

Pirosecuenciación

GS-FLX (454)

Por: Iván Flores Rosales

Sin duda alguna uno de los factores más importantes que desencadenó la mejora continua de los métodos de secuenciación de ADN fue el HGP (Proyecto de Secuenciación del Genoma Humano por sus siglas en inglés). Con una inversión de más de 3 mil millones de dólares durante un tiempo de investigación de 15 años, se secuenciaron cerca de 3 mil millones de bases, es decir, 1 dólar por base; esto requirió la creación de métodos más rápidos, eficientes y baratos.

Esta tarea hubiese sido demasiado complicada hace 35 años, ya que la primera generación de secuenciación desarrollada por Sanger contaba con una capacidad de lectura de 80 bases mediante un método manual, tedioso y peligroso debido a la utilización de componentes radioactivos.

En los 90's con el comienzo de investigaciones que requerían secuenciación se promovió la mejora de estos métodos, y mediante la implementación de didesoxinucleótidos con fluorescencia y con la mejora y automatización del proceso

se logró secuenciar hasta 96 muestras de ADN en pocas horas, procesando entre 500 y 1000 bases, pero aun así a un precio muy alto; llegando al límite de esta generación, publicando en el año 1995 el primer genoma secuenciado *Haemophilus influenzae* y comenzando entonces con el HGP.

La siguiente generación fue la primera en lograr la introducción comercial mediante el sistema Roche™ GS-FLX (454) en el 2004 utilizando una tecnología alternativa conocida como pirosecuenciación.

La Secuenciación 454 involucra 3 pasos principales:

Generación de la librería de muestras.

Nebulización de la muestra y unión de adaptadores, posteriormente se realiza una emulsión con perlas, las cuales funcionarán como microrreactores donde se realizara la amplificación clonal mediante PCR.

Reacción de Pirosecuenciación.

Las perlas son transferidas a la placa para su posterior secuenciación, en conjunto con ATP Sulfurilasa, Luciferasa y Polimerasa; la adición de cada nucleótido produce una señal de luz, la cual es capturada por una cámara incluida en el equipo.

Procesamiento de datos.

Los datos son analizados a profundidad con herramientas bioinformáticas, para el mapeo de la muestra analizada.

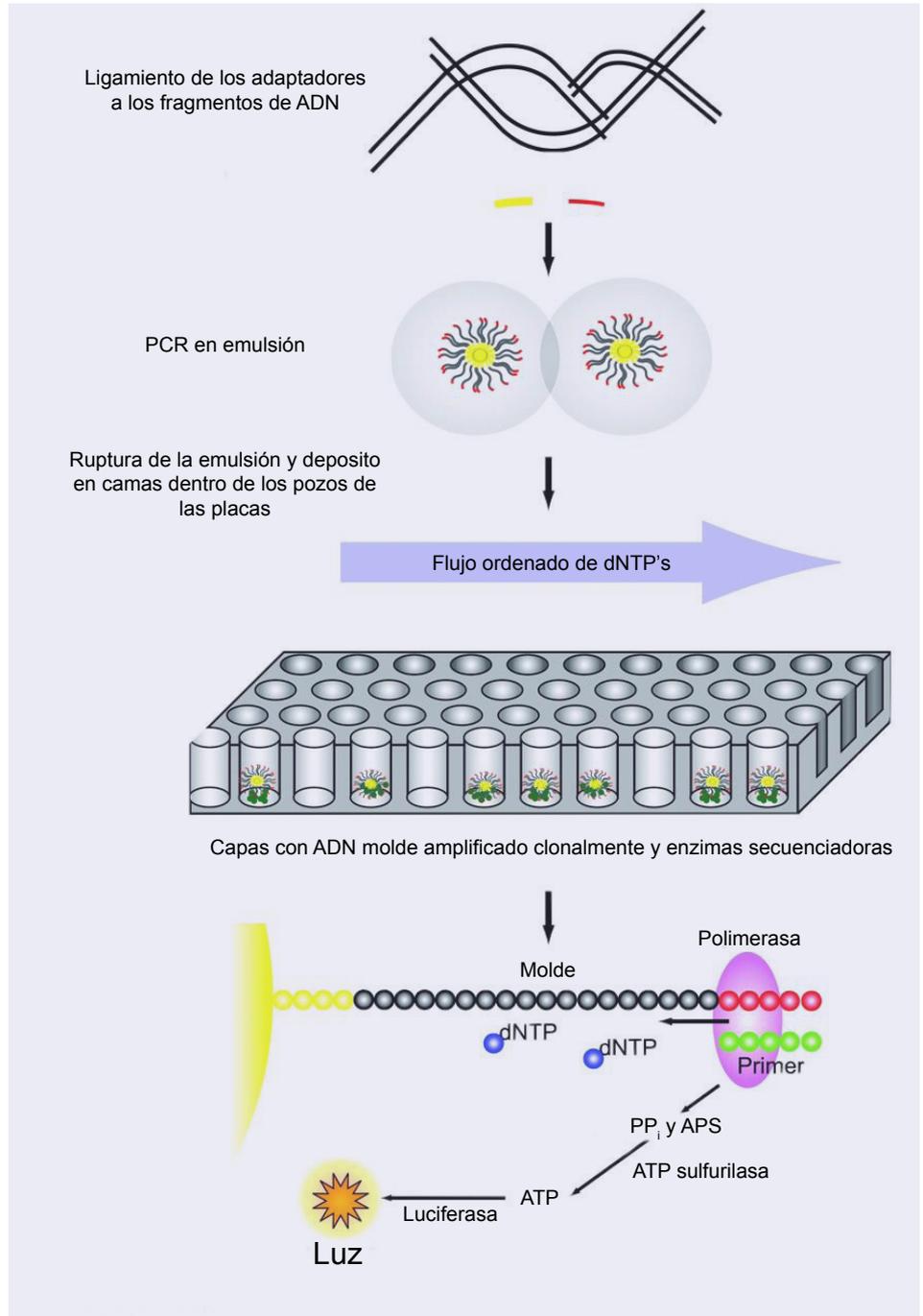
Éste es el método con mayor cobertura dentro de esta generación, disminuyendo entonces el costo a 0.01 dólares por base. (Enlace recomendado: <http://454.com/products/technology.asp>)

Actualmente con el propósito de abaratar los métodos y aumentar la fiabilidad de los mismos se han desarrollado los métodos de tercera generación basados en la secuenciación de una sola molécula de ADN (single molecule real time sequencing), esta tecnología desarrollada por Helicos BioSciences™ se basa en

la secuenciación a tiempo real de miles de millones de pequeñas moléculas únicas de ADN adheridas a una superficie sólida. Esta tecnología es recomendada para secuenciación de genomas y no para la secuenciación de nuevo.

Pacific Biosciences™ ha desarrollado una tecnología capaz de leer hasta 1000 nucleótidos de golpe, todo esto aunado a la desmesurada velocidad de desarrollo de la nanotecnología y la microscopia, hacen posible creer que en pocos años la secuenciación del genoma humano se realice en unas cuantas horas con un costo inferior a \$1000 dólares a diferencia de los 15 años y 3 mil millones de dólares invertidos en el HGP.

Sin duda alguna los métodos de secuenciación han permitido realizar investigaciones que hace unas cuantas décadas parecían inalcanzables; transcriptómica, el análisis de variabilidad, y los análisis de metagenómica.



Referencias:

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291:1304–51

National Human Genome Research Institute (2010) The Human Genome Project Completion, consultado el jueves 18 de abril, <http://www.genome.gov/11006943>

Sanger, F., Nicklen S., Coulson, AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467

Mardis Elaine R. (2008) (Departments of Genetics and Molecular Microbiology and Genome Sequencing Center, Washington University School of Medicine) Next-Generation DNA Sequencing Methods *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9:387–402

Roche Diagnostics Corporation. (s.f.). 454 Sequencing: The technology. Recuperado el 16 de Abril de 2013, de <http://454.com/products/technology.asp>