

Ingeniería Genética II

Unidad III

Nuevas tecnologías de secuenciación

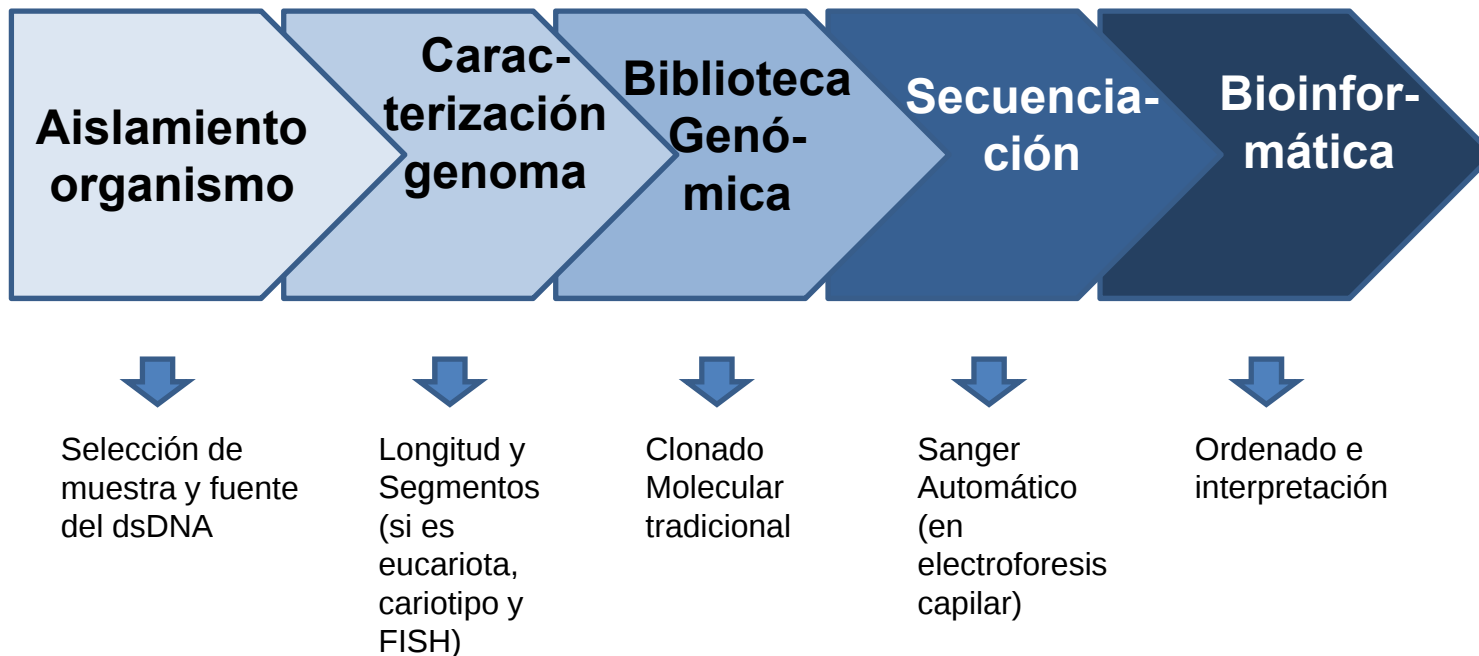
Adquisición de información genómica

- Uno de los **objetivos** primarios de la **Ingeniería Genética** es la necesidad de **conocer información genómica**.
- Todos los **organismos y virus** poseen **material genético** basado en moléculas de **ácidos nucleicos** (dsDNA en los organismos, ssDNA/dsDNA/ssRNA/dsRNA en los virus).
- La **secuencia primaria** contenida en esas moléculas y su posterior **interpretación** es una **f fuente de conocimiento y de potenciales múltiples aplicaciones**.

Adquisición de información genómica

La adquisición de secuencias genómicas suele seguir el siguiente flujo de trabajo...

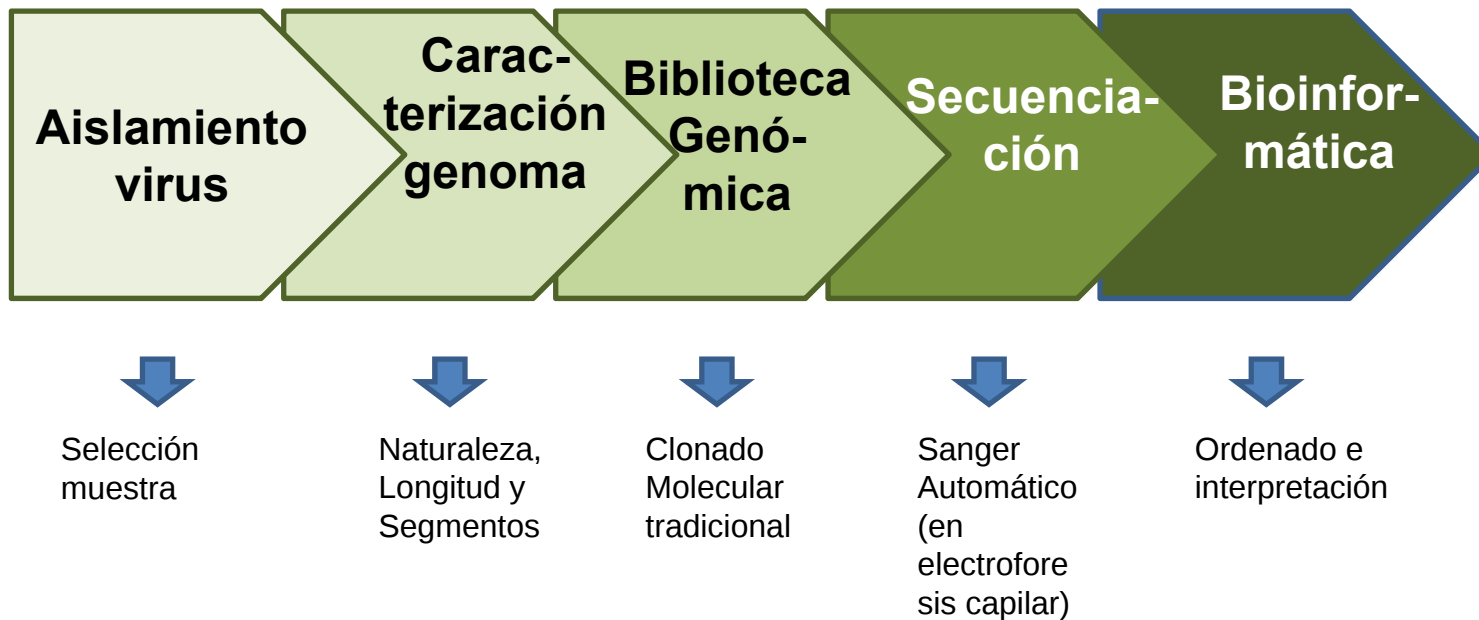
Si es un organismo:



Adquisición de información genómica

La adquisición de secuencias genómicas suele seguir el siguiente flujo de trabajo...

Si es un virus:



Adquisición de información genómica

- La **estrategia** del genoma haploide de la especie humana se denomina **Clone by Clone** e involucra un **alto consumo de tiempo, insumos y recursos humanos**. Está basada en el **método Sanger**, incapaz de leer más de 900-1500 nt por evento de secuenciación.
- Una **adaptación** fue la estrategia **Shot gun** (utilizada para el genoma de un individuo), similar a la anterior pero fragmentando mucho más los genomas o los clones de una biblioteca, sin tantos controles para revelar su calidad y orden.
- La **secuencia resultante** de las estrategias basadas en Sanger da como producto final la **secuencia consenso** (en función de la muestra) **de una especie** de organismos o virus.
- Bajo este escenario se **secuenciaron numerosos genomas**, incluyendo el del ser humano (**HGP**). Este fue concluido en el 2004* (como especie) y en el 2007** se aplicó para un individuo.

*International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 431, 931–945 (2004).

**Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, Huang J, Kirkness EF, Denisov G, Lin Y, MacDonald JR, Pang AW, Shago M, Stockwell TB, Tsiamouri A, Bafna V, Bansal V, Kravitz SA, Busam DA, Beeson KY, McIntosh TC, Remington KA, Abril JF, Gill J, Borman J, Rogers YH, Frazier ME, Scherer SW, Strausberg RL, Venter JC. The diploid genome sequence of an individual human. PLoS Biol. 2007; 5:e254.

Adquisición de información genómica

Artículos sobre la publicación de genomas humanos.



El genoma haploide de la especie humana...

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. **Initial sequencing and analysis of the human genome.** Nature. 2001; 409:860–921.

300 millones de U\$S sólo en secuencia!

Adquisición de información genómica

Artículos sobre la publicación de genomas humanos.



El genoma diploide de un individuo humano...

Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, Huang J, Kirkness EF, Denisov G, Lin Y, MacDonald JR, Pang AW, Shago M, Stockwell TB, Tsiamouri A, Bafna V, Bansal V, Kravitz SA, Busam DA, Beeson KY, McIntosh TC, Remington KA, Abril JF, Gill J, Borman J, Rogers YH, Frazier ME, Scherer SW, Strausberg RL, Venter JC. ***The diploid genome sequence of an individual human.*** PLoS Biol. 2007; 5:e254.

10 millones de U\$S sólo en secuencias

Adquisición de información genómica

- Los **principales limitantes** de la tecnología *Clone by clone* están centrados en el **consumo de recursos** y en que el resultado es un consenso para una especie.

- Esta tecnología transforma en **impracticable la secuenciación de genomas de individuos**, perdiéndose en consecuencia el conocimiento correspondiente a la variabilidad poblacional de las especies (detección de SNPs* –*Single Nucleotide Polymorphisms*; SNVs* –*Single Nucleotide Variants*-, Indels o DIPs –inserciones o deleciones <1000 pb, *Deletion Insertion Polymorphisms*-, variantes estructurales –inserciones o deleciones >1000 pb). .
- Esta situación estimuló a la comunidad científica a **innovar** sobre este objetivo primario de la biología actual.

* SNPs vs SNVs depende de la frecuencia de ocurrencia

Adquisición de información genómica

El estímulo comienza con financiación...



by Maria Anderson

NEWS ANALYSIS

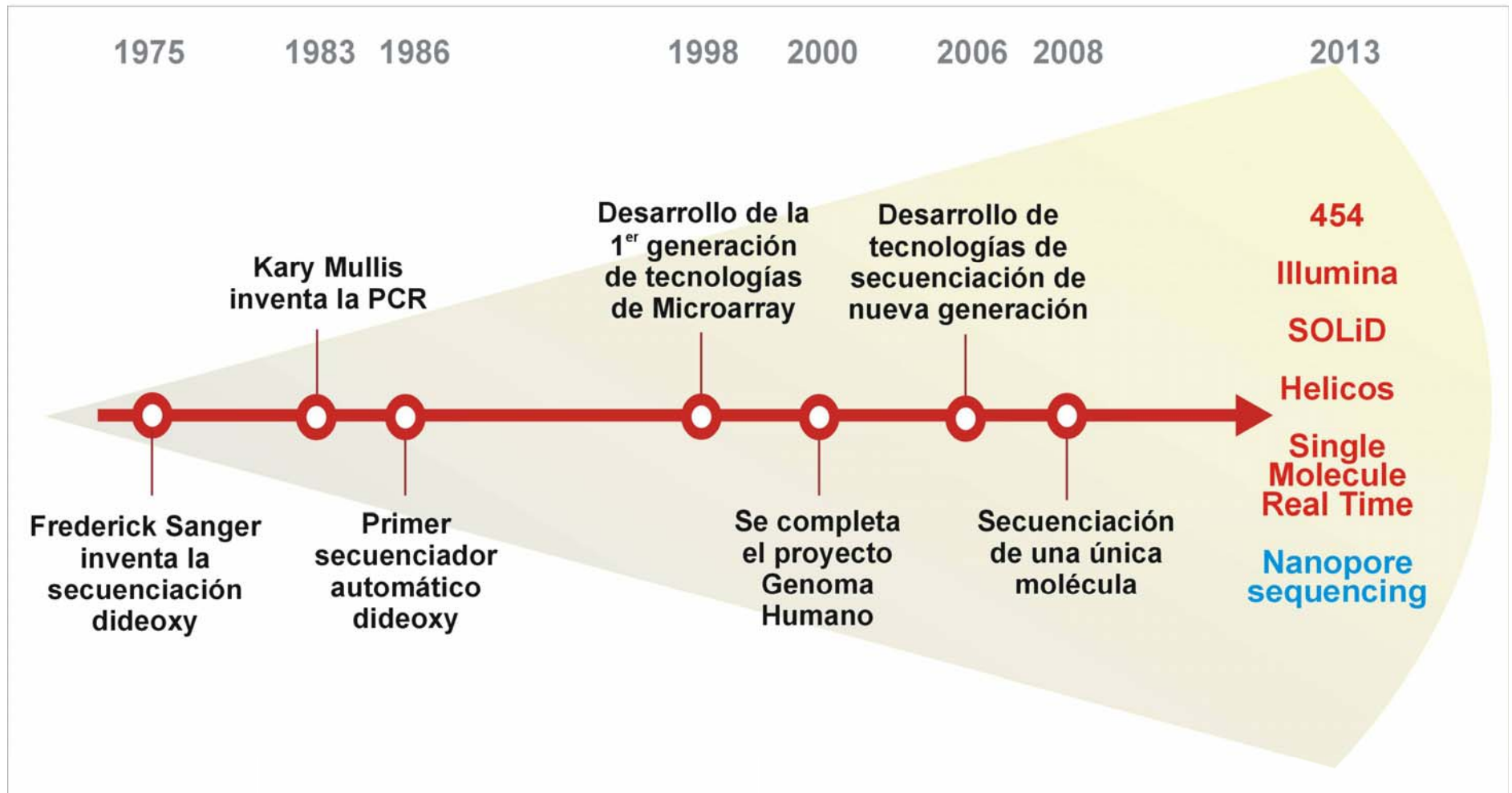
NIH offers \$1000 genome grant

Email: Maria Anderson - manderson@the-scientist.com
ews from The Scientist 2004, 5(1):20040223-05

Published 23 February 2004

The National Institutes of Health (NIH) is now soliciting proposals for funding to work toward the much-vaunted \$1000 genome. Earlier this month (February 12), the NIH published a request for applications (RFA) for grants to develop low-cost genome-sequencing technologies.

Adquisición de información genómica



Adquisición de información genómica

Next Generation Sequencing

- Los nuevos métodos que surgieron se denominan en su conjunto **tecnologías NGS** (*Next Generation Sequencing*) y son adecuadas para la realización de **WGS** (*Whole Genome Sequencing*), tanto *de novo* como resecuenciamiento.
- Las tecnologías **NGS** han revolucionado las ciencias biológicas **disminuyendo** dramáticamente el **consumo de recursos** (dinero, insumos, personal, tiempo) y posibilitando **secuenciar genomas de individuos**.
- Incluso, las tecnologías **NGS** permiten **secuenciar genomas** de entidades biológicas **sin** necesidad de su **previo aislamiento**, y **también** adquirir información genómica de **restos fósiles**.

Adquisición de información genómica

Next Generation Sequencing

- Las tecnologías **NGS** son del tipo **Shot gun**, dado que las lecturas de secuencias se realizan sobre fragmentos pequeños y si un orden pre-establecido.
- En general, las **lecturas** de las tecnologías **NGS** son **más cortas** que las logradas por el método de **Sanger** (50-500 nt vs 900-1500 nt).
- Existen varias **tecnologías NGS** comercialmente disponibles, tales como:

Tecnologías
de 2^{da}
generación

- **Roche GS-FLX 454 Genome Sequencer** (originalmente 454 *sequencing*).
- **Illumina Genome Analyzer** (originalmente Solexa *technology*).
- **ABI SOLiD analyzer**.
- **Ion Torrent**

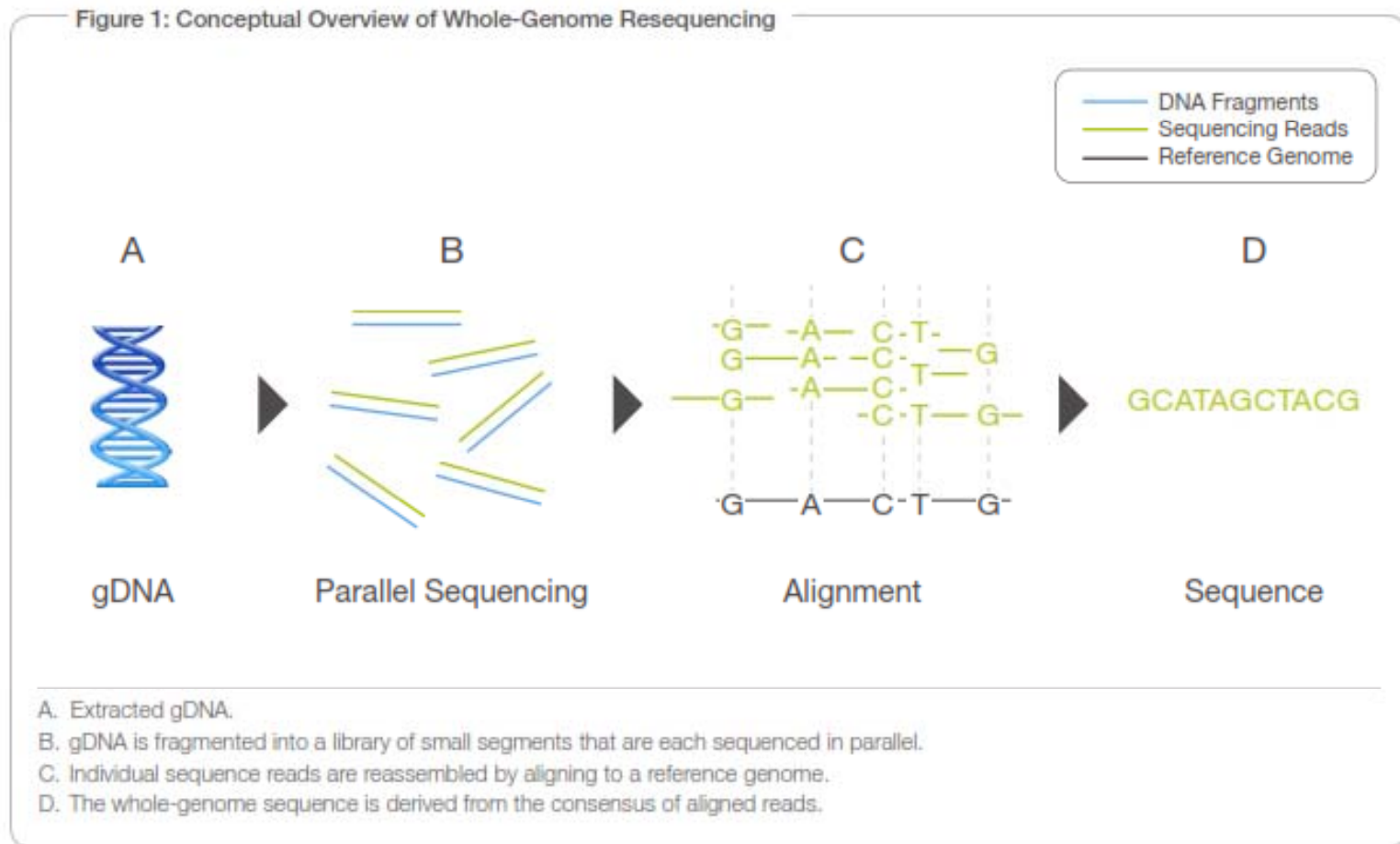
- **Polonator G.007**
- **Helicos HeliScope platforms**

Tecnologías
de 3^{ra}
generación

→ **SMRT seq**
(Single Molecule Real
Time sequencing)

Adquisición de información genómica

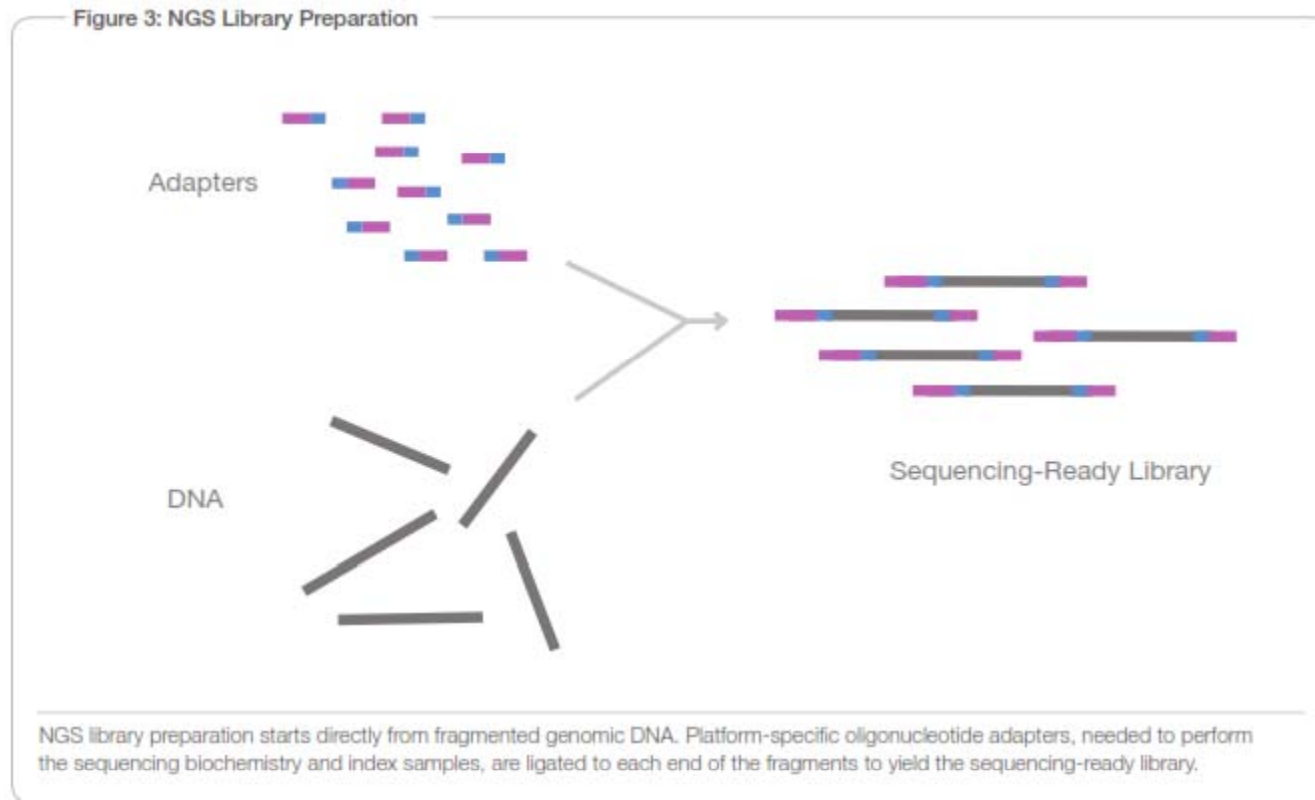
Next Generation Sequencing



Adquisición de información genómica

Next Generation Sequencing

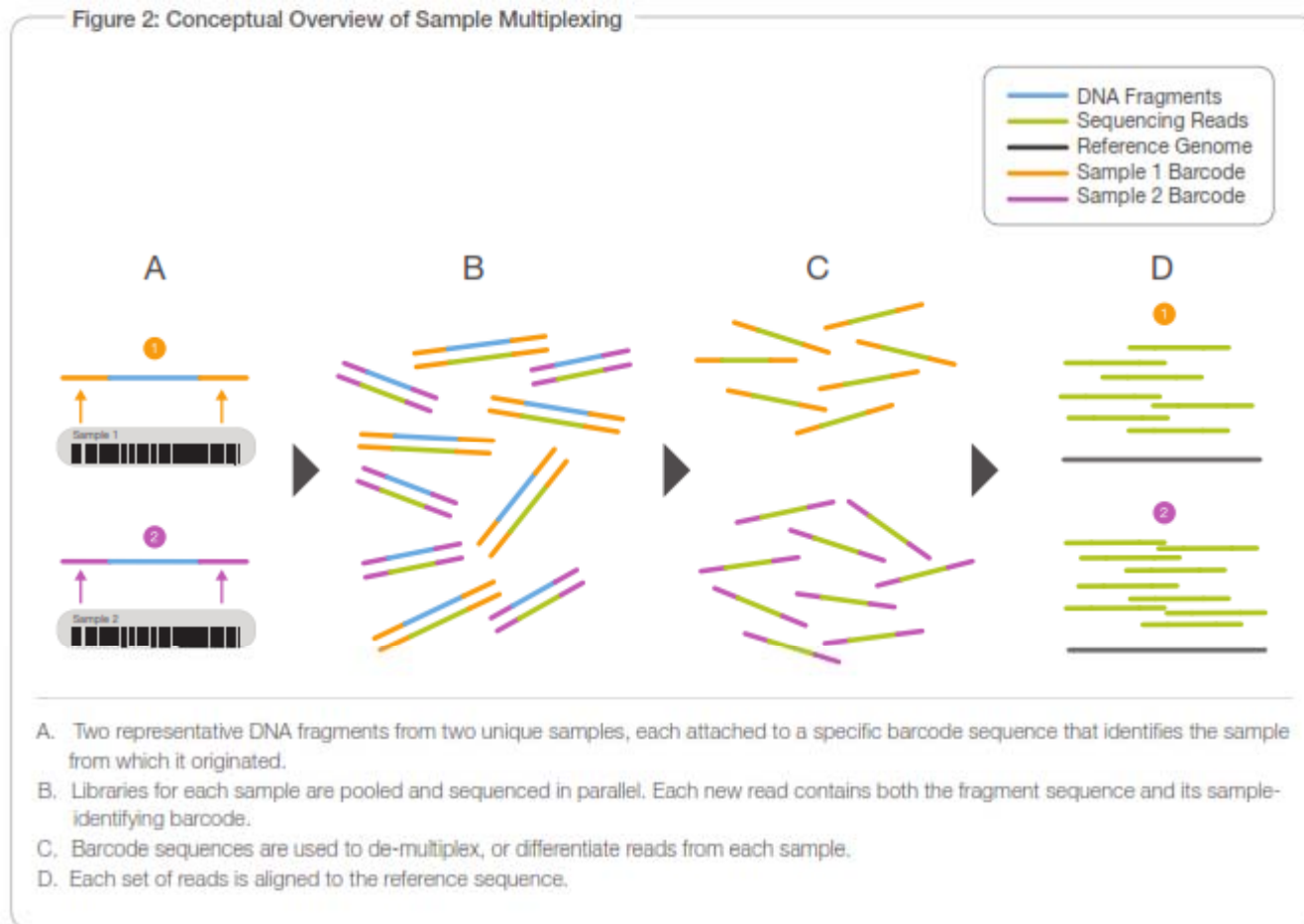
Estas **estrategias** también se basan en la generación de una **biblioteca**, pero *in vitro*.



Adquisición de información genómica

Next Generation Sequencing

Y también, permiten secuenciar varios genomas al mismo tiempo.



Descripción de los métodos más utilizados clasificados dentro de las tecnologías NGS

Tecnología 454

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

- La **tecnología 454** está basada en **pirosecuenciación** y es comercializada por la empresa Roche (<http://www.454.com/>).
- La **pirosecuenciación** fue desarrollada por **Mustafá Ronaghi*** e involucra la lectura de información nucleotídica a partir de síntesis enzimática.
- La **tecnología 454** fue la **primera NGS** en estar comercialmente disponible. Fue la primera de estas tecnologías aplicada para secuenciar el genoma de un individuo humano (James Watson)**.

*Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., and Nyren, P. 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* **242**: 84

**Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*. 2008; 452:872–876.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454



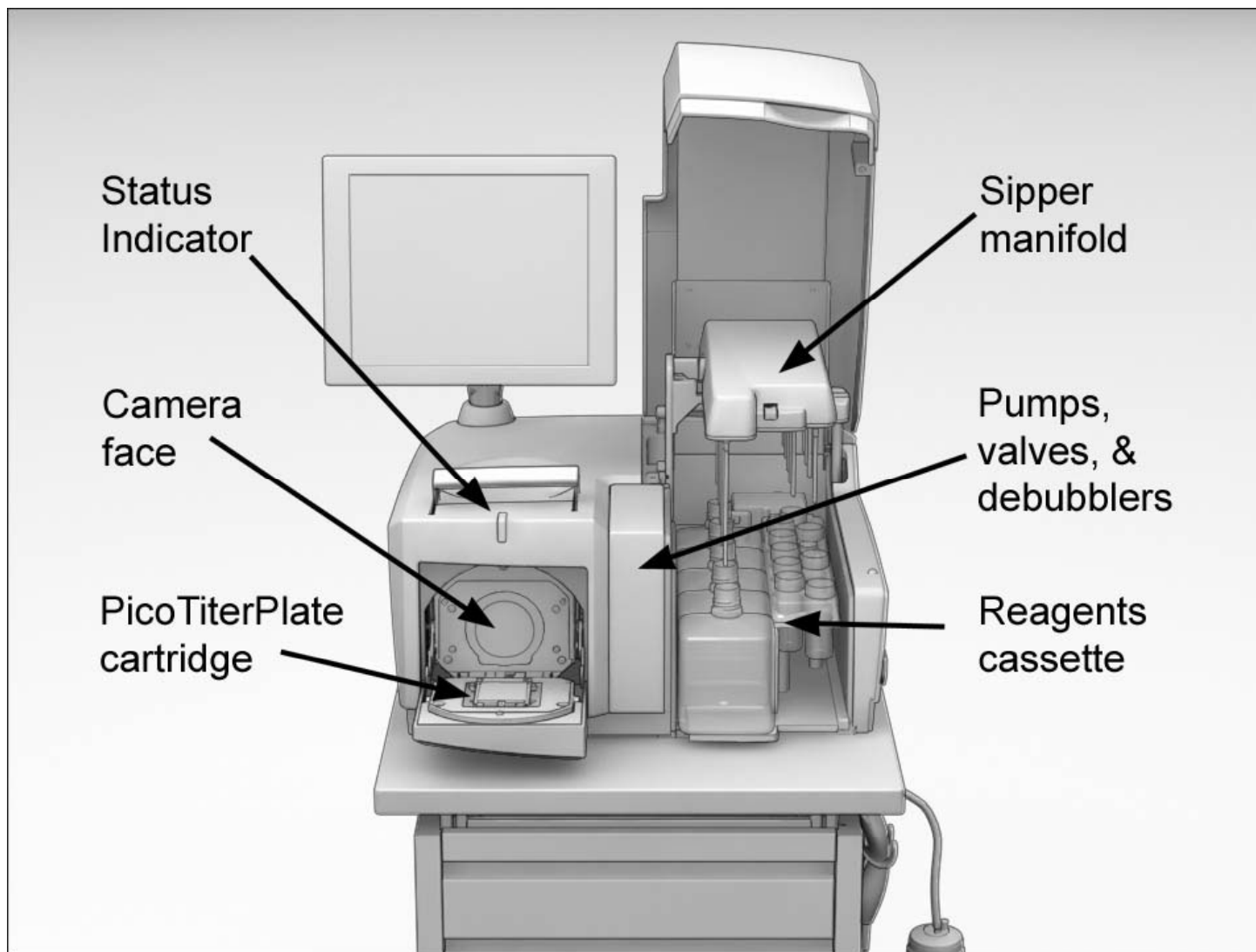
GS FL System



GS Junior System

Adquisición de información genómica

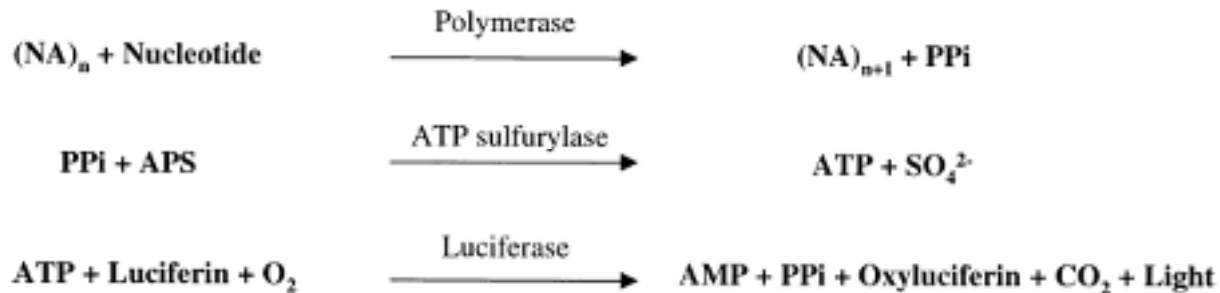
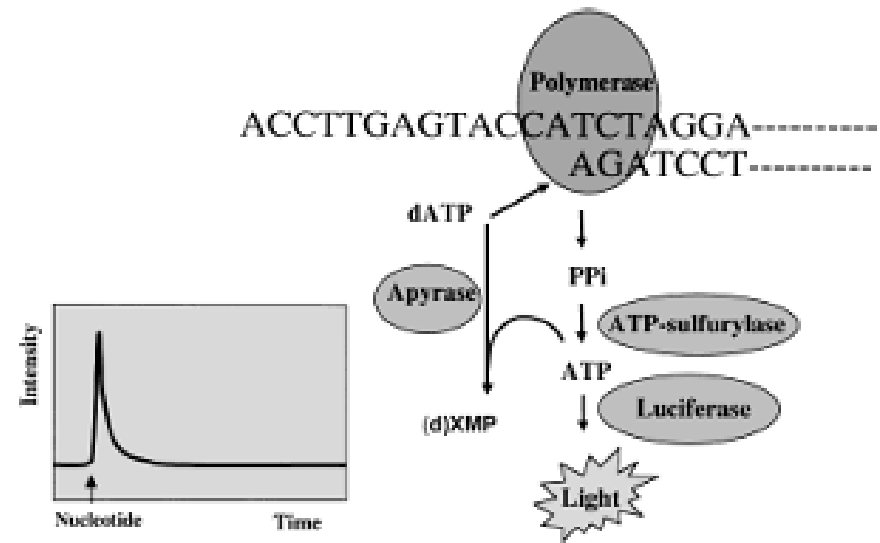
NGS: tecnología 454



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

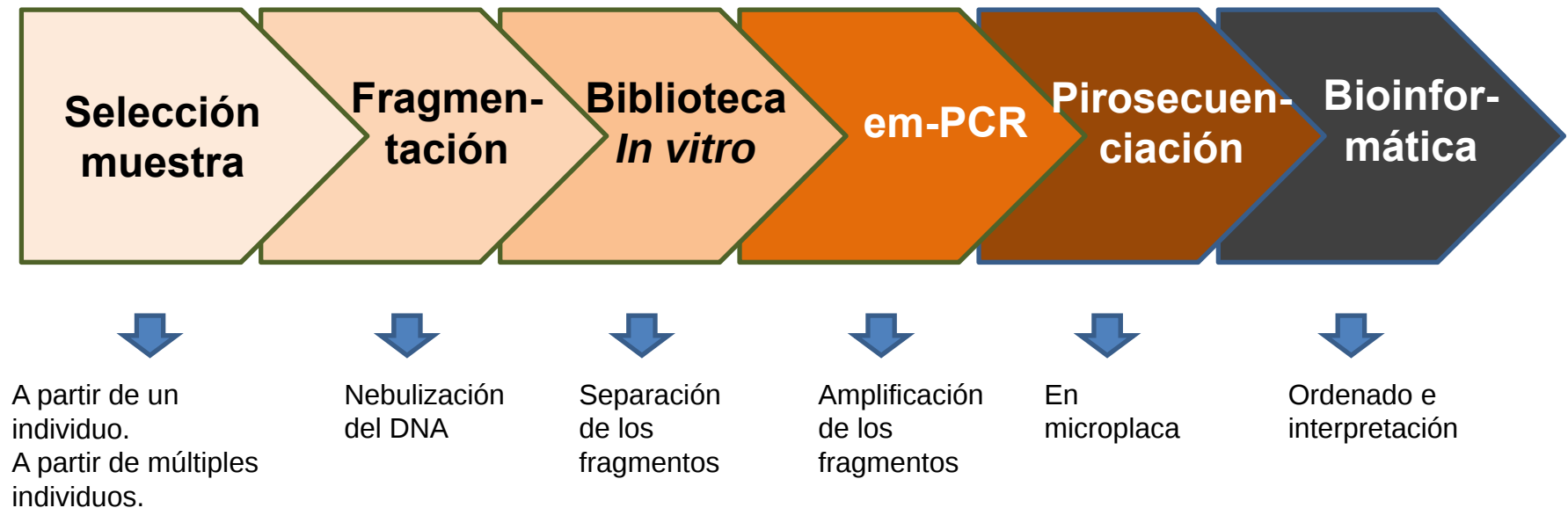
Pirosecuenciación



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

Etapas involucradas en la tecnología 454



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

Etapas involucradas en la tecnología 454



Selección muestra

La **muestra** original debe ser mayor a **500 ng** de DNA y derivar de uno o más individuos de una especie.

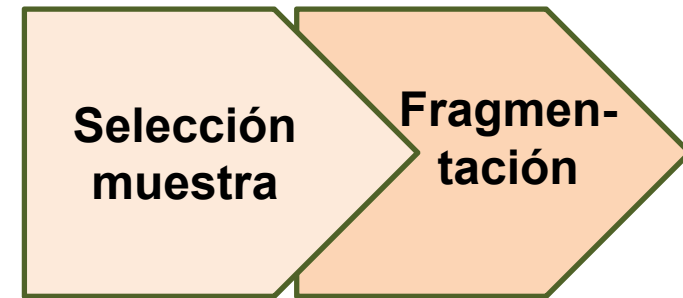


A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

Etapas involucradas en la tecnología 454



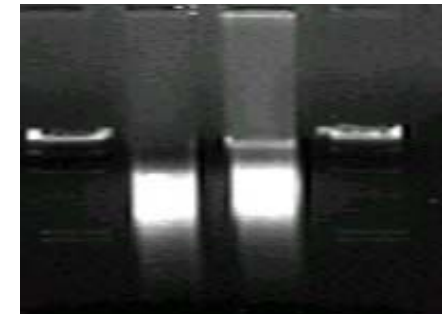
↓

A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

↓

Nebulización del DNA

Realizada mediante nebulización de la solución de DNA en fragmentos de 400-800 pb

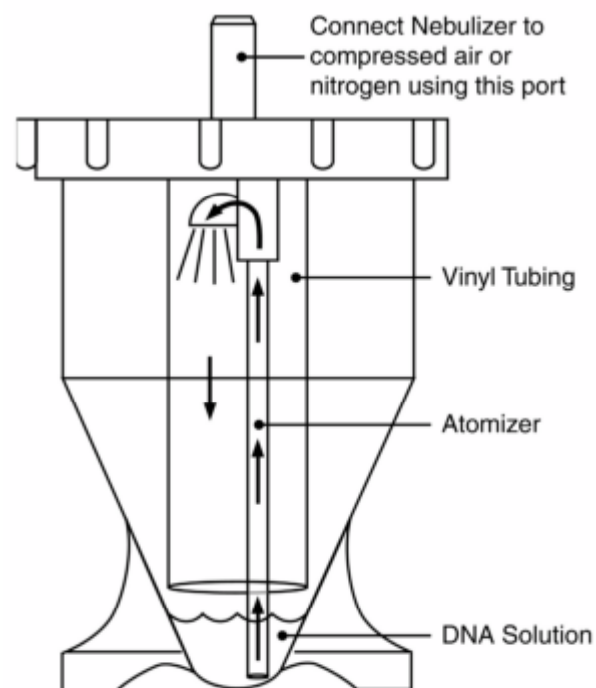


Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454



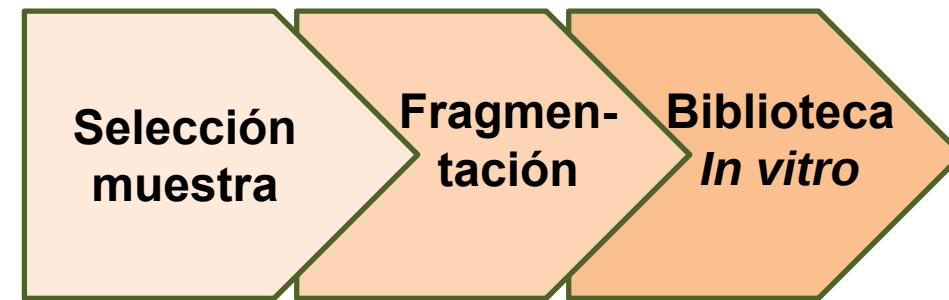
Nebulizador de DNA



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

Etapas involucradas en la tecnología 454



↓

A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

↓

Nebulización del DNA

↓

Separación de los fragmentos

Los fragmentos de **dsDNA** son **modificados** en sus extremos mediante la ligación de **adaptadores**, y luego separados entre sí para formar una colección de **ssDNAs unidos a microesferas**.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

- El **dsDNA fragmentado** de la muestra es **unido** a **dos adaptadores (A y B, este último biotinilado)**. Los adaptadores están desfosforilados para evitar ligación entre ellos.
- El dsDNA con los adaptadores es **luego** tratado con **PNK** y **DNA ligasa** (reparación de *nicks*).
- **Después**, el dsDNA es tratado con **T4 DNA Polimerasa**, **Klenow** y **PNK** (para transformar los extremos en romos).
- **Posteriormente**, el **dsDNA biotinilado** es **capturado** con **microesferas** con **avidina**.
- **A partir de las microesferas**, se liberan los **ssDNA** **flanqueados** por oligonucleótidos **A** y **B** derivados de los adaptadores.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

Ejemplo de secuencia de los adaptadores...

MID-1 Adaptor A:

```
5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTGCGT-3'  Ti-MID1-A
      3' -AGAGGCTGAGTCTGCTCACGCA-5'  Ti-MID1-Aprime
```

MID Adaptor B (Common):

```
5' Biotin-TEG-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG-3'  Ti-MID-B
      3' - ACCGTCAGAGTC-5'  Ti-MID-Bprime
```

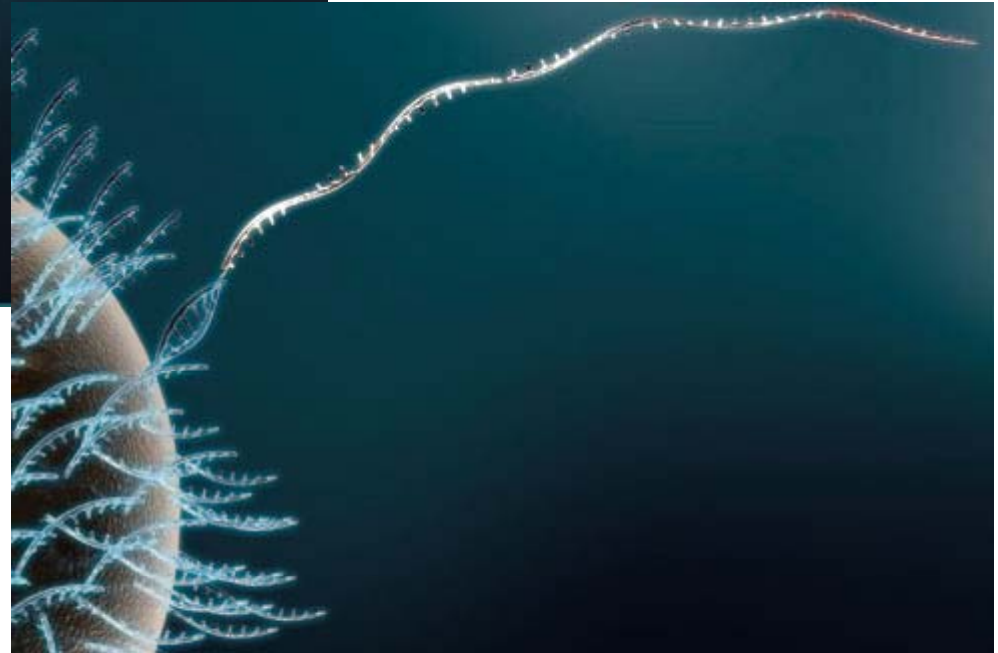
- Phosphorothioate-modified bases are not shown in this figure for ease of sequence alignment
- Sequencing Key is indicated in GREEN. 10 bp MID sequence is shown in YELLOW.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454



Fragmentos de dsDNA
modificados en sus
extremos

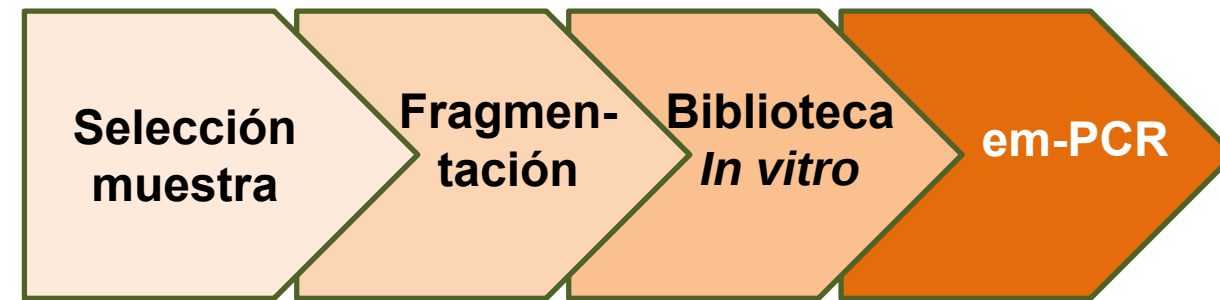


Colección de ssDNA aislados

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

Etapas involucradas en la tecnología 454



↓

A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

↓

Nebulización del DNA

↓

Separación de los fragmentos

↓

Amplificación de los fragmentos

Los **ssDNA** aislados son **multiplicados** mediante **PCR en emulsión** y retenidos en microesferas.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

Los **ssDNA** flanqueados por los oligonucleótidos **A** y **B** son **capturados** por **microesferas** conteniendo **oligonucleótido anti-B**. Luego, son **emulsionados** en una mezcla de **solución acuosa** (mix de PCR) y **aceite**. Finalmente, se realiza un **ciclado térmico** para multiplicar los DNA contenidos en cada microesfera.



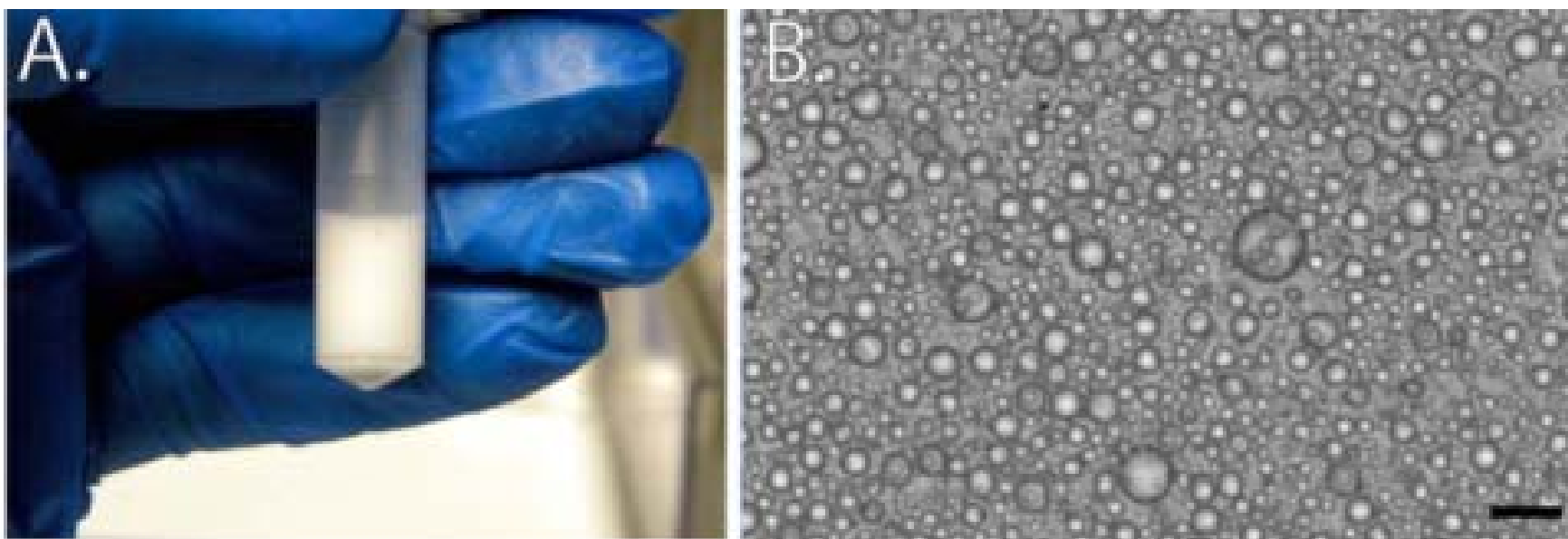
PCR en emulsión



Adquisición de información genómica

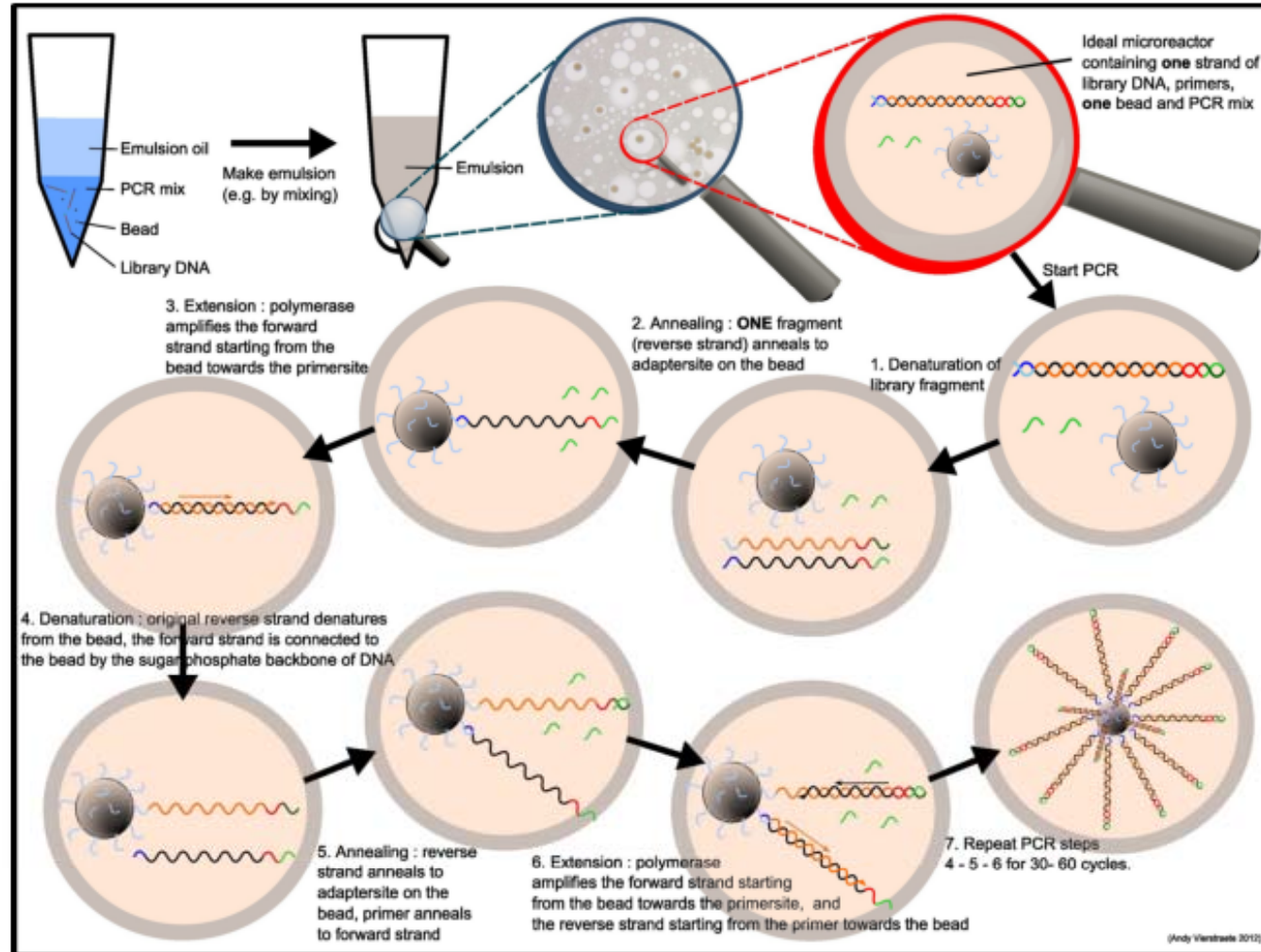
NGS: tecnología 454

Apariencia de una emulsión para PCR.



Adquisición de información genómica

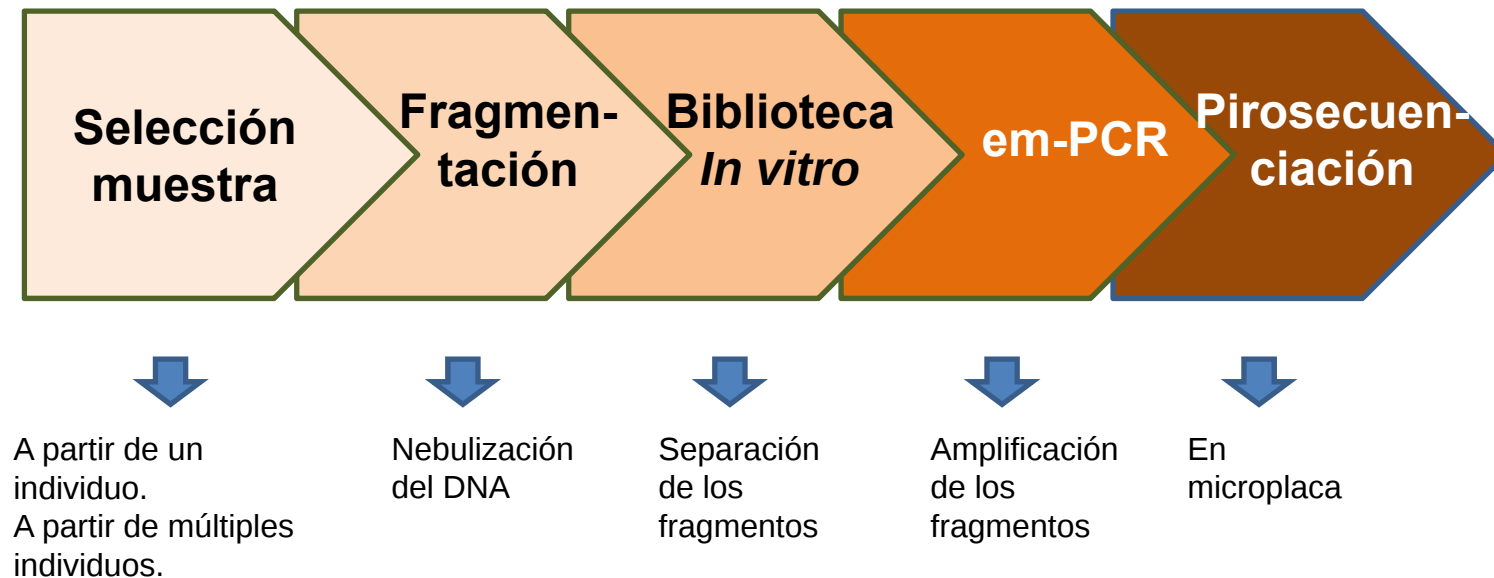
NGS: tecnología 454



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

Etapas involucradas en la tecnología 454



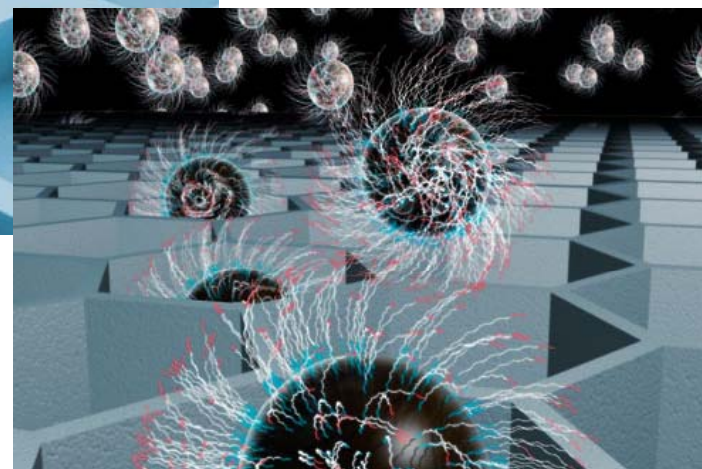
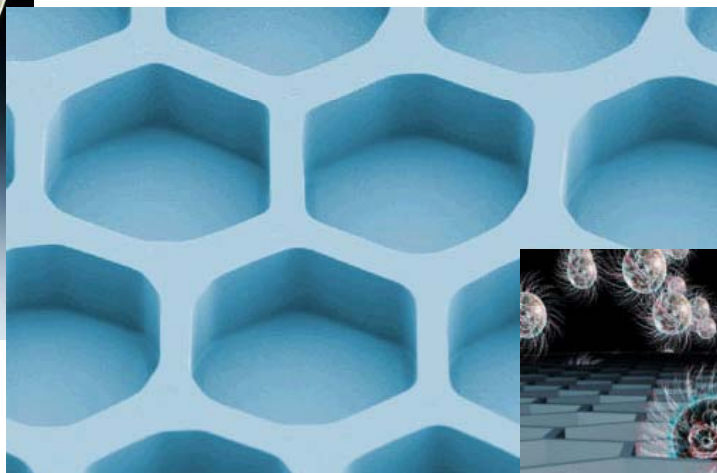
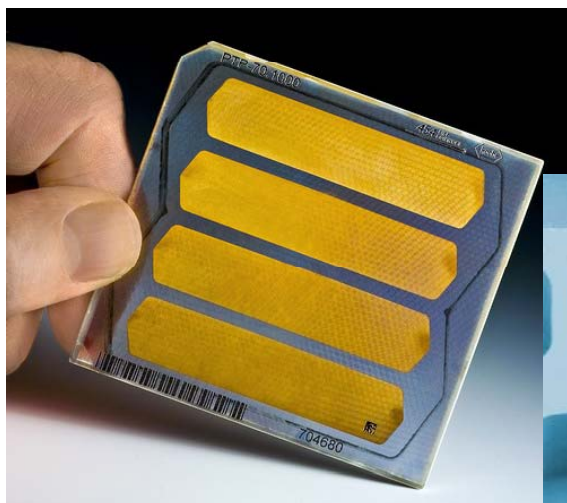
Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

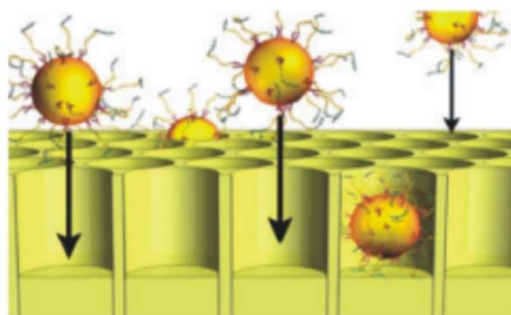
- Las **microesferas** conteniendo los **productos de PCR** son **tratados** con **solución alcalina** para que queden sólo los **ssDNA** a ser secuenciados.
- Luego, las **microesferas** se disponen en una **microplaca** para proceder a la pirosecuenciación.
- En la **microplaca**, se **agregan microesferas** más pequeñas con las enzimas ***Sulfurilasa*** y ***Luciferasa***.
- Luego, se agregan de a **pulsos mezcla de síntesis** (DNA polimerasa, 1 dNTP, APS, luciferina).
- Si el **nucleótido** es **incorporado**, se **produce P_{Pi}**, lo cual derivará en la posterior producción de ATP, oxiluciferina y **luz**.
- Para continuar, se “**limpia**” cada reacción con la enzima **Apirasa** y se repite el ciclo.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454



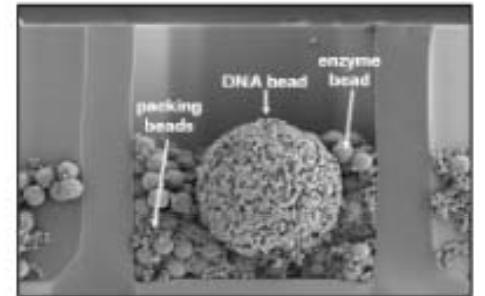
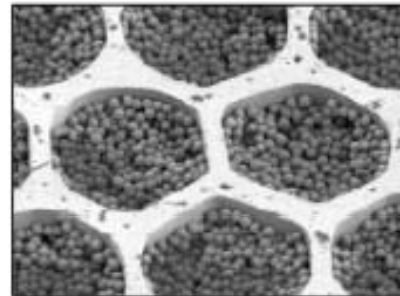
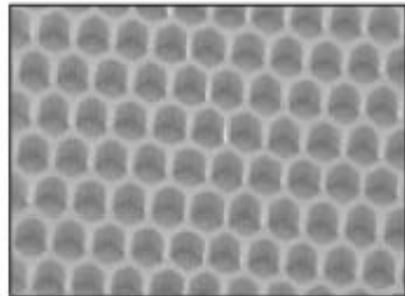
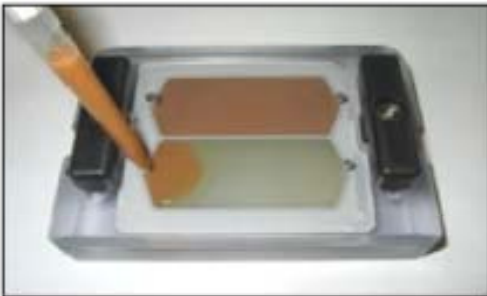
**Microplacas donde se disponen las
microesferas**



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454

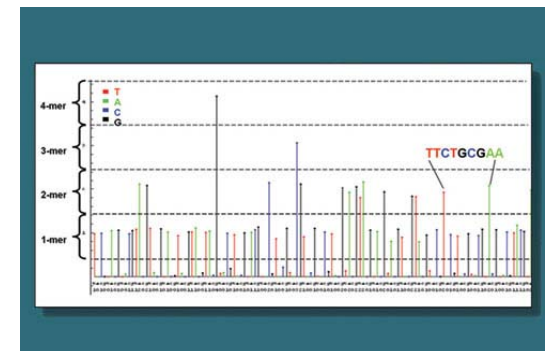
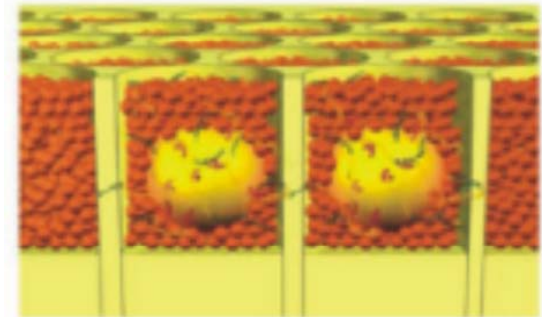
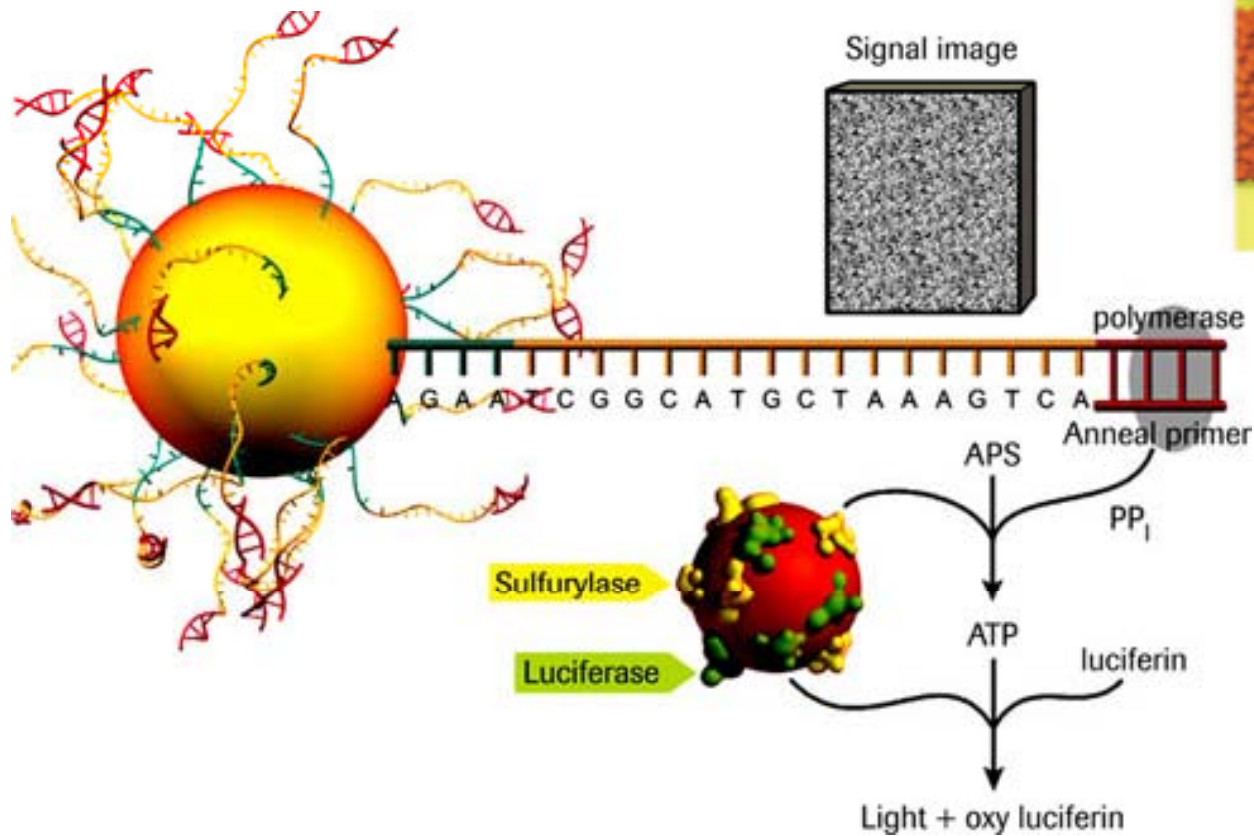
Detalle de las celdas de la microplaca conteniendo las microesferas.



Adquisición de información genómica

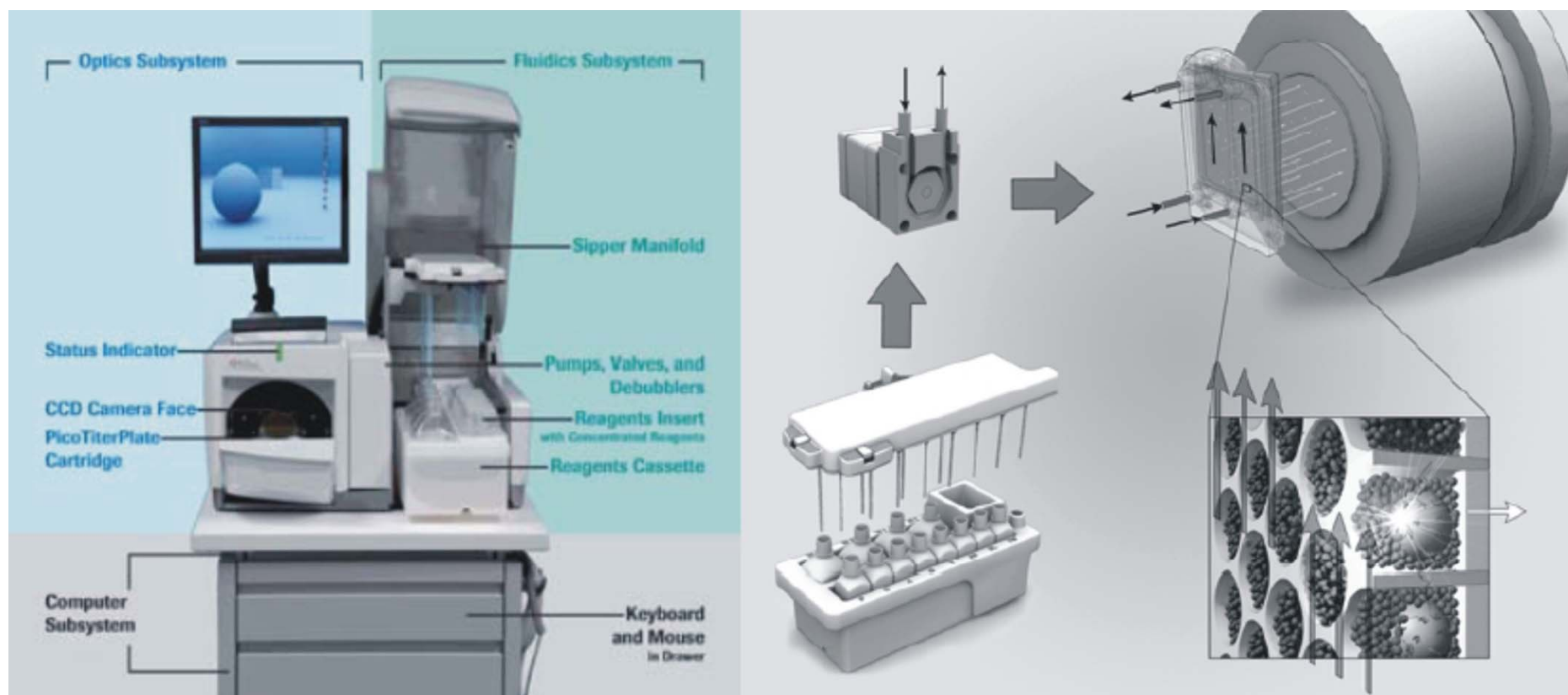
NGS: tecnología 454

Reacción de secuenciación



Adquisición de información genómica

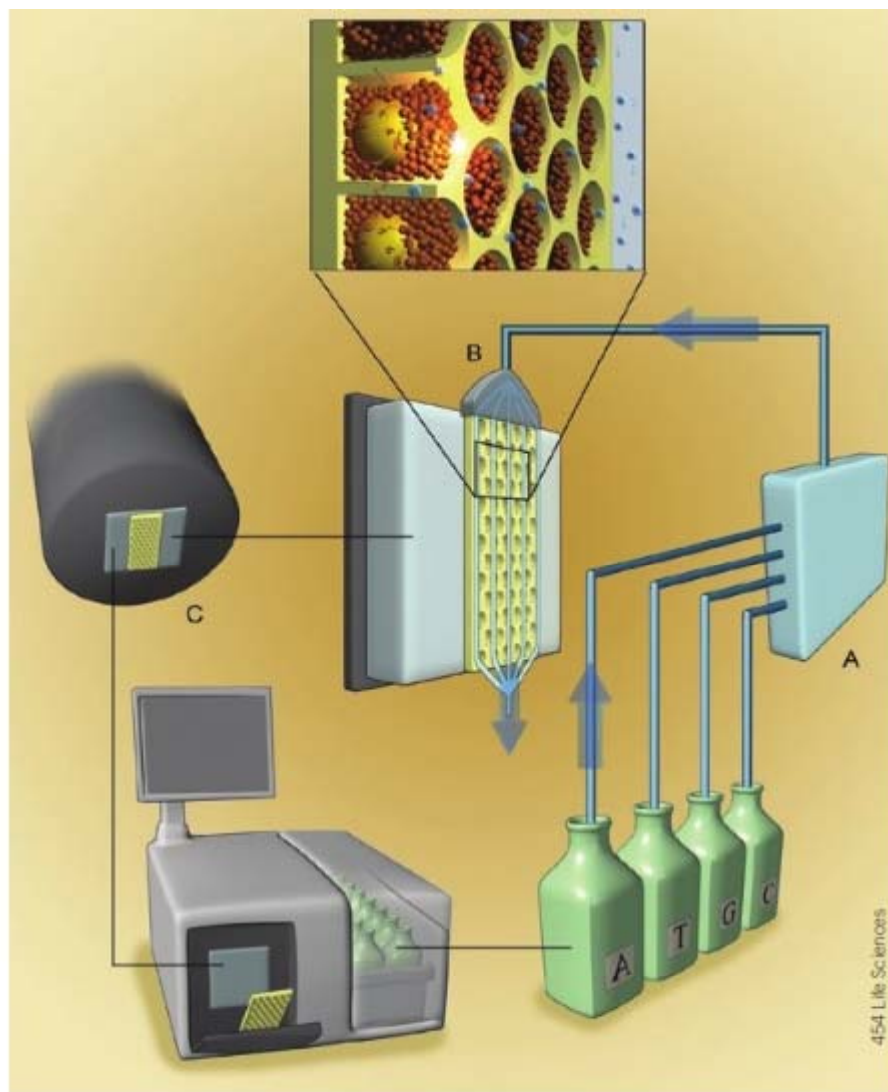
NGS: tecnología 454



Equipamiento por dentro

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología 454



Equipamiento por dentro

Descripción de los métodos más utilizados clasificados dentro de las tecnologías NGS

Tecnología *Illumina*

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

- La **tecnología Illumina** fue desarrollada por **Solexa**, compañía que fue adquirida por la primera en 2007.
- Este procedimiento de secuenciación se basa en ***reversible terminator chemistry****, involucrando síntesis de DNA.
- Los **terminadores** de síntesis son *39-O-azidometil 29-deoxinucleosido trifosfatos* (A, C, G y T) marcados con **fluoróforos distintos y reversibles**.
- Las **secuencias** se determinan sobre ***clusters*** de moléculas, semejantes a colonias bacterianas (**polonias**).

*Bentley, David R.; et al. (6 November 2008). "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry". *Nature* **456** (7218): 53–59.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

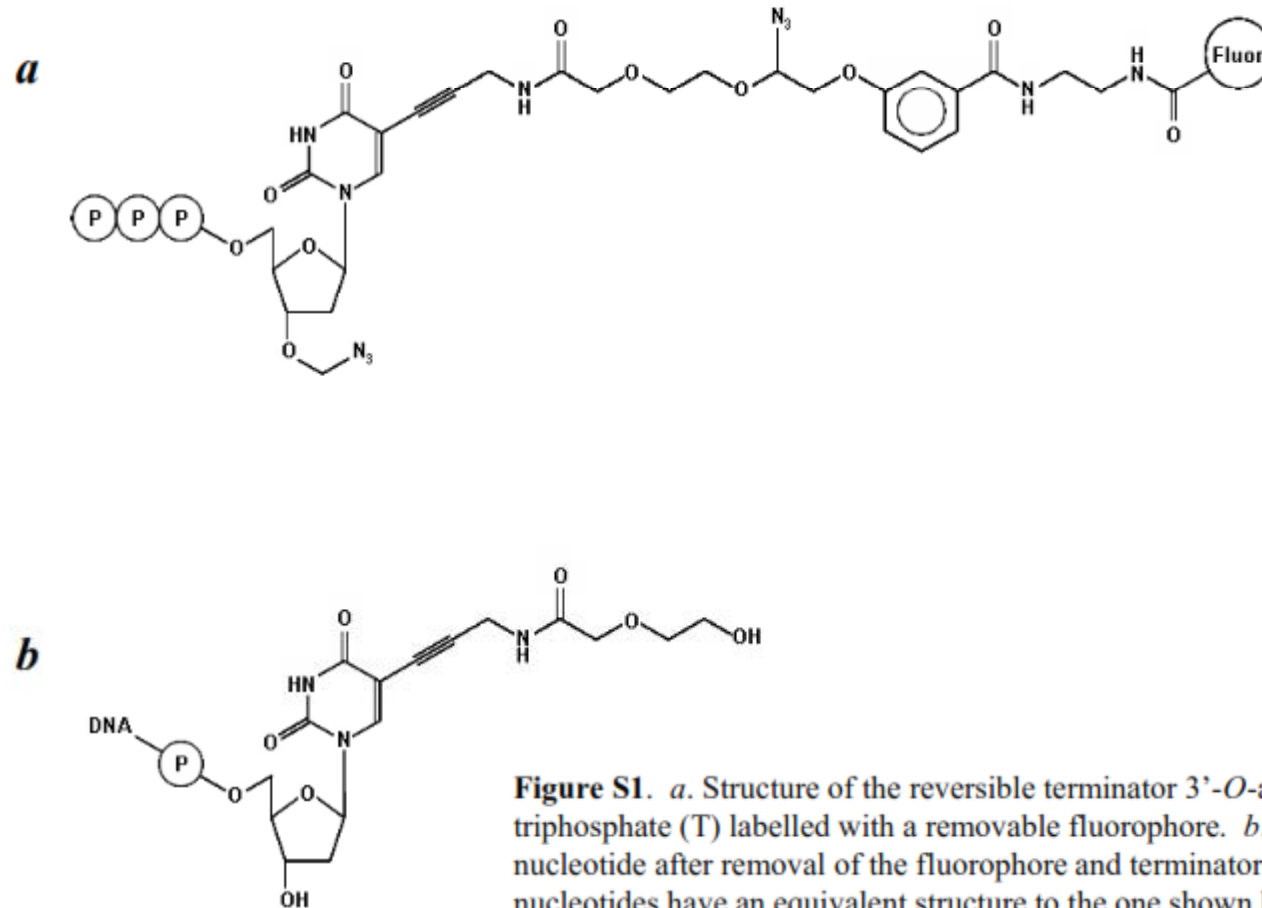


Figure S1. *a.* Structure of the reversible terminator 3'-*O*-azidomethyl 2'-deoxythymine triphosphate (T) labelled with a removable fluorophore. *b.* Structure of the incorporated nucleotide after removal of the fluorophore and terminator group. Each of the four nucleotides have an equivalent structure to the one shown here, except for the different base and a corresponding base-specific fluor.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

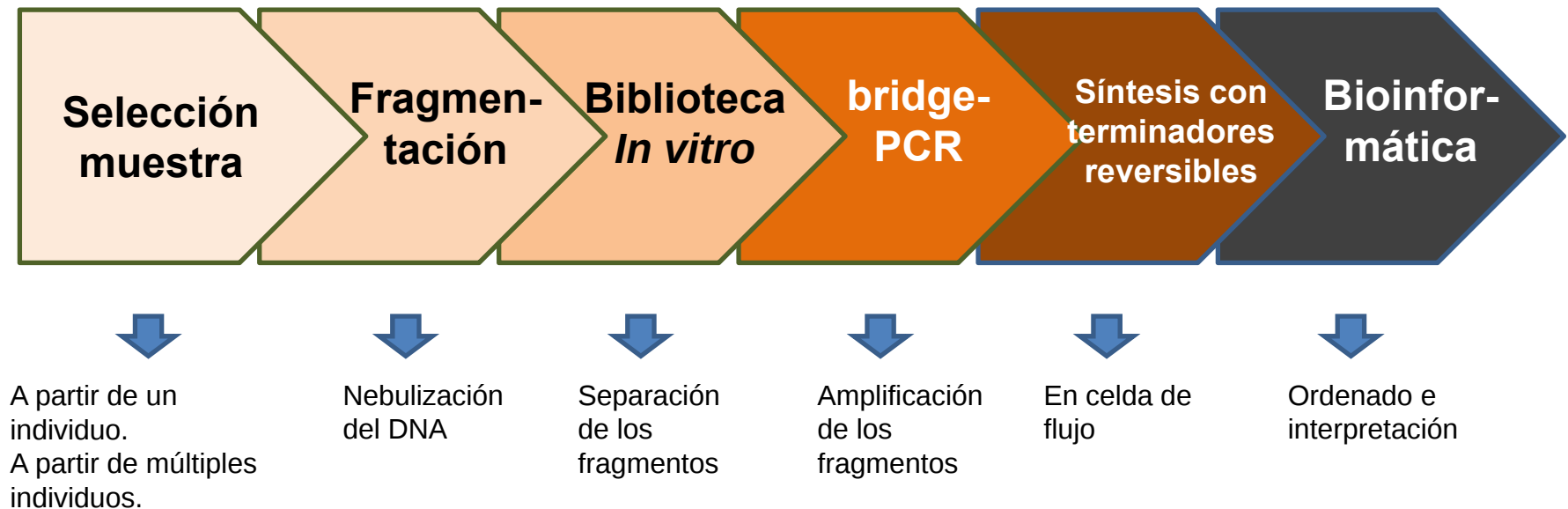


Equipamiento que utiliza el sistema de terminadores reversibles de cadena sintetizada

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

Etapas involucradas en la tecnología Illumina



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

Etapas involucradas en la tecnología Illumina



Selección muestra

La **muestra** original debe ser mayor a **50 ng** de DNA y derivar de uno o más individuos de una especie.

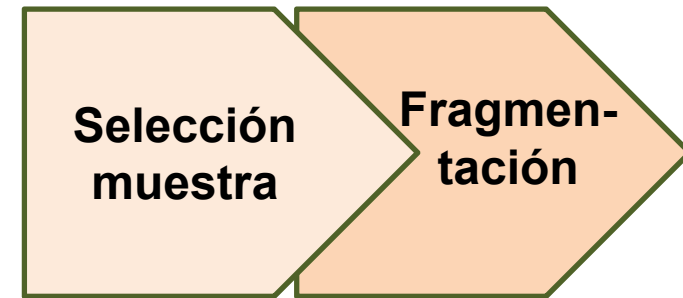


A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

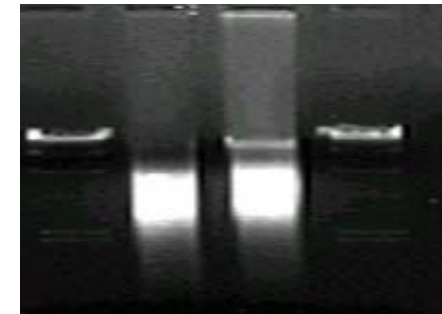
Etapas involucradas en la tecnología Illumina



A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

Nebulización del DNA

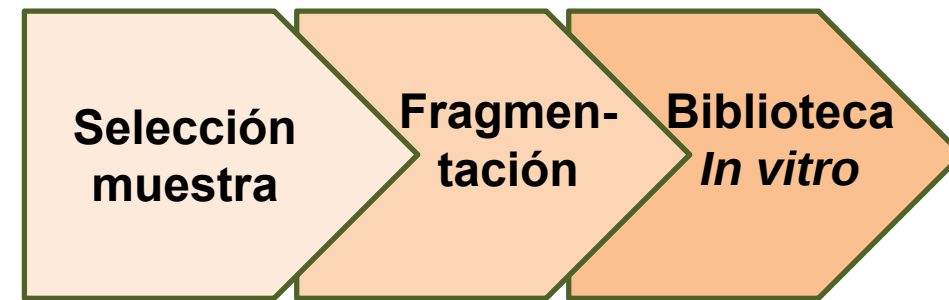
Realizada mediante **nebulización** de la solución de DNA en fragmentos de 200-400 pb



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

Etapas involucradas en la tecnología Illumina



↓

A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

↓

Nebulización del DNA

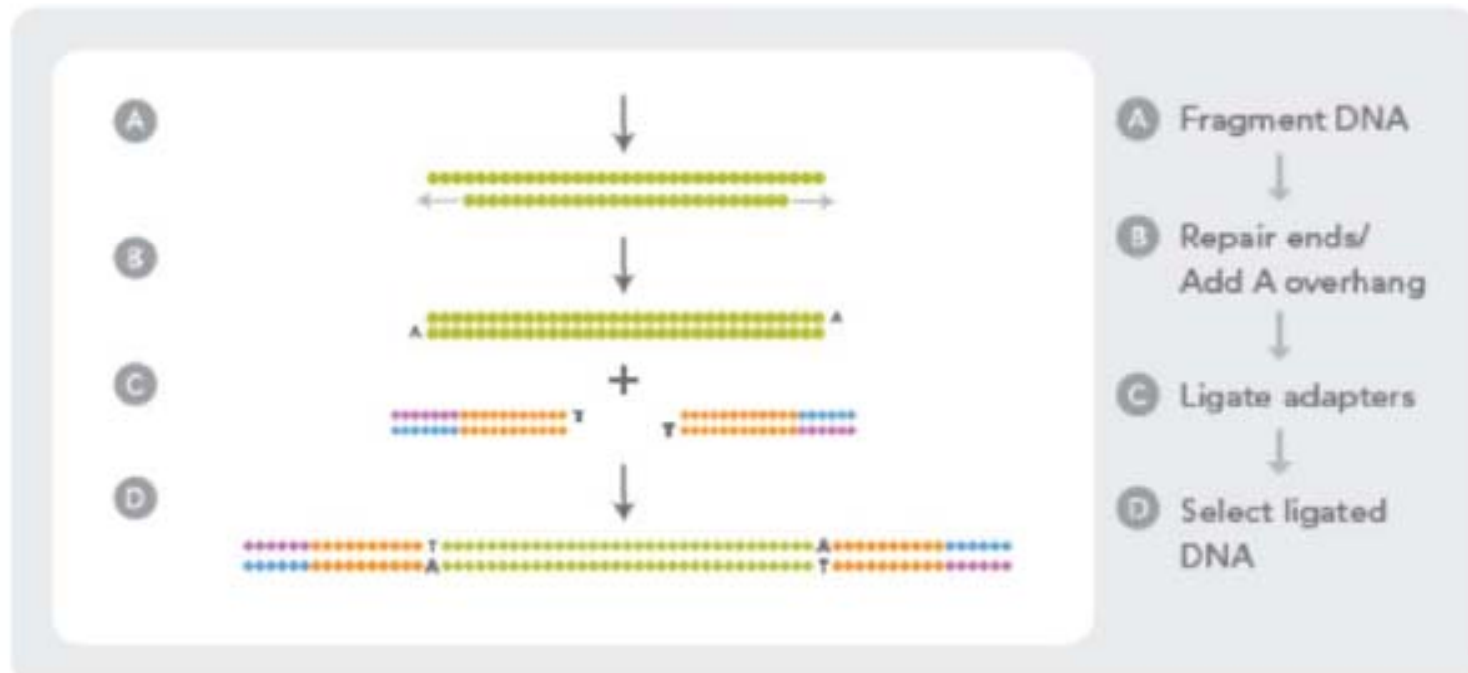
↓

Separación de los fragmentos

Los fragmentos de **dsDNA** son **modificados** en sus extremos mediante la **ligación de adaptadores**, y luego separados entre sí para formar una colección de ssDNAs unidos a una celda de flujo.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

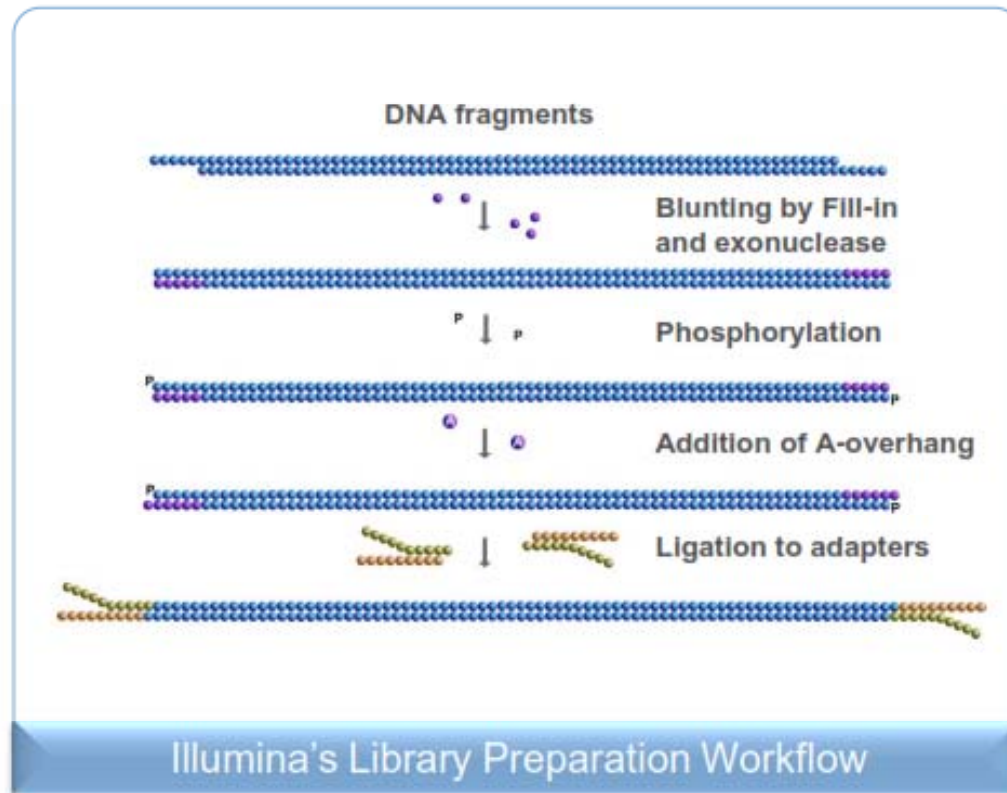


Procedimiento de reparación de extremos y ligación de adaptadores.

La mezcla de reparación contiene *T4 DNA polimerasa*, *Klenow* y *Polinucleótido quinasa (PNK)*. La introducción de Aes 3' extendidas se realiza con *Klenow*.

Adquisición de información genómica

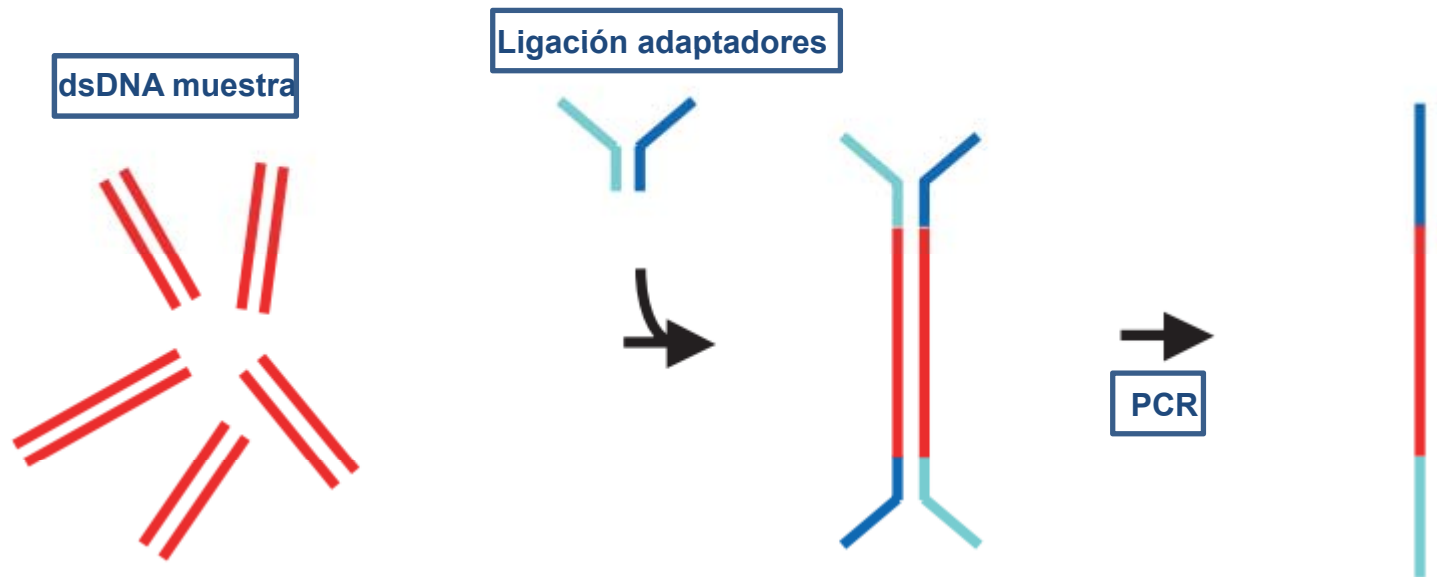
NGS: tecnología Illumina



Los **adaptadores** poseen **secuencias no complementarias** en los **extremos**.
Luego de esto puede realizarse una PCR (6-18 ciclos) con *primers* que hibridan en los adaptadores. Esto permite la secuenciación posterior de cada una de las cadenas.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

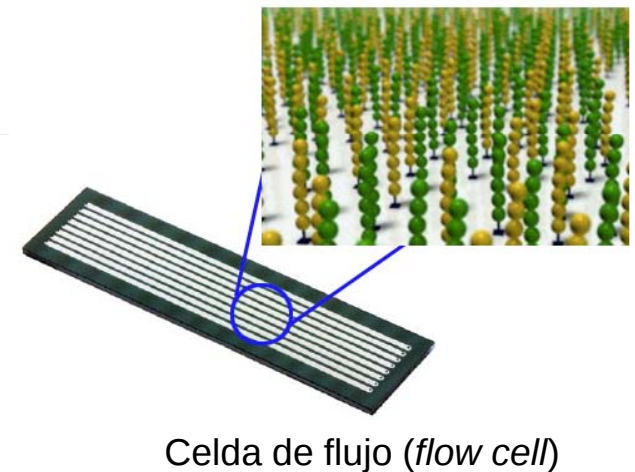
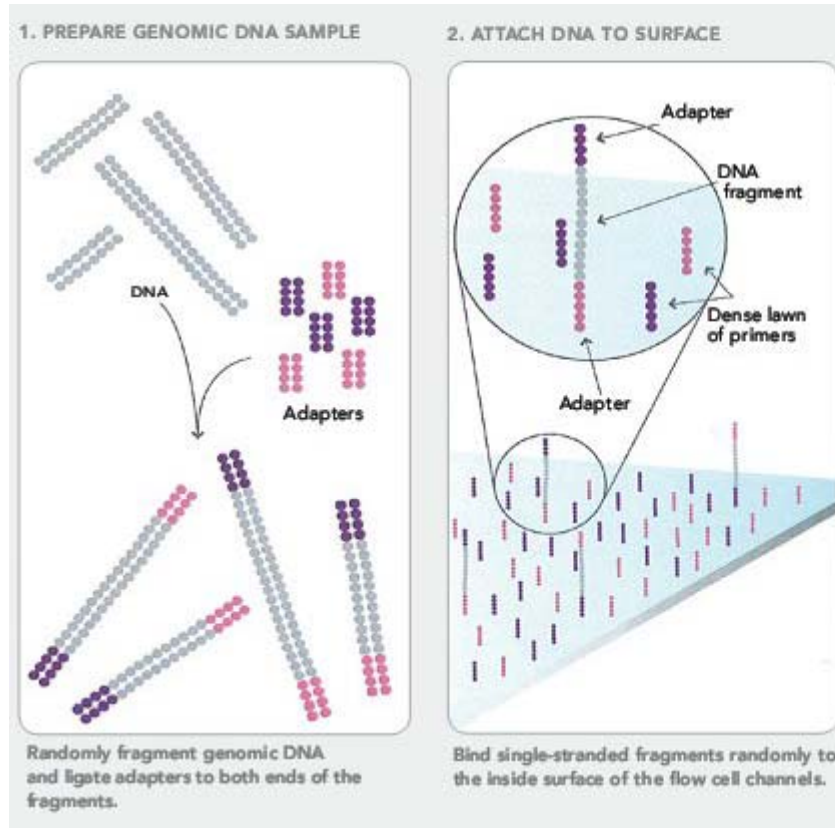


Resumen de los pasos involucrados en la preparación de la colección de fragmentos con las modificaciones en sus extremos.

Todos los fragmentos amplificados quedan con secuencias diferenciales en los extremos.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

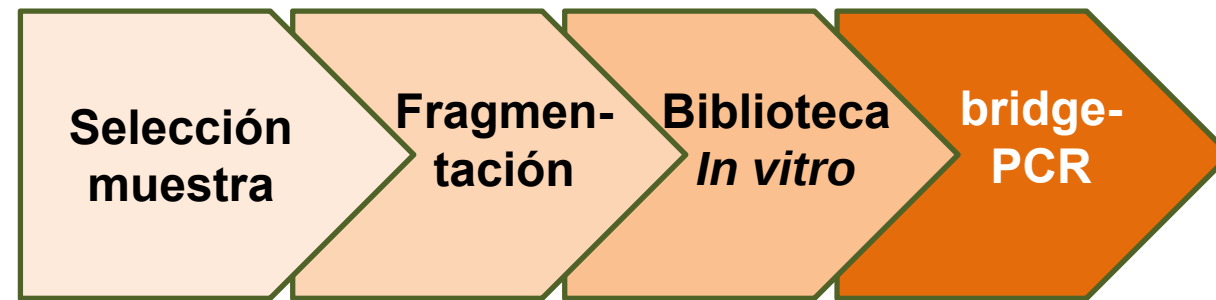


Los **dsDNA** se **desnaturalizan e hibridan en una celda**. Primero se realiza un tratamiento alcalino, luego dilución en solución salina –SSC 5X más Tween 20- y finalmente se agregan a la celda de flujo a alta temperatura (96°C). Posteriormente, la temperatura se reduce lentamente hasta 40°C para favorecer el *annealing* con oligonucleótidos complementarios a los adaptadores que se encuentran inmovilizados en una celda.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

Se realiza una amplificación tipo *solid-phase bridge* o *bridge-PCR*

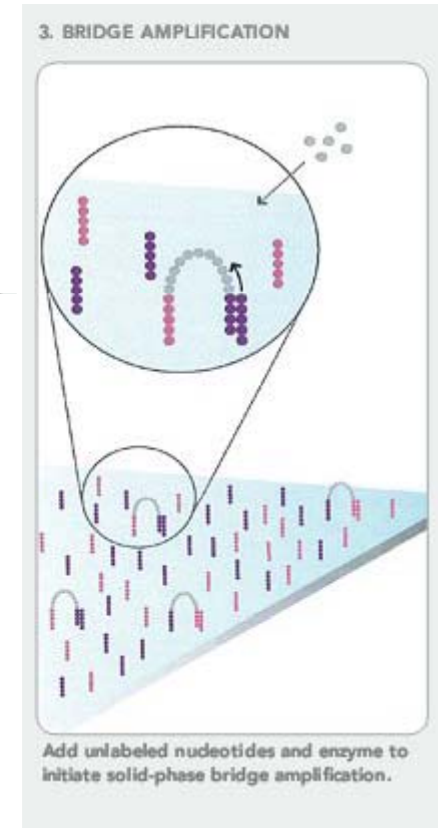


↓
A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

↓
Nebulización del DNA

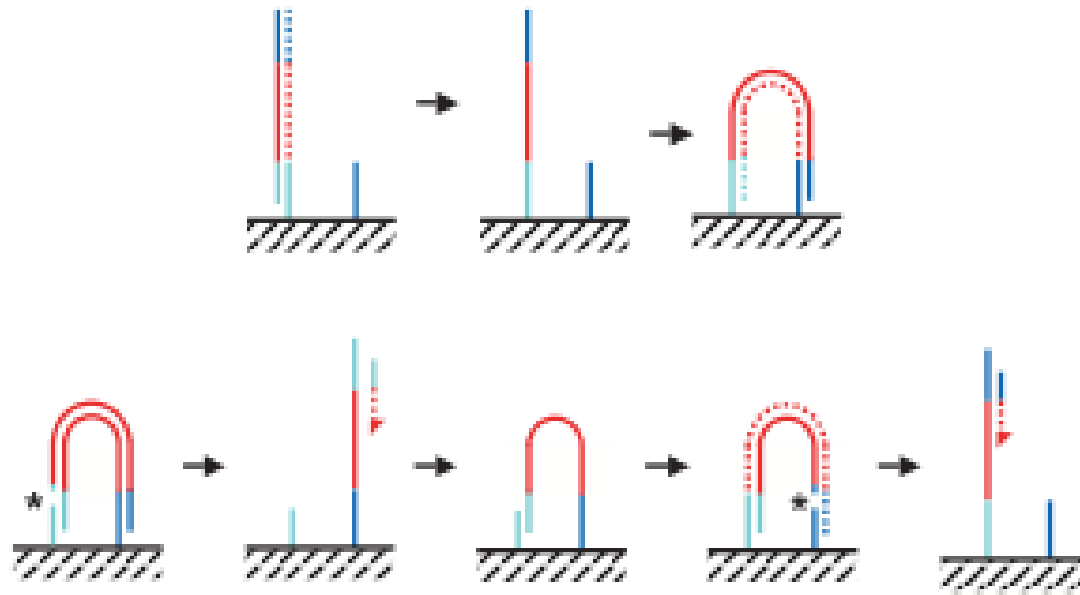
↓
Separación de los fragmentos

↓
Amplificación de los fragmentos



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

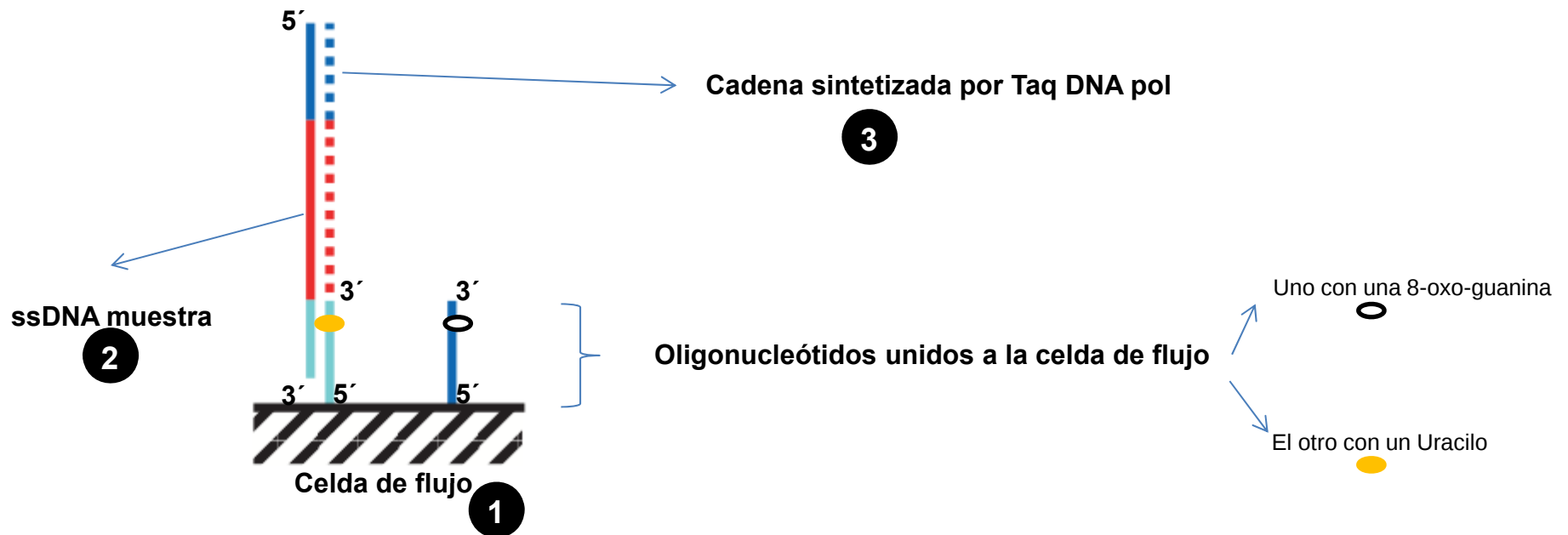


Bridge-PCR

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

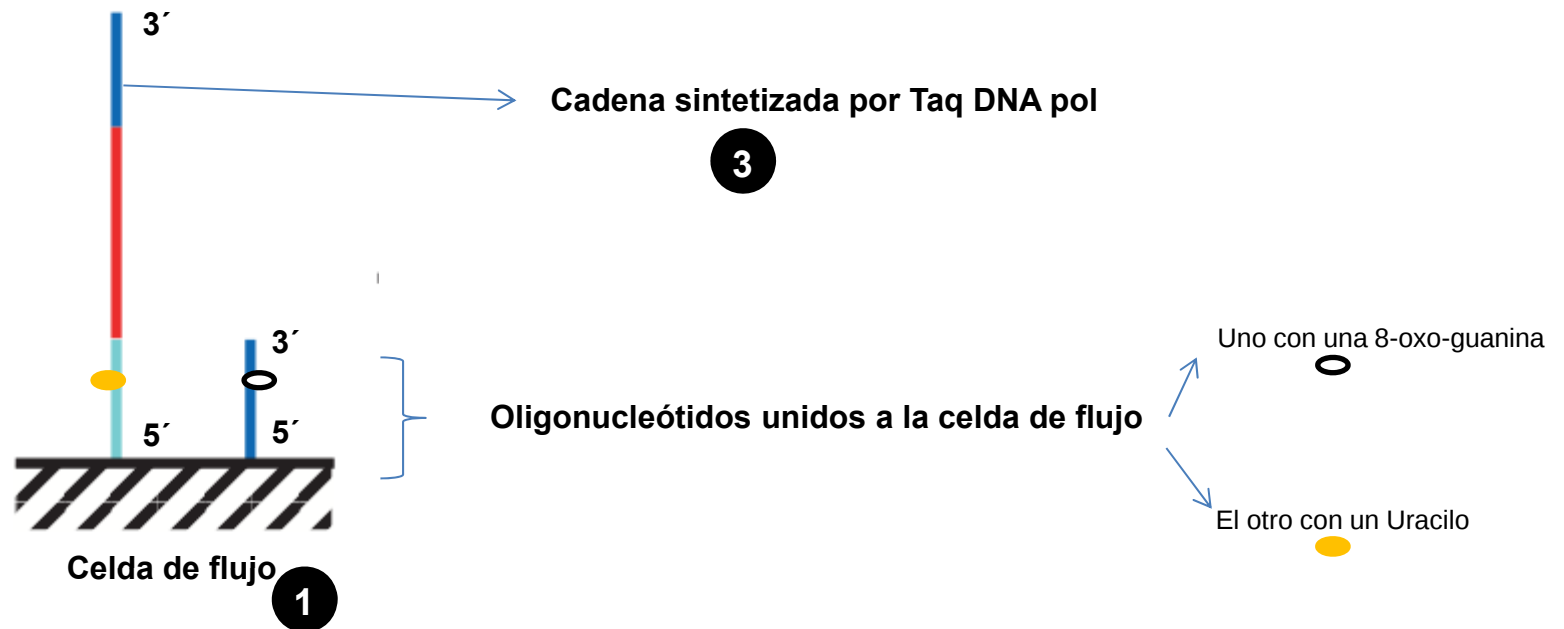
- Los **ssDNA** derivados de la muestra e hibridados a los oligonucleótidos complementarios presentes en la celda son **extendidos** mediante el uso de **TaqDNA pol.**



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

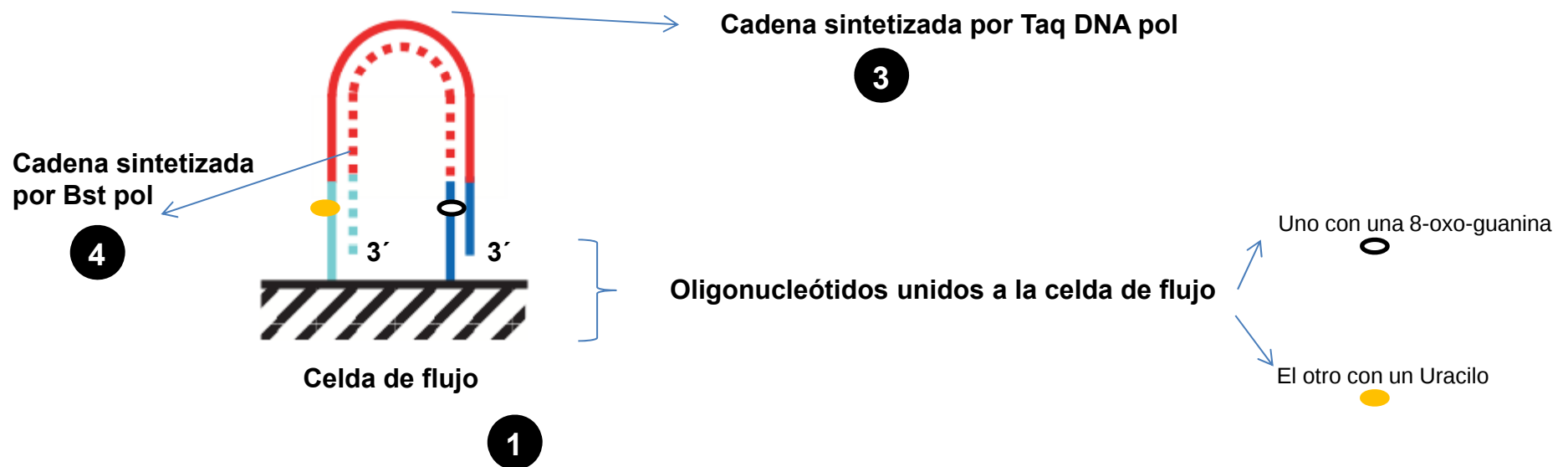
- **Luego** se hace un **tratamiento desnaturalizante** con Formamida para remover la cadena original (indicada previamente con el número 2).



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

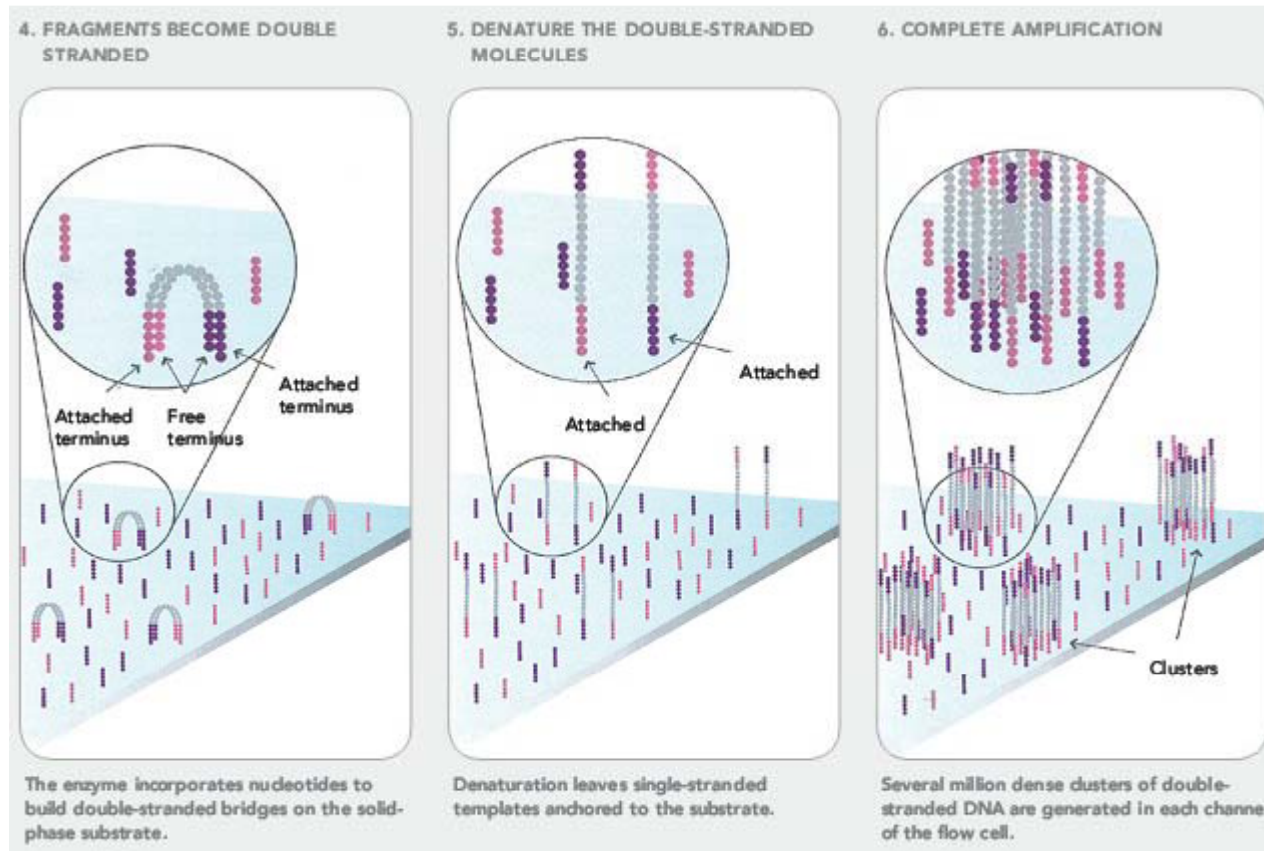
- **Posteriormente** se realiza una **amplificación isotérmica** a 60°C con *DNA polimerasa Bst* (35 ciclos). La desnaturalización entre-ciclos se realiza con formamida.



La *DNA pol Bst* deriva de *Bacillus stearothermophilus* y posee actividad DNA helicasa.

Adquisición de información genómica

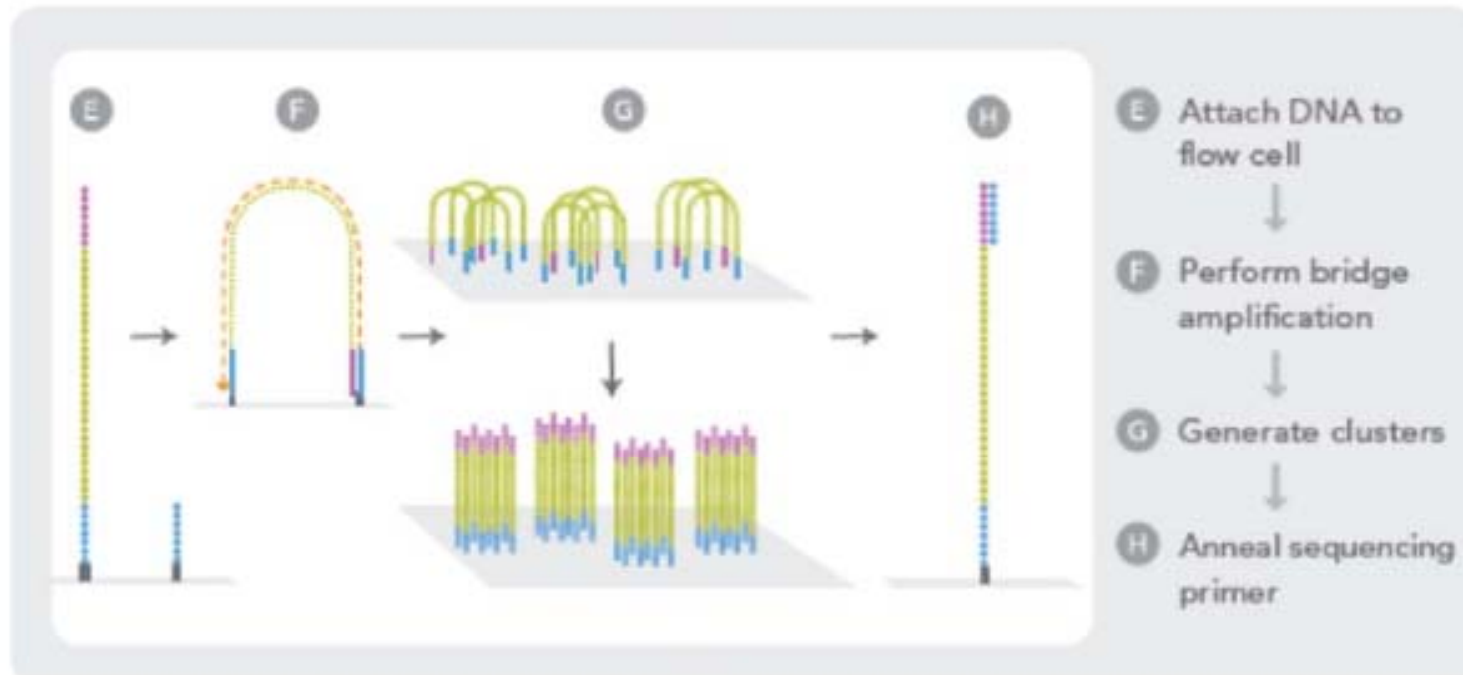
NGS: tecnología Illumina



Luego de la amplificación, se generan *clusters* de ssDNA, o *PCR colonies* denominadas ***polonies*** (polonias). Se generan hasta 40 millones de polonias.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

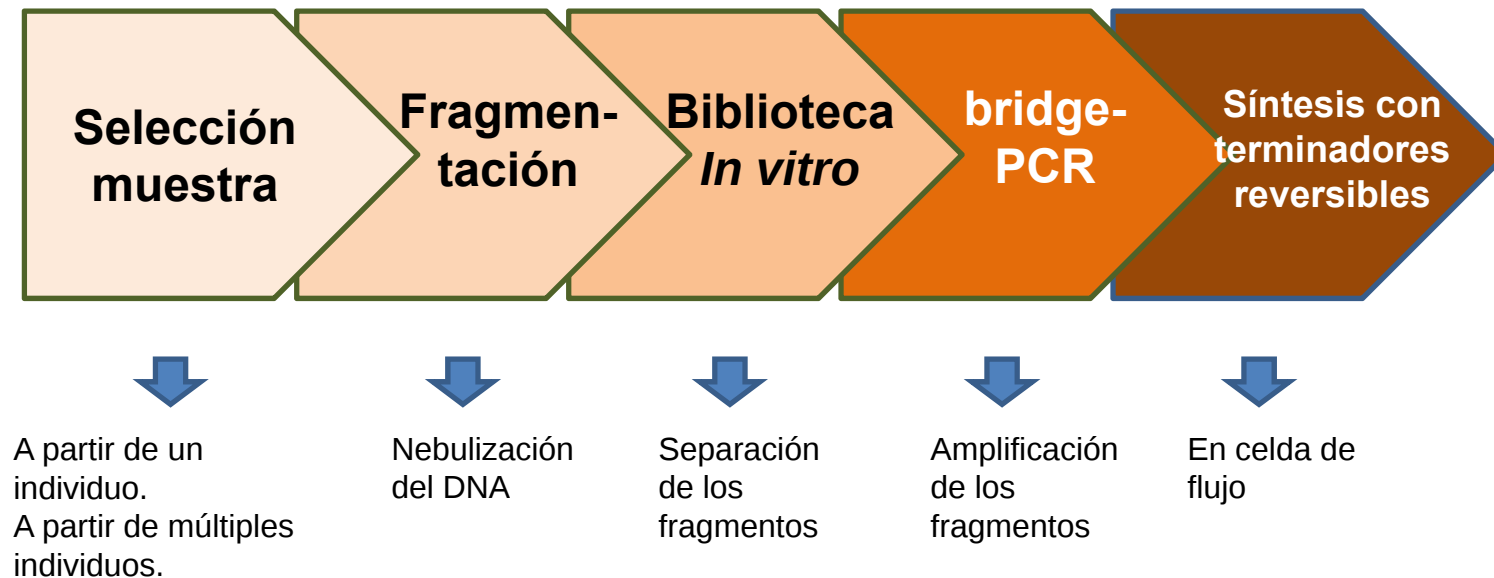


Se generan hasta **1000 copias** de cada fragmento en un diámetro de **1 micrón**.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

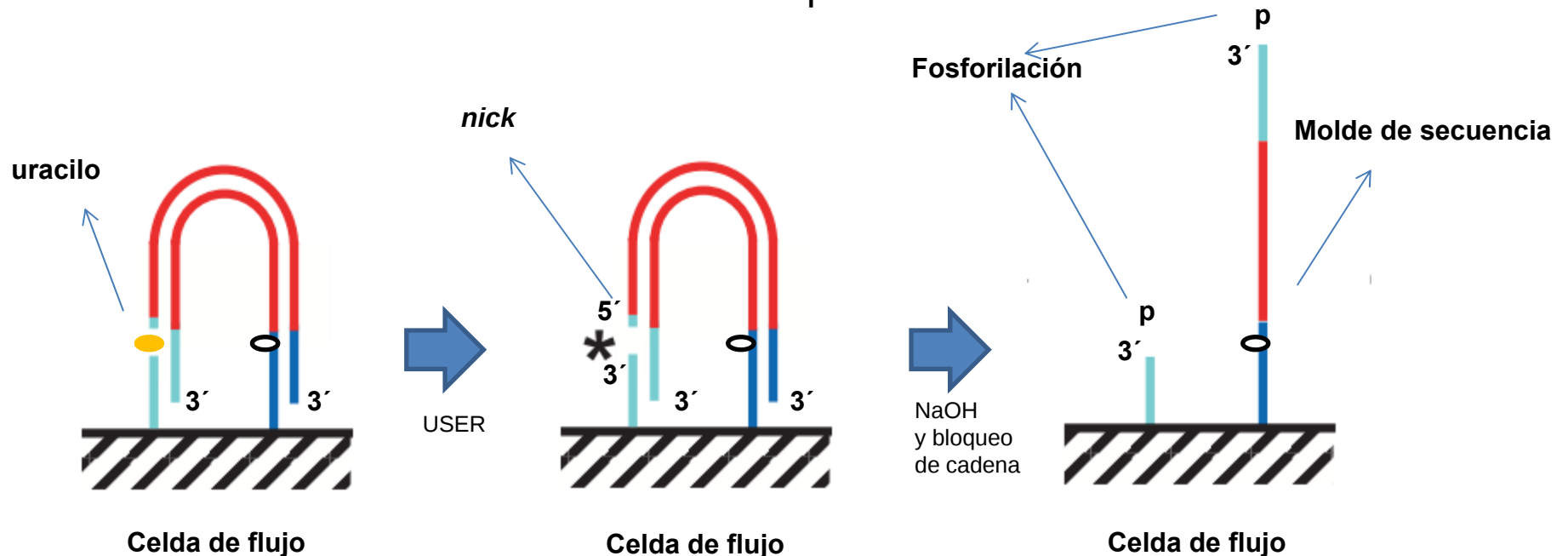
Etapas involucradas en la tecnología 454



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

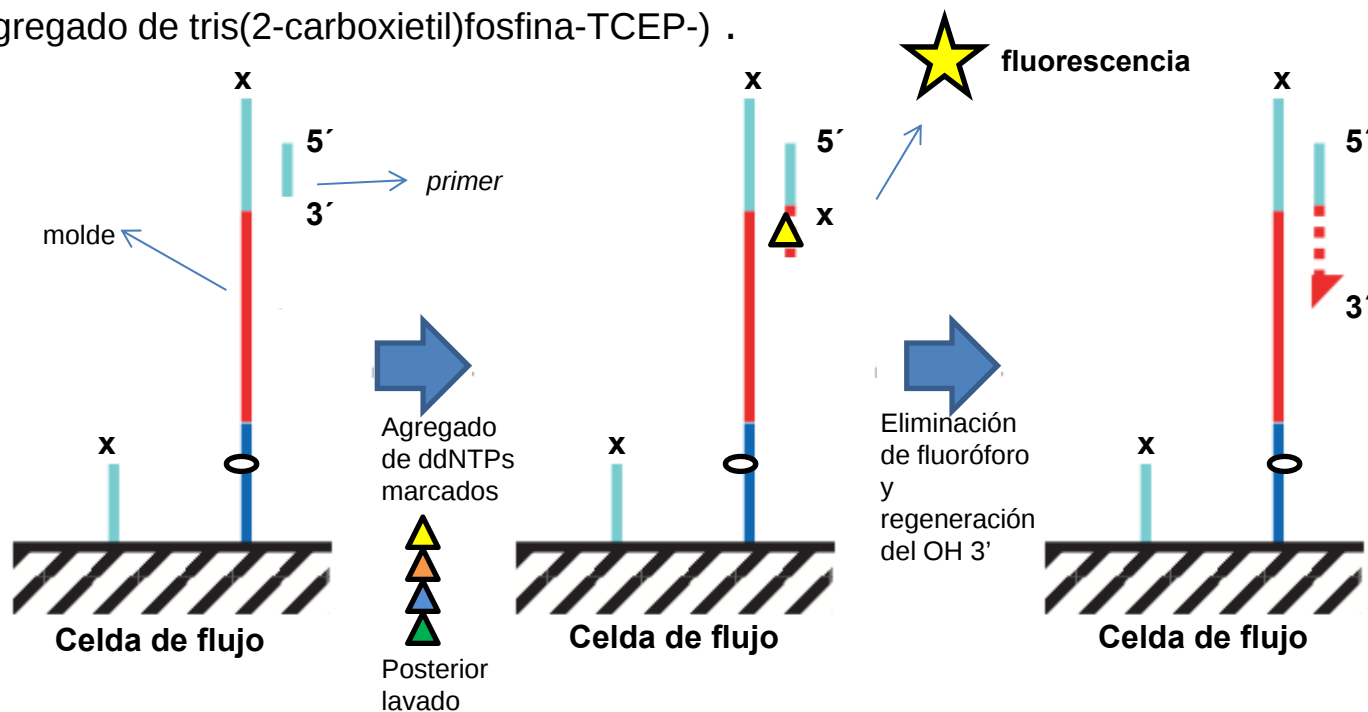
- Los **DNA amplificados** sobre la **celda de flujo** son **tratados** con la enzima **USER** (*Uracil-Specific Excision Reagent*; mezcla de Uracil DNA glicosilasa –UDG– y la DNA endonucleasa glicosilasa-liasas VIII), lo cual **provocará un *nick*** en uno de los oligonucleótidos unidos a la celda de flujo. **Luego** se desnaturaliza con **álcali** para dejar expuesta una sola cadena de DNA y se introduce un fosfato en el extremo 3' con una quinasa.



Adquisición de información genómica

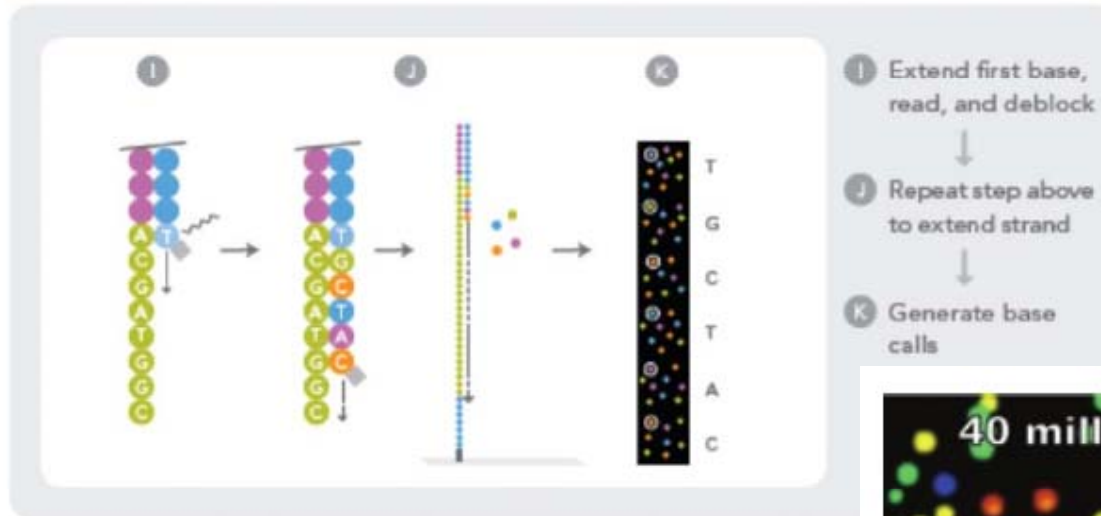
NGS: tecnología Illumina

- Los **ssDNA** luego son **secuenciados** mediante **síntesis**. Para ello se incorpora un **primer específico** para la **cadena en estudio**, *DNA polimerasa DNA dependiente*, y los **4 ddNTPs** marcados con fluoróforos (en formato reversible) agregados en conjunto. **Después de lavar** los **ddNTPs no incorporados**, se **excita** la celda y se **lee la emisión de fluorescencia**. **Posteriormente**, químicamente se **elimina el fluoróforo** y se **revierte** la capacidad **terminadora de síntesis** para repetir el ciclo (agregado de tris(2-carboxietil)fosfina-TCEP-).

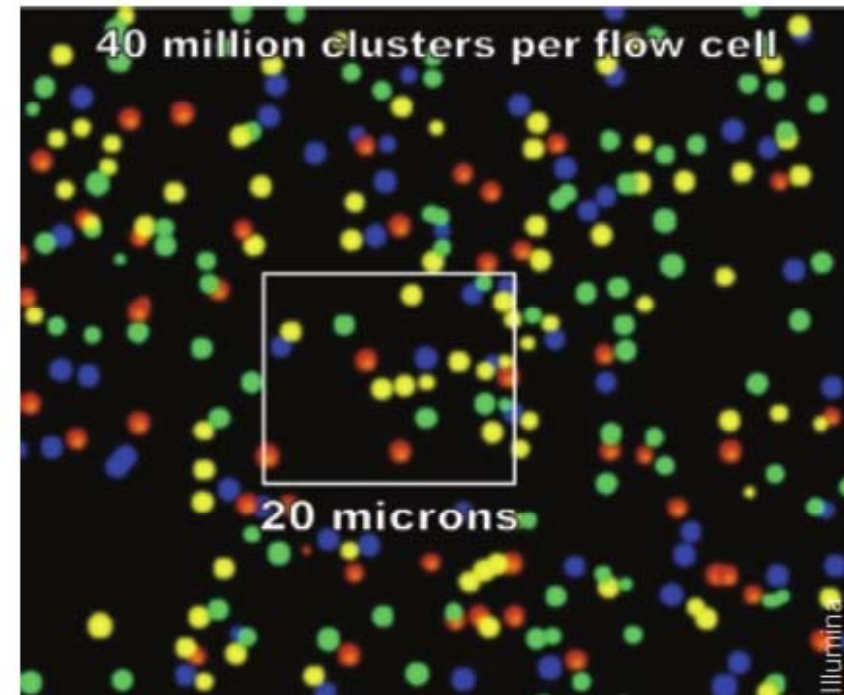


Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina



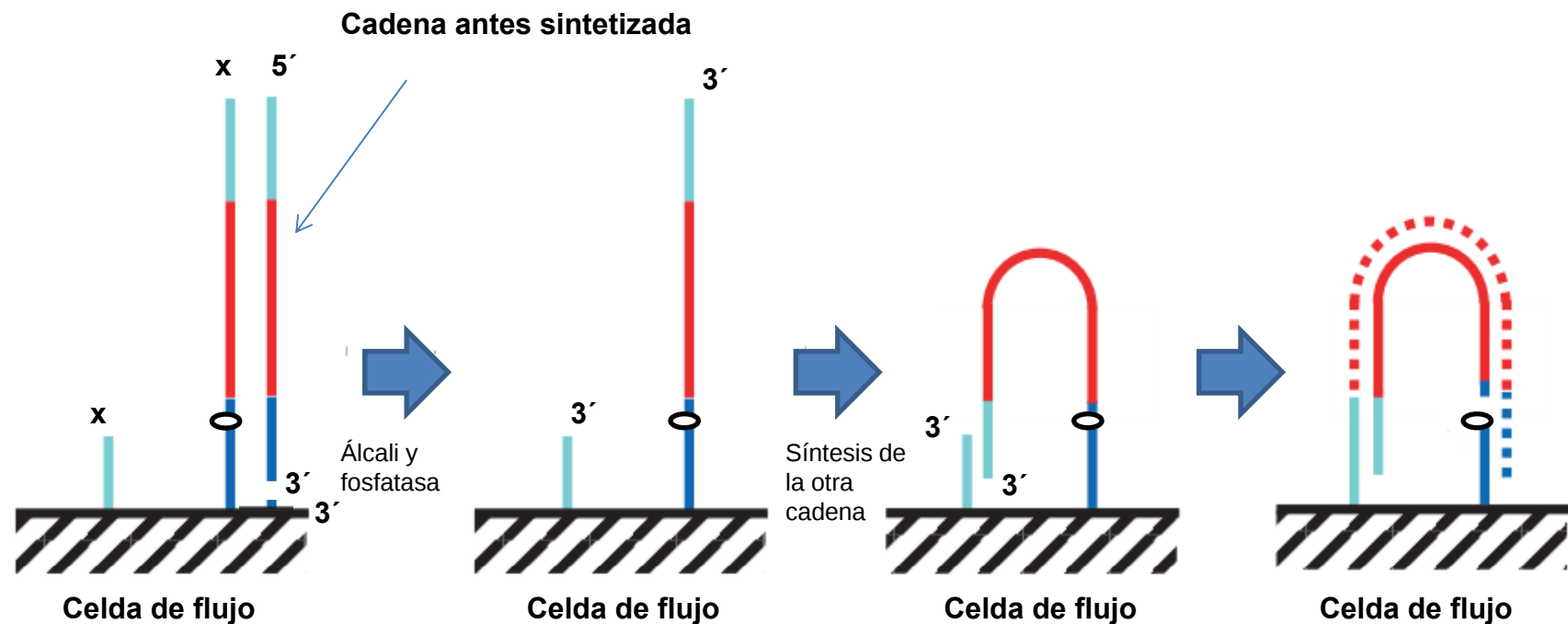
Visión ampliada de las **polonias** emitiendo **fluorescencia** en función del DNA presente en el *cluster*



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina

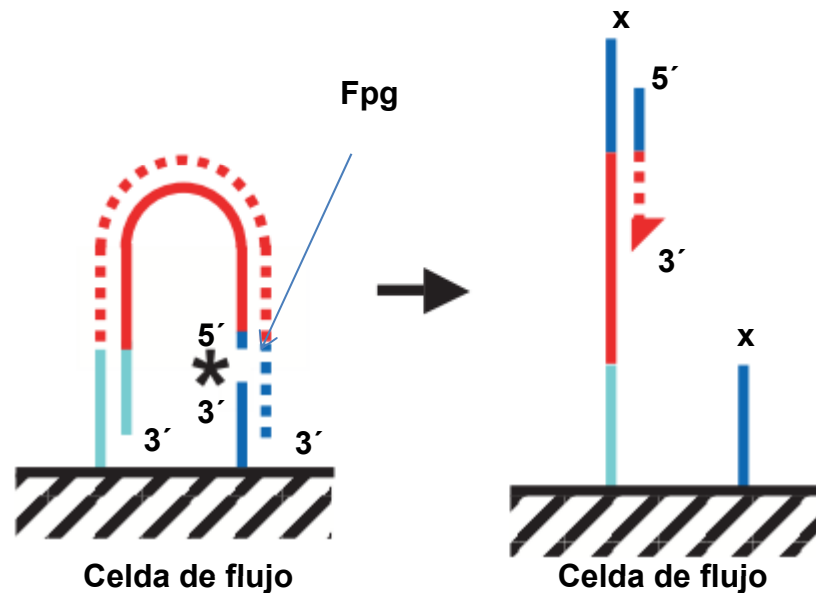
- Una vez **concluida** la **secuencia** de una de las **cadena**s, se **desnaturaliza** la muestra para **eliminar** la **cadena** recientemente **sintetizada**. Luego se **desfosforilan** los **extremos 3' libres** (con fosfatasa) y se **realiza** una reacción de síntesis tipo *bridge*.



Adquisición de información genómica

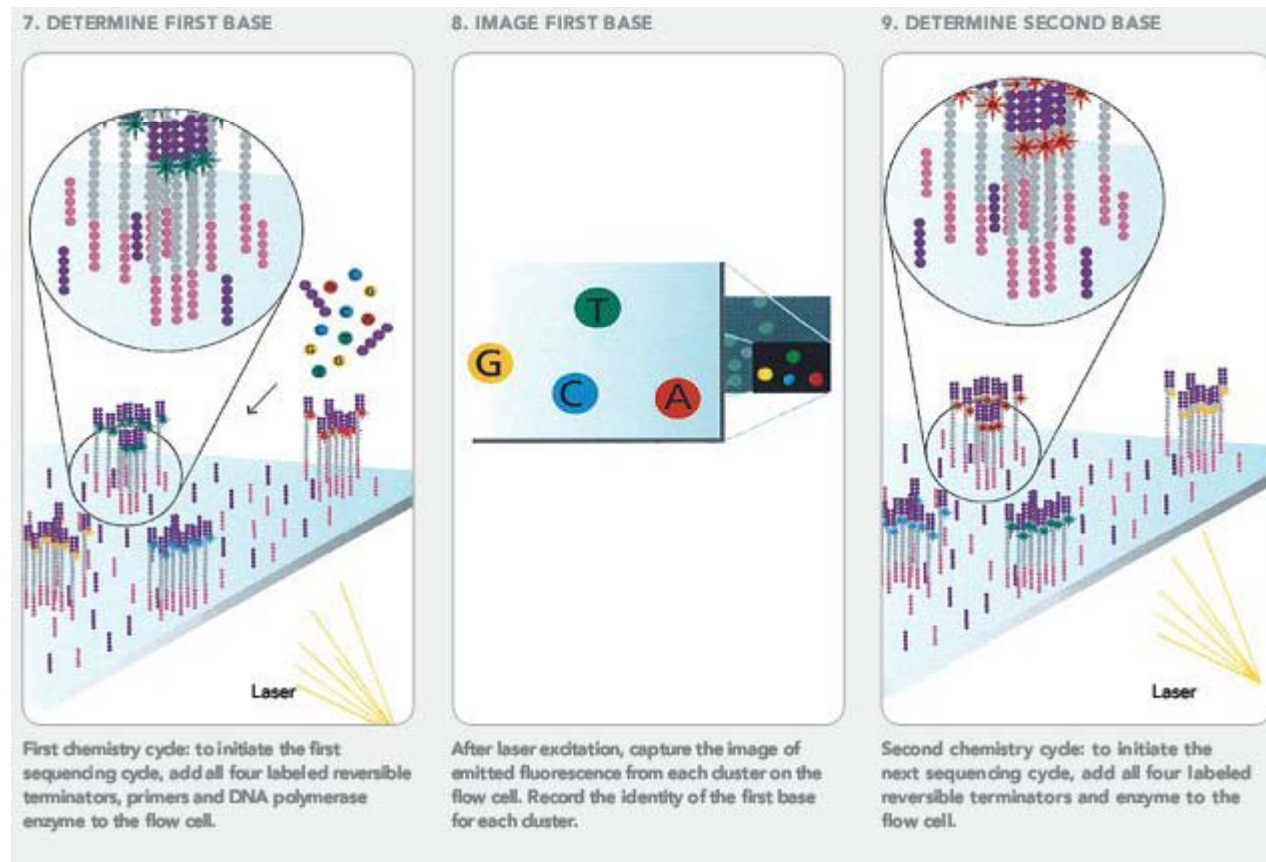
NGS: tecnología Illumina

- Finalmente, se **elimina** la **cadena** ya **secuenciada** mediante tratamiento con **Fpg** (*formamido-pirimidina DNA glicosidasa*) y posterior **desnaturalización**. La **cadena** que queda **unida a la celda** es **secuenciada** del mismo modo que la primera.



Adquisición de información genómica

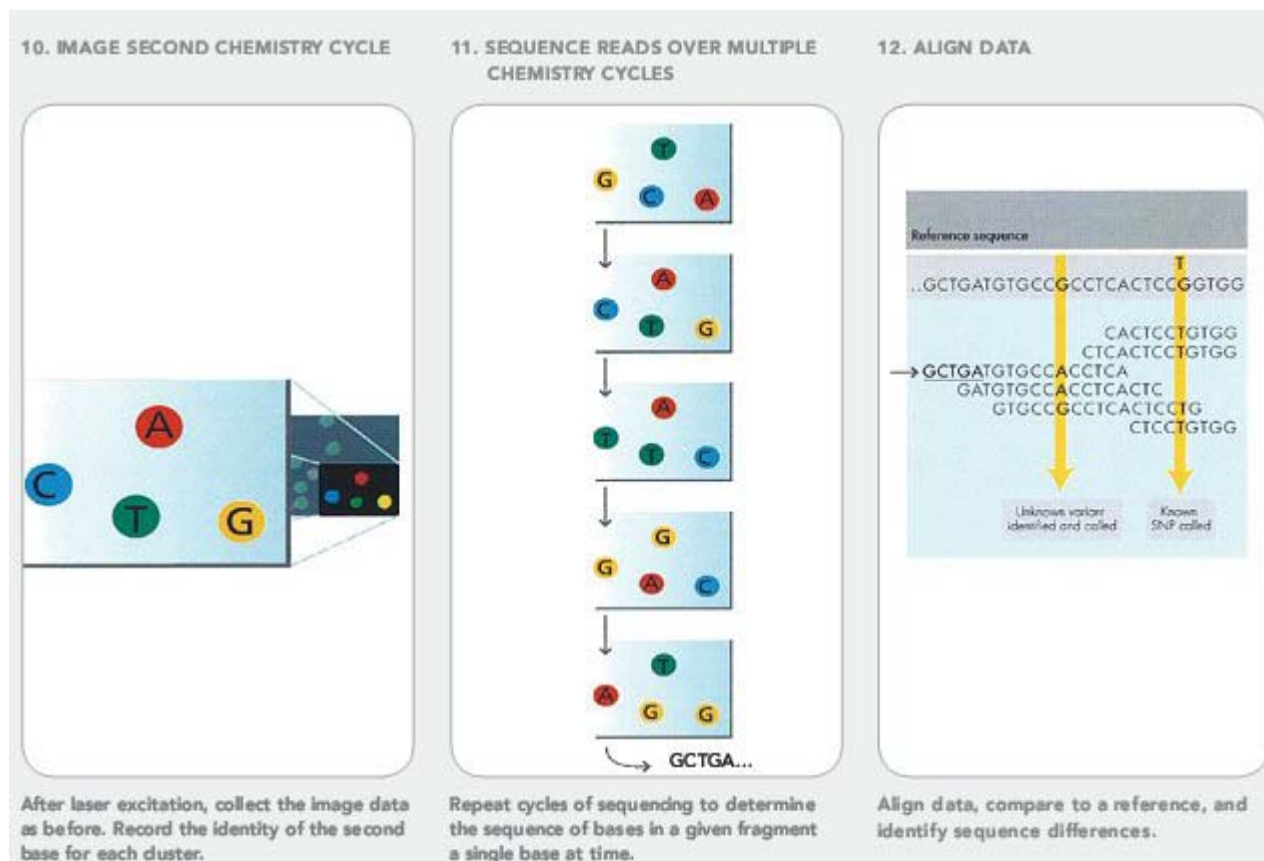
NGS: tecnología Illumina



La reacción de **secuenciación** se realiza por **síntesis e incorporación** de **terminadores de cadena** (cada uno marcado con un fluoróforo diferente). Los mismos son **reversibles**, y por ende se puede continuar con la síntesis.

Adquisición de información genómica

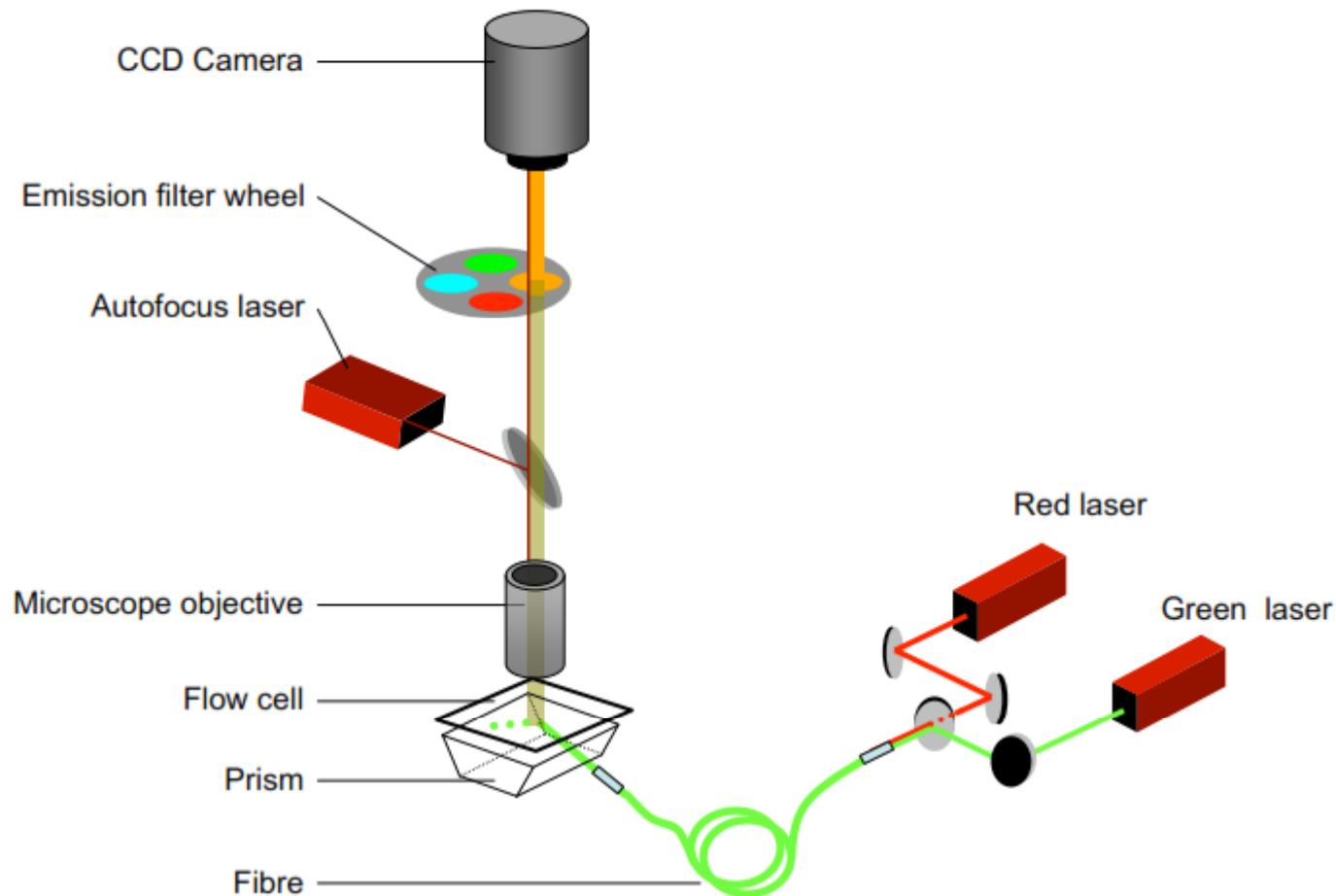
NGS: tecnología Illumina



Una **cámara** va registrando las **señales** derivadas de cada terminador.

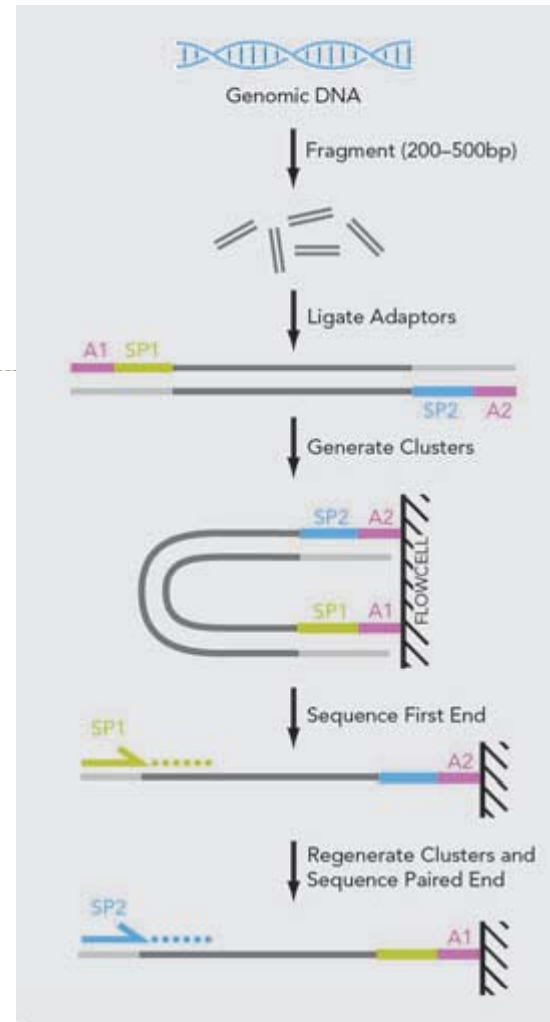
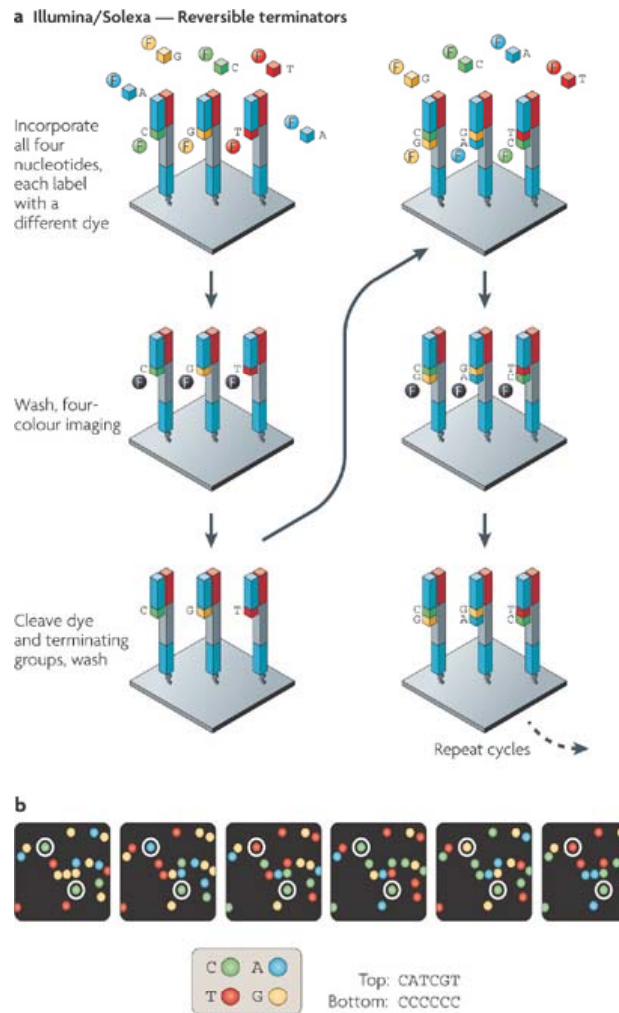
Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Illumina



Resumen de la tecnología

Descripción de los métodos más utilizados clasificados dentro de las tecnologías NGS

Tecnología ABI SOLID

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

- La **tecnología SOLID** (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) disponible desde **2008** ha sido desarrollada por **Applied Biosystems**, la empresa que aportó la tecnología automatizada de Sanger para secuenciar el genoma de la especie humana durante la década de los 90 del siglo XX.
- Desde el año 2008 **Applied Biosystems** se fusionó con **Invitrogen** creando la empresa biotecnológica denominada **Life Technologies**.
- El sistema de **secuenciamiento** de **SOLID** también es conocido como **2 base encoding** y está basado en **reacciones de ligación**.
- Este método **no involucra síntesis** como la pirosecuenciación (tecnología 454) o la química reversible de terminadores fluorescentes (tecnología *Illumina*).

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

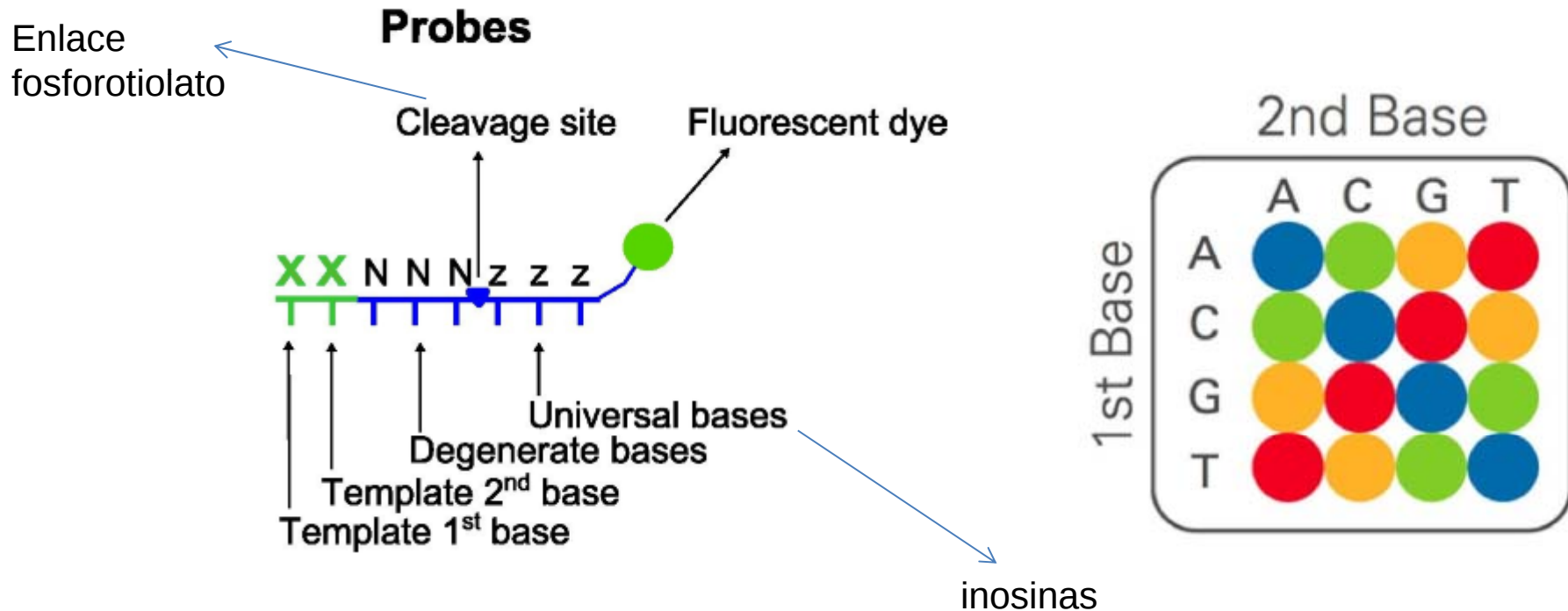


Equipamiento SOLID

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

El método de secuenciación involucra el uso de sondas

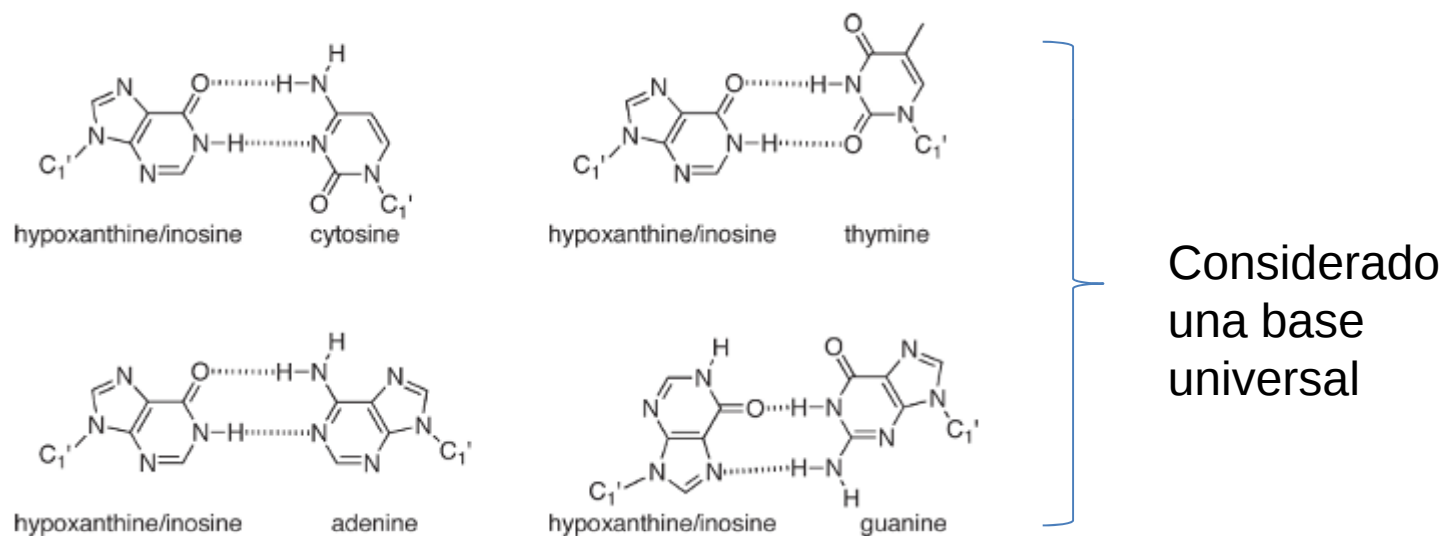


Son **256 sondas** por cada color.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

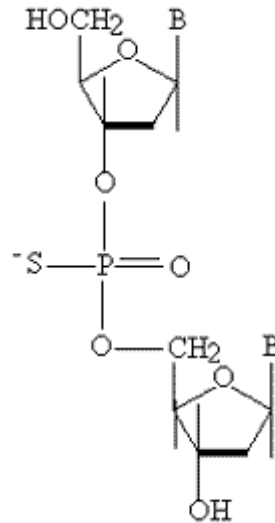
- Apareamiento de **inosina** con el resto de las bases nitrogenadas



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

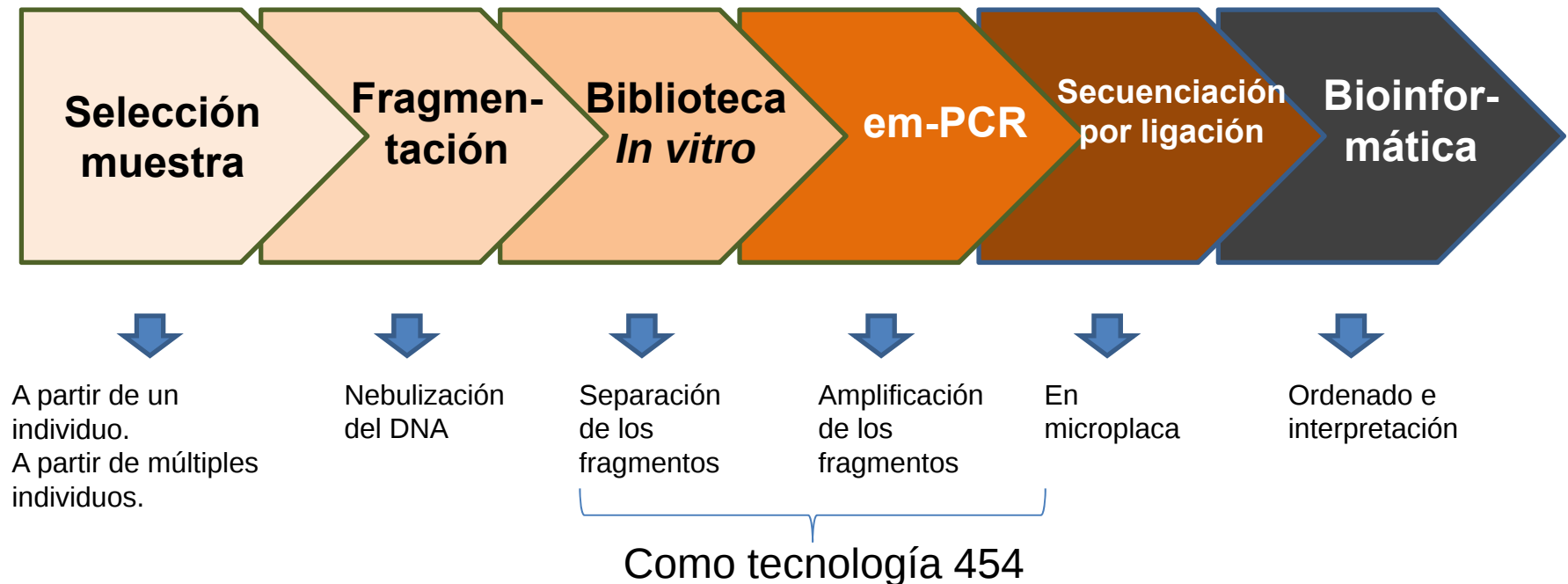
- Los **enlaces fosforotiolatos** dan resistencia a los oligonucleótidos de la acción de exonucleasas, y también permiten su **hidrólisis selectiva** mediante tratamiento con **iones de plata**.



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

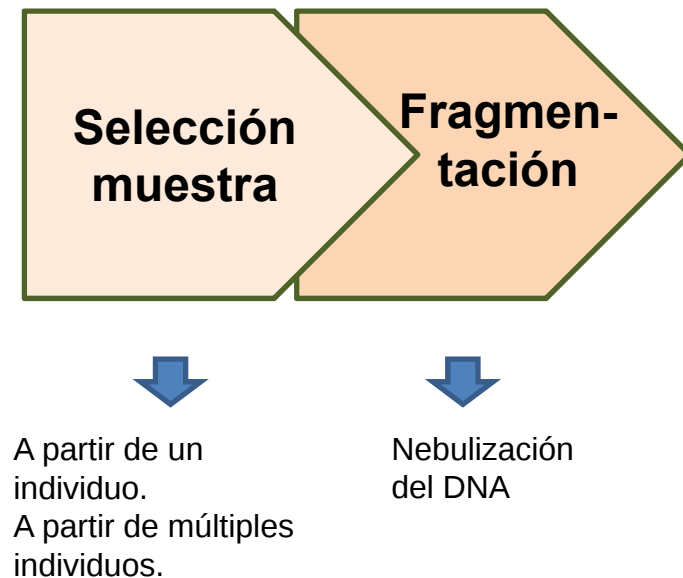
Etapas involucradas en la tecnología SOLID (a)



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

Etapas involucradas en la tecnología SOLID

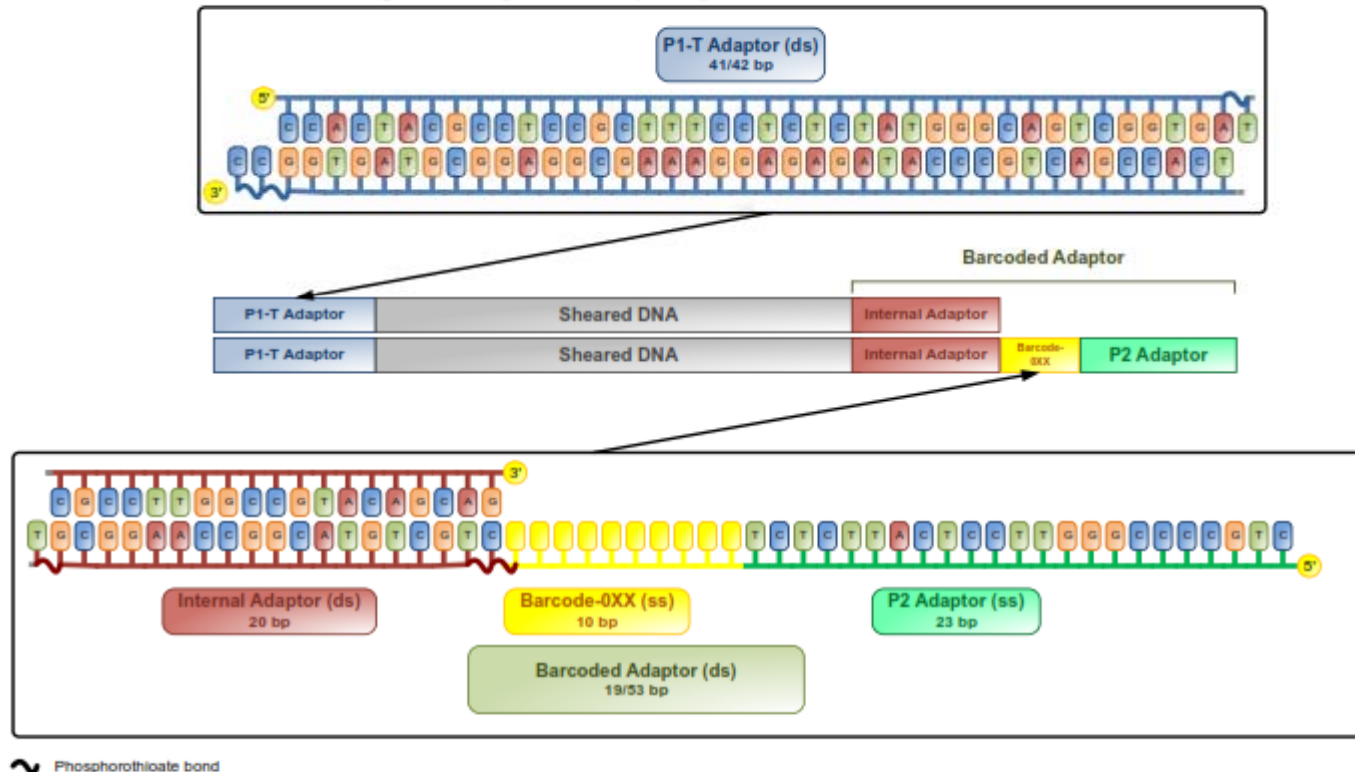


Se puede utilizar como mínimo **10 ng** de **gDNA**. Los fragmentos nebulizados y reparados en sus extremos deben tener entre **100-250 pb**.
A los mismos se les **liga adaptadores** de secuencia conocida, comunmente llamados **P1 y P2**.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

Ejemplos de adaptadores que pueden ligarse a los fragmentos del gDNA.



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

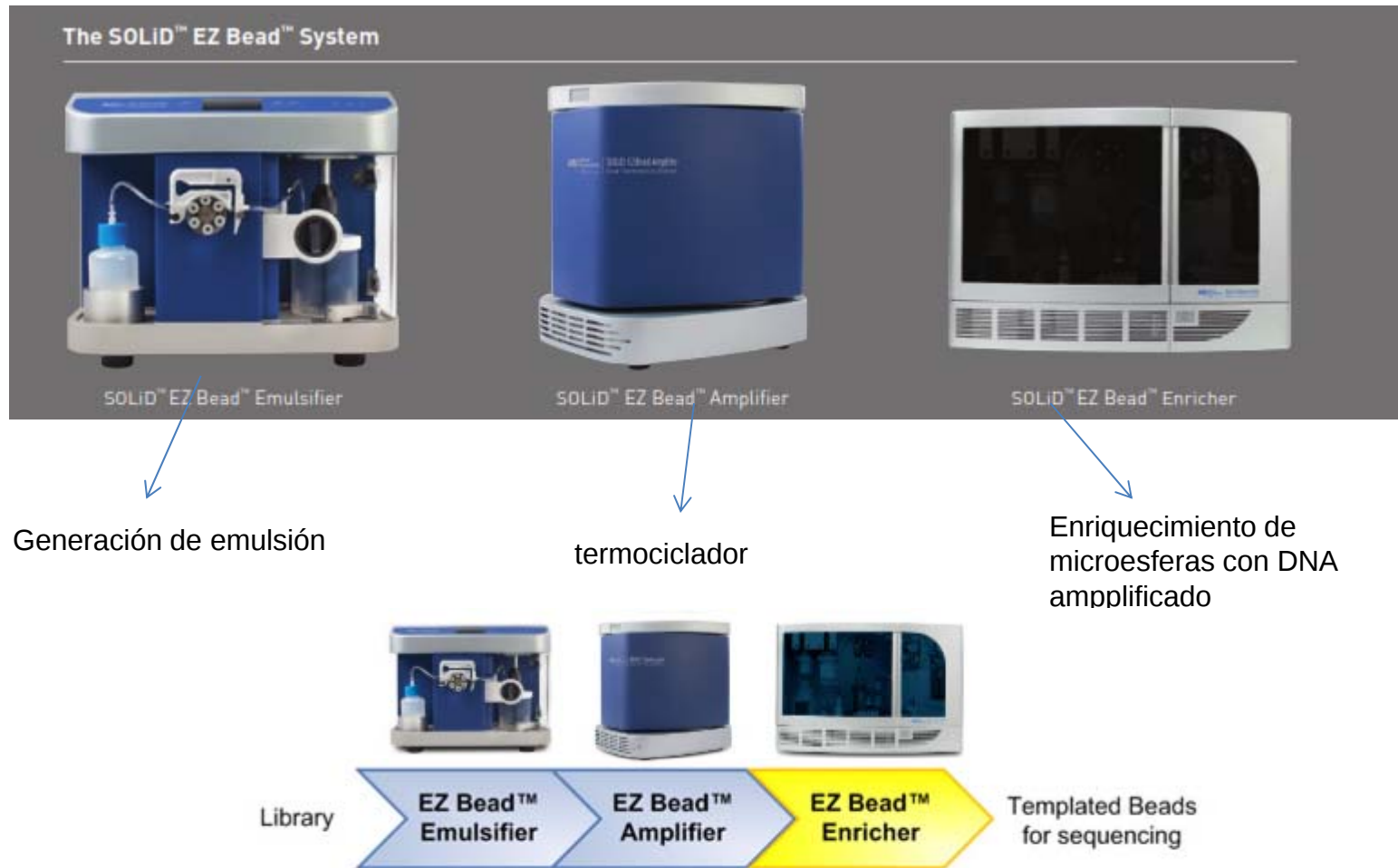
Etapas involucradas en la tecnología SOLID (a)



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

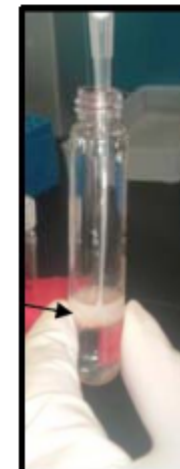
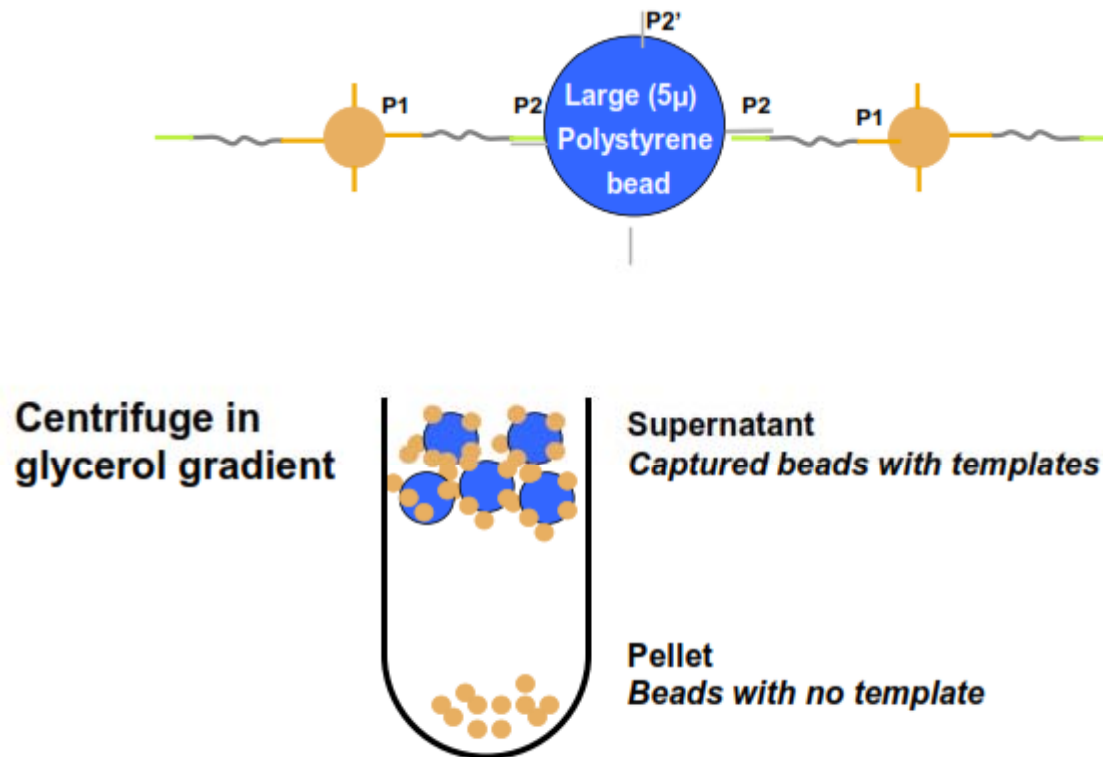
Equipamiento disponible para la construcción de la biblioteca *in vitro* utilizando microesferas



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

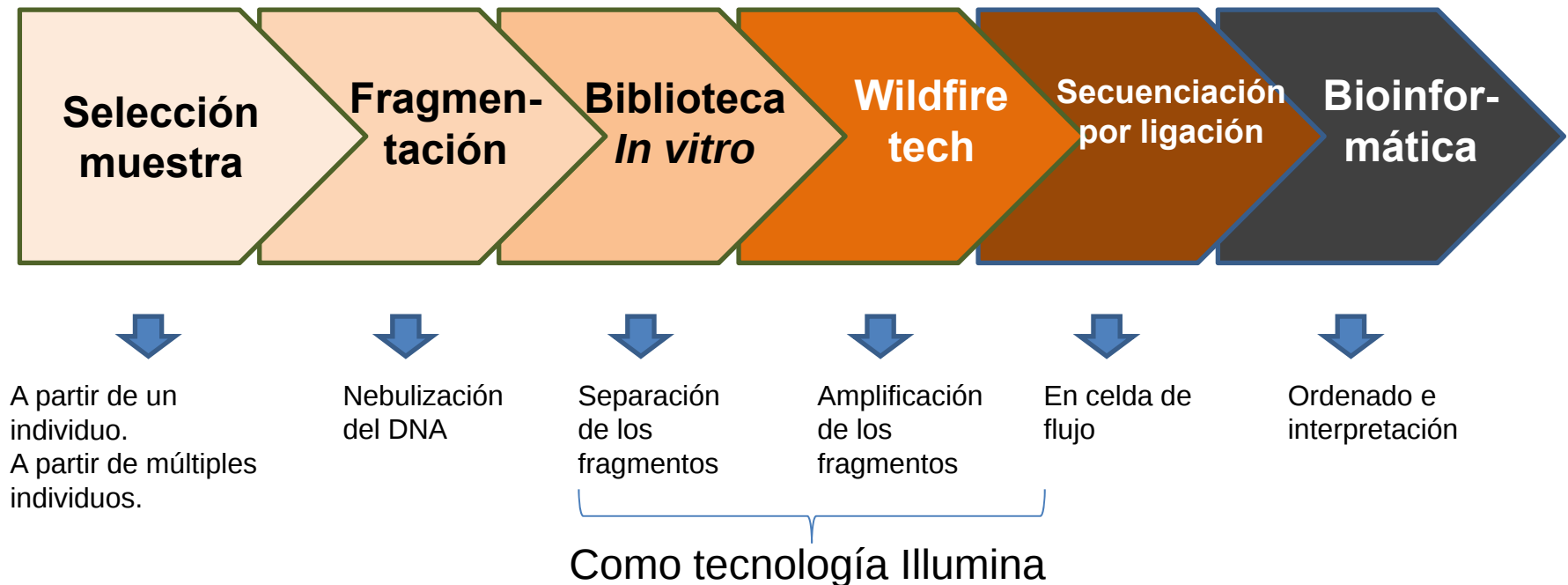
- El **enriquecimiento** de las **microesferas con amplificación** se realiza mediante su **captura** con **microesferas** más grandes de **poliestireno** y con **secuencia complementaria al otro adaptador**.



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

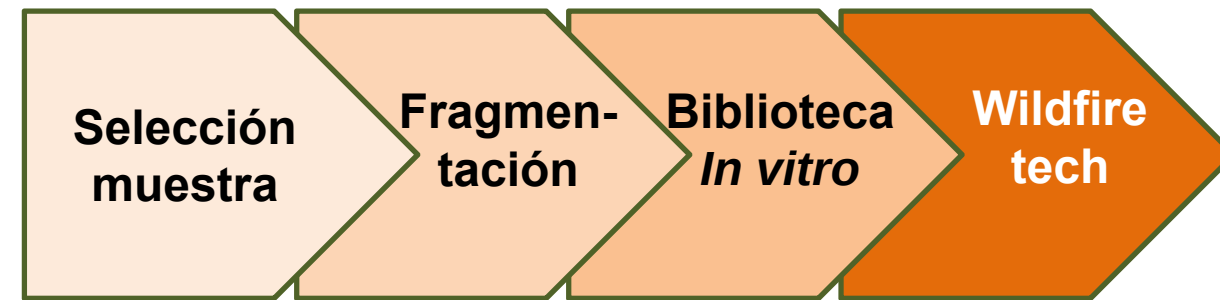
Etapas involucradas en la tecnología SOLID (b)



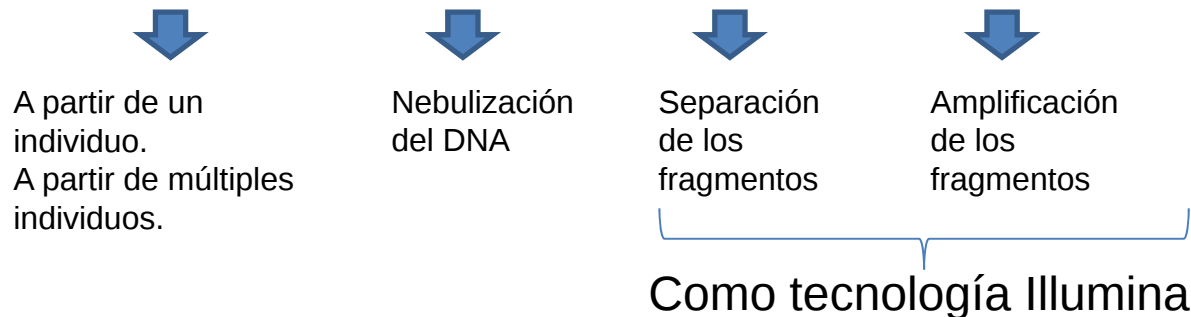
Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

Etapas involucradas en la tecnología SOLID (b)



Disponibilidad de la **tecnología *Wildfire*** en la generación de colonias.

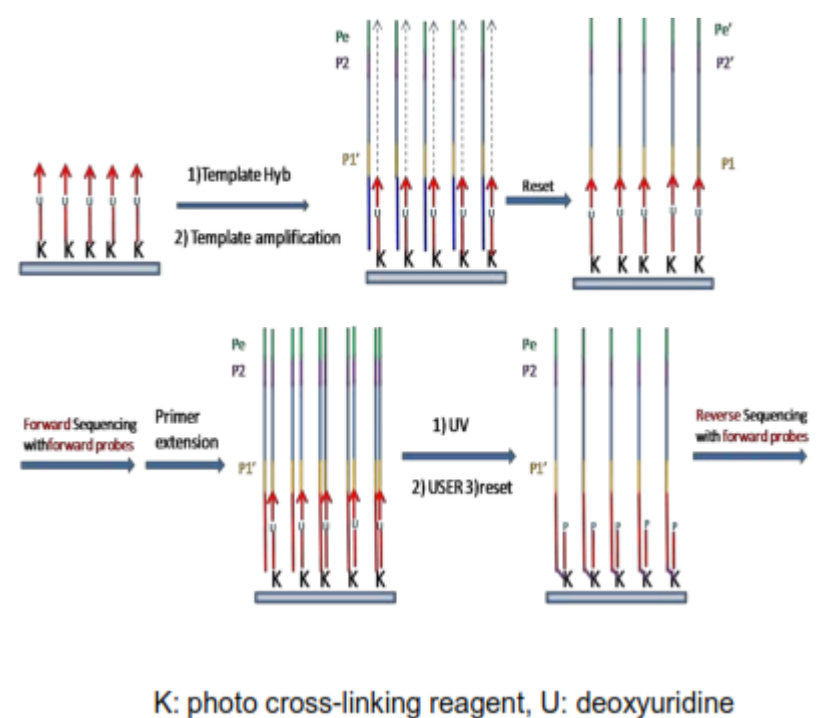
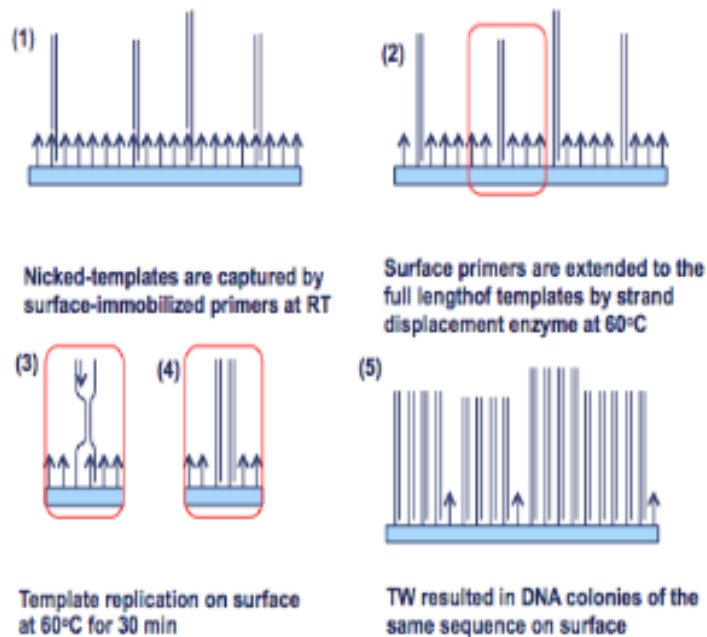


Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

Para la generación de las **colonias** la empresa desarrolló la **tecnología Wildfire**

Isothermal Template Walking (TW)

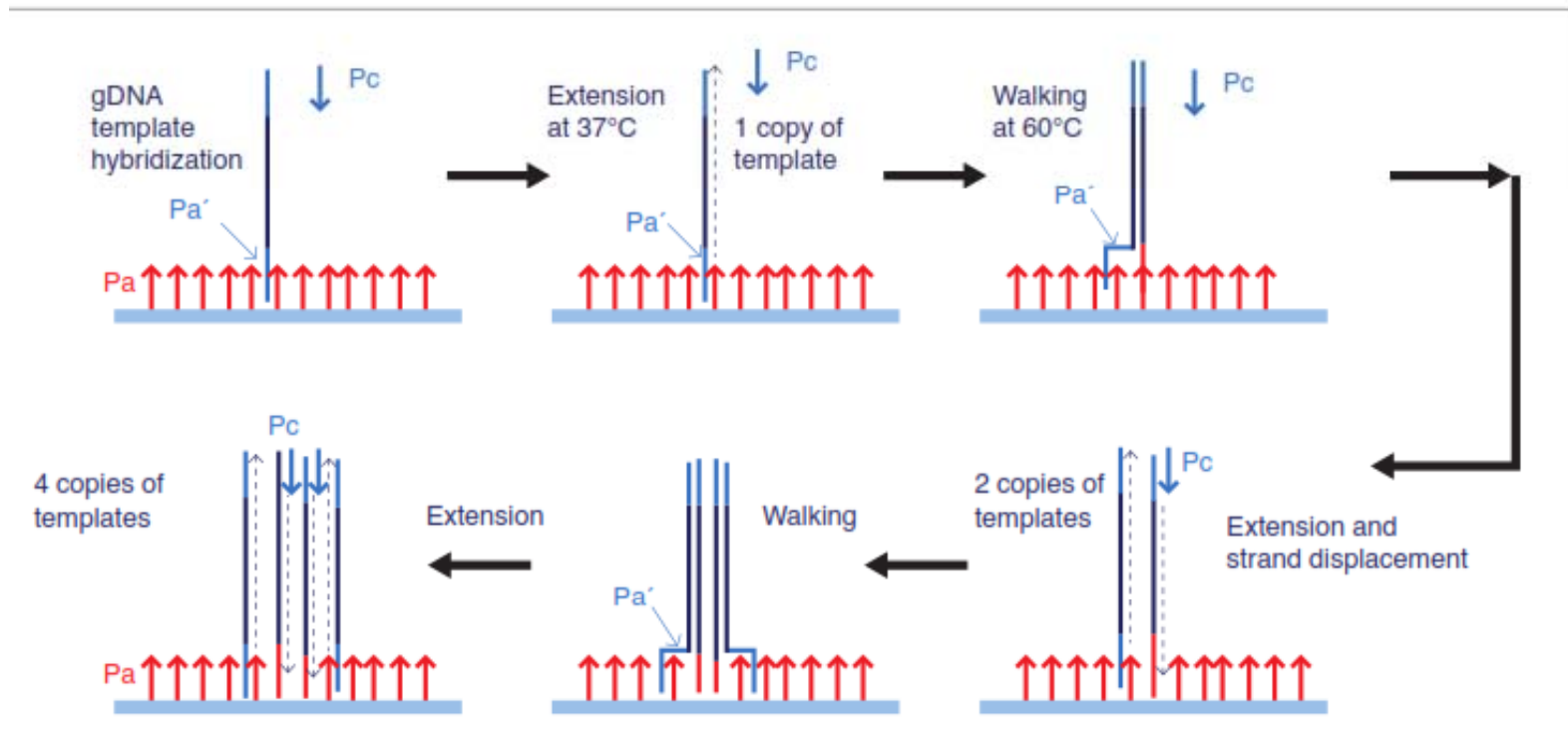


Se generan **1,5 millones de colonias** por **mm²** de superficie

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

Tecnología *wildfire*

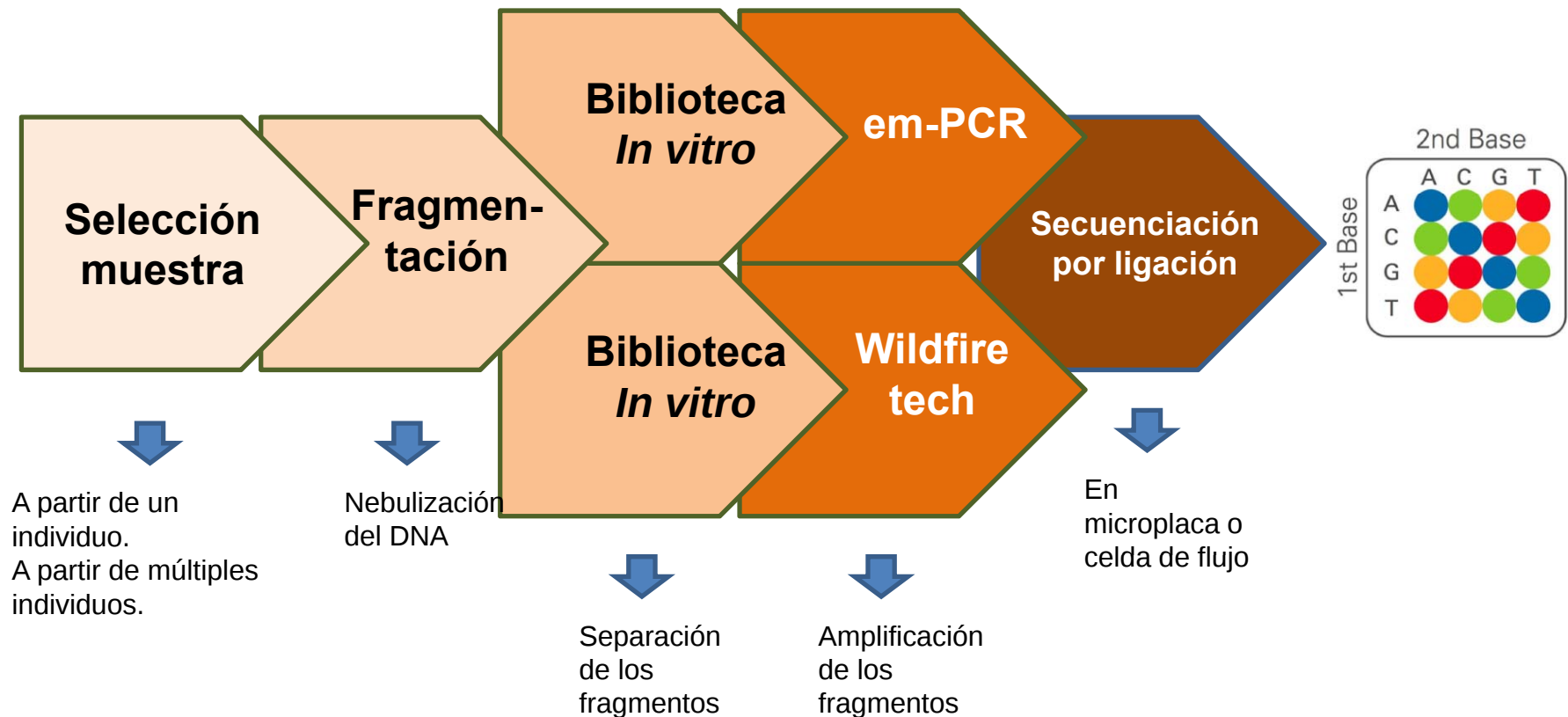


El procedimiento de amplificación dura aproximadamente 30 minutos. El crecimiento de la colonia se detiene cuando se topa con otra.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

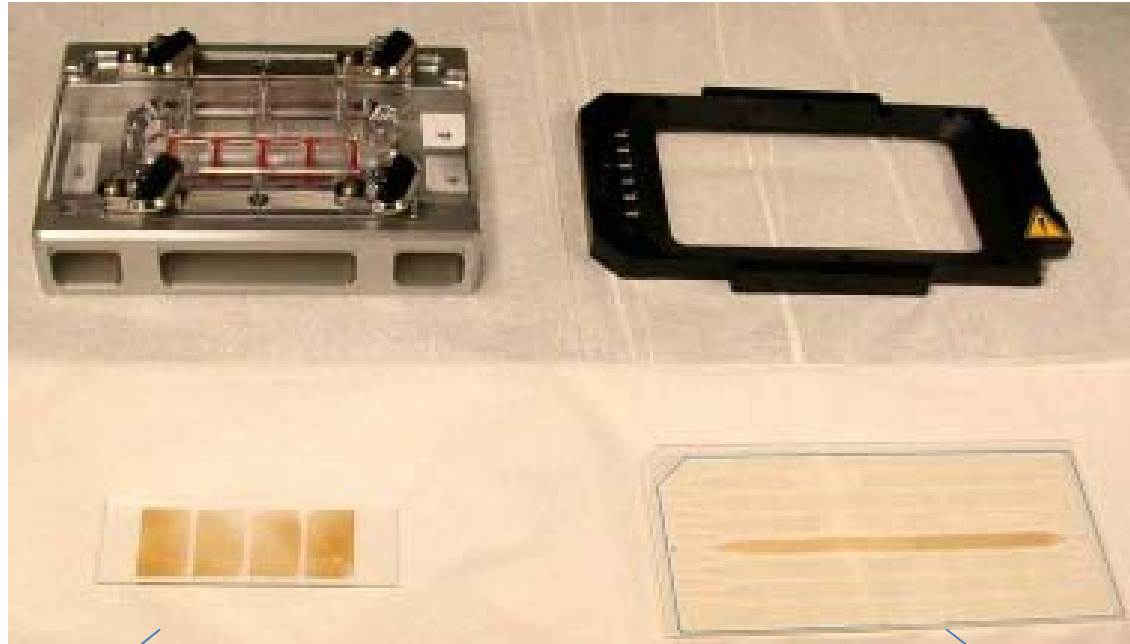
Etapas involucradas en la tecnología SOLID



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

- Si se usa **em-PCR** en microesferas...



Portaobjetos de vidrio utilizados para depositar las microesferas (aproximadamente 600 millones)

Celda de flujo utilizada para depositar las microesferas (aproximadamente 1080 millones)

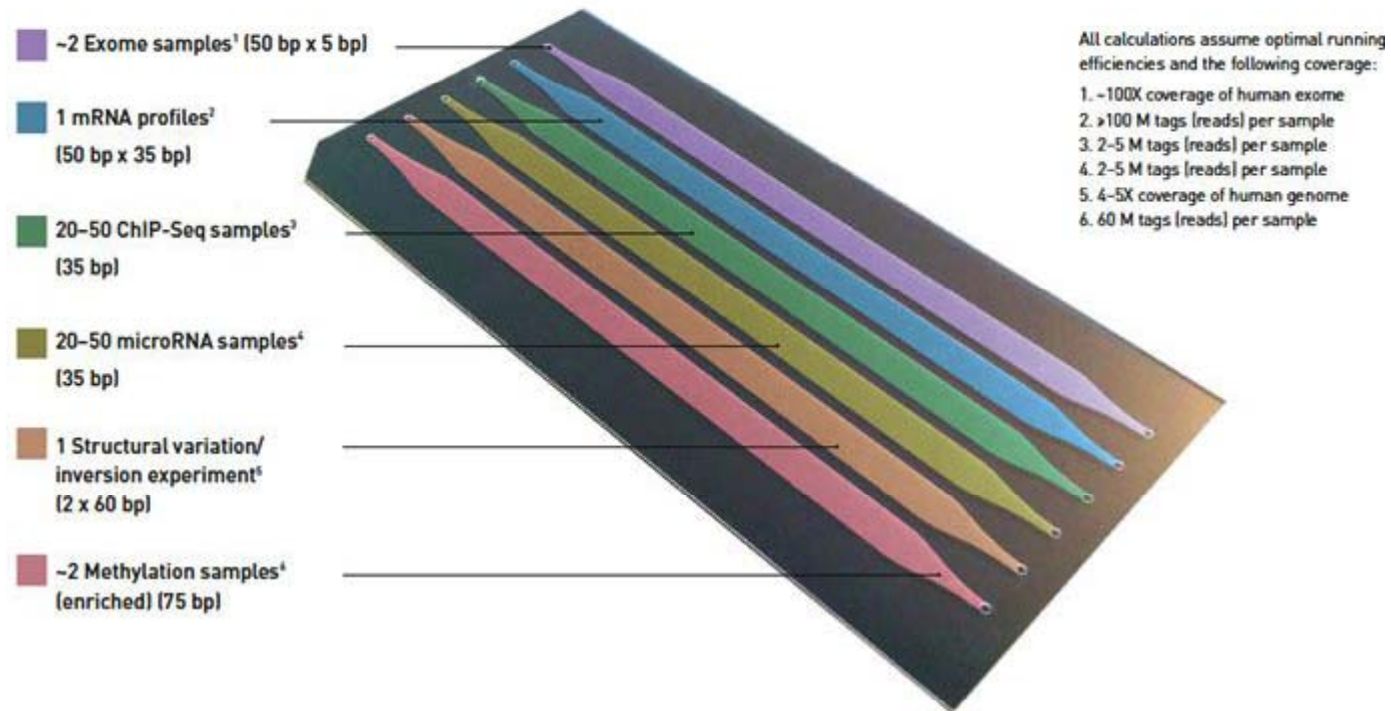
La disposición de las microesferas será al azar, y quedarán retenidas por una unión covalente entre el extremo 3' de algunos ssDNA y la superficie del vidrio

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

- Si se usa **generación de colonias**...

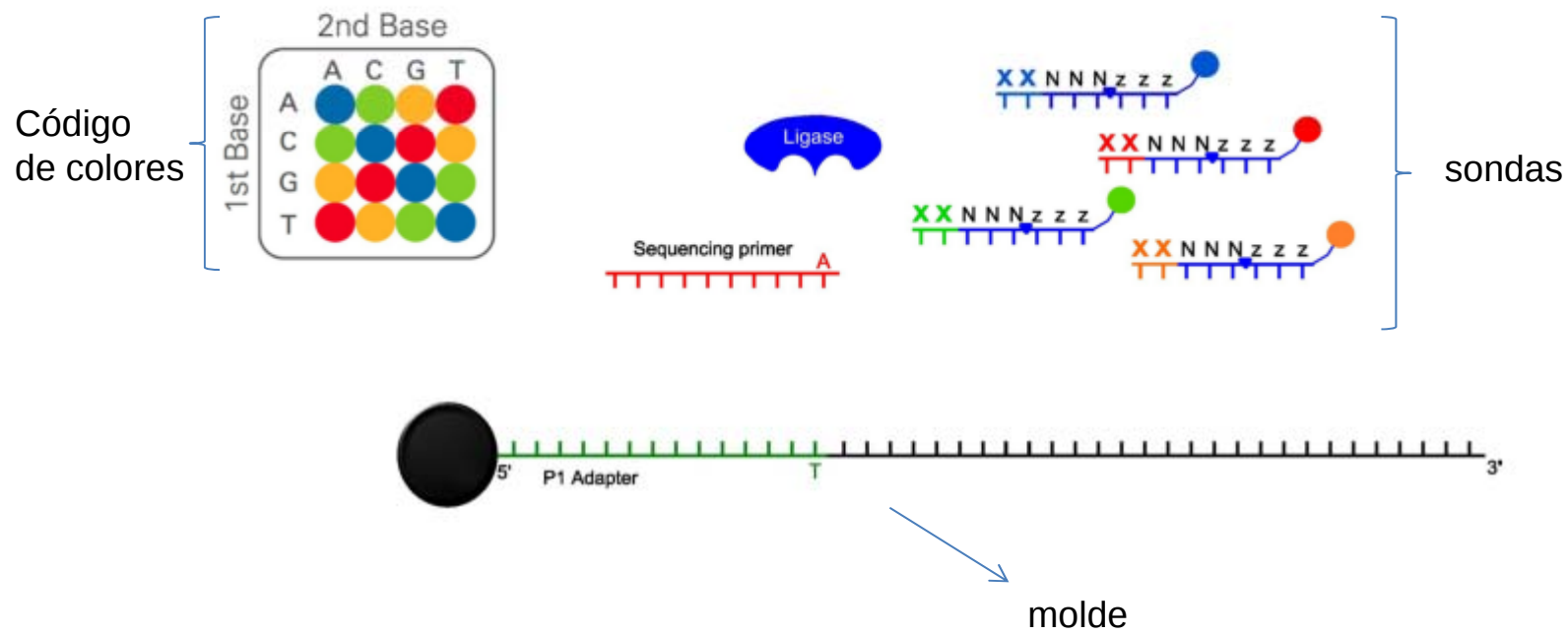
Multiple applications on a single FlowChip with different read lengths and chemistries.



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

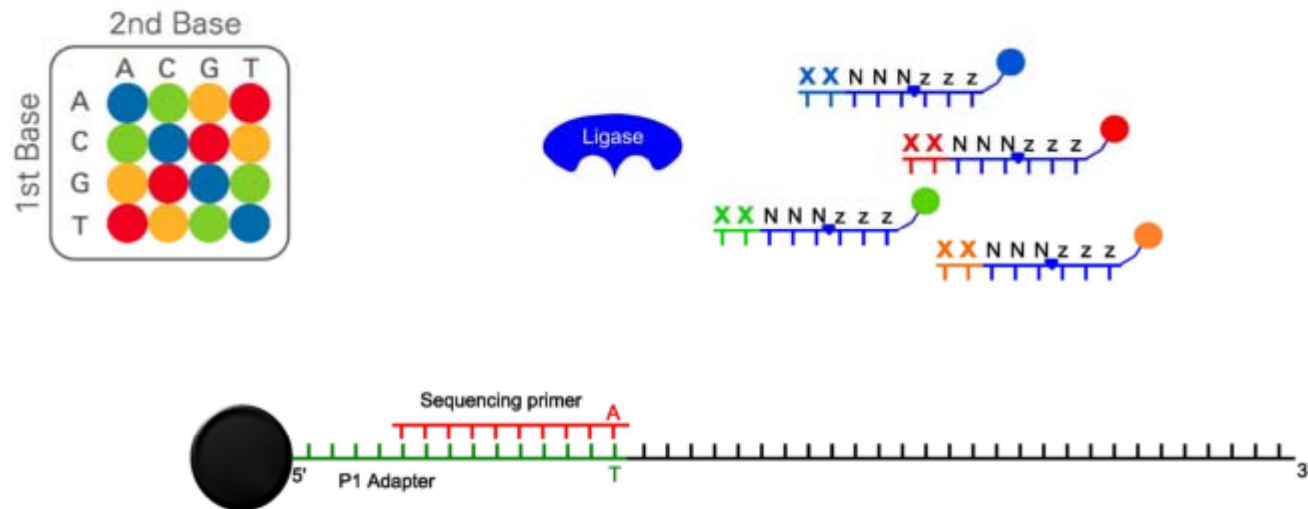
- **Primera Ronda de secuenciación.** Se introduce un **primer 1** específico que hibrida sobre la secuencia adaptadora (incorporada luego de nebulizar las muestras de gDNA), **DNA ligasa** y las **sondas fluorescentes** con diferentes dinucleótidos.



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

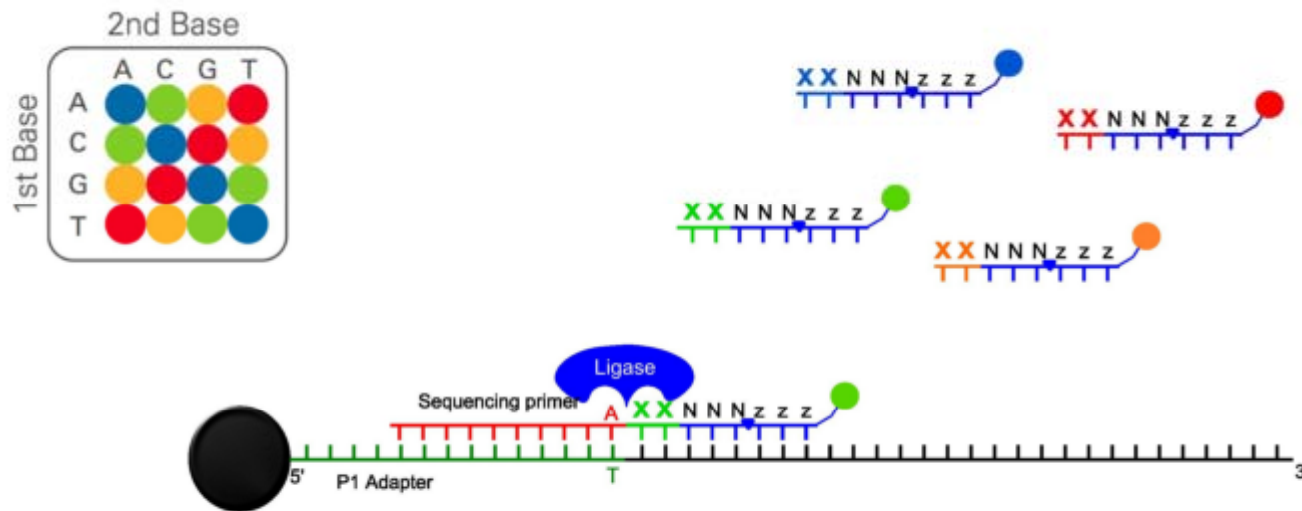
- **Primera Ronda de secuenciación.** El *primer* hibrida ...



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

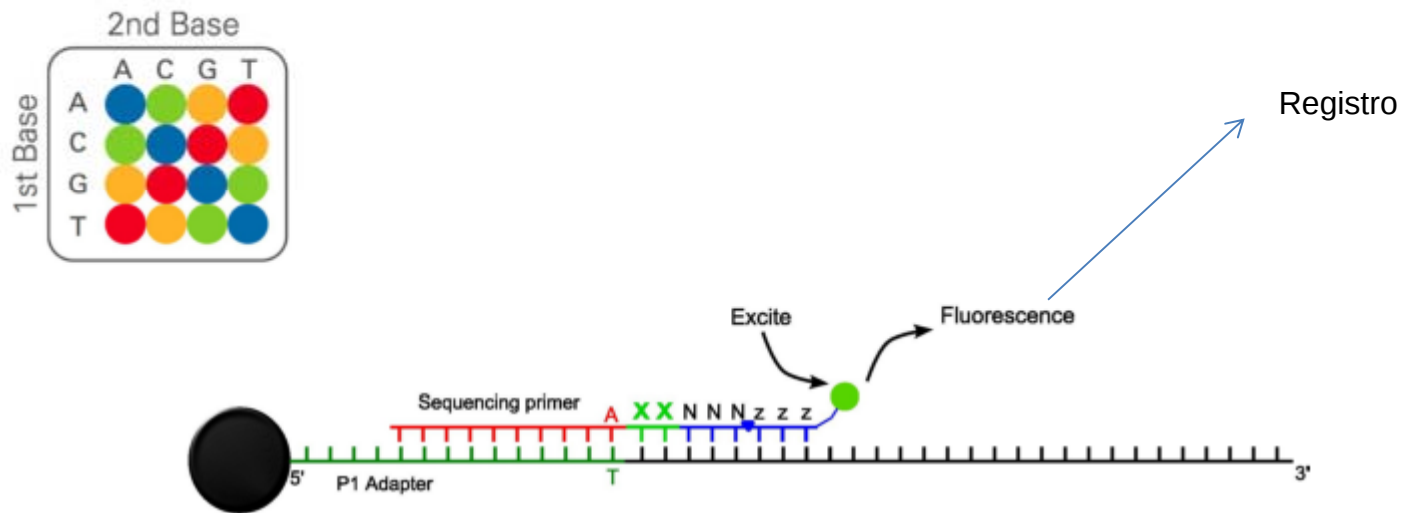
- **Primera Ronda de secuenciación.** El *primer* hibrida y la *sonda* que tiene los dos nucleótidos complementarios **también** lo hace. **Luego**, la **DNA ligasa** cataliza la formación del enlace fosfodiéster.



Adquisición de información genómica

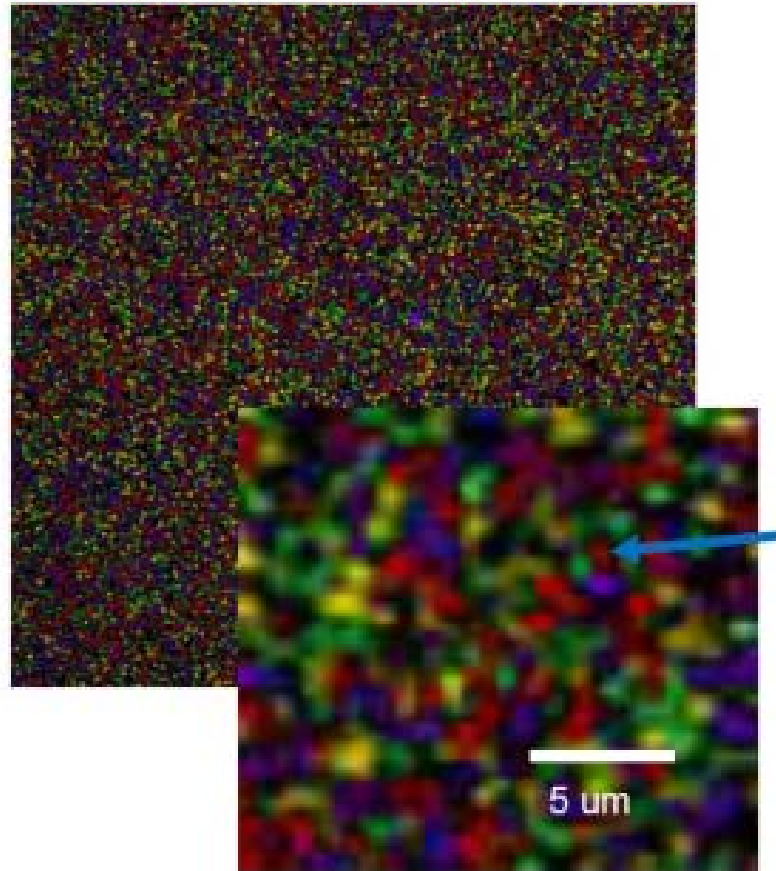
NGS: tecnología SOLID

- **Primera Ronda de secuenciación.** El **primer** hibrida y la **sonda** que tiene los dos nucleótidos complementarios **también** lo hace. **Luego**, la **DNA ligasa** cataliza la formación del enlace fosfodiéster. Se **lava** y se **excita** con luz para así detectar emisión de **fluorescencia**.



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

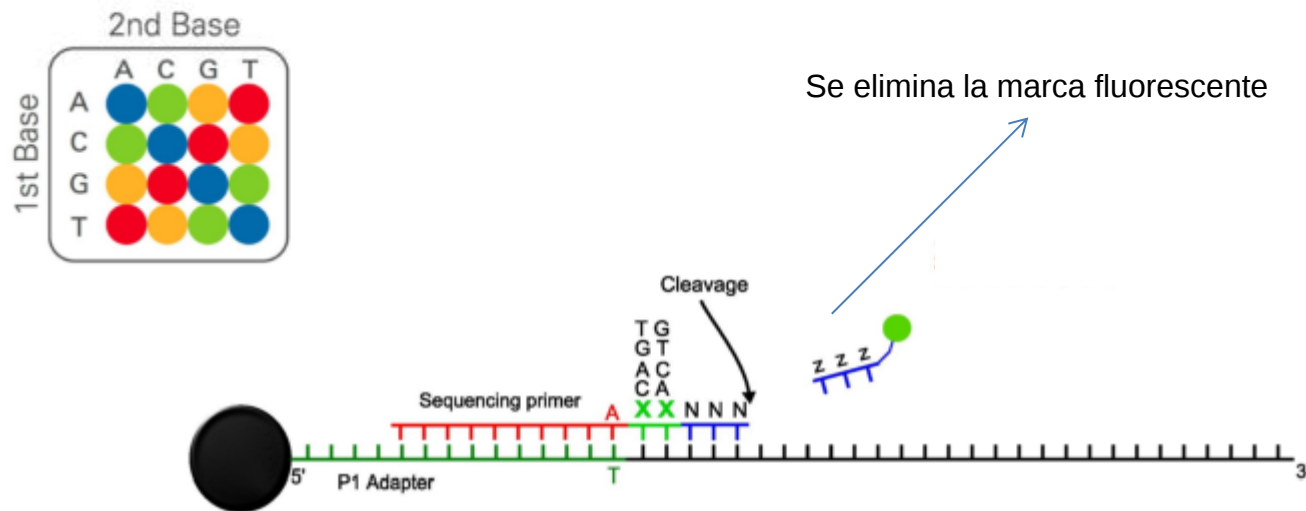


Registro de
fluorescencia de
cada una de las
colonias o
microesferas

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

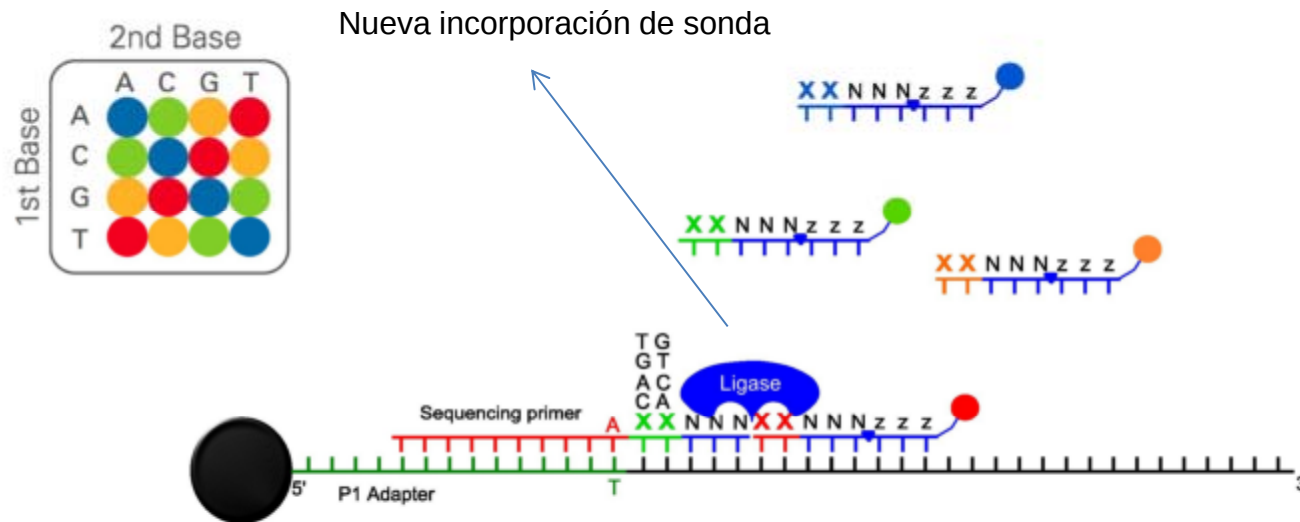
- **Primera Ronda de secuenciación.** El **primer** hibrida y la **sonda** que tiene los dos nucleótidos complementarios **también** lo hace. **Luego**, la **DNA ligasa** cataliza la formación del enlace fosfodiéster. Se **lava** y se **excita** con luz para así detectar emisión de **fluorescencia**. Después, se realiza el **clivaje** de la **sonda** hibridada y un lavado.



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

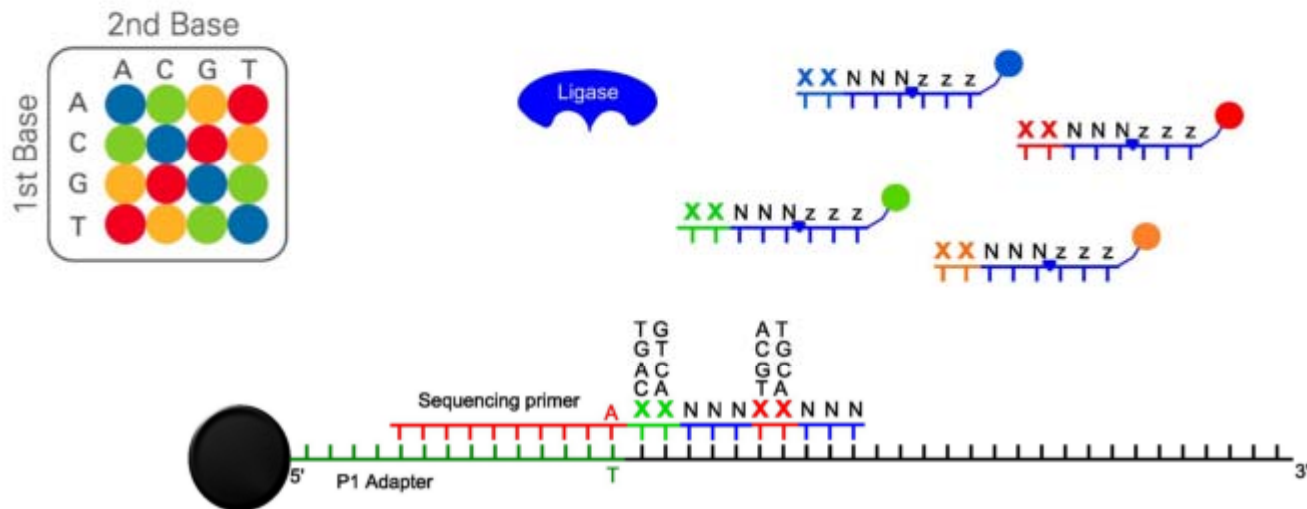
- **Primera Ronda de secuenciación.** El **primer** hibrida y la **sonda** que tiene los dos nucleótidos complementarios **también** lo hace. **Luego**, la **DNA ligasa** cataliza la formación del enlace fosfodiéster. Se **lava** y se **excita** con **luz** para así detectar emisión de **fluorescencia**. Después, se realiza el **clivaje** de la **sonda** hibridada y un lavado. Se **repite** el procedimiento agregando nuevamente las **sondas**.



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

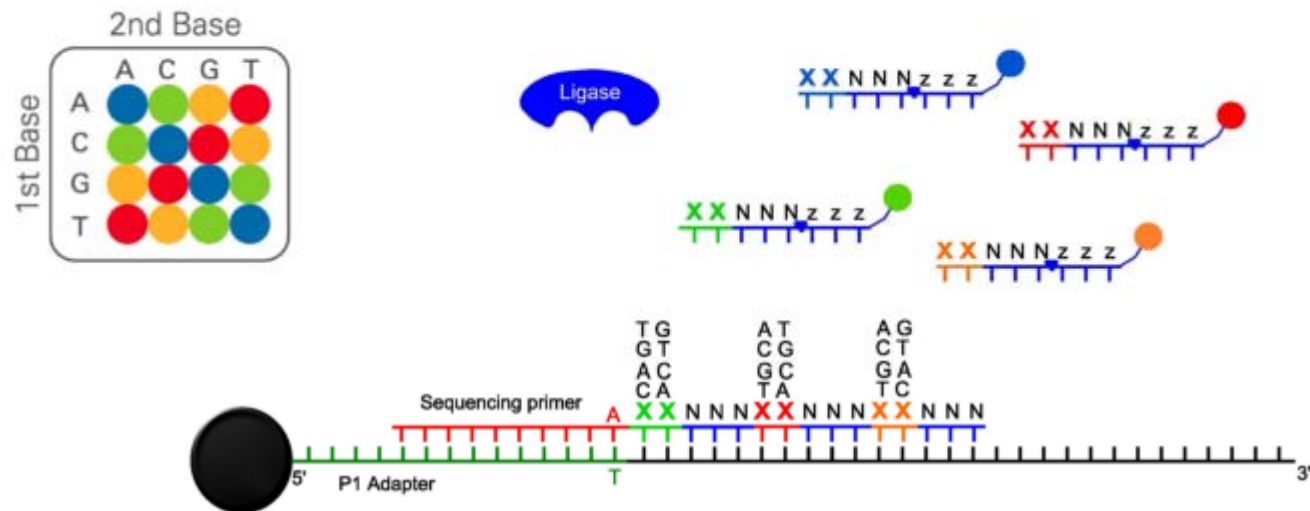
- **Primera Ronda de secuenciación.** ... Así, otra **sonda** es incorporada y se repite otra vez el procedimiento....



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

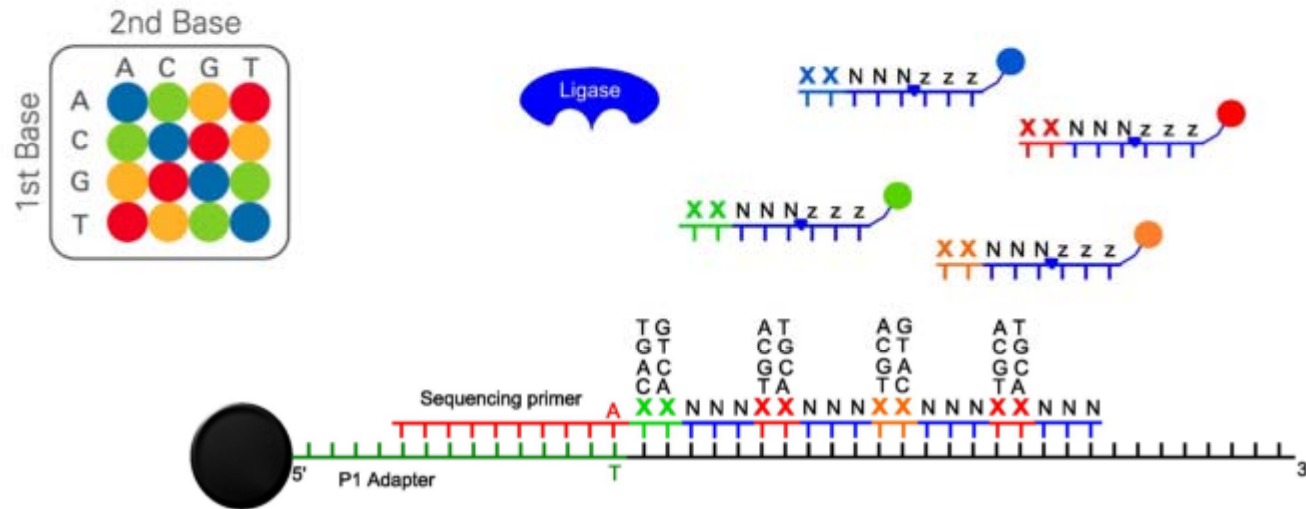
- **Primera Ronda de secuenciación.** ... Así, otra sonda es incorporada y se repite el procedimiento, introduciéndose una más....



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

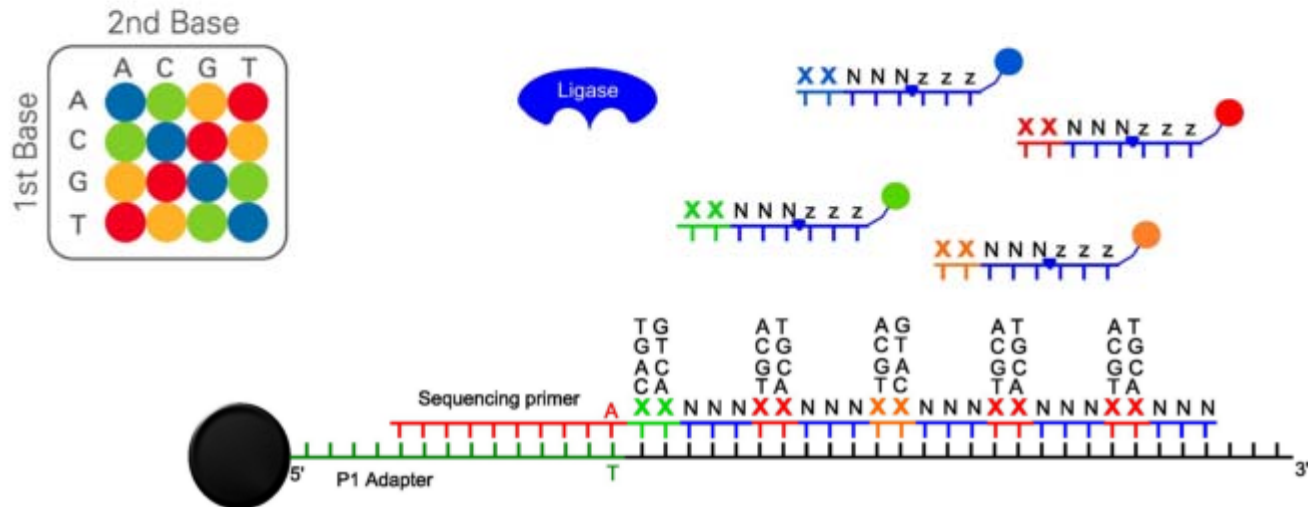
- **Primera Ronda de secuenciación.** ... Así, otra sonda es incorporada y se repite el procedimiento, introduciéndose una más, y otra....



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

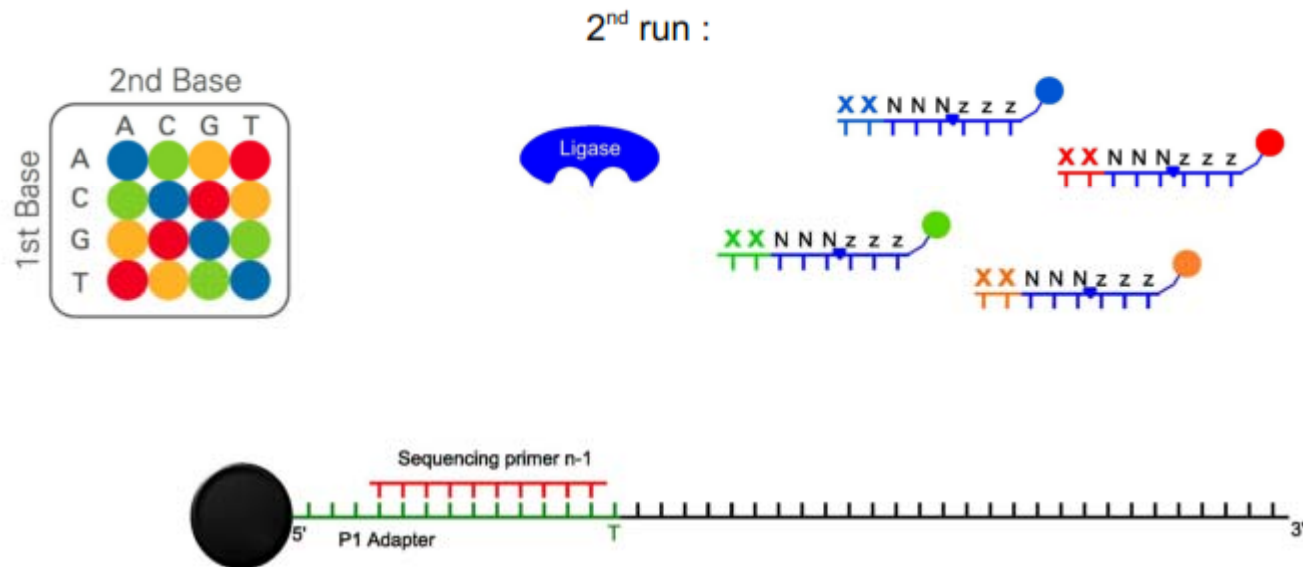
- **Primera Ronda de secuenciación.** ... Así, otra **sonda** es **incorporada** y se repite el procedimiento, **introduciéndose una más, y otra hasta completar** el molde....



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

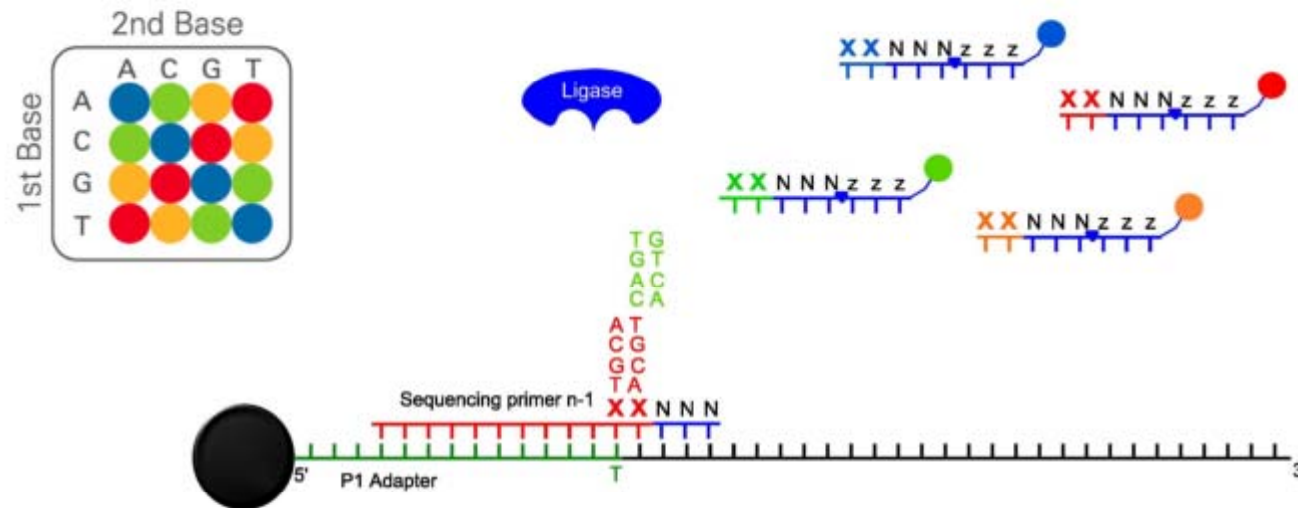
- **Segunda Ronda de secuenciación:** Finalmente, se **desnaturaliza** todo el **dsDNA** y se **inicia** una **nueva ronda de secuenciación** con un **nuevo primer** (hibrida en la secuencia adaptadora pero en una posición -1 respecto del *primer* utilizado en la primera ronda).



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

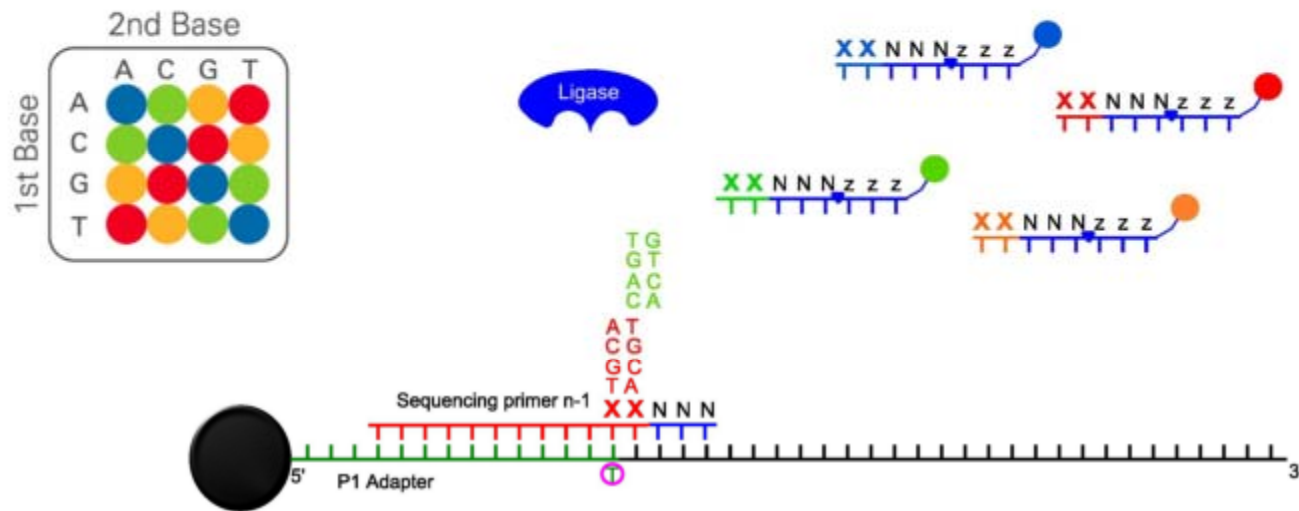
- **Segunda Ronda de secuenciación:** Cuando se **incorpora** una nueva **sonda** y se registra la **fluorescencia**...



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

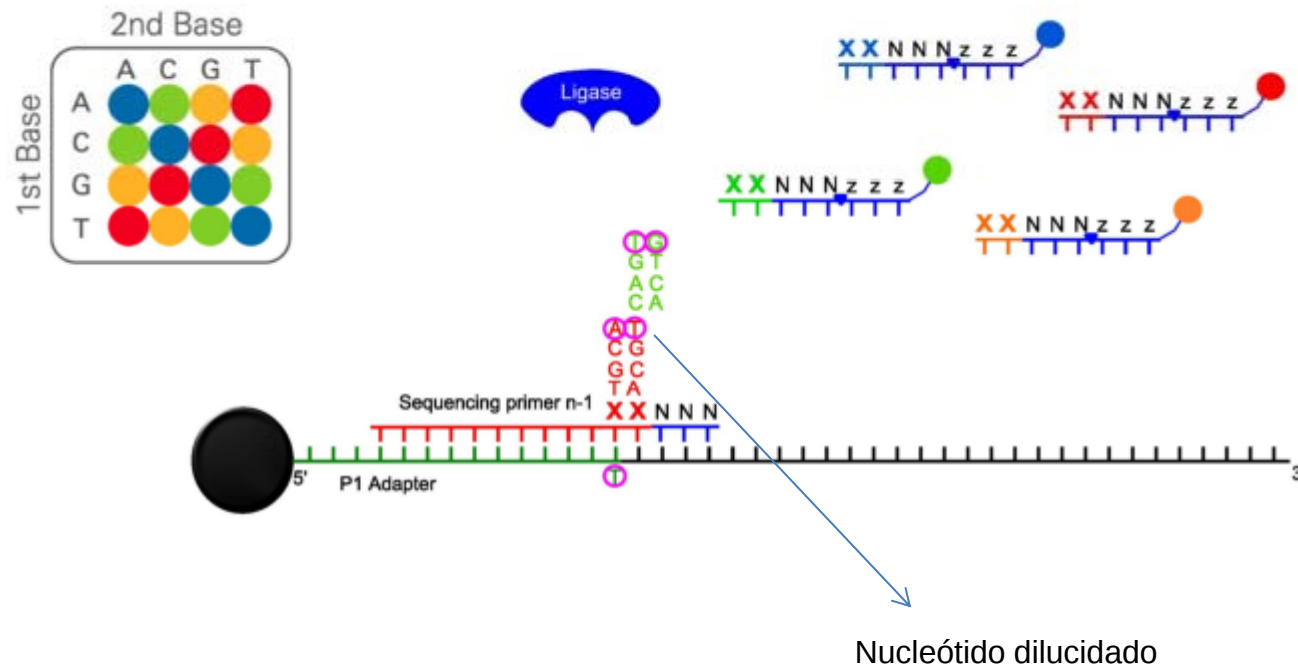
- **Segunda Ronda de secuenciación:** ... el **software** asociado al equipamiento **dilucida** cuál **nucleótido** se encuentra en el **DNA molde**...



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

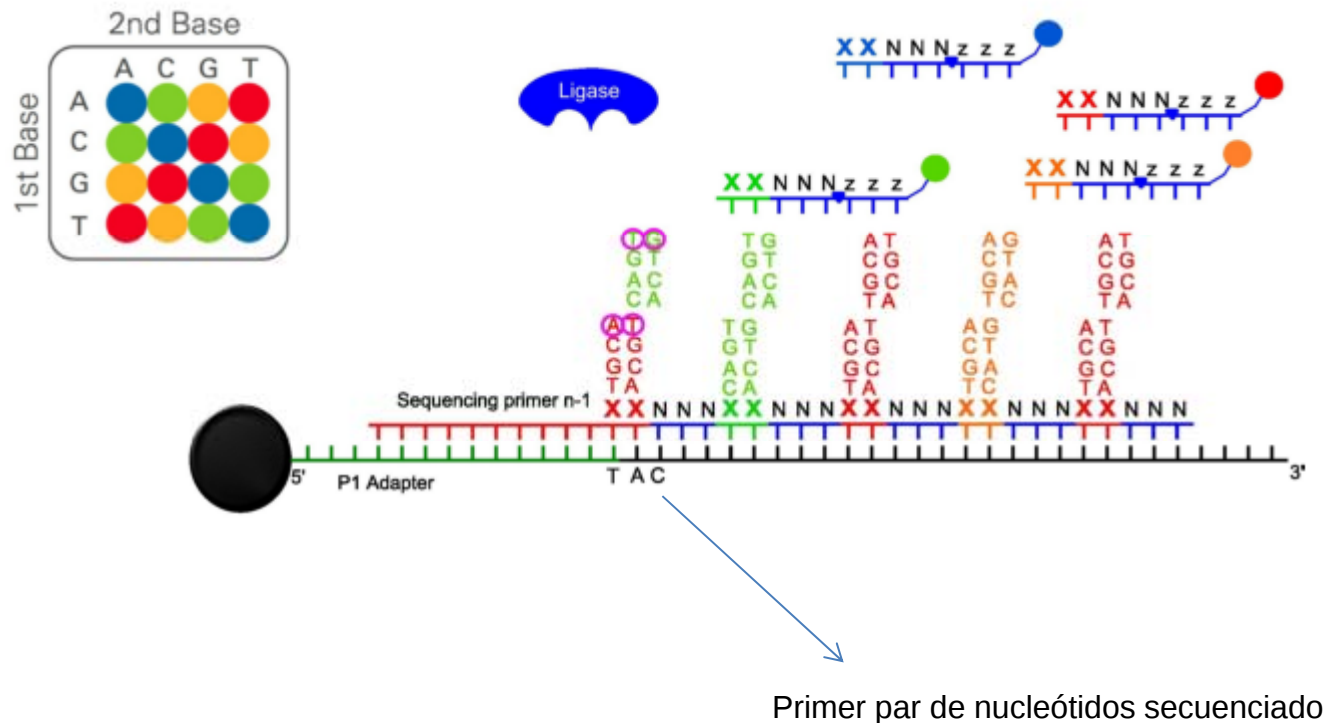
- **Segunda Ronda de secuenciación:** ... conociéndose así los primeros datos de **secuencia** del fragmento...



Adquisición de información genómica

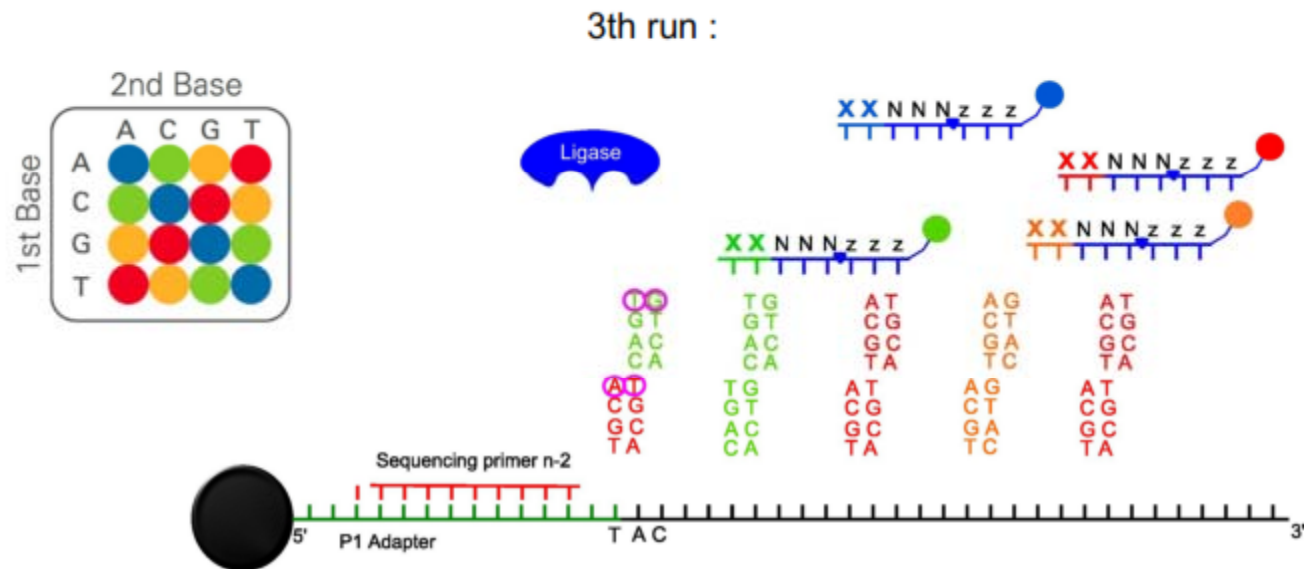
NGS: tecnología SOLID

- **Segunda Ronda de secuenciación:** ... conociéndose así los primeros datos de **secuencia** del fragmento...



NGS: tecnología SOLID

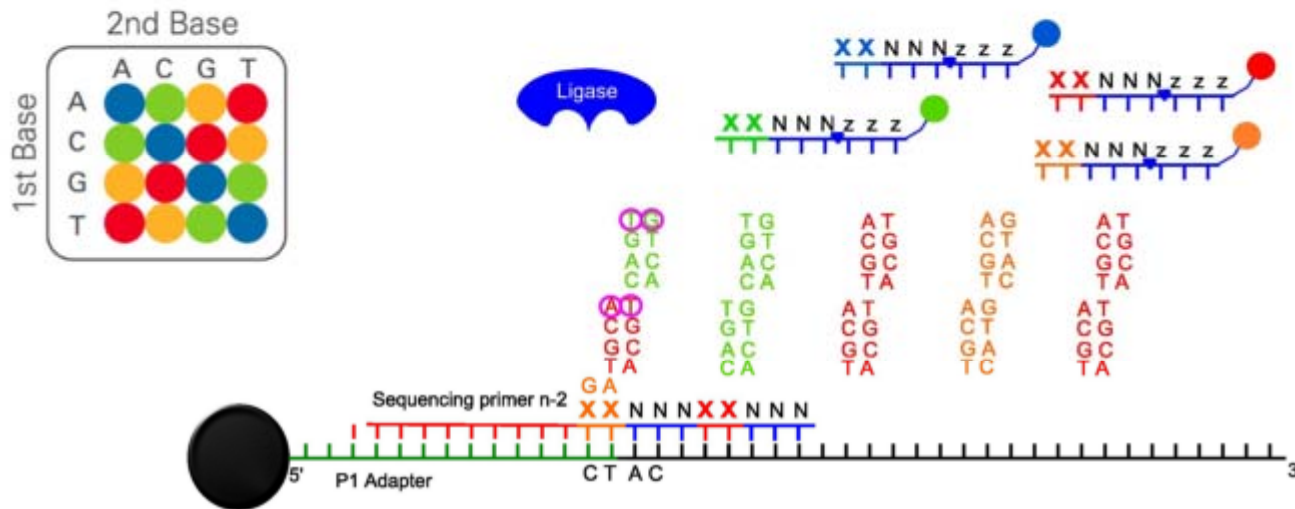
- **Tercera Ronda de secuenciación:** Nuevamente, se **desnaturaliza** todo el **dsDNA** y se **inicia** una **nueva ronda de secuenciación** con un **nuevo *primer*** (hibrida en la secuencia adaptadora pero en una posición -2 respecto del *primer* utilizado en la primera ronda).



Adquisición de información genómica

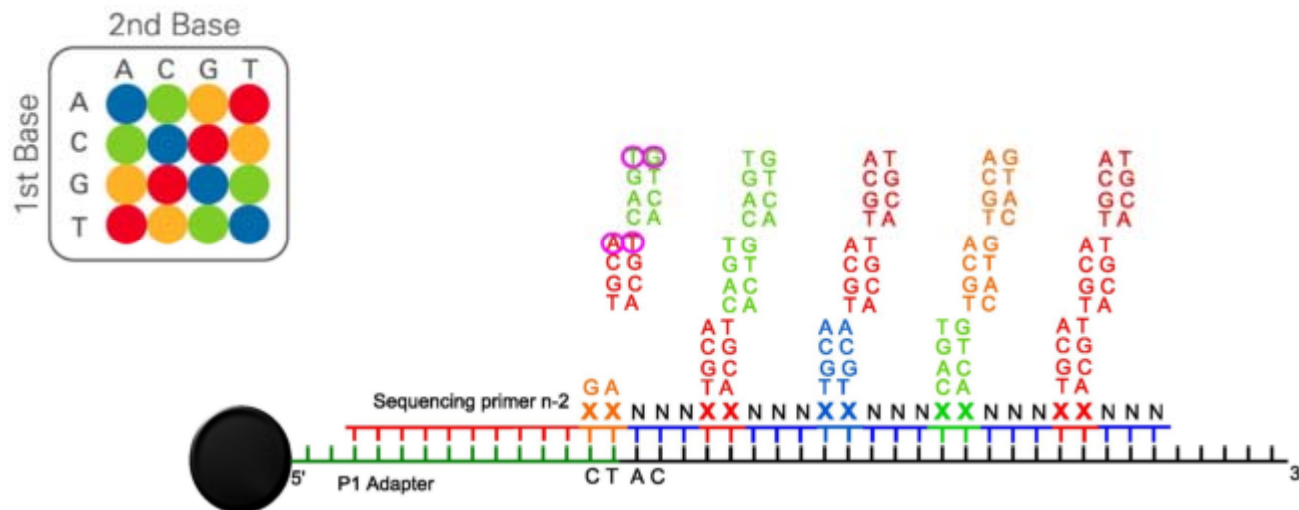
NGS: tecnología SOLID

- **Tercera Ronda de secuenciación:** El procedimiento se desarrolla del mismo modo que en las rondas anteriores...



NGS: tecnología SOLID

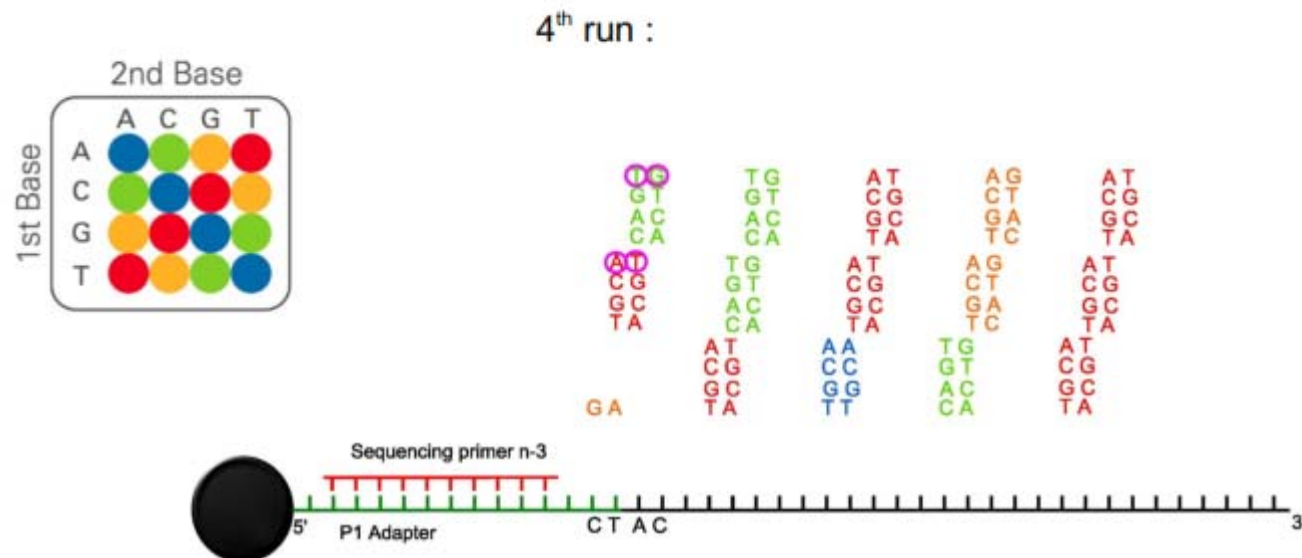
- **Tercera Ronda de secuenciación:** ...hasta **completar el molde...**



Adquisición de información genómica

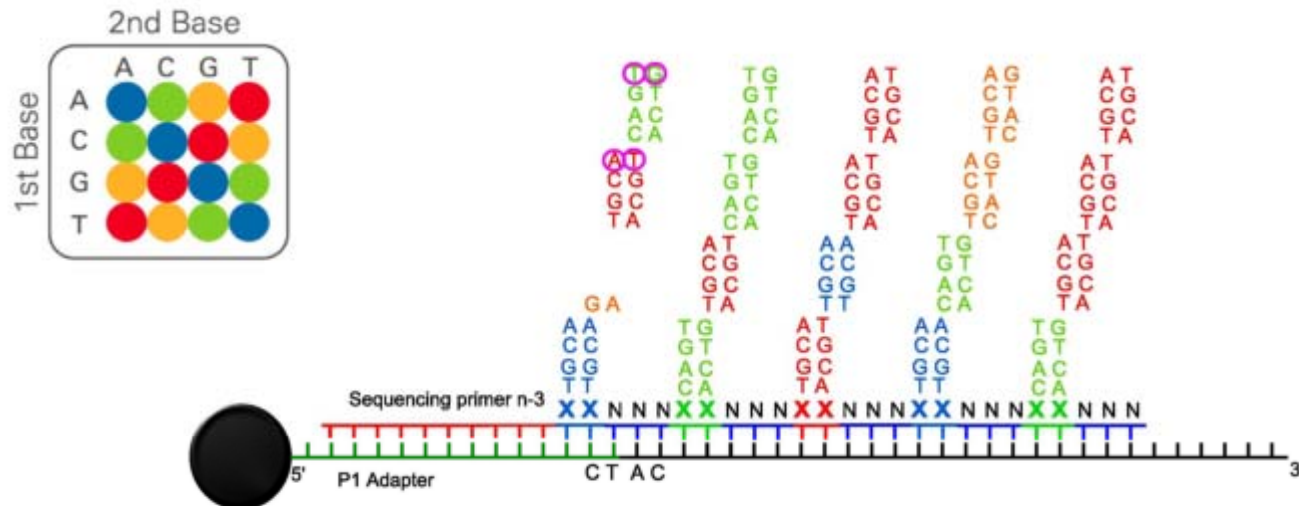
NGS: tecnología SOLiD

- **Cuarta Ronda de secuenciación:** Se **desnaturaliza** todo el **dsDNA** y se **inicia** una **nueva ronda de secuenciación** con un **nuevo *primer*** (hibrida en la secuencia adaptadora pero en una posición -3 respecto del *primer* utilizado en la primera ronda).



NGS: tecnología SOLID

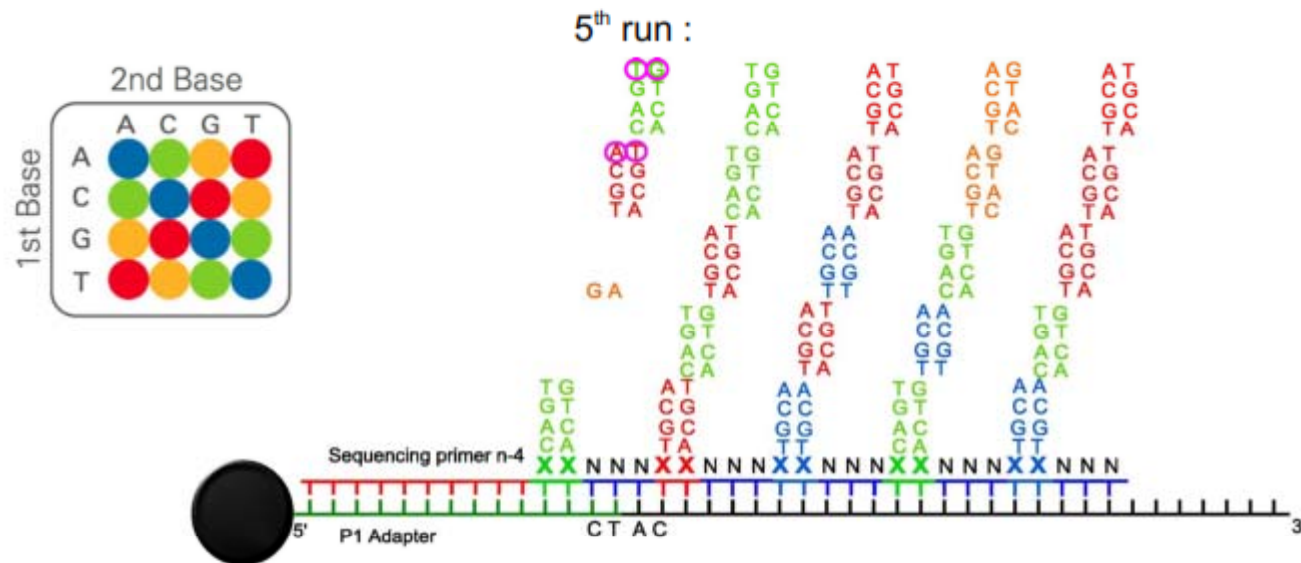
- **Cuarta Ronda de secuenciación:** ...repetiendo todo el procedimiento...



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID

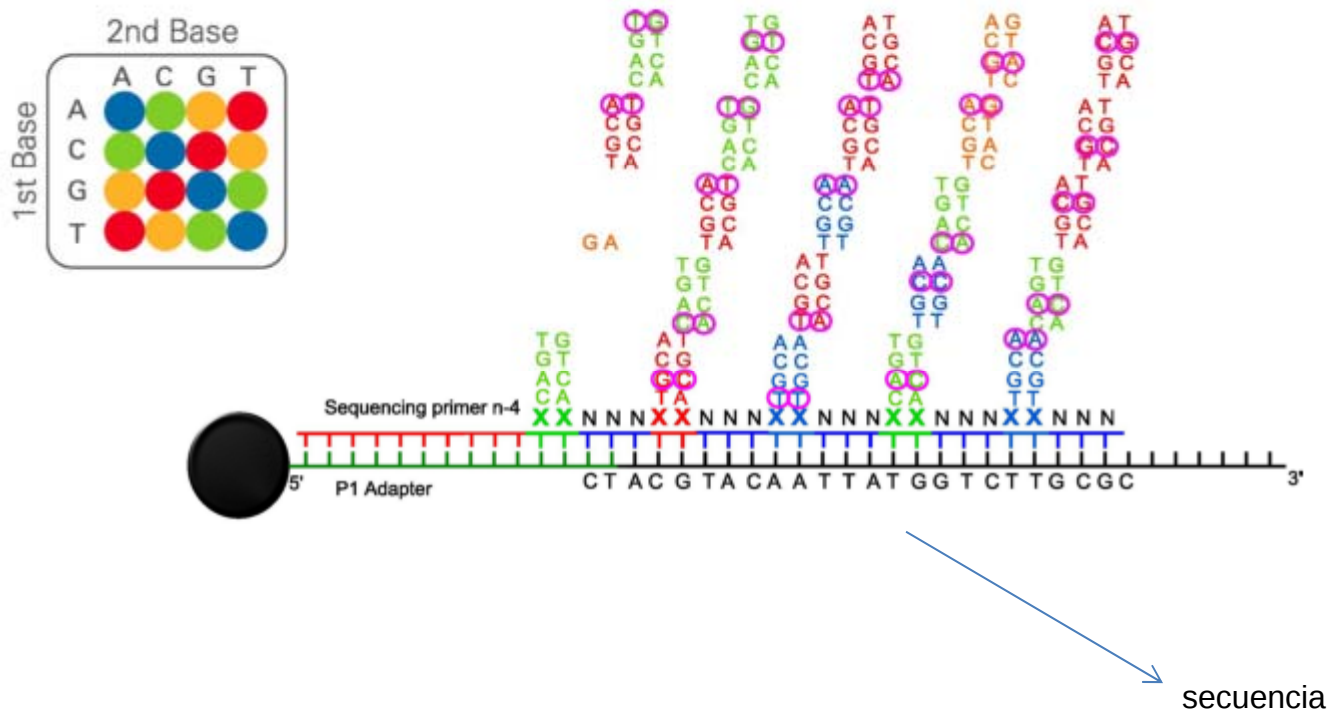
- **Quinta Ronda de secuenciación:** Del mismo modo, **siguen las** rondas con primers desplazados (en este caso *primer -4*)...



Adquisición de información genómica

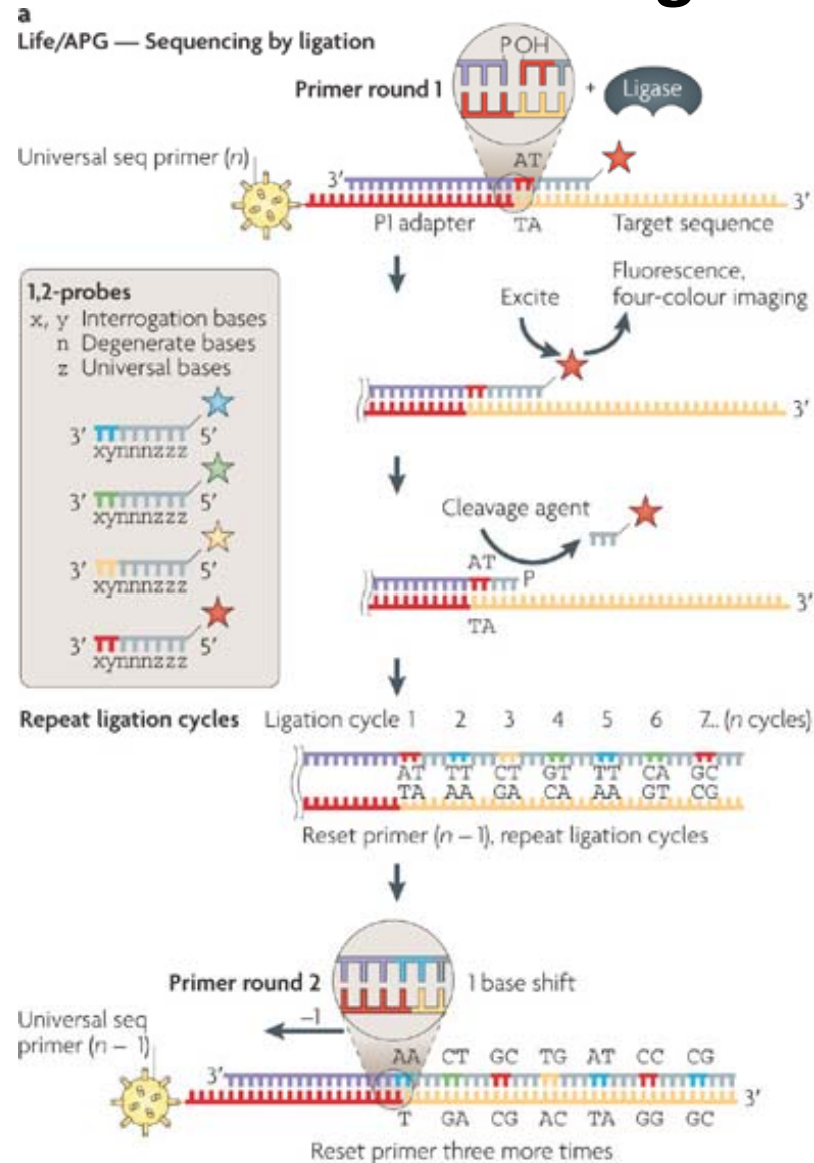
NGS: tecnología SOLID

- **Quinta Ronda de secuenciación:** ... continuándose interpretando cuál es la **secuencia del DNA molde**.



Adquisición de información genómica

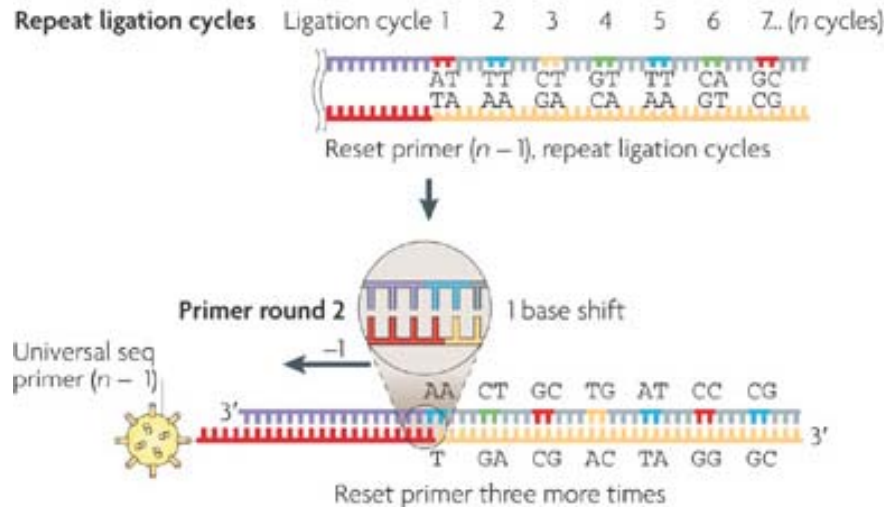
NGS: tecnología SOLID



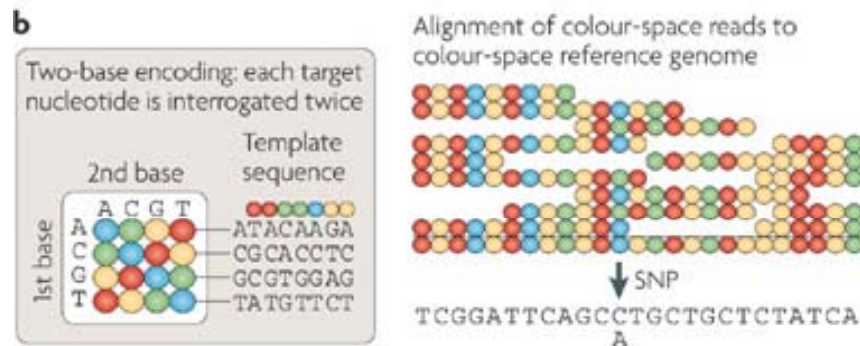
Resumen de la
reacción de
secuenciación
mediada por
ligación de
sondas
fluorescentes

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología SOLID



Resumen de la
reacción de
secuenciación
mediada por
ligación de
sondas
fluorescentes



Read Position		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1	Universal seq primer (n) 3'	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2	Universal seq primer (n-1) 3'	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3	Universal seq primer (n-2) 3'	Bridge Probe		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
4	Universal seq primer (n-3) 3'	Bridge Probe		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
5	Universal seq primer (n-4) 3'	Bridge Probe		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● Indicates positions of interrogation

Ligation Cycle: 1 2 3 4 5 6

Descripción de los métodos más utilizados clasificados dentro de las tecnologías NGS

Tecnología Ion Torrent

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

- La **tecnología Ion Torrent** se basa en un método de **secuenciación** basado en **semiconductores de iones**.
- Esta metodología **detecta** los **iones hidrógeno** liberados **luego** de un evento de **polimerización**. Por ende, es una **secuenciación** basada en **síntesis**.
- Esta tecnología **no utiliza** nucleótidos modificados ni está basada en **propiedades ópticas** de compuestos.
- La tecnología fue licenciada en el año **2010** y hoy en día es comercializada por ***Life Technologies***.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

PGM (Personal Genome Machine)



Proton



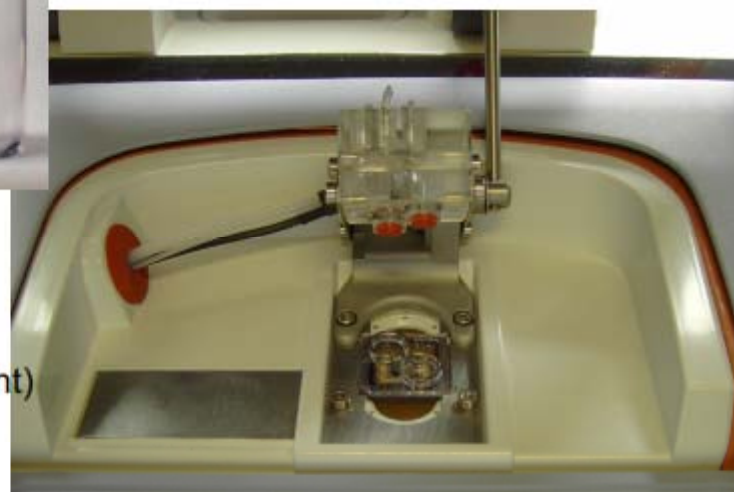
Equipamiento

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent



W1 bottle : 350 μ l 100 mM NaOH
W2 bottle : 2 liter W2 solution (contains detergent)
W3 bottle : 50 ml W3 (= buffer)
4 tubes with 20 μ l of the different dNTP's



Adquisición de información genómica

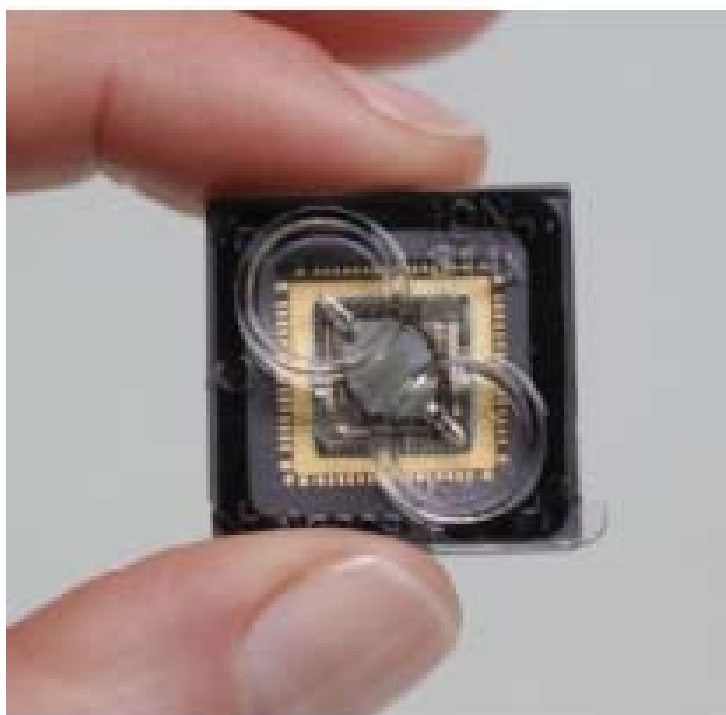
NGS: tecnología Ion Torrent

- Cuando se produce la **incorporación** de un **nucleótido** específico mediante **síntesis** en una reacción de polimerización es retenido en la cadena naciente el nucleósido monofosfato (base de la secuenciación automatizada de Sanger y de la aplicada por Illumina), y **se libera pirofosfato** (base de la pirosecuenciación y de la tecnología 454) y **un ión hidrógeno**.
- El **ión hidrógeno cambiará** en consecuencia el **pH** del entorno, señal que si es registrada permitirá identificar que el ssDNA molde que está siendo secuenciado posee un nucleótido complementario al incorporado.
- Mediante un **ISFET** (*Ion Sensitive Field Effect Transistor*) es posible registrar tales sutiles cambios del pH reportando una señal eléctrica.
- Si a su vez se dispone un **CMOS** (*Complementary metal-oxide-semiconductor*), se termina conformando un **chip** similar a los utilizados en la industria de la electrónica.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

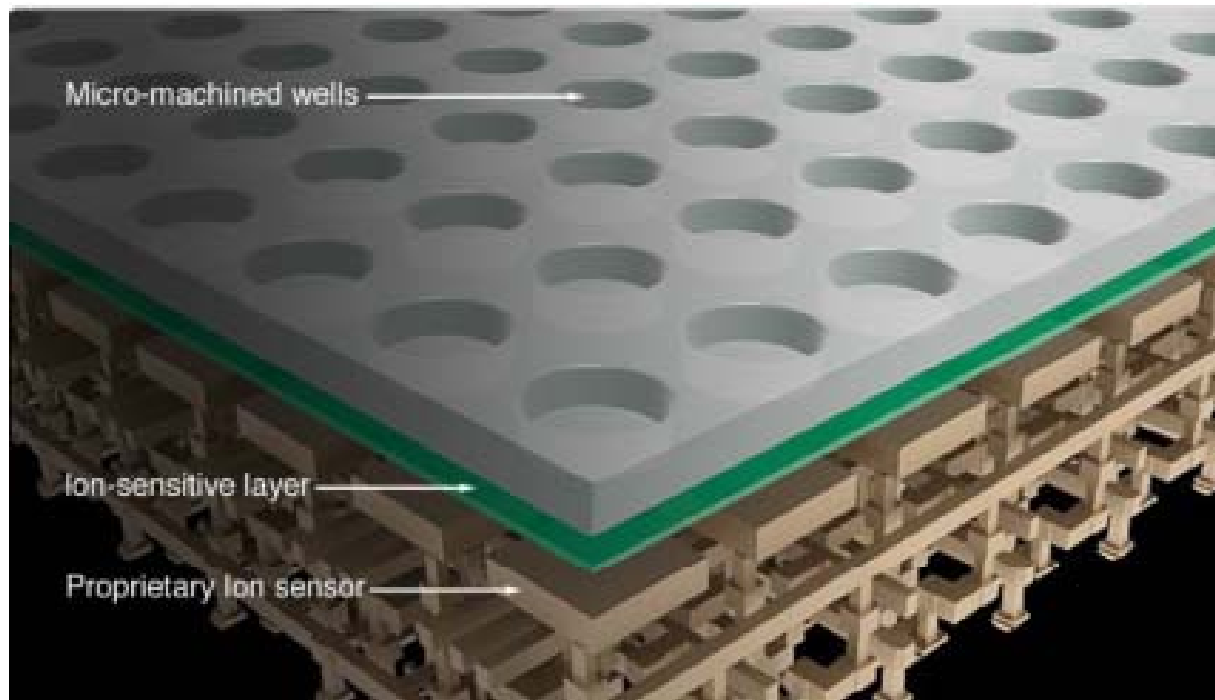
Dimensiones del *chip*



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

Características del *chip*...

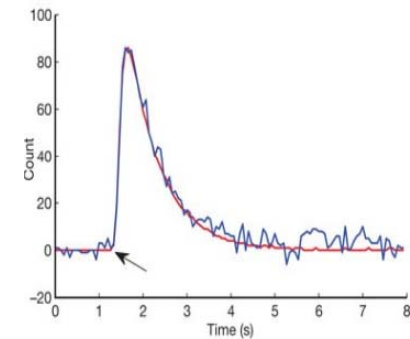
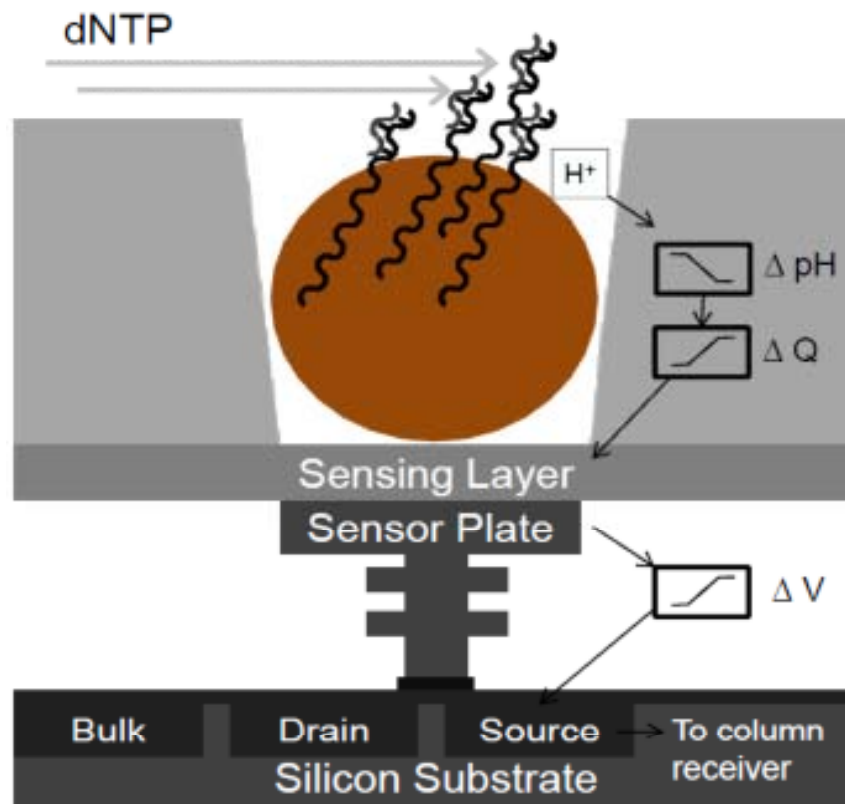


Esta **tecnología** está confeccionada para utilizar **bibliotecas** construidas en **microesferas**, las cuales serán incorporadas a cada *micro-well*.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

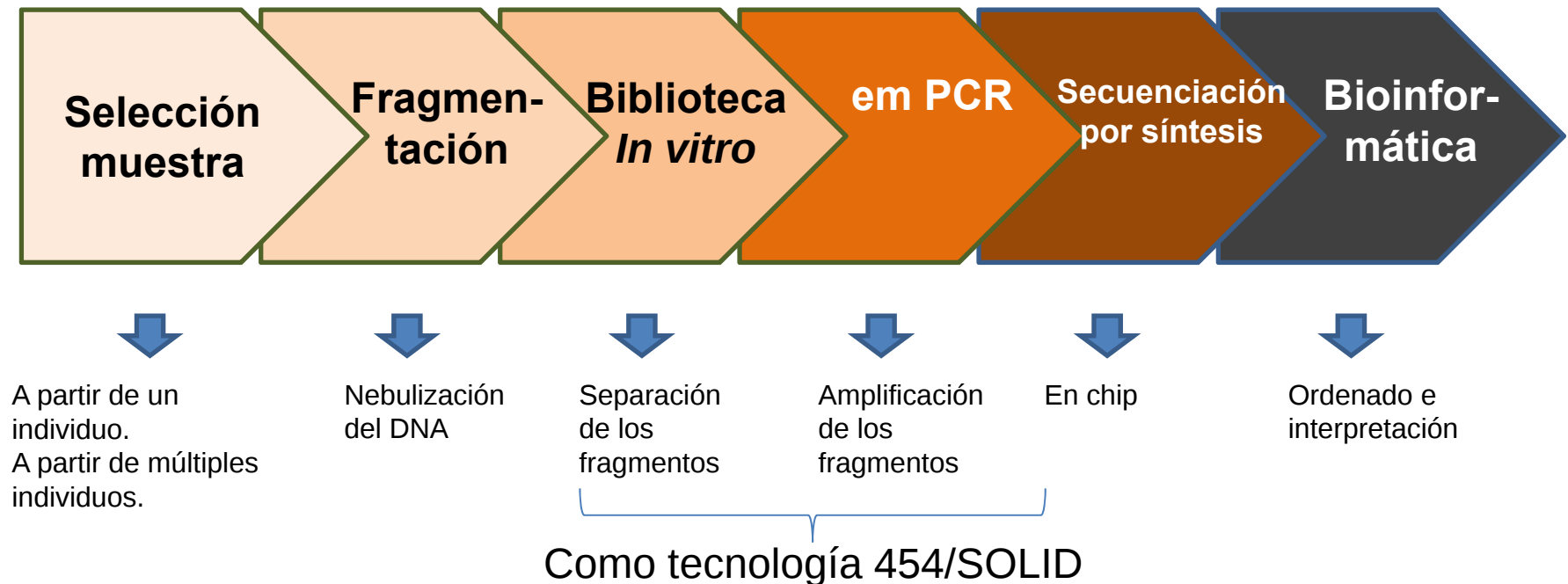
Bases de la detección de un nucleótido incorporado...



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

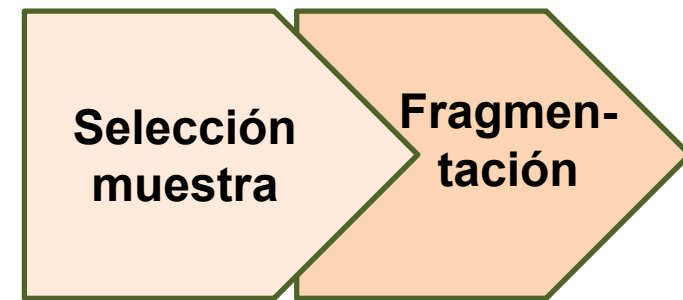
Etapas involucradas en la tecnología *Ion Torrent*



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

Etapas involucradas en la tecnología *Ion Torrent*



A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

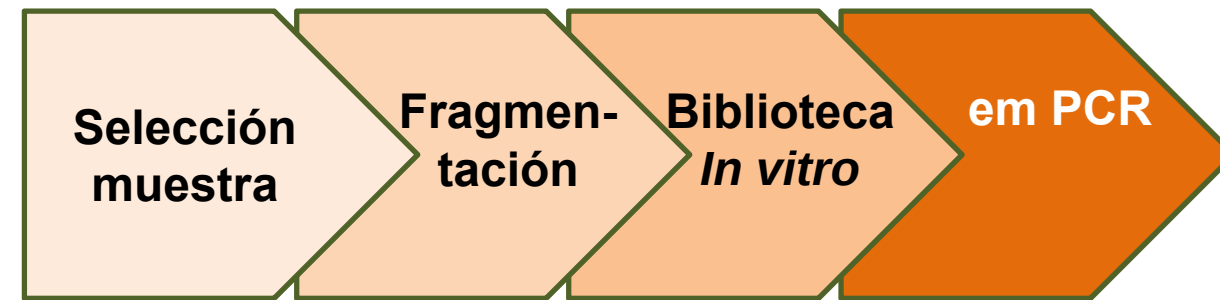
Nebulización del DNA

Se puede partir de **10 ng de gDNA**.
Los fragmentos deben tener un tamaño de entre **100-200 pb**.
A los fragmentos se le ligan **adaptadores**.

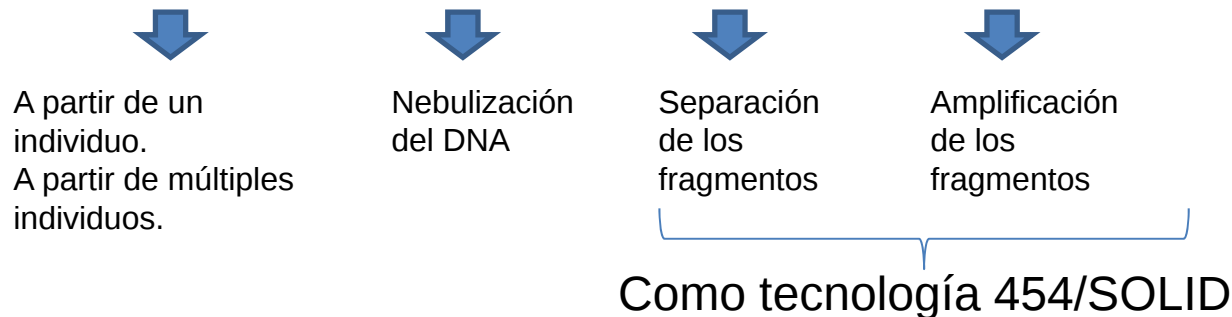
Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

Etapas involucradas en la tecnología *Ion Torrent*

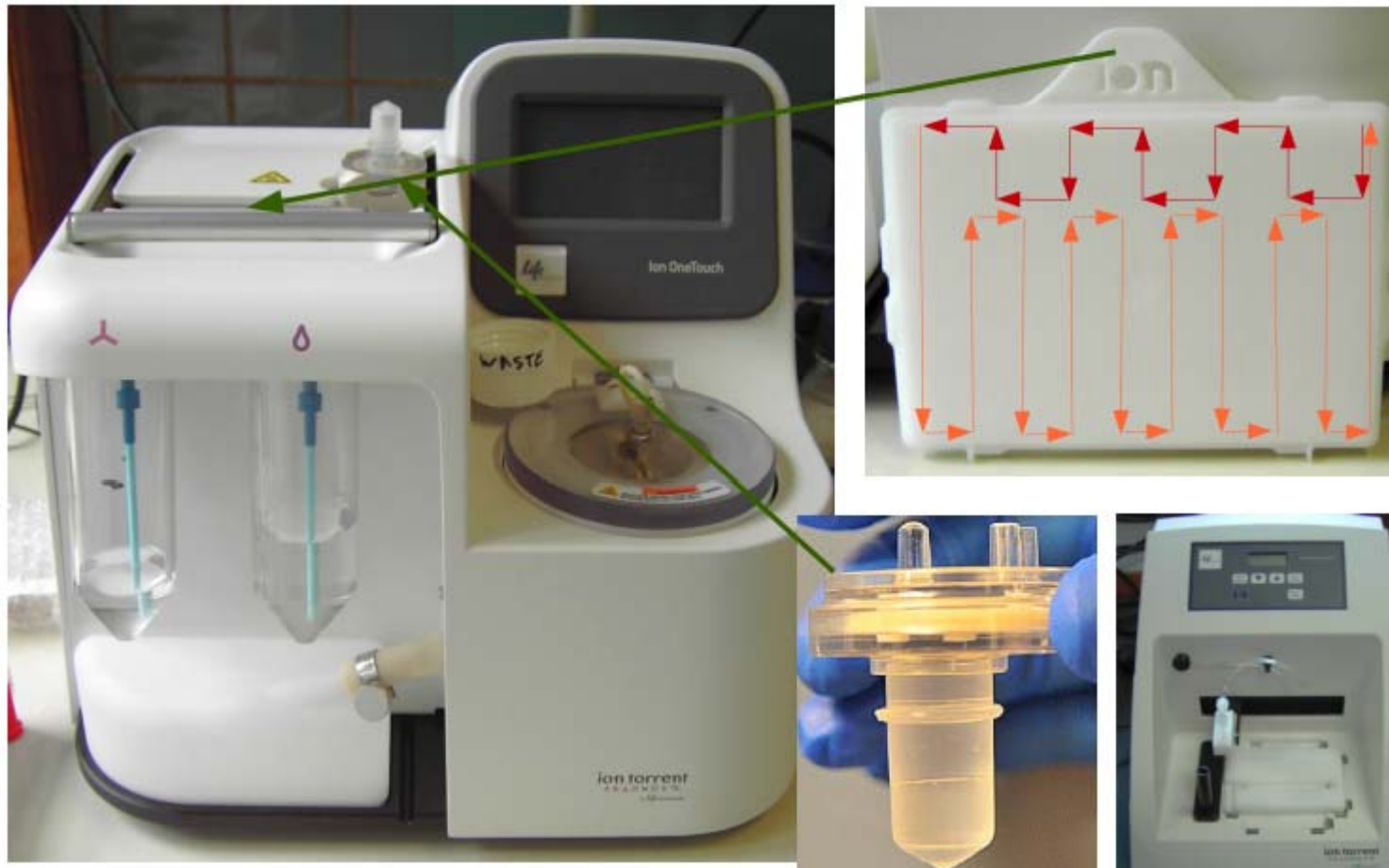


Se utilizan procedimientos similares a los realizados para **454** y **SOLID**



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent



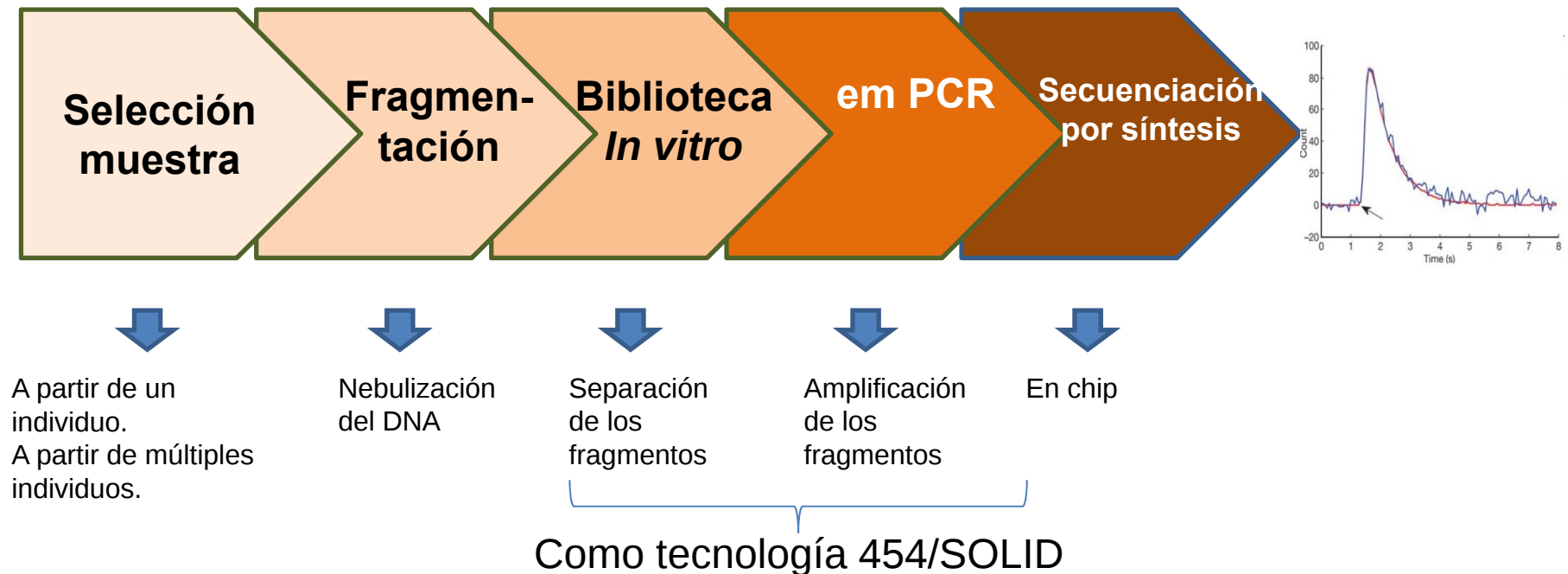
15 min hands-on; 4 hours amplification; 35 min enrichment

Equipamiento para **em-PCR** para tecnología Ion Torrent

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

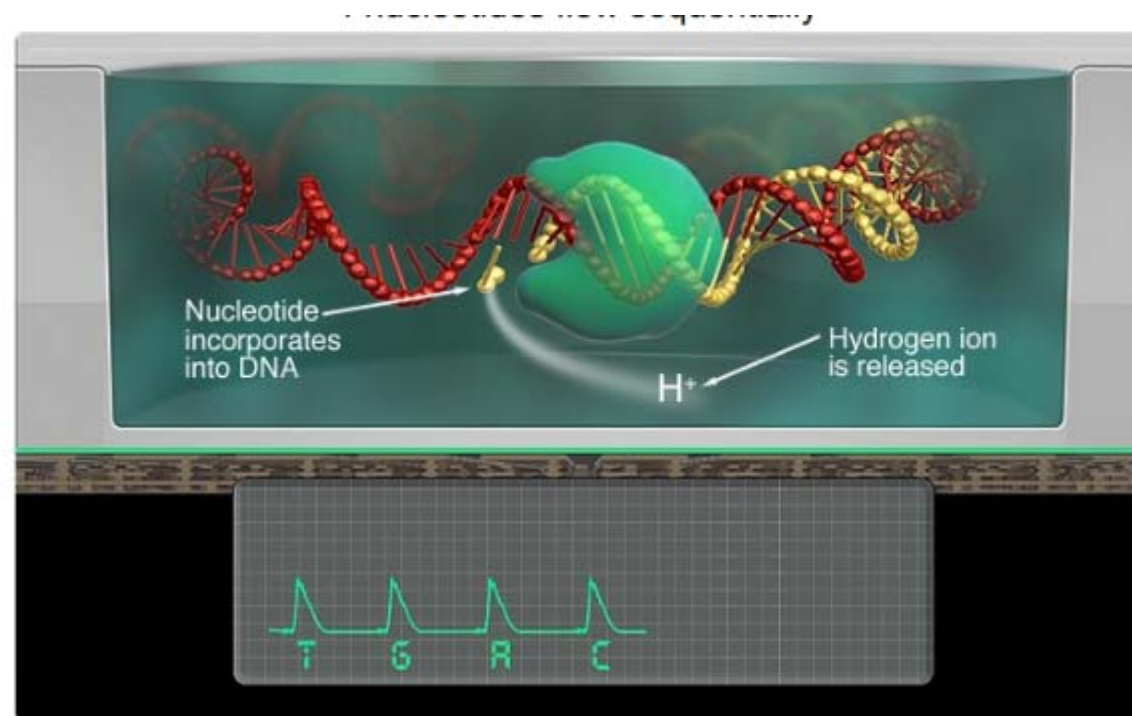
Etapas involucradas en la tecnología *Ion Torrent*



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

- Sobre el **chip** circula una **mezcla de síntesis** (DNA polimerasa, *primer*, 1 dNTP) en pulsos. Si el **nucleótido se incorpora, se libera H^+** . Esto altera el **pH**, lo cual es **sensado** por el **IFSET**, transmitiéndose un voltaje por el semiconductor.

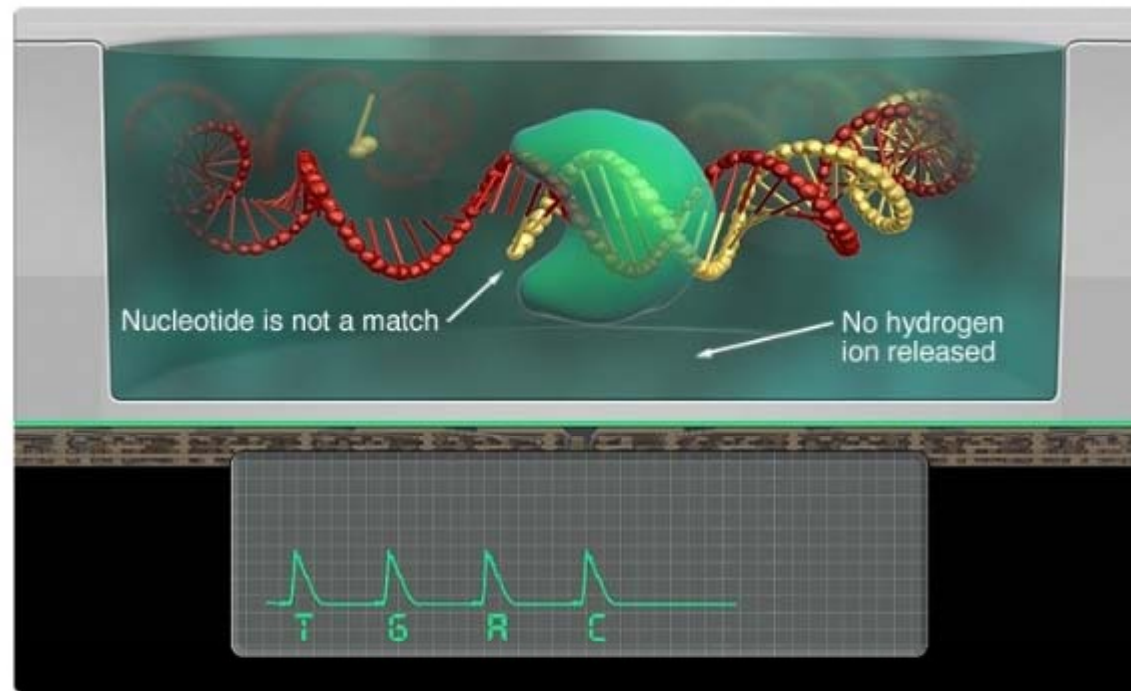


No camera, just a pH sensor

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

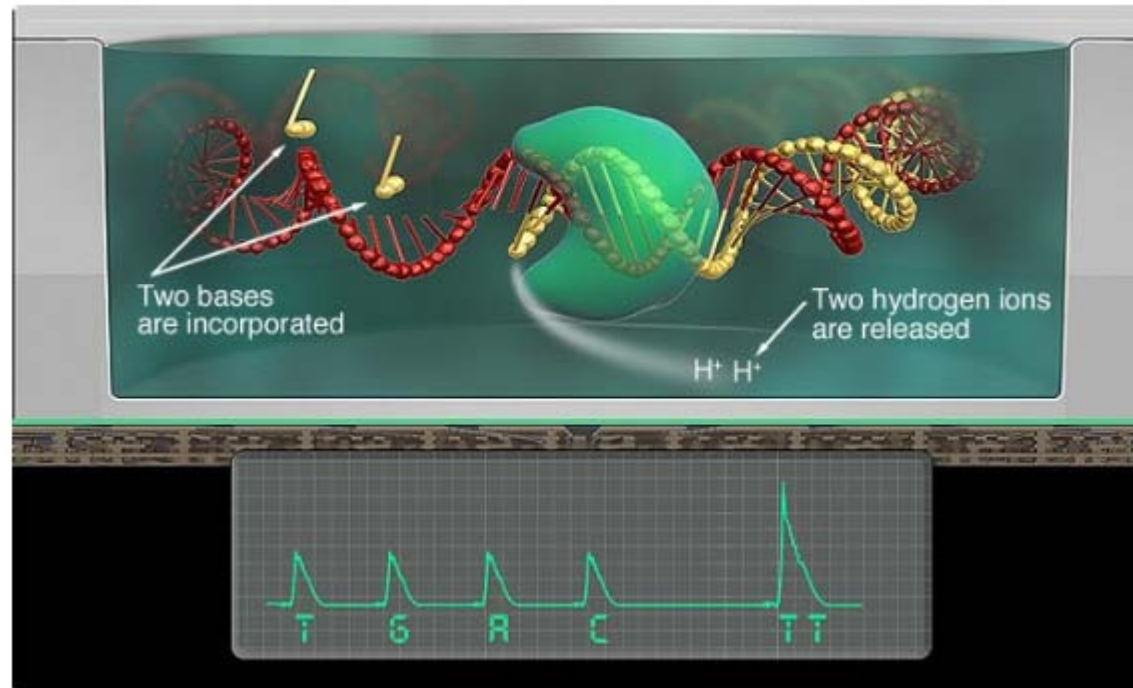
- Cuando se introduce un **dNTP que no se incorpora**, no hay **cambio de pH** y por ende no existe señal eléctrica en dicho *microwell*..



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología Ion Torrent

- Y cuando se introduce un **dNTP** que se incorpora dos veces, el cambio de **pH** es mayor y por ende la señal eléctrica en dicho *microwell* también lo será, interpretándose correctamente.



Descripción de los métodos clasificados dentro de las tecnologías NGS de tercera generación

Tecnología PacBio

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

- **Simple Molecule Real Time sequencing (SMRT)** son procedimientos de secuenciación de moléculas de DNA en tiempo real **sin pasos de amplificación**.
- Las **tecnologías SMRT** se consideran **NGS de tercera generación**, y la primera disponible comercialmente fue la desarrollada por **Pacific Biosciences** en **2011**.
- Esta tecnología se denomina **PacBio**, y está **basada** en **síntesis** con **dNTPs** marcados con **fluoróforos** y en la **lectura** usando la **guía de ondas en modo cero**, o **ZMW** (*zero-mode waveguide*)*.
- La **ZMW** es una **estructura nanofotónica** que **reduce** el **volumen de observación** en más de tres órdenes de magnitud relativo a la microscopia confocal (volúmenes de zeptolitros, 10^{-21} L), posibilitando que no existan pasos previos de amplificación.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

- Las **tecnologías SMRT** secuencian **moléculas originales** de la **muestra**.
- Esto es una **ventaja** dado que la **lectura** se realiza sobre la **molécula sintetizada *in vivo***.
- Pero por otro lado, la **principal restricción** está dada en que la **muestra de dsDNA** debe ser de **muy alta calidad**.
- Esto es, **libre de contaminantes** (ssDNA, RNA, proteínas, sales, solventes orgánicos) y con **alto grado de integridad** (ausencia de *nicks*, de dímeros entre bases).
- La **muestra de dsDNA** no debe ser sometida a **altas temperaturas** (>65°C), ni **pHs extremos** (menores que 6 o mayores que 9). **No debe tener intercalantes** ni haber sido expuesta a **radiación UV**.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

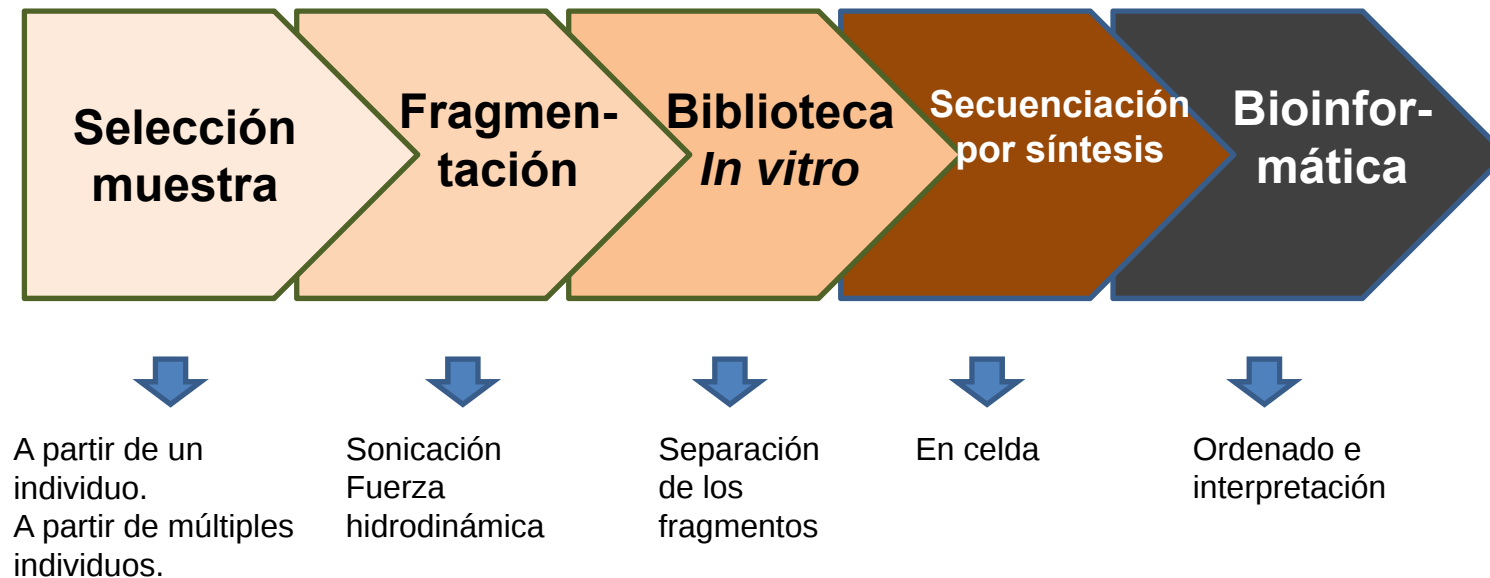


Equipamiento (PacBio RSII)

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

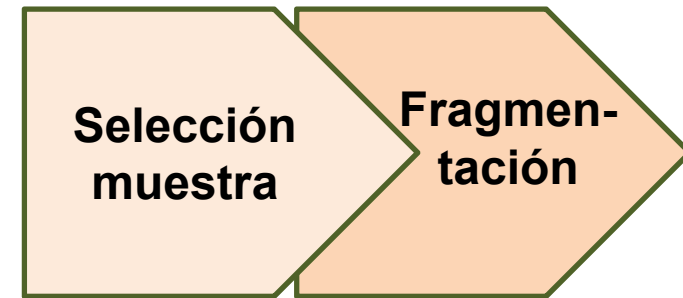
Etapas involucradas en la tecnología *PacBio*



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

Etapas involucradas en la tecnología *PacBio*



A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

Sonicación
Fuerza
hidrodinámica

El gDNA debe tener una masa de 500 ng (para fragmentos de 500 pb), de 1 μ g (para fragmentos de 1 kpb o de 2 kpb), de 4 μ g (para fragmentos de 5 kpb), de 10 μ g (para fragmentos de 10 kpb).

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

- La **fragmentación** del gDNA debe ser **muy controlada** y sin generarse cambios drásticos de temperatura. Además, los fragmentos serán de mayor longitud que los utilizados por las NGS de segunda generación (mayores a 800 pb).
- Ante esta situación, en preferencia a la nebulización, la tecnología *PacBio* requiere otros procedimientos, basados en **sonicación**.



M220 ultrasonicator

ultrasonido



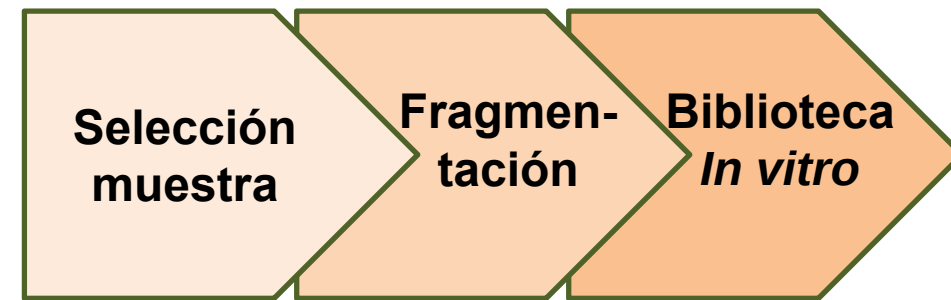
HydroShear

Fuerzas
hidrodinámicas

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

Etapas involucradas en la tecnología *PacBio*



↓

A partir de un individuo.
A partir de múltiples individuos.

↓

Sonicación
Fuerza
hidrodinámica

↓

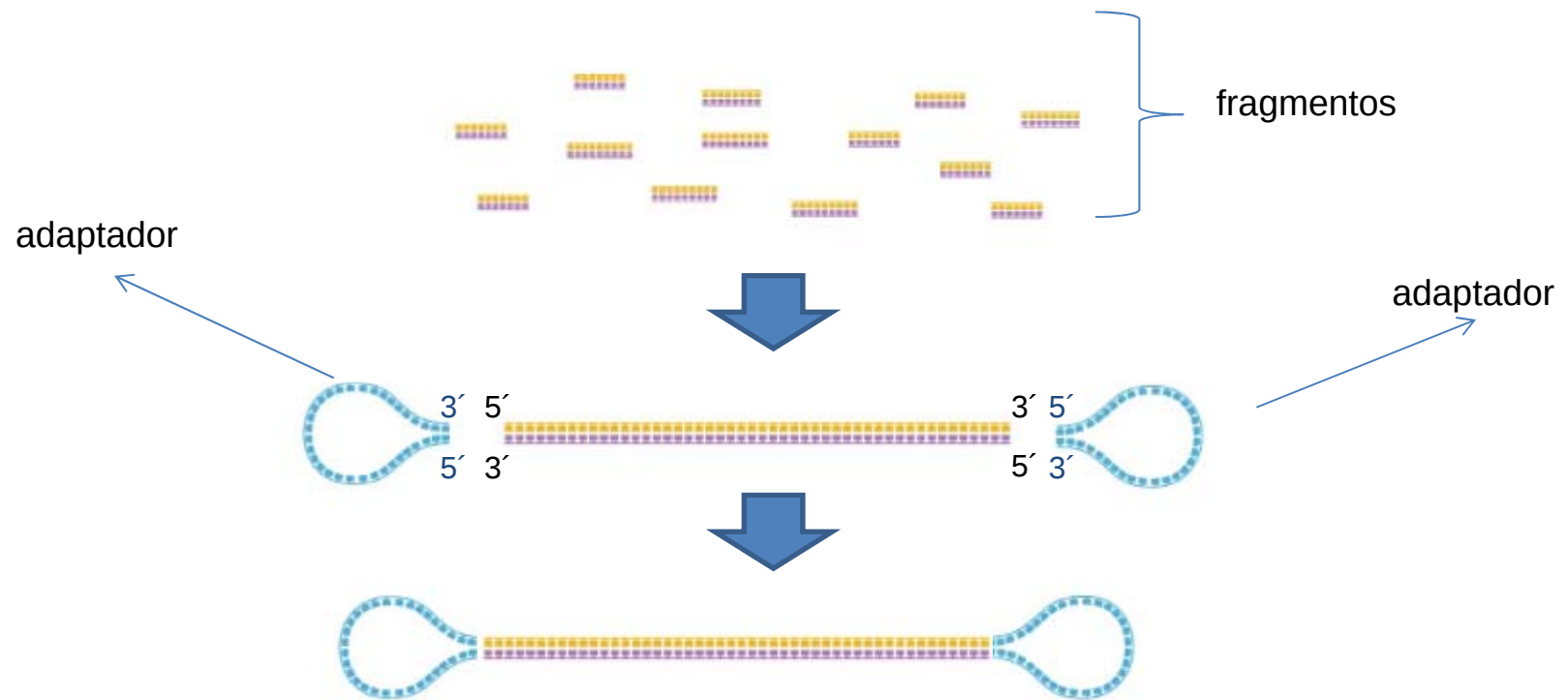
Separación
de los
fragmentos

El gDNA fragmentado (generalmente de 2 kpb) es reparado enzimáticamente en sus extremos para transformarlos en romos o apto para ligación TA.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

- Luego de disponer de los fragmentos de dsDNA de alrededor de 2 kpb y con extremos romos, se procede a la **ligación de adaptadores**.
- Los **adaptadores** tienen **estructura de horquilla** (*hairpin*).



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

Ejemplo de secuencias adaptadoras...

5-GTACGGGTCTCACCCGGTTAACTGCACCTGCATTAA-3

5-CCTAAGGTCTCGGAAGGAAATTATTTGAAAAAAGA-3

Adquisición de información genómica

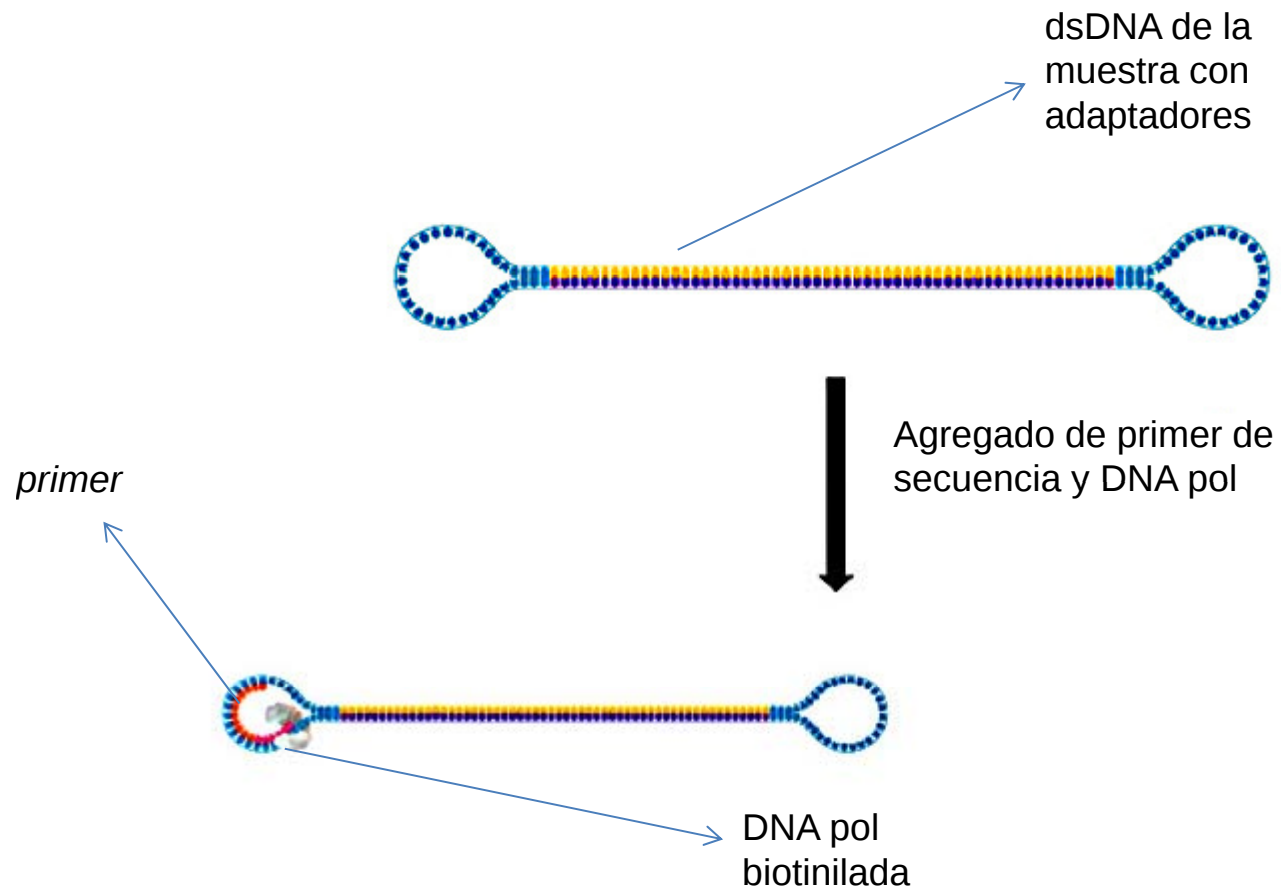
NGS: tecnología PacBio

- **Luego** de tener los fragmentos con los extremos modificados, se debe **agregar** el ***primer*** de secuencia para que suceda el *annealing* con el adaptador.
- **Posteriormente**, se agrega la **DNA polimerasa (ϕ 29)** para que se forme el complejo, la cual posee unida **biotina**.
- La polimerasa **ϕ 29** es codificada por el fago del mismo nombre que multiplica en ***Bacillus subtilis***.
- Esta polimerasa es muy **procesiva**, tiene **actividad correctora de pruebas** y tiene **mayor preferencia** por el **ssDNA**, simulando una actividad helicasa en el proceso de síntesis.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

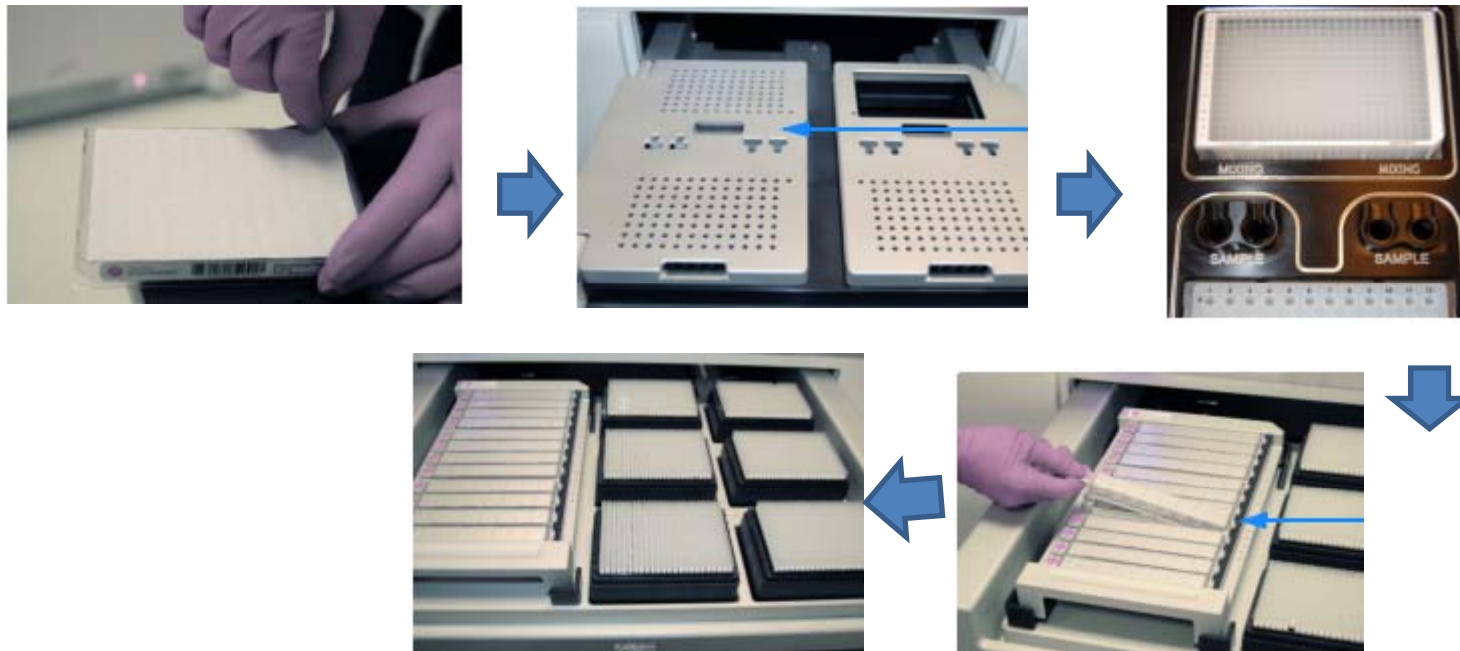
- La **DNA pol** se une al DNA, previamente complejoado con el ***primer***.



Adquisición de información genómica

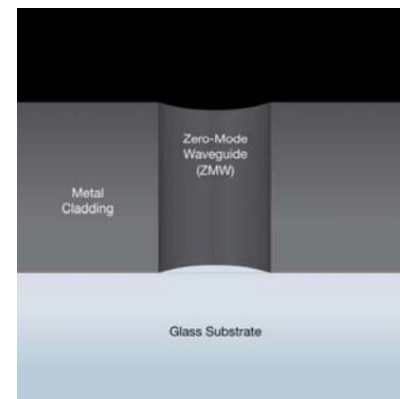
NGS: tecnología PacBio

- La **muestra** así preparada (sin dNTPs) es **depositada** en **placas de 96 wells**.
- **Luego** cada una de las placas **son dispuestas en el equipo**, el cual se encarga de disponer los **complejos de DNA/Enzima** en pequeños orificios (**ZMW**) de una **celda**. Solo queda **un complejo por celda**.



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

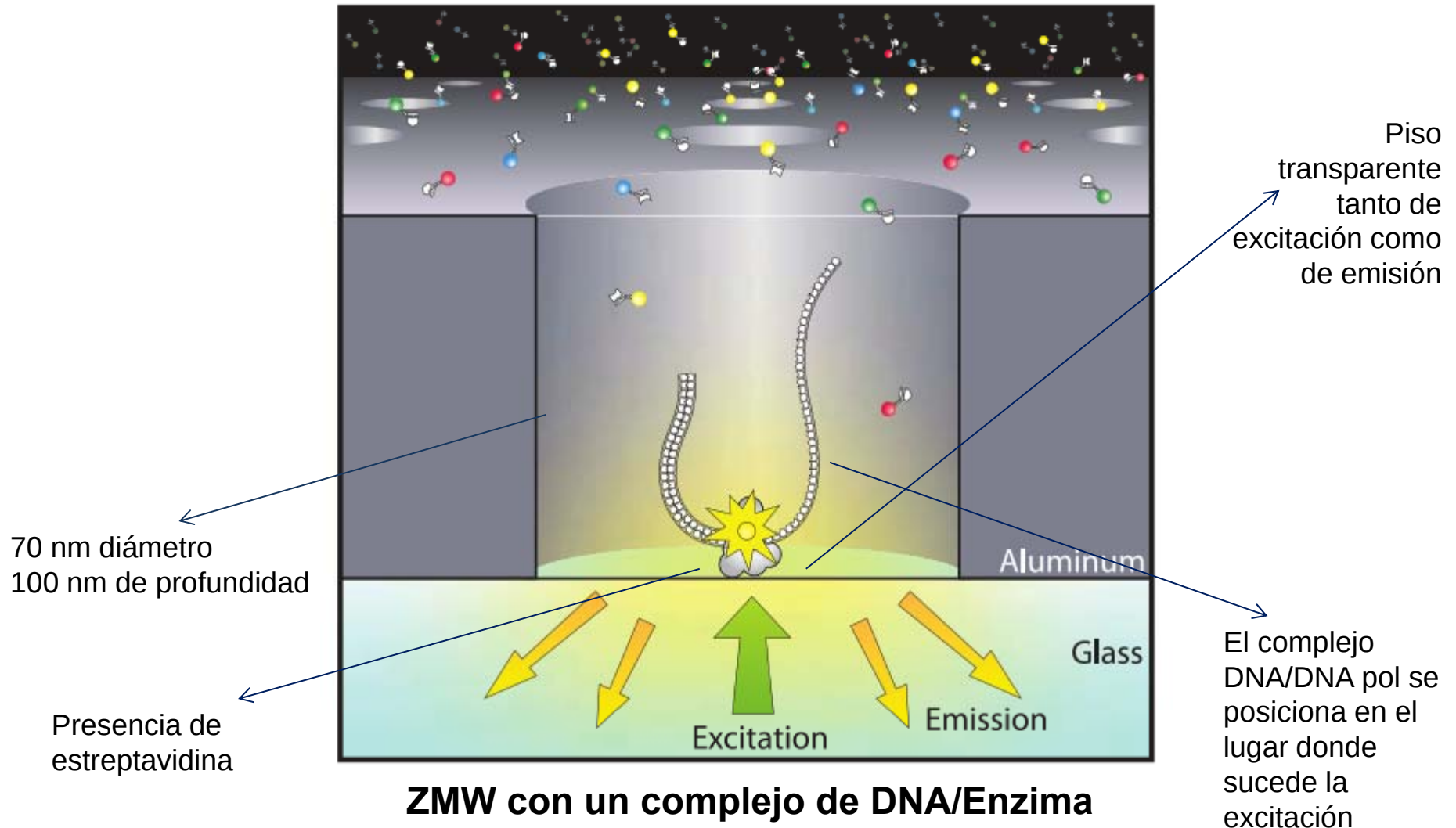


ZMW

Celdas con ZMWs (alrededor de 150000)

Adquisición de información genómica

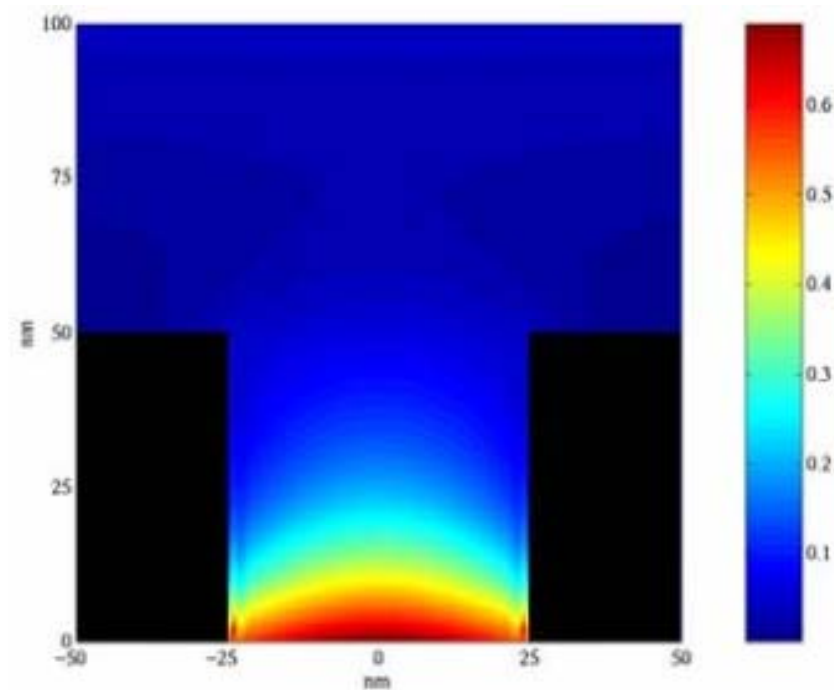
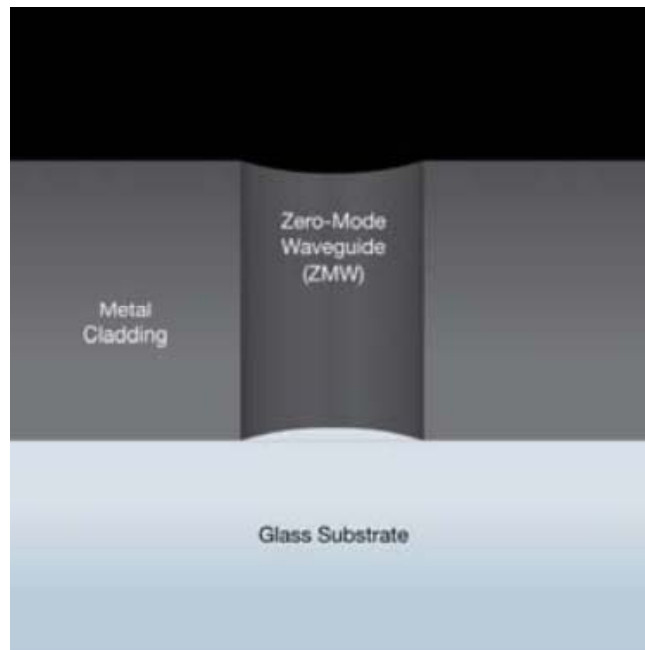
NGS: tecnología PacBio



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

- Los **orificios** realizados sobre el aluminio **son tan pequeños**, que cuando la **luz** **ingresa sólo penetra los 20-30 nm** de la parte inferior.

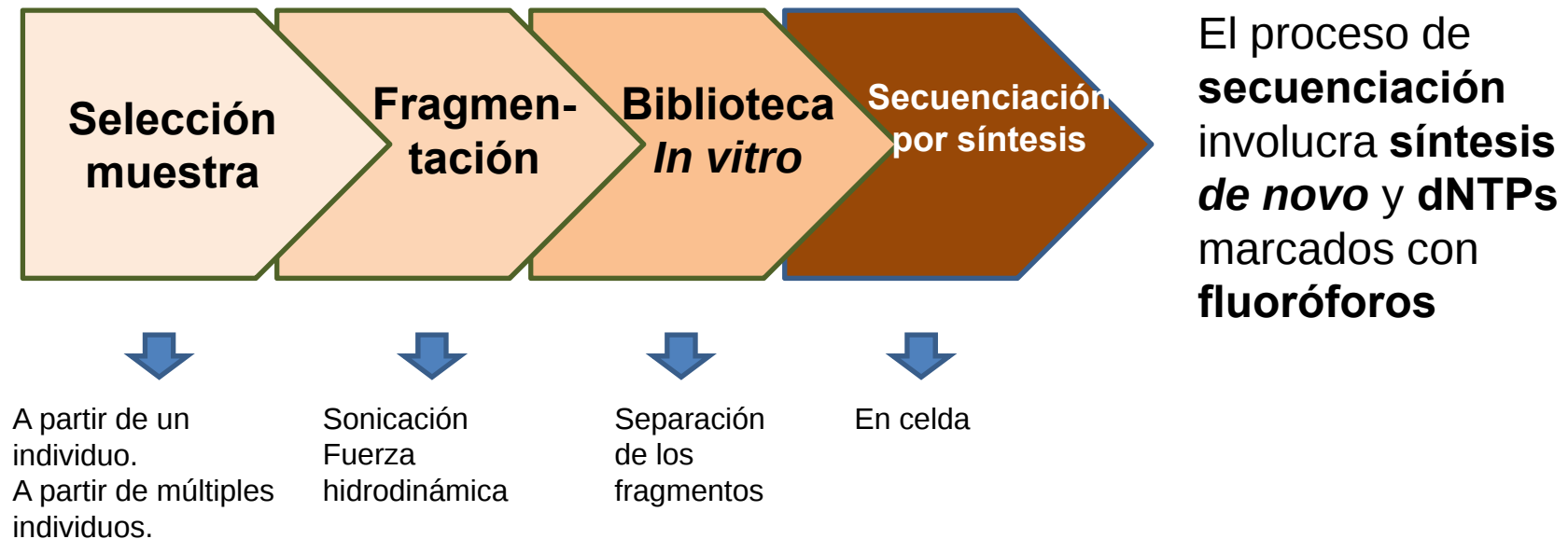


- Esto deriva que el **volumen de detección** sea de **20 zeptolitros**.

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

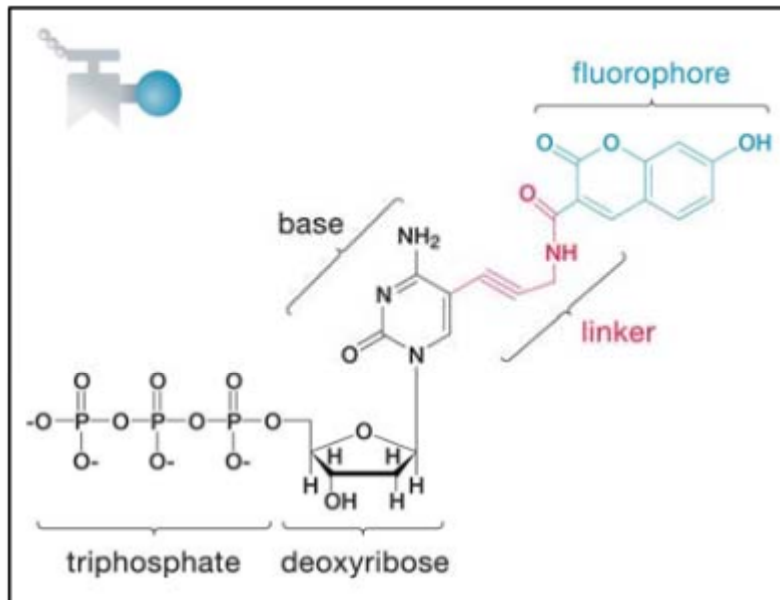
Etapas involucradas en la tecnología *PacBio*



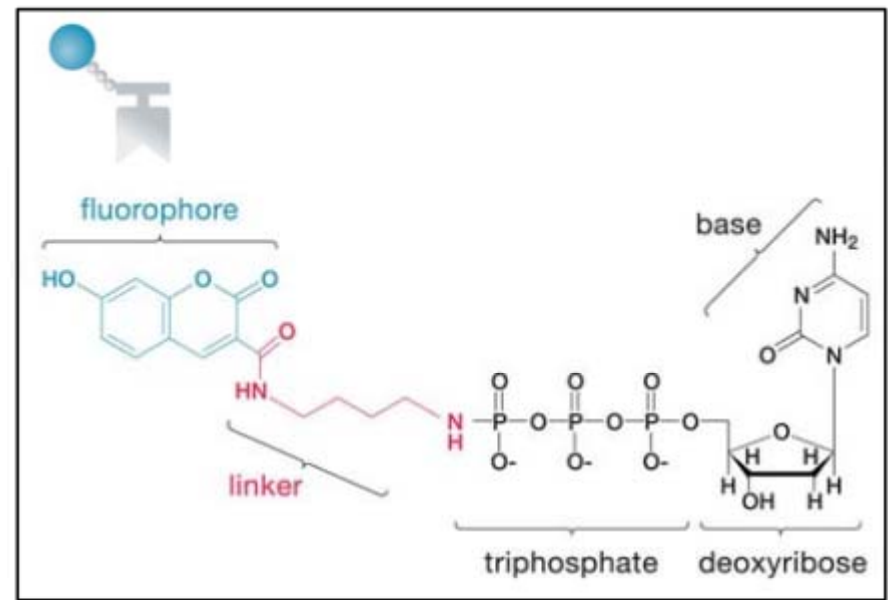
Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

- La **secuenciación comienza** con la **introducción de los 4 dNTPs** marcados con 4 **fluoróforos** distintos. A diferencia del método *Sanger automático* y de *Illumina*, la **marca no se encuentra en la base nitrogenada**.



dNTP marcado en la base

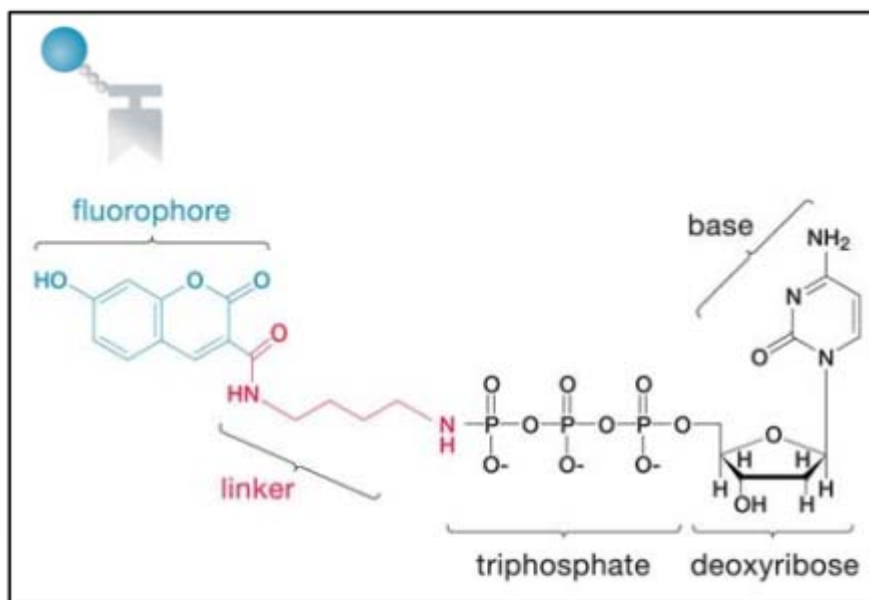


dNTP marcado en los fosfatos

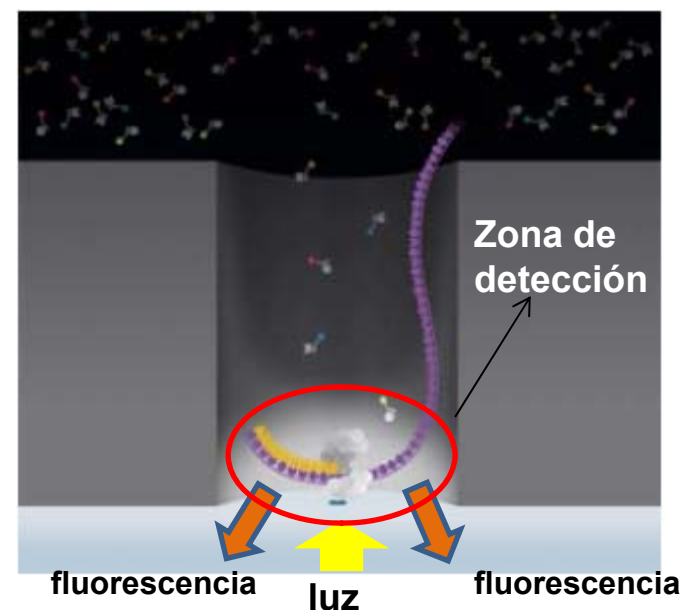
Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

- Esta situación permite que la **fluorescencia no quede** en la **molécula sintetizada**, dado que se elimina en el pirofosfato.
- De este modo, detectando el dNTP que ingresa al sitio activo de la enzima en el proceso de síntesis, es posible realizar la lectura de la secuencia.



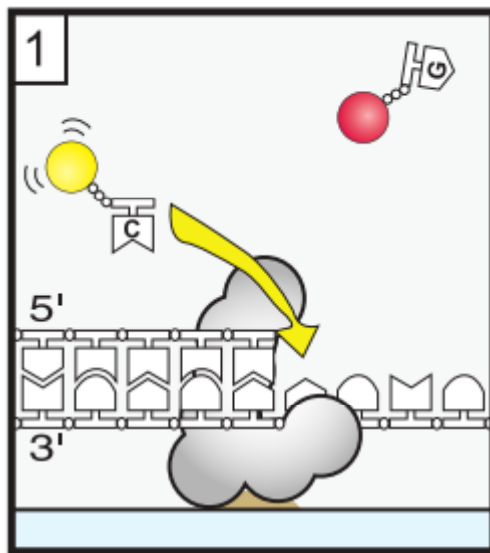
dNTP marcado en los fosfatos



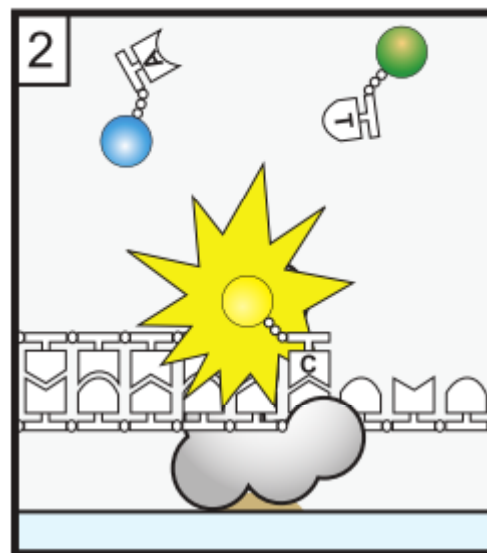
Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

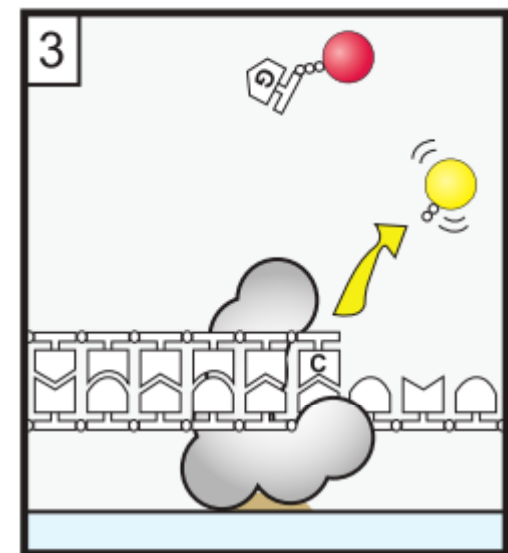
- Durante **10 milisegundos** el **nucleótido** complementario a la cadena molde es **retenido por la enzima para su incorporación**, tiempo suficiente para que quede en la zona de detección y **emita fluorescencia**, lo cual es **registrado en tiempo real**.



El dNTP
complementario
se acerca



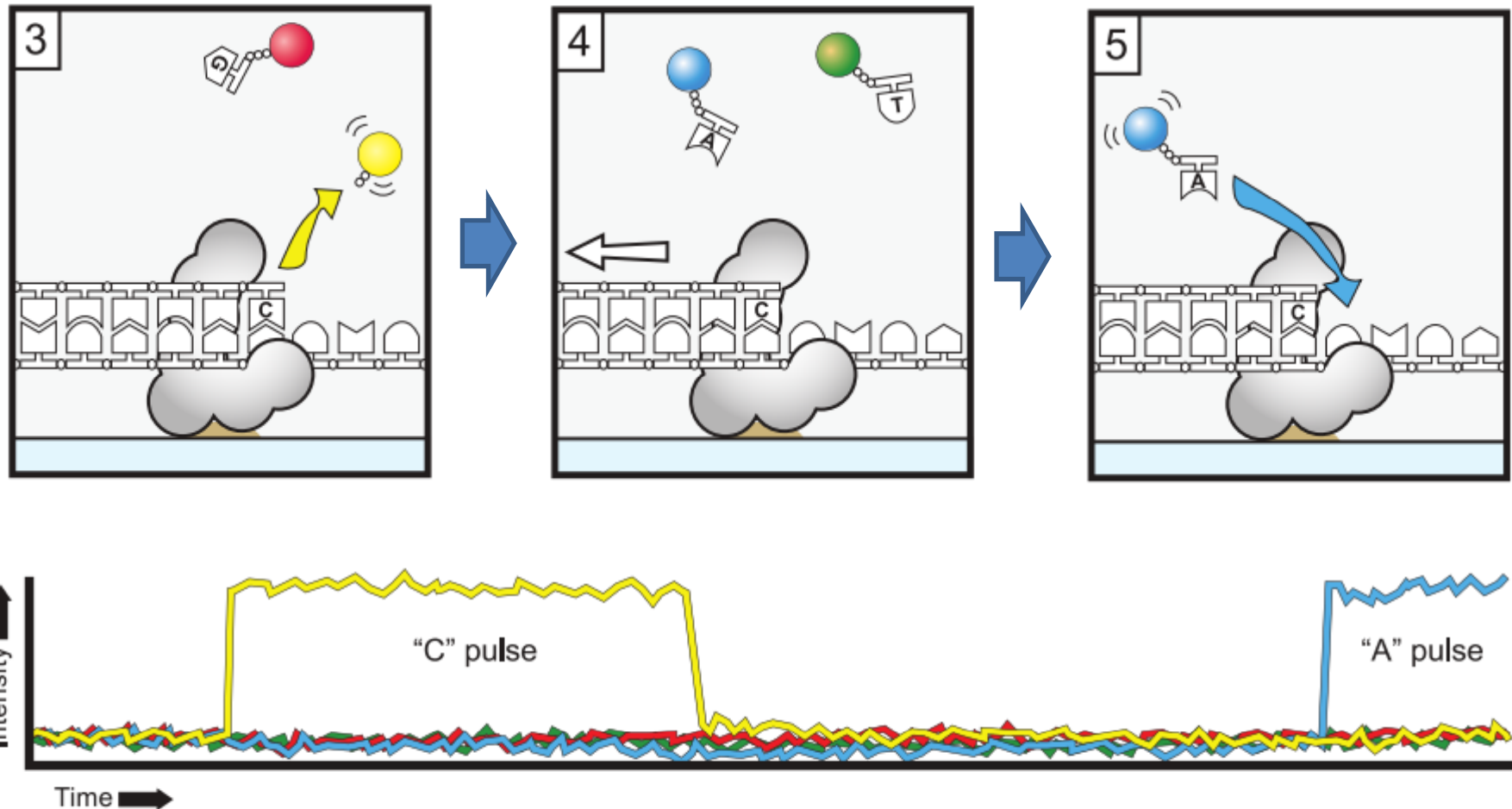
El dNTP
complementario
se incorpora



El pirofasfato
con el fluoróforo
es liberado

Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

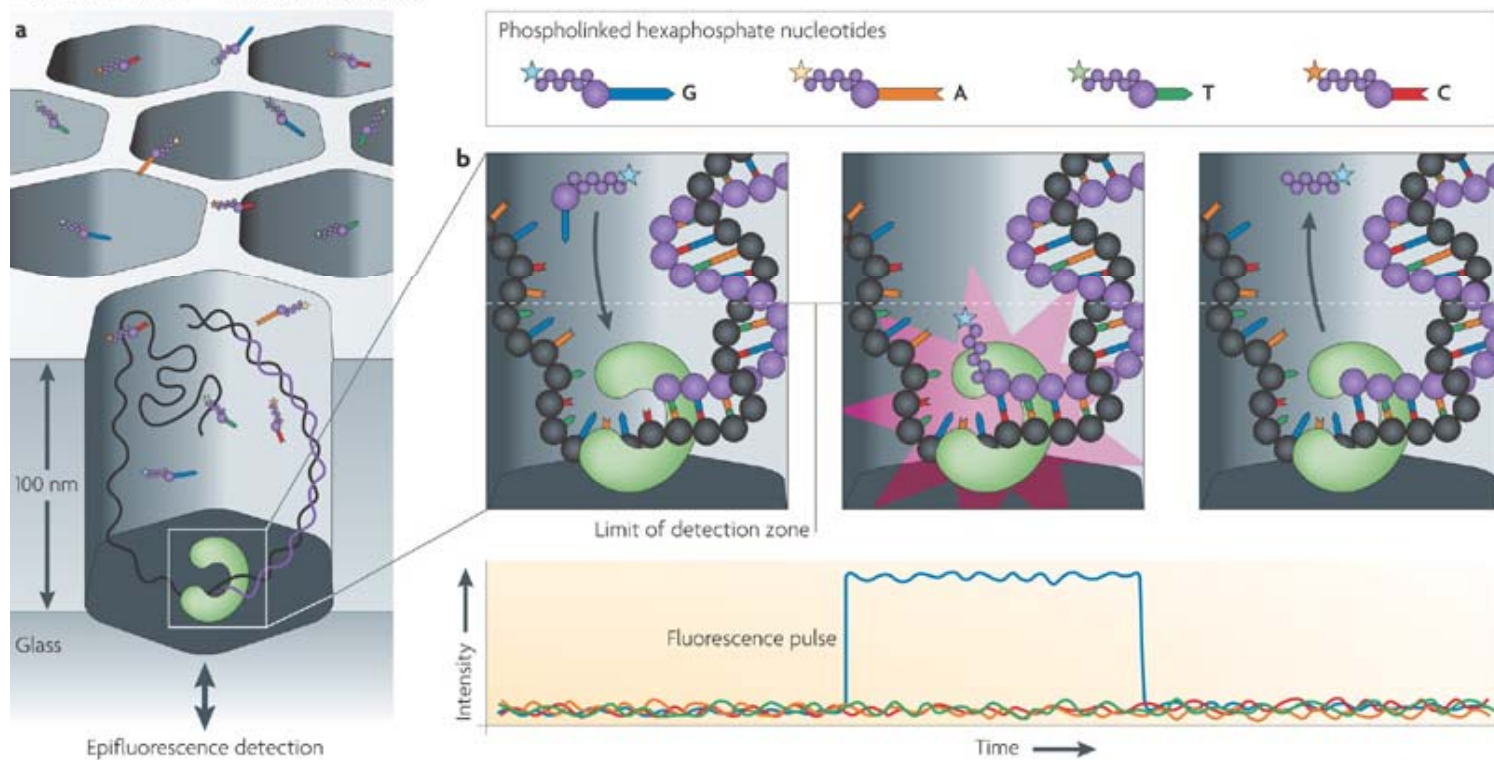


Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio

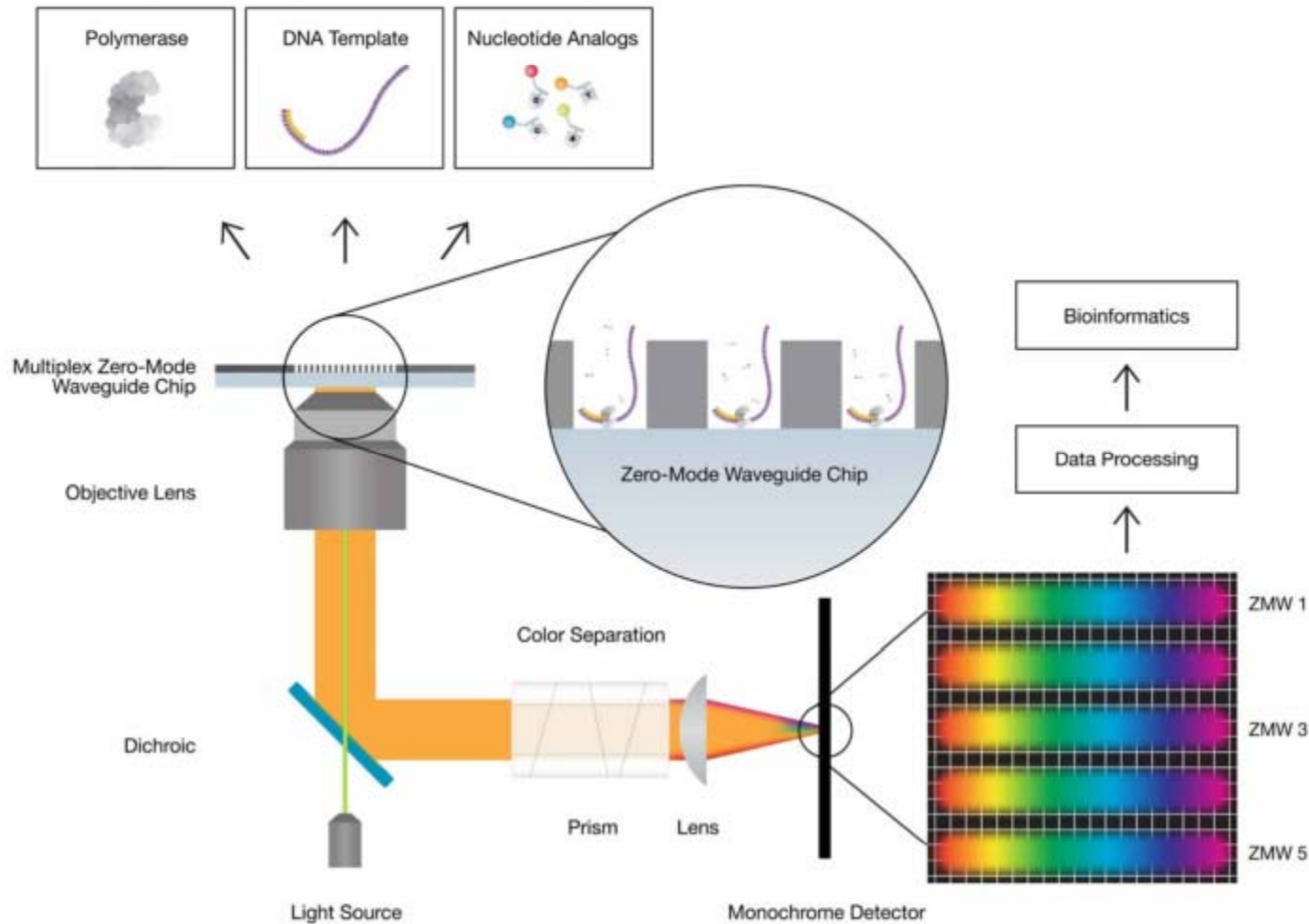
Resumen de la tecnología PacBio

Pacific Biosciences — Real-time sequencing



Adquisición de información genómica

NGS: tecnología PacBio



Amplificaciones previas a la secuenciación

Procesos de amplificación previos

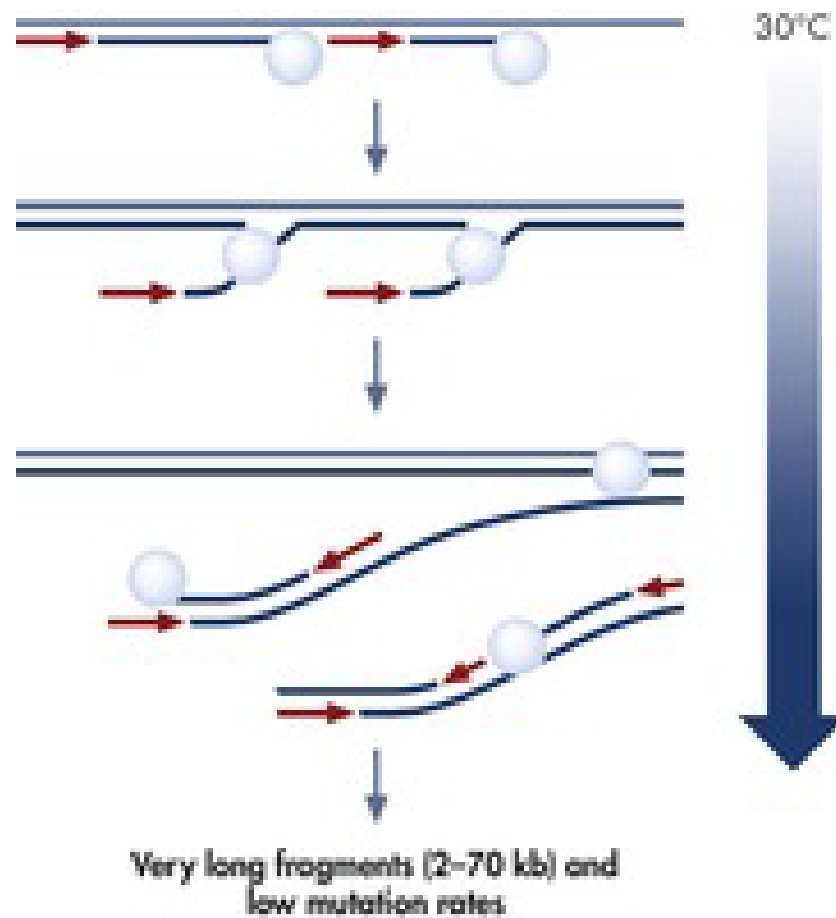
- Cuando se parte de **muy poca cantidad de gDNA** es posible realizar una **amplificación previa** a la construcción de la biblioteca.

- Para ello, se suelen utilizar **DNA polimerasas** con **actividad** de **desplazamiento de cadena** y **hexámeros al azar** como cebadores, para realizar reacciones isotérmicas sin sesgos composicionales.

- Estos **procedimientos** se denominan **WGA** (*Whole Genome Amplification*), y la metodología más utilizada es la conocida como **SDA** (**Strand Displacement Amplification**), reacción isotérmica dirigida por la **DNA polimerasa** del fago $\phi 29$.

Procesos de amplificación previos

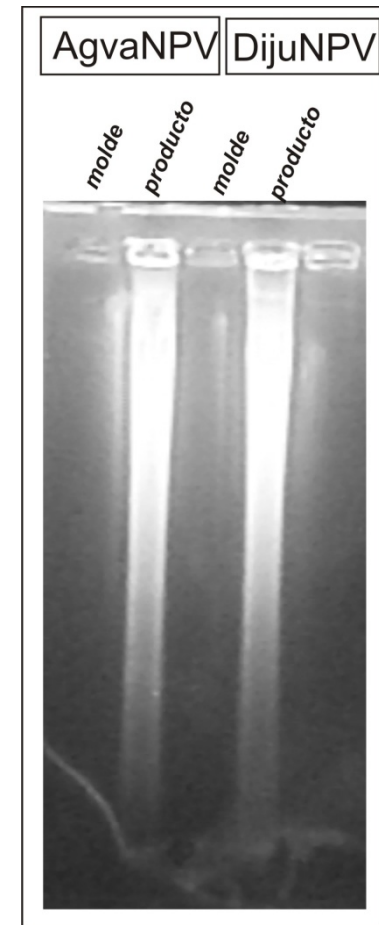
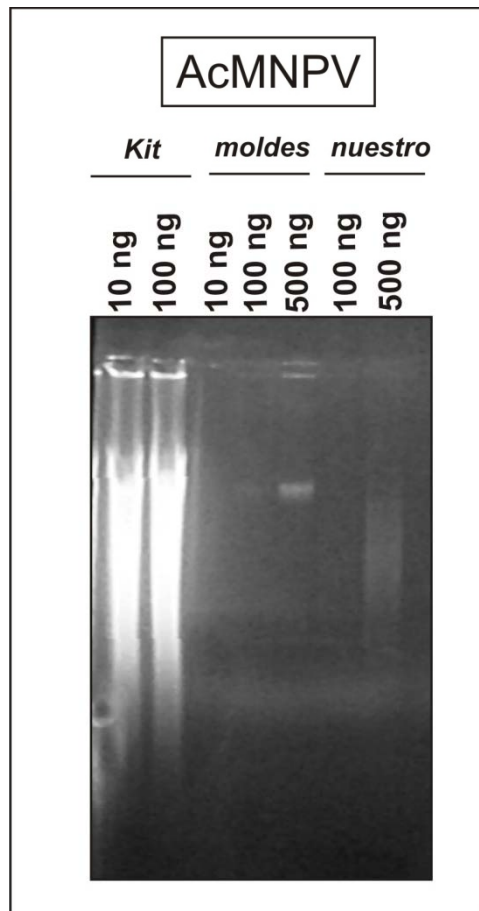
Esquema de la amplificación por SDA



Procesos de amplificación previos

Resultados

- Amplificación *in vitro* de genomas baculovirales como ejemplo de la aplicación de la técnica



Comparación y aplicaciones de los métodos NGS

Adquisición de información genómica

Next Generation Sequencing

Algunas comparaciones de los métodos comerciales...

Table 1. Properties of currently available next-generation sequencing technologies.								
Platform	Read length	Throughput/ run	Approximate time/run	Machine cost (US\$)	Reagent cost (US\$)	Reagent cost/Gb (US\$)	Primary error	Base error rates
HiSeq™ 2000	100 bp	600 Gb	11 days	690,000	23,470	40	Substitution	~1–2% over 100 bp
SOLiD™ 4	75 bp	100 Gb	12 days	475,000	8128	<110	A–T bias	0.06%
SOLiD™ 4hq	75 bp	300 Gb	14 days	595,000	10,503	70	A–T bias	0.01%
SOLiD™ PI	75 bp	77 Gb	8 days	349,000	6101	80	A–T bias	0.01%
454 GS FLX Titanium XL+	700 mean bp, ≤1000 bp	700 Mb	23 h	500,000	6200	7000	Indel	0.5%
IonTorrent™ PGM™ 316	200 bp	100 Mb	~2 h	50,000	750	<7500	Indel	1.2% over 150 bp
IonTorrent™ PGM™ 318	200 bp	1 Gb	~2 h	50,000	925	<925	Indel	1.2% over 150 bp
MiSeq®	150 bp	>1 Gb	27 h	125,000	750	740	Substitution	~1–2% over 100 bp
454 GS Junior	400 mean bp	35 Mb	12 h	108,000	1100	22,000	Indel	1.00%
PacBio RS (early 2012)	2700 mean bp, ≤5000 bp	90 Mb per cell	<1 day (?)	695,000	110–1700	11,000– 340,000	CG deletion	13.00%
Currently available next-generation sequencing technologies. All specifications are liable to rapid change. Cost information is taken from Glenn [18], but can vary widely by country and individual deal. The read lengths given are taken from manufacturers websites [101–105], and are the maximum over all currently available protocols with the system in question. The same holds for throughput, and times are the shortest for the given throughput. Base error rate, from the same sources, should be taken as a rough indicator only as the details of errors vary. It is an average for the read, or for a fixed number of bases from the start of the read (which is stated in this case).								

Adquisición de información genómica

Next Generation Sequencing

Algunas comparaciones de los métodos comerciales...

method	Pac Bio	Ion torrent	Pyroseq	Seq by synthesis	Seq by ligation	Sanger
Company	Pac Bio	Life tech	Roche	Illumina	Applied bio	
Read length	2900 bp	200 bp	700 bp	150 bp	50 bp	800 bp
Reads/run	$75 * 10^5$	$5 * 10^6$	$1 * 10^6$	$3 * 10^9$	$1,2 * 10^9$	1
Time /run	2 hours	2 hours	24 hours	10 days	14 days	2 hours
\$ $1*10^6$ bases	\$2	\$1	\$10	\$0.1	\$0.13	\$2400

Adquisición de información genómica

Next Generation Sequencing: Aplicaciones

