

SECUENCIACIÓN SANGER DE ADN: GUÍA DE SOLUCIONES TÉCNICAS

Secugen recomienda que para la visualización de las secuencias se usen programas que permitan ver el dato crudo, ya que a partir de ese dato se puede evaluar la eficiencia de la reacción de secuenciación.

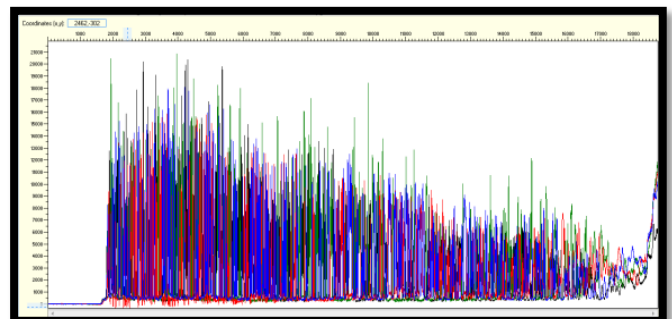
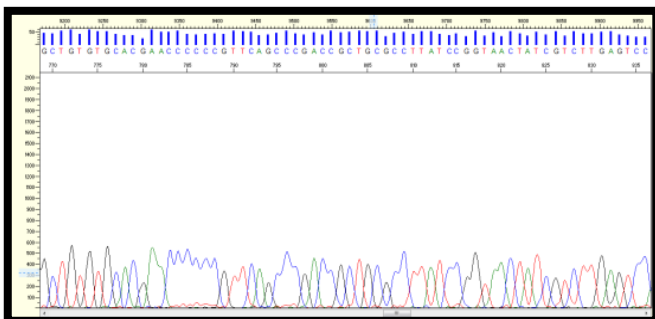
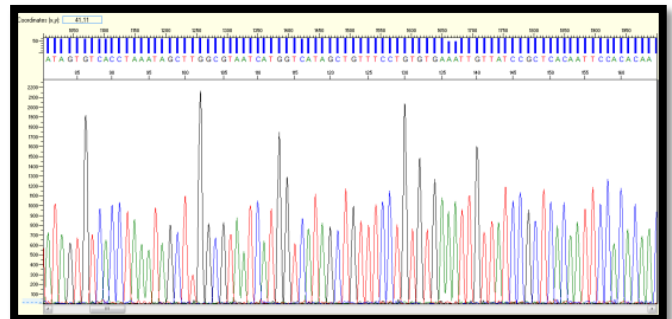
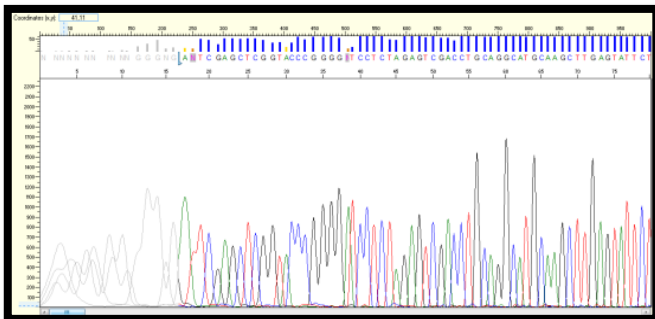
Se recomienda el uso del programa Sequence Scanner de Applied Biosystems.

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN CORRECTA

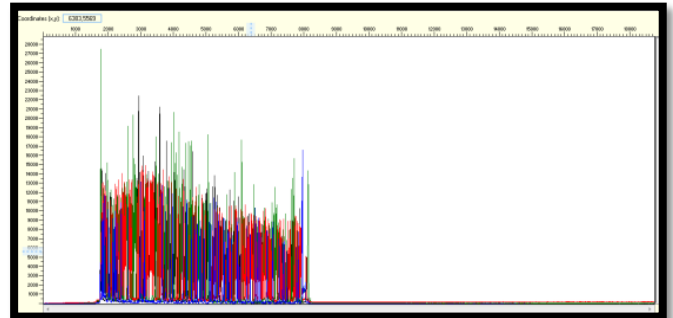
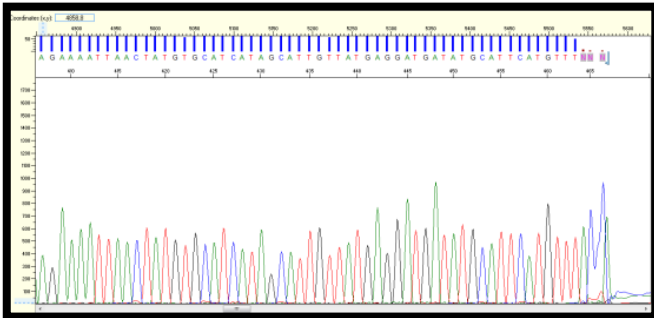
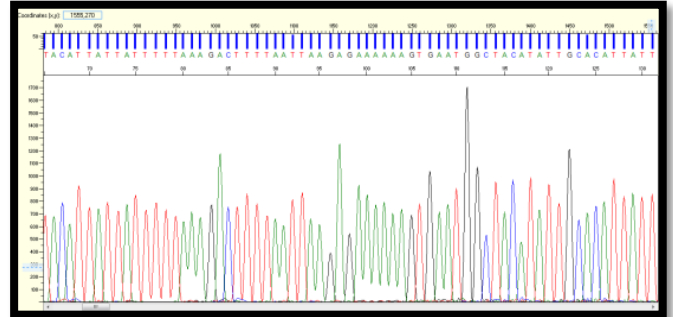
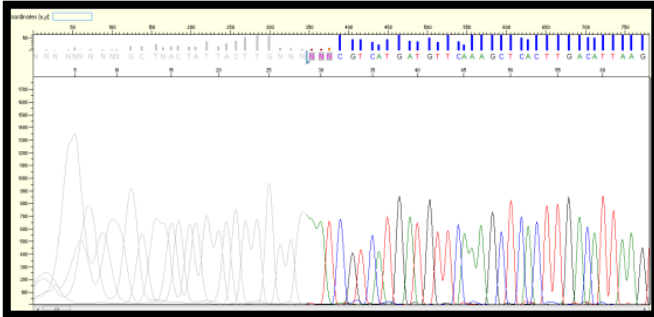
En el electroforegrama se observan picos definidos con buenos valores de calidad. Normalmente se observa una pequeña zona al principio de la carrera donde los picos no están perfectamente resueltos. El dato crudo tiene intensidades a partir de 1000 unidades de fluorescencia.

Ejemplo.

PLÁSMIDO



AMPLICIÓN DE PCR



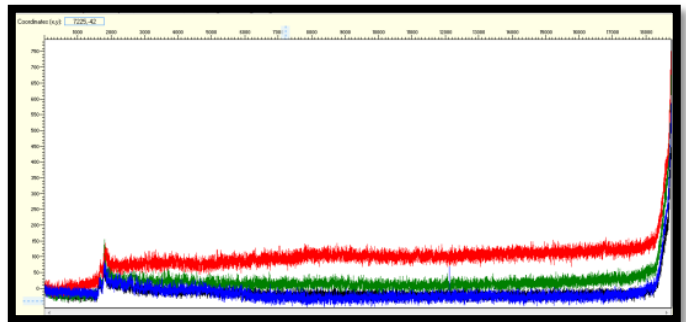
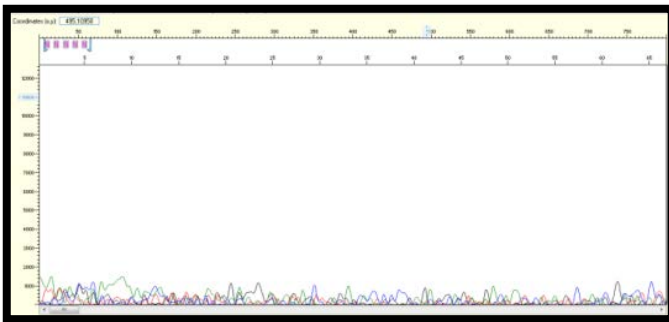
REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN FALLIDA

Aspecto de la secuencia.

- En el electroforegrama no se identifican picos definidos.
- Se asignan Ns en lugar de las bases.
- El archivo de secuencia de lectura produce una secuencia no reconocible.
- El dato crudo tiene una intensidad de señal de cien unidades como máximo.

Ejemplo.

NO REACCIÓN



Causas posibles.

Las causas de este tipo de resultados pueden ser varias, los más comunes son las siguientes:

- La concentración del molde es demasiado baja.

Nota: Las medidas de concentración de ADN mediante espectrofotometría UV son a menudo inexactas y la concentración suele ser sobrestimada. Los geles de agarosa o la espectrofluorometría son mejores métodos de estimación de la calidad y la cantidad. En este caso el dato crudo es bajo, alrededor de 100, debido a una reacción de secuenciación ineficiente.

- No se ha añadido el cebador correcto a la reacción, por lo que no se une al molde y la reacción no tiene lugar.
- La purificación del molde no es adecuada. En ocasiones se arrastra etanol u otras moléculas que inhiben a la DNA polimerasa, provocando que no haya reacción de secuenciación.

Tratamiento.

- Comprobación que la concentración del molde mediante gel de agarosa o espectrofluorometría para confirmar que está dentro del rango solicitado.
- Comprobación que la secuencia del cebador hibrida en el molde.
- Mejorar la calidad de la preparación del molde y de los cebadores, haciendo diluciones nuevas cada vez, en caso de detectar problemas.

CAIDA BRUSCA DE LA SEÑAL

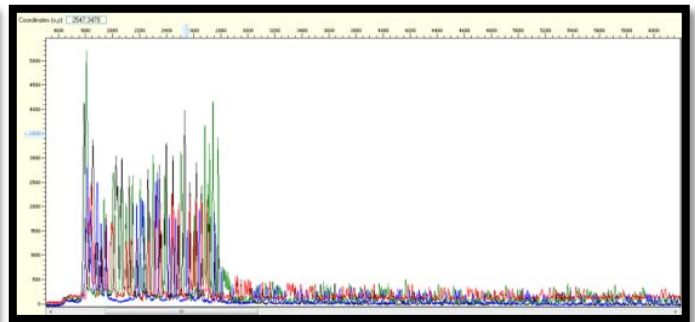
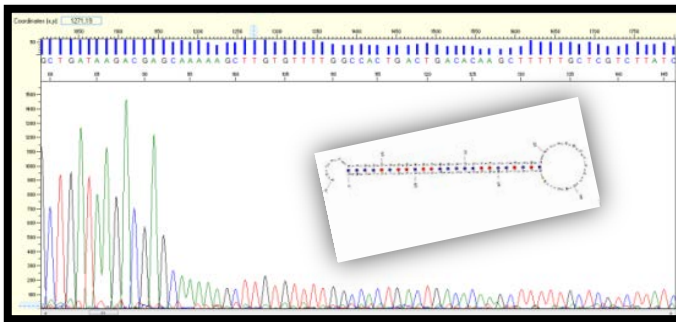
Aspecto de la secuencia.

- La lectura de la secuencia se detiene de repente o la intensidad de los picos disminuye notablemente. En muchos casos es debido a una fuerte estructura secundaria o repeticiones.

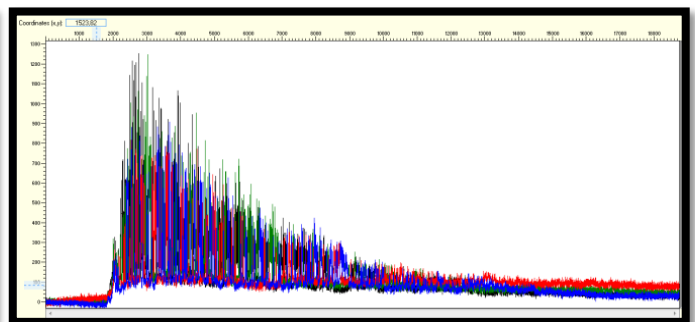
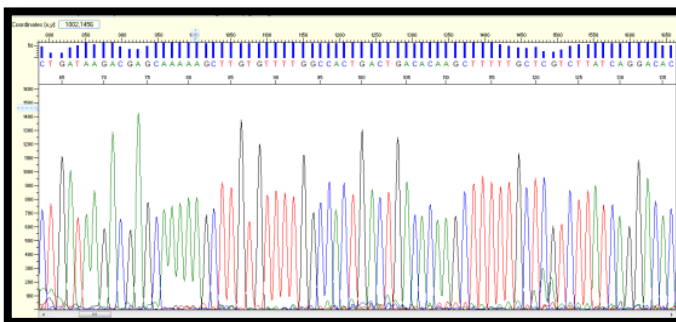
Nota: algunos vectores de clonaje tienen palíndromos flanqueando la zona de clonaje lo que puede provocar este efecto de caída en la secuencia.

Ejemplo.

ESTRUCTURA SECUNDARIA EN PLÁSMIDO SECUENCIADO EN CONDICIONES ESTÁNDAR



ESTRUCTURA SECUNDARIA EN PLÁSMIDO SECUENCIADO EN CONDICIONES ESPECIALES





Área de Secuenciación ADN
Tel.: +34 91 837 31 12 ext.4449
Fax: +34 91 804 72 93
www.secugen.es
Madrid - España

Causas posibles.

- Fuerte estructura secundaria en el molde. Algunos vectores de clonaje tienen palíndromos flanqueando la zona de clonaje lo que puede provocar este efecto de caída en la secuencia por la generación de una horquilla estable a la temperatura de elongación.
- Región rica en GC, o repeticiones de GT.
- La muestra contiene una construcción de RNAi.

Tratamiento.

- Aplicación de protocolos especiales para estructuras secundarias o regiones ricas en repeticiones.

Causas posibles.

- Los productos de PCR no se han purificado adecuadamente. En este caso los cebadores residuales de la PCR pueden actuar como cebadores en la reacción de secuenciación.
- El producto de PCR puede ser heterocigoto debido a indels presente en un organismo diploide o poliploide.
- Contaminación del clon. En este caso el comienzo de la secuencia tiene a menudo buena calidad y a partir de un punto se observa doble secuencia, debido a la existencia de dos clones con insertos diferentes.
- Adición de dos cebadores a la reacción de secuenciación.
- La reacción de PCR genera más de un producto y ambos son secuenciados.
- Existencia de otra zona en el molde donde el cebador puede unirse.

Tratamiento.

- Si se sospecha que el clon está contaminado se recomienda plaquear de nuevo en medio selectivo y seleccionar otros clones.
- Si se sospecha heterogeneidad o heterocigosidad en el producto de PCR, el examen de la zona con doble secuencia puede dar información. Nuevos cebadores de PCR que produzcan fragmentos menores pueden ayudar a identificar el área problemática. De modo alternativo se puede rediseñar el cebador de secuenciación o clonar el fragmento de PCR para su secuenciación independiente.
- Comprobar que solo hay un amplicón como producto de la reacción de PCR analizando por electroforesis en un gel de agarosa.
- Si se sospecha que se ha añadido más de un cebador, repetir la reacción. Si hay posibilidad de que la dilución de trabajo esté contaminada, volver al tubo original u obtener nuevo cebador.
- Comprobar el protocolo de purificación de productos de PCR y las soluciones empleadas.
- Comprobar que la secuencia del cebador está presente en el molde. Si no se conoce la secuencia puede ser necesario diseñar un nuevo cebador.

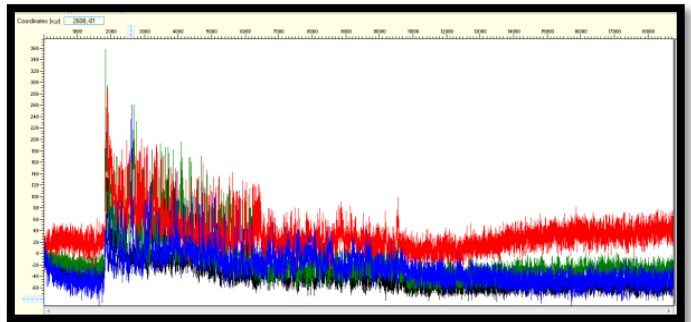
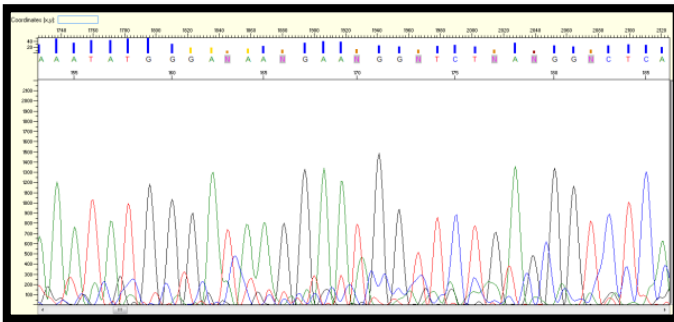
RUIDO DE FONDO

Aspecto de la secuencia.

- La secuencia tiene fondo, aparecen picos dispersos debajo de la secuencia principal junto con “Ns” dispersas por la secuencia. Baja señal del dato crudo.

Ejemplo.

FONDO



Causas posibles.

- La causa más común para esto es que la baja señal por encima del fondo se deba a una cantidad insuficiente de molde o cebador o a una reacción ineficiente de secuenciación debido a la inhibición de la DNA polimerasa. Un caso típico es el arrastre de trazas de etanol en la purificación del molde.

Tratamiento.

- Cuantificar de manera adecuada el molde y el cebador, estar seguro de que no ha habido arrastre de solventes orgánicos en la purificación.

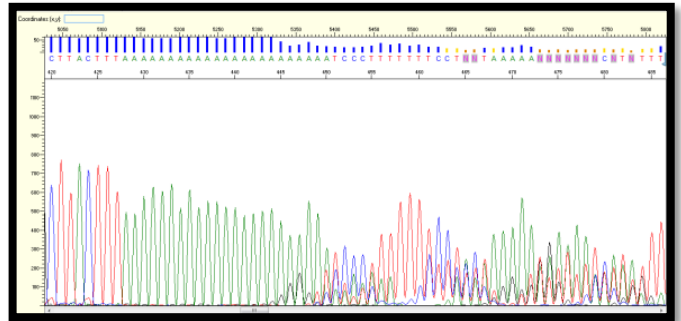
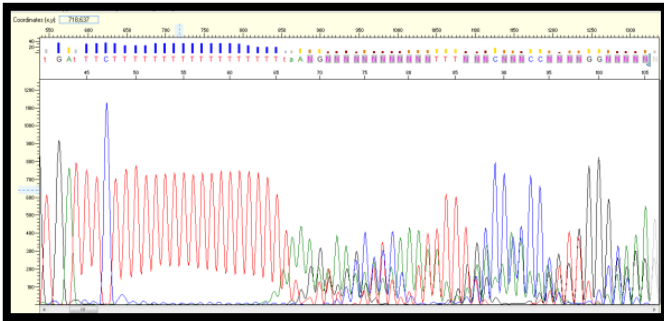
DESFASE DESPUÉS DE REGIÓN HOMOPOLIMÉRICA

Aspecto de la secuencia.

- La calidad de la secuencia disminuye después de repeticiones de alrededor de 10 unidades de la misma base. A partir de este punto se observa doble secuencia.

Ejemplo.

“STUTTERING”



Causas posibles.

- Desfase de la polimerasa durante la síntesis de DNA. Este es un efecto conocido de la secuenciación Sanger.

Tratamiento.

Opciones para resolver este tipo de artefactos:

- Secuenciar desde la otra hebra.
- Usar un primer polimonucleotídico con una base degenerada en el extremo 3'. Solo sirve para las As y Ts.



Área de Secuenciación ADN
Tel.: +34 91 837 31 12 ext.4449
Fax: +34 91 804 72 93
www.secugen.es
Madrid - España

DISMINUCIÓN GRADUAL DE LA SEÑAL

Aspecto de la secuencia.

- La señal de secuenciación cae gradualmente.

Causas posibles.

- Exceso de molde o de cebador. Reacción no equilibrada.
- Molde rico en GC o GT (DNA tratado con bisulfito, por ejemplo).

Tratamiento.

- Cuantificar fielmente el DNA del molde y del cebador.
- Secuenciar desde la hebra contraria.
- Secuenciar con protocolo alternativo.



Área de Secuenciación ADN
Tel.: +34 91 837 31 12 ext.4449
Fax: +34 91 804 72 93
www.secugen.es
Madrid - España

PICOS

Aspecto de la secuencia.

- Aparecen picos afilados, intensos y de varios colores en cualquier lugar de la lectura.

Causas posibles.

- Aunque no se conoce realmente cual es la causa de estos picos se sospecha que puedan originarse por impurezas o microburbujas que distorsionan la emisión de luz que la cámara captura.

Tratamiento.

- Volver a cargar la muestra en el secuenciador.