



Secuenciadores Personales

Rubén Jarne Cabañero 696322

Secuenciación del ADN

Conjunto de métodos y técnicas usadas para determinar el orden en que se disponen los cuatro nucleótidos (A, C, G y T) en un fragmento de ADN.

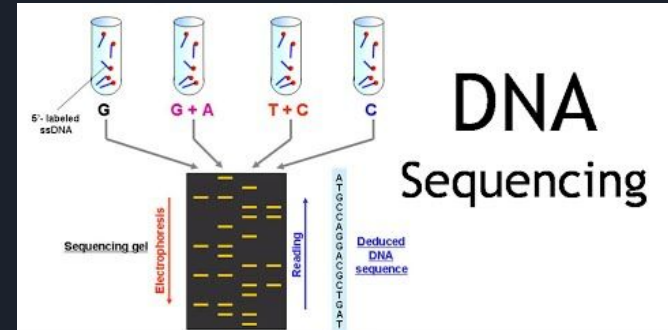
Útil para tener la información genética que se transporta en un segmento específico.




Evolución de los secuenciadores - Secuenciación química

Publicado en 1976, se basa en la modificación química del ADN y posterior escisión en bases específicas. También se conoce como método de Maxam-Gilbert

Permite leer unas 100 bases por secuencia.





Evolución de los secuenciadores - Secuenciación química

1. Se rompen las moléculas marcadas con reacciones químicas específicas para cada una de las bases.
2. Se cogen cuatro muestras proporcionales de la muestra inicial y se tratan bajo condiciones distintas.
3. Se añade “piperidina” para romper la molécula de ADN por la base modificada.
4. Los productos se leen por el tamaño en geles de poliacrilamida y el patrón de sus bandas radiactivas.



Evolución de los secuenciadores - Secuenciación dideoxinucleótidos

Desarrollado en 1977.

Se secuencian regiones de ADN de hasta 900 pb.


Empleado en el Proyecto Genoma Humano.

Permite determinar la secuencia del molde a medida que su hebra es sintetizada.



Evolución de los secuenciadores - Secuenciación dideoxinucleótidos

1. Se preparan cuatro tubos con un cebador, un desoxirribonucleótido trifosfato, ADN-polimerasa y un dideoxinucleótido trifosfato (este último distinto por cada tubo).
2. Se realiza electroforesis en gel de poliacrilamida para separar los diversos fragmentos en función de su tamaño.
3. Se reconstruye la secuencia sintetizada que es complementaria a la secuencia del molde.




Evolución de los secuenciadores - Secuenciación de nueva generación

Conjunto de técnicas más recientes de secuenciación de ADN.


Características comunes:

- Paralelización
- Microescala
- Rápidas
- Bajo coste
- Longitudes más cortas



Evolución de los secuenciadores - Secuenciación de nueva generación

1. Se divide el ADN en fragmentos que se clonan y se agrupan en clusters para secuenciarlos.
2. Se realiza la secuenciación alternando ciclos de terminación reversible y toma de imágenes.
3. Se generan las lecturas de los extremos de cada fragmento de ADN mediante uno de los siguientes métodos:
 - a. Paired end: por fragmentos de ADN pequeños de los que se secuencia el final de ambos extremos
 - b. Mate pairs: por fragmentos de ADN de tamaño conocido que se circularizan y se unen. Finalmente se trocean al azar para purificar los segmentos que contienen el adaptador




Evolución de los secuenciadores - Secuenciación de nueva generación

La frecuencia de cada base en las lecturas indica la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición y se conoce como profundidad de cobertura.

Secuenciadores destacados:


- 454 GS FLX, de Roche
- HiSeq, de Illumina
- SOLid, de Life Technologies




Evolución de los secuenciadores - Secuenciación de nueva generación

Aplicaciones:

- Análisis del genoma humano.
- Investigación sobre enfermedades.
- Investigación del genoma de los virus y bacterias.



Secuenciador	454 GS FLX	HiSeq	SOLiDv4	Sanger 3730xl
Longitud de lectura	700 pb	50 a 300 pb	30 a 100 pb	400 a 900 pb
Precisión	99,9%	98%	99,94%	99,999%
Millones de lecturas/carrera	1	hasta 3000	hasta 1400	-
Tiempo/carrera	1 día	1-10 días	1-2 semanas	20 min - 3 h
Precio/millón de bases	10	0,05 - 0,15	0,13	2400
Precio instrumento (\$)	500.000 7000 por ejecución	690.000 6000	495.000 15000/100 Gb	95.000 4 cada reacción de 800 bp



Secuenciador	454 GS FLX	HiSeq	SOLiDv4	Sanger 3730xl
Ventajas	Tamaño de lectura largo. Rápido.	Proporciona una gran cantidad de datos.	Bajo coste por base.	Lecturas individuales largas. Útil en muchas aplicaciones.
Desventajas	Carreras de alto coste. Errores en homopolímeros.	Equipamiento de alto coste. Requiere altas concentraciones de ADN.	Lento. Problemas secuenciando secuencias palíndromas.	Caro e impráctico para proyectos de secuenciación extensos.



Secuenciadores personales

Los secuenciadores personales permiten secuenciar una molécula de adn completa y se venden por un precio asequible (900€ aproximadamente).

Funcionan mediante nanoporos y permiten el análisis de los resultados sin la necesidad de expertos de laboratorio presentes.

También reducen los tiempos de espera significativamente.



Secuenciadores personales - Secuenciación por nanoporos

La secuenciación por nanoporos es más precisa que otras tecnologías que se basan por ejemplo en cortar la molécula del ADN y amplificar los fragmentos ya que aparecen procesos en los que puede haber más errores.


Además elimina la necesidad de amplificar el ADN o usar caros reactivos



Secuenciadores personales - Secuenciación por nanoporos

El procedimiento es el siguiente:

- Enhebrar el ADN a través de un poro de proteína creado en una membrana.
- Generar nanoporos entre dos compartimentos.
- Generar corriente eléctrica por los poros, las bases del ADN tienen distintas resistencias y mediante la medición del voltaje se puede reconocer cada base.
- La máquina lee electrónicamente los distintos voltajes y crea la secuencia electrónicamente




Secuenciadores personales - Secuenciadores en el mercado - MinION

Su precio actual está a 900 euros.

Incluye: Dispositivo MinION, dos cartuchos, kit de lavado, kit de secuenciación.

Trabaja con la tecnología mencionada de los nanoporos y la posibilidad de conectarlo directamente por USB a un ordenador





Secuenciadores personales - Secuenciadores en el mercado - MinION

- Las hebras atraviesan cada poro a 450 letras por segundo.
- Permite elegir la longitud de lectura
- Permite la secuenciación a tiempo real.
- A costa de la portabilidad y comodidad, MinION no es tan rápido y preciso como los otros secuenciadores.


Secuenciadores personales - Secuenciadores en el mercado - NovaSeq™ 6000

De la empresa Illumina. Tiene el tamaño aproximado de una impresora.

Permite secuenciar el ADN por aproximadamente 950 euros.

Mayor precisión que MinION pero menos portable.





Secuenciadores personales - Secuenciadores en el mercado - NovaSeq™ 6000

Sus especificaciones principales son:

- Rango de salida 4800-6000 Gb
- Lecturas de carrera 32-40 B
- Leer una longitud total de 2 x 250 bp

Pese a ser más grande que el MinION tiene la ventaja de leer extensiones muy largas de letras de ADN de forma consecutiva.


MinION tiene lecturas comunes de 10.000 letras y éste tiene el récord de 882.000 letras.

Secuenciadores personales - Secuenciadores en el mercado - Pacbio Sequel System

Desarrollado por la empresa PACBIO.

Es el más grande por lo que apenas entraría en la categoría de secuenciador personal, pero de igual manera que el resto, no requiere de expertos y su precio es asequible.






Secuenciadores personales - Diagnóstico de COVID-19 mediante MinION - Introducción

El virus COVID-19 tiene algunos paralelismos con el MERS (otro síndrome respiratorio) como por ejemplo, que la presencia de otras infecciones pueden empeorar gravemente la situación con el virus.


Un estudio en China comprobó mediante el secuenciador personal MinION la existencia de otros microorganismos en pacientes con COVID-19 diagnosticado buscando específicamente por virus respiratorios.

No se encontró ningún virus pero se identificaron varios casos de infecciones por hongos.



Secuenciadores personales - Diagnóstico de COVID-19 mediante MinION - Introducción


Al detectar rápidamente el patógeno primario y otras infecciones que están presentes al principio de la enfermedad gracias a la secuenciación se puede actuar preventivamente y tomar medidas cautelares.



Secuenciadores personales - Diagnóstico de COVID-19 mediante MinION - Proceso

Se diseñó una serie de cebadores para que el genoma del SARS-CoV-2 pudiera ser amplificado en apropiadamente 1000 fragmentos secuenciales pareados de bases, con una superposición de aproximadamente 200 pares de bases para permitir el ensamblaje de la secuencia desde el amplicón.

Para probar si los cebadores podían generar amplicones, se infectó una célula Vero con un gen aislado del COVID.




Secuenciadores personales - Diagnóstico de COVID-19 mediante MinION - Proceso

Se generaron 30 amplicones de las muestras de COVID y se secuenciaron mediante MinION.

Se evaluaron los amplicones con muestras de los hisopos nasofaríngeos recolectados de dos pacientes con COVID.

En total se tomaron 3 muestras y aunque la presencia de algunos amplicones estaba presente que otros, no se pudo identificar y secuenciar la enfermedad.



Secuenciadores personales - Diagnóstico de COVID-19 mediante MinION - Proceso

Para finalizar, se tomaron las 3 muestras anteriores, esta vez sin presunciones para identificar bacterias.

Tras esto se llegó a la conclusión de que la profundidad de lectura de los amplicones fue mucho mayor que con este último método.