

# Comparación del método de secuenciación de las regiones HVI y HVII del ADN mitocondrial con el kit BigDye® Direct Cycle Sequencing y el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing

Luisa Fernanda Gómez Batres  
Laboratorio de Serología y Genética  
Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala –INACIF-  
luisag28@gmail.com

Recibido: 3/03/2021  
Aceptado: 24/03/2021

## ABSTRACT

This study describes and compares the main characteristics of the method of sequencing of the HVI and HVII regions of mitochondrial DNA with the *BigDye® Direct Cycle Sequencing* kit and the *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* kit through a literature review. The main difference is that the *BigDye® Direct Cycle Sequencing* kit requires that *forward and reverse primers* for PCR includes the M13 tail at their 5' ends; while the *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* kit does not require it. Additionally, purification of the PCR products and cycle sequencing in the *BigDye® Direct Cycle Sequencing* kit is performed in a single step, reducing a potential source of error and time for sample processing. However, the advantage of the *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* kit is that it allows re-analyzing the PCR products of each sample, since it does not use the full volume to perform the cycle sequencing as in the *BigDye® Direct Cycle Sequencing* kit. Therefore, the appropriate kit that can be applied in the Genetics Area of the Serology and Genetics Laboratory from the Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala (INACIF) is the *BigDye® Direct Cycle Sequencing* kit because it reduces the time of the flow of cycle sequencing work and minimizes experimental variability caused by multiple handling steps.

**Palabras clave:** *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing*, *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, cebadores forward y reverse, cola M13, regiones HVI y HVII del ADN mitocondrial.

**Key words:** *BigDye® Direct Cycle Sequencing kit*, *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit*, forward and reverse primers, M13 tail, HVI and HVII regions of mitochondrial DNA.

## RESUMEN

En el presente estudio se describen y comparan las características principales del método de secuenciación de las regiones HVI y HVII del ADN mitocondrial con el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* y el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*; mediante una revisión bibliográfica. La diferencia principal entre el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* y el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, es que el primero requiere que los cebadores *forward* y *reverse* para PCR incluyan en sus extremos 5' la cola M13; mientras que el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* no la requiere. Además, la purificación de los productos de PCR y ciclo de secuenciación en el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* se realizan en un solo paso, lo que reduce una potencial fuente de error por transferencias y el tiempo para el procesamiento de las muestras. Sin embargo, la ventaja del *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* es que permite re-analizar los productos de PCR de cada muestra ya que no utiliza el volumen completo de los mismos para realizar el ciclo de secuenciación como el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing*. Por lo anterior, el kit apropiado que puede ser aplicado en el Área de Genética del Laboratorio de Serología y Genética del Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala (INACIF) es el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing*, al reducir el tiempo del flujo de trabajo del ciclo de secuenciación y minimizar la variabilidad experimental causada por múltiples pasos de manipulación de las muestras.

NOTA: Ciertos equipos, instrumentos, reactivos, insumos y/o materiales comerciales que se identifican en el presente estudio, tienen como única finalidad especificar los procedimientos experimentales de la manera más completa posible. En ningún momento dicha identificación implica una promoción de estos productos.

NOTE: Certain equipment, instruments, reagents, supplies, and commercial materials that are identified in this study have the sole purpose of specifying the experimental procedures as completely as possible. In no case does such identification imply a promotion of these products.

## INTRODUCCIÓN

Desde 1996 los laboratorios de genética a nivel internacional tipifican el ADN mitocondrial (ADNmt). El ADNmt es un pequeño genoma circular bicatenario con aproximadamente 16,569 pares de bases; esto varía debido a pequeñas inserciones o deleciones. En promedio hay de 4 a 5 copias de moléculas de ADNmt por mitocondria con un rango medido de 1 a 15.

Pueden encontrarse aproximadamente 500 copias en la mayoría de células, sin embargo, la cantidad de mitocondrias en una célula depende de la energía que esta requiera para realizar sus actividades. (Amorim et al., 2019; Butler, 2012)

Al poseer las células un mayor número de copias de ADNmt serán más resistentes a la degradación completa de la muestra. El análisis del ADNmt se convierte en una herramienta valiosa para los científicos de genética forense durante la evaluación de muestras en las que el ácido desoxirribonucleico nuclear se encuentra altamente degradado o de plantilla baja (100 pg). Así mismo, este tipo de análisis es útil en la tipificación familiar, en situaciones de desastres masivos y cuando se posean únicamente muestras de referencia de parientes lejanos por línea materna, por ejemplo: tías, tíos, primas o primos maternos; ya que el ADNmt en los humanos es heredado directamente de la madre, en la mayoría de los casos. (Budowle et al., 2003; Butler, 2012; Linacre & Templeton, 2014)

## CONTENIDO

Para llevar a cabo este procedimiento se realiza la extracción del ADN, es decir, el ADNmt se extrae junto con el ADN nuclear; según el protocolo que utiliza cada uno de los laboratorios para cada tipo de muestra (Bourdon et al., 2014; von Wurmb-Schwark et al., 2003). En la mayoría de los laboratorios se purifica el extracto para eliminar todos los inhibidores de PCR que se hayan extraído en conjunto, por ejemplo: hemoglobina de muestras de sangre, tintes índigos de la mezcla o melanina de muestras de cabello para evitar que éstos se unan al sitio activo de la Taq polimerasa; y de esta forma, permitir su funcionamiento correcto durante la amplificación por PCR (Butler, 2012; Knapp et al., 2012; Radstrom et al., 2008; Sundquist & Bessetti, 2005).

Muchos laboratorios realizan un ensayo de cuantificación de ADN nuclear del extracto y luego estiman la cantidad de ADNmt presente, suponiendo una relación fija entre el ADN nuclear y el ADNmt (Butler, 2012). Sin embargo, actualmente algunos científicos han publicado ensayos que permiten la cuantificación directa del número de moléculas de ADNmt en una muestra mediante PCR en tiempo real

(Andréasson et al., 2002; Meissner et al., 2000; von Wurmb-Schwark et al., 2003). En este procedimiento, se recomienda que la plantilla de ADN sea mayor a 50 pg y no se exceda de 1 ng; ya que esto garantizará el éxito de una amplificación consistente y la producción de datos de secuencia de alta calidad, sin requerir constantes reprocesamientos de la muestra (Lyons et al., 2013).

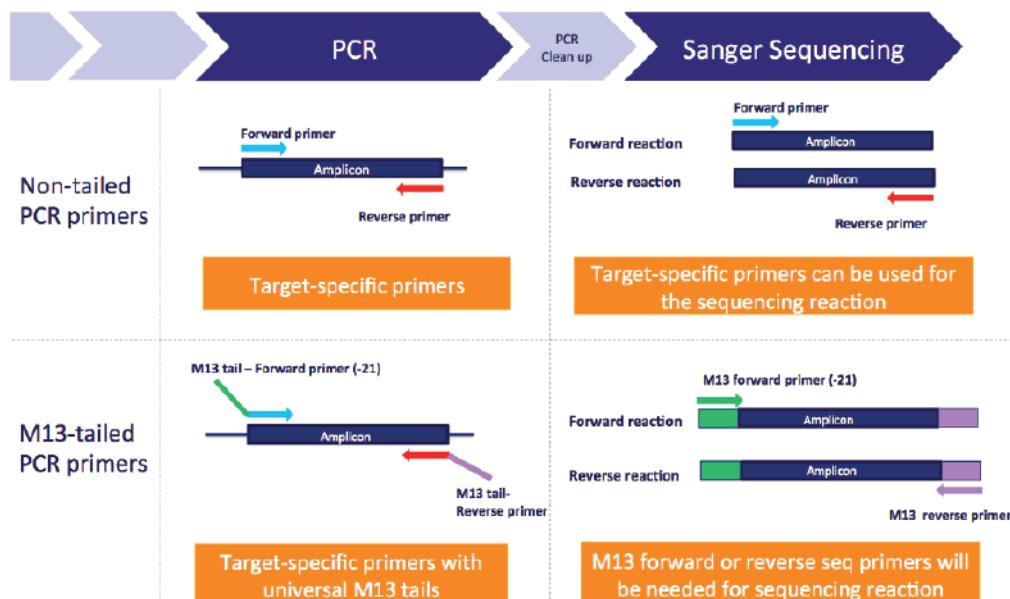
Luego de la extracción, se procede a realizar la amplificación de las regiones HVI y HVII del ADNmt. Los laboratorios utilizan diversos cebadores de PCR y secuenciación, así como combinaciones de los mismos para generar los datos de la secuencia de ADN para HVI y HVII; y generalmente, se realiza con 34 a 38 ciclos (Butler, 2012). La primera diferencia entre ambos kits se encuentra en este paso.

Para utilizar el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* los cebadores *forward* y *reverse* para PCR deben incluir en sus extremos 5' la secuencia universal M13, también conocida como cola M13 (Figura 1). El uso de cebadores con cola M13 reduce la pérdida de bases en la posición 5' lo que permite simplificar y estandarizar el paso de

secuenciación del producto de PCR. Además, dentro del kit se incluye el *BigDye® Direct PCR Master Mix* para realizar la PCR. El *Master Mix* es una mezcla maestra, preparada con los reactivos para PCR (Taq ADN polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y buffer) a concentraciones óptimas. Mientras que, para usar el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*

los cebadores para PCR no poseen la cola M13, por lo que los cebadores forward y reverse son utilizados para PCR y las reacciones del ciclo de secuenciación (ver Figura 1). En el caso de los reactivos para PCR se utiliza la *AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix*, la cual no viene incluida en el kit; por lo que se debe adquirir por separado. (Thermo Fisher

**Figura 1.** Comparación de cebadores sin cola M13 (*kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*) y con cola M13 (*kit BigDye® Direct Cycle Sequencing*) en PCR y ciclo de secuenciación.



(Thermo Fisher Scientific Inc., 2015a)

Posterior a la amplificación, los laboratorios realizan la cuantificación de los amplicones mediante la visualización de los productos de PCR por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% o una cuantificación basada en microfluidos de la plataforma de *Agilent (kit Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000)* (Bourdon et al., 2014; NYC Office of Chief Medical Examiner, 2016). Este paso extra se realiza para determinar la cantidad de ADN plantilla que se utilizará en el ciclo de secuenciación; en este caso el protocolo del fabricante recomienda que para productos de PCR con tamaño de 200 a 500 pb se utilice la cantidad de plantilla de ADN de 3 a 10 ng (Thermo Fisher Scientific Inc., 2018).

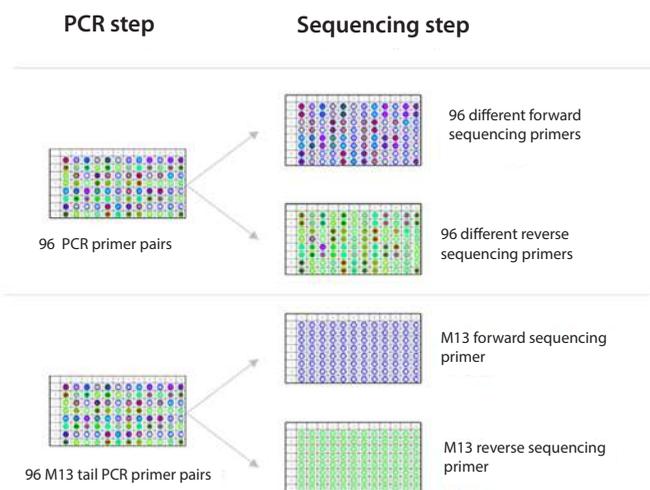
Luego, se procede a la purificación de los productos de PCR para eliminar el exceso de cebadores y los dNTPs (desoxinucleótidos trifosfatos) que no se incorporaron, los cuales pueden interferir en el ciclo de secuenciación ya que éste también utiliza cebadores y nucleótidos. En el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* el reactivo de

limpieza para este paso está integrado en el *BigDye® Sequencing Master Mix*, el cual es una mezcla maestra para el ciclo de secuenciación que contiene dNTPs, terminadores de tinte (ddNTPs marcados con tintes), buffer y Taq ADN polimerasa; mientras que, en el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* se utiliza un reactivo de limpieza que no está incluido dentro del mismo, el fabricante del kit recomienda en su protocolo el reactivo de limpieza *CleanSweep™ PCR Purification Reagent*; sin embargo, éste ya está discontinuado por lo que los laboratorios utilizan *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent*; con cualquiera de estos dos reactivos la purificación se lleva a cabo por una limpieza enzimática que hidroliza el exceso de cebadores y desfosforila los dNTPs no incorporados en la mezcla de productos de PCR (Bourdon et al., 2014; NYC Office of Chief Medical Examiner, 2016; Thermo Fisher Scientific Inc., 2015b, 2020).

Una vez purificados los productos de PCR se procede a realizar el ciclo de secuenciación. Como se mencionó

anteriormente, la diferencia principal es que el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* requiere que los cebadores forward y reverse para PCR contengan la cola M13. Estos productos de PCR tendrán la misma cola, por lo que en el paso del ciclo de secuenciación se utilizan los cebadores universales M13, *forward* y *reverse* para todas las reacciones. Estos cebadores están incluidos dentro del *kit: BigDye® M13 Forward Primer* y *BigDye® M13 Reverse Primer*. Por lo que en este paso solamente se requerirá del producto de PCR, el *BigDye® Direct Sequencing Master Mix*, y el *BigDye® M13 Forward Primer* o *BigDye® M13 Reverse Primer*; según corresponda. (Life Technologies Corporation, 2011; Thermo Fisher Scientific Inc., 2016a) En cambio, en el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* el cebador del ciclo de secuenciación será el mismo que se utilizó en la PCR, y deberá coincidir según los pares de cebadores utilizados en la misma (Figura 1 y 2). En este caso, se utilizará el *BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix* y los cebadores *forward* o *reverse* sin cola M13 para PCR; respectivamente. Algunas reacciones del ciclo de secuenciación pueden optimizarse utilizando el *BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix* diluido. El *BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix* se proporciona en el *kit* a una concentración de 2.5X y se puede diluir usando *BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer* a una concentración final de reacción de 1X. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016c, 2018)

**Figura 2.** Comparación del ciclo de secuenciación con cebadores sin cola M13 (*kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*) y con cola M13 (*kit BigDye® Direct Cycle Sequencing*).



(Thermo Fisher Scientific Inc., s. f.) (Thermo Fisher Scientific Inc., s. f.)

Para obtener resultados óptimos se debe eliminar completamente las sales, dNTPs y terminadores de tinte en los productos del ciclo de secuenciación ya que pueden oscurecer los datos en la primera parte de la secuencia e interferir en el proceso de asignación de bases a los picos del electroferograma (conocido en inglés como basecalling). El fabricante recomienda, sin importar cuál *kit* se esté utilizando, tres métodos para purificar las reacciones de secuenciación y el tiempo aproximado que requiere cada uno de los protocolos: 40 minutos al utilizar el *kit BigDye XTerminator™ Purification*, 45 minutos con *Centri-Sep™* o 90 minutos mediante precipitación con etanol/EDTA; colocando una nota aclaratoria, que con este último método a pesar de que produce una señal de secuenciación limpia, puede causar una pérdida sutil de pequeños fragmentos de peso molecular. Así mismo, si se utiliza *Centri-Sep™* o precipitación con etanol/EDTA, las muestras purificadas deberán ser resuspendidas con formamida altamente desionizada (*Hi-Di™ Formamide*) antes de la electroforesis capilar; sin embargo, no es necesario resuspender las muestras purificadas con el *kit BigDye XTerminator™ Purification*. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016a, 2016b)

Cada laboratorio deberá elegir el protocolo que mejor se adecue a sus capacidades y posibilidades. Por ejemplo, *NYC Office of Chief Medical Examiner* utiliza el protocolo de purificación con *Centri-Sep™* (*NYC Office of Chief Medical Examiner*, 2016). Sin embargo, Bourdon y colegas (2014) en su estudio llamado Optimización de la secuenciación de la región control del ADNmt humano para aplicaciones forenses, realizan una comparación de la purificación de las reacciones de secuenciación con *BigDye XTerminator™* y *Centri-Sep™*, mencionando que el procedimiento con *BigDye XTerminator™* es más fácil y rápido ya que reduce la manipulación de la muestra sin transferencia de líquido y completa la purificación en 40 minutos; en comparación con el protocolo de *Centri-Sep™*, que requiere un paso de secado, en el cual la evaporación se completa luego de una hora aproximadamente a 75 °C en un termociclador. Además, todos los productos purificados con *BigDye XTerminator™* fueron secuencias legibles (Bourdon et al., 2014).

Por último, se realiza la electroforesis capilar. Para ello se requiere de un Analizador Genético, buffer de ánodo y cátodo, un arreglo capilar de 50 cm y en el caso del *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* el polímero que se utiliza es el *POP-7™*; mientras que, en el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* se puede utilizar el polímero *POP-6™* o *POP-7™*. Ambos polímeros se utilizan para la secuenciación y análisis de fragmentos, sin embargo, la diferencia es que el tiempo de corrida con el polímero

POP-6™ es de 135 min, mientras que, con el polímero POP-7™ es de 65 min. Además, Peter Ma y colegas (2010) en su estudio demuestran que utilizar el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* con el polímero POP-7™ aumenta la velocidad de la electroforesis capilar y proporciona datos de secuencia de alta calidad y resolución desde la base 1; es decir, justo después del cebador de secuenciación, garantizando la reproducibilidad. Mientras que, utilizar el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* con el polímero POP-7™ no resuelve las primeras 20 a 30 bases después del cebador de secuenciación. (Crespillo Márquez & Barrio Caballero, 2019; Peter Ma et al., 2010)

## CONCLUSIONES

En general, la purificación de los productos de PCR y ciclo de secuenciación en el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* se realizan en un solo paso, permitiendo que todo el flujo de trabajo del ciclo de secuenciación se pueda realizar en un solo tubo o placa de reacción; al no ser necesario transferir la muestra a un tubo diferente o placa de reacción, se reduce una potencial fuente de error por transferencias y minimiza la variabilidad experimental causada por múltiples pasos de manipulación de las muestras, cosa que no ocurre con el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. Sin embargo, en caso se requiera re-analizar una muestra, con el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* se debe iniciar el procedimiento desde la amplificación; mientras que, con el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* se podrían utilizar los productos de PCR, ya que no se utiliza el volumen completo para realizar el ciclo de secuenciación.

Además, el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* reduce el tiempo para la preparación de las muestras al tener el reactivo de limpieza dentro de la mezcla del ciclo de secuenciación y al utilizar solamente un cebador forward y reverse con cola M13 para todas las muestras. Según *Thermo Fisher Scientific*, el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing* ayuda a los investigadores a ahorrar hasta 3 horas del procesamiento de las muestras, en comparación con un flujo de trabajo del ciclo de secuenciación tradicional con polímero POP-6™, como lo sería con el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* y POP-6™. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015a). Por lo anterior, de acuerdo a la teoría descrita, el kit apropiado que puede ser aplicado en el Área de Genética del Laboratorio de Serología y Genética del Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala (INACIF) es el *kit BigDye® Direct Cycle Sequencing*.

## BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7, e7314.

Andréasson, H., Gyllensten, U., & Allen, M. (2002). Real-Time DNA Quantification of Nuclear and Mitochondrial DNA in Forensic Analysis. *BioTechniques*, 33(2), 402-411.

Bourdon, V., Ng, C., Harris, J., Prinz, M., & Shapiro, E. (2014). Optimization of Human mtDNA Control Region Sequencing for Forensic Applications. *Journal of Forensic Sciences*, 59(4), 1057-1063.

Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R., & Chakraborty, R. (2003). Forensic and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4(1), 119-141.

Crespillo Márquez, M. C., & Barrio Caballero, P. A. (Eds.). (2019). *Genética forense: Del laboratorio a los tribunales*. Ediciones Díaz de Santos.

Knapp, M., Clarke, A. C., Horsburgh, K. A., & Matisoo-Smith, E. A. (2012). Setting the stage – Building and working in an ancient DNA laboratory. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 3-6.

Life Technologies Corporation. (2011). *Protocol BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit*.

Linacre, A., & Templeton, J. E. L. (2014). Forensic DNA profiling: State of the art. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 25.

Lyons, E. A., Scheible, M. K., Sturk-Andreaggi, K., Irwin, J. A., & Just, R. S. (2013). A high-throughput Sanger strategy for human mitochondrial genome sequencing. *BMC Genomics*, 14(1), 881.

Meissner, C., Mohamed, S. A., Klueter, H., Hamann, K., von Wurmb, N., & Oehmichen, M. (2000). Quantification of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system. *Forensic Science International*, 113(1-3), 109-112.

NYC Office of Chief Medical Examiner. (2016). *Forensic Biology Protocols for Mitochondrial DNA Analysis*.

Peter Ma, Su-Chun Hung, Stephan Berosik, Michael Wenz, Stephanie Schneider, Aparna Chhibber, Tina Agostini, Dina Berchanskiy, & David Dinauer. (2010). *A new sequencing primer and workflow increase 5' resolution and throughput on HLA sequencing*. Life Technologies Corporation.

Radstrom, P., Lofstrom, C., Lovenklev, M., Knutsson, R., & Wolffs, P. (2008). Strategies for Overcoming PCR Inhibition. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(4), pdb.top20-pdb.top20.

Sundquist, T., & Bessetti, J. (2005). Identifying and Preventing DNA Contamination in a DNA-Typing Laboratory. *Promega Corporation Profiles in DNA*, 8(2), 11-13.

Thermo Fisher Scientific Inc. (s. f.). *PCR for Sanger Sequencing*.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2015a). *Primer Designer Tool*.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2015b). *Product Information Sheet CleanSweep™ PCR Purification*.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2016a). *Generating high-quality data using the BigDye™ Direct Cycle Sequencing Kit Demonstrated Protocol*.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2016b). *Generating high-quality data using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Using CleanSweep™ PCR Purification*.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2016c). *Quick Reference BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2018). *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit User Guide*.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2020). *ExoSAP-IT PCR cleanup reagents*.

Von Wurmb-Schwark, N., Harbeck, M., Wiesbrock, U., Schroeder, I., Ritz-Timme, S., & Oehmichen, M. (2003). Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. *Legal Medicine*, 5, S169-S172.