

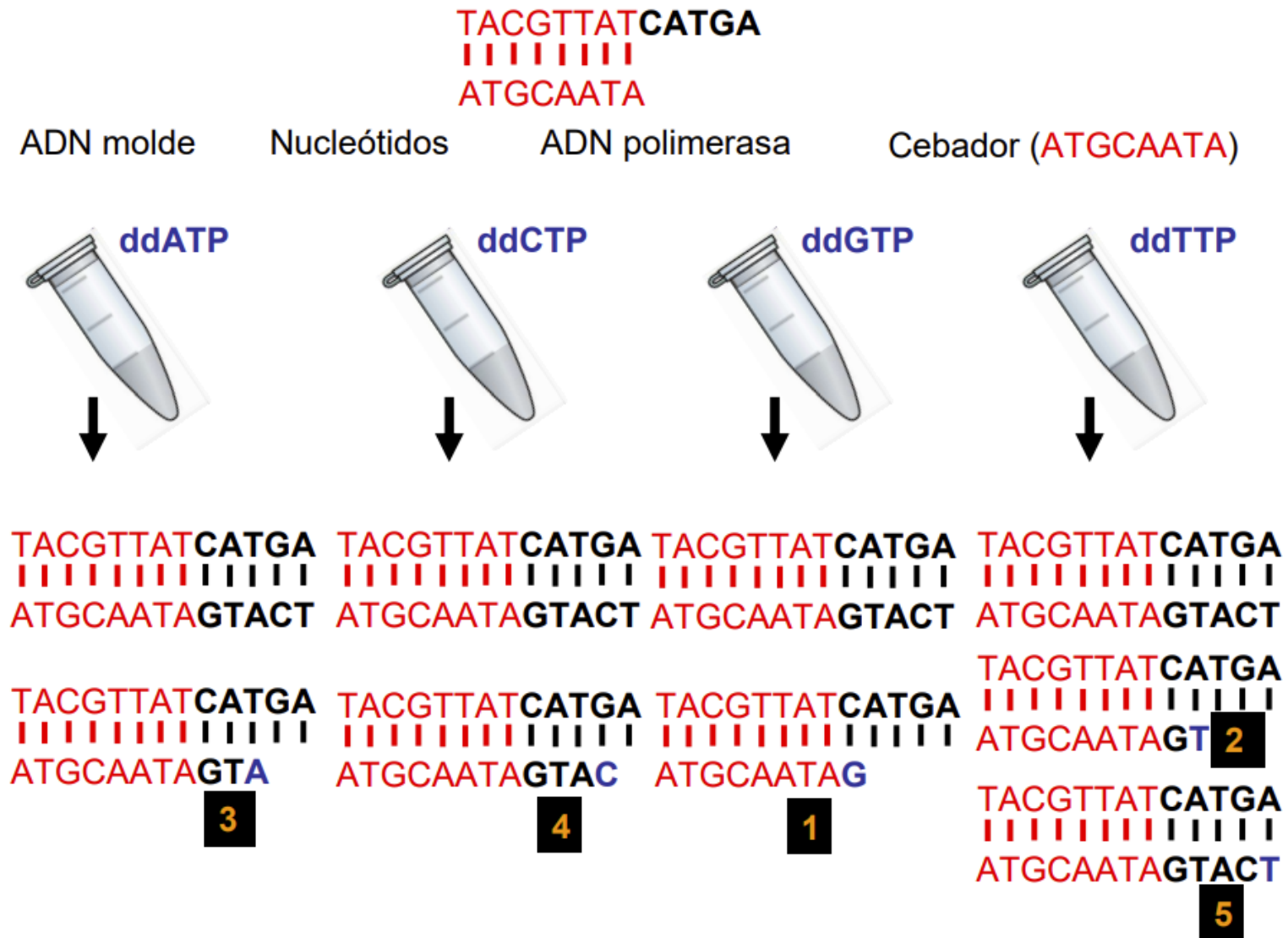
Evolución de las Técnicas de Secuenciación

Aplicaciones de la Ingeniería Genética
Rafael Navajas Pérez

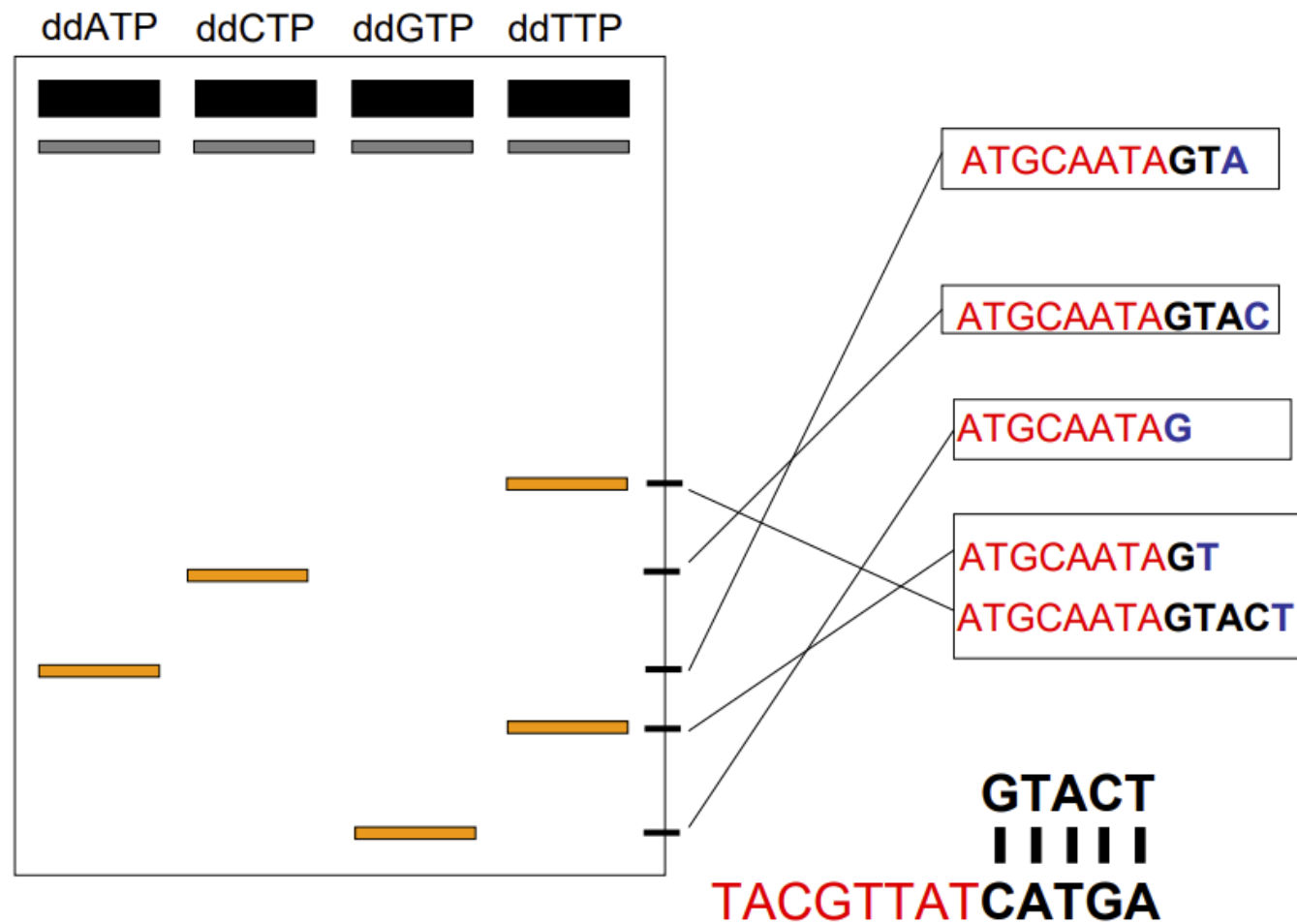
Enero de 2025

Máster en Genética y Evolución
(Especialidad Agroalimentaria)

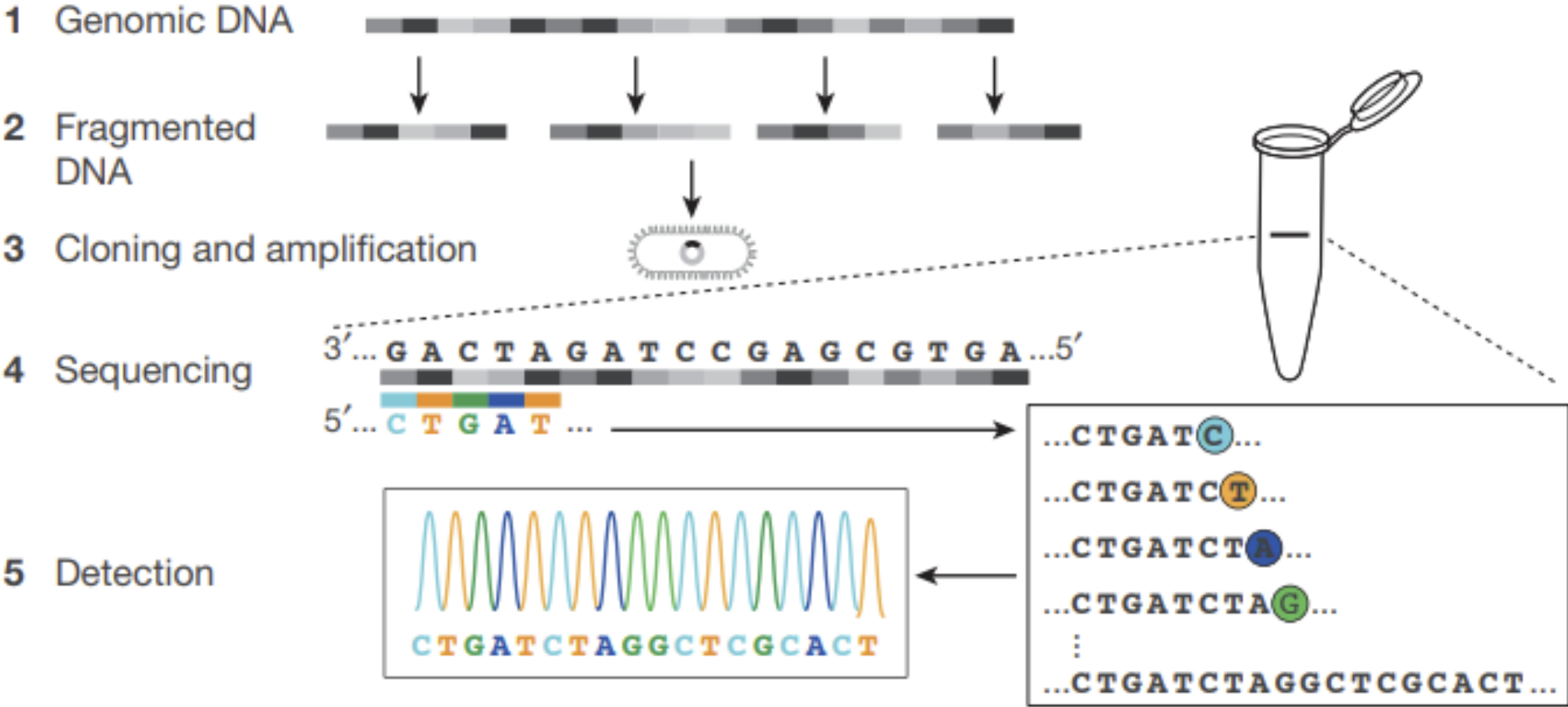
Secuenciación por Terminadores (Sanger)



Secuenciación por Terminadores (Sanger)



1.- Secuenciación de Primera Generación



Secuenciación por Terminadores (Sanger)

Utiliza **didesoxinucleótidos** marcados como terminadores.

Staden desarrolla el ***shotgun sequencing*** en 1979.

Applied Biosystems automatiza el proceso, llegando a **1000 bases por día** en 1986.

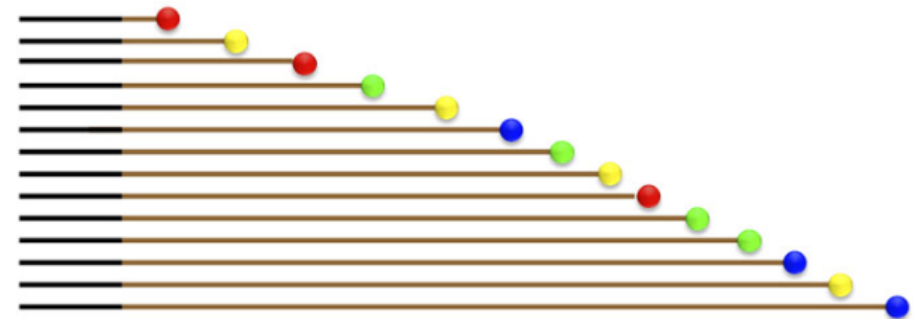


Fig. 1 Diagram of Capillary Electrophoresis for PCR Products

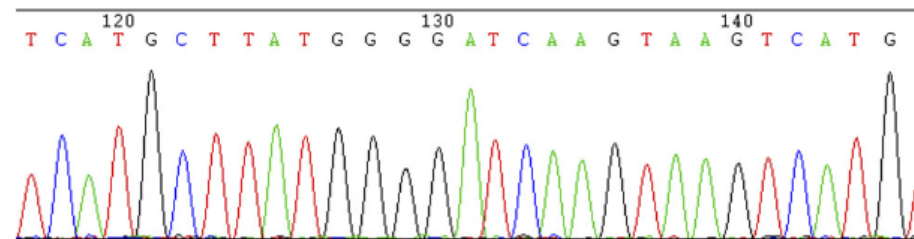


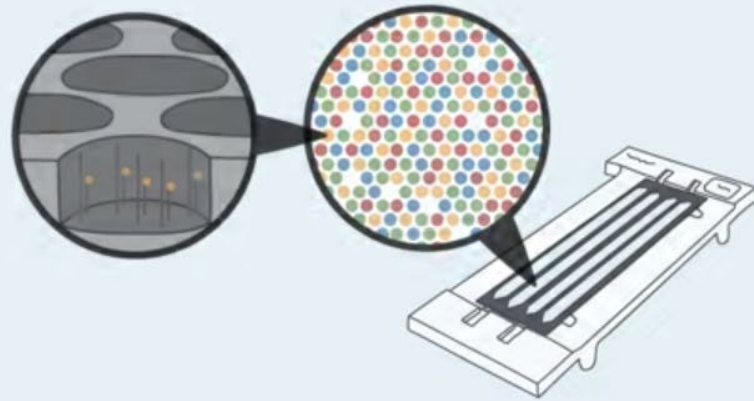
Fig. 2 Results of Sanger Sequencing

Next Generation Sequencing (NGS)

Number of DNA Strands Sequenced

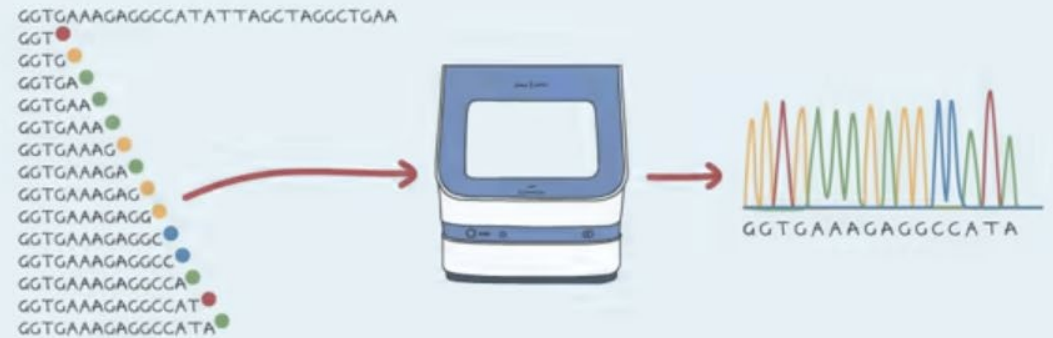
NGS

Billions of Strands



Sanger Sequencing

One Strand



2.- Secuenciación de Segunda Generación (NGS)

(Secuenciación masiva en paralelo)

Claves NGS:

De un tubo por reacción a **librerías de ADN** inmovilizadas en una **estructura bidimensional** (*multiplex*).

De la clonación a la **amplificación *in vitro***.

De la electroforesis a la **medición** de productos de **reacciones químicas**.

SECUENCIACIÓN POR SÍNTESIS (SBS: Sequencing By Synthesis):

- **Amplificación en Puente:**
 - Solexa (Illumina)
- **PCR en Emulsión:**
 - Pirosecuenciación 454 (Life Sciences, Roche).
 - Ion Torrent (Thermo Fisher).

REQUIEREN AMPLIFICACIÓN DE ADN

Fases Comunes SBS

- PREPARACIÓN DE LAS LIBRERÍAS
- CLUSTERIZACIÓN
- SECUENCIACIÓN
- ANÁLISIS DE SECUENCIAS

SOLEXA (Illumina)

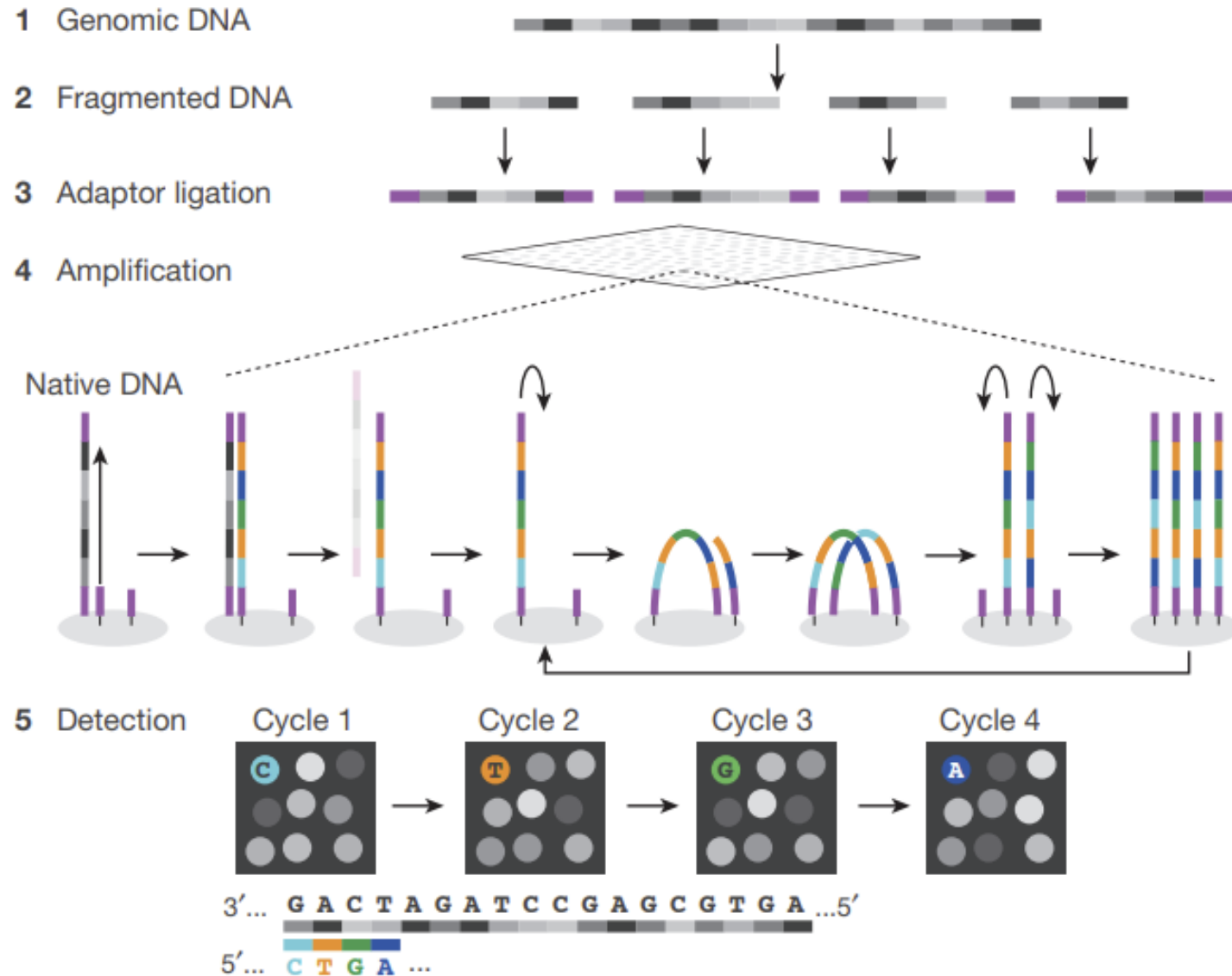


Illumina, fundamentos:

<https://youtu.be/fCd6B5HRaZ8?si=xtdej9xyeCQSpE>

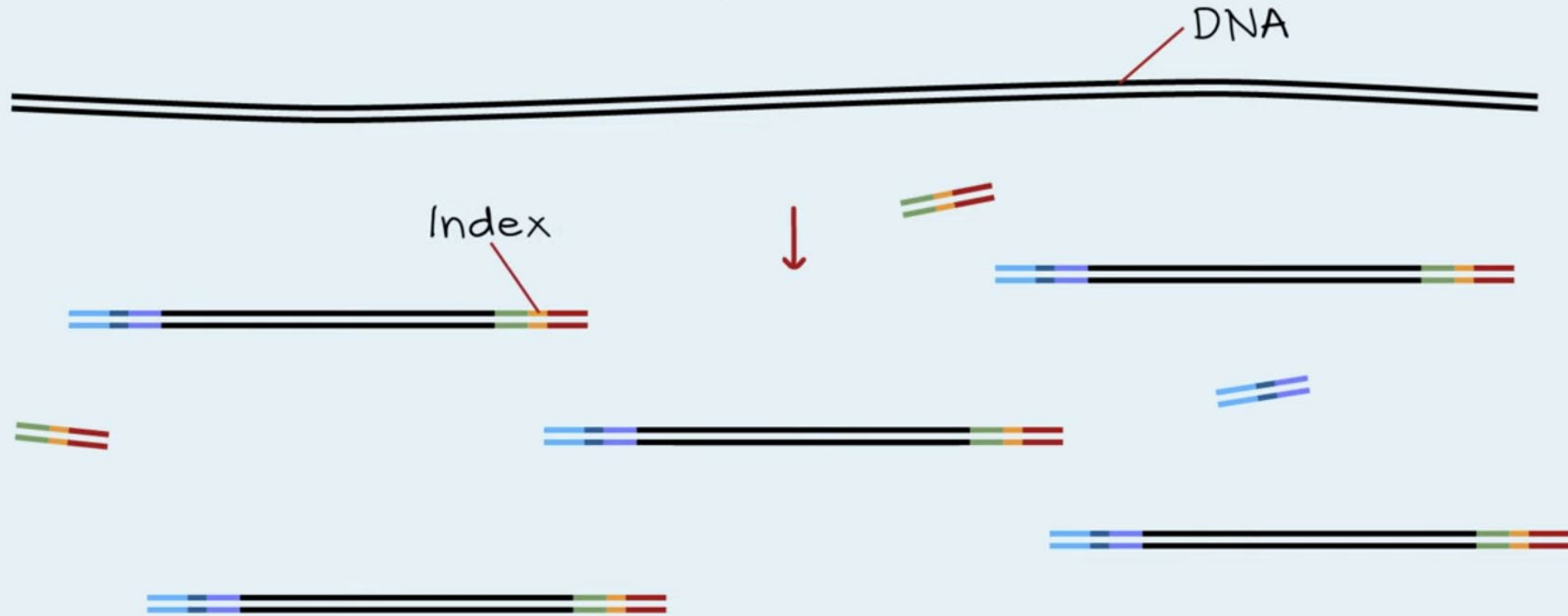
<https://youtu.be/HMyCqWhwB8E?si=TVr1b1HhC-SGUGRJ>

2.- Secuenciación de Segunda Generación (NGS) (Secuenciación masiva en paralelo)



Next Generation Sequencing (NGS)

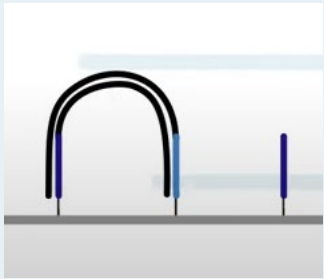
Library Preparation



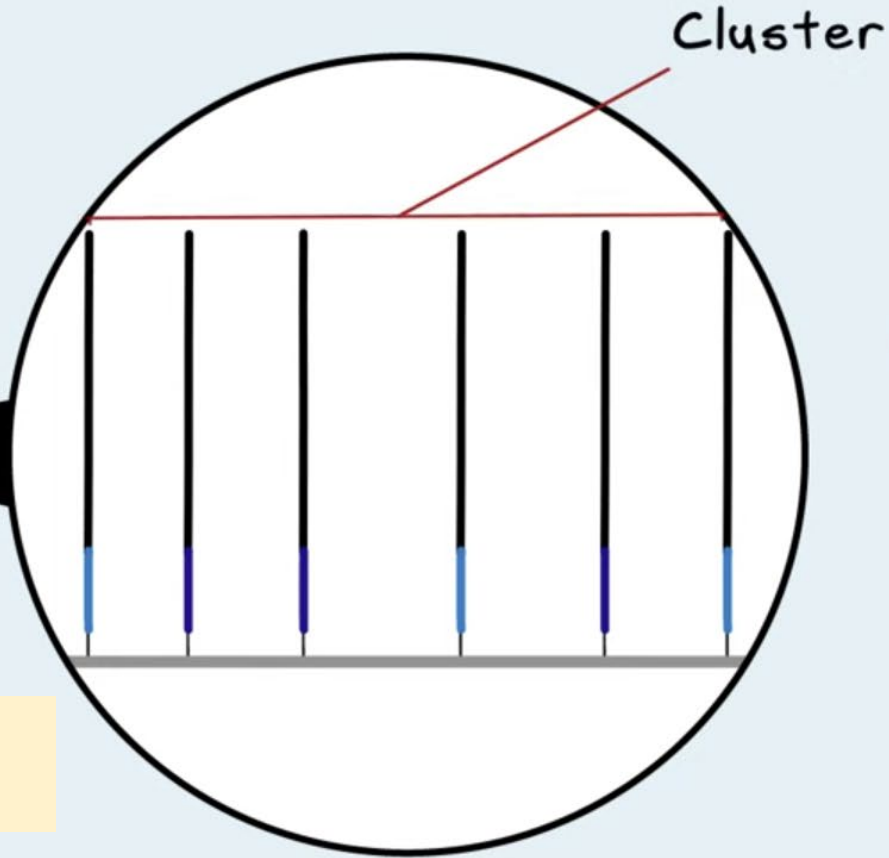
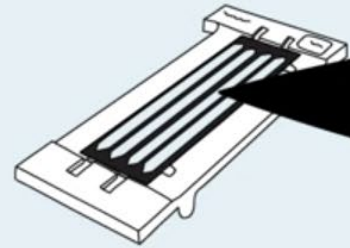
Los **adaptadores** (*Región comp.*) permiten la fijación al soporte sólido

Next Generation Sequencing (NGS) Sequencing by Synthesis (SBS)

Clonal Amplification
PCR at a
Single Temperature



Amplificación en puente + amplificación
clonal masiva



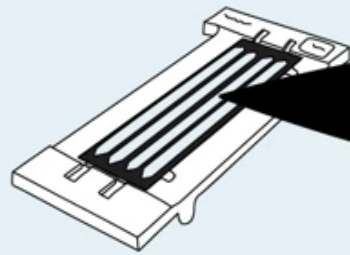
Annealing
Extension
Melting

Next Generation Sequencing (NGS) Sequencing by Synthesis (SBS)

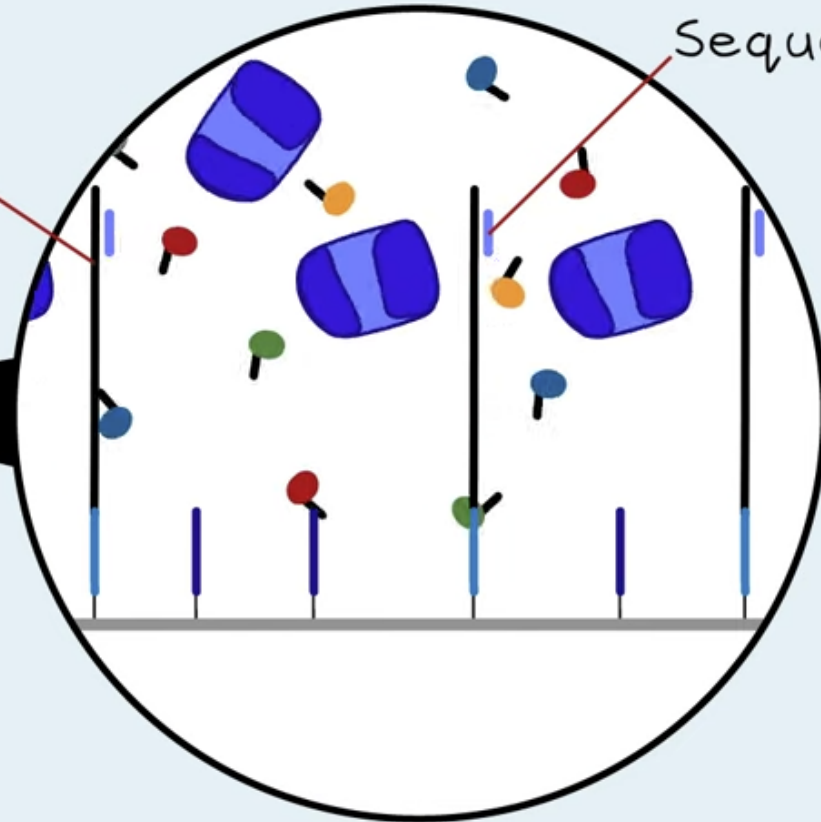


Forward Strand

Sequencing Primer



DNA Polymerase



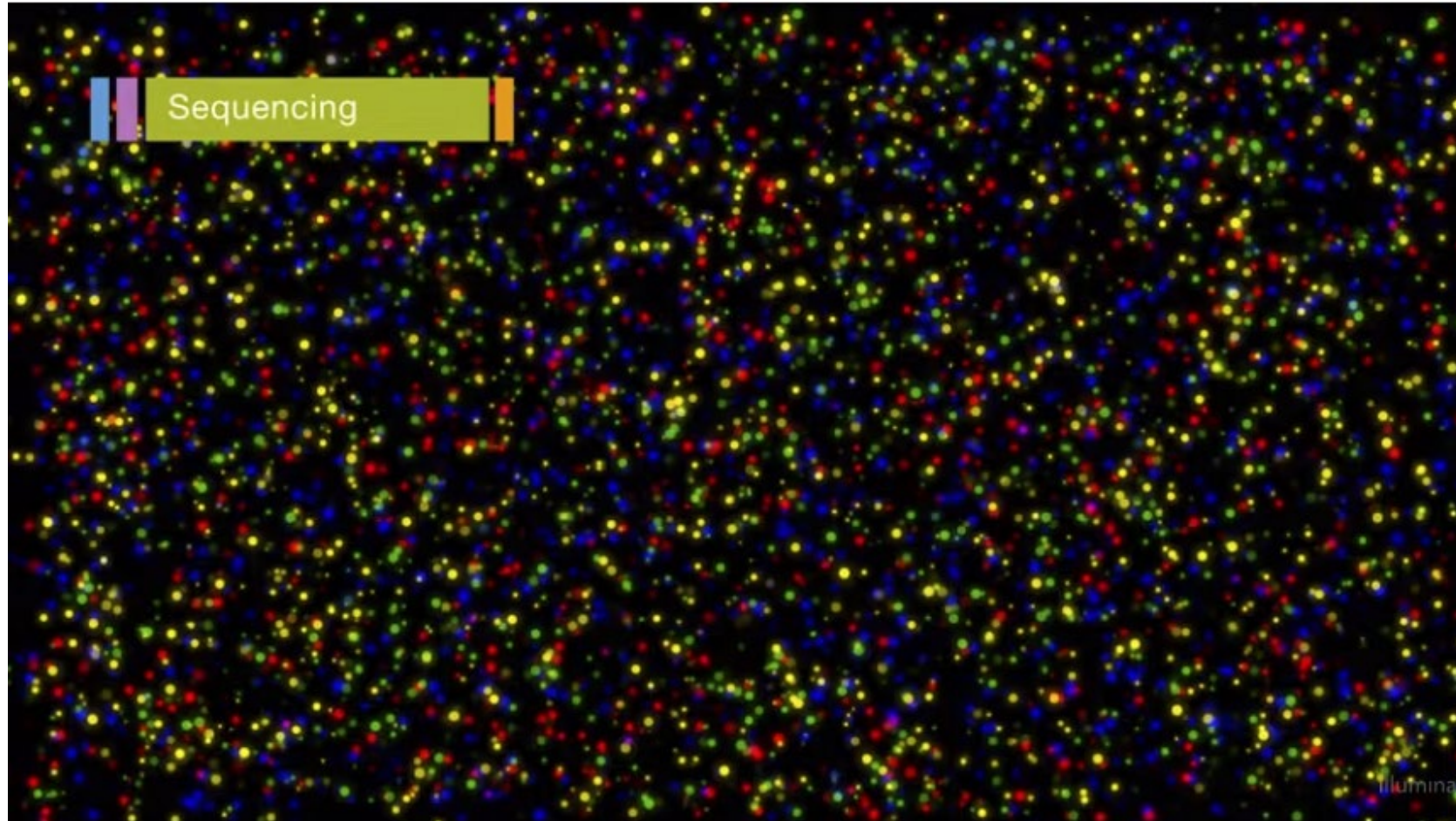
- Fluorescent Tag
- Terminator

Fluorescent
Nucleotides

G  C 

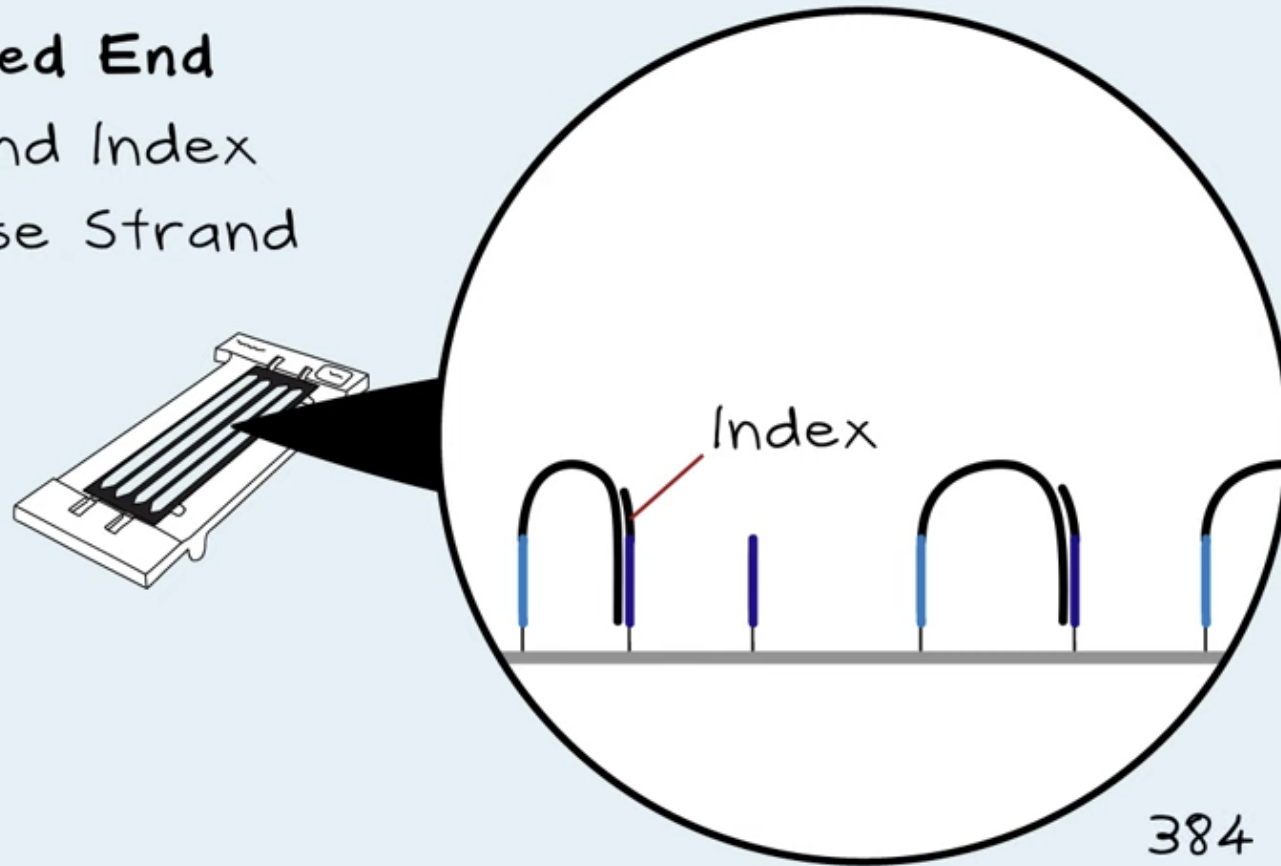
T  A 

Secuenciación en paralelo



Next Generation Sequencing (NGS) Sequencing by Synthesis (SBS)

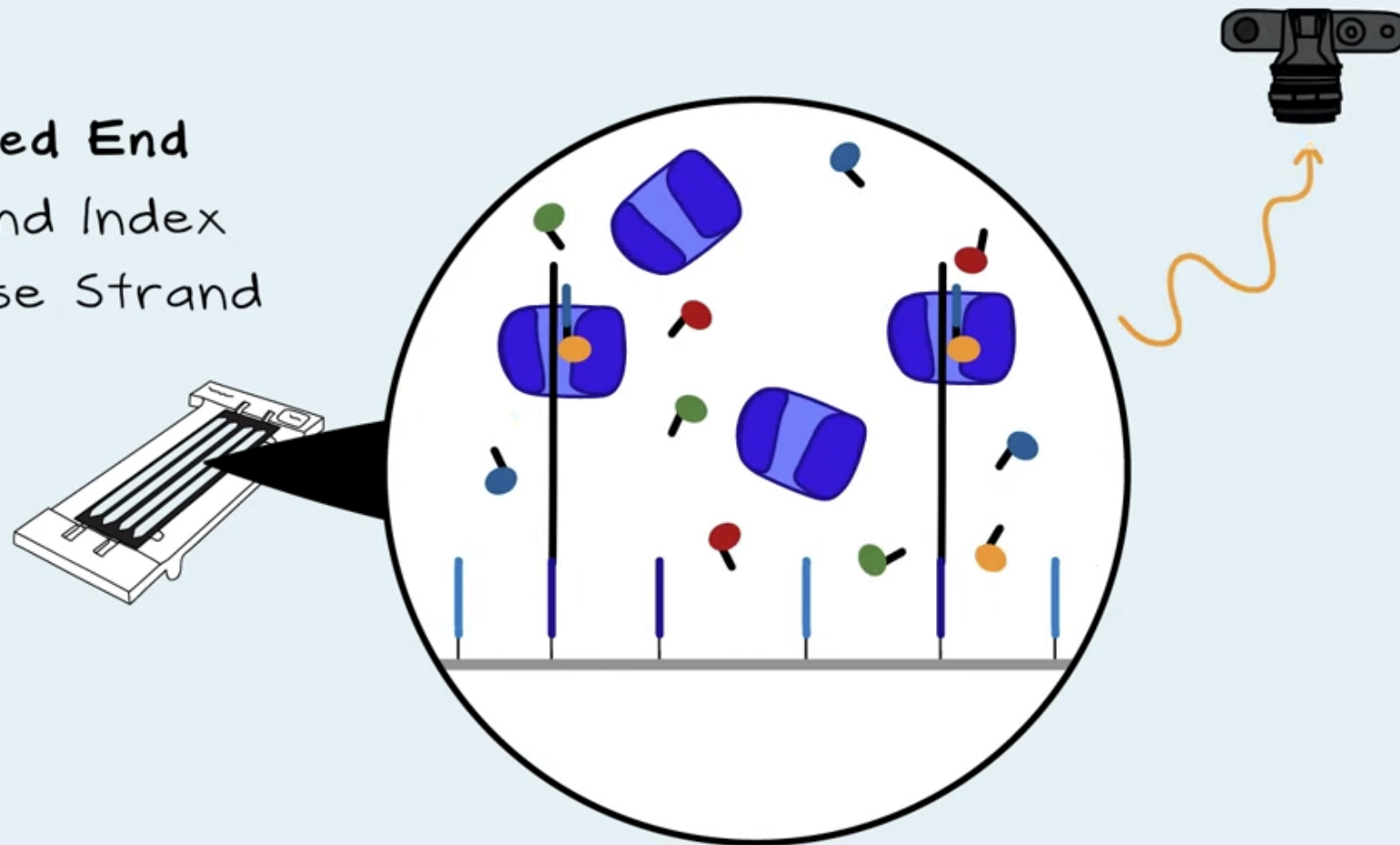
Paired End
Second Index
Reverse Strand



Unique Dual
Indexes
384 samples/flowcell

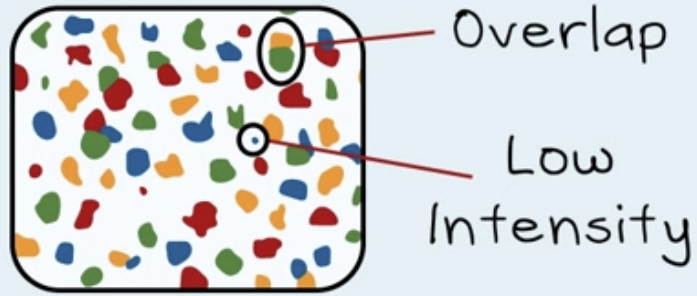
Next Generation Sequencing (NGS) Sequencing by Synthesis (SBS)

Paired End
Second Index
Reverse Strand

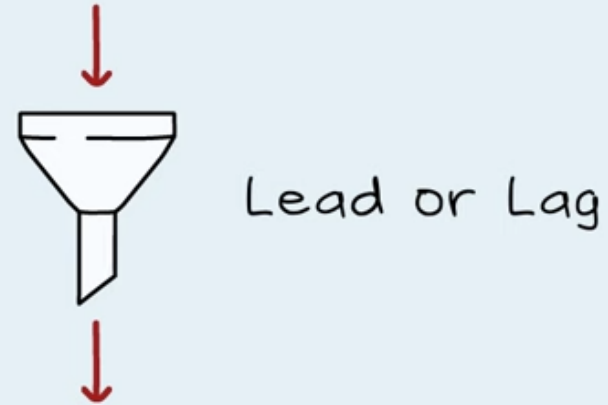
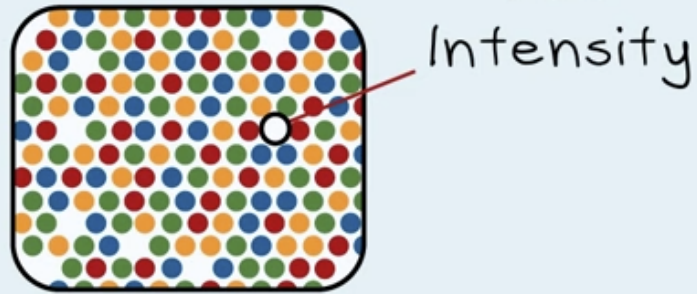


Next Generation Sequencing (NGS) Filtering and Mapping

Non-Patterned
Flow Cell



Patterned Flow Cell
Low Intensity

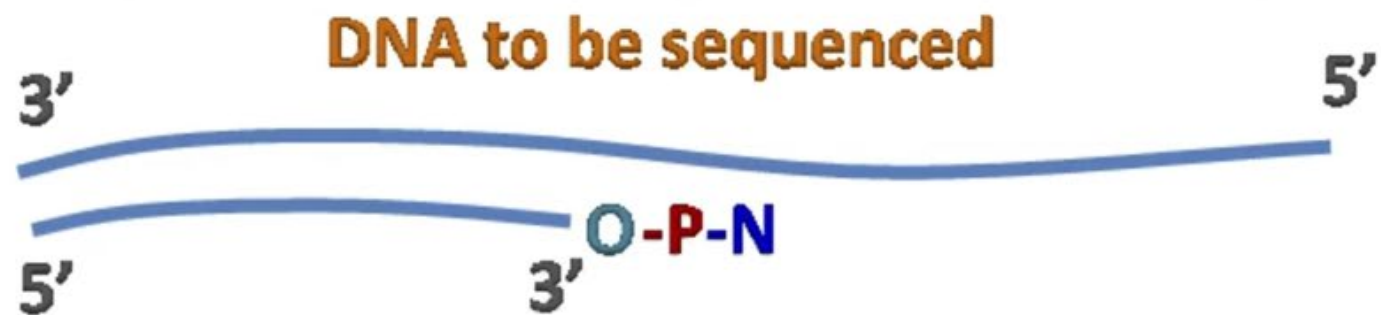


Pirosecuenciación 454 (Life Sciences)



Pirosecuenciación, QIAGEN, fundamentos:

<https://youtu.be/bNKEhOGvcaI?si=hDoChspi8-mfLjw5>



PPi
Pyrophosphate
+
adenylyl sulfate

ATP sulfurylase

ATP

Luciferase

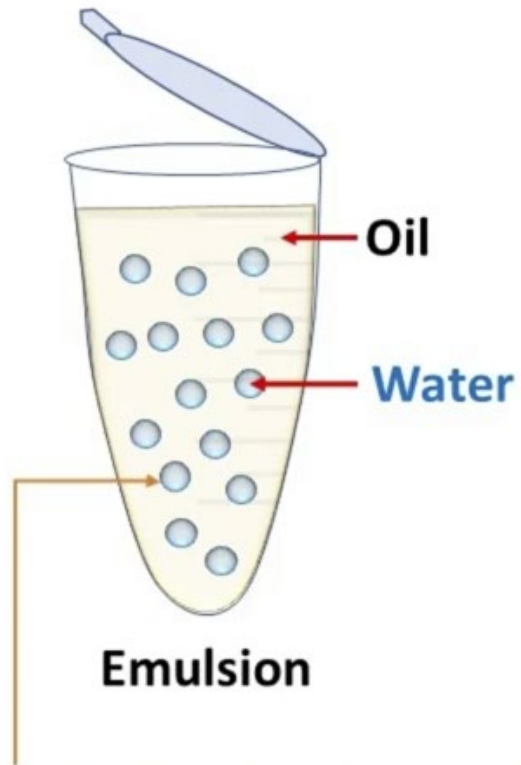
Luciferin + O₂

oxyluciferin

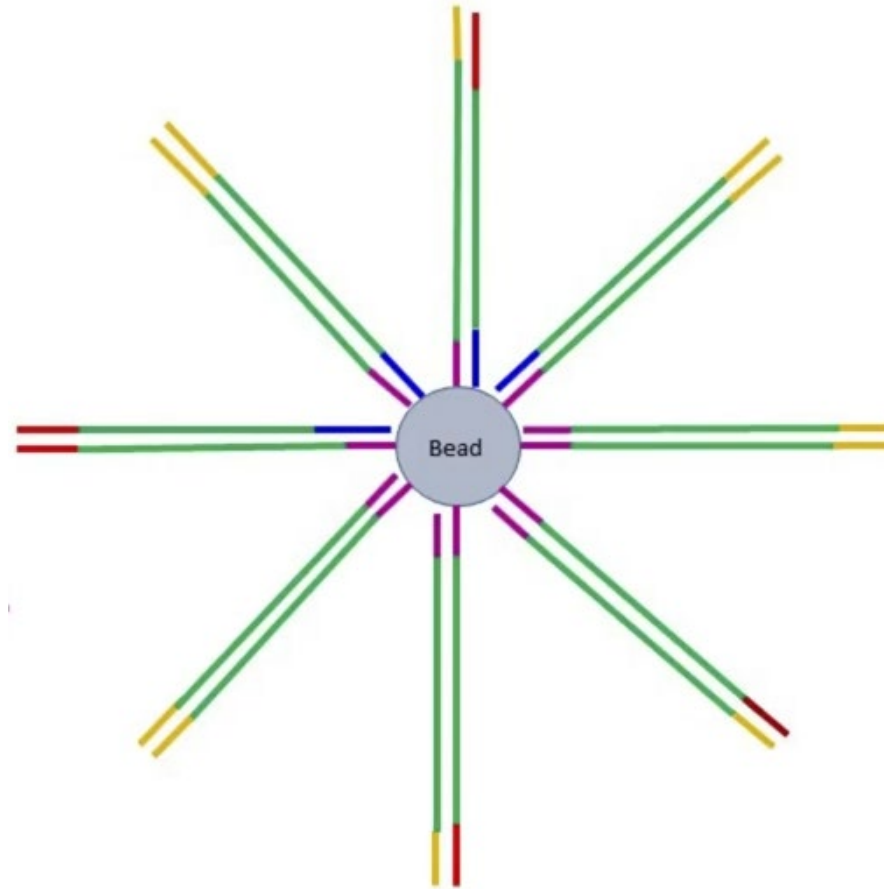
Light

Only one dNTP is added at a time

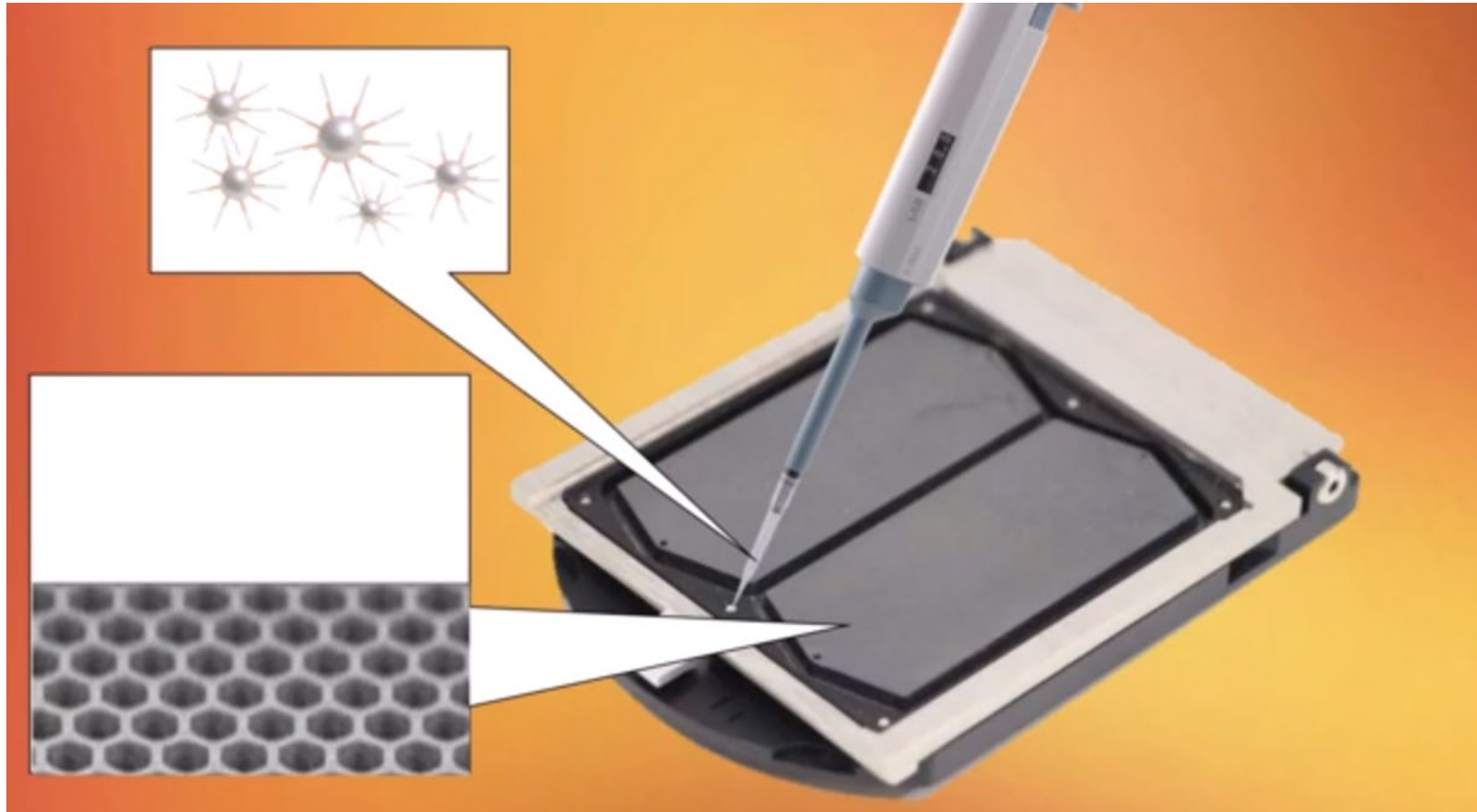
Emulsion PCR



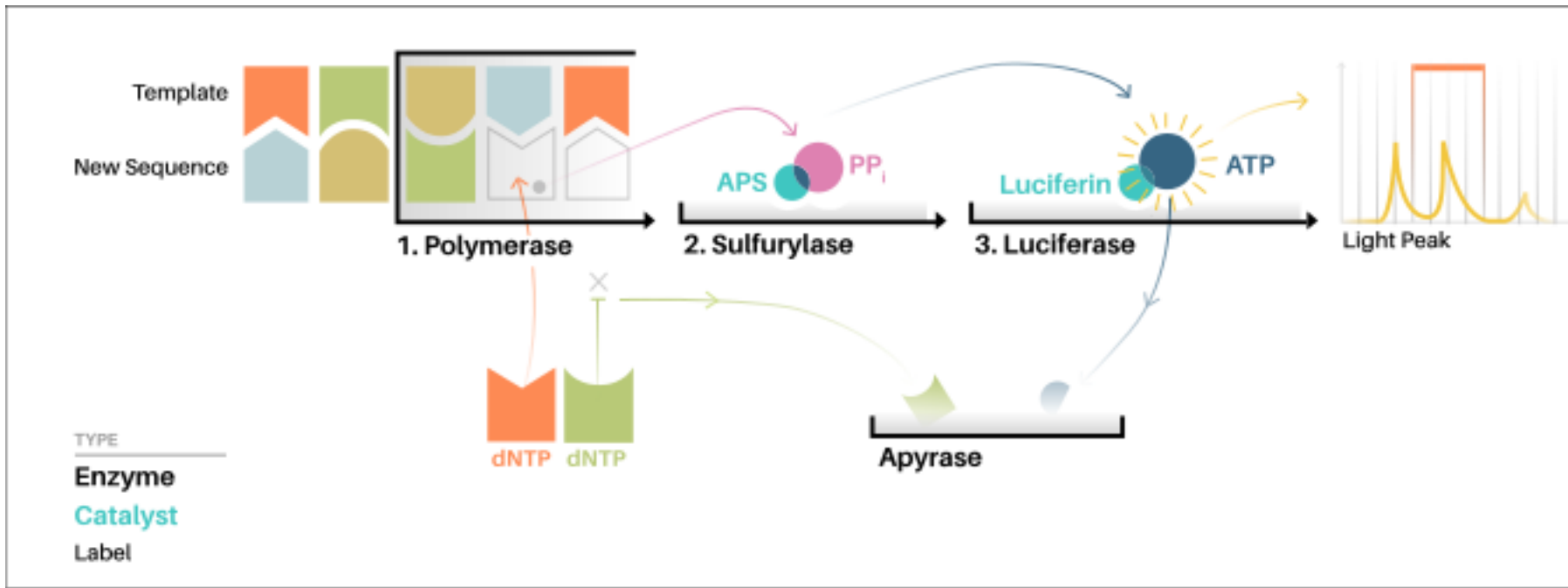
Each droplet of water has a bead (coated with primer), fragment of genomic DNA and other ingredients of PCR



Pirosecuenciación 454 (Life Sciences)



Pirosecuenciación 454 (Life Sciences)



- Si se añade un nucleótido, se produce la **liberación de un pirofosfato**.
- La ATP sulfurilasa lo transforma en **ATP**.
- Esta reacción se acopla a la **luciferina**.
- La luciferasa produce la **emisión de una señal luminosa**.
- La señal luminosa es **equivalente al número de nucleótidos incorporados**.
- Tras cada ciclo, la **apirasa retira todos los pirofosfatos** existentes en el pocillo.

Ion Torrent (Thermo Fisher)



Ion Torrent de Thermo Fisher:

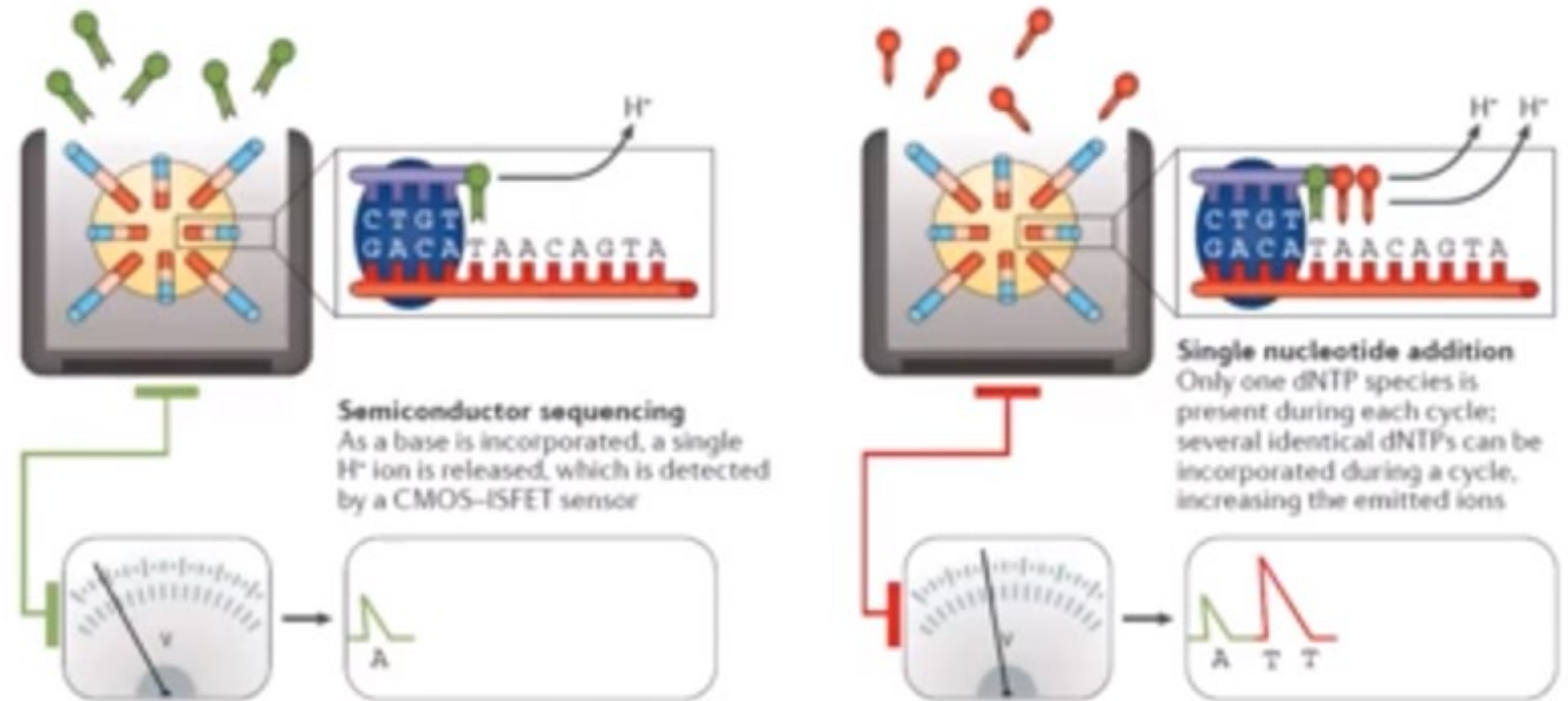
<https://youtu.be/VUO-GYwAlp4?si=h87AfR8hKc4iHIV>

Ion Torrent, fundamentos:

<https://youtu.be/zBPKj0mMcDg?si=KBJW5yBUhoI9apHh>

Ion Torrent (Thermo Fisher)

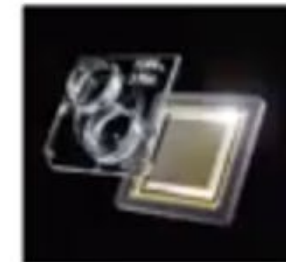
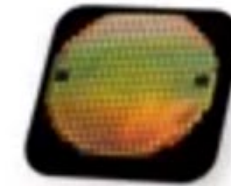
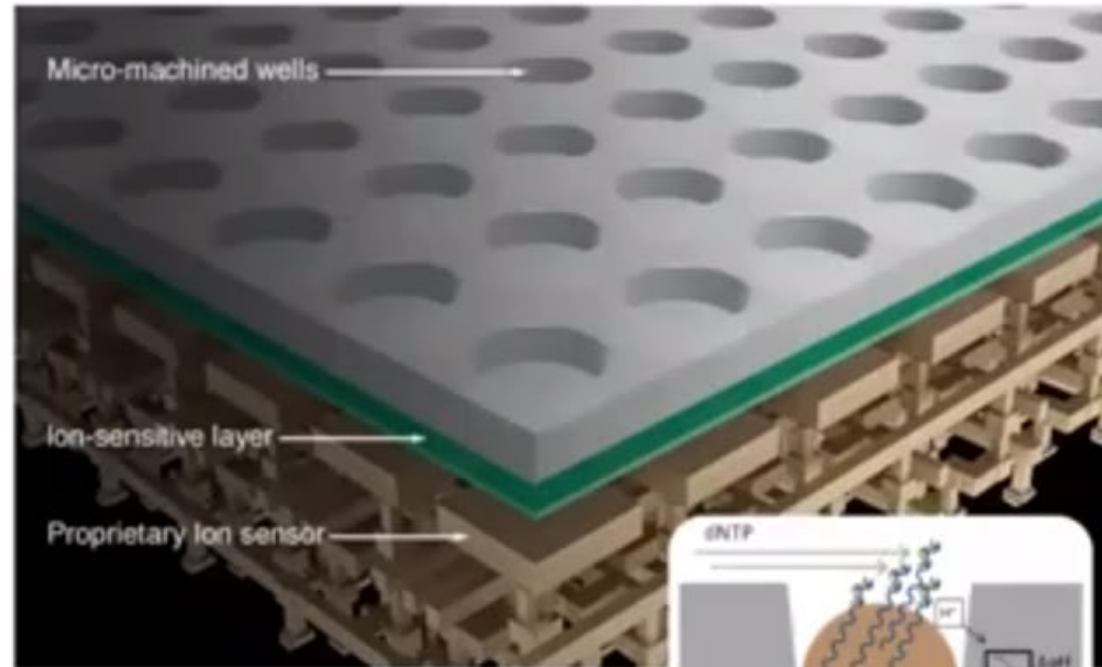
La detección no es fluorescente; está basada en **semiconductores**



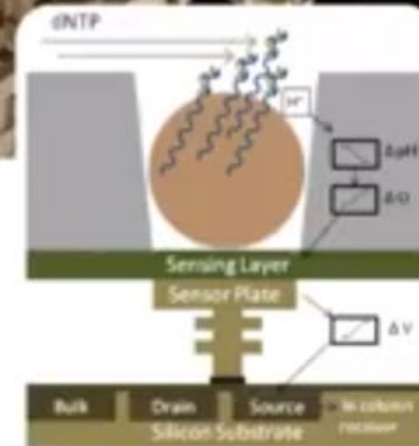
Goodwin S et al. *Nat Rev Gene*, 2016.

Ion Torrent (Thermo Fisher)

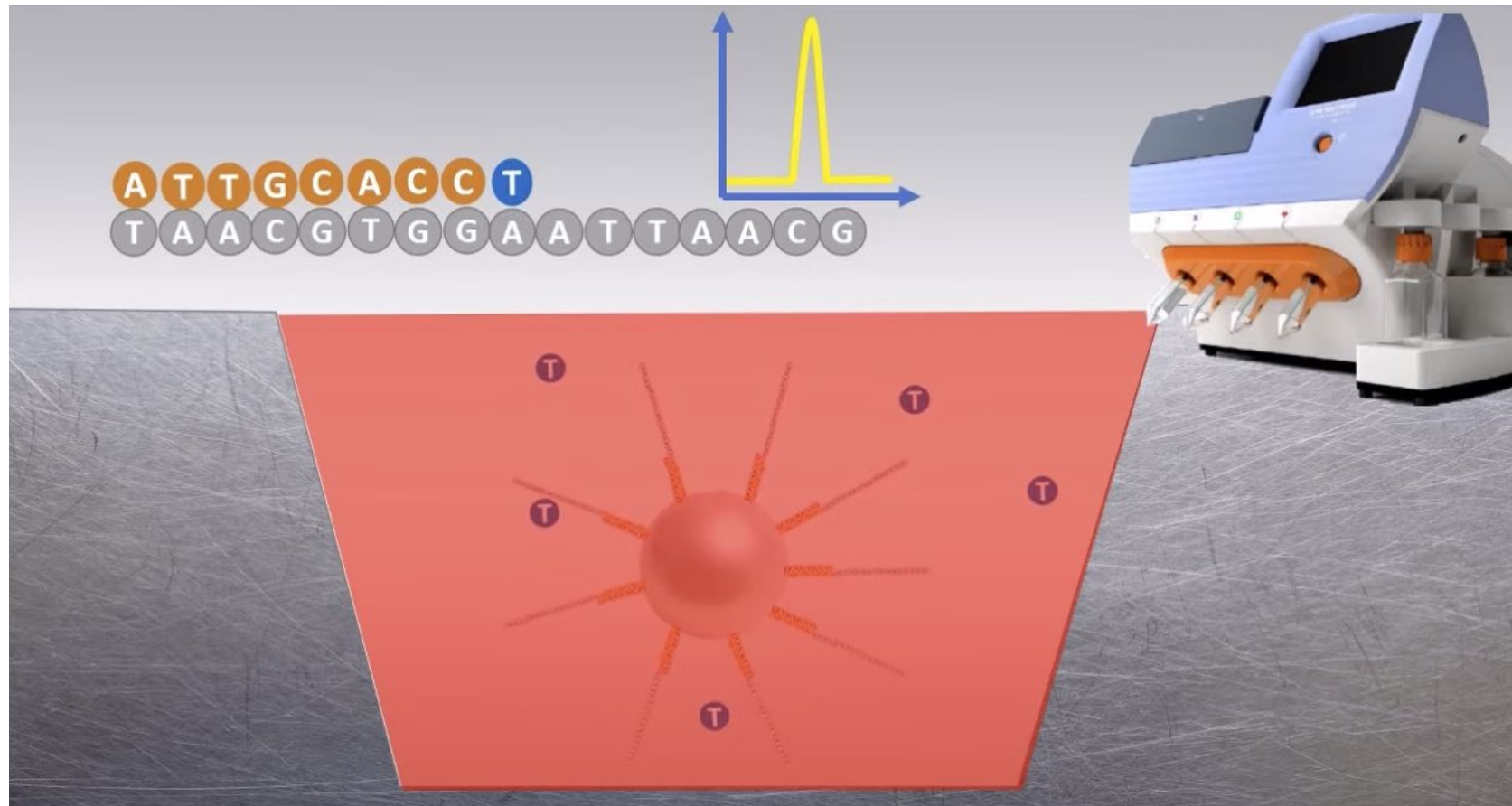
Se incorpora un tipo de nucleótido por ciclo



Si hay unión se **libera un H**, que produce una señal (*cambios de pH en el medio*) que se registra



Ion Torrent (Thermo Fisher)



3.- Secuenciación de Tercera Generación

- **Secuenciación en Tiempo Real:**
 - SMRT (Single Molecule Real Time sequencing) PacBio (Pacific Biosciences).
- **Nanoporos:**
 - Nanopore, MinION (Oxford).

SIN POLIMERASAS

NO REQUIEREN AMPLIFICACIÓN DE ADN

PacBio (Pacific Biotechnology)



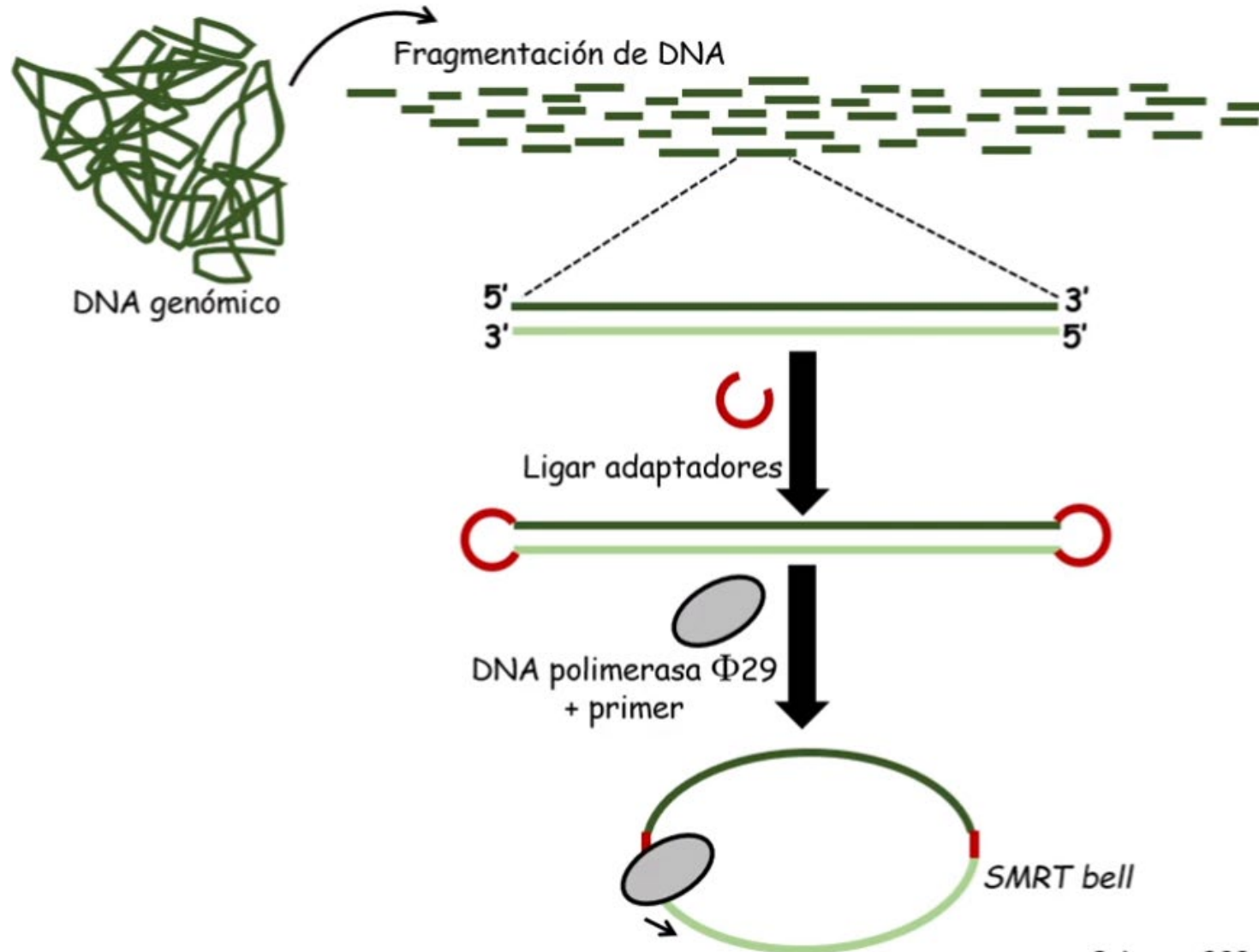
SMRT sequencing, fundamentos:

<https://youtu.be/NHCJ8PtYCFc?si=HJfAsPmKThS8b1vJ>

PacBio, fundamentos:

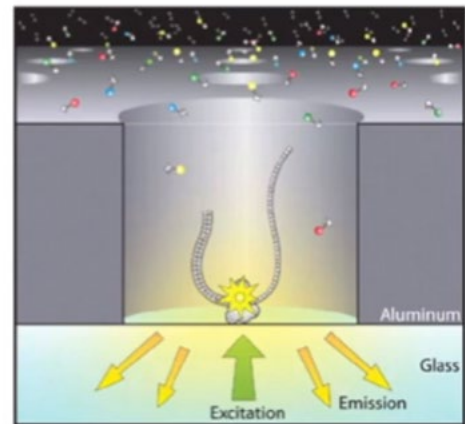
<https://youtu.be/ID8JyAbwEo?si=ALOWySXJ2SUtvOB>

PacBio



SMRT Sequencing: Single Molecule Real-Time Sequencing

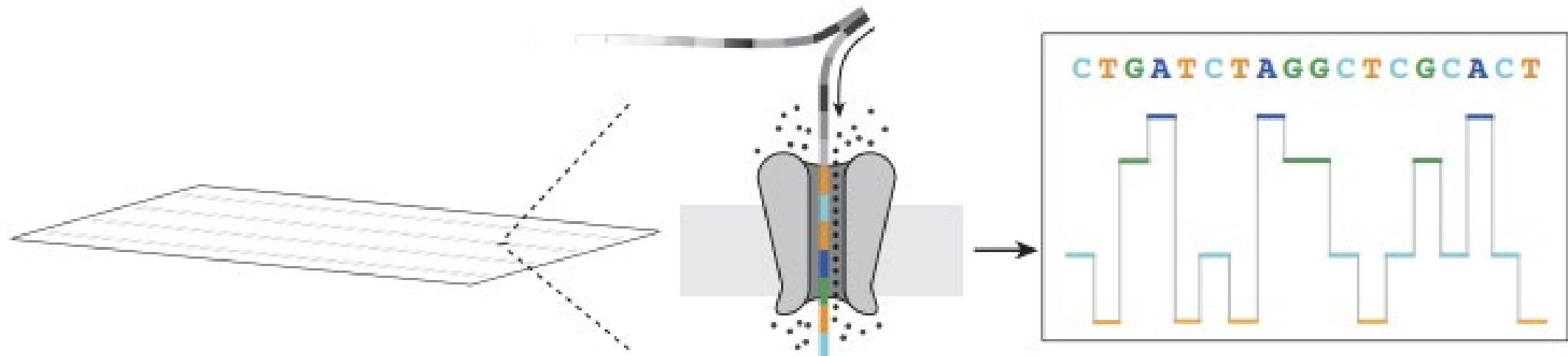
PacBio (Pacific Biotechnology)



Síntesis de DNA
con nucleótidos
fluorescentes

Secuenciación de
ambas cadenas del
DNA original en
cada ZMW

3.- Secuenciación de Tercera Generación



Nanopore (Oxford)

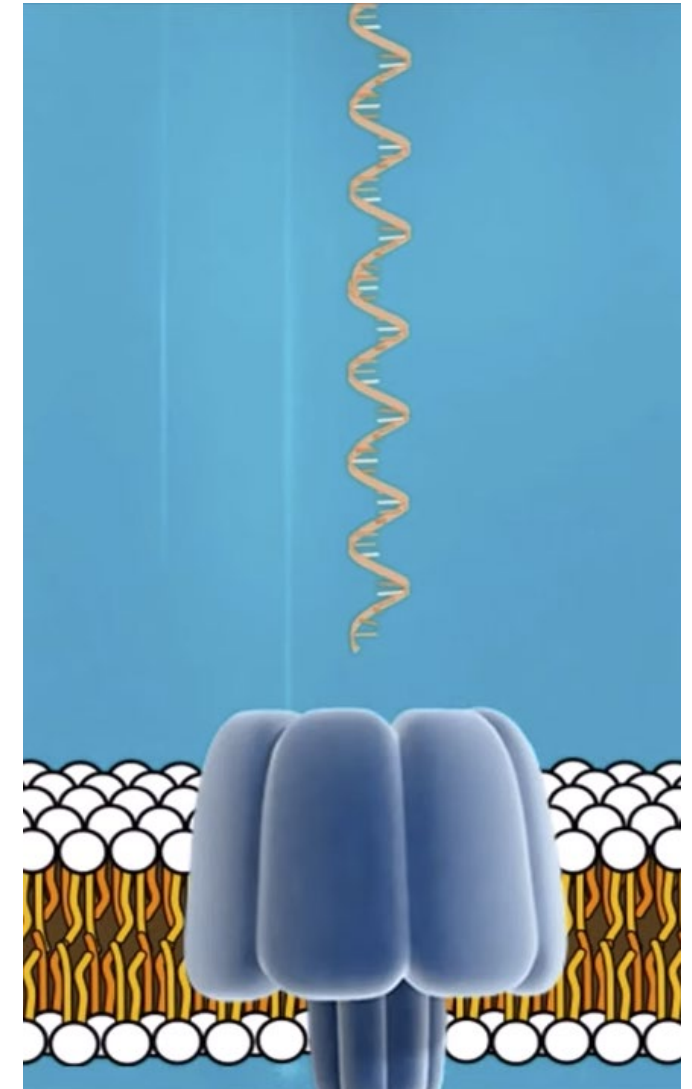
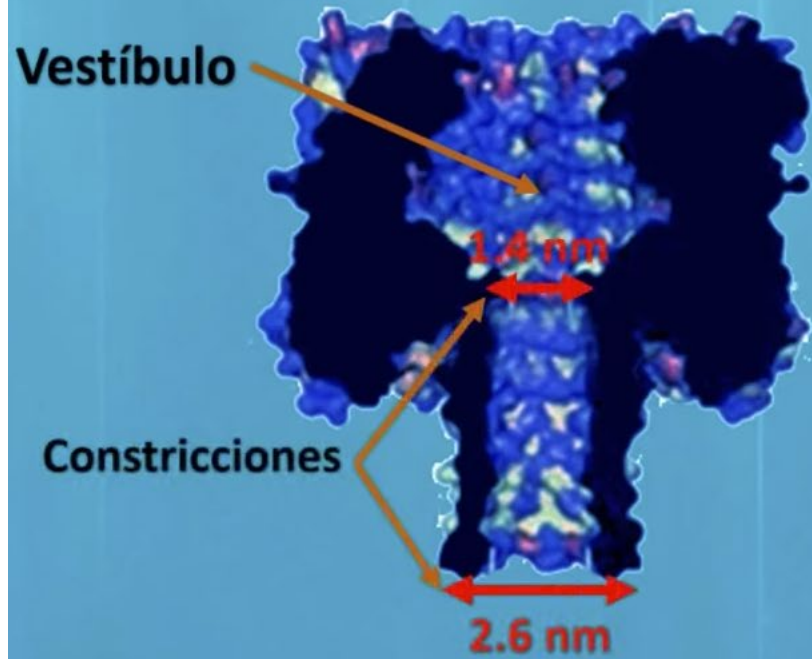


Nanopore, fundamentos:

<https://youtu.be/RcP85JHLmnl?si=ahTB1ZRa1NtU5n2M>

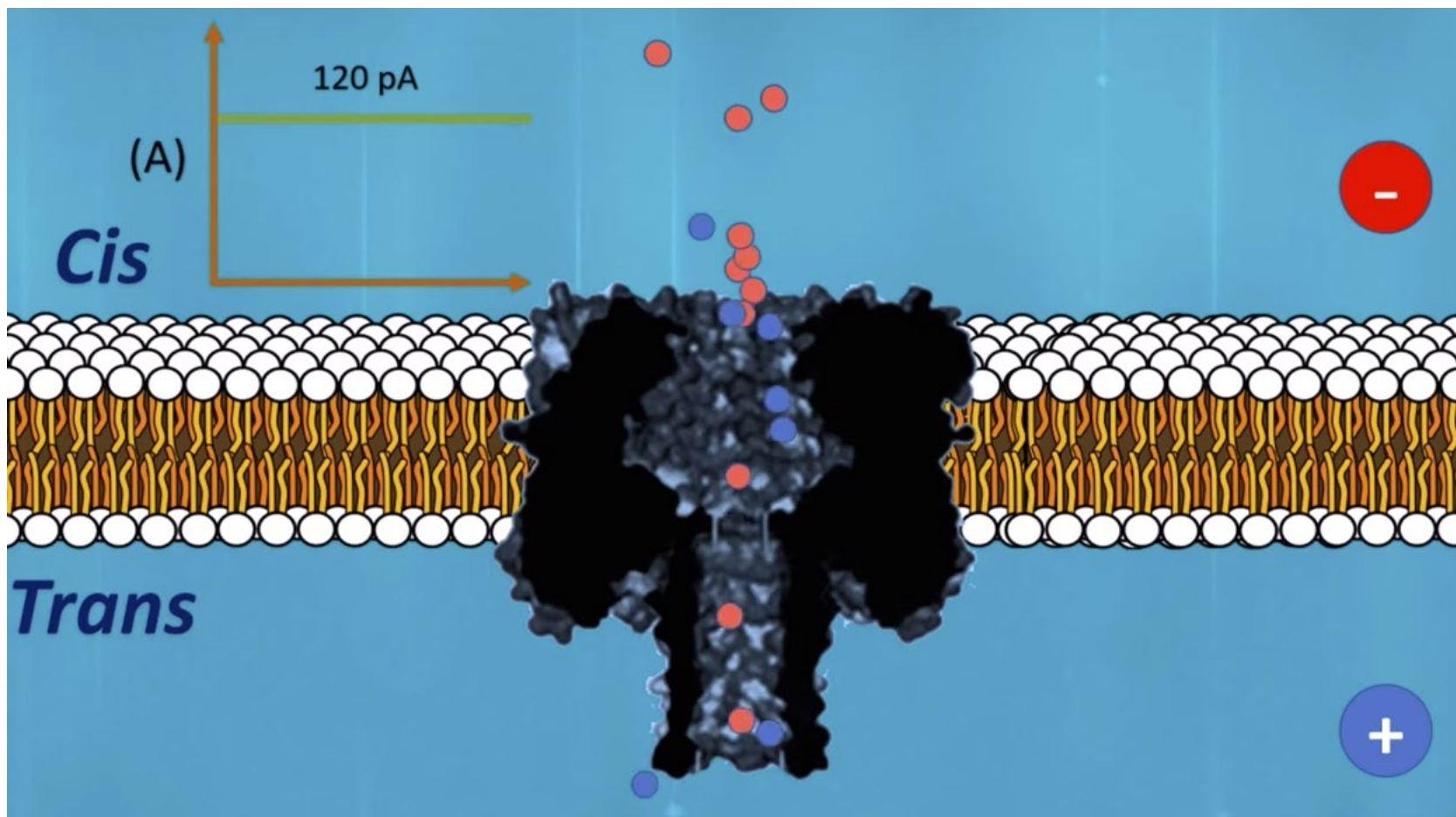
Nanopore (Oxford)

Alfa hemolisina



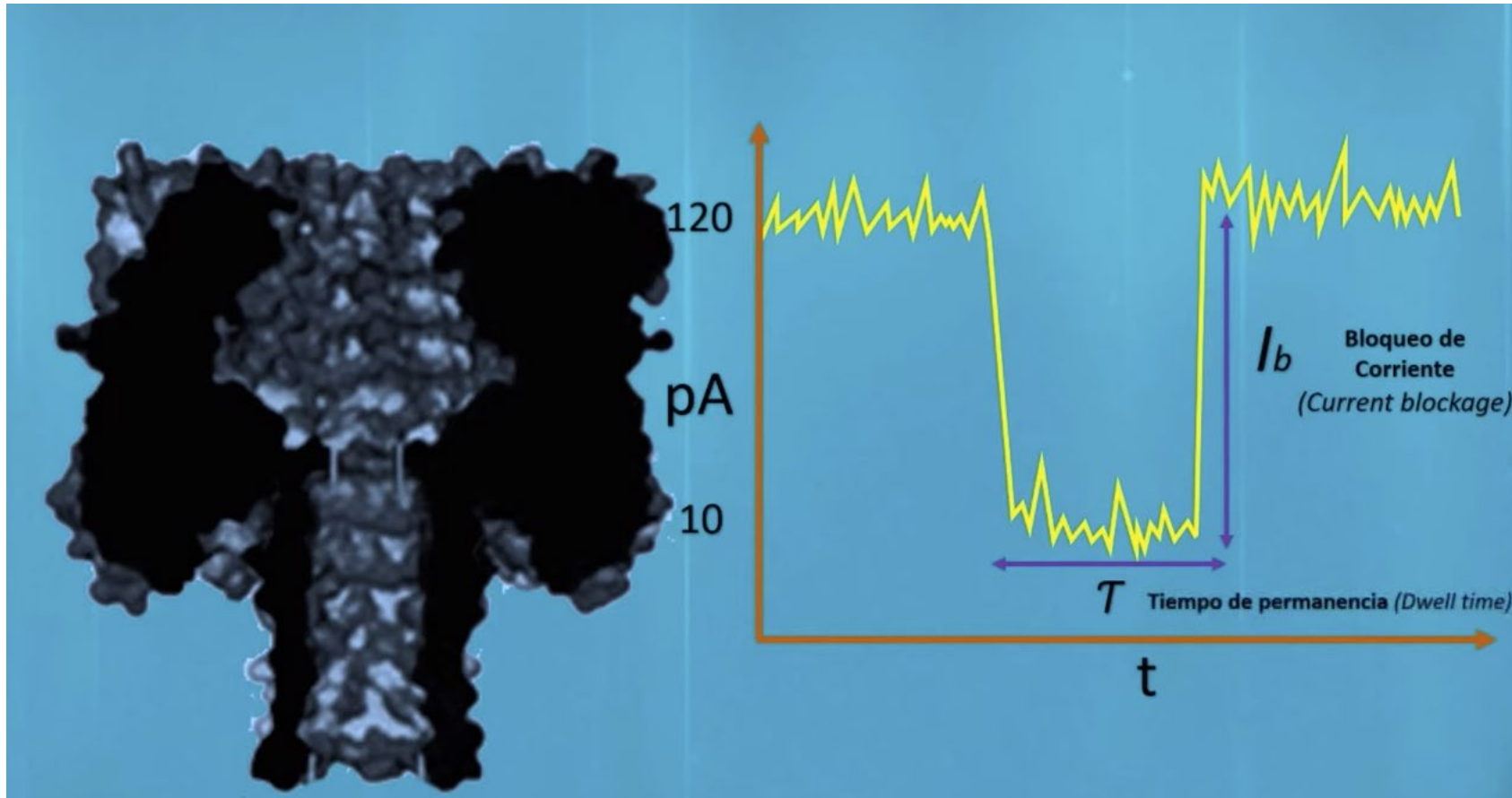
Rapidez
Economía

Nanopore (Oxford)



Se establece un **flujo de iones constante.**

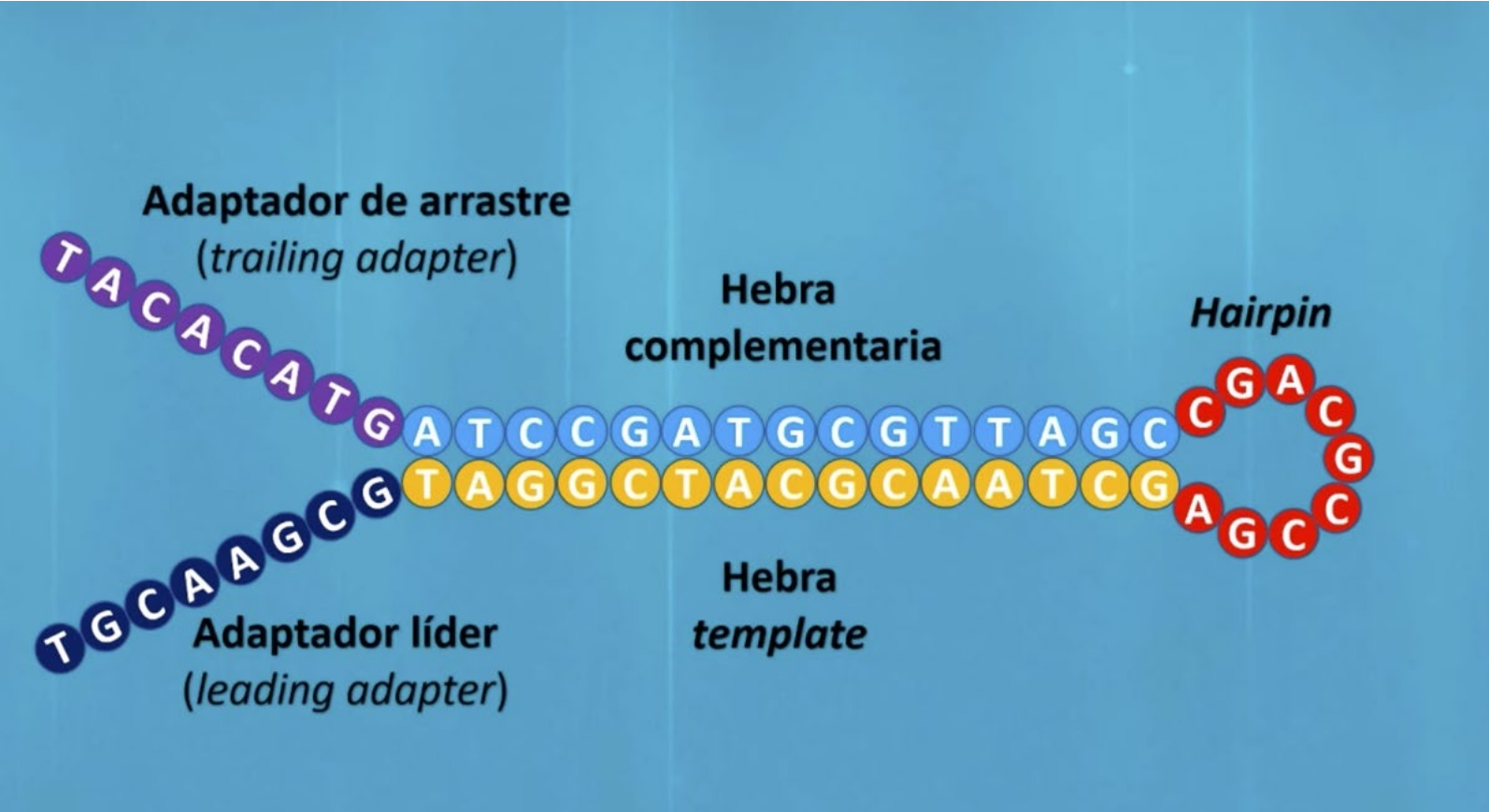
Nanopore (Oxford)



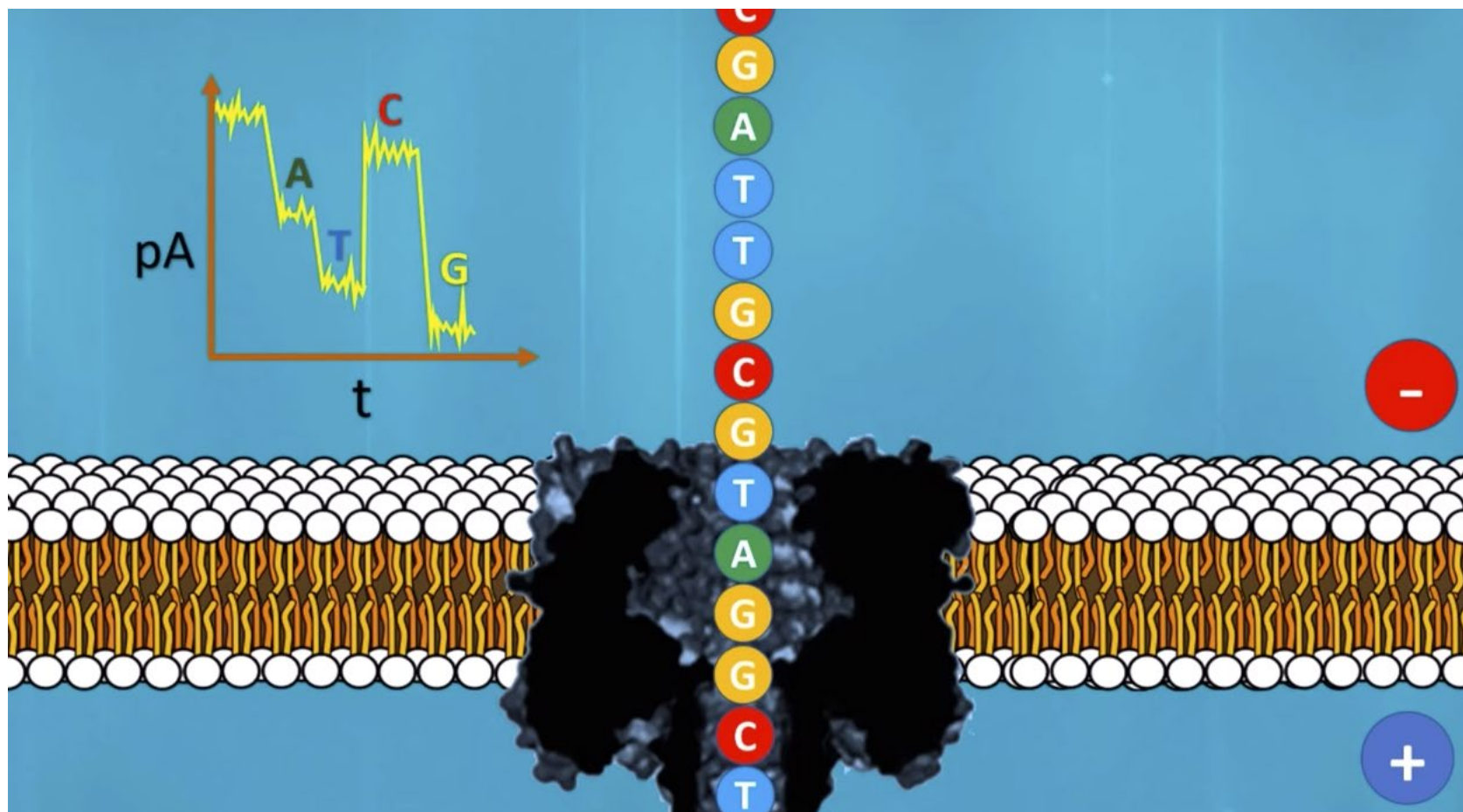
Cada vez que una molécula pasa por el poro, **la corriente se interrumpe.**

Tenemos en cuenta la *intensidad* del bloqueo (*current blockage*) y la duración (*dwell time*).

Nanopore (Oxford)

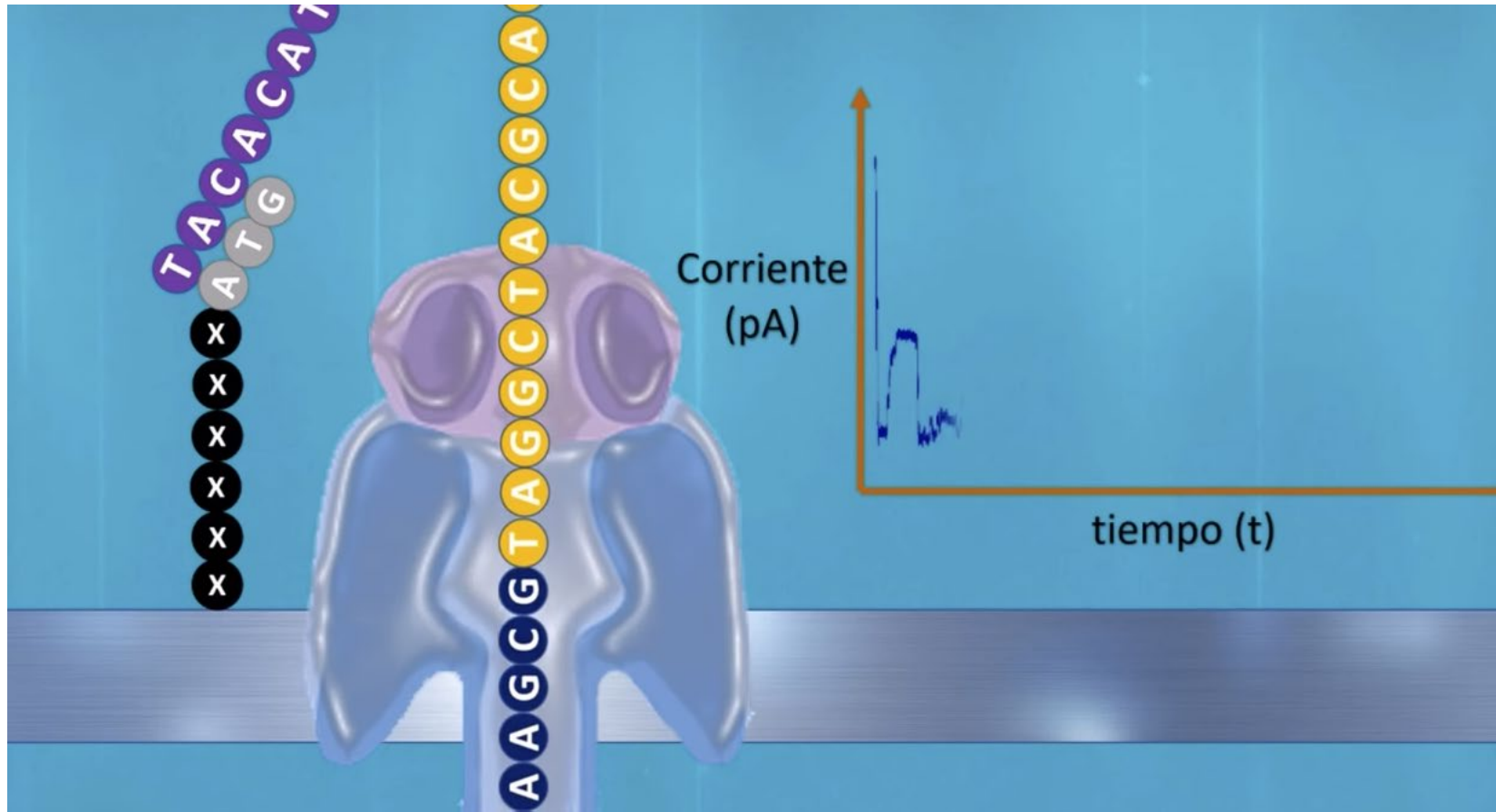


Nanopore (Oxford)



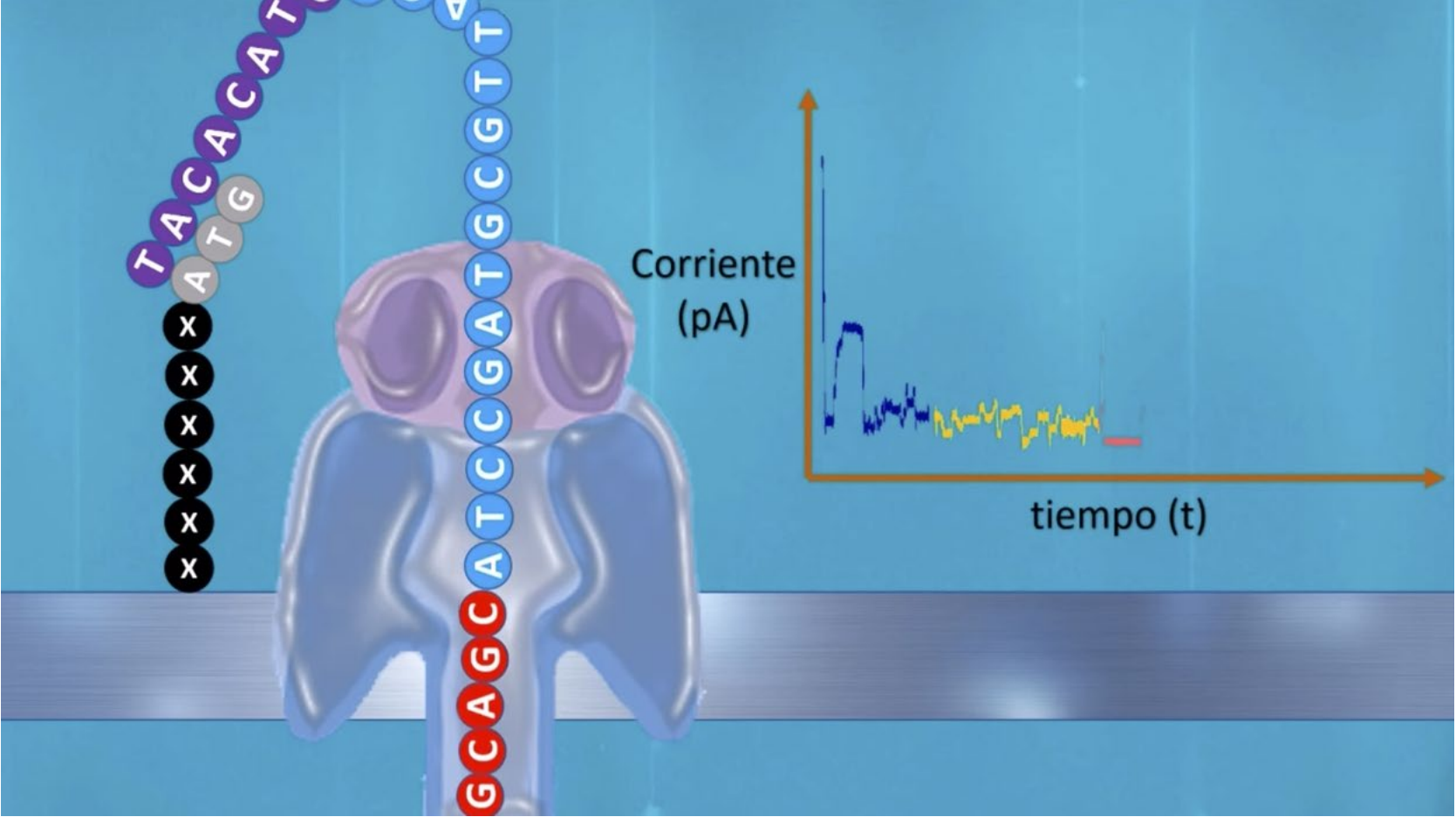
Cada nucleótido presenta un **patrón diferente y distintivo**.

Nanopore (Oxford)

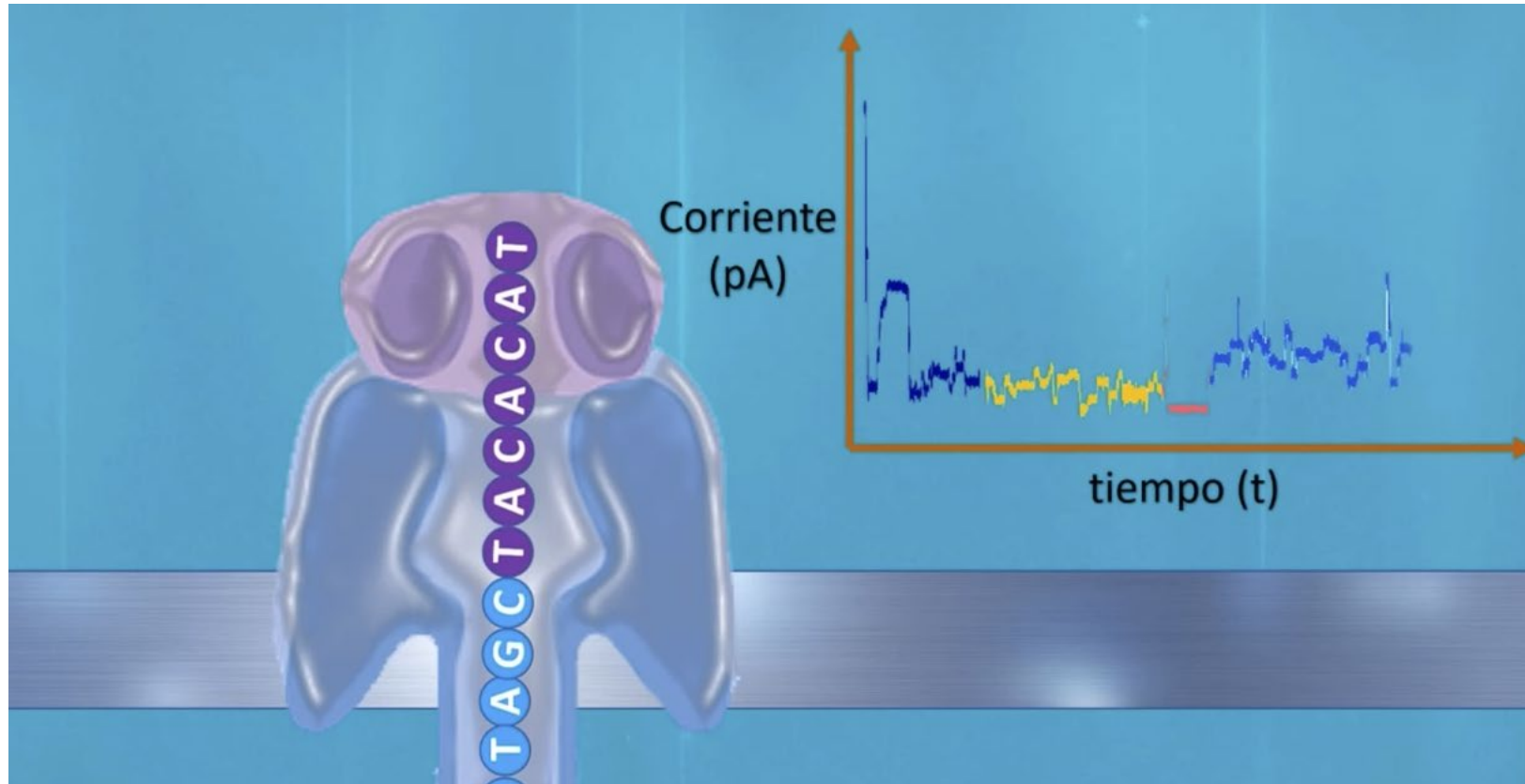


La **proteína motora** acerca el ADN al poro que, por afinidad del otro adaptador, se **introduce en el poro**.

Nanopore (Oxford)



Nanopore (Oxford)



Nanopore (Oxford)

