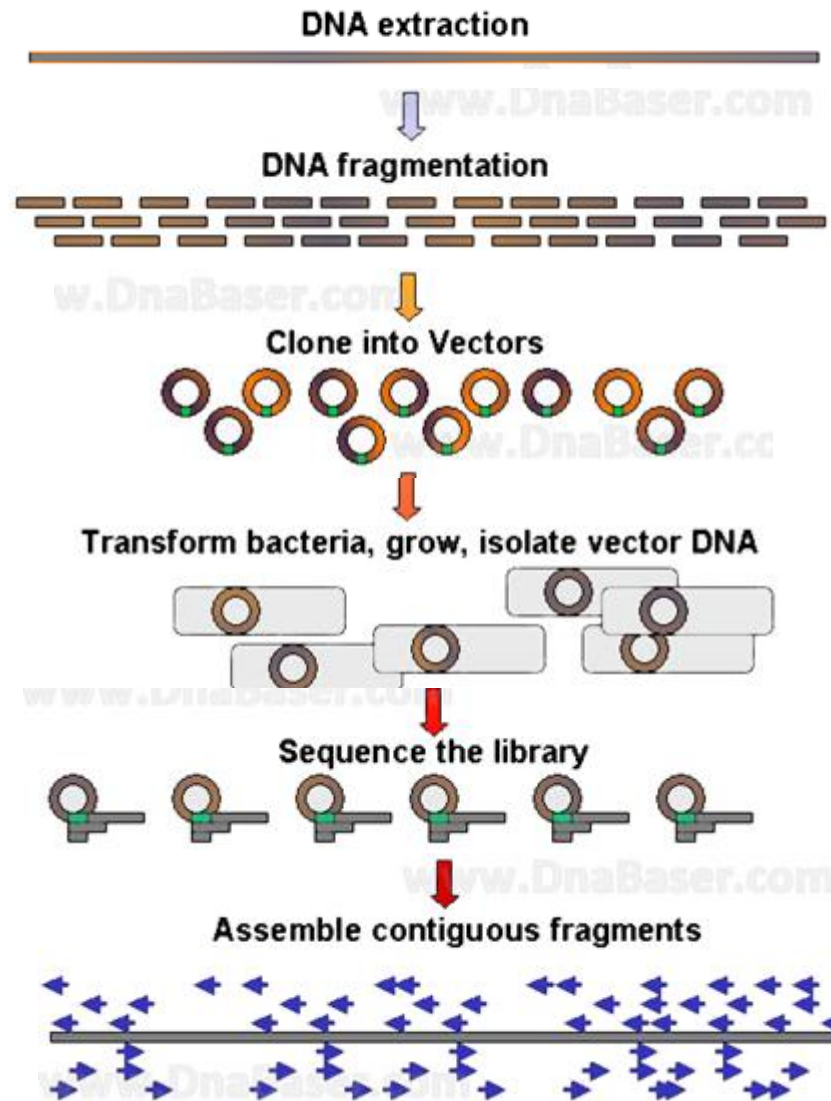
Frederick Sanger
Prize share: 1/4

The Nobel Prize in Chemistry 1980 was divided, one half awarded to Paul Berg *"for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to recombinant-DNA"*, the other half jointly to Walter Gilbert and Frederick Sanger *"for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids"*.

Nuevo método de secuenciación de Sanger

- 1982: F. Sanger - Shotgun Sequencing (Se agrega un nuevo protocolo).
- Se secuencía el genoma del bacteriofago lambda (48.502 nucleótidos, primer genoma secuenciado con este método).

Shotgun Sequencing



Permite
secuenciar
fragmentos
grandes de
DNA

Secuenciación automatizada

1987 – Primer
secuenciador



**ABI PRISM™
310 Genetic Analyzer**

PERKIN ELMER
Applied Biosystems Division
Foster City, CA 94404 U.S.A.

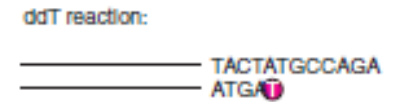
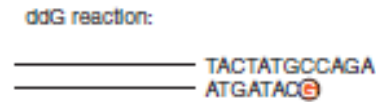
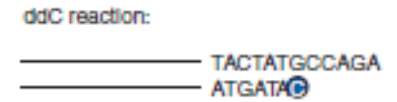
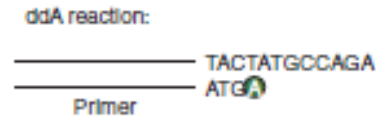
Model: 310

ABI 370

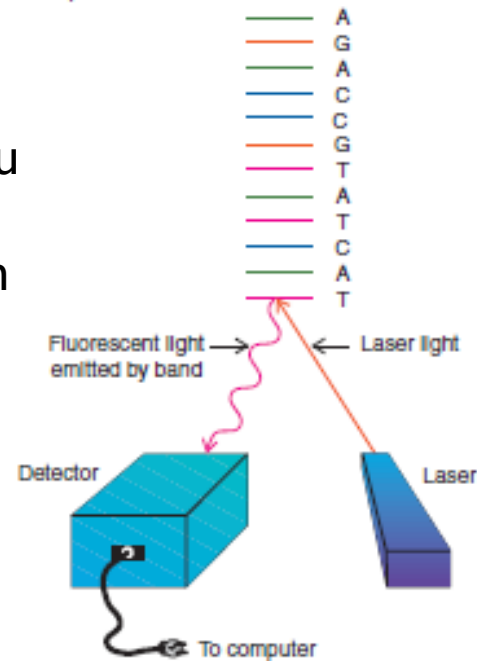
Secuenciación automatizada

Durante la electroforesis los fragmentos migran de acuerdo a su tamaño, el fluoróforo con el que van marcados es detectado por un láser, el cual envía una señal que es interpretada por el equipo en forma de un pico en un “electroferograma” (*electropherogram*).

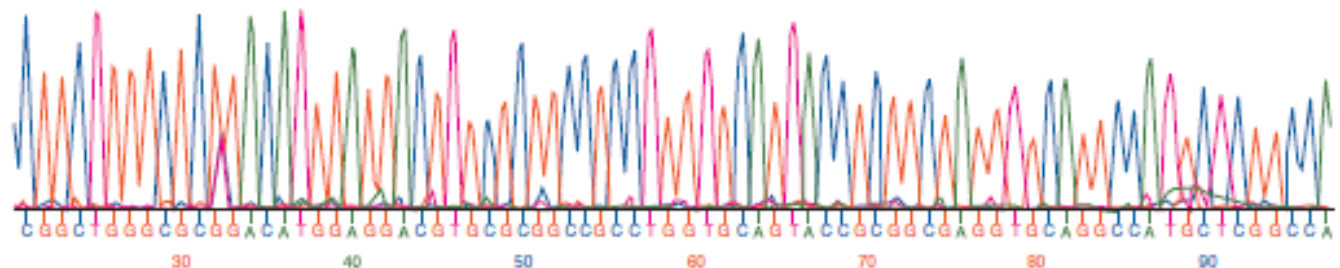
(a) Primer extension reactions:



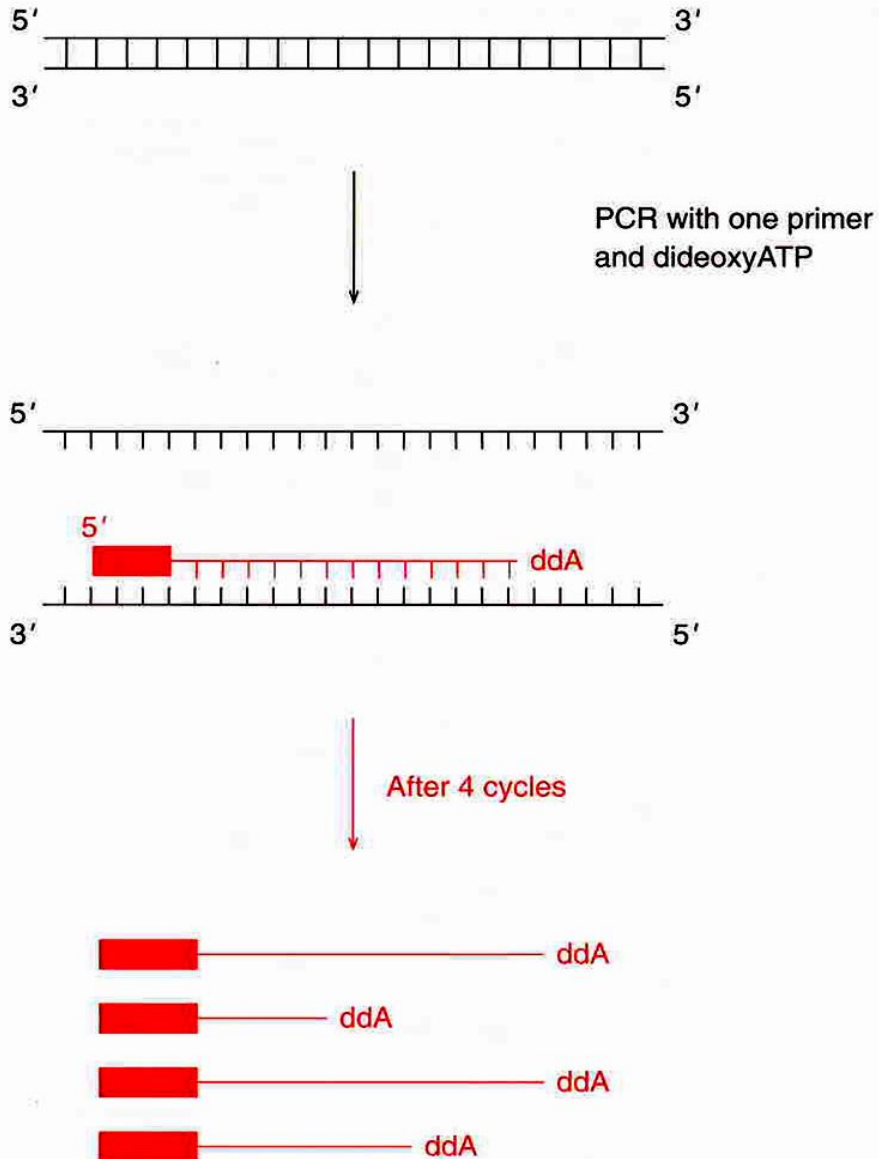
(b) Electrophoresis:



(c)



Secuenciación automatizada + amplificación por PCR



Ligation mediated PCR (LMPCR)

94-95 ° C: desnaturalización
45-55 ° C: *annealing*
68-75 ° C: extensión

25-35 ciclos

Ventajas: se requiere
mucha menor cantidad de
DNA molde

Desventajas: la DNA pol
termoestable incorpora
ddNTPs de forma poco
eficiente

Nueva generación de métodos de secuenciación

- Secuenciación por síntesis (SBS)
- Secuenciación por ligamiento (SBL)
- Pirosecuenciación

Secuenciación

Para leer:

[Nat Rev Genet.](#) 2016 May 17;17(6):333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49.

Coming of age: ten years of next generation sequencing technologies.

[Goodwin S](#)¹, [McPherson JD](#)², [McCombie WR](#)¹.



APPLICATIONS OF NEXT-GENERATION SEQUENCING

Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies

Sara Goodwin¹, John D. McPherson² and W. Richard McCombie¹

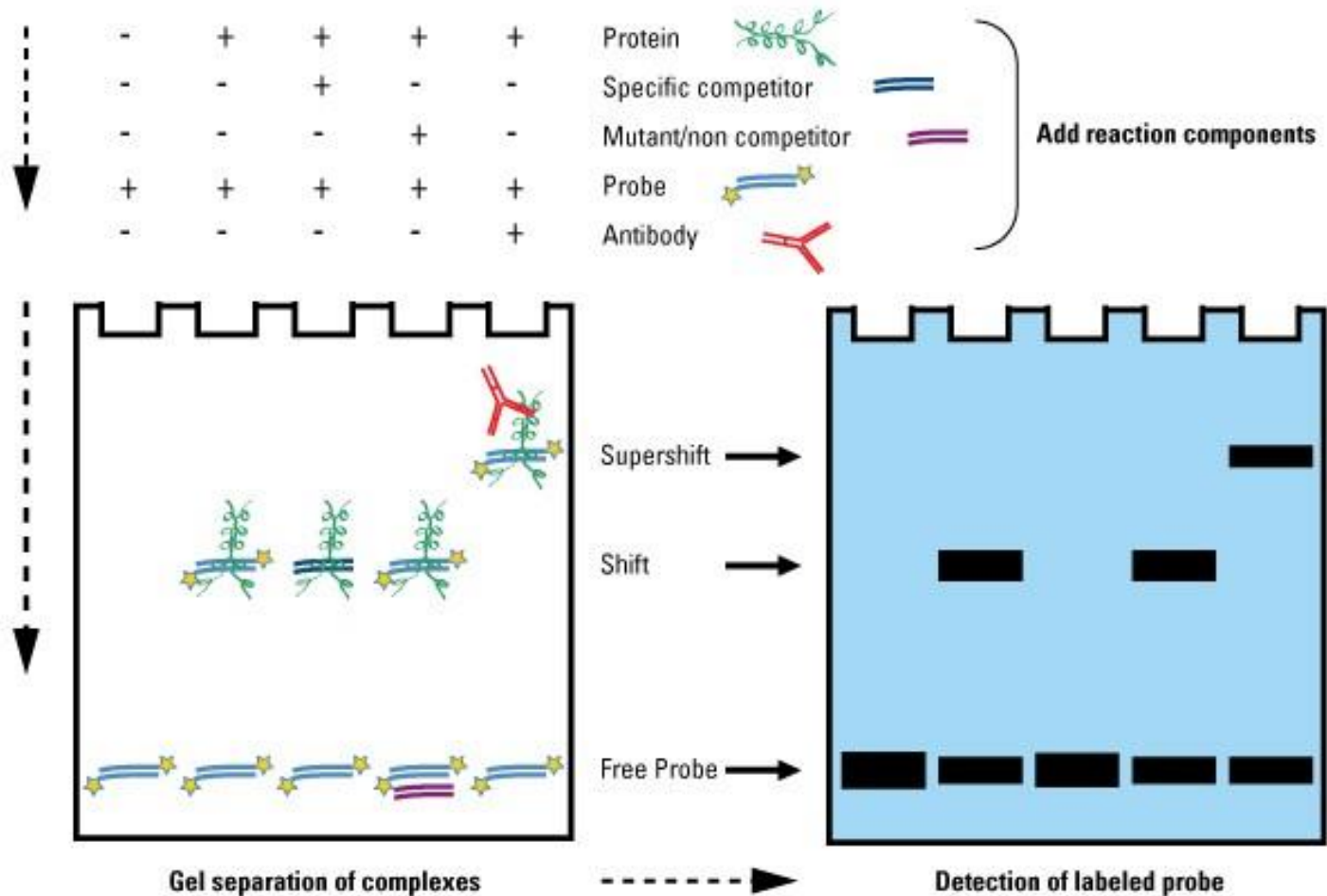
Abstract | Since the completion of the human genome project in 2003, extraordinary progress has been made in genome sequencing technologies, which has led to a decreased cost per megabase and an increase in the number and diversity of sequenced genomes. An astonishing complexity of genome architecture has been revealed, bringing these sequencing technologies to even greater advancements. Some approaches maximize the number of bases sequenced in the least amount of time, generating a wealth of data that can be used to understand increasingly complex phenotypes. Alternatively, other approaches now aim to sequence longer contiguous pieces of DNA, which are essential for resolving structurally complex regions. These and other strategies are providing researchers and clinicians a variety of tools to probe genomes in greater depth, leading to an enhanced understanding of how genome sequence variants underlie phenotype and disease.

Métodos para estudiar la interacción DNA-proteína

- Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).
- DNA footprinting assay.
- Yeast one hybrid system.
- Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay.
- Luciferase reporter assay.
- Etc.

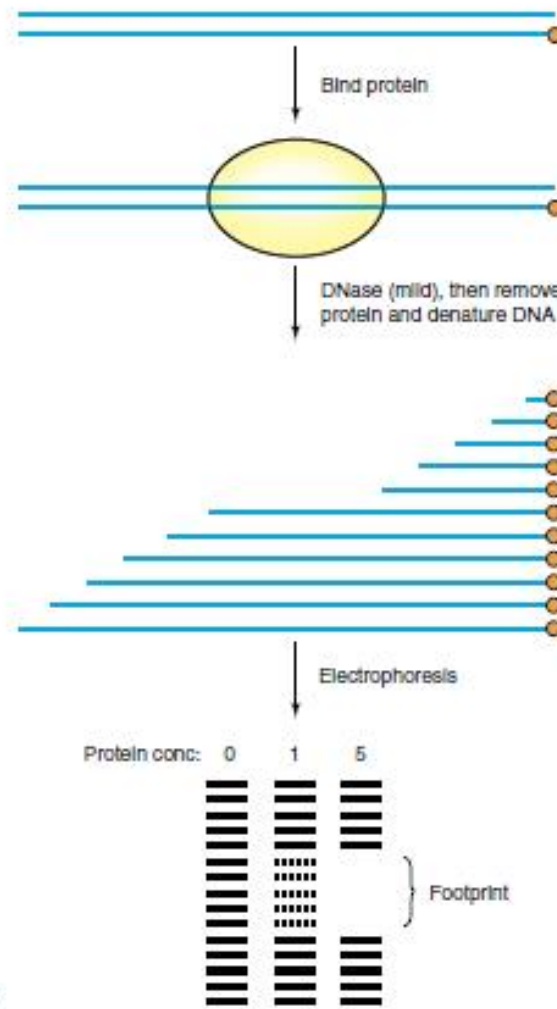
Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

- ✓ Retraso de migración en gel
- ✓ Interacción proteína-DNA

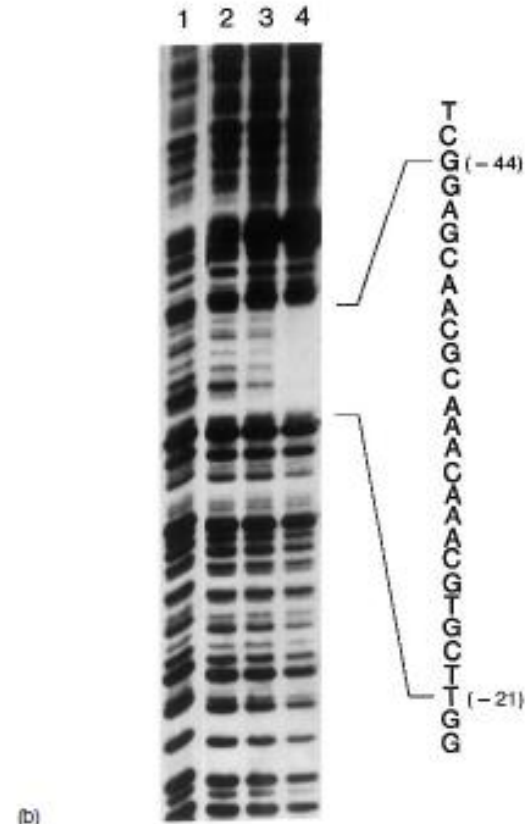


DNA Footprinting

- ✓ Interacción proteína-DNA: permite identificar la región de unión de una proteína al DNA
- ✓ Métodos más populares: DNase footprinting, dimethylsulfate (DMS) footprinting, and hydroxyl radical footprinting.



(a)



Se compara
contra un DNA
control sin el
agregado de la
proteína

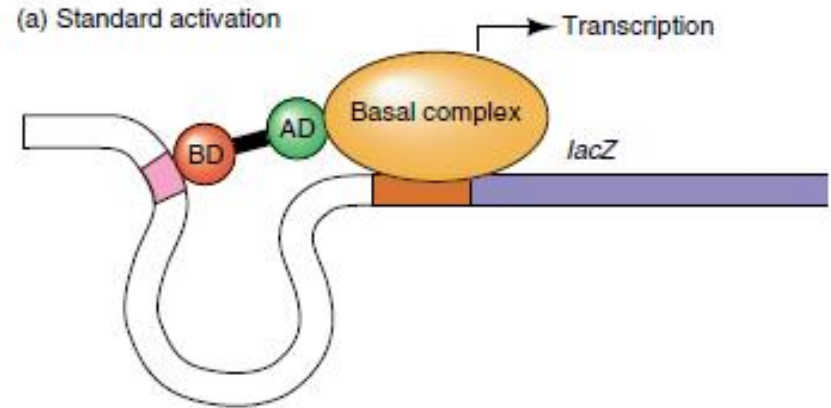
(b)

Ejemplo de DNase
footprinting

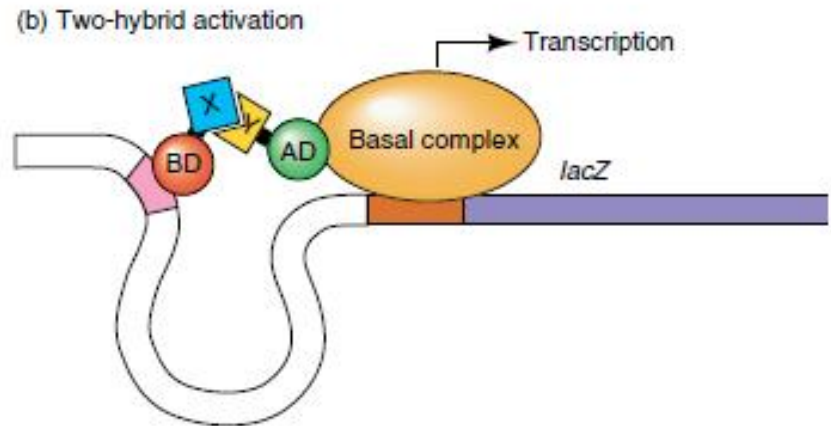
Doble híbrido

✓ Interacción proteína-proteína.

a) Activación estándar de la transcripción. El dominio de unión al DNA (BD) se une al dominio de activación (AD), estimulando la transcripción.



b) Ensayo de doble híbrido. Se fusiona la proteína X a un dominio BD y la proteína Y a un dominio AD. Se introduce en levaduras.



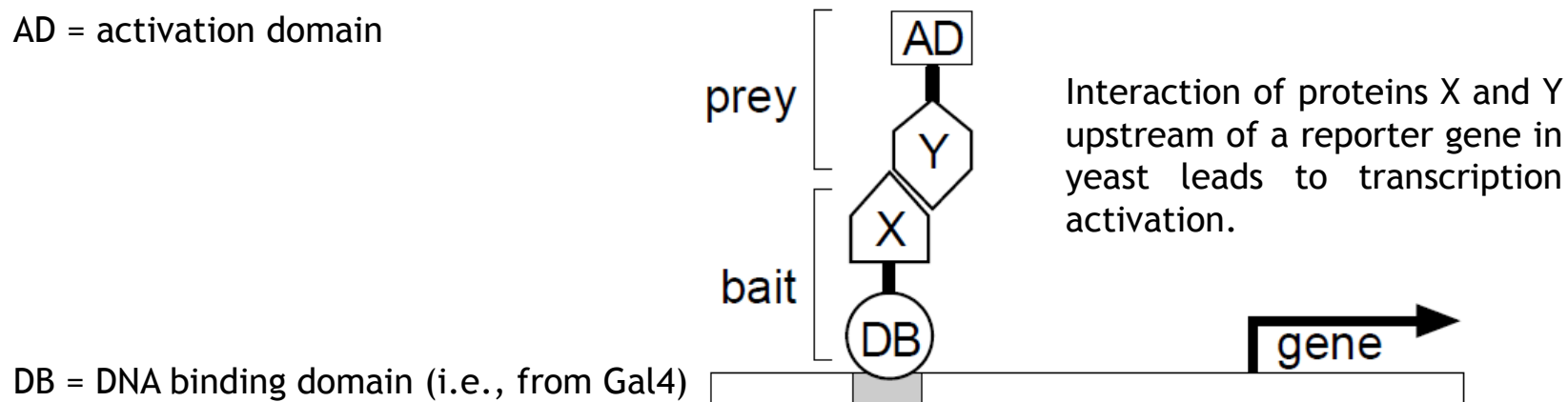
BD muy usado: Gal4

Métodos de identificación

Yeast one-hybrid system → DNA-protein interactions

Yeast two-hybrid system → Protein-protein interactions

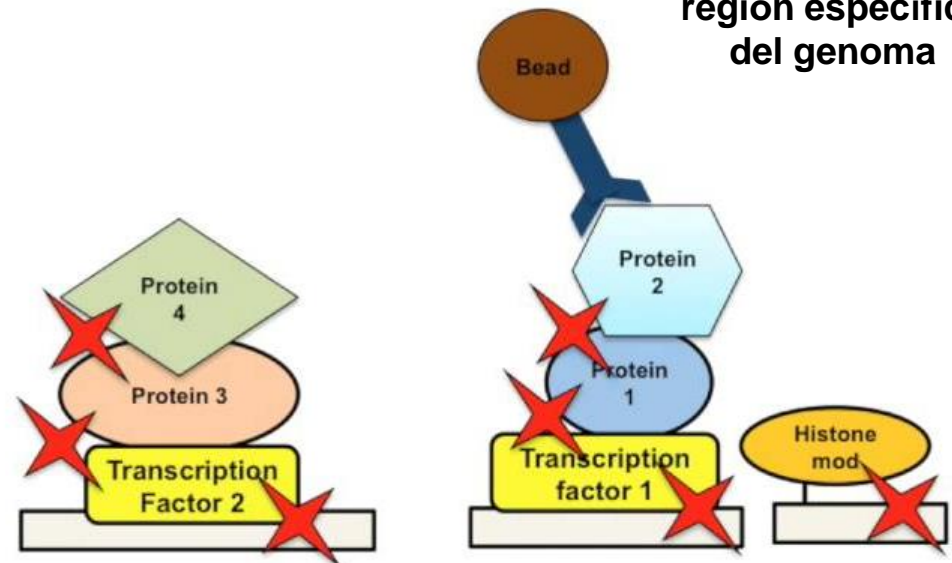
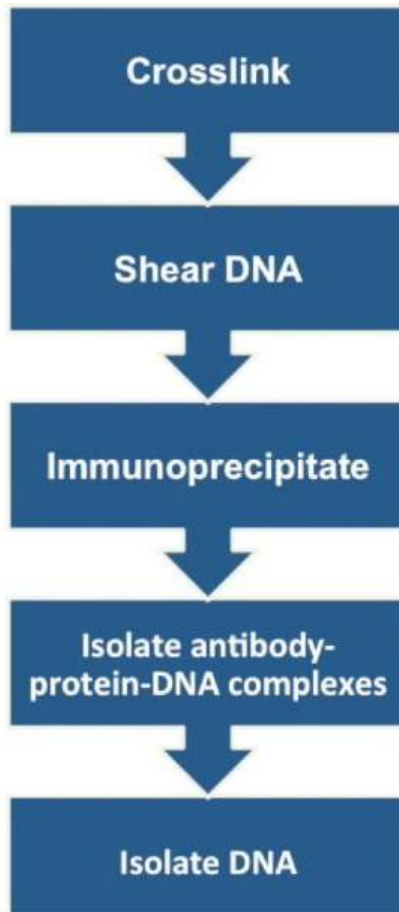
AD = activation domain



Yeast three-hybrid system → RNA-protein interactions

Explicado en: Brent R, Finley RL Jr. (1997). Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. *Annu Rev Genet.* 31:663-704.

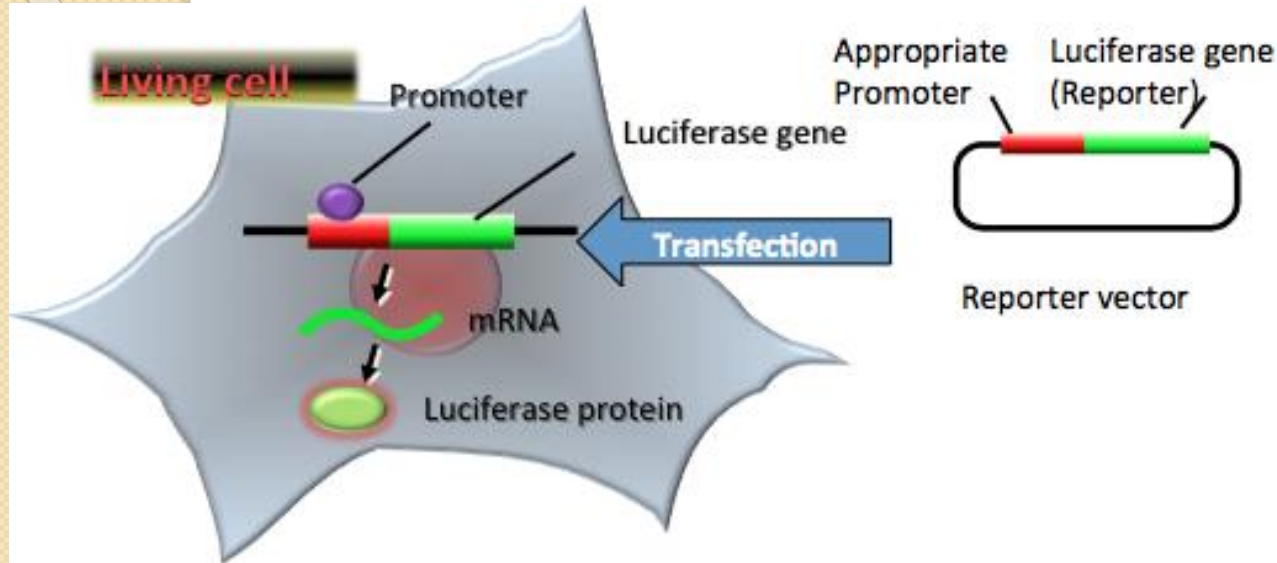
Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)



Permite identificar múltiples proteínas asociadas con una región específica del genoma

Ejemplo de DNase footprinting

Luciferase Reporter Assay



Ejemplo:

