

47. Secuenciación del DNA

Gabriel Dorado Pérez

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

RESUMEN

El denominado Proyecto del Genoma Humano, iniciado en “The Human Genome Workshop” (Santa Fe, New Mexico, EUA, 1986) ha conseguido secuenciar los $\sim 3 \times 10^9$ pb del genoma humano en 15 años (2001). Ello ha sido posible gracias a algunos avances técnicos y mejoras de la técnica empleada (Lario et al, 1997). No obstante, aún no se sabe con certeza los genes que tenemos (el conocimiento de la secuencia no implica el conocimiento de las zonas codificantes). Paralelamente se han secuenciado los genomas de organismos modelo. El objetivo es tratar de descifrar las claves del fenotipo y desarrollo de los seres vivos en base a su secuencia génica. Además, ello permitirá identificar genes implicados en la aparición de enfermedades, abriendo las puertas de su diagnóstico precoz, prevención, terapia e incluso curación. No obstante, el porcentaje de organismos cuyo genoma se ha secuenciado es ínfimo en comparación con los seres vivos de la Tierra. Por tanto, no estamos en la Era Posgenómica, sino que este siglo será una auténtica Era Genómica en el más amplio sentido de la palabra. Las técnicas de secuenciación empleadas actualmente de forma rutinaria están basadas en metodologías publicadas en 1977: el método de Sanger y el de Maxam-Gilbert, siendo el primero el más popular. Ambos se basan en la generación de una población de moléculas marcadas radiactivamente, que representan todos los tamaños y combinaciones posibles. En este capítulo se describirán las diferentes metodologías, y en especial las variaciones del método de Sanger.

Título corto (60 caracteres como máximo): Secuenciación del DNA clonado.

Palabras clave: acrilamida, cebadores, didesoxinucleótidos, fluorescencia inducida por láser, fluorograma gel, terminadores.

Abreviaturas empleadas. APS: persulfato de amonio; CE: electroforesis capilar; ddNTP: didesoxinucleósido trifosfato; DNA: ácido desoxirribonucleico; dNTP: desoxinucleósidos trifosfato; LB: medio rico Luria-Bertani; Na₂-EDTA: sal disódica del ácido etilén diamino tetra-acético; PAGE: electroforesis en gel de poli(acrilamida); PCR: reacción en cadena de la polimerasa; PM: peso molecular; SDS: dodecil sulfato sódico; WTR: distancia del pocillo a la zona de lectura.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El denominado Proyecto del Genoma Humano, iniciado en “*The Human Genome Workshop*” (Santa Fe, New Mexico, EUA, 1986) ha conseguido secuenciar los $\sim 3 \times 10^9$ pb del genoma humano en 15 años (2001). Ello ha sido posible gracias a algunos avances técnicos y mejoras de la técnica empleada (Lario et al, 1997). No obstante, aún no se sabe con certeza los genes que tenemos (el conocimiento de la secuencia no implica el conocimiento de las zonas codificantes). Paralelamente se han secuenciado los genomas de organismos modelo tales como la bacteria *Escherichia coli* (3×10^6 pb), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (14×10^6 pb), el nemátodo *Cænorhabditis elegans* (80×10^6 pb), la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (165×10^6 pb) y el ratón doméstico *Mus musculus* (3×10^6 pb), entre otros. El estado de estos y otros proyectos de secuenciación puede comprobarse en el NCBI de EUA <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Genome/org.html>>. El objetivo es tratar de descifrar las claves del fenotipo y desarrollo de los seres vivos en base a su secuencia génica. Cómo, a partir de un óvulo fecundado, puede generarse y diferenciarse un organismo adulto con más de 10^{13} células. Además, ello permitirá identificar genes implicados en la aparición de enfermedades, abriendo las puertas de su diagnóstico precoz, prevención, terapia e incluso curación. En otras palabras, el Proyecto del Genoma no es un fin en sí, sino una vía para conocer y entender la vida en nuestro planeta: sus orígenes, evolución, los misterios del desarrollo, fisiología, comportamiento e interacciones con el medio ambiente. No obstante, el porcentaje de organismos cuyo genoma se ha secuenciado es ínfimo en comparación con los seres vivos de la Tierra. Por tanto, no estamos en la Era Posgenómica, sino que este siglo será una auténtica Era Genómica en el más amplio sentido de la palabra.

Para obtener información actualizada sobre el estado del Proyecto del Genoma Humano, puede consultarse “The Genome Database” (GDB) disponible en la siguiente dirección de InterNet: <<http://gdbwww.gdb.org>>.

2. PRINCIPIO EN QUE SE BASA LA SECUENCIACIÓN DEL DNA

Las técnicas de secuenciación empleadas actualmente de forma rutinaria están basadas en metodologías publicadas en 1977: el método de Sanger y el de Maxam–Gilbert, siendo el primero el más popular. Ambos se basan en la generación de una población de moléculas marcadas radiactivamente, que representan todos los tamaños y combinaciones posibles. El producto de cada una de las cuatro reacciones se somete, en cuatro carriles independientes, a electroforesis en gel de poliacrilamida y se revela siguiendo los métodos clásicos de autorradiografía. Las manchas aparecidas indican la bases presentes en cada posición de la secuencia.

El método de Maxam–Gilbert se basa en la rotura química de DNA de cadena sencilla (ssDNA) cuyo extremo 5' está marcado radiactivamente. Las roturas se realizan de forma controlada y específica. Controlada (esto es, limitada) para que se genere una población de fragmentos con todas las posibles combinaciones y longitudes. Específica, rompiendo la cadena nucleotídica de cuatro formas diferentes: en C; en C o T; en G; y finalmente en G o A.

El procedimiento de Sanger emplea una DNA polimerasa que copia la cadena molde a ssDNA en presencia de una mezcla de reacción que contiene los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) y una pequeña cantidad de un didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP), que es un análogo del primero. El análogo se diferencia del dNTP normal en que el carbono 3' de la desoxirribosa también presenta, al igual que el 2', un -H en vez de -OH. Se llevan a cabo cuatro reacciones en paralelo, cada una de las cuales contiene un ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, respectivamente). La DNA polimerasa es capaz de incorporar el análogo en la cadena que se sintetiza, pero como éste carece de extremo 3'-OH, dicha enzima es incapaz de unirle el siguiente nucleótido y por consiguiente se "termina" la reacción. Es por ello que esta técnica recibe también el nombre de terminación de didesóxidos y los ddNTPs suelen denominarse "terminadores".

3. SISTEMAS COMERCIALES NO RADIATIVOS

Recientemente se han desarrollado métodos no radioactivos para secuenciar ácidos nucleicos, que generan resultados comparables e incluso superiores a los producidos con isótopos. Incluyen sistemas manuales y automatizados.

Los sistemas manuales no radiactivos son similares a los isotópicos, con la diferencia de que emplean marcadores como la digoxigenina de BoehringerMannheim Biochemicals (Mannheim, Alemania; <<http://www.boehringer-mannheim.com>> y <<http://biochem.boehringer-mannheim.com>>) ahora parte de Roche Molecular Biochemicals (F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland; <<http://www.roche.com>>). Dichas moléculas pueden acoplarse a un anticuerpo para producir una reacción quimioluminiscente o coloreada. Las bandas generadas se interpretan como en el caso de los sistemas clásicos radiactivos.

Estos sistemas pueden complementarse con el uso de nuevas enzimas como la *ThermoSequenase* (equivalente a la *AmpliTaqs*, descrita más abajo) y los cebadores y terminadores fluorescentes "DYEnamic ET" de transferencia de energía desarrollados por AmershamPharmacia Biotech (Uppsala, Suecia; <<http://www.apbiotech.com>>), producto de la fusión entre AmershamLifeSciences (Little Chalfont, Reino Unido; <<http://www.amersham.co.uk>>, <<http://www.amersham.com>> y <<http://www.nycomed-amersham.com>>) y PharmaciaBiotech (Uppsala, Suecia; <<http://www.biotech.pharmacia.se>>).

Entre los sistemas automatizados no radiactivos existen básicamente dos opciones: la electroforesis en gel de poliacrilamida y la electroforesis capilar.

3.1. Basados en electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

La ventaja principal de los sistemas de secuenciación basados en la electroforesis de geles de poliacrilamida (PAGE; "PolyAcrylamide Gel Electrophoresis") es que permiten leer un mayor número de bases. El límite actual para geles de unos 90 cm es de unas 1400 bases con un 99% de

precisión. Su principal inconveniente es que son tediosos (hay que preparar el gel, limpiar los cristales y cargar manualmente las muestras), lentos y entrañan un cierto riesgo (manipulación de acrilamida monomérica, que es neurotóxico y neurocarcinógeno).

Gene ReadIR DNA Sequencing/Analysis System (Li-Cor, Lincoln, NE, USA; <<http://www.licor.com>>). Se trata de un sistema personal cuya principal ventaja es su costo moderado. Su principal desventaja es que permite secuenciar un número reducido de muestras. Su fundamento es similar al sistema Alf (descrito a continuación), con la salvedad de que utiliza un láser de infrarrojos que se supone más fiable para detectar ácidos nucleicos y menos sensible a interferencias proteicas de la muestra.

ALFexpress II DNA Analysis System (AmershamPharmaciaBiotech). Emplea cebadores marcados con un único fluoróforo para llevar a cabo cuatro reacciones independientes que se cargan en cuatro carriles diferentes del gel de poliacrilamida. Su principal desventaja es que al usar un solo fluoróforo no permite realizar las cuatro reacciones (correspondientes a cada clon) en un solo tubo. Del mismo modo, es necesario cargar cada una de las cuatro reacciones/clon en cuatro carriles diferentes en el gel de poliacrilamida, que debido a ello debe ser bastante ancho.

Vistra DNA Labstation 625 (AmershamPharmaciaBiotech). Puede emplear tanto la química de cebadores marcados como la más cómoda, rápida, barata y popular de terminadores marcados. Su principal desventaja es que no permite la elevada productividad del ABI PRISM 377, descrito a continuación.

ABI PRISM 377 (PerkinElmer/AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA; <<http://www.perkin-elmer.com>>), que sustituye a modelos anteriores (ABI 373, 373A y 373Stretch). Es, con diferencia, el sistema de secuenciación PAGE más versátil y potente del mercado. Permite emplear tanto la química de cebadores como la de terminadores (didesoxinucleótidos) marcados con cuatro fluoróforos diferentes. Ello hace posible poder llevar a cabo las cuatro reacciones en un mismo tubo y cargarlas en un solo carril del gel. Así, pueden secuenciarse en cada electroforesis 24, 32, 36, 48, 64 y hasta 96 clones diferentes. Asimismo, soporta diferentes longitudes de gel que permiten leer entre 200 y 1000 bases. Con ello se pueden conseguir rendimientos de hasta 96 kpb/gel. La mayor parte del Proyecto del Genoma Humano y Proyectos Accesorios se llevan a cabo con esta máquina. Esta empresa fabrica también otros secuenciadores menos poderosos (aunque más baratos), como el ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, cuya principal ventaja es que está basado en electroforesis capilar, por lo que no requiere preparar geles de poliacrilamida (ver más abajo).

3.2. Basados en electroforesis capilar (CE)

Los sistemas de secuenciación basados en electroforesis capilar (CE; “capillary electrophoresis”) son muy recientes y está claro que representan la próxima generación de secuenciación automática. Su ventaja principal es justamente ésa: el proceso se automatiza todavía más, siendo por ello muy cómodos. Basta colocar las reacciones de secuenciación en las placas microtiter y la máquina se encarga del resto. Además son mucho más rápidos y el operario no tiene que manipular directamente la acrilamida (no hay que

preparar gel). Su inconveniente es que las lecturas obtenidas (unas 500 bases con 99% de precisión) son menores que las que se consiguen mediante PAGE. Además, el costo por reacción es aproximadamente el doble que el de los sistemas basados en gel.

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer/AppliedBiosystems). Fue el primer sistema comercial de secuenciación mediante electroforesis capilar. Cada lectura es de unas 500 bases con un 99% de precisión, realizándose en 2 horas. Procesa secuencialmente grupos de hasta 48 ó 96 muestras. La puesta a punto se lleva a cabo en 10 minutos, funcionando después sin necesidad del operario. Ya ha sido anunciado su sucesor, probablemente llamado ABI PRISM 3100, que constará de 12 capilares en paralelo y será comercializado en 1999.

CEQ 2000 DNA Analysis System (BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA; <<http://www.beckman.com>> y <<http://www.beckmancoulter.com>>). Acaba de ser presentado y consta de 8 capilares que trabajan en paralelo, secuenciando 8 muestras en 2 horas. El sistema está automatizado, pudiendo secuenciar hasta 96 muestras en 24 h sin intervención del usuario. El tiempo requerido para configurar el sistema es de 10 minutos por programa (de 2 a 24 horas).

MegaBACE 1000 DNA Sequencing System (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA; <<http://www.mdyn.com>>). También acaba de ser presentado y consta de 96 capilares que secuencian en paralelo 96 muestras en 2 horas. Cada lectura es de unas 500 bases con un 99% de precisión. El sistema está automatizado, pudiendo secuenciar hasta 1.100 muestras (500 x 1.100 = 550.000 bases) en 24 h sin intervención del usuario. El tiempo requerido para configurar el sistema es de 10 minutos por programa (de 2 a 24 horas; de 1 a 1.100 muestras). La tecnología MegaBACE 1000 ha sido licenciada por diversas empresas, entre las que se encuentran AmershamPharmaciaBiotech y BeckmanCoulter.

ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (PerkinElmer/Applied Biosystems). Es probablemente el mejor sistema del mercado. Estará disponible a principios de 1999, siendo muy parecido al MegaBACE, aunque con una mayor productividad. El sistema puede procesar 1.536 muestras en 16 grupos de 96 (32 horas) sin intervención del operario. El tiempo requerido para configurar el sistema es de 10 minutos por programa (de 2 a 32 horas; de 1 a 1.536 muestras).

4. PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA SECUENCIACIÓN

Debido al ímpetu generado por el Proyecto del Genoma Humano, se está investigando intensamente para desarrollar sistemas de secuenciación mucho más eficientes que los actuales. Por una parte se investiga en la optimización de los sistemas automáticos existentes para incrementar su eficacia entre diez y cien veces. Como ejemplo podría citarse secuenciadores automáticos con cientos o incluso miles de capilares en fase de desarrollo por Perkin-Elmer/AppliedBiosystems. Por otra parte, se está investigando en tecnologías radicalmente diferentes, cuyo objetivo es alcanzar rendimientos entre cien y mil veces superiores a los disponibles con las técnicas actuales. Cabe destacar las

basadas en la secuenciación de moléculas únicas de DNA. La mayor parte de estos proyectos representan secretos industriales, por lo que su estado actual de desarrollo es desconocido.

5. PREPARACIÓN DEL DNA RECOMBINANTE

Nota: como es habitual, la manipulación del material biológico debe realizarse bajo las oportunas medidas de esterilidad, a fin de evitar contaminaciones y degradación de las muestras.

El DNA a secuenciar (fragmento amplificado del gen *araA* de *Salmonella typhimurium*) fue previamente insertado en el vector *pGEM-5Zf(+)* o *pBluescript (SK+)* y clonado en *Escherichia coli* DH5 α F'.

El primer paso para secuenciar dicho DNA es la purificación y cuantificación del mismo. Para ello se han empleado los kits “QIAprep Spin Miniprep” o “Magic Miniprep” (purificación) y “DNA DipStick” o espectrofotometría (cuantificación), según se ha descrito detalladamente en las Sesiones 9 a 13 (“Clonación del DNA amplificado mediante PCR”) y 14 a 15 (“Purificación y análisis del DNA recombinante”).

6. SECUENCIACIÓN

Una vez obtenido y purificado el DNA recombinante, puede procederse a su secuenciación. Para ello emplearemos el secuenciador automático 373 Stretch (PerkinElmer/AppliedBiosystems).

6.1. Metodología general

El 373 Stretch ofrece la posibilidad de emplear diferentes químicas y estrategias de secuenciación. En nuestro caso usaremos el “ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” de terminadores. Éste utiliza la enzima *AmpliTaqFS*, sustituyendo al “PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing” y al “Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing”, que usaban la *AmpliTaq* o la *AmpliTaqCS*.

La mezcla de reacción contiene, entre otros componentes, la DNA polimerasa termoestable (p.ej., *AmpliTaqFS*), dNTP y ddNTP marcados con cuatro fluoróforos diferentes (terminadores). La DNA polimerasa termoestable copiará el DNA molde partiendo de cebadores universales (que aparean con secuencias del vector) o específicos (de la secuencia clonada). En la reacción de PCR asimétrica (lineal; no exponencial), que se repite 25 veces en un ciclador térmico, se sintetizan cadenas de ssDNA de diferentes longitudes, terminadas con un ddNTP fluorescente.

El exceso de terminadores fluorescentes libres se elimina mediante columnas de exclusión molecular o por precipitación del DNA en etanol. A continuación las muestras se secan y se almacenan en congelador o se disuelven en la solución de carga y se someten a electroforesis, detección y análisis por software específico.

6.2. Reacciones “Cycle Sequencing” con *AmpliTaq* o con *AmpliTaqFS*

Como se ha indicado anteriormente, usaremos bien el kit “ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” con *AmpliTaqFS*. También se muestra el protocolo para *AmpliTaq*.

a).-Preparar una mezcla madre, según se indica en la tabla correspondiente, compuesta por agua, premezcla terminadora y el cebador elegido. Repartir a razón de 15 (*AmpliTaq*) o 18 (*AmpliTaqFS*) μl por tubo Eppendorf de 0,6 ml.

b).-Añadir, respectivamente, 5 ó 2 μl (= 1 ó 0,4 μg) del DNA a secuenciar (plásmido de 3–4 kpb) por tubo de reacción para química con *AmpliTaq* o *AmpliTaqFS* (véanse las tablas correspondientes).

c).-Añadir una gota de cera fundida a 70°C en la pared interior de cada tubo para evitar la evaporación de la reacción durante su amplificación lineal.

d).-Colocar los tubos en un ciclador térmico (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA; <<http://www.perkin-elmer.com>>) precalentado a 96°C.

e).-Activar inmediatamente el siguiente perfil de PCR (programa 67):

96°C / 30 segundos
50°C / 15 segundos
60°C / 4 minutos

durante 25 ciclos. Apagar automáticamente (programa 0 = Shut Down).

f).-Purificar mediante columnas Sephadex G–50 o conservar a –20°C y purificar posteriormente. En el caso de la química con *AmpliTaqFS* puede purificarse también mediante precipitación del DNA con etanol (ver más adelante).

Tabla 1. Reacción de secuenciación (PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator con <i>AmpliTaq</i>)					
	Para 1 clon	Para 2 clones	Para 3 clones	Para 4 clones	Para 5 clones
Agua destilada “milli-Q” (hasta 20 μl)	1,5 μl	3 μl {3,15}	4,5 μl {4,725}	6 μl {6,3}	7,5 μl {7,875}
“Terminator Premix”	9,5 μl	19 μl {19,95}	28,5 μl {29,925}	38 μl {39,9}	47,5 μl {49,875}
“–21M13 Forward Primer” (0,8 pmol/ μl)	4 μl (3,2 pmol)	8 μl {8,4} (6,4 pmol)	12 μl {12,6} (9,6 pmol)	16 μl {16,8} (12,8 pmol)	20 μl {21} (16 pmol)
Mezclar bien y añadir a razón de 15 μl por tubo Eppendorf de 0,6 ml					
dsDNA de ~3-4 Kpb (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5 μl (= 1 μg) por tubo de reacción				
El volumen de reacción debe ser ahora de 20 μl					
Añadir una gota de cera fundida a 70°C en la pared de cada tubo					
Colocar en ciclador térmico precalentado a 96°C					
Elegir el programa apropiado para realizar los siguientes 25 ciclos (programa 67):					
96°C / 30 segundos					

50°C / 15 segundos 60°C / 4 minutos
Apagar automáticamente (programa 0 = Shut Down)
Purificar mediante columnas Sephadex G-50 o conservar a -20°C

Nota: como es sabido, al pipetear se cometen errores. Por una razón misteriosa, al repartir soluciones madre entre los tubos hijos, nunca sobra y — lo que es peor— no suele haber suficiente reactivo para el último tubo. Veamos un truco para evitar este problema. En la tabla anterior, se reparte la mezcla madre a razón de 15 µl por tubo. Asumiendo un error del 5%, ello supone ±0,75 µl de error por cada pipeteo. Para garantizar que el último tubo también recibe sus correspondientes 15 µl de mezcla de reacción, puede incrementarse el volumen total de la mezcla madre en 0,75 µl por cada pipeteo que se vaya a hacer de la misma (entre llaves en la tabla anterior). Dicho con otras palabras, un tubo serían 15 µl; 2 tubos serían 30 + (0,75 x 2) = 31,5 µl (lo cual supone multiplicar la primera columna por 2,1); 3 tubos serían 45 + (0,75 x 3) = 47,25 µl (lo cual supone multiplicar la primera columna por 3,15); 4 tubos serían 60 + (0,75 x 4) = 63 µl (lo cual supone multiplicar la primera columna por 4,2); y 5 tubos serían 75 + (0,75 x 5) = 78,75 (lo cual supone multiplicar la primera columna por 5,25).

Tabla 2. Reacción de secuenciación (“ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” con *AmpliTag*FS)

	Para 1 clon	Para 2 clones	Para 3 clones	Para 4 clones	Para 5 clones
Agua destilada “milli-Q” (hasta 20 µl)	6 µl	12 µl {12,6}	18 µl {18,9}	24 µl {25,2}	30 µl {31,5}
“Terminator Premix”	8 µl	16 µl {16,8}	24 µl {25,2}	32 µl {33,6}	40 µl {42}
“-21M13 Forward Primer” (0,8 pmol/µl)	4 µl (3,2 pmol)	8 µl {8,4} (6,4 pmol)	12 µl {12,6} (9,6 pmol)	16 µl {16,8} (12,8 pmol)	20 µl {21} (16 pmol)
Mezclar bien y añadir a razón de 18 µl por tubo Eppendorf de 0,6 ml					
dsDNA de ~3-4 Kpb (0,2 µg/µl)	2 µl (= 0,4 µg) por tubo de reacción				
El volumen de reacción debe ser ahora de 20 µl					
Añadir una gota de cera fundida a 70°C en la pared de cada tubo					
Colocar en ciclador térmico precalentado a 96°C					
Elegir el programa apropiado para realizar los siguientes 25 ciclos (programa 67):					
96°C / 30 segundos					
50°C / 15 segundos					
60°C / 4 minutos					
Apagar automáticamente (programa 0 = Shut Down)					
Purificar mediante precipitación con etanol o —mejor— mediante columnas Sephadex G-50; o conservar a -20°C para su posterior purificación					

Nota: como es sabido, al pipetear se cometen errores. Por una razón misteriosa, al repartir soluciones madre entre los tubos hijos, nunca sobra y — lo que es peor— no suele haber suficiente reactivo para el último tubo. Veamos un truco para evitar este problema. En la tabla anterior, se reparte la mezcla madre a razón de 18 µl por tubo. Asumiendo un error del 5%, ello supone ±0,9 µl de error por cada pipeteo. Para garantizar que el último tubo también recibe sus correspondientes 18 µl de mezcla de reacción, puede incrementarse el volumen total de la mezcla madre en 0,9 µl por cada pipeteo que se vaya a

hacer de la misma (entre llaves en la tabla anterior). Dicho con otras palabras, un tubo serían 18 μ l; 2 tubos serían $36 + (0,9 \times 2) = 37,8 \mu$ l (lo cual supone multiplicar la primera columna por 2,1); 3 tubos serían $54 + (0,9 \times 3) = 56,7 \mu$ l (lo cual supone multiplicar la primera columna por 3,15); 4 tubos serían $72 + (0,9 \times 4) = 75,6 \mu$ l (lo cual supone multiplicar la primera columna por 4,2); y 5 tubos serían $90 + (0,9 \times 5) = 94,5$ (lo cual supone multiplicar la primera columna por 5,25).

6.3. Purificación de productos (eliminación de terminadores)

La reacción de secuenciación se realiza en presencia de un exceso de nucleótidos y didesoxinucleótidos. Este exceso es particularmente significativo en el caso de la química de terminadores y *AmpliTaq*. Con la *AmpliTaqFS* se utiliza una concentración mucho menor de terminadores en la reacción. Al estar los terminadores marcados fluorescentemente, es necesario eliminarlos de las muestras antes de someterlas a electroforesis en el secuenciador automático.

ATENCIÓN: es muy importante eliminar completamente los terminadores fluorescentes. En caso contrario producirán un exceso de fluorescencia que saturará al detector del secuenciador, ocultando los datos útiles.

Nota: los terminadores presentan carga eléctrica e interaccionan con la acrilamida, por lo que su migración es de hecho bastante errática, distribuyéndose principalmente en el frente de la reacción, pero también en diferentes tramos de ésta.

Describiremos tres protocolos para purificar las reacciones de secuenciación, antes de ser cargadas en el gel de poliacrilamida para ser sometidas a electroforesis y detección por fluorescencia inducida por láser.

El método mejor para eliminar los terminadores es la exclusión molecular mediante columnas de Sephadex G-50. De hecho, éste es el único método que funciona bien con la química de terminadores que emplea *AmpliTaq* (la cual se realiza con un exceso de terminadores). Esta química ha sido abandonada por Perkin-Elmer en favor de la que emplea *AmpliTaqFS* y una concentración mucho menor de terminadores. Ello permite poder usar otros métodos de eliminación de los mismos que no estaban aconsejados con la química de la *AmpliTaq*: la precipitación con etanol.

Nota: debe tenerse en cuenta que el lavado con etanol es más cómodo que la exclusión molecular, pero puede dejar trazas de terminadores en el frente de electroforesis (generalmente no afectan la lectura) y —lo cual puede ser más grave— hacer perder las secuencias más pequeñas (aspecto que se puede controlar hasta cierto punto en el tiempo de precipitado en etanol). Este último inconveniente es irrelevante cuando el primer tramo de la secuencia no es útil (por ejemplo, cuando se secuencia usando cebadores universales, las primeras decenas de bases pueden corresponder al vector), pero puede ser importante cuando se secuencian productos de PCR directamente o cuando hay poca distancia entre el extremo 3'-OH del cebador y la secuencia problema. Así, pues, el orden de limpieza y consistencia es: exclusión molecular > etanol con lavado > etanol sin lavado. Por orden de comodidad, el orden sería justamente el contrario. Estos aspectos empíricos deberán ser determinados por el

investigador para elegir el mejor método de purificación para cada aplicación de secuenciación.

Nota: recientemente, Perkin–Elmer ha desarrollado un método para eliminar los terminadores presentes en la muestra mediante una incubación de los productos de reacción con fosfatasa alcalina (de gamba o ternera). Actualmente se encuentra en fase de experimentación y disponible en internet a través del Dr. Shiaw-Min Chen vía eMail en <chensm@perkin-elmer.com> o <chensm@ccmail.apldbio.com>. El Dr. Chen trabaja para Perkin–Elmer/AppliedBiosystems, cuyo servidor WWW es <http://www.perkin-elmer.com>.

6.4. Purificación de productos (eliminación de terminadores) por exclusión molecular (columnas Sephadex G–50)

Nota: este método de purificación por exclusión molecular es el más consistente, aunque también requiere una mayor inversión de tiempo y costo. Generalmente se emplea en la química de terminadores con *AmpliAq*, así como con la *AmpliAqFS* cuando se quiere leer el máximo de bases en la zona inicial de la secuencia.

a).–Preparar jeringas con tapones de fibra sintética Perlón (disponible en acuarios) esterilizada en autoclave. Para ello arrancar un poco (muy poco) de fibra sintética con unas pinzas estériles y colocarla sobre una jeringa de insulina de 1 ml desprovista de émbolo. Introducir la fibra hasta el fondo de la jeringa con la ayuda de una pipeta Pasteur suficientemente larga.

b).–Llenar las jeringas con Sephadex G–50. Para ello emplear una pipeta Pasteur provista de tetina, succionar la resina del lecho, introducir la punta de la pipeta hasta el fondo de la jeringa. Liberar la resina mientras se retira la pipeta Pasteur poco a poco, procurando que no se formen burbujas de aire. Colocar cada jeringa rellena de resina en un tubo de plástico de 10 ml y 1,5 cm Ø para que drene el agua libremente. Si fuera necesario —generalmente lo es— añadir más resina para rellenar completamente la jeringa.

c).–Secar la resina centrifugando las columnas (colocadas en el interior de los tubos de plástico) en centrífuga Mixtasel (Selecta, Barcelona, España) a 1000g (~2.500 rpm) durante 1 minuto. Eliminar el agua drenada.

d).–Colocar un tubo Eppendorf de 1,5 ml con el tapón cortado (puede ser necesario cortar también el borde de la boca para que quepa) en el interior de cada tubo de plástico. Acoplar la jeringa rellena de resina.

e).–Añadir 80 µl de agua destilada a cada tubo Eppendorf conteniendo la reacción de secuenciación.

f).–Usar una micropipeta tipo P200 (Gilson, Villiers–le–Bel, Francia) ajustada a 150 µl para perforar la barrera de cera que separa el producto de reacción del agua añadida. Sacar la punta y expulsar el tapón de cera en el interior del tubo Eppendorf. Introducir de nuevo la punta de la pipeta hasta el fondo del tubo y succionar todo el líquido (reacción+agua).

Nota: de esta forma se consigue recuperar la práctica totalidad de la reacción de secuenciación, ya que el agua añadida sobre la cera acaba lavando el fondo del tubo, al ser succionada por la pipeta.

g).-Aplicar lentamente y con sumo cuidado la solución (conteniendo la reacción de secuenciación) al centro de la resina Sephadex G-50 contenida en la jeringa.

ATENCIÓN: es muy importante que la resina Sephadex G-50 no se seque en las columnas. En caso contrario no se eliminarían completamente los terminadores. Evitar por consiguiente dejar las columnas rellenas al aire durante mucho tiempo. Si fuera necesario, éstas pueden almacenarse a 4°C en un vaso de precipitados herméticamente cerrado y provisto de un fondo de agua para mantener la humedad.

ATENCIÓN: es muy importante aplicar las muestras en el centro de la resina contenida en la jeringa. Asimismo, el flujo debe ser lo suficientemente bajo como para permitir que el líquido sea absorbido por la resina, sin llegar a drenar hacia el espacio entre el cilindro de resina y la pared de plástico de la jeringa. Si ello sucediera, los terminadores que contuviera no serían retenidos por la resina, contaminando la muestra.

h).-Centrifugar las columnas a 1000g durante 1 minuto en la centrífuga basculante previamente utilizada.

i).-Eliminar las columnas y recoger (en tubos Eppendorf nuevos de 0,6 ó 1,5 ml) el líquido drenado, que debe contener las muestras purificadas.

Nota: para sacar los tubos Eppendorf cortados que contienen las muestras purificadas del interior de los tubos de plástico, utilizar unas pinzas estériles.

j).-Concentrar las muestras en un evaporador tipo SpeedVac SVC100 (Savant, Farmingdale, NY, USA) durante unas 2 horas.

ATENCIÓN: es muy importante encender la trampa de vacío del evaporador al menos dos horas antes de su uso, para asegurar que no entren vapores en el aceite de la bomba.

ATENCIÓN: para evitar la pérdida de las muestras, es esencial seguir el siguiente orden en el manejo del evaporador: para concentrar, colocar las muestras, cortar el circuito de aire, activar la centrífuga, arrancar la bomba, abrir el circuito de aire. Para recoger las muestras: cortar el circuito de aire, apagar la bomba, abrir lentamente la entrada de aire, apagar la centrífuga y acceder a las muestras.

k).-Guardar a -20°C.

Nota: las muestras secadas de esta forma son estables durante meses.

6.5. Purificación de productos (eliminación de terminadores) por precipitación con etanol (protocolo 1 con lavado)

Nota: este método de purificación por precipitación con etanol y lavado no proporciona resultados tan consistentes como la purificación por exclusión molecular, pero generalmente es suficiente cuando se trabaja secuenciando con la enzima *AmpliTaqFS* y no se requiere leer el máximo de bases en la zona inicial de la secuencia. Es el que seguiremos en esta sesión.

a).-Para cada reacción de secuenciación, preparar un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenga 2 μ l de acetato de sodio 3M (pH 4,6) y 50 μ l de etanol (95%).

b).Añadir todo el volumen de reacción de secuenciación (20 μ l). Agitar mediante vórtex para mezclar bien. Incubar en hielo picado durante 10 min.

Nota: la incubación en hielo es importante para favorecer la precipitación de los fragmentos de DNA más pequeños. Si se incubara más de 24 h, se incrementaría también la precipitación de terminadores. Algunos protocolos recomiendan incubar a temperatura ambiente en vez de en hielo picado; deberá ser determinado por el investigador, según las condiciones ambientales de su laboratorio.

c).-Centrifugar a máxima velocidad (16.000 g) durante 15 – 30 min (p.ej., 20 min).

d).Decantar o aspirar con sumo cuidado el sobrenadante. Eliminar todo el sobrenadante (o sea, terminadores) que sea posible con cuidado de no perder la pella. Para ello, dejar drenar boca abajo sobre papel de filtro.

Nota: a veces, la pella puede ser difícil de ver a simple vista.

e).-Lavar la pella añadiendo 250 μ l de etanol (70%). Algunos protocolos usan etanol frío sacado del congelador a -20°C .

f).-(opcional). Centrifugar a máxima velocidad (16.000 g) durante 15 – 30 min. Otros protocolos indican 5 min.

g).Decantar o aspirar con sumo cuidado el sobrenadante. Eliminar todo el sobrenadante que sea posible con cuidado de no perder la pella. Para ello, dejar drenar boca abajo sobre papel de filtro.

h).-Acabar de secar la pella bajo vacío (5 min) o —mejor— en estufa a 37°C (10 min). También puede dejarse secar el tubo boca abajo a temperatura ambiente toda la noche e incluso días.

Nota: como se desprende de lo dicho, los restos de etanol pueden eliminarse manteniendo el tubo boca abajo durante un tiempo, dejándolo escurrir sobre un papel absorbente, colocándolo boca abajo u horizontal en una estufa a 37°C , con la ayuda de un evaporador bajo vacío (SpeedVac), o incluso usando papel higiénico estéril o bastoncillos de papel o algodón estériles para eliminar manualmente las gotas e líquido que queden. Según nuestra experiencia, un secado prolongado al aire (un día) consigue secuencias más limpias (con menos terminadores).

i).-Guardar a -20°C .

Nota: las muestras secadas de esta forma son estables durante meses.

6.6. Purificación de productos (eliminación de terminadores) por precipitación con etanol (protocolo 2 sin lavado)

Nota: este método de purificación por precipitación con etanol sin lavado es el más cómodo, aunque puede dejar trazas de terminadores que pudieran interferir con la detección. Su eficiencia deberá confirmarse empíricamente por el investigador en cada caso.

a).-Para cada reacción de secuenciación, preparar un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenga 35 μ l de etanol (95%).

b).Añadir todo el volumen de reacción de secuenciación (20 μ l). Agitar mediante vórtex para mezclar bien. Incubar en hielo picado durante 10 min.

c).-Centrifugar a máxima velocidad (15.000 g) durante 15 – 30 min.

d).Decantar o aspirar con sumo cuidado el sobrenadante. Eliminar todo el sobrenadante (o sea, terminadores) con cuidado de no perder la pella. Para ello, dejar drenar boca abajo sobre papel de filtro.

Nota: en este protocolo es especialmente importante asegurarse de que todo el sobrenadante es eliminado. En caso contrario, los terminadores contaminantes interferirán con la detección y análisis de las secuencias.

Nota: a veces, la pella puede ser difícil de ver a simple vista.

e).-Acabar de secar la pella bajo vacío (1 a 3 min), en termobloque a 90°C (1 min) o —mejor— en estufa a 37°C (10 min).

Nota: los restos de etanol pueden eliminarse manteniendo el tubo boca abajo durante un tiempo, dejándolo escurrir sobre un papel absorbente, colocándolo boca abajo u horizontal en una estufa a 37°C, con la ayuda de un evaporador bajo vacío (SpeedVac), o incluso usando papel higiénico estéril o bastoncillos de papel o algodón estériles para eliminar manualmente las gotas e líquido que queden.

f).-Guardar a -20°C

Nota: las muestras secadas de esta forma son estables durante meses.

6.7. Preparación del gel de secuenciación

ATENCIÓN: el 373 Stretch soporta geles con diferentes longitudes. Debido a ello, los volúmenes de gel necesarios así como su concentración de acrilamida pueden ser diferentes. Es muy importante utilizar la concentración apropiada para cada caso. Las diferentes concentraciones de acrilamida y la longitud del gel se muestran en la tabla siguiente. En esta práctica prepararemos un gel de 34 cm WTR (Full Scan) con 4,75% de acrilamida o un gel de 48 cm WTR (Full Scan) con 4,25% de acrilamida.

Tabla 3. Tipos de geles soportados por el 373 Stretch "Sequencer/GeneScan"			
Well-To-Read (WTR)	Tipo de "Scan"	Concentración del gel (% acrilamida)*	Volumen de gel a preparar*
6	GeneScan	‡	30
12	GeneScan	‡	40
24	Sequencer (Full Scan)	6,00	60
24	Sequencer (BaseSprinter)	4,75	60
34	Sequencer (Full Scan)	4,75	80
34	Sequencer (BaseSprinter)	4,25	80
48	Sequencer (Full Scan)	4,00	100

(*): Estos datos han sido obtenidos del manual del 373Stretch suministrado por Perkin-Elmer. Algunos de ellos han sido mejorados, como se indica en esta práctica (Tablas 4 y 5).
(‡): Para GeneScan, usar las concentraciones descritas en el manual "GeneScan 672"

Nota: Well-To-Read (WTR) es la distancia recorrida por la muestra antes de ser detectada por el sensor; en otras palabras, es la distancia entre el fondo de los pocillos donde se deposita la muestra y la ventana de lectura del láser/detector.

Nota: el modelo 373 Stretch presenta la ventana de lectura más abajo que el modelo 373A previo, incrementando el valor WTR para un cristal dado. Así, los cristales previamente catalogados como de "24 cm" (para el 373A) corresponden ahora a cristales "34 cm" (cuando se usan con el 373 Stretch).

a).-Preparar los cristales para recibir el gel. Para ello lavarlos con detergente Alconox de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania; <<http://www.sigma-aldrich.com>>) y una esponja, aclararlos con agua del grifo y finalmente con agua destilada. Dejarlos secar al aire. Lavar el peine y los espaciadores (en su caso) con agua. Dejarlos secar. Colocar los espaciadores en los laterales de los cristales y fijar el "sandwich" mediante tres pinzas en cada lateral del "sandwich".

Nota: con el protocolo que se describe a continuación ya no es necesario sellar el sandwich con cinta adhesiva amarilla de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA; <<http://www.sigma-aldrich.com>>) como se hacía antes: ahora el gel se carga horizontalmente y no verticalmente.

ATENCIÓN: colocar una bayeta o —mejor— una alfombrilla de caucho o goma en el fondo y lateral del fregadero donde se limpien los cristales para evitar romperlos.

ATENCIÓN: es MUY importante que la zona externa del cristal pequeño (que presenta las “orejas”) quede siempre hacia el exterior del “sandwich”. Ello es así porque dicha zona se pone en contacto con una cinta de goma del secuenciador y queda “impregnada” de dicha goma de forma que se crearían burbujas de aire al formarse el gel si dicha zona se coloca dentro del “sandwich” de cristales. Es muy fácil determinar qué zona del cristal ha estado previamente en contacto con la goma: basta añadir agua y comprobar si ésta corre libremente (cristal virgen) o forma una línea a 1 cm del borde del cristal (cristal con goma).

Nota: para facilitar el vertido del gel (ver más adelante), preparar un “bolsillo” en la apertura del “sandwich” con cinta amarilla o blanca.

Nota: a continuación se describe la receta para preparar un gel de secuenciación. Actualmente es posible comprar soluciones pre-mezcladas que simplifican mucho su preparación. Una de ellas (que usaremos en esta sesión) es la denominada “Gel-Mix 4.25FA Sequencing Gel Solution” de Life Technologies (antes, GibcoBRL) (Rockville, MD, USA; <<http://www.lifetech.com>>). Consta de acrilamida (4,04% p/v) + bis-acrilamida (0,21% p/v) + urea (6 M) + tris-borato (89 mM) + Na₂EDTA (2,2 mM) + TEMED (3,7 mM). Se presenta en forma de solución, de modo que para convertirla en gel sólo es necesario añadir 5 µl de persulfato amónico (APS) al 10% (p/v) por cada ml de gel preparado. Este protocolo se resume en la tabla siguiente y sustituye los apartados “a” a “h” y la Tabla 5 (que se mantienen como referencia o por si se desea preparar un gel en ausencia de la pre-mezcla comercial).

Tabla 4. Preparación del gel de secuenciación (ingredientes pre-mezclados*)			
	34 cm WTR “BaseSprinter” y 48 cm WTR “FullScan” (pre-mezcla con 4,25% acrilamida)	24 cm WTR “BaseSprinter” y 34 cm WTR “FullScan” (pre-mezcla con 4,75% acrilamida)	12 y 24 cm WTR “FullScan” (pre-mezcla con 6% acrilamida)
Pre-mezcla con 4,25% acrilamida	46 ml	—	—
Pre-mezcla con 4,75% acrilamida	—	46 ml	—
Pre-mezcla con 6,00% acrilamida	—	—	46 ml
10% APS (“fresco”)	230 µl	230 µl	230 µl
Mezclar agitando MUY suavemente			
Verter entre los cristales			
Utilizar después de 2 h y antes de 24 h			
(*) : como se indica en el texto, las “pre-mezclas” al 4,25; 4,75 ó 6,00 % constan de todos los componentes del gel, excepto el APS.			

b).-Según se indica en la tabla siguiente, pesar 23 g de urea, añadir 5,5 (34 cm WTR) o 4,9 (48 cm WTR) ml de 40% acrilamida (19:1) y 14,4 (34 cm WTR) o 14,8 (48 cm WTR) ml de agua.

c).-Añadir 0,46 g de una resina de intercambio iónico (Amberlita).

d).-Calentar suavemente (no más de 37°C) y agitar con “mosca” hasta disolver completamente (10 min).

e).-Filtrar a través de una membrana hidrofílica con 22 µm de diámetro de poro.

f).-Desgasificar bajo vacío en baño de ultrasonidos durante 5 minutos.

g).-Añadir 9,3 (34 cm WTR) o 9,2 (48 cm WTR) ml de 5x TBE y 1,15 (34 cm WTR) o 3 (48 cm WTR) ml de agua (volumen final = 46 ml).

h).-Añadir los activadores de la polimerización de la acrilamida: 207 (34 cm WTR) o 231 (48 cm WTR) µl de APS “fresco” (con menos de una semana) y 20,7 (34 cm WTR) o 23,1 (48 cm WTR) de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine). Agitar muy suavemente para mezclar.

i).-Colocar el sandwich horizontalmente (o —mejor— levemente levantado por la parte superior). Asegurarse de que la cinta que forma el “bolsillo” está bien pegada. Verter la solución del gel en el centro de la zona creada por el “bolsillo”. Rellenar el bolsillo con gel (no dejar que se seque) a la vez —y esto es importante— que se dan golpecitos enérgicos y breves en la zona del frente para ayudar al avance de la solución y evitar la formación de burbujas. Una vez relleno el sandwich, despegar el “bolsillo” y meter el prepeine hasta el fondo con cuidado de que no se formen burbujas de aire

Nota: con el protocolo antiguo (que todavía algunos prefieren) se colocaba el sandwich formando un ángulo de unos 45° y se vertía la solución del gel entre los cristales sellados por cinta amarilla. Cuando quedaban unos 3 cm por rellenar, se despegaba el “bolsillo”, se tumbaba el “sandwich” hasta que la acrilamida saliera al exterior y se metía el prepeine hasta el fondo con cuidado de que no se formen burbujas de aire.

Nota: en el protocolo antiguo, si se formaran burbujas, dejar de añadir acrilamida y volcar el sandwich lateralmente hasta eliminarlas. Continuar añadiendo la solución del gel entre los cristales.

Nota: en ambos protocolos, pueden eliminarse burbujas introduciendo un alambre suficientemente fino en forma de ojiva desde el fondo del sandwich. Por ejemplo, la referencia 3-200-00 de ATBiochem.

j).-Colocar de nuevo el “bolsillo” para cerrar la zona donde se encuentra el prepeine, colocar tres pinzas sobre el mismo y dejar el “sandwich” en posición horizontal.

Nota: conviene aislar al máximo la zona superior del gel del aire, ya que el oxígeno es un inhibidor de la polimerización de la acrilamida.

k).-Guardar el gel a temperatura ambiente. Usar el gel después de 2 h y antes de 24 h.

ATENCIÓN: es muy importante usar geles que tengan entre 2 y 24 horas para conseguir resultados óptimos. No obstante, el mismo gel puede reutilizarse (con resultados inferiores) para varias electroforesis, siempre que se eliminen los restos de la electroforesis precedente.

ATENCIÓN: en invierno suele suceder un fenómeno curioso en laboratorios no climatizados (sin calefacción central). Este fenómeno ocurre típicamente cuando la temperatura baja a unos 15 °C y tiene tres efectos o consecuencias. En primer lugar, la urea suele polimerizar mientras se está filtrando la mezcla que la contiene (junto con las acrilamidas y el TBE). El problema se resuelve calentando la mezcla a 37 °C durante 5 ó 10 min. En segundo lugar, el gel no polimeriza bien. Aunque aparentemente está perfecto, al hacer la electroforesis aparecen bandas gruesas en posiciones no esperadas y otras distorsiones extrañas que parecen debidas a interferencias de los sistemas óptico-electrónicos del secuenciador automático. En realidad, se deben a que la urea ha cristalizado en el interior de la matriz del gel, inutilizándolo para su función. Este problema se resuelve preparando y polimerizando el gel en una habitación a $\geq 20^{\circ}\text{C}$. En tercer lugar, los resultados de la secuenciación son también extraños, siendo debido a que en las condiciones de arriba (baja temperatura), el gel necesita ≥ 20 horas para polimerizar perfectamente. Resumiendo, todos estos efectos no deseados se eliminan preparando y polimerizando el gel a temperatura suave y dejando la polimerización más tiempo.

Tabla 5. Preparación del gel de secuenciación (ingredientes separados)

	34 cm WTR "BaseSprinter" y 48 cm WTR "FullScan" (4,25% acrilamida)	24 cm WTR "BaseSprinter" y 34 cm WTR "FullScan" (4,75% acrilamida)	12 y 24 cm WTR "FullScan" (6% acrilamida)
Urea	23 g	23 g	23 g
40% acrilamida (19:1)	4,914498 \approx 4,9 ml	5,489539 \approx 5,5ml	6,934155 \approx 6,9 ml
Agua destilada "milli-Q"	15,359502 \approx 15,4 ml	14,78446 \approx 14,8 ml	13,339845 \approx 13,3ml
Amberlita	0,46 g	0,46 g	0,46 g
Agitar con "mosca en estufa a $\leq 37^{\circ}\text{C}$ hasta disolver completamente (~10 min)			
Filtrar a través de membrana hidrófila (nitrato de celulosa) con 0,22 μm \varnothing poro			
Desgasificar bajo vacío en baño ultrasonidos durante 5 minutos			
5x TBE	9,24554 \approx 9,2 ml o 9,25082 \approx 9,3ml (48cmWTR)	9,24554 \approx 9,2 ml	9,24554 \approx 9,2 ml
Agua destilada "milli-Q"	\sim 1,15 ml o \sim 3 ml (48 cm WTR) (hasta 46 ml)	\sim 1,15 ml (hasta 46 ml)	\sim 1,15 ml (hasta 46 ml)
10% APS ("fresco")	207 μl o 231 μl (48 cm WTR)	207 μl	207 μl
TEMED	20,7 μl o 23,1 μl (48 cm WTR)	20,7 μl	20,7 μl
Mezclar agitando MUY suavemente			
Verter entre los cristales			
Utilizar después de 2 h y antes de 24 h			

Nota: el volumen de gel que conviene preparar para los geles de 34 y 48 cm WTR es el mismo (46 ml) porque el primero, aunque es más pequeño (34 cm

WTR), tiene espaciadores de 0,4 mm (Volumen = 40,8 cm alto • 22,2 cm ancho • 0,04 cm ancho = 36,23 ml). El segundo es más largo (48 cm WTR), pero tiene espaciadores de sólo 0,3 mm (Volumen = 57,6 cm alto • 20,2 cm ancho • 0,03 cm ancho = 34,91 ml). Así, preparando 46 ml sobrarán unos 10 (34 cm WTR) u 11 (48 cm WTR) ml.

Nota: en el caso de 34 cm WTR, el volumen “V” de la solución de acrilamida al 40% necesario para producir un gel de $46\text{ml} + (207 + 20,7)\mu\text{l} = 46,2277\text{ml}$ de volumen final y “x” % de acrilamida será:

$$V \text{ (ml) acrilamida al 40\%} = (46,2277 \cdot x)/40 = 1,1556925 \cdot x$$

Por tanto, el volumen de agua necesario será:

$$V \text{ (ml) de agua} = 20,274 - [V \text{ (ml) acrilamida al 40\%}]$$

Nota: en el caso de 48 cm WTR, el volumen “V” de la solución de acrilamida al 40% necesario para producir un gel de $46\text{ml} + (231 + 23,1)\mu\text{l} = 46,2541\text{ml}$ de volumen final y “x” % de acrilamida será:

$$V \text{ (ml) acrilamida al 40\%} = (46,2541 \cdot x)/40 = 1,1563525 \cdot x$$

Por tanto, el volumen de agua necesario será:

$$V \text{ (ml) de agua} = 20,274 - [V \text{ (ml) acrilamida al 40\%}]$$

Nota: los volúmenes de la tabla anterior están ajustados para preparar un gel de 34 ó 48 cm WTR. Para geles menores puede prepararse menos volumen, reduciendo proporcionalmente los componentes.

Nota: los geles deben prepararse bajo condiciones constantes para asegurar la reproducibilidad de la polimerización. Factores como la pureza de los reactivos y agua, el tiempo de desgasificación, la presión parcial de oxígeno o la temperatura ambiente pueden afectar la polimerización y consiguientemente las características físicas y eléctricas del gel.

l).-Cuando se vaya a utilizar el gel, quitarle las pinzas y cintas adhesivas. Colocar bajo el grifo y lavar completamente los restos de acrilamida. Retirar el prepeine con cuidado y volver a lavar con agua del grifo y finalmente con agua destilada. Dejar escurrir unos segundos y secar con papel de filtro.

m).-Lavar bien el prepeine. Secar y guardar.

n).-Colocar la cubeta inferior en la cámara de secuenciación del 373 Stretch y el gel sobre la misma. Fijar el gel con las sujeciones laterales. Cerrar la ventana de lectura del láser.

ATENCIÓN: cuando se empleen cristales de 34 cm WTR, comprobar que el cristal descansa sobre los dos bloques atornillados del fondo de la cubeta. Para el resto de electroforesis, aflojar el tornillo y desplazar el bloque para que los cristales descansen más abajo.

ATENCIÓN: no añadir aún el electrolito, por si fuera necesario desmontar el sistema para su limpieza (ver más adelante).

o).-Cerrar la cámara de electroforesis.

6.8. Preparación del secuenciador: 373 Stretch

a).-Levantar el interruptor (“Circuit Breaker”) del transformador del secuenciador (colocado a la derecha del mismo).

b).-Una vez realizado este paso —y sólo entonces— pulsar el interruptor general del secuenciador (situado en la parte izquierda frontal, abajo). El secuenciador debe ponerse en marcha.

Nota: si el secuenciador no se pusiera en marcha, apagar la máquina y el transformador, comprobar que el magnetotérmico (situado en una caja en la pared) se encuentra activado y que hay corriente en la línea. Volver al apartado “a”).

Tras arrancar la máquina y después de un minuto y 35 segundos, la pantalla de cristal líquido del secuenciador se debe activar mostrando el estado del mismo.

ABI DNA SEQUENCER	VER. 2.10
(Press Main Menu to begin)	

c).-Presionar “Main Menu”. La pantalla mostrará:

Set-up Run	Start Pre-run	Choose Run	Self Test	Cali- bration
---------------	------------------	---------------	--------------	------------------

d).-Comprobar el tipo de filtro seleccionado en la máquina. Para ello presionar “Calibration”, “Configure” y “more”. Debe obtenerse la siguiente lectura:

Filter sequence = 531, 560, 580, 610; Set A		
	change	more

En caso contrario deberá verse:

Filter sequence = 531, 545, 560, 580; Set B		
	change	more

Si estuviera instalado el “Set B”, presionar change para que aparezca el “Set A”

Nota: cada “Set” representa un conjunto de cuatro filtros que la máquina empleará para detectar la fluorescencia inducida por el láser. El “Set A” se utiliza con la química estándar (AmpliTaQ o AmpliTaQFS) y la mayor parte de GeneScan, mientras que el “Set B” se reserva para la química de “Sequenase T7 Terminator” y “GeneScan TET Amidite”.

e).-Presionar “Set–up Run”. Aparecerá la siguiente pantalla:

Scan delay 01:00	Timer 7:00	Volt 2500	mAmp 40	Watt 32
---------------------	---------------	--------------	------------	------------

f).-En su caso, modificar “Scan delay” a una hora (34 cm WTR) u hora y media (48 cm WTR) y “Timer” a un número de horas entre 7 y 13 (34 cm WTR) o 18 (48 cm WTR) h, dependiendo de la longitud de secuencia que se desee leer. La potencia estará a 32 W (34 cm WTR) o a 38 W (48 cm WTR). Para modificar estos valores emplear las teclas con flechas para moverse entre los campos y el teclado numérico para editar los valores.

Nota: el sistema eléctrico del secuenciador se configura siguiendo al parámetro más bajo. De modo que si se quiere correr a potencia constante (asterisco en 32 ó 38 W), conviene que el valor de voltios sea alto (p.ej., 2500), al igual que la intensidad de corriente (p.ej., 40 mAmp). De este modo se consigue que el asterisco se vaya al vataje (ver más adelante), reconfigurándose los valores de diferencia de potencial y amperaje proporcionalmente (como es sabido, $W = V \cdot \text{Amp}$).

g).-Activar “Start Pre–run” en la pantalla del “Main Menu” y luego “Plate Check”. Tras unos segundos, el láser comenzará a funcionar y el secuenciador enviará al Mac datos correspondientes a cuatro barridas usando los cuatro filtros previamente seleccionados.

Nota: en este momento el Mac debe estar activo y con la aplicación “Data Collection” en pantalla (ver más abajo).

h).-Activar “Scan” en la pantalla del Mac. Aparecerá un sistema de coordenadas cuyo eje Y representa el valor de la fluorescencia inducida por el láser, mientras que el eje X corresponde a la anchura del gel.

i).-Aparecerán cuatro líneas de colores, que representan la respuesta del sensor a cada uno de los filtros empleados. Colocar la punta de la flecha del cursor (ratón) tocando la línea cuyo valor de Y sea menor (generalmente corresponde con el color azul). El valor de Y debe estar entre 800 y 1000 (aparece en el margen inferior izquierdo de la ventana). En caso contrario, debe incrementarse o reducirse el voltaje del fotomultiplicador.

Nota: el valor de Y suele incrementar un poco una vez que la máquina se calienta. Conviene pues dejar el “Scan” funcionando durante unos cinco minutos para asegurarse de que la lectura es correcta.

j).-Para alterar el valor del fotomultiplicador, presionar “Calibration” en la pantalla del “Main Menu”. aparecerá la siguiente ventana:

Set Clock	Version 2.10	Fluor Check	Gain Set	Con- figure
--------------	-----------------	----------------	-------------	----------------

k).-Presionar “Fluor Check”. Aparecerá la siguiente pantalla:

PMT voltage is 495 volts

l).-Utilizar las teclas numéricas para introducir el valor deseado. Presionar “change”. Volver al apartado “h”. Repetir el proceso tantas veces como sea necesario para obtener una lectura de Y entre 800 y 1000.

m).-Por otra parte, si las líneas observadas en la pantalla del Mac tras realizar el “Scan” presentaran picos, debe volverse a limpiar la zona de lectura del láser, incluyendo los cristales y la propia tapa de cierre de la ventana. Una vez realizada la limpieza, proceder de nuevo a comprobar el “Scan” (apartado h). Repetir el proceso tantas veces como sea necesario para conseguir líneas lo más rectas posibles y sin picos marcados.

Nota: los papeles tipo Kleenex son excelentes porque no dejan rastro de celulosa.

ATENCIÓN: conviene usar agua y no alcohol para la limpieza de los cristales, ya que el alcohol puede llevar sustancias contaminantes que fluorezcan.

n).-Una vez conseguido un gel limpio y con un valor de Y correcto, colocarle el peine apropiado (generalmente, 24 o 36 dientes de tiburón) con cuidado.

ATENCIÓN: asegurarse que la anchura del gel corresponde con la de los espaciadores usados para crearlo.

ATENCIÓN: asegurarse que el gel no está apretado por los tornillos superiores del soporte de alineamiento (ver más adelante). En tal caso no podría introducirse bien el peine, que podría romperse.

ATENCIÓN: el peine debe introducirse de forma uniforme en toda su longitud. Meterlo hasta que entre ~0,5 mm en el gel de acrilamida. Ésta no debe “combarse”.

Nota: existen peines con y sin numeración. Generalmente es conveniente usar los provistos de numeración.

o).-Colocar el soporte de alineamiento (“Alignment brace”) o barra de metacrilato y apretar los dos tornillos laterales.

ATENCIÓN: no apretar demasiado los tornillos (¡podría romperse el soporte de alineamiento!). Generalmente basta con que estén ligeramente apretados.

Nota: usar un soporte de alineamiento sin numeración (en el caso de que el peine estuviera marcado), y viceversa.

p).-Añadir 1X TBE a la cubeta superior hasta que quede 1,5 cm para llegar casi al borde. Llegar hasta el borde para electroforesis de 18 o más horas.

ATENCIÓN: Comprobar que el electrolito no gotea. En caso contrario, apretar un poco más los tornillos. Si no dejara de gotear, sacarlo con una jeringa o vaso de precipitados, limpiar con papel de filtro, retirar el sandwich,

secar todo bien y volver a colocar el sandwich apretando bien los tornillos. Repetir hasta que no gotee. ¡ NUNCA AÑADIR GRASA !

q).-Añadir 1X TBE a la cubeta inferior hasta que quede 1,5 cm para llegar casi al borde. Llegar hasta el borde para electroforesis de 18 o más horas.

r).-Conectar los cables eléctricos de las cubetas superior e inferior.

6.9. Preparación del secuenciador: Macintosh

a).-Enciende el Mac pulsando la tecla de arranque situada en el extremo superior derecho del teclado.

b).-Desactiva todas las extensiones del sistema que no sean estrictamente necesarias para el software de recogida y análisis de datos del 373 Stretch. Para ello accede al botón "CC" (ConflictCatcher) de la barra principal de menús y selecciona "Set this BEFORE a run".

Nota: aunque no es absolutamente necesario, la inactivación de las extensiones del sistema (p. ej., antivirus, protectores de pantalla, red, etc) elimina posibles riesgos de conflicto y caída del sistema.

c).-Introduce los iconos (alias) "Data Collection" y "Sequence Analysis", que están sobre el escritorio, en la carpeta "Items Arranque. Mete o saca aquí" (que es en realidad un alias de la carpeta "Items de Arranque" situada en la carpeta del sistema del Mac).

Nota: mediante este paso se consigue que arranquen automáticamente los programas "Data Collection" y "Sequence Analysis" después de un eventual corte del flujo eléctrico.

d).- (opcional). Usa un destornillador para girar a derechas (y meter) el tornillo situado en la parte derecha trasera del Mac. Se trata en realidad de un interruptor. El Mac debe reiniciarse en ese momento, arrancando automáticamente las aplicaciones Data Collection y Sequence Analysis.

Nota: mediante este paso se consigue que arranque el Mac después de un corte del flujo eléctrico. De hecho, en estas circunstancias es imposible apagar el Mac desde el menú del escritorio ("Apagar Equipo").

Nota: este paso puede eliminarse si se dispone de un SAI (Sistema de Alimentación Ininterrumpida) de 20.000 voltios, y con una autonomía de media hora a pleno rendimiento y de 5 a seis horas cuando está conectado el 373Stretch sólo (que es lo que sucede, por ejemplo, al dejar secuenciando durante la noche).

e).-Si no lo hubiera hecho, reiniciar el Mac. Acceder a Data Collection. Seleccionar "Settings" del menú "Edit". Teclear los datos requeridos: duración de electroforesis, matriz a usar (Instrument File), tipo de peine empleado y química (terminadores, cebadores). Marcar con una "X" la opción "Analyze all samples". No seleccionar el resto de opciones ("Plot Raw Data", "Plot Analyzed Data").

f).-Abrir “New Sample Sheet” del menú “File”. Rellenar la hoja con los datos requeridos: nombre de la muestra, comentarios y química. Los “auto settings” se autoconfiguran como su nombre indica. Sólo hay que tener en cuenta que si en un carril se escribe algo y luego se deja vacío, conviene ir a “auto settings” y borrar la X de “automatic analysis” que el Mac habrá puesto automáticamente.

g).-El Mac ya está listo para recoger datos: sólo hace falta activar “Collect” (ver más adelante).

6.10. Aplicación de las muestras al gel de secuenciación

a).-Añadir a cada reacción (previamente secada) de 3 a 4 µl (ver tabla siguiente) de la mezcla de carga (5 formamida : 1 Na₂EDTA) con o sin colorante. Agitar vigorosamente con vórtex para disolver el residuo seco. Centrifugar durante 5 segundos a máxima velocidad (16.000 g) para recoger todo el volumen en el fondo.

	Peine (pocillos)	Volumen (µl)
24 y 34 cm WTR	24	4–6 (100%)
24 y 34 cm WTR	32 ó 36	3–4 (75–100%)
48 cm WTR	32 ó 36	2–4 (50–100%)

ATENCIÓN: la muestra disuelta de esta forma debe cargarse en el gel de secuenciación en las siguientes horas.

Nota: con *AmpliTaQFS* y peine de 36 pocillos, se obtienen buenos resultados disolviendo la muestra en 4 µl y cargando 3 µl en el pocillo del gel.

b).-Una vez que el gel este dispuesto para recibir las muestras, calentarlas a 90°C durante 2 minutos para desnaturalizar el dsDNA. Colocar los tubos inmediatamente en hielo picado.

Nota: para conseguir un enfriamiento más rápido de las muestras y obtener los mejores resultados, desnaturalizar las muestras en una gradilla. Colocarla después en hielo durante unos segundos. Sacarla y volver a pinchar los tubos en otro lugar del hielo picado. Realizar este proceso 3 ó 4 veces hasta que los tubos se enfríen.

c).-Justo antes de cargar las muestras en el gel, lavar los pocillos con una jeringa conteniendo solución amortiguadora de la cubeta superior para eliminar la urea presente.

ATENCIÓN: es muy importante lavar bien los pocillos justo antes de cargar las muestras. La omisión de este paso provocará la aparición de bandas borrosas en la imagen del gel, debido a la presencia de urea en el pocillo.

d).-Cargar todas las muestras impares usando la micropipeta de secuenciación “Drummond 25 µl” (Sigma, Saint Louis, MO, USA).

ATENCIÓN: es esencial lavar bien la punta en el electrolito inferior después de cada muestra cargada.

Nota: no debe cambiarse la punta de la micropipeta Drummond; está diseñada para ser reutilizada.

ATENCIÓN: es muy importante NO cargar dos pocillos contiguos de forma sucesiva. Deben cargarse de forma alterna (por ejemplo, primero impares; luego pares). Si no se cumplen esta regla, el software puede tener problemas para interpretar dónde acaba y donde empieza cada muestra/carril. Asimismo, es muy importante no dejar huecos (carriles) sin cargar entre las muestras. Al menos no dejar huecos de más de dos carriles. En caso contrario el software puede tener problemas a la hora de asignar el número correcto a cada carril cargado.

e).-Una vez cargada la primera serie de muestras en el gel (ver más abajo), presionar “Start Pre–run” en el “Main Menu” y someter a electroforesis durante 5 (34 cm WTR) ó 6 (48 cm WTR) minutos. Aparecerá el siguiente menú en la pantalla del 373 Stretch:

Alter Run	Monitor Run	Abort Run	Self Test	Cali- bration
--------------	----------------	--------------	--------------	------------------

Nota: para comprobar las condiciones de electroforesis, seleccionar “Monitor Run”. Para alterar dichas condiciones, presionar “Alter Run”.

f).-Transcurridos los 5 ó 6 minutos, abortar la electroforesis presionando “Abort Run”. Confirmar.

g).-Lavar de nuevo los pocillos.

h).-Cargar las muestras pares.

i).-Una vez cargada la segunda serie de muestras en el gel, presionar “Start Pre–run” en el “Main Menu” y someter a electroforesis durante 5 (34 cm WTR) ó 6 (48 cm WTR) minutos.

j).-Transcurridos los 5 ó 6 minutos, abortar la electroforesis presionando “Abort Run”. Confirmar.

k).-Lavar de nuevo los pocillos.

Nota: este segundo lavado no es crítico, pero mejora el avance uniforme de las muestras durante la electroforesis.

ATENCIÓN: al finalizar de cargar las muestras, no olvidar lavar la punta de la micropipeta Drummond con agua destilada y colocarle el canuto protector.

l).-Seleccionar “Choose Run” en “Main Menu”. Aparecerá la siguiente pantalla:

GENESCAN RUN	SEQUENCE RUN
-----------------	-----------------

m).-Elegir "Sequence Run". La pantalla cambiará a:

FULL SCAN	BASE SPRINTER
--------------	------------------

n).-Elegir "Full Scan" para leer en el gel completo (generalmente es la opción utilizada). Elegir "Base Sprinter" cuando sólo se han cargado los 18 pocillos centrales de un peine de 36 pocillos.

ñ).-La pantalla cambiará a (34 cm WTR):

Intrpt Run	Timer 12:59	Elapsed 00:01	Volt 1524	mAmp 21	Watt 32*	Temp 40
---------------	----------------	------------------	--------------	------------	-------------	------------

...o a (48 cm WTR):

Intrpt Run	Timer 17:59	Elapsed 00:01	Volt 2000	mAmp 19	Watt 38*	Temp 40
---------------	----------------	------------------	--------------	------------	-------------	------------

Nota: el asterisco en el valor de "Watt" indica que la electroforesis se realiza a potencia constante. La temperatura de electroforesis es de 40°C. Los demás valores de cada variable pueden oscilar algo respecto a los indicados arriba.

Nota: para alterar las condiciones de electroforesis, seleccionar "Alter Run" en el "Main Menu".

o).-Desarrollar la electroforesis el tiempo necesario (generalmente entre 7, 13 ó 18 horas). Generalmente la electroforesis se lleva a cabo durante la noche.

p).-Activar "Collect" en el controlador de "373A Collection" de la pantalla del Mac. Este aparecerá como una punta de flecha verde intermitente. También puede activarse seleccionando "Start Collecting" del menú "Collect".

ATENCIÓN: asegurarse que el 373 Stretch muestra un valor de potencia constante en la pantalla de LCD y que "Collect" está activado e intermitente en el Mac.

ATENCIÓN: cerrar todas las ventanas de la pantalla del Mac, excepto la del controlador.

q).-Oscurecer la pantalla del Mac para evitar su desgaste (usar los controles situados en el lateral derecho del monitor).

r).-Colocar un papel encima del teclado del Mac, indicando que se está procediendo a secuenciar.

s).-Encender el aparato de aire acondicionado. Basta presionar una vez el interruptor on/off del mando a distancia.

ATENCIÓN: es muy importante encender el aire acondicionado (que siempre se fija en el mínimo), tanto en invierno como en verano. En caso contrario la temperatura de la habitación se elevará demasiado, pudiendo afectar a los sistemas electrónicos del secuenciador.

6.11. Post–secuenciación: 373 Stretch

Una vez realizada la secuenciación, es importante dejar la máquina en perfectas condiciones para los siguientes usuarios. Proceder del siguiente modo:

a).-Apagar el interruptor del 373 Stretch situado en la parte delantera izquierda baja del mismo.

b).-Bajar el interruptor del transformador.

c).-Abrir la cámara de secuenciación y succionar con trompa de agua o jeringa la solución amortiguadora de las cámaras superior e inferior. Secar con papel absorbente la zona de contacto de la cámara superior con el cristal para evitar que gotee y ensucie el cañón del láser.

d).-Desenchufar las conexiones de las cámaras de electroforesis. Desatornillar el soporte de alineamiento y retirarlo. Retirar la cubeta superior. Aflojar las sujeciones del gel (laterales y cámara de lectura) y retirar el conjunto gel+cristales.

e).-Utilizar dos espátulas anchas para separar los cristales. Retirar los espaciadores y el peine de dientes de tiburón. Tirar el gel de acrilamida. Para ello basta colocar en posición vertical el cristal al que se encuentra adherido y enrollarlo hacia abajo con un poco de papel. Lavar con agua del grifo primero y destilada después los cristales, separadores, peine y cubetas de electroforesis. Dejarlos escurrir en el soporte de plástico apropiado.

ATENCIÓN: No usar espátulas con sección corta, pues romperían el cristal. Emplear espátulas de ‘albañil’ con al menos 5 cm de hoja.

ATENCIÓN: colocar una bayeta o —mejor— una alfombrilla de caucho o goma en el fondo y lateral del fregadero donde se limpien los cristales para evitar romperlos.

f).-Secar y cerrar la cámara de electroforesis.

6.12. Post–secuenciación: Macintosh

Proceder de forma inversa a como se ha descrito anteriormente:

a).-Activa las extensiones del sistema. Para ello accede al botón “CC” (ConflictCatcher) de la barra principal de menús y selecciona “Set this AFTER a run”.

Nota: este paso es esencial, por ejemplo, para poder imprimir los resultados de la electroforesis.

b).-Sacar los iconos (alias) “Data Collection” y “Sequence Analysis” de la carpeta “Items Arranque. Mete o saca aquí” y dejarlos en el escritorio.

Nota: mediante este paso se evita que los programas “Data Collection” y “Sequence Analysis” arranquen automáticamente cada vez que se encienda el Mac.

c).-(en su caso). Usar un destornillador para girar a izquierdas (y sacar) el tornillo situado en la parte derecha trasera del Mac.

Nota: mediante este paso se consigue que se pueda apagar el Mac desde el menú del escritorio (“Apagar Equipo”).

d).-Cerrar todas las ventanas abiertas en el escritorio y seleccionar “Reiniciar” del menú “Especial”.

e).-Proceder a visualizar los datos generados (gel, electroferogramas, secuencias), grabarlos en disco magneto óptico, imprimirlos, etc

6.13. Análisis de resultados

El secuenciador 373 Stretch transfiere los datos obtenidos durante la secuenciación al ordenador Apple Macintosh en tiempo real. Si este último se ha configurado de forma apropiada, al acabar la recogida de datos (electroforesis), el Mac procede automáticamente a analizarlos, generando la imagen del gel y los fluorogramas y secuencias de las muestras cargadas previamente.

Al acabar este proceso, el Mac mostrará una ventana “Error log” indicando las incidencias de la secuenciación. Leerla (en su caso) y cerrarla.

Asimismo, se mostrará la ventana “Sample File Queue”, que consta de dos subventanas (“Sample File Queue” y “Sample File Log”), donde aparecerán los archivos para ser reanalizados o impresos, una vez seleccionadas las opciones correspondientes (“Add for Printing”, “Add for Analysis”). En el caso de un nuevo análisis, pueden elegirse varios algoritmos representados por “Base Caller” (Adaptive, SemiAdaptive, ABI50, ABI100 y ABI200). Generalmente se selecciona el ABI50 (34 cm WTR) o el ABI100 (48 cm WTR), aunque en situaciones especiales (productos cortos de PCR, espaciamientos anormales, etc) puede ser mejor elegir otros. Según nuestra experiencia, los plásmidos secuenciados con geles de 48 cm WTR, se analizan mejor en el 373Stretch siguiendo el siguiente orden de algoritmos: ABI100 > Adaptive ≥ SemiAdaptive > ABI50 > ABI200.

Los resultados generados pueden utilizarse tal cual o reanalizarse manualmente si se desea alterar alguno de los parámetros del análisis automático (eliminar la parte inicial o final de la lectura, alterar la numeración de los carriles o la guía de lectura (tracking), cambiar la química si se cometió un error en la hoja de datos, etc).

El secuenciador 373 Stretch dispone de manuales explícitos del funcionamiento de la máquina (“373 DNA Sequencing System”) y del software estándar correspondiente (“373 DNA Sequence Analysis Software”). Asimismo, existe software específico de PerkinElmer:

Inherit. Se trata de un software muy potente de ensamblaje de secuencias generadas por el 373 Stretch, así como análisis, comparación y búsqueda de secuencias en bases de datos.

SeqEd. Para análisis de las secuencias y fluorogramas generados con el 373 Stretch.

SequenceNavigator. Ideal para detectar polimorfismos y mutaciones en gran cantidad de secuencias.

AutoAssembler. Como su nombre indica, permite ensamblar las secuencias generadas mediante el 373 Stretch.

Factura. Para análisis de fingerprinting generados mediante GeneScan.

Genotyper. Para convertir los datos de fingerprinting generados mediante GeneScan en genotipos y árboles genealógicos.

Finalmente, las secuencias generadas pueden ser también analizadas con el paquete **LaserGene** (DNASTar, Madison, WI, USA), según se comentó en la Sesión 1. En esta práctica realizaremos un análisis de restricción de la secuencia obtenida (mediante MapDraw), así como una comparación de la misma frente a la base de datos GeneMan/EMBL (mediante GeneMan), cuyo resultado debe ser el operón *araBAD* de *Salmonella typhimurium* y, más específicamente, una porción del gen *araA*. Finalmente puede realizarse una comparación de ambas secuencias (mediante Align o MegAlign).

7. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

- + Applied Biosystems (1996): Comparative Sequencing. Applied Biosystems, Perkin Elmer (Foster City, CA, USA; <<http://www.perkin-elmer.com>>). Libro sobre las diferentes estrategias de secuenciación fluorescente con los equipos 310, 373 y 377. Clasificación: TEORÍA ESPECÍFICO.
- + Applied Biosystems (1995): ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Part number 402078. Rev. A (August 1995). Applied Biosystems, Perkin Elmer (Foster City, CA, USA; <<http://www.perkin-elmer.com>>). Manual de instrucciones del kit de secuenciación mediante terminadores “PRISM” y AmpliTaqFS. Clasificación: PROTOSCOLOS.
- + Applied Biosystems (1994): 373 DNA Sequence Analysis Software. User’s Manual. Part number 903205. Rev. A (May, 1994). Applied Biosystems, Perkin Elmer (Foster City, CA, USA; <<http://www.perkin-elmer.com>>). Manual de instrucciones del software “Analysis” del secuenciador automático 373 DNA Sequencer Stretch. Clasificación: PROTOSCOLOS.
- + Applied Biosystems (1995): ABI Prism DNA Sequence Analysis Software. User’s Manual. Part number 903436. Rev. A (January, 1995). Applied

- Biosystems, Perkin Elmer (Foster City, CA, USA; <<http://www.perkin-elmer.com>>). Manual de instrucciones del software "Analysis" del secuenciador automático 373 DNA Sequencer Stretch. Clasificación: PROTOCOLOS.
- + Applied Biosystems (1994): 373 DNA Sequencing System. User's Manual. Part number 903204. Rev. A (June, 1994). Applied Biosystems, Perkin Elmer (Foster City, CA, USA; <<http://www.perkin-elmer.com>>). Manual de instrucciones del secuenciador automático 373 DNA Sequencer Stretch. Clasificación: PROTOCOLOS.
 - + Applied Biosystems (1994): SeqEd 675. DNA Sequence Editor. User's Manual. Part number 901415. Rev. 1.00A (August, 1990). Applied Biosystems, Perkin Elmer (Foster City, CA, USA; <<http://www.perkin-elmer.com>>). Manual de instrucciones del software "SeqEd" del secuenciador automático 373 DNA Sequencer Stretch. Clasificación: PROTOCOLOS.
 - + Applied Biosystems (1994): PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit. Part number 401388. Rev. A (June 1994). Applied Biosystems, Perkin Elmer (Foster City, CA, USA; <<http://www.perkin-elmer.com>>). Manual de instrucciones del kit de secuenciación mediante terminadores "PRISM" y AmpliTaq. Clasificación: PROTOCOLOS.
 - + Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (2005): "Current Protocols in Molecular Biology". Vols 1 a 4. New York: Greene & John Wiley (New York). Manual de protocolos. "La nueva «Biblia» del Biólogo Molecular" actualizada trimestralmente. Clasificación: PROTOCOLOS.
- Brown TA (ed) (1991): "Molecular Biology LabFax". Oxford: Bios Scientific Publishers/Blackwell Scientific Publications. Compendio de datos útiles en biología molecular. Clasificación: DATOS.
- Cooper NG (1994): "The Human Genome Project. Deciphering the Blueprint of Heredity" Mill Valley: USA. Divulgativo y a la vez con nivel y rigor científico. Explica exhaustivamente el Proyecto del Genoma Humano y aspectos relacionados. Interesante e instructivo. Recomendable. Clasificación: TEORÍA DIVULGATIVO.
- + DNASTar (2005): LaserGene for the Macintosh and PowerMacintosh. User's Manual. DNASTar (Madison, WI, USA; <<http://www.dnastar.com>>). Manual de instrucciones del paquete de software de biología molecular "LaserGene". Clasificación: PROTOCOLOS.
- Lario A, González A, Dorado G (1997): Automated laser-induced-fluorescence DNA sequencing: equalizing signal-to-noise ratios significantly enhances overall performance. Analytical Biochemistry 247: 30-33. Optimización del protocolo de secuenciación para 373 Stretch. Clasificación: TEORÍA ESPECÍFICO.
- Maxam AM, Gilbert W (1977): A new method of sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA 74:560-564. Descripción del protocolo de secuenciación mediante degradación química (de Maxam-Gilbert). Clasificación: TEORÍA ESPECÍFICO.
- + Promega (2005): Magic Minipreps DNA Purification System. Plasmid Miniprep. Instructions for isolating plasmid DNA from bacteria. Catalog number A7100. Promega (Madison, WI, USA; <<http://www.promega.com>>). Manual de instrucciones del kit "Magic Miniprep". Clasificación: PROTOCOLOS.

- + Sambrook J, Russell D (2001): “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 3rd edition, Vols 1–3. New York: CSH Laboratory Press. Manual de protocolos. “La «Biblia» clásica del Biólogo Molecular”. Clasificación: PROTOSCOLOS.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463–5467. Descripción del protocolo de secuenciación mediante análogos de nucleótidos (didesoxinucleótidos o de Sanger). Clasificación: TEORÍA ESPECÍFICO.
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992): “Recombinant DNA” New York: Freeman and Company. Divulgativo y a la vez con nivel y rigor científico. Clásico sobre Ingeniería Genética y sus aplicaciones. Claro, didáctico y con numerosos esquemas e ilustraciones explicativas. Muy recomendable. Clasificación: TEORÍA DIVULGATIVO.

Nota: las referencias fundamentales para la preparación de la sesión se indican con el símbolo “+”.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PAFPU ‘FORMAPROFE’ (‘UCO-N-031’) de Formación del Profesorado Universitario, Junta de Andalucía.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Pesar y añadir las cantidades que se indican en las tablas correspondientes, disolver previamente en agua (en el caso de que se desee repartir entre botes) y esterilizar en autoclave (“autoclavar”) a 120°C y 1 bar (= 1 kg/cm²) de presión durante 20 minutos.

ATENCIÓN: comprobar que el autoclave tiene agua en el fondo. En caso contrario, añadir agua destilada hasta la rejilla del fondo de la máquina. Asimismo, comprobar que las salidas de agua y de aire se encuentran cerradas. Si no se toman estas precauciones podría quemarse el autoclave.

ATENCIÓN: como norma general, no se deben autoclavar soluciones concentradas de ácidos (clorhídrico, sulfúrico) o álcalis (NaOH). Como es obvio, estas soluciones son “estériles” per se. Además, pueden dañar la estructura de acero del autoclave. Tampoco se autoclavan soluciones concentradas ni diluidas de disolventes orgánicos (acetona, tolueno, éter, metanol, etanol, etc). En estos casos se autoclava la solución sin el disolvente orgánico volátil. Éste se añade posteriormente cuando la temperatura de la muestra es igual a la ambiente. En caso contrario, el disolvente volátil ¡se evaporará completamente durante el proceso de esterilización en el autoclave!

Generalmente las soluciones se preparan en botes de vidrio tipo Pyrex, excepto los que contienen álcalis, que se guardan en plástico.

Mezcla sólida acrilamida:bis–acrilamida (19:1)

ATENCIÓN: la acrilamida y la bis–acrilamida (N,N’–Methylene–bis–acrylamide o N,N’–Methylene–di–acrylamide) en estado de monómeros son

neurotóxicos y neurocarcinógenos. Para más información, consultar las monografías de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (“International Agency for Research on Cancer”; IARC; <<http://www.iarc.fr>>) y las publicaciones de la Organización Mundial de la Salud (“World Health Organization”; WHO; <<http://www.who.org>>). Manipular el material sólido monomérico con guantes y mascarilla dentro de una campana extractora. Está terminantemente prohibido pesar la acrilamida fuera de la campana extractora. La poliacrilamida (o sea, los monómeros polimerizados) no es peligrosa.

Tabla 7. Mezcla sólida acrilamida:bis–acrilamida (19:1)			
	Para 20 g (g)	Para 100 g (g)	Para 200 g (g)
Acrilamida	19	95	190
Bis–acrilamida	1	5	10
Mezclar bien los polvos			
Guardar a temperatura ambiente			

ATENCIÓN: la acrilamida y bis–acrilamida son higroscópicas, por lo que se apelmazan y forman grumos. Por tanto, es esencial pulverizar perfectamente ambos componentes para obtener una mezcla correcta 19:1.

Solución 40% acrilamida:bis–acrilamida (19:1)

ATENCIÓN: la acrilamida es neurotóxica. Manipular la solución con guantes.

Tabla 8. Solución 40% acrilamida:bis–acrilamida (19:1)			
	Para 50 ml	Para 100 ml	Para 200 ml
Mezcla sólida acrilamida:bis–acrilamida (19:1)	20 g	40 g	80 g
Agua destilada “milli-Q”	31,5 ml	63 ml	126 ml
Guardar a 4°C			

Solución persulfato amónico (APS)

Disolver en agua, según se indica en la tabla.

Tabla 9. Solución persulfato amónico (APS)			
	Para 0,5 ml	Para 1 ml	Para 15 ml
Persulfato amónico	0,05 g	0,1 g	1,5 g
Agua destilada “milli-Q”	500 µl	1 ml	15 ml
Guardar a 4°C			
USAR SOLUCIONES FRESCAS (≤ 1 SEMANA)			

ATENCIÓN: la solución de persulfato amónico debe prepararse fresca. No deben usarse soluciones con más de una semana.

Suspensión Sephadex G–50

La suspensión de Sephadex G–50 (Pharmacia, Suecia) se prepara en agua, según se indica en la tabla siguiente.

Tabla 10. Suspensión Sephadex G–50		
	Para 100 ml	Para 500 ml

Azida sódica	0,02 g	0,1 g
Agua destilada "milli-Q"	Hasta 10 ml	Hasta 500 ml
Añadir un poco de Sephadex G-50, agitar para que se hidrate y seguir añadiendo hasta que sólo queden ~2 cm de agua por encima del lecho de la resina		
Guardar a 4 °C		

ATENCIÓN: aunque no es necesario añadir azida sódica cuando la resina se va a utilizar el mismo día, es recomendable añadirla si se desea conservar la suspensión sin que se contamine por bacterias.

Nota: la azida sódica no interfiere con la detección en el secuenciador; esto es, no es necesario lavar la resina al preparar las columnas de purificación de las reacciones de secuenciación.

Fibra sintética Perlón

La fibra sintética Perlón puede adquirirse en acuarios (se usa para los filtros de las peceras). Es mejor que la lana de vidrio, ya que no es tóxica y no adhiere ácidos nucleicos.

Tabla 11. Fibra sintética Perlón	
Lavar la fibra con agua destilada (usar guantes)	
Realizar tres baños sucesivos	
Empaquetar en bolsas	
Esterilizar en autoclave	
Secar en estufa a 37°C durante toda la noche	
Guardar a temperatura ambiente	

Nota: dependiendo del origen de la fibra, puede no ser necesario lavarla ni esterilizarla previamente. El lavado es necesario cuando la fibra presenta sustancias fluorescentes que pudieran interferir con el secuenciador. La esterilización es necesaria si la fibra está contaminada con nucleasas.

Solución formamida desionizada

Desionizar la formamida en presencia de una resina de intercambio iónico como la Amberlite MB-1 (Sigma, USA).

Tabla 12. Solución formamida desionizada		
	Para 1 ml	Para 10 ml
Formamida	1 ml	10 ml
Amberlita	0,1 g	1 g
Agitar con "mosca" magnética durante 30 minutos		
Filtrar a través de membrana hidrófila (nitrato de celulosa) con 0,22 µm Ø poro		
Guardar a -20°C		

Solución 50 mM EDTA, pH 8

La solución de la sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético (ethylenediamine tetraacetic acid, disodium salt) se prepara como sigue:

Tabla 13. Solución 50 mM EDTA, pH 8		
	Para 10 ml	Para 100 ml
Na ₂ -EDTA (PM = 372,2)	0,19 g	1,86 g
Agua destilada "milli-Q"	8 ml	80 ml
Disolver con "mosca", ajustar pH a 8 con una solución saturada de NaOH y llevar volumen final a 10 ó 100 ml, respectivamente		
Esterilizar en autoclave		
Guardar a temperatura ambiente		

Nota: también puede usarse EDTA (ácido libre; PM = 292,25). En tal caso se añadirán 0,146 y 1,46 g, respectivamente, para preparar 10 y 100 ml. Además será preciso añadir sosa para conseguir la disolución del ácido libre. Realmente, generalmente siempre se usa la sal disódica; cuando se dice o escribe "EDTA", prácticamente en todos los casos se hace referencia a su sal disódica. Sería más correcto escribir Na₂-EDTA.

Solución de carga (sin colorante)

La solución de carga (sin colorante) consta de:

Tabla 14. Solución de carga (sin colorante)		
	Para 6 µl (µl)	Para 6 ml (ml)
Formamida desionizada	5	5
Na ₂ -EDTA (50 mM, pH 8)	1	1
Mezclar		
Guardar a -20°C		

Nota: con el modelo "ABI Prism 377 DNA Sequencer" se usa EDTA 25 mM en vez de 50 mM (empleado con el "ABI 373 Stretch DNA Sequencer").

Solución stock coloreada

La solución stock coloreada consta de Na₂-EDTA y azul dextrano:

Tabla 15. Solución stock coloreada		
	Para 1 ml	Para 10 ml
Na ₂ -EDTA (50 mM, pH 8)	1 ml	10 ml
Azul dextrano	0,03 g	0,3 g
Mezclar		
Guardar a -20°C		

Nota: otros protocolos usan 50 mg (en vez de 30 mg) de dextrano azul por cada ml de solución stock coloreada, para dar una tonalidad más fuerte.

Solución de carga (con colorante)

La solución de carga (con colorante) consta de:

Tabla 16. Solución de carga (con colorante)
--

	Para 6 μ l (μ l)	Para 6 ml (ml)
Formamida desionizada	5	5
Solución stock coloreada	1	1
Mezclar		
Guardar a -20°C		

Nota: la utilización de solución de carga con o sin colorante sólo depende de las preferencias del usuario. Facilita la carga de las muestras al hacerlas “visibles” y no afecta la detección por parte del secuenciador automático. Es por ello muy recomendable, al menos para los que se inician en la técnica de secuenciación en gel.

Almacenamiento de oligos

Es importante realizar un almacenamiento correcto de los oligos, ya que ello permitirá una mayor vida útil de los mismos. En general, las empresas garantizan éstos durante un año, pero es sabido que su vida útil puede ser significativamente mayor si se almacenan correctamente (o menor, en caso contrario):

El mejor método para almacenar oligos es secándolos en una centrífuga evaporadora (SpeedVac) o —mejor— mediante liofilización. Luego se guardan a temperatura ambiente o —mejor— congelados a -20°C o menos.

Los oligos también son estables en una solución de 5% de acetonitrilo y -20°C (no llegan a congelar). Algunas empresas los suministran de ésta forma. Aunque esta concentración de acetonitrilo es soportada en la PCR, generalmente se elimina por desecación o liofilización y se procede como se indica en el apartado anterior o posterior.

El siguiente método por orden de estabilidad es disueltos en agua destilada (oligos sin marcar, biotinilados o fosforilados) o disueltos en TE pH 8 (oligos marcados con fosforoamiditas fluorescentes de Perkin–Elmer: Rox, Tamra, 6–Fam, Hex, Tet, etc).

Nota: las fosforoamiditas para marcar oligos suelen ser “Rox” (rojo), “Tamra” (rojo), “6–Fam” (azul), “Hex” (amarillo) y “Tet” (verde). Rox y Tamra suelen reservarse para los estándares internos de peso molecular. Estos fluoróforos pueden usarse con la química de cebadores marcados para secuenciación, o bien en GeneScan. La experiencia indica que Tet es el que más rápidamente se degrada y el que da más problemas de fondo (sobre todo, en presencia de otros en PCRs múltiples). 6–Fam da más señal que Hex, siendo ambas buenas opciones para PCRs múltiples. Otra lección de la experiencia es que, en el caso de análisis con GeneScan, deben elegirse en las PCRs múltiples amplicones que no solapen (aunque tengan diferente color): al menos deben distanciarse en 3 pb. Finalmente, el tamaño ideal del amplicón debe oscilar entre 130 y 150 pb. En estos casos suele usarse como patrón interno de pesos moleculares el “GeneScan 350 Tamra” (Perkin-Elmer/AppliedBiosystems).

Nota: es importante tener en cuenta que los oligos marcados con fosforoamiditas fluorescentes deben protegerse de la luz, guardados en botes ámbar o envueltos en papel de aluminio.

Nota: para evitar la degradación de los oligos, se recomienda alicuotar éstos en pequeñas cantidades, de forma que una misma muestra no se congele/descongele más de cinco veces. Lo ideal es mantener los oligos que se vayan a usar en un año o antes en pequeños volúmenes, de forma que en 1 μ l (p.ej.) de solución haya la cantidad necesaria por reacción. El resto debe guardarse seco a -20°C o menos.