ЗАНЯТИЕ № 13 (Семинарское).

**Тема: Методы секвенирования.**

**Основные вопросы, выносимые на обсуждение семинара.**

1. «Плюс-минус» метод.
2. Метод «обрыва цепи».
3. Компоненты реакционных смесей и их функции.
4. Анализ данных Сэнгеровского секвенирования.
5. Принцип массового параллельного секвенирования.
6. Метод пиросеквенирования.
7. Полупроводниковое секвенирование.
8. Анализ данных массового параллельного секвенирования.

**Краткое содержание занятия:**

Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. sequentum — последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generation sequencing) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сенгеру. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК, получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов.

**Секвенирование ДНК по Сенгеру.**

Первым методом прямого ферментативного секвенирования ДНК стал метод, предложенный Ф. Сэнгером и Д. Коулсоном в 1975 г.

В качестве матрицы в реакции полимеразного копирования использовался одноцепочечный фрагмент ДНК. В качестве праймеров - синтетические олигонуклеотиды или природные субфрагменты, получаемые при гидролизе рестрицирующими эндонуклеазами, а в качестве фермента - фрагмент Кленова ДНК полимеразы I (PolI) из E.coli (*большой белковый фрагмент, образующийся при ферментативном расщеплении ДНК-полимеразы I из Escherichia coli протеазой субтилизином*).



Метод включал два этапа. Сначала в ограниченных условиях проводили полимеразную реакцию в присутствии всех четырех типов dNTP (один из них был мечен по альфа-положению фосфата), получая на выходе набор продуктов неполного копирования матричного фрагмента. Смесь очищали от несвязавшихся дезоксинуклеозидтрифосфатов и делили на восемь частей. После чего в "плюс" системе проводили четыре реакции в присутствии каждого из четырех типов нуклеотидов, а в "минус" системе - в отсутствие каждого из них. В результате, в "минус" системе терминация происходила перед dNTP данного типа, а в "плюс" системе - после него. Полученные таким образом восемь образцов разделяли с помощью электрофореза, "считывали" сигнал и определяли последовательность исходной ДНК. Этим способом была секвенирована короткая ДНК фага фХ174, состоящая из 5386 нуклеотидных пар.

**Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод "терминаторов"**

В 1977 г. автор "плюс-минус" метода предложил еще один способ ферментативного секвенирования, получивший название метода терминирующих аналогов трифосфатов. Более мощный и более технологичный, этот способ, несколько модифицированный, применяется до сих пор. В основе метода тоже лежало ферментативное копирование с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I из E.coli. В качестве праймеров использовали синтетические олигонуклеотиды. Специфическую терминацию синтеза обеспечивали добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP (один из которых был радиоактивно мечен по альфа положению фосфата) еще и одного из 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), который способен включаться в растущую цепь ДНК, но не способен обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы.  Отношение концентраций dNTP/ddNTP авторы подбирали экспериментально, так, чтобы в итоге получить набор копий ДНК различной длины. Таким образом, для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК требовалось провести четыре реакции копирования: по одному типу терминаторов в каждой из реакций. После этого полученные продукты разгонялись в полиакриламидном геле на соседних дорожках и по расположению полос определялась последовательность нуклеотидов.

Пиросеквенирование

С попыткой создать технику быстрого чтения ДНК познакомил своих читателей журнал Nature (2005, т. 437, с. 376–380). Метод секвенирования описали несколько десятков авторов под руководством Марселя Маргулиса и Майкла Эгхольма (Marcel Margoulies, Michael Egholm) из «454 Life Science Corporation» в Коннектикуте. Кроме этой компании в работе участвовали Калифорнийский университет, Рокфеллеровский университет и Ротберговский институт детских болезней. Имя Джонатана М. Ротберга в списке авторов стоит последним (как фамилия руководителя работы), тем не менее новый метод называют «секвенированием по Ротбергу».

Берется образец ДНК, которую надо прочитать. Специальные ферменты нарезают его на кусочки случайным образом, и кусочки эти изолируют друг от друга предельным разведением. К каждому кусочку прикрепляют адапторную нуклеотидную последовательность, которая, в свою очередь, заякоривается на маленькой бусинке (средний диаметр — 28 микрометров). К одной бусинке прикрепляется только один фрагмент. Затем бусины попадают в капельки водной эмульсии в масле. В этих капельках содержится все необходимое для амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР): каждая капелька — это отдельный реакционный сосуд, в котором копируется один и только один фрагмент ДНК. Как сказал журналистам сам Ротберг, при традиционном для метода Сэнгера клонировании фрагменты ДНК изолируют и наращивают в бактериальных клетках, а здесь роль клеток играют капельки эмульсии. После ПЦР к каждой бусинке прицепляется около 10 млн. копий индивидуального фрагмента. Эмульсию разрушают, и бусинки, обросшие ДНК, центрифугированием загоняют в реакционные сосуды — открытые сверху микроскопические соты (диаметр каждой ячейки 44 микрометра, объем — 75 пиколитров). Соты размещены на волоконно-оптической подложке — квадратике размером 6 на 6 см, который несет на себе примерно 1,6 миллиона ячеек. Если бусина попадет не в каждый «колодец», это даже хорошо: меньше будет вероятность ложных сигналов.

Ферменты, как и ДНК, тоже прицеплены к бусинам, которые не вымываются из ячеек, а остаются на местах, как камешки на дне ручья, удерживая ферменты и матрицу, нуклеотиды же сменяют друг дружку. Пришел аденин — во всех сотах, где к цепочкам присоединяется А, вспыхивают огоньки, а остальные, ожидающие Т, G или С, остаются темными, пока не настанет их очередь. А дальше — дело техники. Оптические волокна передают вспышки на сенсорное устройство, компьютер записывает букву за буквой сразу в сотне тысяч последовательностей.

Для публикации в Nature отсеквенировали геном бактерии Mycoplasma genitalium (580,069 н. п.). ДНК микроорганизма нарезали на кусочки средней длиной 110 оснований, автоматизированная реакция (42 цикла по 4 нуклеотида) заняла всего 4 часа. Исследователи прочитали 96,5% генома микоплазмы с сорокакратным перекрыванием. Точность прочтения составила 99,96% (для апробации метода, естественно, выбрали уже известный геном, чтобы было с чем сравнивать). Удовлетворительные результаты были получены и с более крупным геномом Streptococcus pneumoniae (2,1 млн. н. п.).

**Секвенирование с использованием нанопор**

Ученые из Калифорнийского университета, Сан-Диего (UCSD) изобрели технику быстрого секвенирования ДНК с помощью нанопор. Наносеквенатор может быть доступен любым здравоохранительным учреждениям, так как стоимость у готового устройства будет невелика. Как утверждают ученые, это поможет ускорить появление геномной медицины, направленной на лечение генетических болезней отдельно взятого человека, исходя из его дефектов в ДНК.

В статье, опубликованной в Nano Letters, описывается метод секвенирования человеческого генома, занимающий несколько часов. При этом устройство для секвенирования на основе нанопор будет недорогим, его смогут приобрести практически любые медицинские учреждения. Сам метод состоит в изменении электрического потенциала при прохождении ДНК через нанопору.

Секвенирование ДНК отдельно взятого человека с помощью современной техники займет несколько месяцев и будет стоить миллионы долларов, что, естественно, не позволяет детально исследовать геном пациентов и на его основе лечить генетические болезни. Если же появится устройство быстрого секвенирования, то анализ ДНК может вполне быть обычной клинической процедурой, как, например, анализ крови. Естественно, подобная практика совершит революцию в медицине.

«Одно из потенциальных применений ДНК-нанопор – в диагностике генетических заболеваний. Мы можем оснастить канал различными протеинами, которые при взаимодействии с ДНК, находящейся в нем, будут изменять силу протягивания биомолекулы. По величине этой силы можно говорить о каких-либо отклонениях от нормы в молекуле и, соответственно, выделять ее поврежденные участки. Возможно, что таким образом можно будет лечить различные генетические заболевания», – говорит Максимилиано Ди Вентра, профессор физики при UCSD.

Ди Вентра и его коллеги перед началом работы над нано-секвенаторами провели предварительное математическое моделирование электрических флюктуаций различных оснований ДНК (аденина, цитозина, гуанина и тимина). Далее они провели комплексный расчет наноструктуры, состоящей из окруженной золотыми электродами нанопоры диаметром 1 нанометр, находящейся в подложке из нитрида кремния, и молекулы ДНК, находящейся непосредственно в канале нанопоры.

Результаты показали, что каждая пара оснований ДНК имеет свою неповторимую электрическую «подпись», которую можно идентифицировать, приложив напряжение на золотые электроды нанопоры в то время, как ДНК будет находиться в ней.

Предыдущие попытки создать подобный секвенатор (например, учеными из Иллинойского университета, которые создали полноценный ДНК-чип) не увенчались успехом из-за высокого уровня шума сигналов, полученных от ДНК. Шум, в свою очередь, был вызван изгибом и скручиванием молекулы в нанопоре из-за высокого приложенного напряжения.

В новом типе секвенатора ученые так скоординировали электроды, что электрический ток проходит не вдоль ДНК, а поперек, что заметно снижает электродинамические флюктуации молекулы, что позволяет свести «паразитный шум» к минимуму.

«Мы разрабатывали устройство, способное записывать последовательности нуклеотидов ДНК по мере того, как биомолекула проходит через тонкую пору в специальной мембране из нитрида кремния, – продолжает объяснять Ди Вентра. – Чем меньше диаметр нанопоры, тем точнее мы можем управлять положением в ней молекулы, и, соответственно, наши шансы на прочтение последовательности нуклеотидов увеличиваются. Однако ДНК не хочет, чтобы ее секвенировали, поэтому флюктуации будут все время повторяться по мере того, как молекулу будут протягивать через нанопору. А измеренный ток не дает полной информации о том, какая из баз находится на каком месте. Но нам удалось упорядочить процесс «протаскивания» ДНК через пору, этим мы избавили себя от необходимости точно идентифицировать базы – мы просто записываем их точную последовательность». Конечно, изготовить массово наносеквенаторы пока очень трудно – нанопоры такого размера и золотые электроды ученые изготавливали «вручную» долгое время. Но они не сомневаются в том, что вскоре технология массового производства матриц с нанопорами будет налажена, и врачи получат бесценный инструмент для лечения генетических заболеваний. «Быстрый секвенатор» может быть доступен любым здравоохранительным учреждениям, так как стоимость у готового устройства будет невелика. «Предложенный нами метод секвенирования ДНК получает информацию о биомолекуле с гораздо меньшим количеством ошибок. Например, метод Сэнгера, которым пользуются сейчас, не дает такой точности». Работа ученых поддержана Национальным Научным обществом, Национальным Институтом Геномики и Национальным Институтом Здоровья США. Ранее, в 2004 Национальным Научным обществом США была запущена программа по исследованию альтернативных недорогих методов секвенирования ДНК, которые позволят получить полную информацию о геноме человека всего за $1000. Как говорят коллеги калифорнийских ученых, они сделали большой шаг навстречу этой цели. «Мы выбрали новый подход для решения этой проблемы, – говорит Ди Вентра. – Для нас ДНК – набор атомов, которые необходимо проанализировать. И у нас это получилось».