

Я.М.Краснов, Н.П.Гусева, Н.А.Шарапова, А.В.Черкасов

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК (ОБЗОР)

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Стремительно развивающиеся технологии секвенирования создали возможность определения нуклеотидной последовательности ДНК полного индивидуального генома человека всего за несколько недель. Производительность некоторых секвенаторов измеряется уже многими сотнями миллиардов пар оснований за рабочий цикл.

В обзоре рассмотрены принципы и аналитические возможности современных методов секвенирования ДНК, которые условно разделены на три основных вида: классические – секвенирование с помощью капиллярного электрофореза и пиросеквенирование; новые («второго» поколения – Next Generation Sequencing – NGS) – проводят одновременно секвенирование миллионов фрагментов ДНК, каждый из которых представлен кластером из многих тысяч или сотен тысяч своих клонов – это высокопроизводительное пиросеквенирование, циклическое лигазное и полупроводниковое секвенирование; секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников; новейшие («третьего» поколения – Next-Next Generation Sequencing – NNGS) методы секвенирования, которые считывают информацию с миллионов единичных фрагментов ДНК без их предварительного клонирования.

Ключевые слова: секвенирование, методы, ДНК.

Ya.M.Krasnov, N.P.Guseva, N.A.Sharapova, A.V.Cherkasov

Modern Methods of DNA Sequencing (Scientific Review)

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Rapidly developing sequencing technologies have provided the possibility for identification of a DNA nucleotide sequence of a whole individual human genome just in a couple of weeks. Working capacity of some sequencers is already measured in thousands of millions of base pairs per an operating cycle.

Reviewed have been the basic principles and analytical potential of the modern methods for DNA sequencing which are nominally subdivided into three major types: classical – capillary electrophoresis sequencing and pyrosequencing, novel (Next Generation Sequencing – NGS) – simultaneous sequencing of millions of DNA fragments, each one of which is a cluster containing many thousands or hundreds of thousands of their clones – high-performance pyrosequencing, cyclic ligase and semiconducting sequencing, molecular-cluster-based sequencing using fluorescent-labeled precursors; and cutting-edge methods – (Next-Next Generation Sequencing – NNGS) – the ones that read millions of single DNA fragments without pre-cloning.

Key words: sequencing, methods, DNA.

Классические методы секвенирования ДНК

Классические методы секвенирования ДНК были разработаны в конце прошлого века и в настоящее время имеют самое широкое распространение в научно-исследовательских и медико-диагностических учреждениях.

Секвенирование методом терминации цепи с помощью капиллярного электрофореза. Для проведения секвенирования с помощью капиллярного электрофореза используют самый распространенный на сегодняшний день способ подготовки ДНК – «метод терминации цепи» или «дидезокси метод», разработанный в 70-х годах прошлого века F.Sanger [26]. В 1985 г. этот метод был существенно улучшен, после того как радиоактивную метку смогли заменить светящейся флуоресцентной [31].

Особенность метода «терминации цепи» заключается в использовании химически модифицированных дезоксирибонуклеотидов, составляющих нуклеотидную последовательность ДНК. Каждая разновидность нуклеотида «помечена» своей флуоресцентной молекулой-маркером. Когда один из

таких модифицированных нуклеотидов при синтезе комплементарной цепи ДНК встраивается в нее, дальнейшая достройка этой цепи прекращается. Видоизмененные разновидности нуклеотидов присутствуют в реакционной смеси в значительно меньших количествах, чем обычные нуклеотиды. В результате получается смесь, содержащая полный набор синтезированных фрагментов ДНК, каждый из которых начинается в одном и том же месте, но заканчивается во всех возможных положениях вдоль цепи ДНК-матрицы [3].

Автоматические секвенаторы разделяют эти фрагменты по величине, как ионы, движущиеся в электрическом поле от «минуса» к «плюсу», пропускающая всю смесь через тончайшие капилляры, наполненные гелем. По мере того, как появляется очередной фрагмент, он освещается лазером, что заставляет светиться меченый нуклеотид на его конце. Таким образом, друг за другом определяются разновидности меченых нуклеотидов на концах всех фрагментов и составляется полная нуклеотидная последовательность исследуемого образца ДНК [2, 3].

Относительно невысокая стоимость, точность, а также простота автоматизации делают этот метод широко используемым в лабораторной практике. В современной интерпретации данный метод позволяет за один рабочий цикл (ран) в одном капилляре с точностью до 98 % определить последовательность ДНК длиной до 1000 пар нуклеотидов (п.н.) [4, 10, 11].

В начале XXI века достигнут предел производительности секвенаторов на основе капиллярного электрофореза, в одном приборе до 384 капилляров. Самые высокопроизводительные модели капиллярных секвенаторов – «MegaBACE 4500» (384 капилляра) и «3730xl DNA Analyzer» (96 капилляров) – способны секвенировать за одни сутки тысячи фрагментов ДНК длиной до 900 п.н. с точностью 95–98 % [4, 10]. Метод терминации цепи был использован при секвенировании первого генома человека, но при таких масштабах оказался очень дорогостоящим и медленным [15].

Пиросеквенирование ДНК. Метод пиросеквенирования основан на определении пирофосфата, образующегося при синтезе комплементарной цепи ДНК. В 1988 г. Е.Нуман впервые предложил использовать этот метод для секвенирования [14]. В 1996 г. Р.Нугэн и М.Ронагхи завершили детальную разработку данного метода [24, 25].

Согласно этой технологии растворы четырех типов нуклеотидов добавляются последовательно в процессе секвенирования фрагментов ДНК и отмываются после каждой реакции. При включении очередного нуклеотида в синтезируемую комплементарную цепь на подготовленной одноцепочечной ДНК-матрице происходит детекция высвобождающегося пирофосфата путем связывания его с белком люциферазой и в итоге получением светового сигнала. В течение реакции комплементарная цепь ДНК достраивается, а последовательность нуклеотидов определяется по световым сигналам в виде пиков на пирограмме, интенсивность которых пропорциональна количеству встроенных в цепь ДНК нуклеотидов одного вида из очередной реакционной смеси [23].

Простые химические реакции и надежная система детекции исключают необходимость использования в данном методе гелей, электрофореза и специфических флуоресцентных меток. Лидирующей в этом направлении корпорацией «Biotage АВ» разработан ряд систем, в частности «PyroMark Q96 ID»,

которая имеет высокую скорость определения последовательности ДНК (96 образцов за 1 ч) с точностью до 99 %. В приборе при пиросеквенировании реагенты вводятся головкой струйного принтера в лунки планшета с образцами, после чего не удаляются, а расщепляются специальным ферментом – апиразой [23]. Однако метод не позволяет качественно определить длину секвенированных фрагментов ДНК более 200 п.н., а также точно определить в последовательности ДНК число одиночных одинаковых нуклеотидов более 6 подряд. Таким образом, метод эффективен для быстрого определения большого числа коротких последовательностей (маркерных зон) ДНК и РНК, выявления единичных мутаций нуклеотидов, повторного секвенирования и т.д. При этом значительно снижается время и стоимость исследования в сравнении с капиллярным электрофорезом [17, 23].

Методы секвенирования ДНК нового поколения

Чтобы снизить стоимость процедуры секвенирования и увеличить ее производительность, в новых методах определения нуклеотидной последовательности ДНК проводится секвенирование миллионов ее фрагментов одновременно. Отличительной особенностью методов секвенирования ДНК нового поколения является их направленность на получение нуклеотидных последовательностей целых геномов различных организмов, включая человека.

На рис. 1 показана общая схема основных этапов процесса подготовки ДНК к секвенированию методами нового поколения. Первый этап представляет собой фрагментацию длинных молекул ДНК ультразвуком или ферментативной рестрикцией до размера 50–1000 п.н. Далее следует стадия обработки концов ДНК-фрагментов, в результате которой удаляются или достраиваются выступающие концы фрагментов, а затем лигируются адаптерные олигонуклеотиды. Затем полученная библиотека амплифицируется для увеличения представительности каждого фрагмента ДНК. Последний шаг – создание молекулярных колоний путем клональной амплификации каждого фрагмента библиотеки на твердой поверхности (подложка или микросфера). На этой стадии точное измерение концентрации библиотеки фрагментов ДНК является критическим, так как позволяет оптимизировать кластерную плотность, одновременно избегая ее переполнения на подложке. В случае микросфер добиваются того, что в каждой микрокапле с реак-

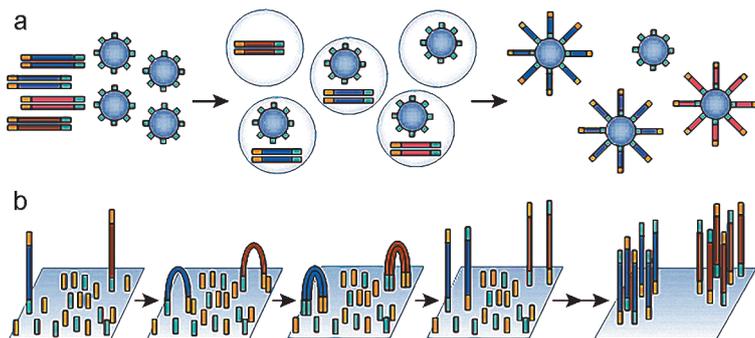


Рис. 1. Клональная амплификация секвенируемых фрагментов в методах NGS:

А – для платформ «GS FLX», «SOLiD» и «PGM» используется эмульсионная ПЦР на поверхности микросфериков. Каждый фрагмент ДНК с обоих концов имеет адаптеры. На поверхности каждой микросферы прикреплен один вид праймеров, которые комплементарны одному из адаптеров на концах фрагментов ДНК; Б – технология «Solexa» использует кластерную ПЦР на подложке, поверхность которой покрывают праймеры двух типов, соединенные с ней через линкеры. Продукты амплификации, происходящие от любого одиночного фрагмента ДНК из библиотеки, остаются локально расположенными около места синтеза и снова амплифицируются по соседству

ционной смесью в составе водно-масляной эмульсии содержится не более одной микросферы и одного фрагмента ДНК, способного с ней связаться комплементарно. Клональная амплификация необходима для усиления сигнала детектирующего присоединения к комплементарной цепи очередного нуклеотида, или сшивание праймера с зондом в процессе секвенирования (дотраивания комплементарной цепи ДНК по ее одноцепочечной матрице). После клональной амплификации сигнал будет поступать уже от многих сотен тысяч копий одного анализируемого фрагмента ДНК.

Подготовленная таким образом библиотека ДНК помещается в секвенатор, где стадии подачи реактивов для секвенирования чередуются со стадиями сканирования поверхности и регистрации получаемых сигналов [20, 33, 34].

Сейчас высококачественного секвенирования геномов (точностью 99,999 % и более) добиваются, как минимум, после 30-кратного «прочтения» их последовательностей, секвенирование полного генома человека в этом случае требует прочтения не менее 90 млрд пар оснований ДНК. Последние модели секвенаторов нового поколения могут выполнить секвенирование до шестнадцати полных геномов человека всего за один рабочий цикл [33].

Высокопроизводительное пиросеквенирование ДНК. В 2004 г. компания «454 Life Sciences» дополнила метод пиросеквенирования возможностями современных технологий. Основой модификации явилось использование эмульсионной ПЦР с одновременной параллельной подготовкой многих сотен тысяч фрагментов ДНК для их секвенирования [12, 16, 34].

После проведения всех предварительных этапов пробоподготовки каждый из четырех видов нуклеотидов, смешанный с другими реактивами для пиросеквенирования, подается последовательно в проточную камеру, куда помещается подложка, имеющая несколько миллиардов лунок, заполненных микросферами (одна лунка – одна микросфера). Каждая микросфера содержит на своей поверхности после эмульсионной ПЦР многие сотни тысяч копий одного из исходных ДНК-фрагментов. Если в лунку попадает тип нуклеотидов, который комплементарен очередному нуклеотиду в достраиваемой одноцепочечной цепи матрицы ДНК, то полимеразы встраивают эти нуклеотиды, что приводит через каскад реакций к высвобождению пирофосфата и генерации общего светового сигнала из лунки. Интенсивность сигнала из каждой лунки пропорциональна количеству нуклеотидов одного вида, встроенных в цепи ДНК за один проход реакционной смеси. Дно подложки находится в оптическом контакте с оптико-волоконным световодом, что позволяет регистрировать излучаемые фотоны со дна многих сотен тысяч лунок одновременно, в которых произошло встраивание очередного известного нуклеотида в достраиваемые комплементарные цепи ДНК в процессе пиросеквенирования [12, 16, 34].

Длина единичного фрагмента ДНК, секвенируемого методом высокопроизводительного пиросеквенирования, достигает 1000 п.н. с точностью до 99 %. Производительность секвенирования последней из моделей – «GS FLX Titanium XL+» близка к 1 млрд п.н. за один рабочий цикл с консенсусной точностью до 99,997 % (при 15-кратном прочтении) [12, 34].

Секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников. В 2005 г. компанией «Illumina» предложен метод секвенирования ДНК на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников, реализованный в виде платформы «Solexa» [6]. В этом методе фрагменты ДНК-матрицы фиксируют на подложке вместе с праймерами и проводят их амплификацию, в результате которой вокруг каждого исходного фиксированного фрагмента ДНК образуется около 1000 его копий. В целом на подложке образуются до миллиарда таких скоплений – кластеров (рис. 1, b) [1, 6, 33]. Далее ДНК денатурируют и проводят секвенирование ее одноцепочечных фрагментов. Для этого добавляют свободно плавающие праймеры и меченные флуоресцентными красителями разных цветов терминирующие нуклеотиды всех четырех типов, чтобы к каждому однонитевому фрагменту ДНК присоединился праймер и только 1 нуклеотид, цвет которого можно определить с помощью лазера. Затем присоединенный нуклеотид химически модифицируют, чтобы к нему мог присоединиться следующий терминирующий нуклеотид, таким образом, продолжают секвенс (дотраивание) комплементарной цепи, детектируя прибором флуоресценцию из многих сотен миллионов точек-кластеров одновременно [1, 33].

Длина единичного фрагмента ДНК, секвенируемого данным методом, достигает 300 п.н. с точностью 99 %. Последняя выпущенная компанией «Illumina» система секвенирования – «HiSeq X» за один цикл способна секвенировать до 16 полных геномов человека с 30-кратным перекрытием (1600 млрд п.н.) и консенсусной точностью до 99,999 % [33].

Циклическое лигазное секвенирование. В 2007 г. компанией «Applied Biosystems» (теперь входит в состав корпорации «Life Technologies») была представлена платформа «SOLiD» на основе технологии циклического лигазного секвенирования. В данном методе также используют эмульсионную ПЦР, после которой каждая из микросфер содержит на своей поверхности около миллиона копий одного из исходных ДНК-фрагментов. Затем фрагменты ДНК денатурируют и модифицируют по 3' концу, что позволяет ковалентно связать миллиарды микросфер, покрытых фрагментами ДНК, с подложкой. Затем следует процесс циклического лигазного секвенирования. К одноцепочечной матрице ДНК присоединяют праймер и добавляют синтезированные флуоресцентно меченные восьмичленные олигонуклеотидные зонды. Каждый зонд в позиции 1 и 2 содержит

два известных нуклеотида, которые в сочетании со следующими тремя основаниями должны иметь комбинацию последовательности, комплементарную соответствующим коротким фрагментам матрицы. Последние 3 основания, одинаковые (универсальные) для всех зондов, имеют на конце флуоресцентную метку. После того, как один из зондов комплементарно связывается с первыми пятью основаниями от праймера на одноцепочечной матрице ДНК, лигаза сшивает его с праймером. При этом метка детектируется и удаляется вместе с последними тремя универсальными нуклеотидами зонда. Затем происходит сшивание (лигирование) другого зонда, комплементарно соединившегося со следующими пятью основаниями, от зонда уже присоединенного ранее и так далее до конца матрицы ДНК. После чего построенная комплементарная цепь удаляется, а к матрице добавляется праймер, который смещен по месту посадки на один нуклеотид относительно посадки предыдущего праймера, и весь процесс достройки второй цепи методом лигирования повторяется. Для определения полной последовательности секвенируемого фрагмента нужно провести эту процедуру с пятью праймерами, каждый из которых смещен относительно предыдущего праймера по месту посадки на один нуклеотид [20].

Длина единичного фрагмента ДНК, секвенируемого методом лигирования, достигает 75 п.н. с точностью до 99,99 %. Выпущенный компанией «Applied Biosystems» прибор «5500xl SOLiD System» способен за один цикл секвенировать 3 полных генома человека с 30-кратным покрытием и точностью 99,9999 % [5].

Полупроводниковое секвенирование. В 2010 г. компания «Ion Torrent» (США) (теперь входит в состав корпорации «Life Technologies») представила метод секвенирования ДНК на полупроводниковом чипе (Semiconductor sequencing) [28]. Данный метод не требует модификации нуклеотидных оснований, хемилюминесцентных или флуоресцентных меток. Когда нуклеотид включается в комплементарную достраиваемую цепь ДНК полимеразой, происходит выделение водородного иона как побочного продукта, что изменяет рН реакционной смеси, определение этого изменения рН положено в основу детекции последовательности нуклеотидов ДНК при полупроводниковом секвенировании.

Пробоподготовка ДНК в данном методе практически не отличается от уже описанной для лигазного секвенирования. Проведение предварительной эмульсионной ПЦР здесь необходимо для усиления сигнала об изменении в значении рН. Это изменение рН в каждой отдельной лунке на чипе будет давать около миллиона копий одного из исходных ДНК-фрагментов, прикрепленных к поверхности микро-сферы. Для этого подготовленную таким образом библиотеку ДНК денатурируют и распределяют на микроэлектронный чип, имеющий миллионы микролунок (одна лунка – одна микро-сфера) с иончувствительной поверхностью, связанной с датчиками. Затем последовательно добавляют реакционные ПЦР смеси, отличающиеся по составу наличием в них только одного из 4 видов нуклеотидов, и детектируют изменение рН в лунках, где произошло встраивание этих нуклеотидов в комплементарные цепи ДНК-матриц. Основанный на данной технологии секвенатор «Personal Genome Machine» (PGM) в настоящее время за один цикл определяет до 2 млрд п.н., при этом длина единичного прочтения превышает 400 п.н. с точностью 99,5 %. Метод полупроводникового секвенирования быстро совершенствуется и за последние 2 года увеличил свою производительность в 100 раз [28]. Выпущенный новый прибор «Ion Proton» на основе данной технологии нацелен на секвенирование генома человека. В 2014 г. данная платформа за один цикл будет определять до 60 млрд п.н. [28].

Описанные системы секвенирования второго поколения значительно отличаются по производительности, стоимости и продолжительности рабочего цикла. По сочетанию всех этих параметров наиболее оптимальной для персонализации медицины выглядит система «HiSeq X», «NextSeq 500» и «Ion Proton», а для секвенирования бактериальных геномов – «MiSeq», или «PGM» (таблица).

Методы секвенирования новейшего поколения

Методы секвенирования третьего поколения (NNGS) призваны исправить основные недостатки методов второго поколения, а именно: сложную пробоподготовку, небольшую длину единичных прочтений, потребность в усилении сигнала от каждого из анализируемых фрагментов ДНК путем их амплификации, длительное время цикла, необходимость

Сравнительная характеристика NGS и NNGS секвенаторов (январь 2014 г.)

Характеризуемый показатель	Модели секвенаторов							
	NGS							NNGS
	GS Junior	FLX Ti+	MiSeq	HiSeq X	5500 xl	Ion Proton	PGM	PacBio RS
	Roche	Roche	Roche	Roche	Roche	Life Technologies	Life Technologies	Pacific Biosciences
Длина единичного «прочтения», п.н.	450	800	300	150	60	200	400	8500
Продолжительность этапа секвенирования, сут	0,42	0,42	0,3	3	7	0,17	0,3	0,1
Число секвенируемых нуклеотидов за цикл, млрд. п.н.	0,035	1	15	1600	180	10	2	6
Стоимость одного цикла (без приготовления библиотек), тыс. \$*	0,8	8	0,7	12	4	1,3	0,5	0,1

*Приблизительная стоимость одного цикла работы прибора в США (без приготовления библиотек).

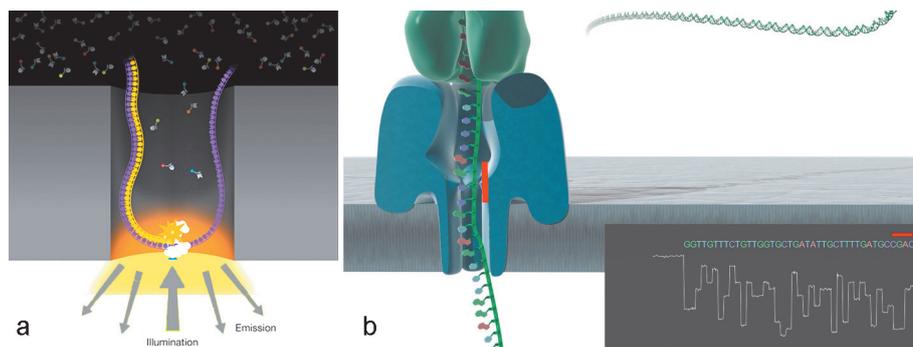


Рис. 2. Детекция сигнала при секвенировании:

А – на платформе «SMRT»; Б – по технологии «Oxford Nanopore»

многочисленного повторного секвенирования [8, 9, 19, 21, 32].

Технология секвенирования одной молекулы. В 2008 г. компания «Helicos BioSciences» впервые продемонстрировала на своем приборе метод секвенирования нуклеотидной последовательности единичных фрагментов ДНК без их предварительной амплификации [29]. Эта технология – «tSMS» (true Single Molecule Sequencing) обладает очень высокой чувствительностью, благодаря разработанному компанией сверхнизкому фоновому свечению поверхности подложки, реагентам для секвенирования и способу визуализации. Согласно новому методу, ДНК разделяется на небольшие фрагменты, и к одному из концов каждого фрагмента с помощью специального фермента прикрепляют длинную последовательность из молекул аденина, имеющую в конце светящуюся метку. На специальную подложку прикрепляют последовательности из молекул тимина на расстоянии, позволяющем анализировать каждый фрагмент по отдельности. Когда образцы распределяют на подложку, то происходит комплементарное связывание последовательностей из тимина, прикрепленных на ее поверхности, с адениновыми последовательностями, связанными с фрагментами ДНК. Далее подложка сканируется, и по свечению меток находят положение каждого присоединенного отрезка молекулы ДНК. Затем метку удаляют и добавляют по очереди каждый из четырех типов меченых нуклеотидов, детектируя свечение в местах связывания, после чего метки от присоединенных нуклеотидов удаляют и вводят следующий тип меченых нуклеотидов. Так, нуклеотид за нуклеотидом последовательность достраивается по комплементарной цепи ДНК, что позволяет секвенировать фрагменты длиной до 55 п.н. Компьютер записывает положение миллионов вспышек после каждой реакции. Такая система обеспечивает прочтение миллиардов нуклеотидов в сутки с точностью до 99,999 % при 20-кратном перекрытии [29]. Однако прибор, основанный на данной технологии («Heli Score»), получился слишком дорогим, расход реагентов высоким при малой длине чтения нуклеотидных последовательностей. В ноябре 2012 г. компания «Helicos Bioscience» была признана банкротом и прекратила свое существование.

Секвенирование единичных молекул в реальном времени. В 2009 г. был представлен метод секвениро-

вания «Single Molecule RealTime» (SMRT), разработанный компанией «Pacific Biosciences». Секвенатор этой компании позволяет «читать» каждый фрагмент ДНК десятки раз, при этом консенсусная точность определения его нуклеотидной последовательности достигает 99,9 %. Технология данного метода основана на секвенировании в реальном времени единичных фрагментов ДНК длиной до 10000 п.н. и более с помощью ДНК-полимеразы [32]. На дно специальных ячеек, расположенных на прозрачном стекле, прикрепляются одиночные молекулы ДНК-полимеразы. Область вокруг закрепленного фермента просвечивается с помощью специального лазера. В каждую ячейку добавляют нуклеотиды всех четырех типов, помеченные разными светящимися маркерами. Область, которую анализирует лазер, столь мала, что меченые нуклеотиды не задерживаются в ней достаточно долго, чтобы их свечение было зафиксировано прибором. Если же ДНК-фрагмент удерживается полимеразой, то во время достройки его комплементарной цепи сигнал от каждого присоединившегося нуклеотида фиксируется в сканируемой области. После присоединения очередного нуклеотида его светящаяся метка удаляется (рис. 2, а). Прибор «PacBio RS», основанный на этой технологии, имеет высокую собственную стоимость, но в то же время экспрессную пробоподготовку, высокую скорость и низкую стоимость секвенирования ДНК (таблица).

Секвенирование через нанопоры. Возможность использовать матрицы с нанопорами для быстрого секвенирования ДНК исследуется уже более 15 лет в научных центрах Европы и США [7, 8, 9, 18, 19, 21]. Нанопоры представляют собой нано-отверстия, которые могут быть биологическими, например порообразующий белок в мембране как липидный бислой, или твердотельными (из таких синтетических материалов, как нитрид кремния или графен). При секвенировании через нанопоры используется физическое различие между нуклеотидными основаниями для их идентификации в молекуле ДНК. Отрицательно заряженный одноцепочечный фрагмент ДНК длиной в несколько тысяч нуклеотидов протягивают через пору в мембране диаметром 2–5 нм, регистрируя изменение электропроводности нанопоры при помощи электродов по мере поочередного прохождения через нее нуклеотидов. Каждому типу основания соот-

ветствует свое изменение электропроводности из-за различия между ними по размерам, поэтому они закрывают пору в большей или меньшей степени и на разную продолжительность. Соответственно этому изменяется и электропроводность (рис. 2, б). Однако данная технология имеет, по крайней мере, два серьезных технических препятствия для реализации: отсутствие надежного подхода к контролю продвижения ДНК через нанопоры и технические трудности в создании достаточно малых датчиков [9].

В одном из вариантов для замедления прохождения фрагмента ДНК через нанопоры на его конец крепят магнитную микросферу. Чтобы тянуть молекулу за микросферу, используют магнит, включенное электрическое поле в то же время тянет ДНК в противоположную сторону, затягивая ее в отверстие нанопоры. Таким образом, скорость движения ДНК через нанопоры определяется балансом этих сил. При этом чтение последовательности нуклеотидов происходит со скоростью в сотни тысяч раз быстрее, по сравнению со стандартными методами секвенирования. Секвенирование генома человека займет в этом случае всего 20 ч, поскольку многократной амплификации матрицы не понадобится [21].

Другой предложенный фирмой «IBM» вариант технологии – «ДНК Транзистор», использует многослойную (диэлектрик-металл) мембрану. Изменение напряжения между адресными слоями металла в мембране создает электрические поля внутри нанопор, циклически включая и выключая которые можно двигать ДНК через нанопоры с шагом в один нуклеотид за цикл, улавливая датчиками разницу между возможными четырьмя вариантами оснований [9].

Существуют также другие варианты реализации секвенирования ДНК через нанопоры, но в настоящее время научно-исследовательские разработки нанопорных секвенаторов находятся на опытно-конструкторской стадии [13, 27, 30].

Недавно компания «Oxford Nanopore Technologies» заявила о том, что практически доработала технологию секвенирования на основе нанопор до ее коммерческого аппаратного воплощения. Выход первых нанопорных секвенаторов данной компании под названием «GridION» и «MinION» может состояться уже в 2015 г. Уровень ошибок данной технологии составит 0,1–1 %, а длина читаемых единичных фрагментов ДНК достигнет многих десятков тысяч нуклеотидов [22]. Это будет очередным прорывом в области секвенирования ДНК, так как время, затрачиваемое на данный процесс, и его стоимость уменьшатся на порядок.

На сегодняшний день из практически реализованных методов секвенирования третьего поколения функционирует только платформа «SMRT» (Pacific Biosciences). Вероятно, через несколько лет метод секвенирования ДНК через нанопоры станет доминирующим и вытеснит практически используемые методы второго поколения.

Таким образом, классические, новые и новейшие

методы секвенирования направлены на выполнение разноплановых задач, связанных с определением нуклеотидной последовательности ДНК. Методы секвенирования третьего поколения могут в ближайшее время заменить своих предшественников, в том числе стать практической альтернативой и для классических методов секвенирования ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скрябин К.Г., Прохорчук Е.Б., Мазур А.М., Булыгина Е.С., Цыганкова С.В., Недолужко А.В., Расторгуев С.М., Матвеев В.Б., Чеканов Н.Н., Горанская Д.А., Теслюк А.Б., Груздева Н.М., Валихов В.Е., Заридзе Д.Г., Ковальчук М.В. Комбинирование двух технологических платформ для полногеномного секвенирования человека. *Acta Naturae*. 2009; 3:113–9.
2. Степухович А., Цуприк А., Кособова О., Гаврилов Д., Горбовицкий Б., Гудков Г., Тышко Г., Черевикшик М., Горфинкель В. Анализ капиллярно-электрофоретических систем секвенирования ДНК. *Журн. технической физики*. 2008; 78(6):90–102.
3. Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК. М.: Наука; 1999. 428 с.
4. 3730x/ DNA Analyzer. [Internet] Life Technologies [cited 27 Jan 2014]. Available from: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601642&tab=TechSpec>
5. 5500 Series Genetic Analysis Systems. [Internet] Life Technologies 2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems.html>
6. Bennett S.T., Barnes C., Cox A., Davies L., Brown C. Toward the 1,000 dollars human genome. *Pharmacogenomics*. 2005; 6(4):373–82.
7. Deamer D.W., Akeson M. Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends Biotechnol.* 2000; 18(4):147–51.
8. DNA sequencing (solid state nanopores). [Internet] Oxford Nanopore Technologies 2008–2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.nanoporetech.com/sections/index/81>
9. DNA Transistor. [Internet] IBM [cited 27 Jan 2014]. Available from: http://researcher.watson.ibm.com/researcher/view_project.php?id=1120
10. GE Healthcare / Amersham Biosciences MegaBACE 4500 DNA Analysis System. [Internet] Artisan Technology Group [cited 27 Jan 2014]. Available from: http://www.artisanag.com/Scientific/70238-1/GE_Healthcare_Amersham_Biosciences_MegaBACE_4500_DNA_Analysis_System
11. GenomeLab GeXP Genetic Analysis System. [Internet] Beckman Coulter, Inc. [2000–2014, cited 27 Jan 2014]. Available from: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/capillary-electrophoresis/genom-elab-gexp-genetic-analysis-system/index.htm?i=A26572>
12. GS FLX+ System. [Internet] 454 sequencing. Roche Diagnostics Corporation 1996–2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://my454.com/products/gx-flx-system/index.asp>
13. He H., Scheicher R.H., Pandey R., Rocha A.R., Sanvito S., Grigoriev A., Ahuja R., Karna S.P. Functionalized nanopore-embedded electrodes for rapid DNA sequencing. *J. Phys. Chem. C*. 2008; 112(10):3456–9.
14. Hyman E.D. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem*. 1988; 174(2):423–36.
15. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409:860–921.
16. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005; 437:376–80.
17. Montero C.I., Shea Y.R., Jones P.A., Harrington S.M., Tooke N.E., Witebsky F.G., Murray P.R. Evaluation of Pyrosequencing Technology for the Identification of Clinically Relevant Non-Dematiaceous Yeasts and Related Species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(9):821–30.
18. Nanopore Method Could Revolutionize Genome Sequencing. [Internet] Official web page of the University of California, San Diego [2006 Apr 6, cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://ucsdnews.ucsd.edu/newsrel/science/sfastdna.asp>
19. Nanopore Sequencing. [Internet] Harvard University [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.mcb.harvard.edu/branton/>
20. Overview of SOLiD™ Sequencing Chemistry. [Internet] Life Technologies 2013 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems/solid-sequencing-chemistry.html>
21. Peng H., Ling X.S. Reverse DNA translocation through a solid-state nanopore by magnetic tweezers. *Nanotechnology*. 2009;

20:185101.

22. Press releases. [Internet] Oxford Nanopore Technologies 2008–2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <https://www.nanoporetech.com/news/press-releases>

23. PyroMark Q96 ID. [Internet] QIAGEN 2013 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.qiagen.com/products/catalog/automated-solutions/pyrosequencing/pyromark-q96-id>

24. Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res.* 2001; 11:3–11.

25. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlén M., Nyren P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal. Biochem.* 1996; 242(1):84–9.

26. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12):5463–7.

27. Schneider G.F., Kowalczyk S.W., Calado V.E., Pandraud G., Zandbergen H.W., Vandersypen Lieven M.K., Dekker C. DNA Translocation through Graphene Nanopores. *Nano Lett.* 2010; 10(8):3163–7.

28. Semiconductor Sequencing Technology [Internet]. Life Technologies Corporation; 2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Sequencing/Semiconductor-Sequencing/Semiconductor-Sequencing-Technology.html>

29. Sequencing single molecules of DNA. *Nature*. Published online 3 April 2008 [cited 27 Jan 2014]. doi: 10.1038/news.2008.735. Available from: <http://www.nature.com/news/2008/080403/full/news.2008.735.html>

30. Singer A., Wanunu M., Morrison W., Kuhn H., Frank-Kamenetskii M., Meller A. Nanopore Based Sequence Specific Detection of Duplex DNA for Genomic Profiling. *Nano Lett.* 2010; 10:738–42.

31. Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B., Hood L.E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986; 321(6071):674–9.

32. SMRT technology. [Internet] Pacific Biosciences of California, Inc. 2010 – 2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.pacificbiosciences.com/products/smrt-technology>

33. Systems / Sequencing Systems. [Internet]. Illumina, Inc.; 2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.illumina.com/systems/sequencing.ilmm>

34. The Technology. [Internet] 454 sequencing. Roche Diagnostics Corporation 1996–2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://454.com/products-solutions/how-it-works/index.asp>

References

1. Skryabin K.G., Prokhorchuk E.B., Mazur A.M., Bulygina E.S., Tsygankova S.V., Nedoluzhko A.V., Rastorguev S.M., Matveev V.B., Chekanov N.N., Goranskaya D.A., Teslyuk A.B., Gruzdeva N.M., Velikhov V.E., Zaridze D.G., Koval'chuk M.V. [Combining two technologies for full genome sequencing of human]. *Acta Naturae.* 2009; 3:113–9.

2. Stepankovich A., Tsuprik A., Kosobokova O., Gavrillov D., Gorbovitsky B., Gudkov G., Tyshko G., Cherevishnik M., Gorfinkel' V. [Analysis of capillary-electrophoretic DNA sequencing systems]. *Zh. Tekhnich. Fiziki.* 2008; 78(6):90–102.

3. Chemeris A.V., Akhunov E.D., Vakhitov V.A. [DNA Sequencing]. M.: Nauka; 1999. 428 p.

4. 3730xl DNA Analyzer. [Internet] Life Technologies [cited 27 Jan 2014]. Available from: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/advert/ab?cmd=catNavigate2&catID=601642&tab=TechSpec>

5. 5500 Series Genetic Analysis Systems. [Internet] Life Technologies 2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems.html>

6. Bennett S.T., Barnes C., Cox A., Davies L., Brown C. Toward the 1,000 dollars human genome. *Pharmacogenomics.* 2005; 6(4):373–82.

7. Deamer D.W., Akeson M. Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends Biotechnol.* 2000; 18(4): 147–51.

8. DNA sequencing (solid state nanopores). [Internet] Oxford Nanopore Technologies 2008–2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.nanoporetech.com/sections/index/81>

9. DNA Transistor. [Internet] IBM [cited 27 Jan 2014]. Available from: http://researcher.watson.ibm.com/researcher/view_project.php?id=1120

10. GE Healthcare / Amersham Biosciences MegaBACE 4500 DNA Analysis System. [Internet] Artisan Technology Group [cited 27 Jan 2014]. Available from: http://www.artisanng.com/Scientific/70238-1/GE_Healthcare_Amersham_Biosciences_MegaBACE_4500_DNA_Analysis_System

11. GenomeLab GeXP Genetic Analysis System. [Internet] Beckman Coulter, Inc. [2000–2014, cited 27 Jan 2014]. Available from: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/capillary-electrophoresis/genomelab-geXP-genetic-analysis-system/index.htm?i=A26572>

12. GS FLX+ System. [Internet] 454 sequencing. Roche Diagnostics Corporation 1996–2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://my454.com/products/gs-flx-system/index.asp>

13. He H., Scheicher R.H., Pandey R., Rocha A.R., Sanvito S., Grigoriev A., Ahuja R., Karna S.P. Functionalized nanopore-embedded electrodes for rapid DNA sequencing. *J. Phys. Chem. C.* 2008; 112(10):3456–9.

14. Hyman E.D. A new method of sequencing DNA. *Anal. Biochem.* 1988; 174(2):423–36.

15. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409:860–921.

16. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005; 437:376–80.

17. Montero C.I., Shea Y.R., Jones P.A., Harrington S.M., Tooke N.E., Witebsky F.G., Murray P.R. Evaluation of Pyrosequencing Technology for the Identification of Clinically Relevant Non-Dematiaceous Yeasts and Related Species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(9):821–30.

18. Nanopore Method Could Revolutionize Genome Sequencing. [Internet] Official web page of the University of California, San Diego [2006 Apr 6, cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://ucsdnews.ucsd.edu/newsrel/science/sfastdna.asp>

19. Nanopore Sequencing. [Internet] Harvard University [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.mcb.harvard.edu/branton/>

20. Overview of SOLiD™ Sequencing Chemistry. [Internet] Life Technologies 2013 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.applied-biosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems/solid-sequencing-chemistry.html>

21. Peng H., Ling X.S. Reverse DNA translocation through a solid-state nanopore by magnetic tweezers. *Nanotechnology.* 2009; 20:185101.

22. Press releases. [Internet] Oxford Nanopore Technologies 2008–2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <https://www.nanoporetech.com/news/press-releases>

23. PyroMark Q96 ID. [Internet] QIAGEN 2013 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.qiagen.com/products/catalog/automated-solutions/pyrosequencing/pyromark-q96-id>

24. Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res.* 2001; 11:3–11.

25. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlén M., Nyren P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal. Biochem.* 1996; 242(1):84–9.

26. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12):5463–7.

27. Schneider G.F., Kowalczyk S.W., Calado V.E., Pandraud G., Zandbergen H.W., Vandersypen Lieven M.K., Dekker C. DNA Translocation through Graphene Nanopores. *Nano Lett.* 2010; 10(8):3163–7.

28. Semiconductor Sequencing Technology [Internet]. Life Technologies Corporation; 2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Sequencing/Semiconductor-Sequencing/Semiconductor-Sequencing-Technology.html>

29. Sequencing single molecules of DNA. *Nature*. Published online 3 April 2008 [cited 27 Jan 2014]. doi: 10.1038/news.2008.735. Available from: <http://www.nature.com/news/2008/080403/full/news.2008.735.html>

30. Singer A., Wanunu M., Morrison W., Kuhn H., Frank-Kamenetskii M., Meller A. Nanopore Based Sequence Specific Detection of Duplex DNA for Genomic Profiling. *Nano Lett.* 2010; 10:738–42.

31. Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B., Hood L.E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986; 321(6071):674–9.

32. SMRT technology. [Internet] Pacific Biosciences of California, Inc. 2010 – 2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.pacificbiosciences.com/products/smrt-technology>

33. Systems / Sequencing Systems. [Internet]. Illumina, Inc.; 2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://www.illumina.com/systems/sequencing.ilmm>

34. The Technology. [Internet] 454 sequencing. Roche Diagnostics Corporation 1996–2014 [cited 27 Jan 2014]. Available from: <http://454.com/products-solutions/how-it-works/index.asp>

Authors:

Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Cherkasov A.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шаранова Н.А., Черкасов А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 26.03.12.