

Полимеразная цепная реакция как инструмент современной биотехнологии

Л.И. Патрушев

*Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
г. Москва*

Кари Б. Муллис (Kary B. Mullis) – изобретатель полимеразной цепной реакции (ПЦР)

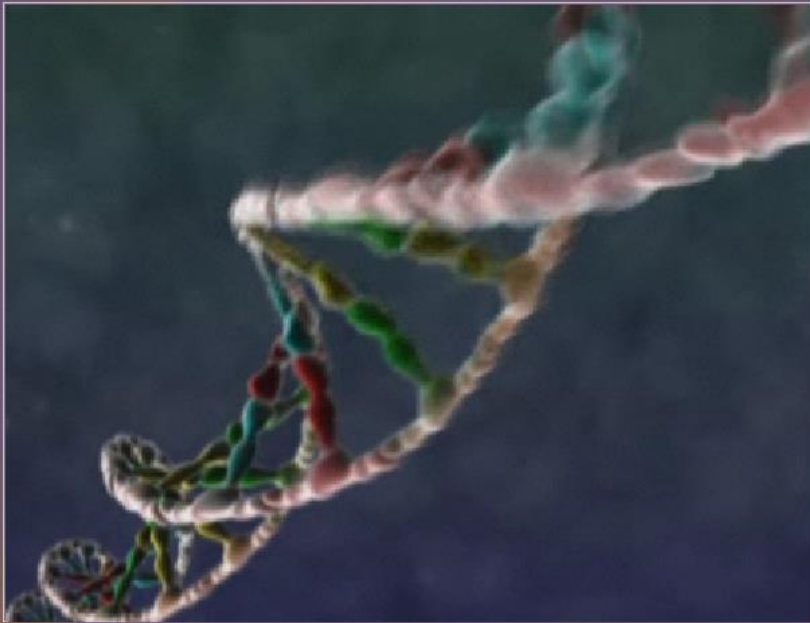


- Американский биохимик 1944 г.р.
- Патент - 1985 г., фирма Cetus Corp. California
- Нобелевская премия по химии – 1993 г.



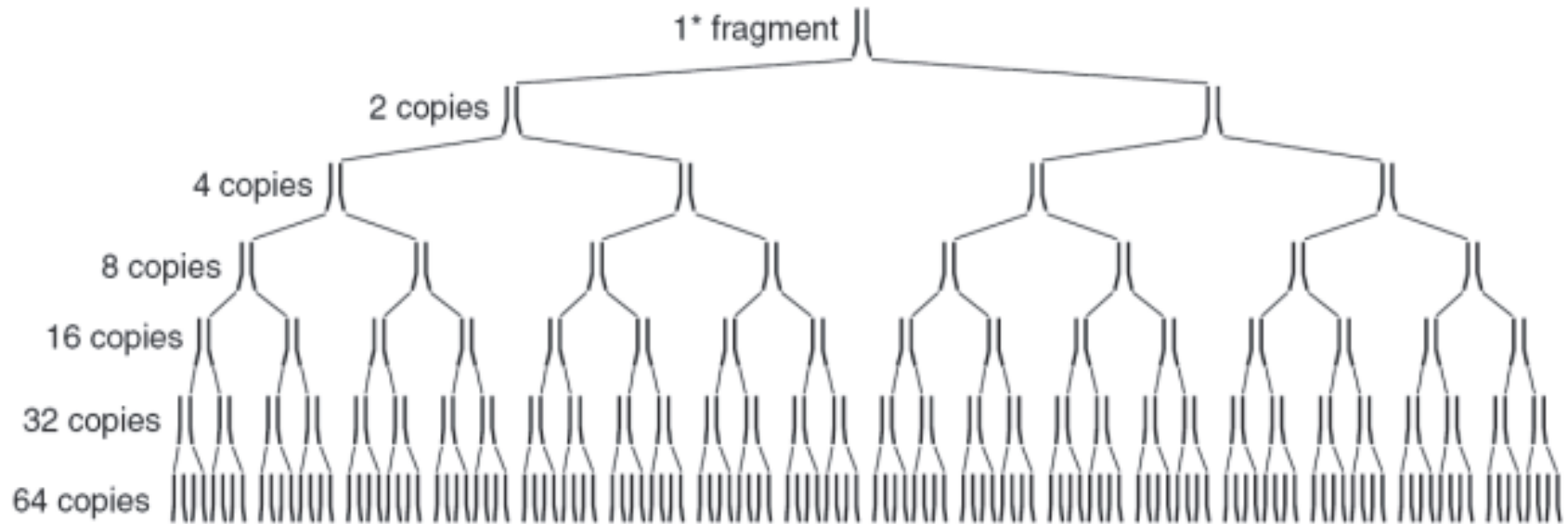
[HOME](#) | [BIOGRAPHY](#) | [PCR](#) | [ALTERMUNE](#) | [SCIENCE](#) | [BOOKS](#) | [LECTURES](#) | [CONTACT](#)







ПЦР как молекулярная копировальная машина («молекулярный ксерокс»)



■ После 6 циклов ПЦР образуется 64 идентичных копии исходного генетического локуса (ампликона)

Полимеразная цепная реакция: 1-й цикл

Cycle 1

DNA Sample

Denaturation

Strands separate

Priming

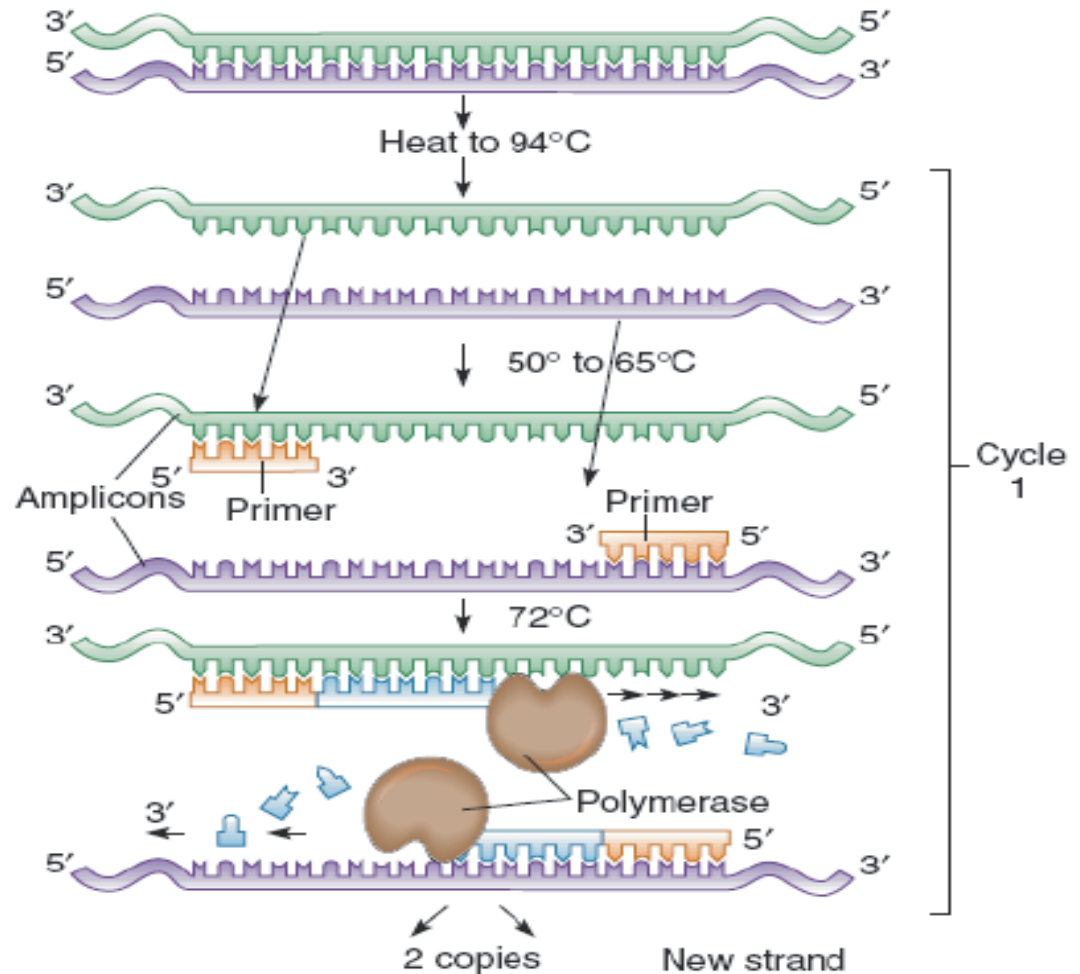
Oligonucleotide primers attach at ends of strands to promote replication of amplicons

Extension

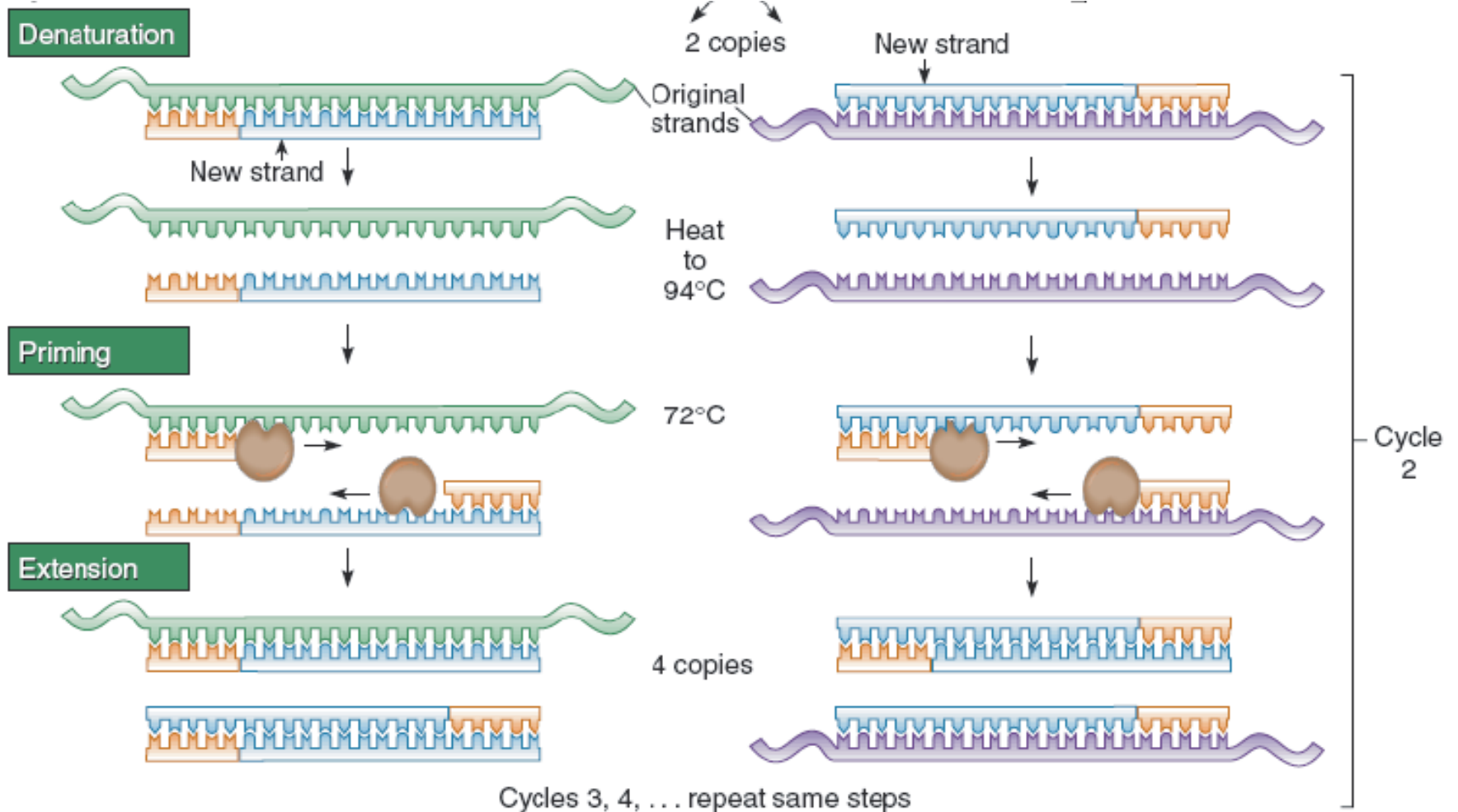
DNA polymerase synthesizes complementary strand

Cycle 2

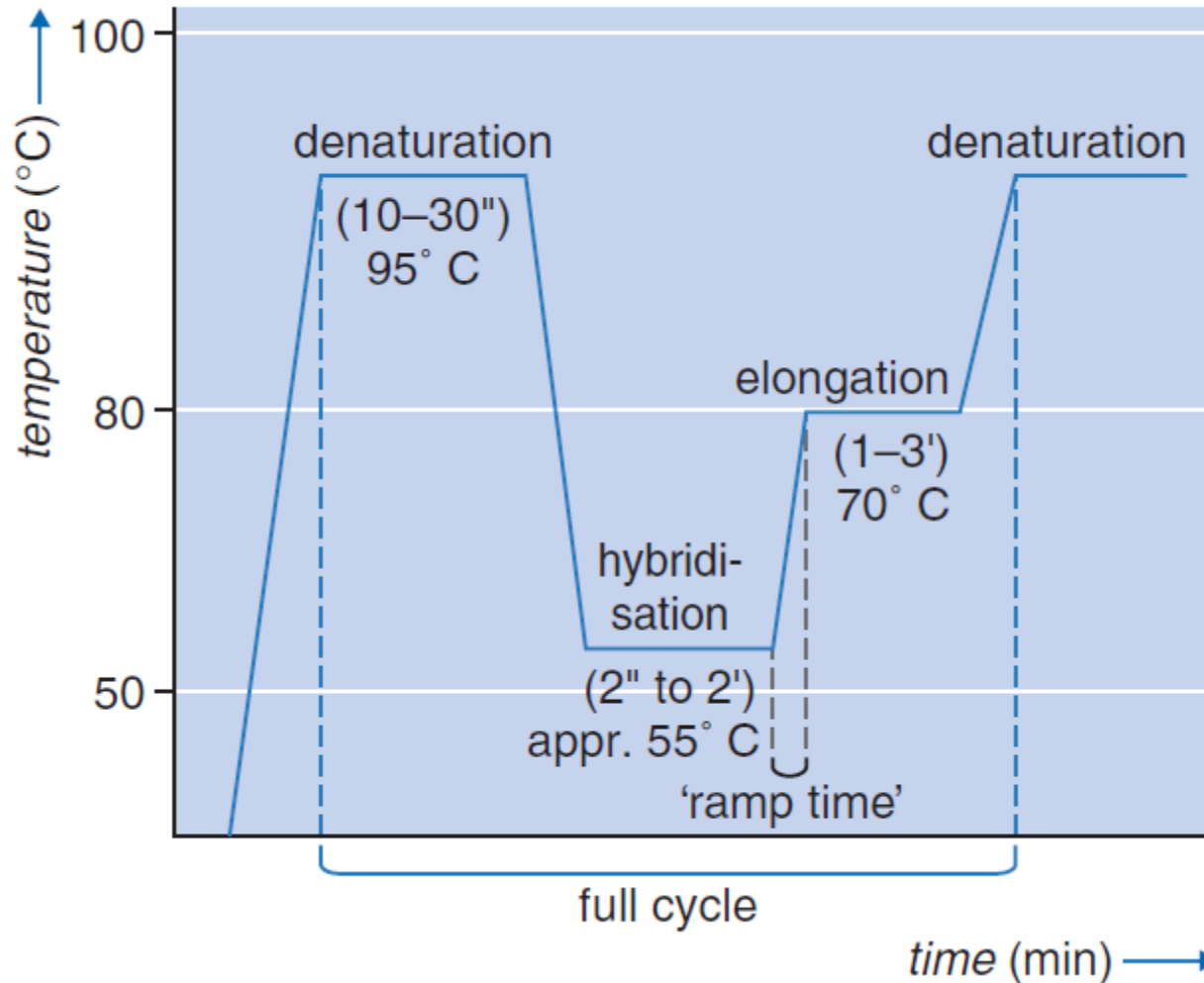
Denaturation



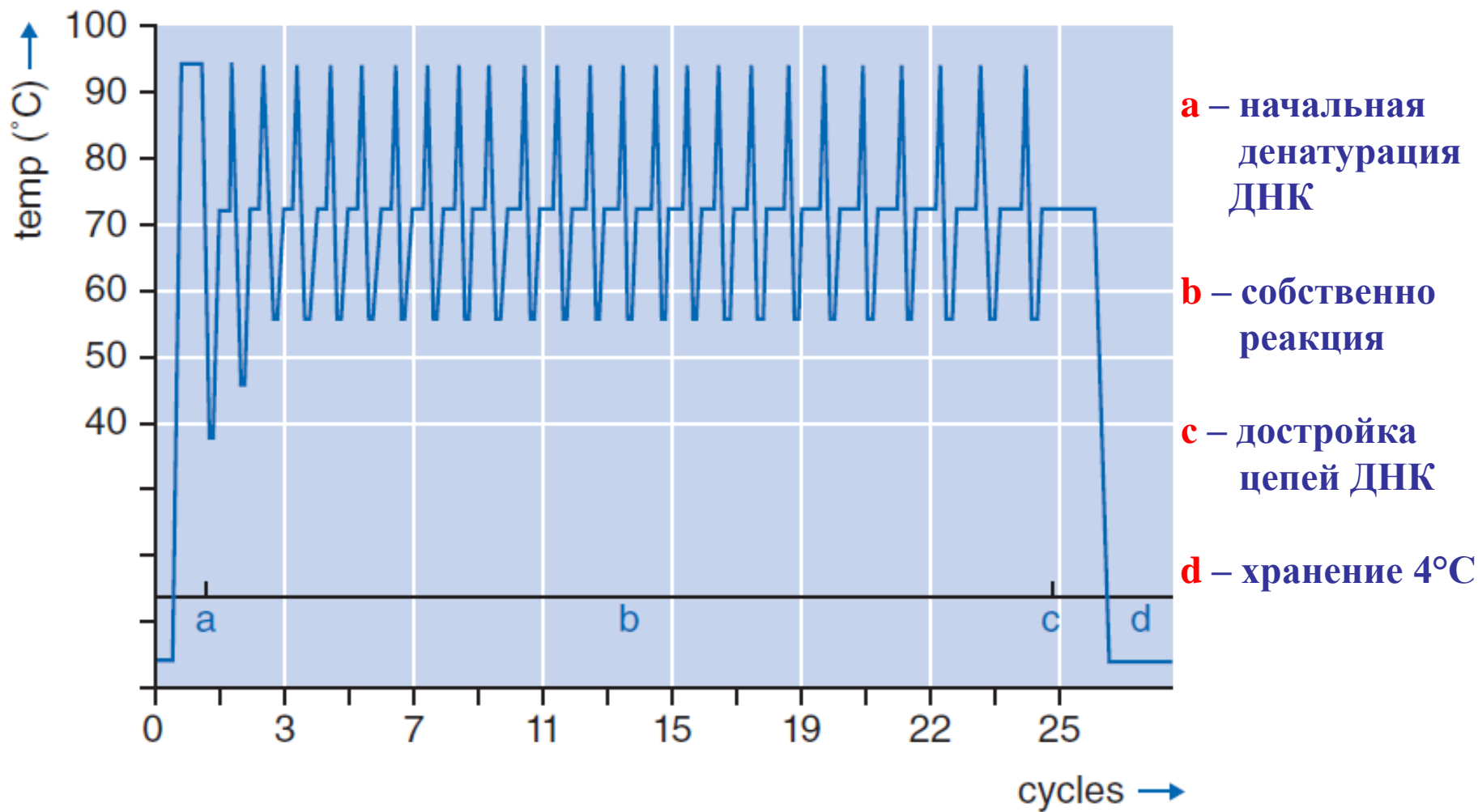
Полимеразная цепная реакция: 2-й цикл



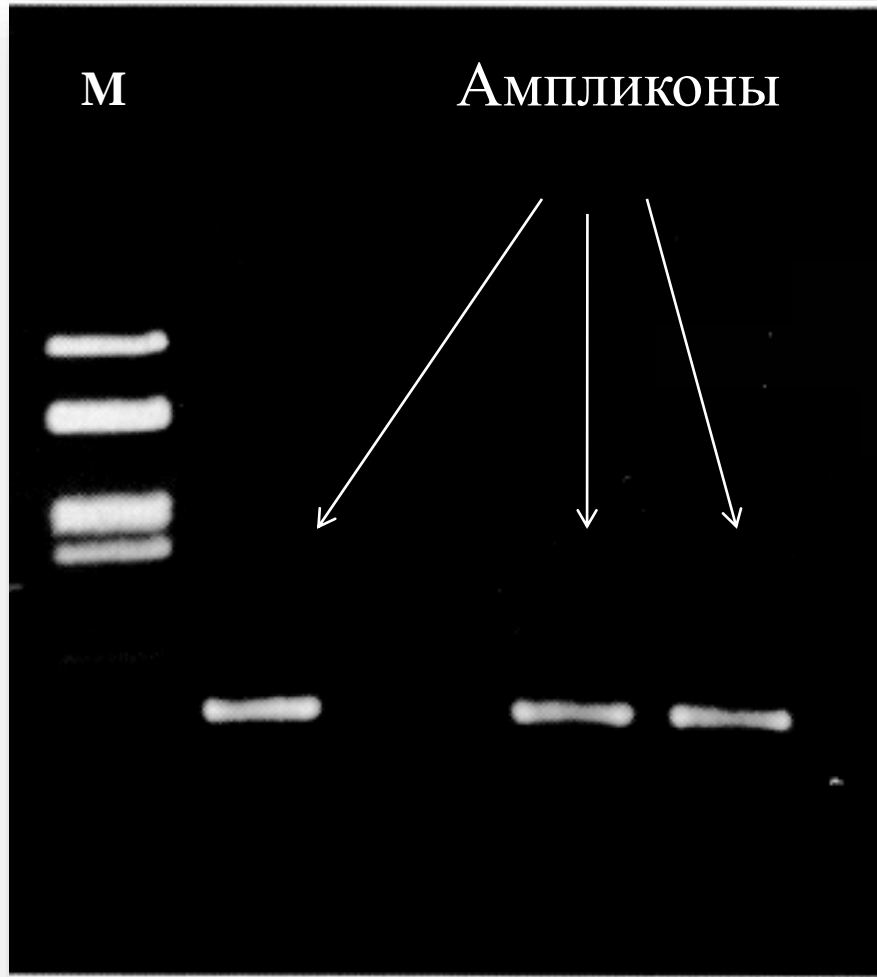
Изменение температуры в типичном трехступенчатом цикле ПЦР



Полный температурный профиль полимеразной цепной реакции (25 циклов)



Типичный результат амплификации ДНК с помощью ПЦР



- Ген фактора V системы свертывания крови человека (**амплимер**)
- Размер продукта – 174 п.о.
- 20 циклов ПЦР
- Электрофорез в 3% агарозном геле
- Окраска бромистым этидием

Современный амплификатор

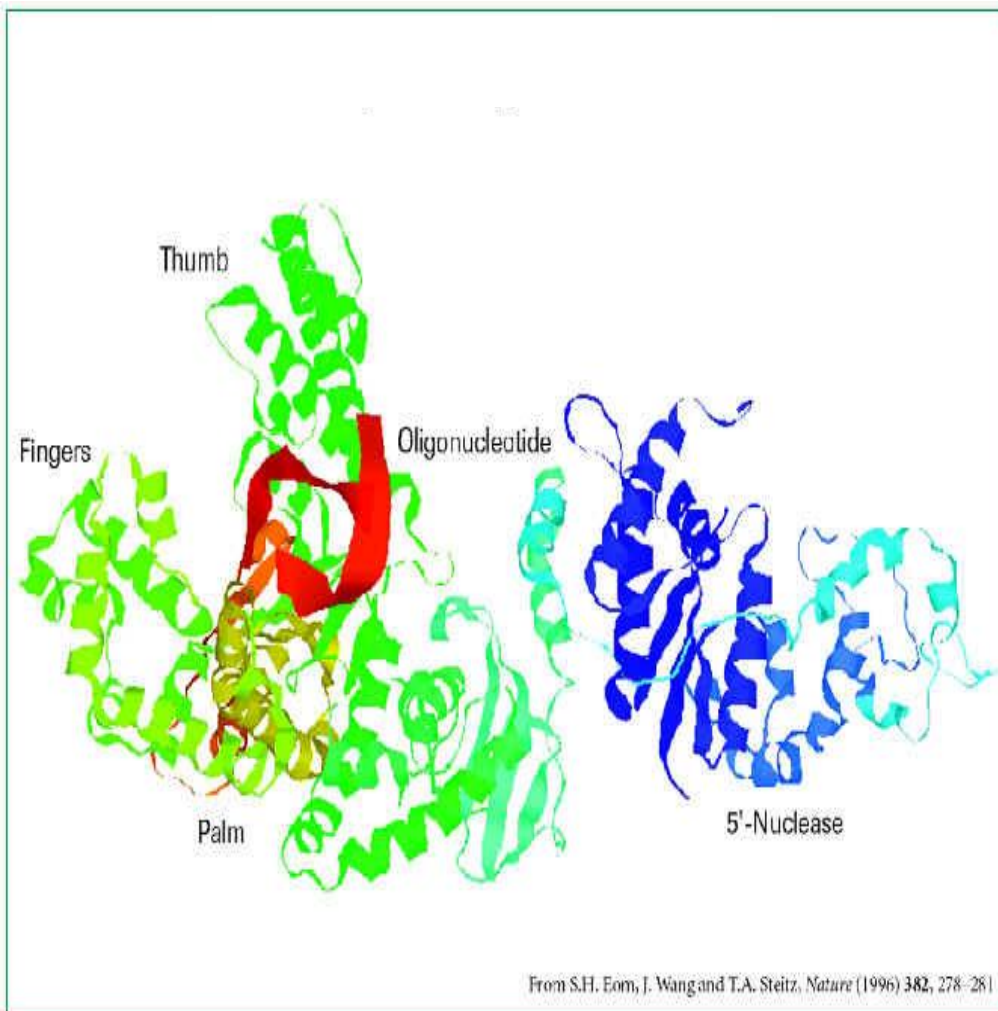


- Термостатируемая крышка
- Возможность использования 96-луночных планшетов
- Градиент температуры вдоль нагревающего блока
- Возможность регуляции скорости перехода от одного сегмента цикла к другому (ramp time)
- «Терцик» фирмы *ДНК-технология* (Москва) – высококачественный отечественный амплификатор

Компоненты, необходимые для проведения ПЦР

- Объем пробы – 0,5-50 мкл
- Анализируемая ДНК – 50-100 нмоль, 0,1-0,25 мкг (до 1 молекулы в пробе)
- Термостабильная ДНК-полимераза
- 4 Дезоксирибонуклеозидтрифосфата (4 dNTPs –dATP, dGTP, TTP, dCTP) – 0,2 мМ
- Олигонуклеотидные праймеры – длина 17-25 н.т. (0,5-1,0 мкМ)
- Ионы Mg^{2+} - 0,5-3,0 мкМ
- Буферный раствор
- Все компоненты ПЦР производятся в ИБХ РАН

Структура и свойства *Taq*-ДНК-полимеразы

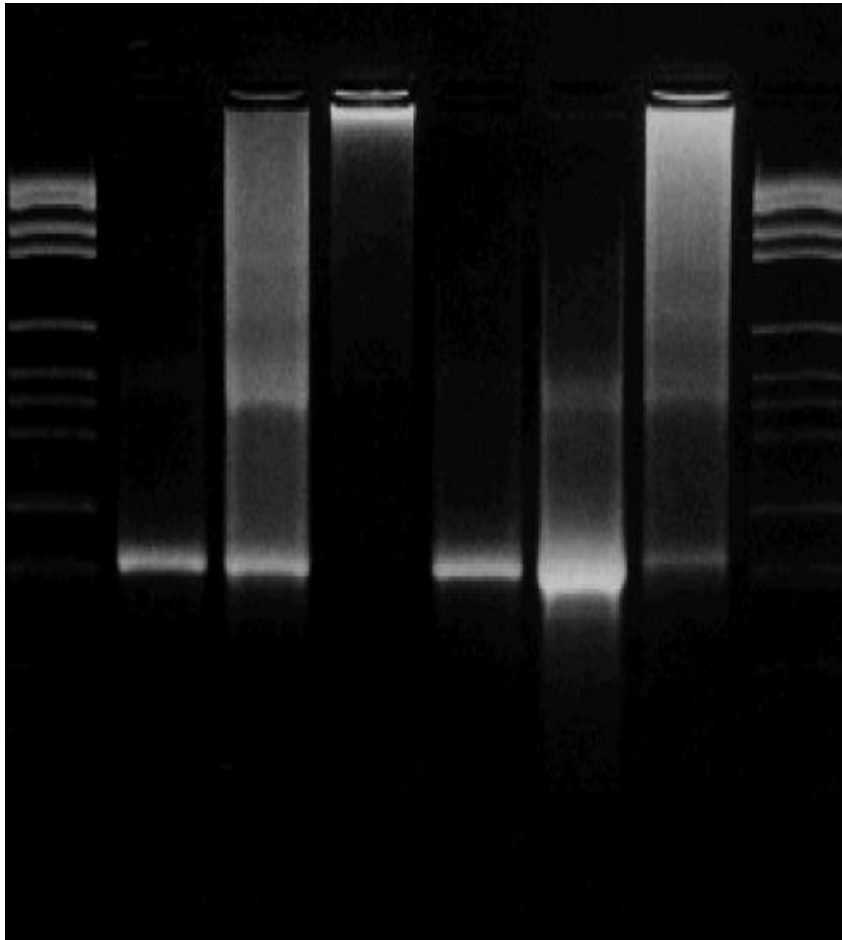


- Наличие 5'→3' экзонуклеазной активности
- Отсутствие 3'→5' экзонуклеазной активности
- Высокая термостабильность (время полужизни: ~ 2 часа при 95°C)
- Скорость синтеза ДНК ~ 50 нт/сек при 72°C

Критические характеристики ПЦР, наиболее важные для исследователя

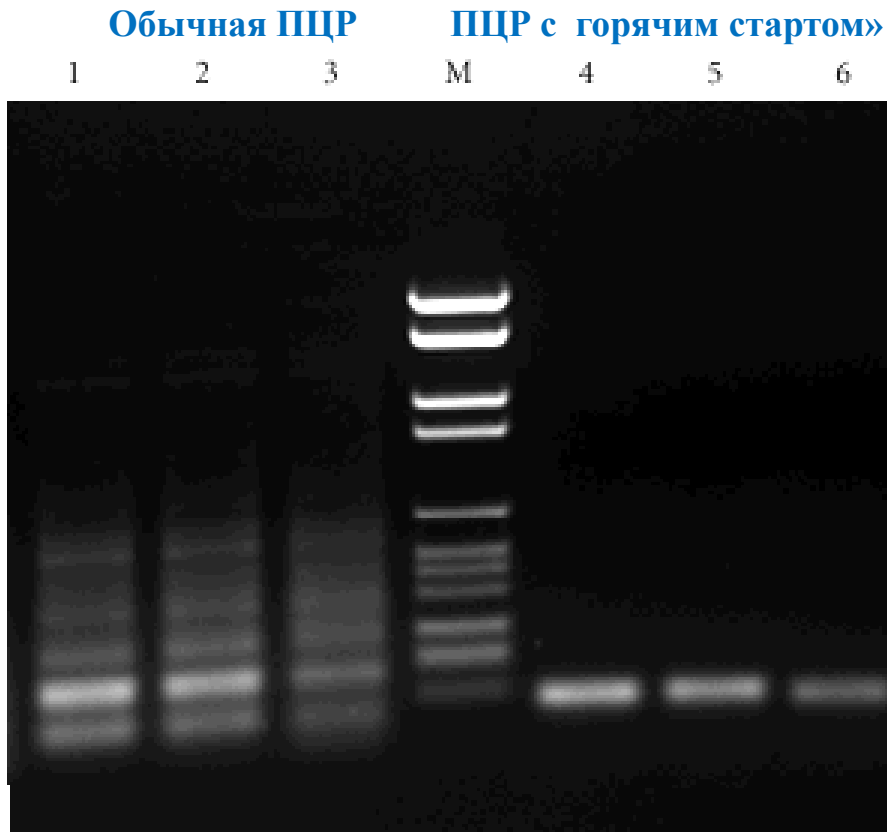
- **Специфичность**
- **Точность синтеза ДНК**
- **Эффективность**

Критические характеристики ПЦР: *специфичность*



- В неоптимальных условиях при амплификации образуются неспецифические продукты ПЦР (шмир, дополнительные полосы, в т.ч. димеры праймеров)
- Электрофорез в агарозном геле, окраска бромистым этидием

ПЦР с «горячим стартом»

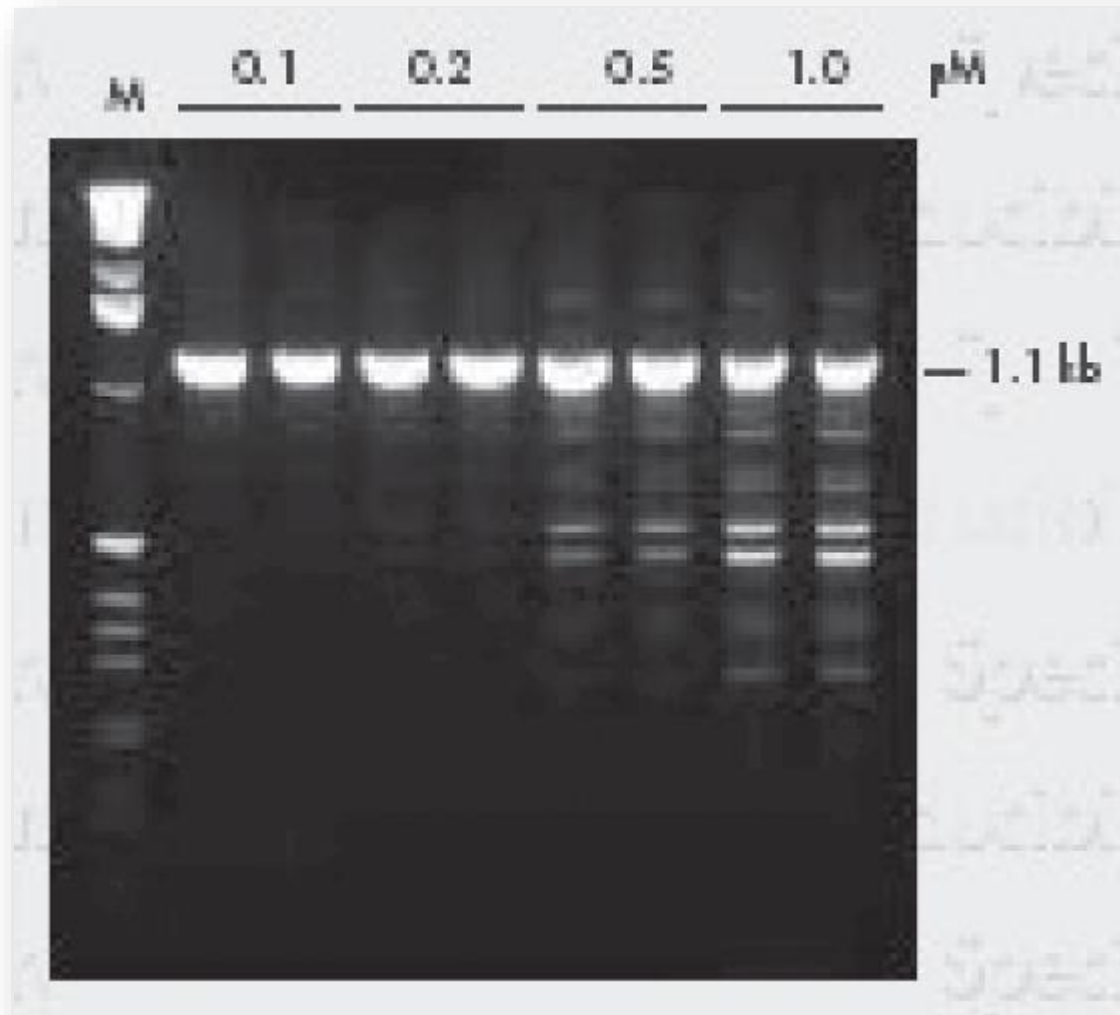


Уменьшение содержания ДНК в пробе >>>

- Обратимая инактивация *Taq*-ДНК-полимеразы резко увеличивает специфичность ПЦР
- Добавление в реакционную смесь некоторых соединений (DMSO, бетаин, 2-пирролидон) приводят к тому же эффекту

Аmplификация гена tPA

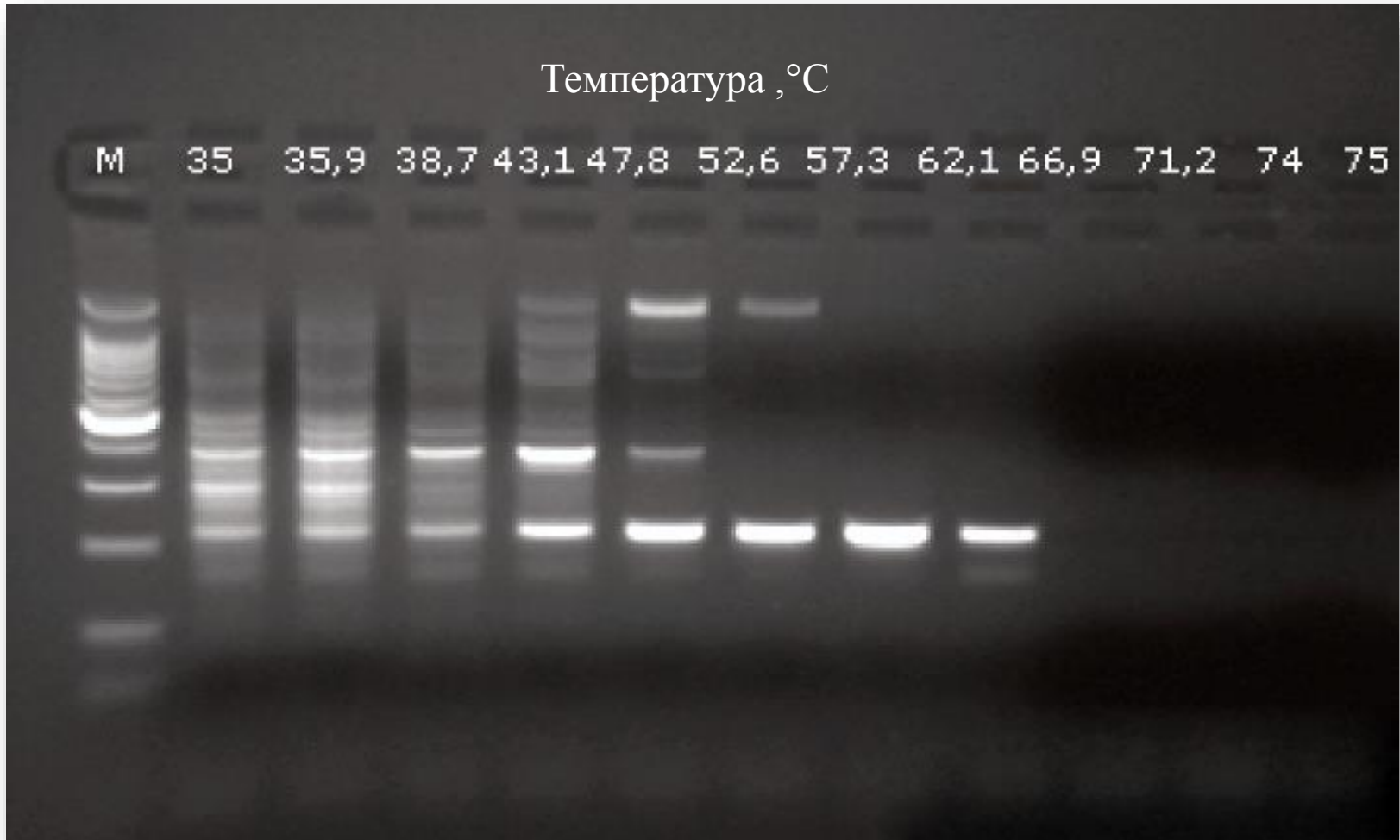
Влияние концентрации праймеров на специфичность ПЦР



Вверху указана концентрация праймеров в реакционной смеси

Концентрация праймеров выше 1 μM не используется

Влияние температуры отжига праймеров на специфичность ПЦР



Амплификация части гена фактора V системы свертывания крови человека

Точность синтеза ДНК некоторыми термостабильными ДНК-полимеразами

ДНК-полимераза	Частота ошибочного включения нуклеотидов $\times 10^{-6}$
Taq	8,0
Pfu	1,3
Смесь Taq/Pfu (50/1)	5,0

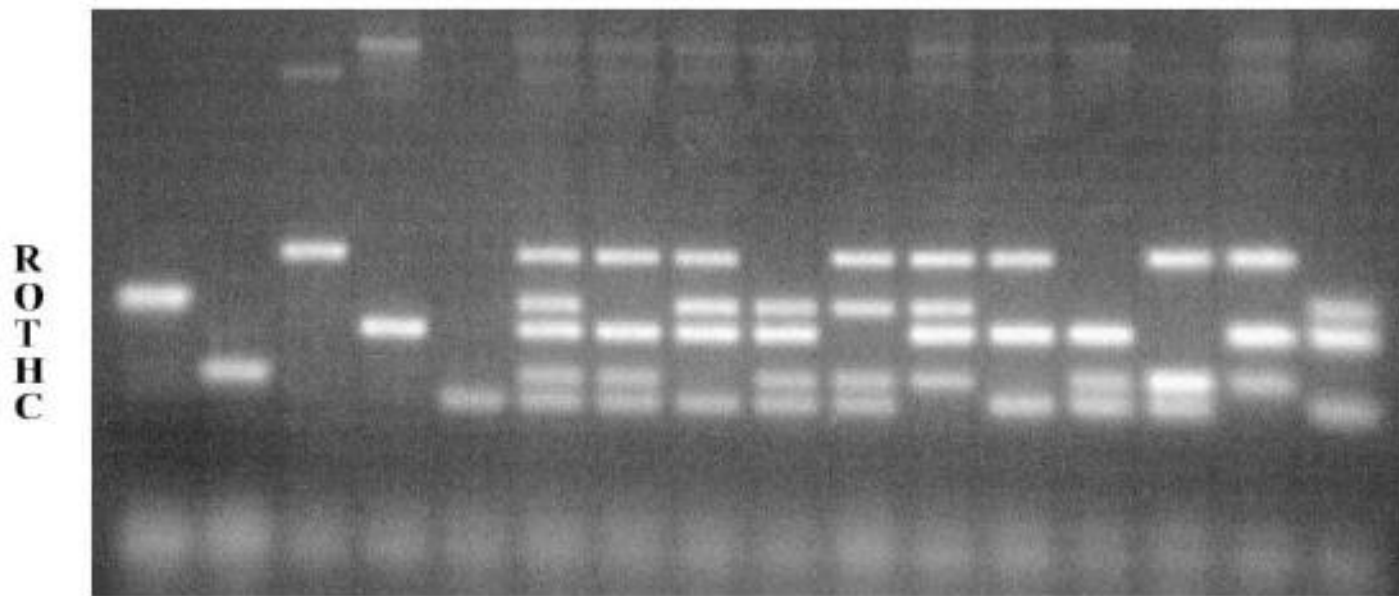
Методы ПЦР



Асимметричная ПЦР

- Амплификация с преимущественным использованием одного праймера
 - Один из праймеров в меньшей концентрации
 - В основном образуется одноцепочечный продукт ПЦР
 - Линейное увеличение продукта ПЦР

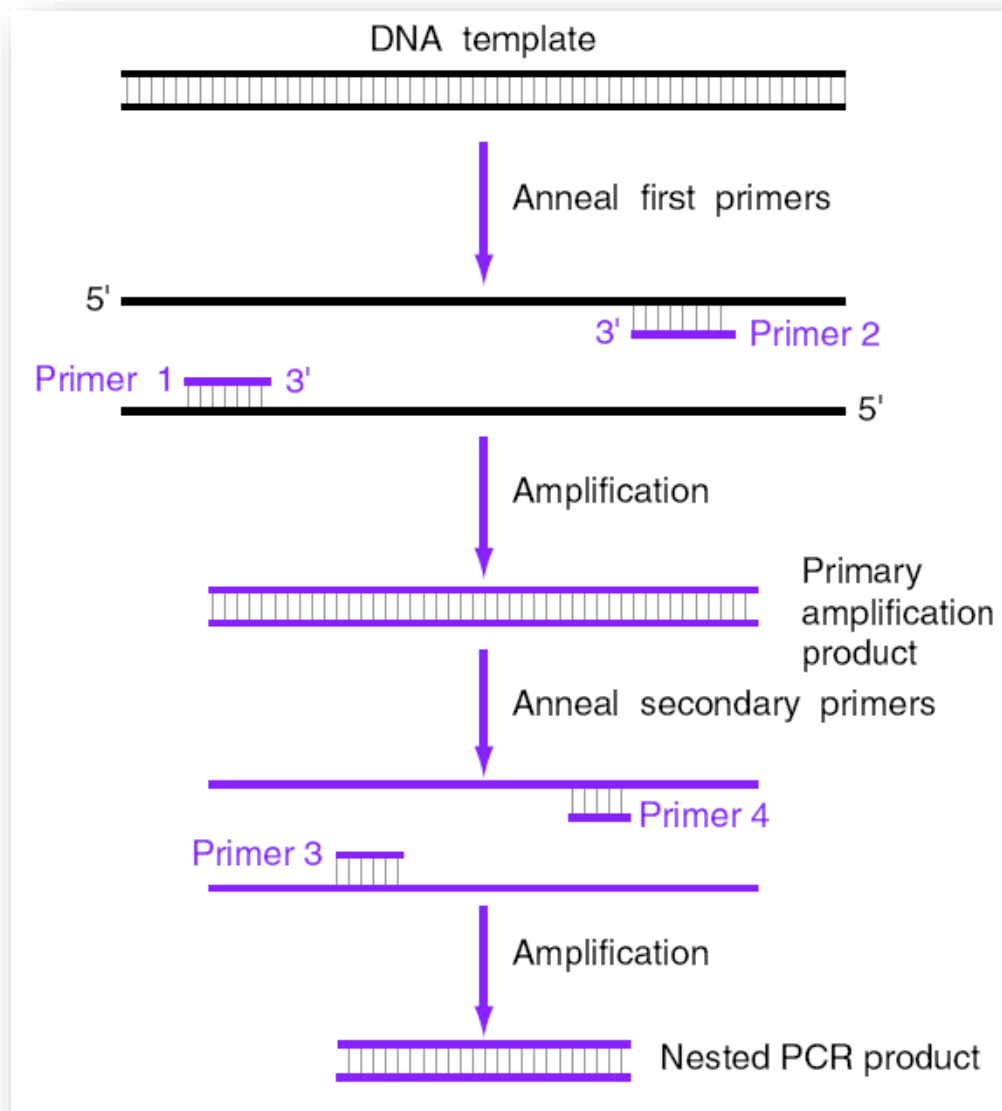
Множественная ПЦР (Multiplex PCR) – одновременная амплификация нескольких ампликонов в одной пробирке



<i>O. ostertagi</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>H. placei</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>O. radiatum</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>T. colubriformis</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>C. oncophora</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+

Очищенная ДНК патогенных грибов смешана в равных пропорциях в указанных сочетаниях

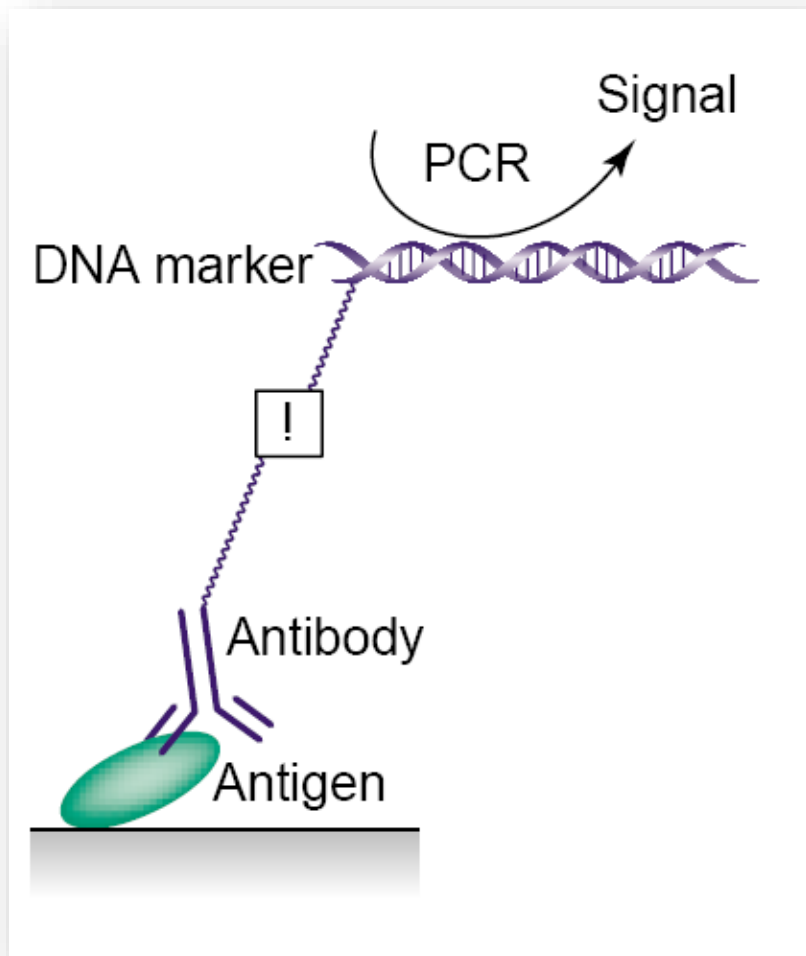
«Гнездовая» ПЦР (Nested PCR)



Амплификация больших участков ДНК с высокой точностью (Long PCR, LA PCR)

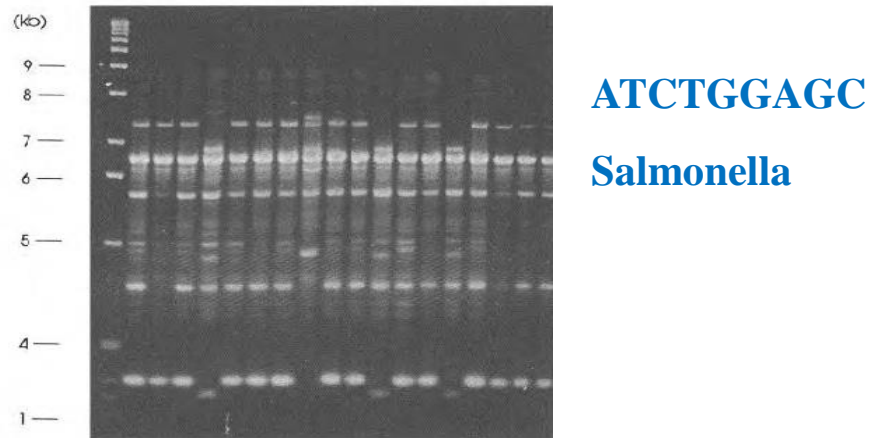
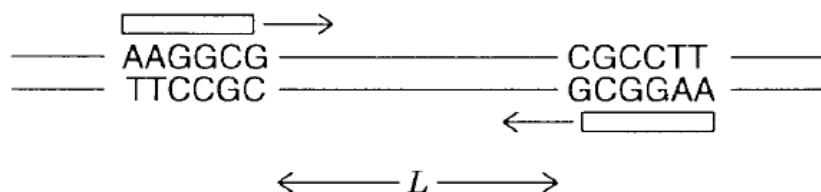
- Амплификация участков ДНК до 200 т.п.н. (целых эукариотических генов и вирусных геномов)
- Использование смесей из двух ДНК-полимераз, одна из которых обладает 3'→5'-экзонуклеазной активностью
- Использование высокоочищенных dNTPs
- Дистрибутивный характер работы ДНК-полимеразы

Иммуно-ПЦР (IPCR)



- ДНК-матрица конъюгирована с молекулами иммуноглобулинов, специфичных в отношении анализируемого антигена
- Конкурентная иммуно-ПЦР: конъюгат лиганда с ДНК-матрицей конкурирует со свободным лигандом за АТ
- 1000-Кратное увеличение чувствительности стандартного иммуноферментного метода

Случайная амплификация полиморфных последовательностей (метод RAPD)



Длина праймера, нт	Число продуктов PCR	Суммарное кол-во амплифицируемой ДНК (геном 3×10^9 п.н.) $L=2000$
8	1500	$1,5 \times 10^6$ п.н.
9	100	$1,0 \times 10^5$ п.н.
10	6	$6,0 \times 10^3$ п.н.

ПЦР *in situ*: амплификация участков ДНК или РНК в интактных клетках

- Фиксация 10% формалином клеток и тканей, помещение в парафиновые блоки, пермеабиллизация клеточных мембран протеиназами (пепсин), их удаление диэтилпиروкарбонатом, амплификация с биотинилированными нуклеотидами, детекция
- Позволяет:
 - Локализовать анализируемые последовательности во внутриклеточном пространстве
 - Обнаруживать 1 копию последовательности на фоне 1 μg ДНК, т.е. уникальные гены и их транскрипты
- Находит широкое применение в вирусологии, онкологии и биологии развития

Недостатки ПЦР, проводимой в обычном формате

- **Необходимость анализа продуктов ПЦР после завершения реакции**
 - **Электрофорез**
 - **Гибридизация и т.п.**
- **Опасность кроссконтаминаций продуктами ПЦР**
- **Невозможность количественной оценки содержания амплифицируемой матрицы в анализируемых образцах**

Обычная ПЦР не позволяет определять количество матричной ДНК или РНК в пробе

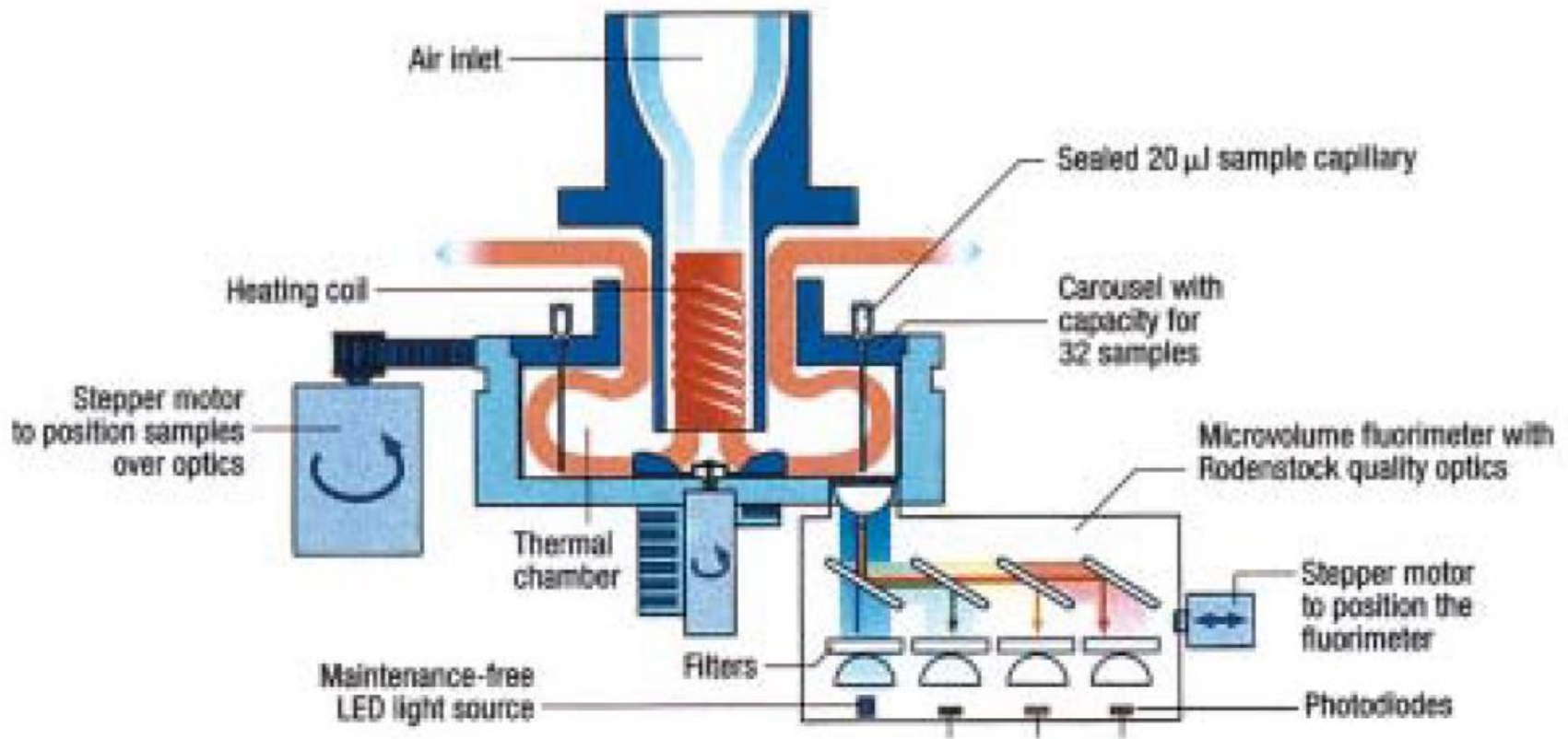
- Ни одна из стадий ПЦР не завершается с эффективностью 100%
- Накопление ингибиторов ПЦР при прохождении реакции
- Наименее эффективны завершающие циклы
- Решение проблемы с помощью ПЦР в реальном времени

Количественная ПЦР

ПЦР в режиме реального времени Real-time PCR

**Позволяет, не открывая пробирки, непрерывно
следить за накоплением продуктов ПЦР в пробах**

Устройство капиллярного амплификатора LightCycler

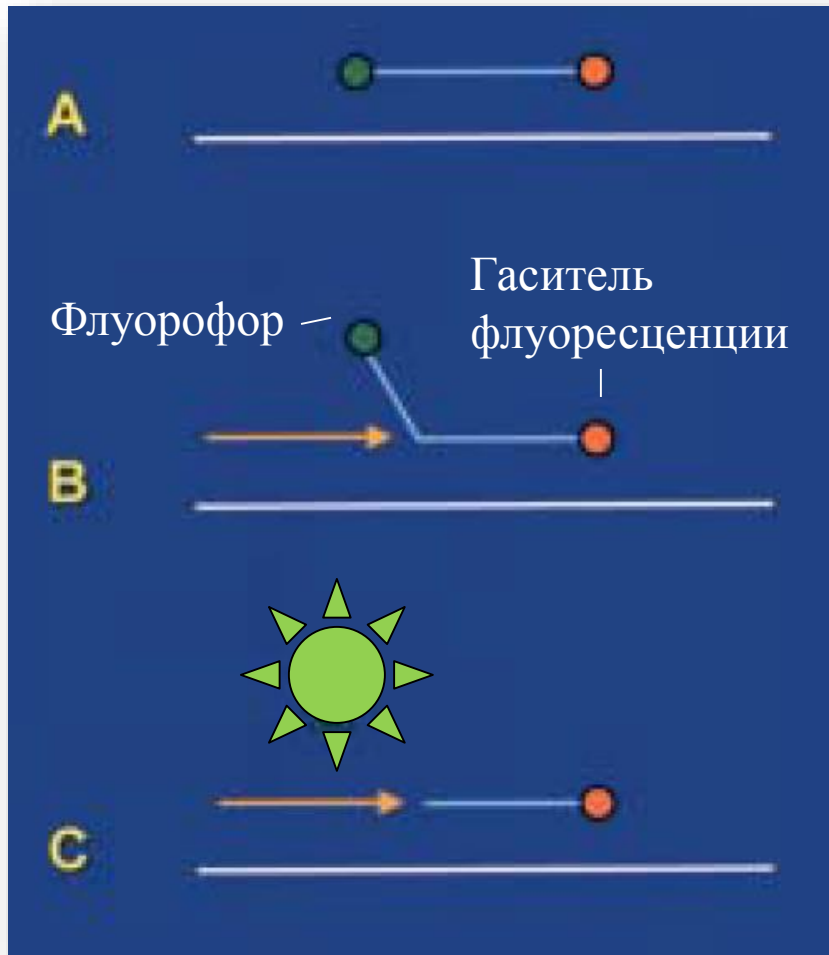


Капилляры объемом 20 мкл обеспечивают высокое соотношение поверхности к объему и высокую скорость теплообмена. 30 циклов завершаются за 20-30 мин

Российские производители амплификаторов для проведения ПЦР в реальном времени

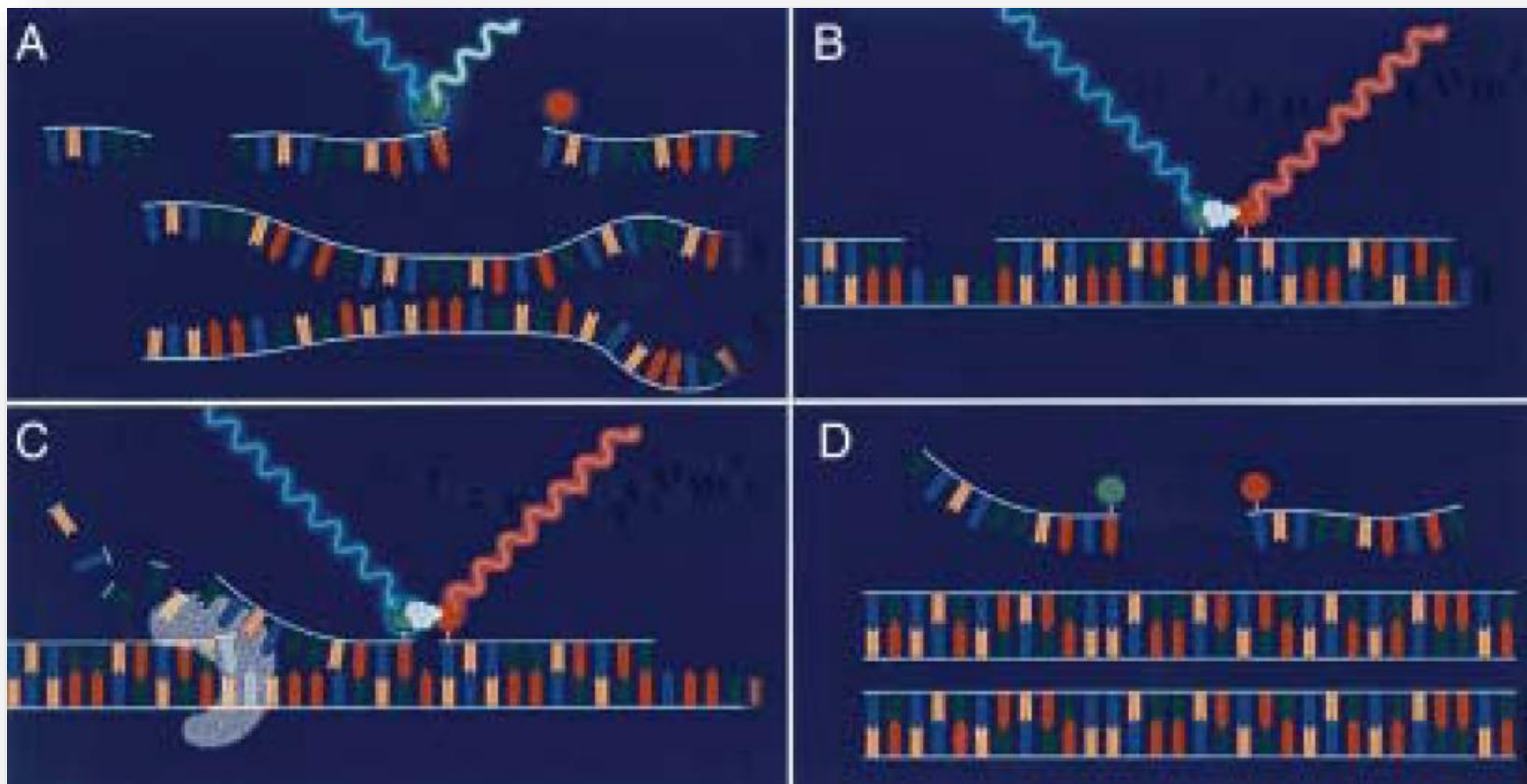
- *Институт аналитического приборостроения РАН, С-Петербург совместно с фирмой «Синтол», Москва*
- *Фирма «ДНК-Технология», Москва*
- *Флуоресцентно-меченые зонды – «ДНК-синтез», (ИБХ РАН), фирма «Синтол», Москва*

Принцип действия зондов TaqMan

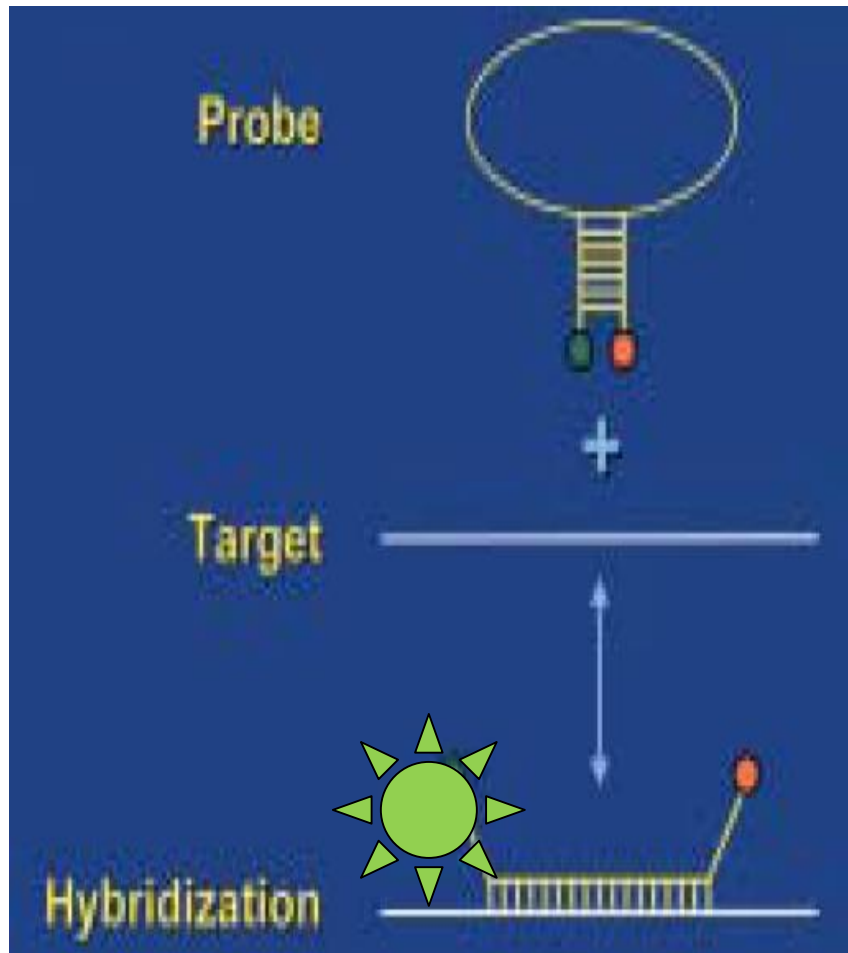


■ 5'→3'-экзонуклеаза
Taq-ДНК-полимеразы
отщепляет
флуоресцентный
краситель, который
начинает
флуоресцировать в
реакционной смеси

Принцип действия зондов, основанных на резонансном переносе энергии флуоресценции (FRET - fluorescence resonance energy transfer)

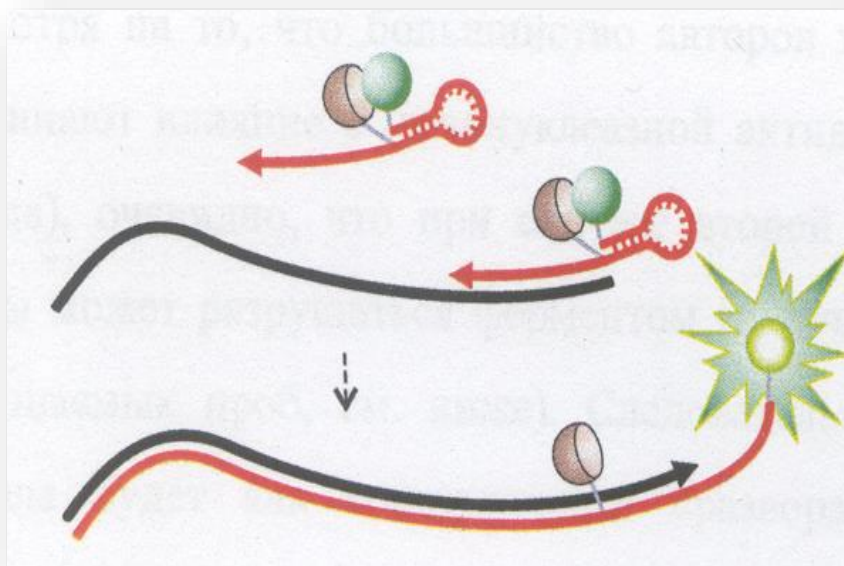


Принцип действия зондов – молекулярных маяков (molecular beacon probes)

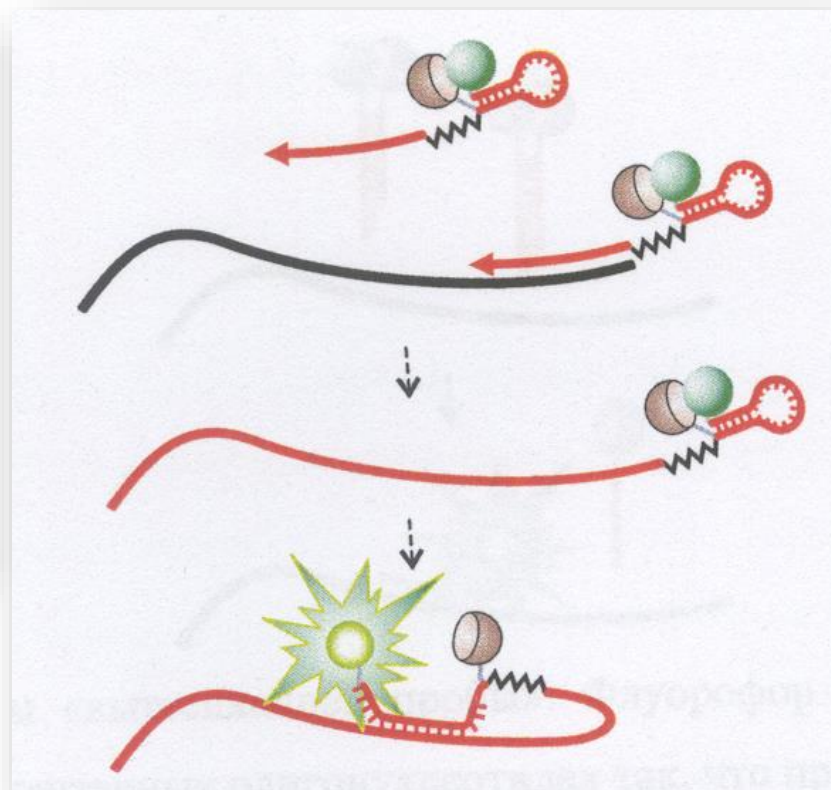


- В растворе зонды образуют структуру «стебель-петля», что приводит к сближению флуорофора и гасителя флуоресценции

Праймеры, меченые флуорофорами, в ПЦР в реальном времени

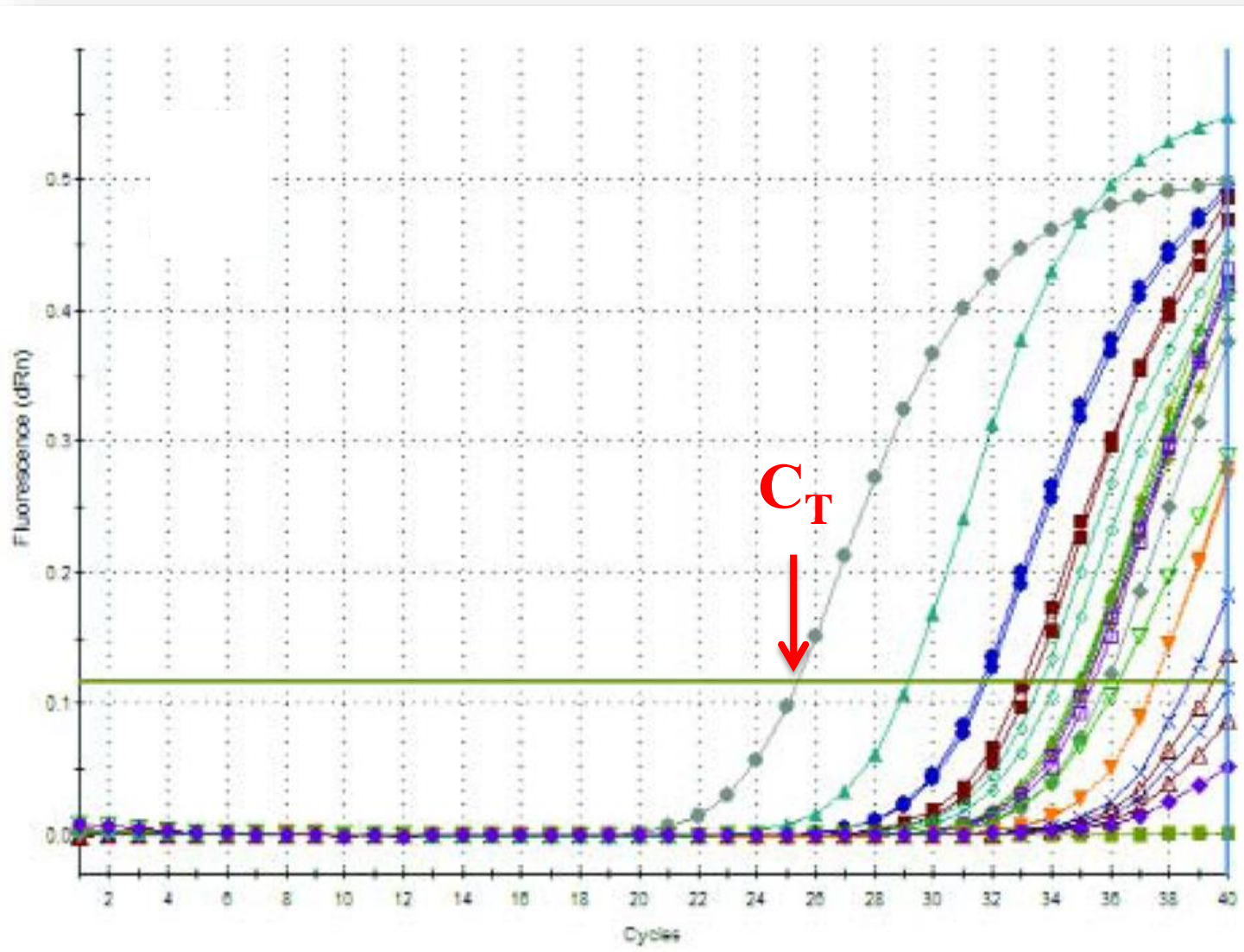


Праймеры «Амплифлюор»



Праймеры «Скорпион»

Мониторинг накопления продуктов ПЦР в реальном времени протекания реакции



C_T –
пороговый
цикл

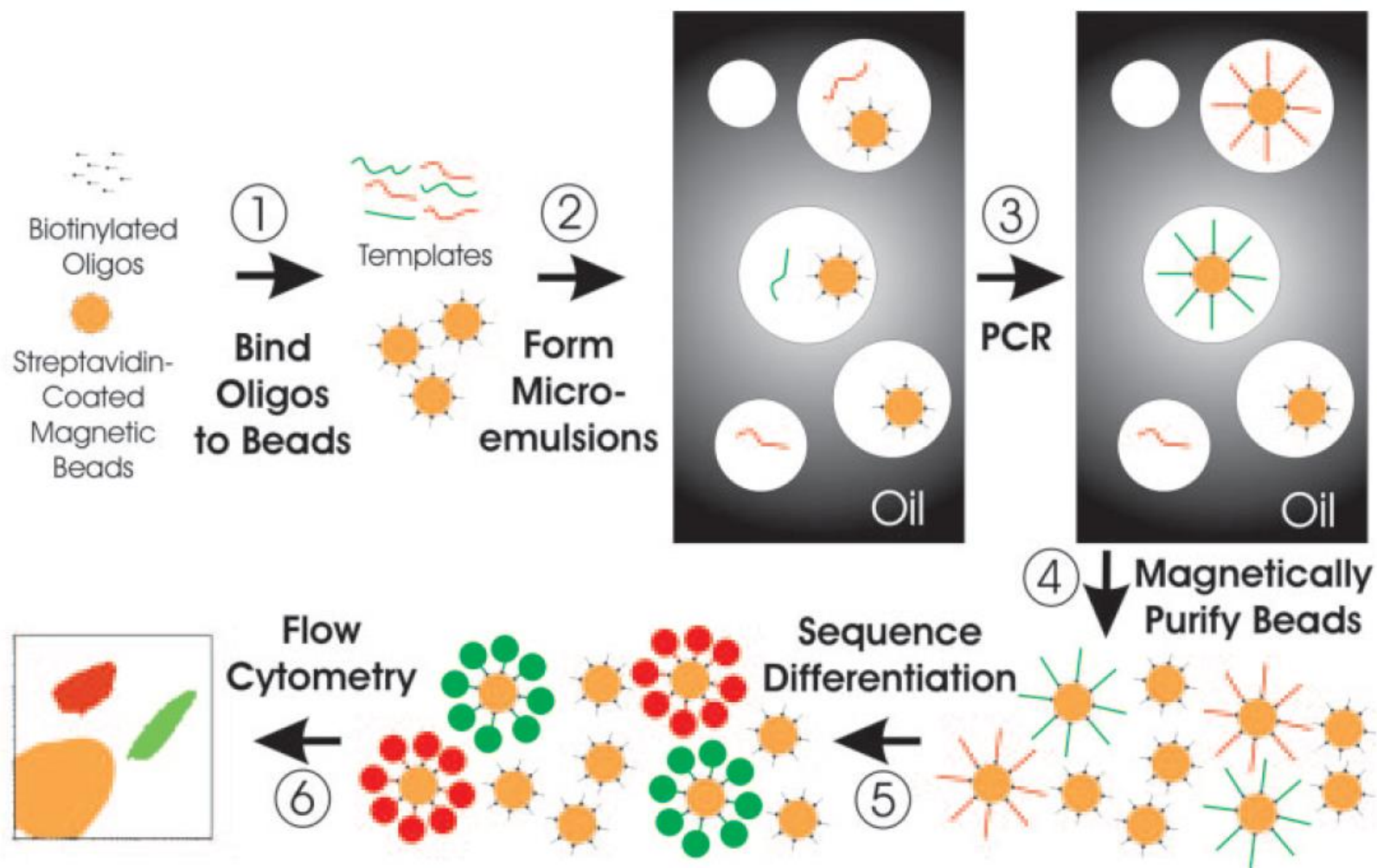
Калибровочная кривая для определения количества ДНК-матрицы в пробе



Определение числа плазмидных копий гена *F8* в трансфицированных клетках человека

Концентрация ДНК в крайних точках различается на 9 порядков

Цифровая ПЦР (Digital PCR) (на основе эмульсионной ПЦР)



ПЦР

в прикладных исследованиях

ДНК-диагностика

Что такое «ДНК-диагностика»?

- **Постановка диагноза заболевания или выявление предрасположенности к нему путем определения особенностей структуры генов (ДНК) обследуемого пациента**

Геном человека в связи его болезнями

- **Количество известных генов, ассоциированных с болезнями – >1500 (*OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man*)**
- **Количество заболеваний, диагностируемых на генетическом уровне – >1000**
- **Количество генетических тест-систем, используемых в современной клинике – >650**

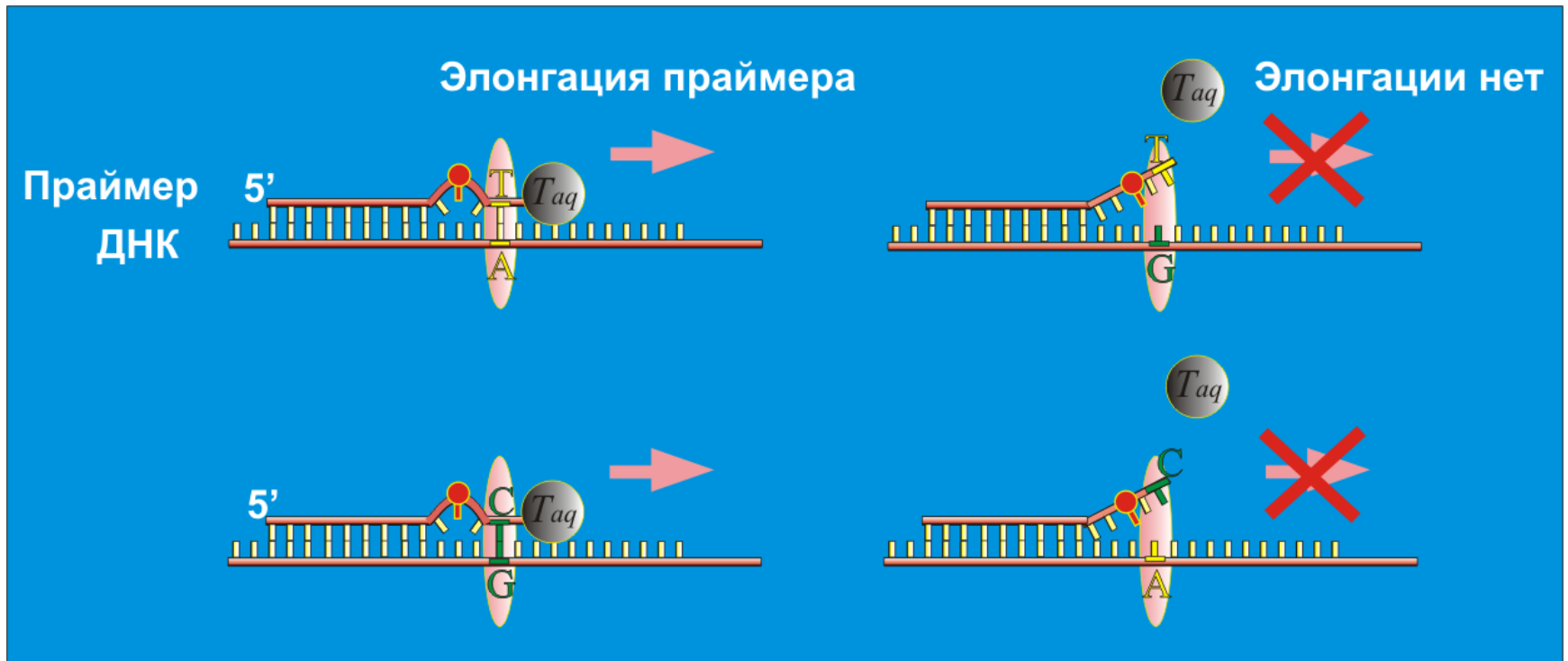
ДНК-полиморфизмы – основа генетической индивидуальности человека

- **Полиморфизмы – это мутации с частотой >1%**
- **SNP – (single nucleotide polymorphisms) полиморфизмы по отдельным нуклеотидам – обнаружено в геноме человека – >10,000,000**
- **Геномы двух людей различаются по ~1,500, 000 SNP, (1 SNP/180 п. н., исследовано 137 человек)**
- **CNV – copy number variation (различия в числе копий участков генома)**

Поиск SNP в генах человека

- Поиск SNP в генах пациентов, ассоциированных с заболеваниями – одно из главных направлений современных медико-генетических исследований

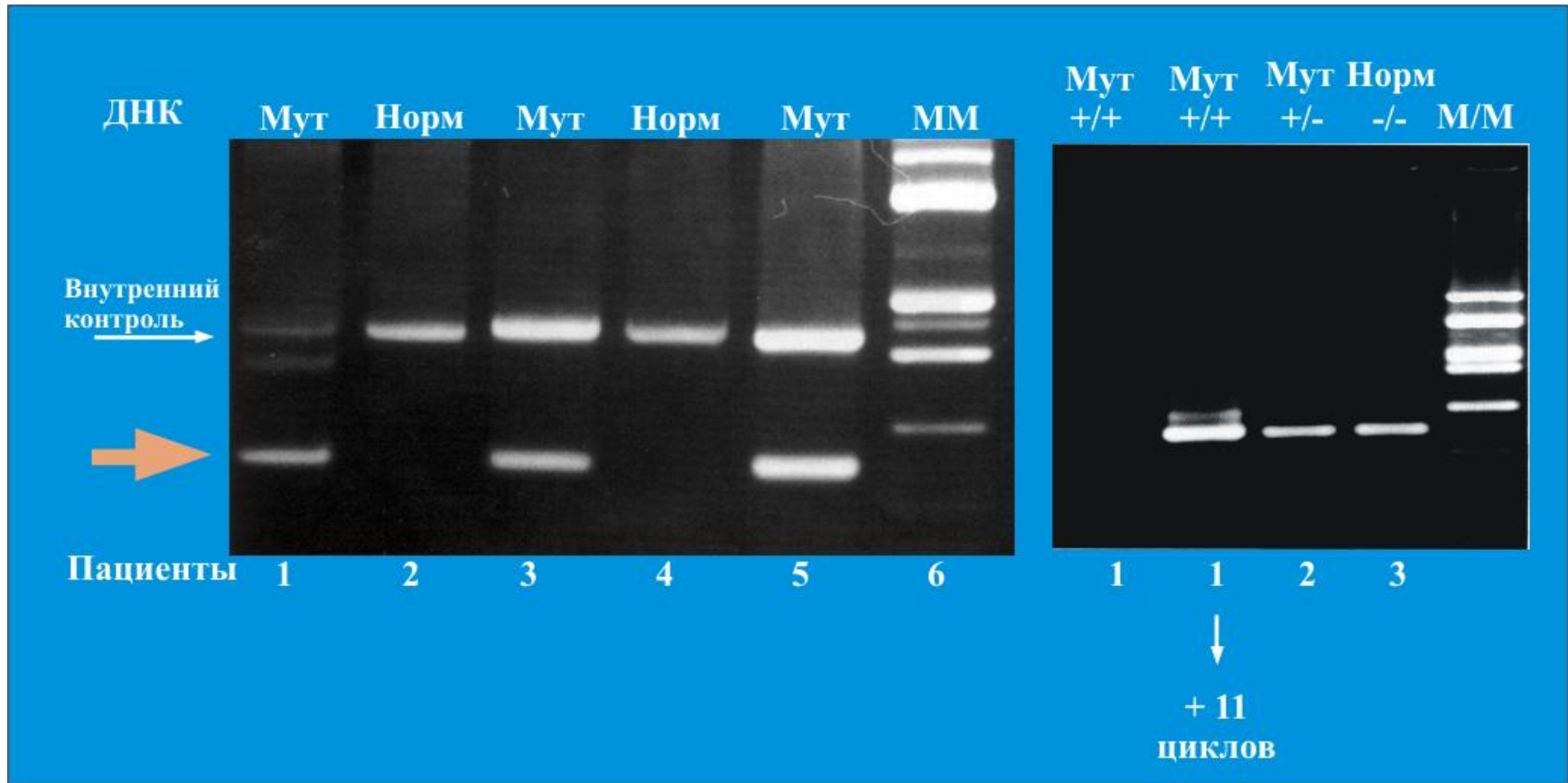
Аллель-специфическая ПЦР



Принцип действия аллель-специфических праймеров:

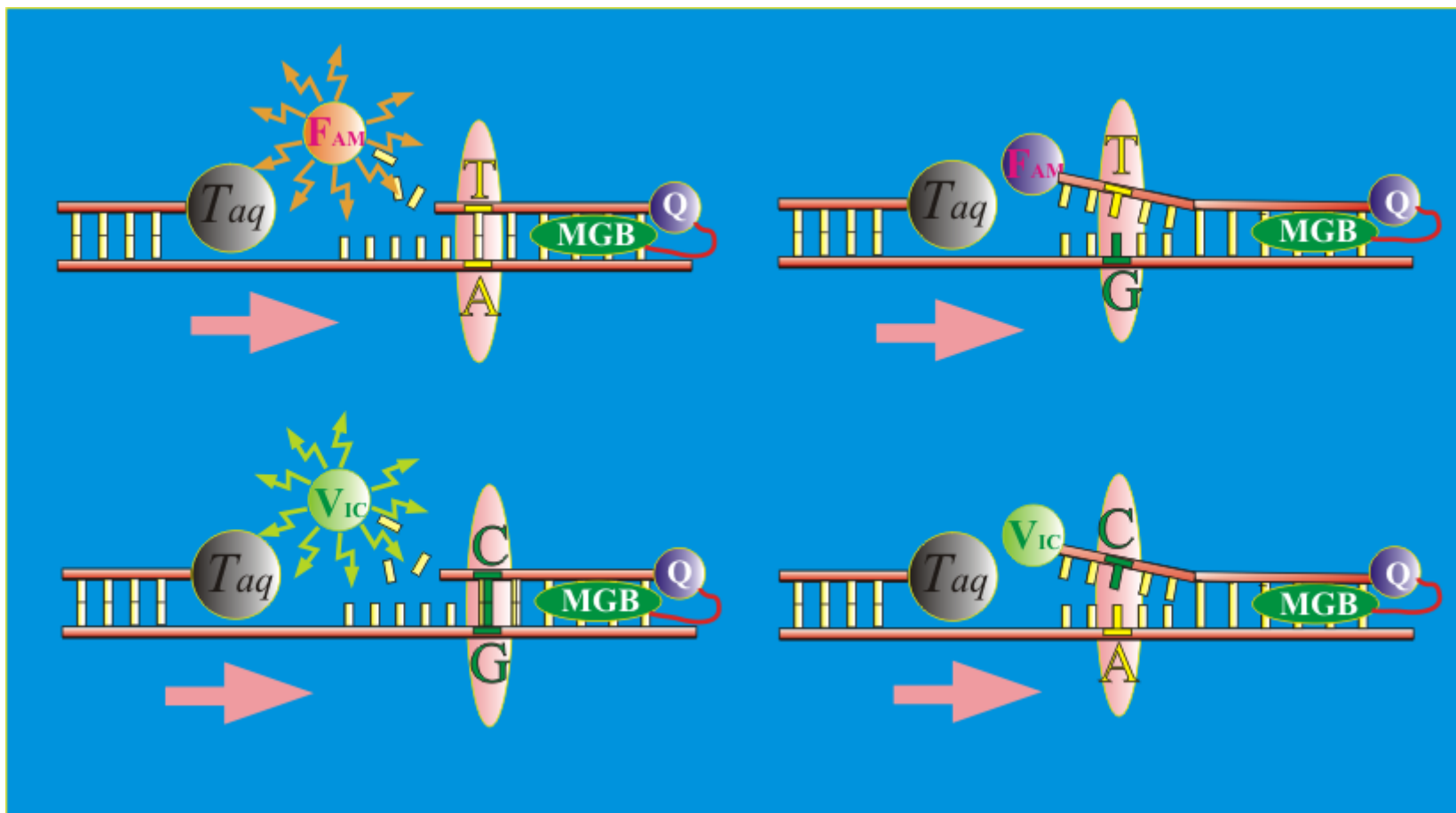
Элонгация праймера происходит только в том случае, если его 3'-концевой нуклеотид комплементарен матричной ДНК

Выявление мутации *FV Leiden* в геноме человека с использованием аллель-специфической ПЦР

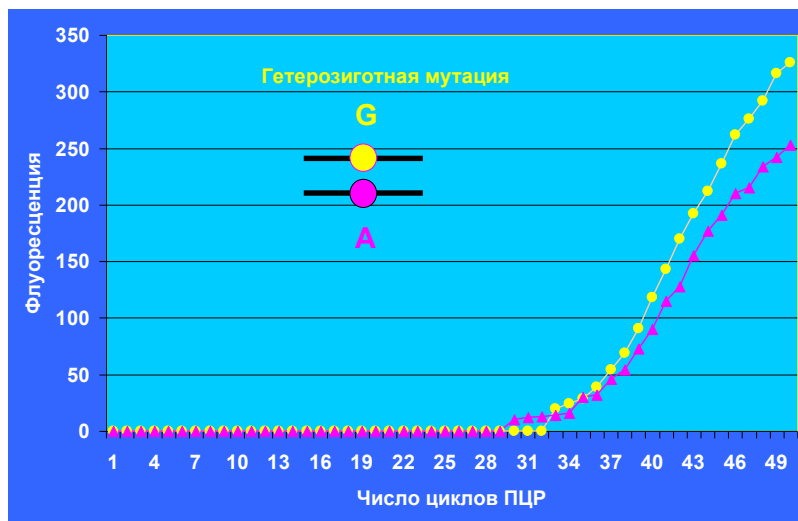
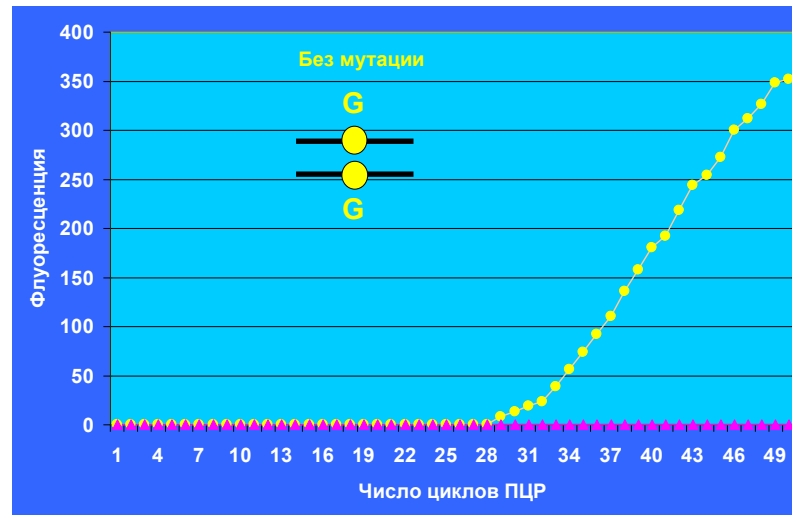
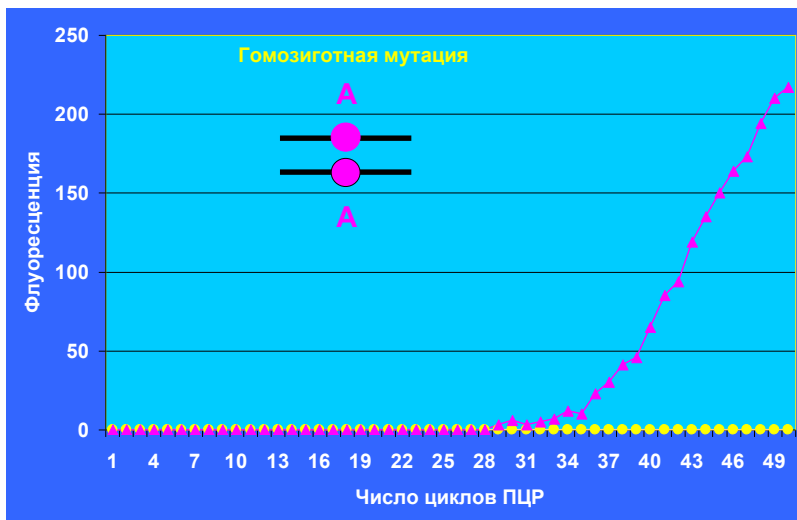


Электрофорез продуктов ПЦР в 3% агарозном геле

ПЦР в реальном времени: принцип действия системы TaqMan с аллель-специфическими зондами



Выявление мутации *FV Leiden* с помощью ПЦР в реальном времени и аллель-специфических зондов



**Будущее ДНК-диагностики –
это высокопроизводительное
параллельное секвенирование
ДНК**

THE SEQUENCE EXPLOSION

**Объем баз данных
Человек:
2000 – 8 Gb
2010 – 278 Gb**

**Всего:
1,8 триллиона**

**2005 г. Секвенаторы
второго поколения**

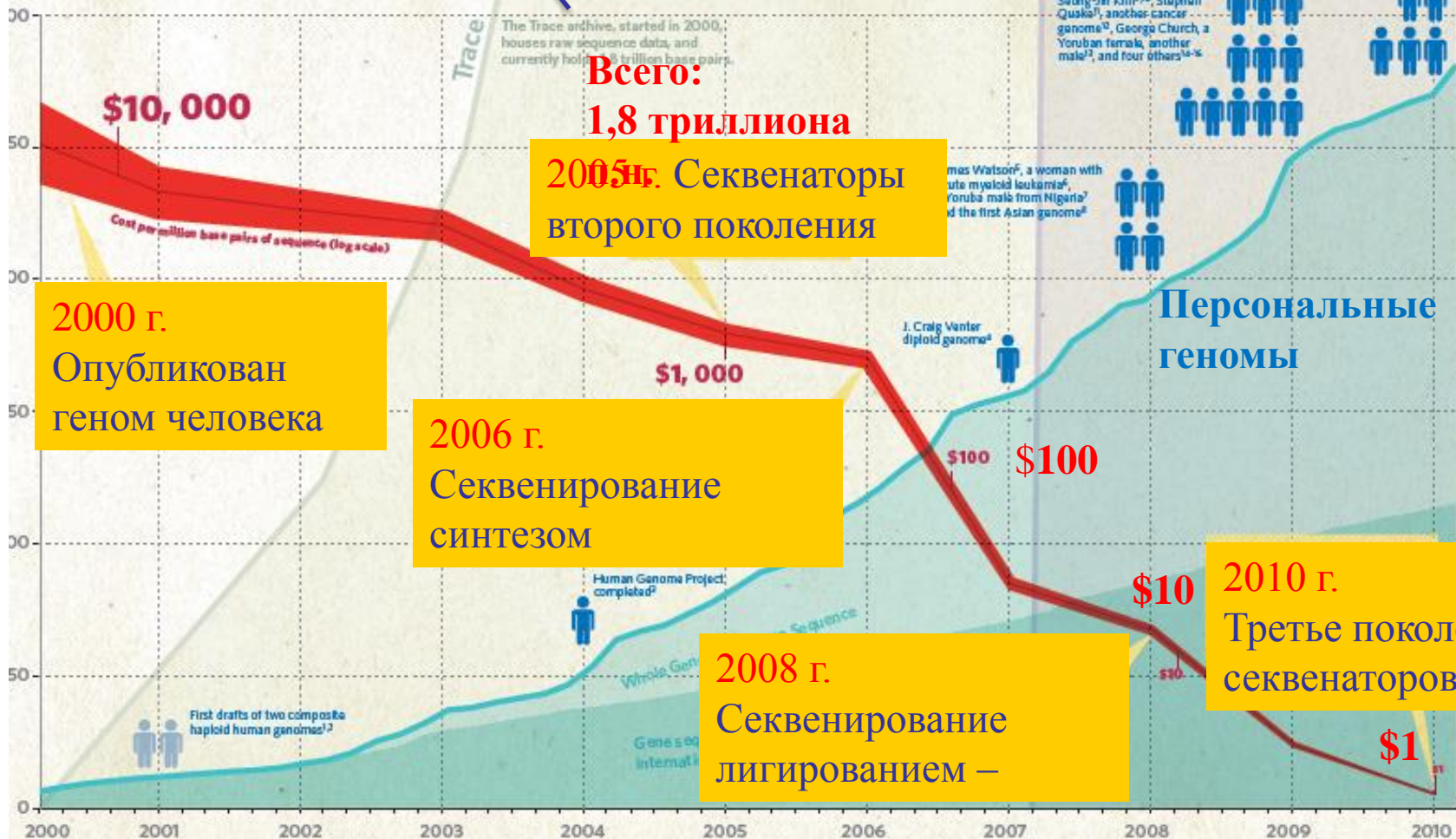
**2000 г.
Опубликован
геном человека**

**2006 г.
Секвенирование
синтезом**

**2008 г.
Секвенирование
лигированием –**

**Персональные
геномы**

**2010 г.
Третье поколение
секвенаторов**



The Sequence Read Archive (SRA) houses raw data from next-generation sequencing and has grown to 25 trillion base pairs. If this chart were to accommodate it, it would stretch to more than 12 metres — twice the height of an average giraffe.

A glioma cell line¹⁷, Inuk¹⁸, Gubi and Archbishop Desmond Tutu¹⁹, James Lupski²⁰, and a family of four²¹

Two Korean males including Saeng-Jin Kim²², Stephan Quake²³, another cancer genome²⁴, George Church, a Yoruban female, another male²⁵, and four others²⁶⁻²⁸

James Watson²⁹, a woman with acute myeloid leukaemia³⁰, Yoruba male from Nigeria³¹ and the first Asian genome³²

J. Craig Venter diploid genome³³

Фредерик Сенгер – духовный и крестный отец автоматических ДНК-секвенаторов первого поколения

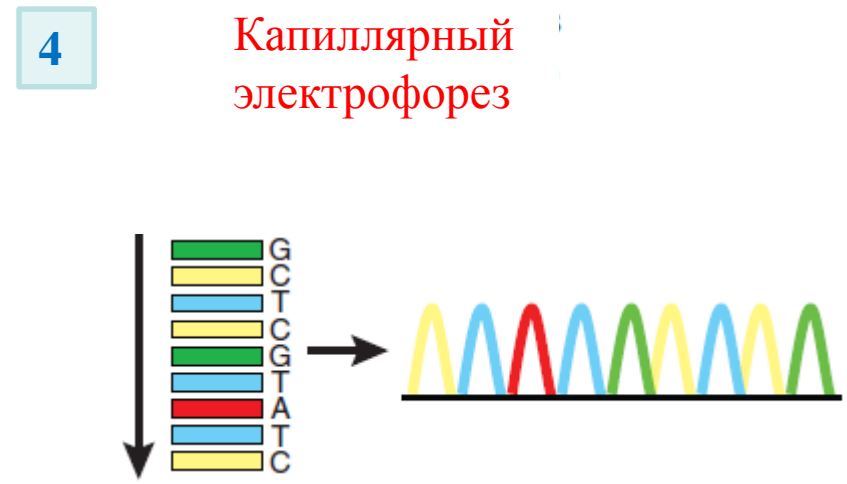
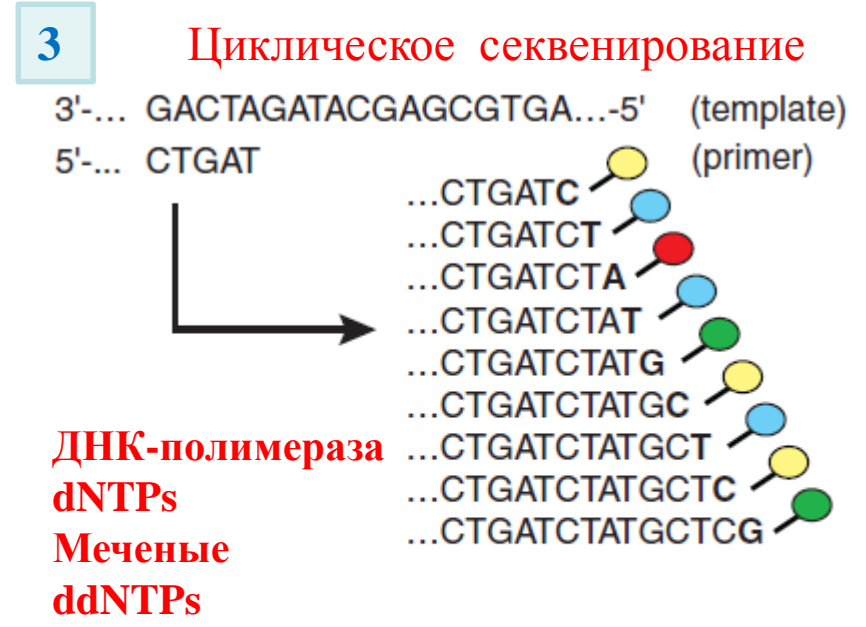
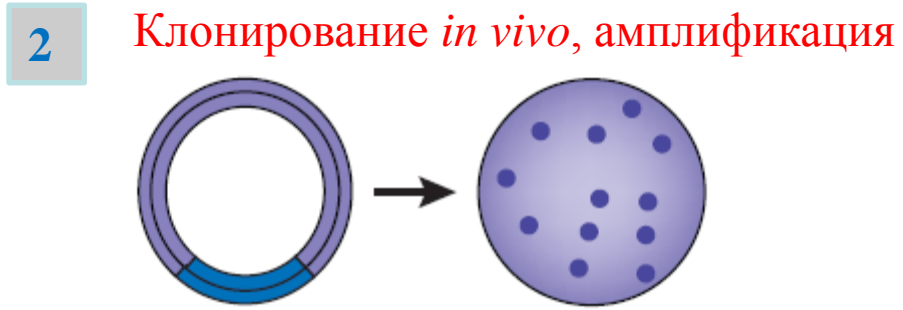
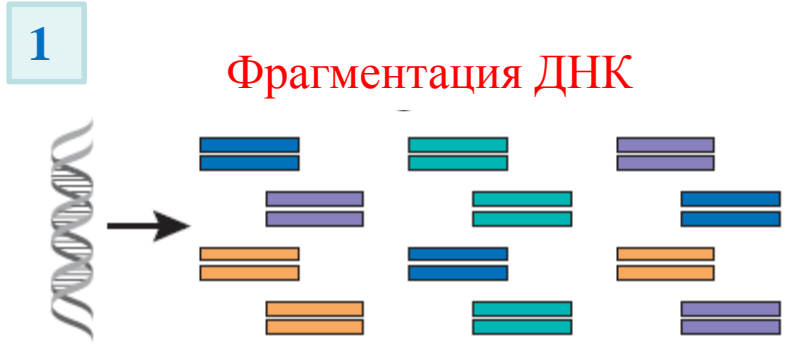


Дважды лауреат Нобелевской премии по химии

1958 г. – первичная структура инсулина

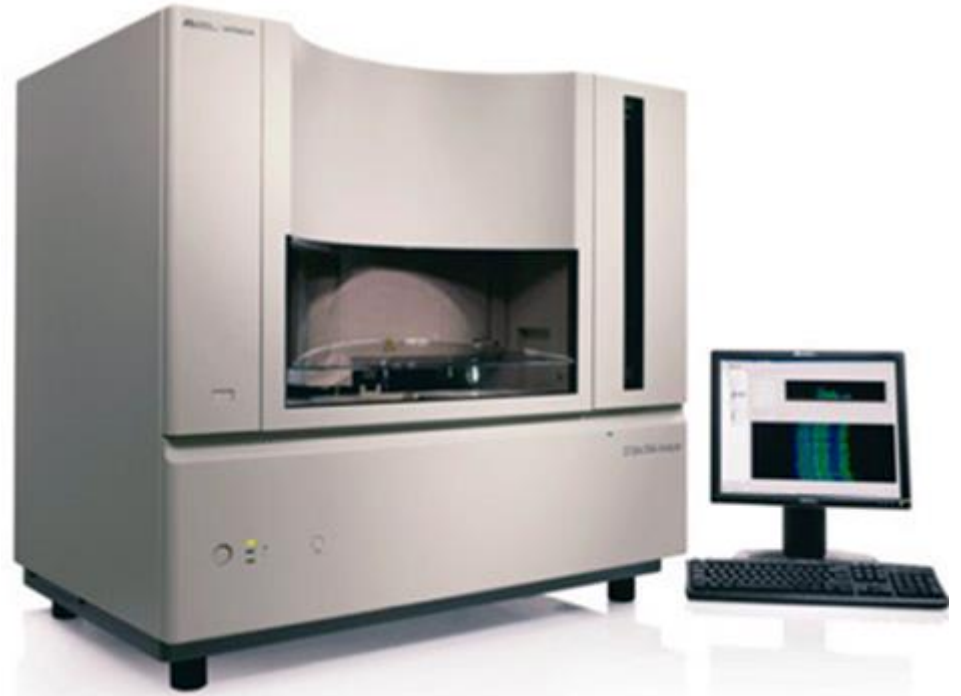
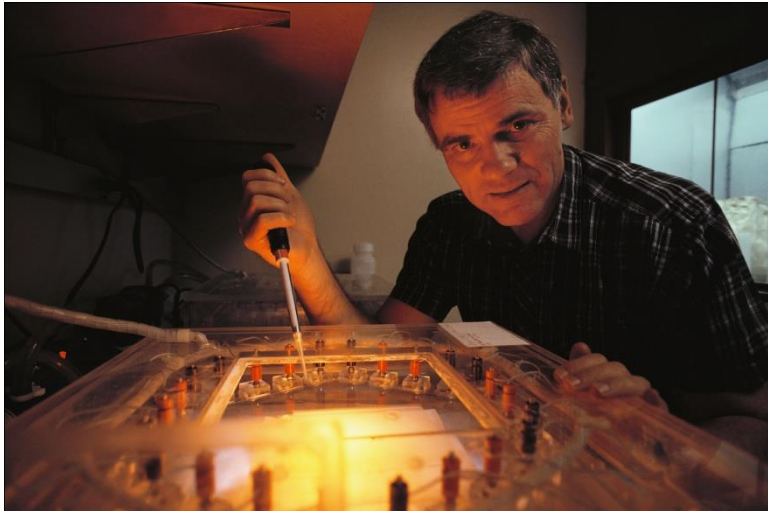
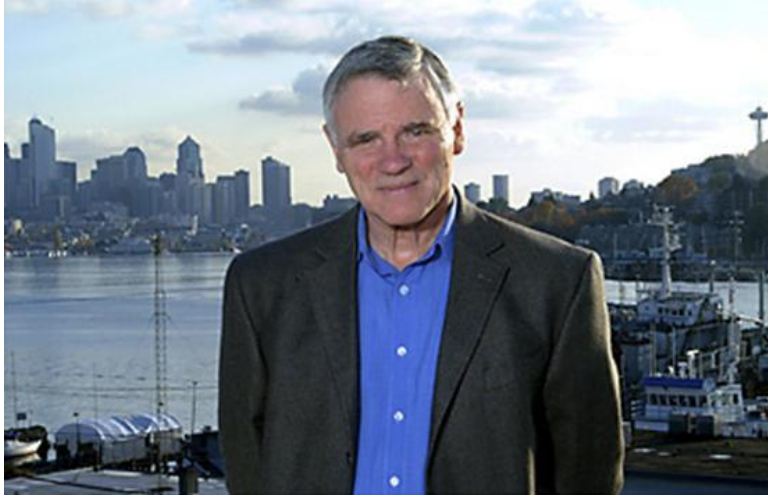
1980 г. – метод секвенирования ДНК

Основные этапы секвенирования ДНК методом Сенгера



Фрагменты ДНК клонируют *in vivo* и секвенируют с использованием ddNTPs, меченых флуоресцентными красителями. Образовавшиеся фрагменты ДНК разделяют капиллярным электрофорезом.

Лерой Худ (Leroy Hood) – родной отец автоматических ДНК- секвенаторов первого поколения



**Современный автоматический ДНК-
анализатор ABI 3730 фирмы Applied
Biosystems**

- 48 капилляров
- Время анализа – 2 часа
- Длина секвенируемого фрагмента ДНК - ~500 п.н.

Секвенирование генома человека – кульминация использования метода Сенгера

Основные участники проекта «Геном человека»:

- **Международный консорциум (1990- 2000 г.г.)**
Университеты и исследовательские центры США, Англии, Японии, Франции, Германии, Китая, Канады и Новой Зеландии
- **Американская частная фирма Celera (1998-2000 г.г.)**

Затраты проекта:

В каждом случае по ~3 миллиарда долларов

Френсис Коллинз (Francis Collins) – координатор международной программы «Геном человека»



**В 1993 г сменил Д. Уотсона на посту
Национального центра по
исследованию генома человека**

**Становится координатором
Международного консорциума по
секвенированию генома человека**

**В настоящее время директор
Национального института здоровья,
США**

Крейг Вентер – основатель фирмы Selera

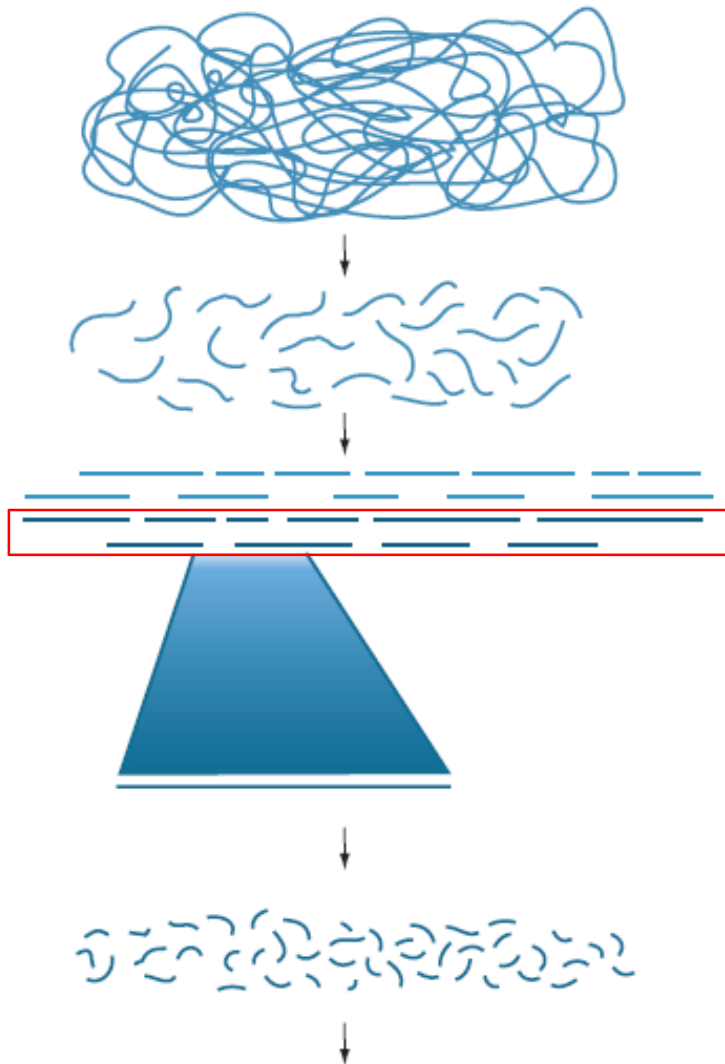


Craig Venter:
«Геном человека – это Я!»



**Цех секвенирования
ДНК методом Сенгера**

Стратегия секвенирования больших геномов методом дробовика (**Shotgun method**)



Геномная ДНК

ВАС-библиотека

Упорядоченные клоны, объединенные в протяженные контиги: выбирается наиболее короткий путь секвенирования

ВАС-клоны, выбранные для секвенирования

Фрагменты ВАС, секвенируемые методом дробовика

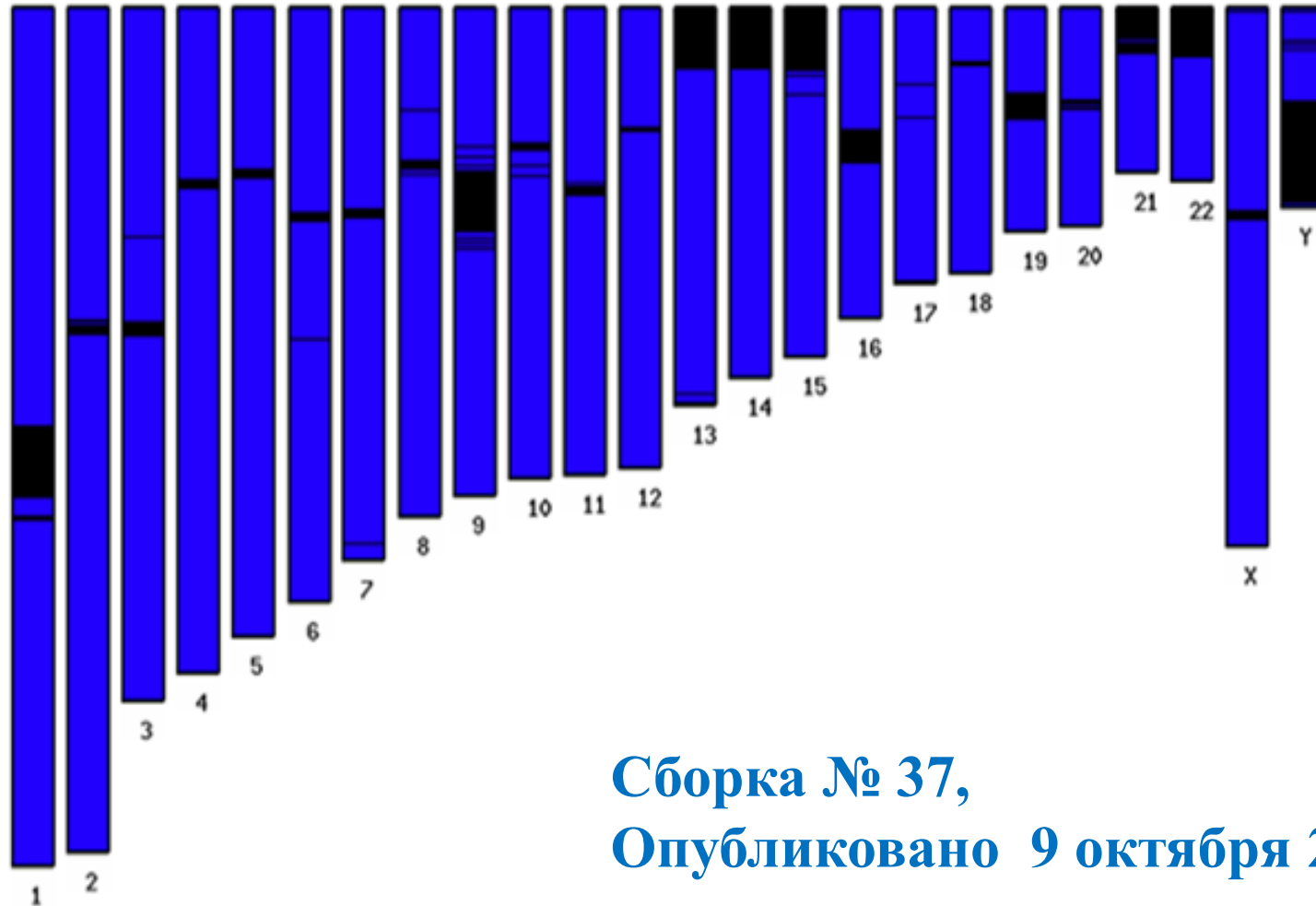
:CGTAAATGGGCTGATCATGCTTAAA
TGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG...

:CGTAAATGGGCTGATCATGCTTAAACCCTGTGCATCCTACTG...

Объединение клонов по перекрытию

Собранная последовательность

Современное состояние эталонной последовательности генома человека

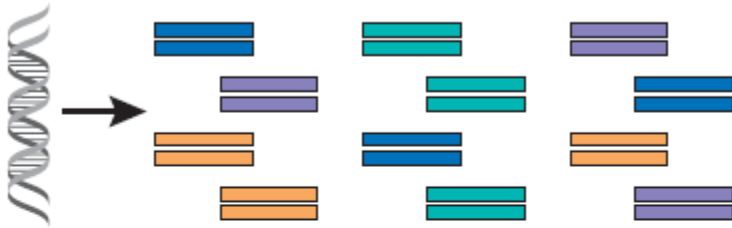


Сборка № 37,
Опубликовано 9 октября 2009 г.

Системы секвенирования ДНК второго поколения

1

Фрагментация ДНК



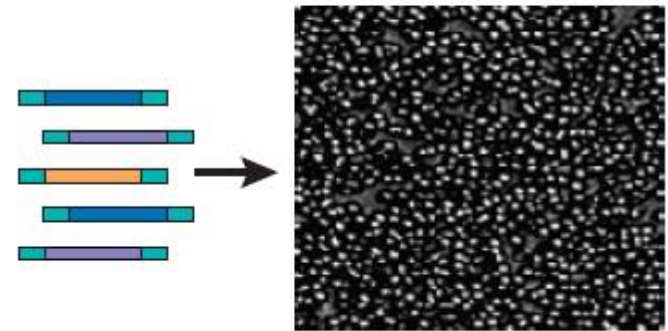
2

Лигирование адаптера



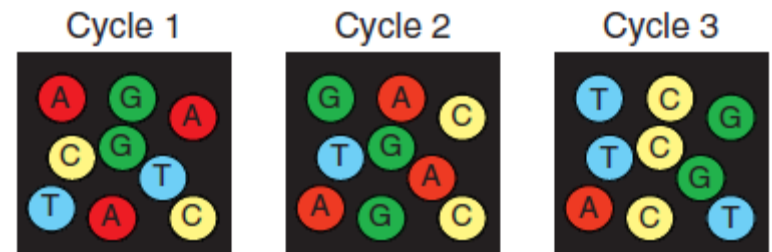
3

Получение полимеразных колоний - полоний



4

Циклическое секвенирование
микроматрицы

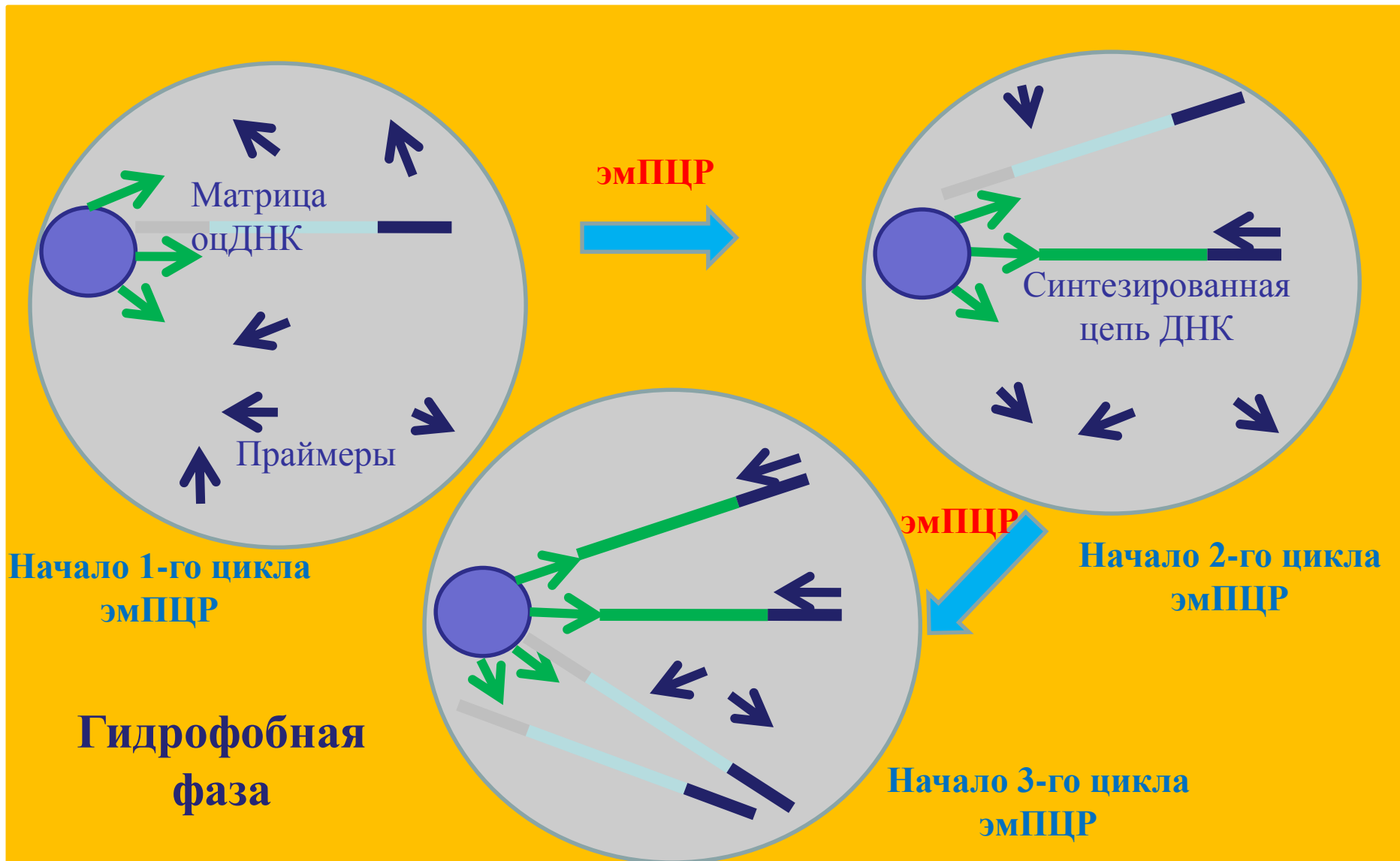


What is base 1? What is base 2? What is base 3?

Фрагменты ДНК лигируют с олигонуклеотидными адаптерами, каждый фрагмент одновременно амплифицируют *in vitro* и секвенируют с использованием флуоресцентных красителей

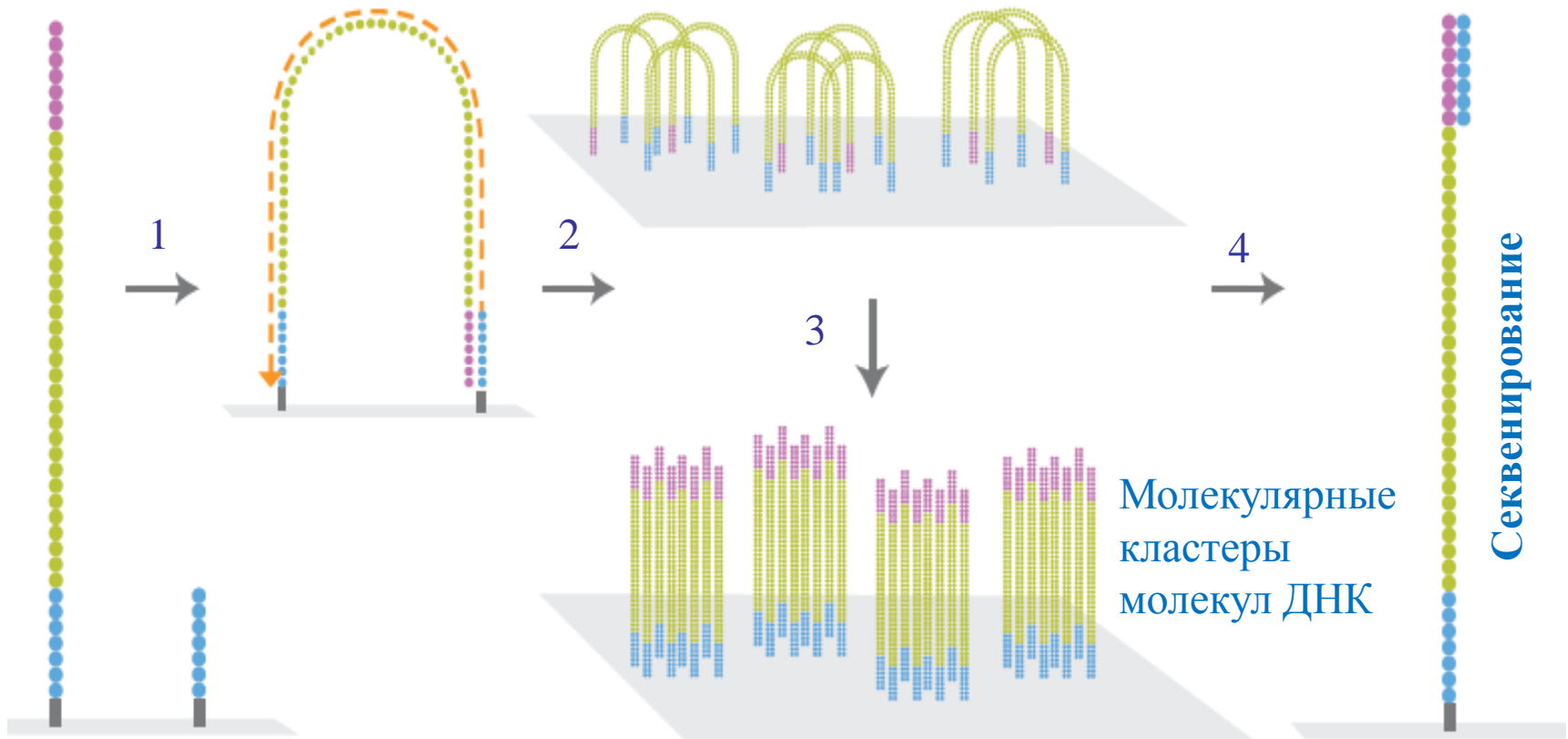
Полонии – полимеразные колонии

Эмульсионная (эм)ПЦР на мибочастицах с иммобилизованным праймером



Вторая стратегия получения полимеразных колоний в секвенаторах второго поколения

Аmplификация ДНК на твердой (стеклянной) подложке

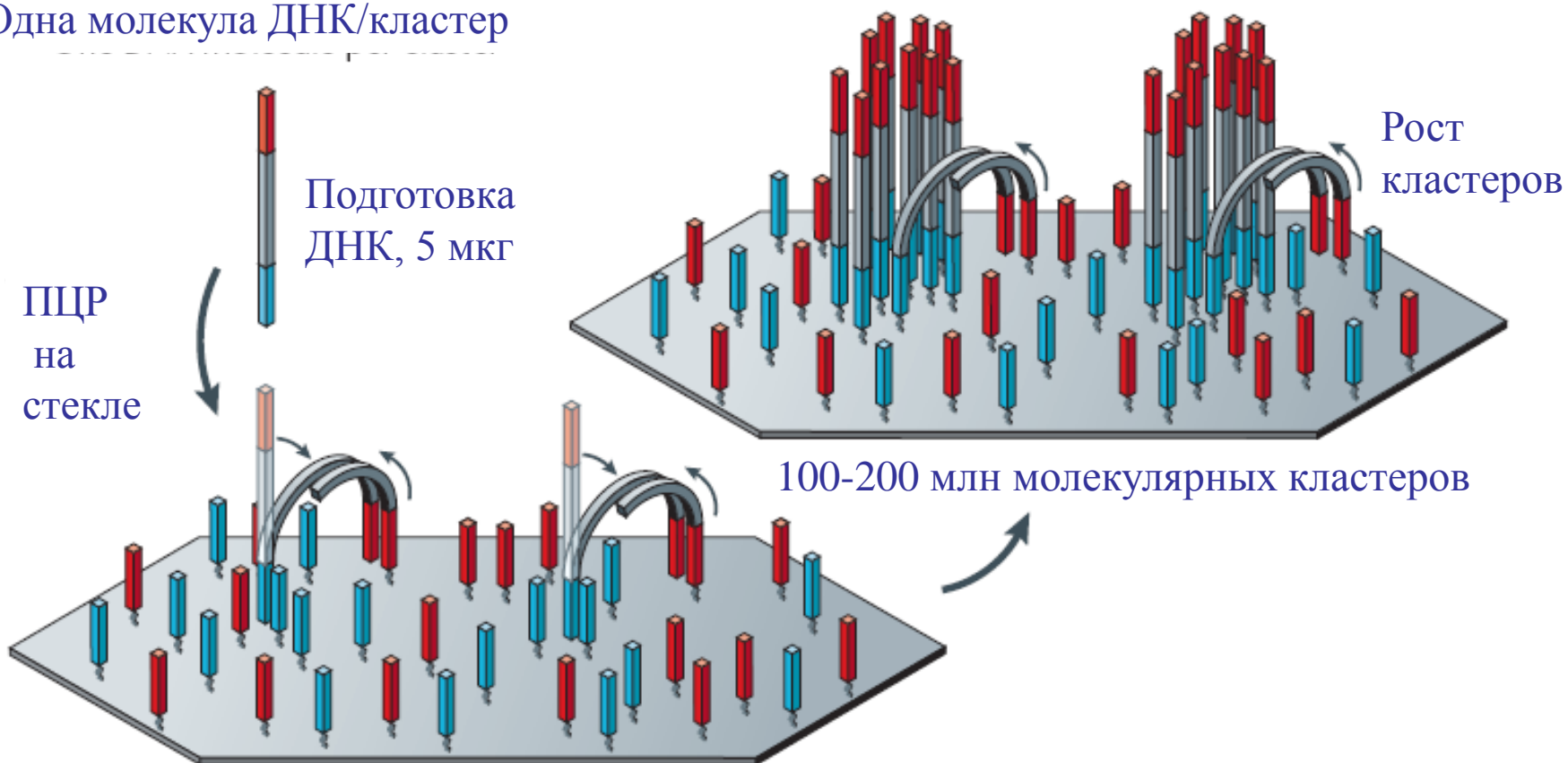


Иммобилизация праймеров и матрицы на стекле → ПЦР

Стратегии получения полимеразных колоний в секвенаторах второго поколения

Illumina/Solexa

Одна молекула ДНК/кластер



Арочная амплификация

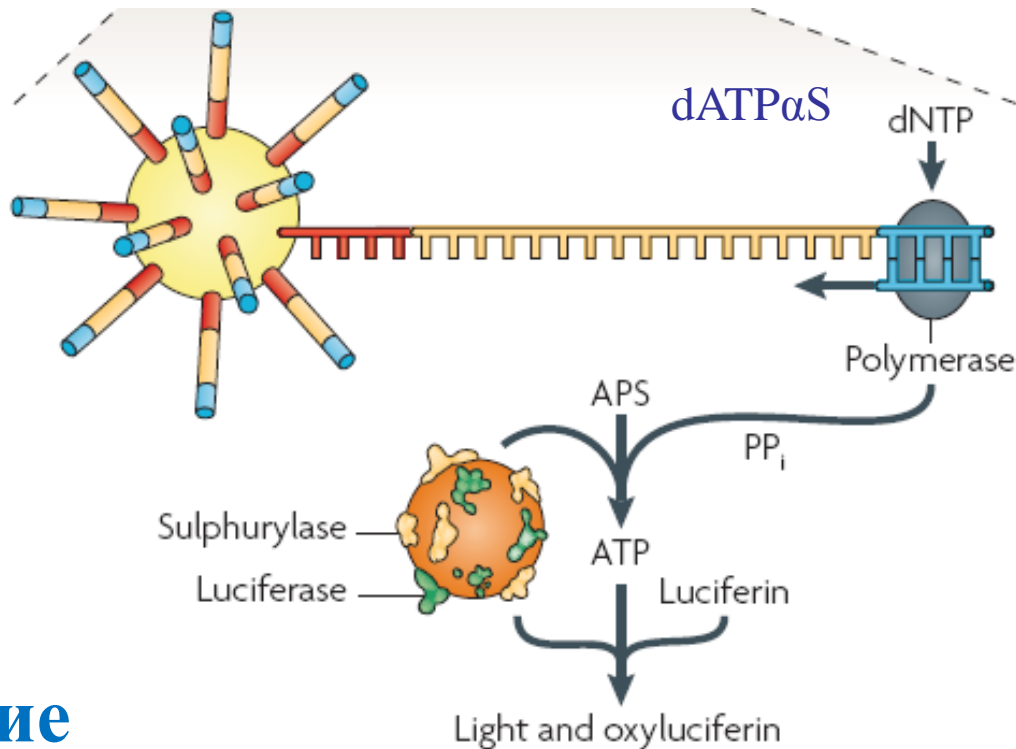
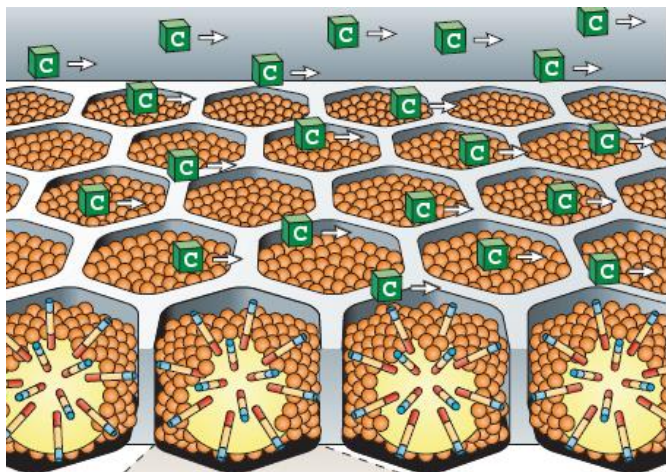
Пиросеквенатор второго поколения Roche GS-FLX 454



>1 млн одновременно
секвенируемых фрагментов ДНК
~400 нт - длина секвенируемого
участка ДНК
500 000 USD - стоимость в 2010 г.



Вариант пиросеквенатора для
исследовательских лабораторий
Размер лазерного принтера
Производство начнется в 2010 г.



PicoTiterPlate (PTP)
Система Roche/454's Titanium

Пиросеквенирование

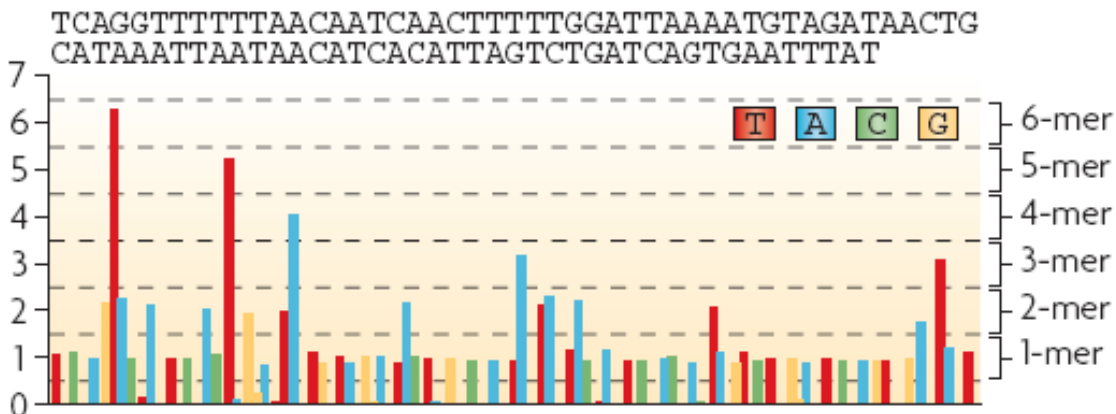
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ДНК

Яркость свечения отдельной
ячейки пропорциональна
количеству присоединенных
нуклеотидов

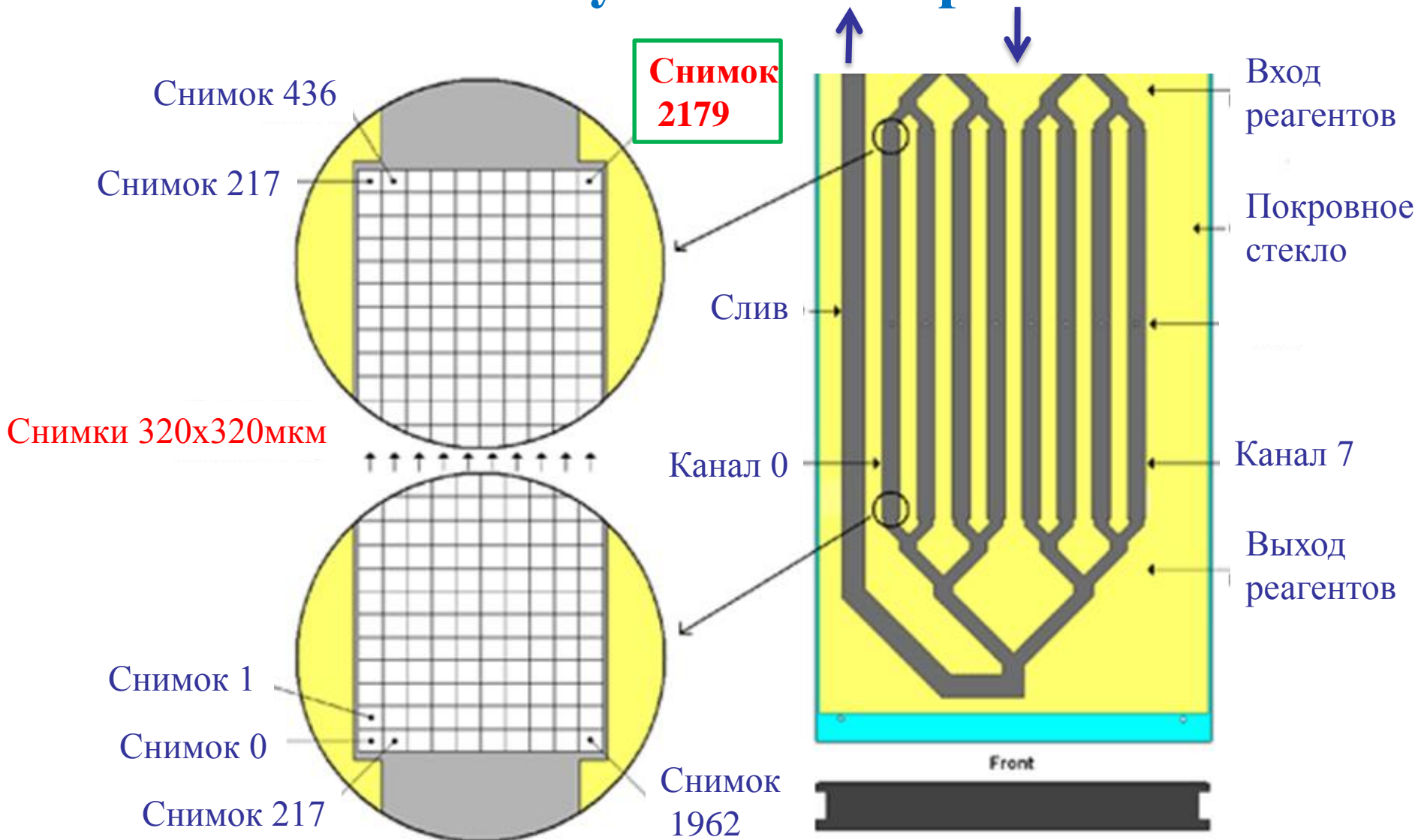
d

Flowgram

APS – аденозин-
5'-фосфосульфат

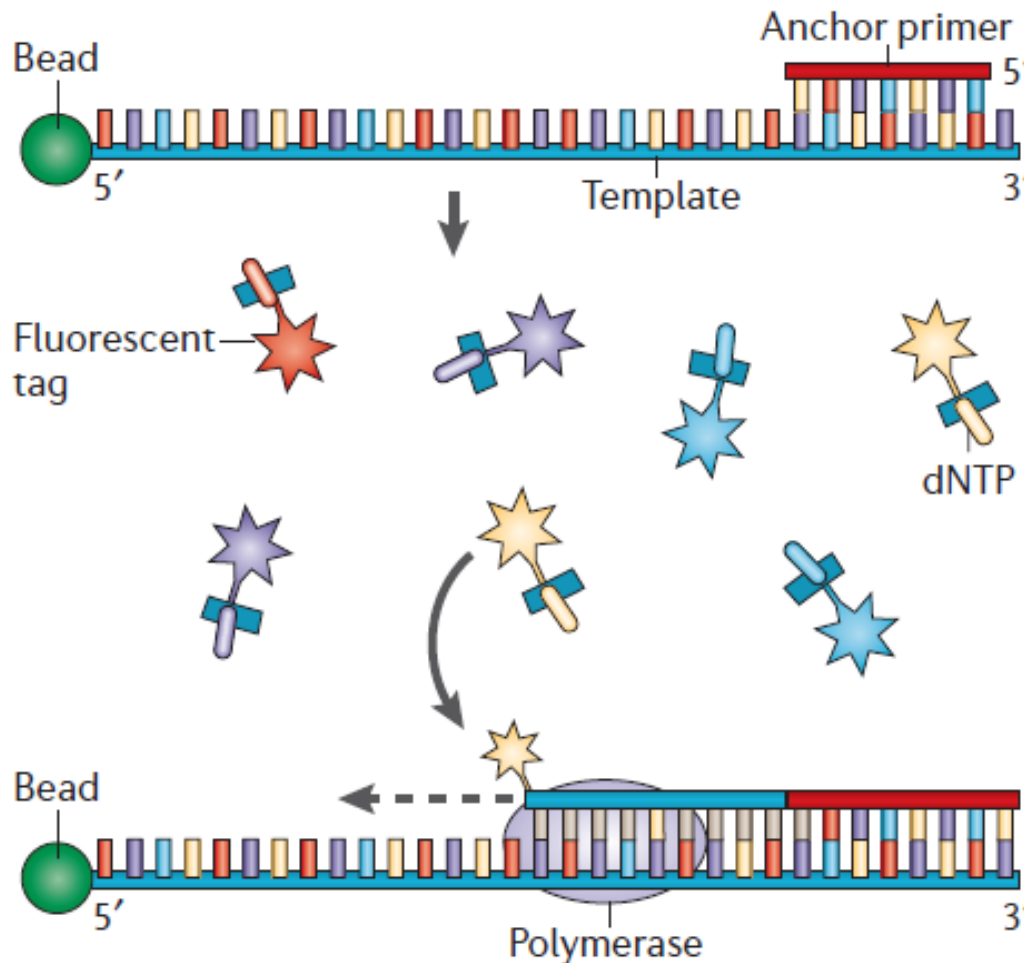


Проточная ячейка Полонатора и схема получения изображений



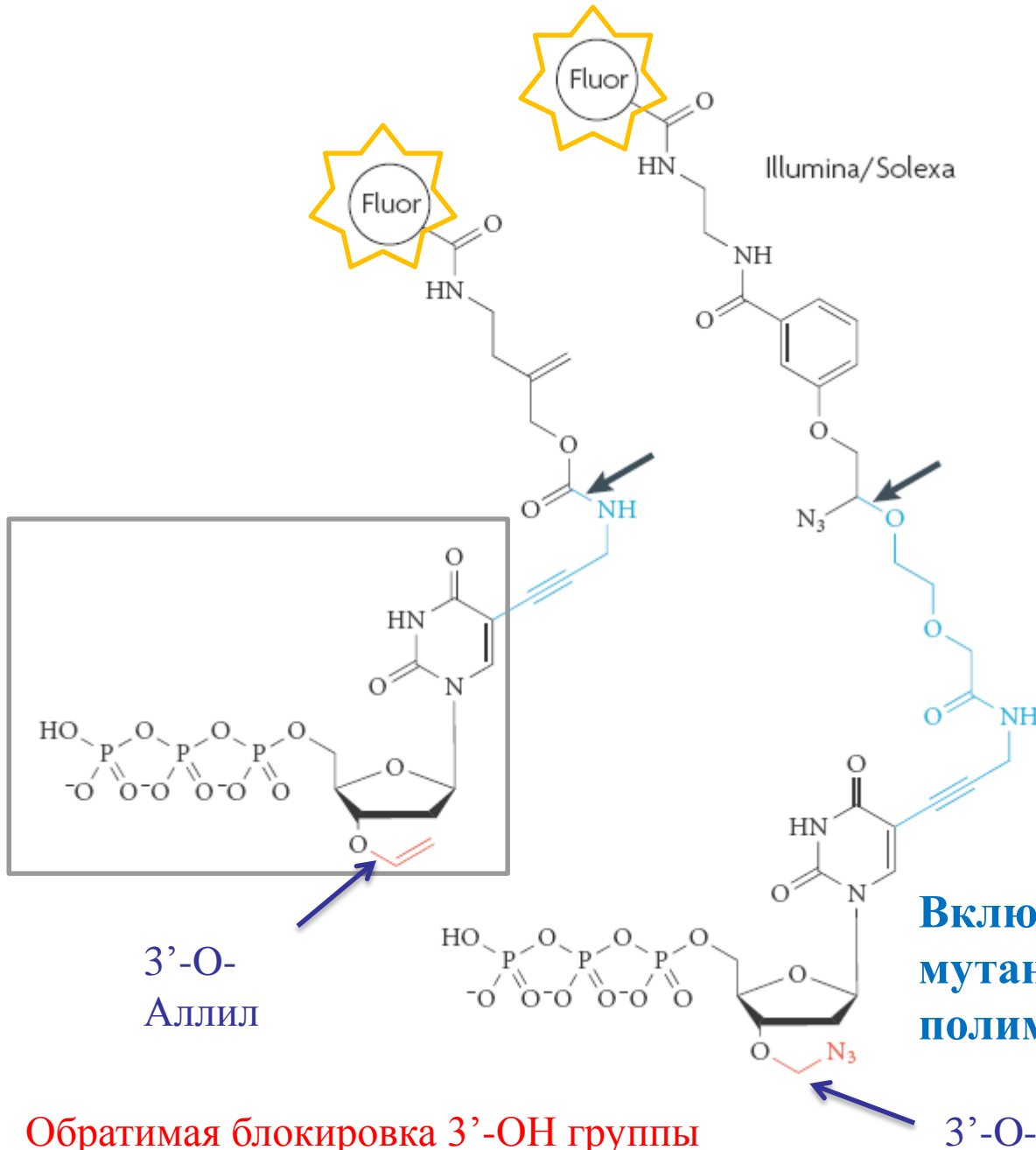
Стратегии секвенирования кластеров ДНК в секвенаторах второго поколения

2. Секвенирование синтезом (sequencing by synthesis –SBS)



- Включение флуоресцентного терминатора
- Считывание
- Деблокирование и удаление флуорофора

Структура некоторых обратимых терминаторов синтеза ДНК

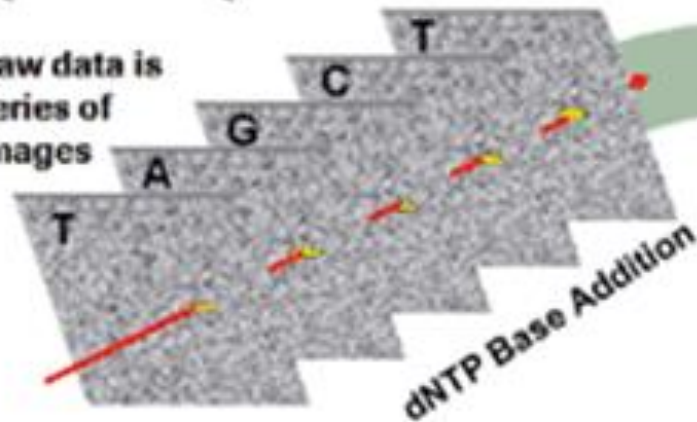


Извлечение данных и их последующий анализ

GS FLX Data

Image Processing Overview

1. Raw data is series of images



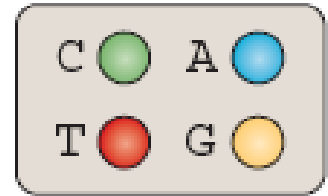
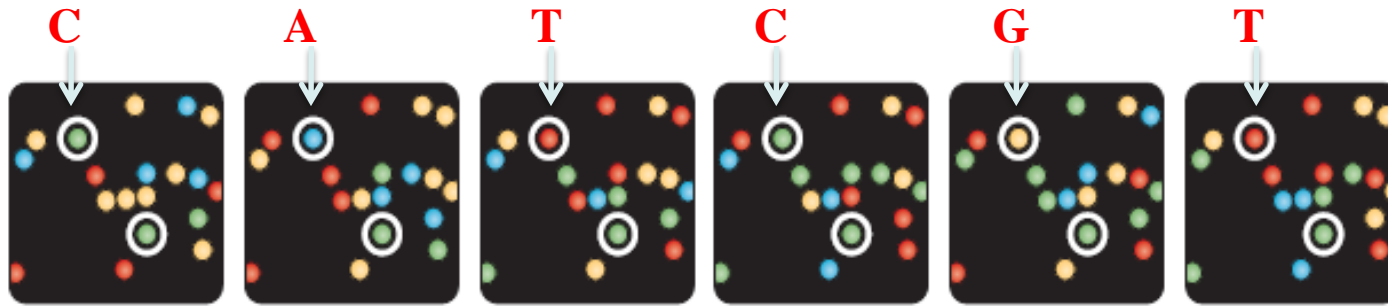
2. Each well's data extracted, quantified and normalized



3. Read data converted into "flowgrams"

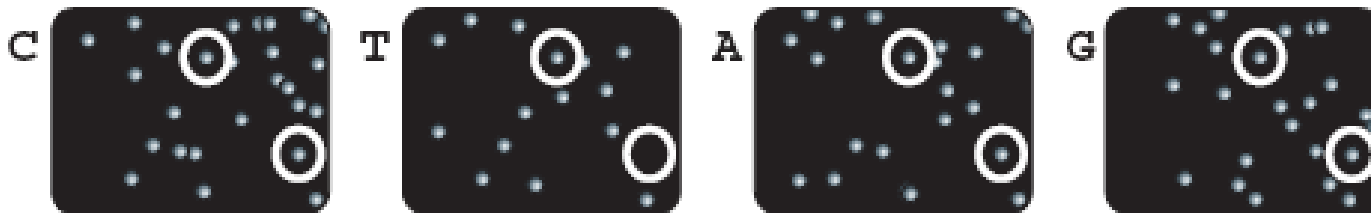
После включения в строящиеся цепи ДНК очередного нуклеотида, меченого флуорофором, флуоресценцию в каждой точке нормализуют и измеряют количественно и полученные данные представляют графически в виде «флоуграммы»

Извлечение информации из неупорядоченных микроматриц при секвенировании ДНК



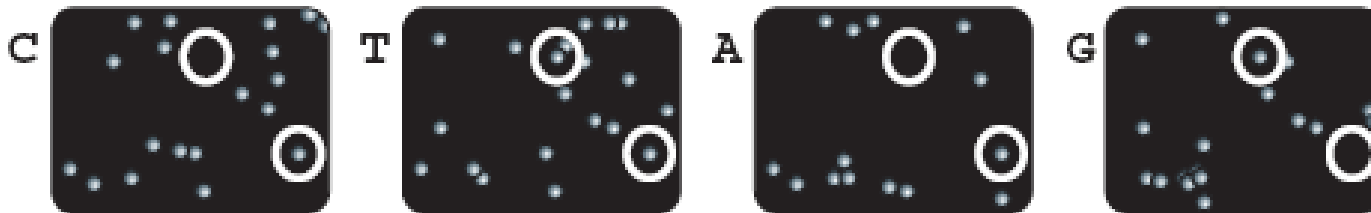
Каждый dNTP
мечен своим
флуорофором

Циклы: 1 2 3 4 5 6



Все dNTPs
мечены одним
флуорофором

Циклы: 1 2 3 4

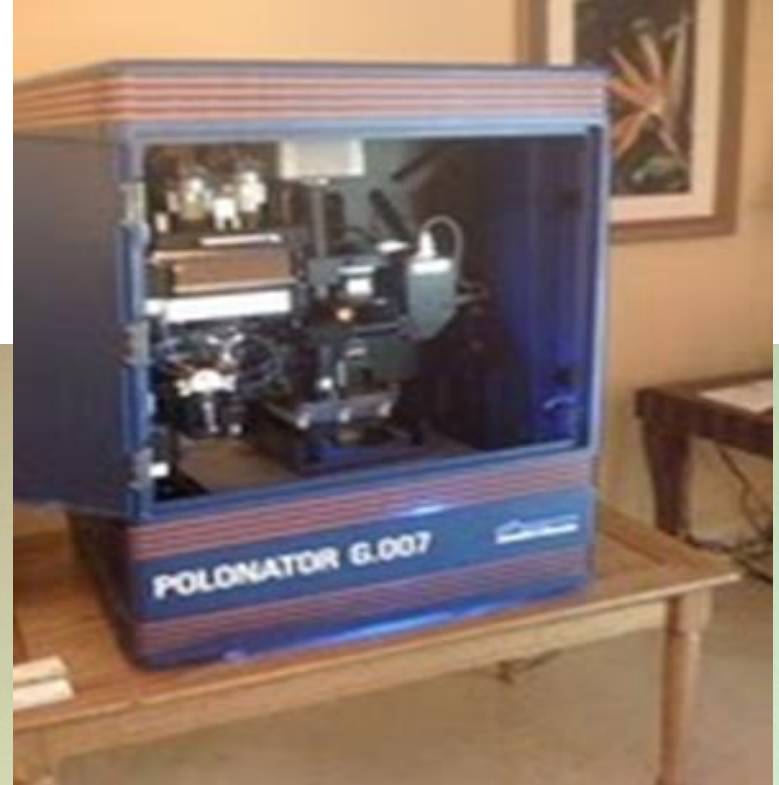
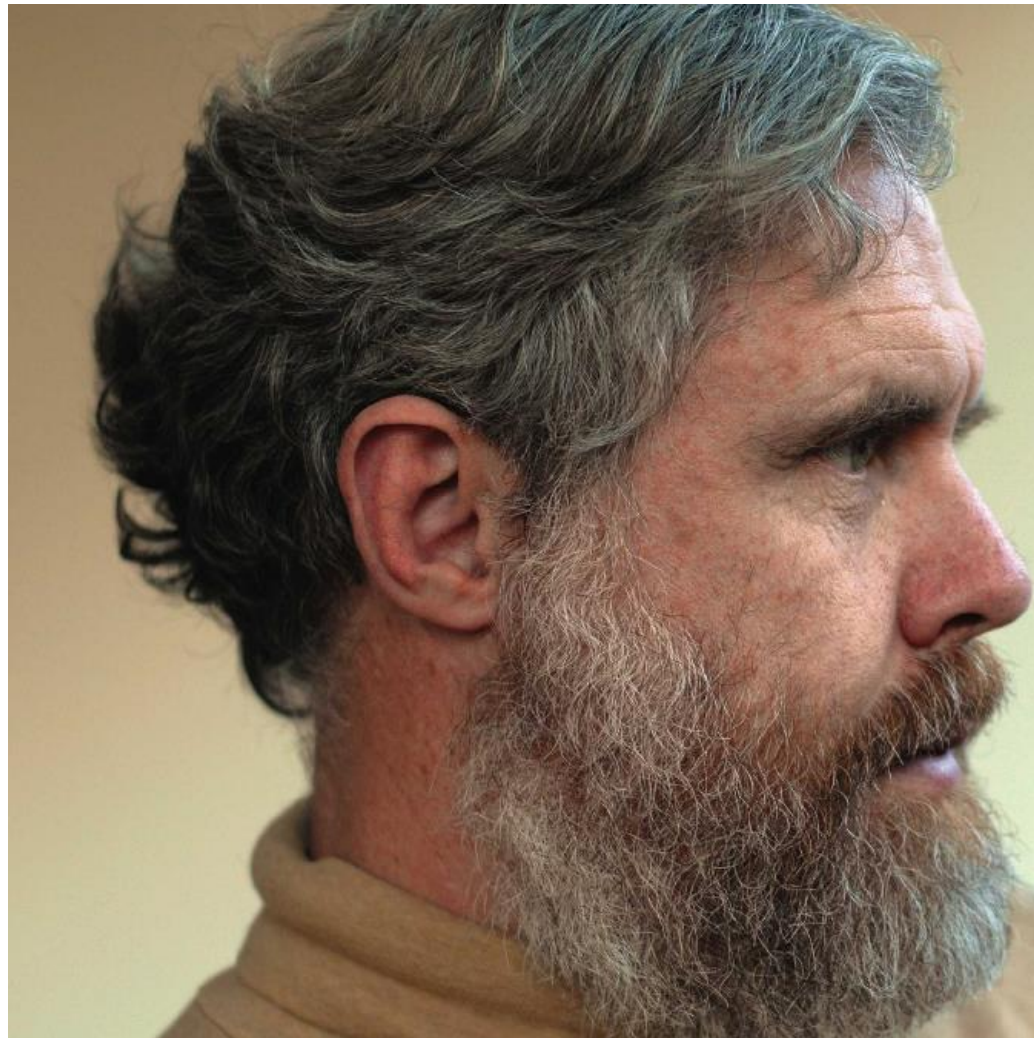


В каждом
цикле
добавляют
только один
dNTP

Циклы: 5 6 7 8

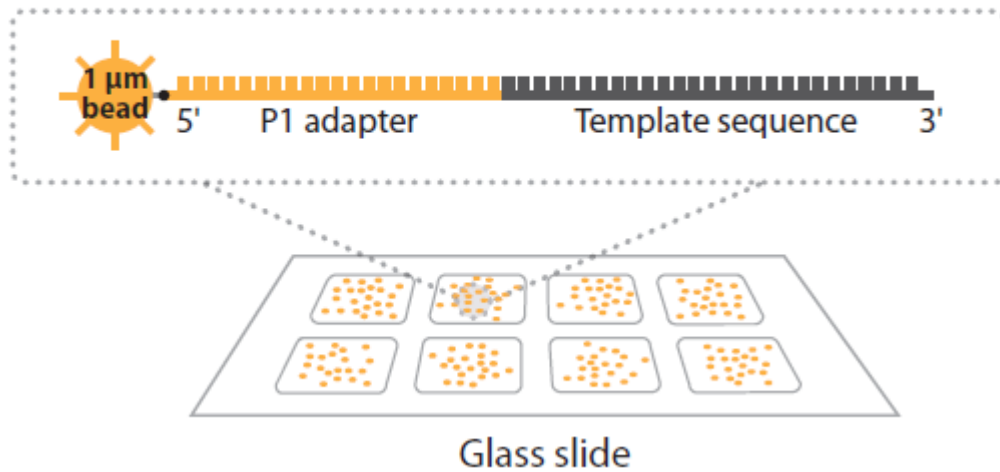
Последовательности, верхний ряд: **СТАGТG**, нижний ряд: **САGСТA**

Джорж Черч (G. Church) – изобретатель полонатора

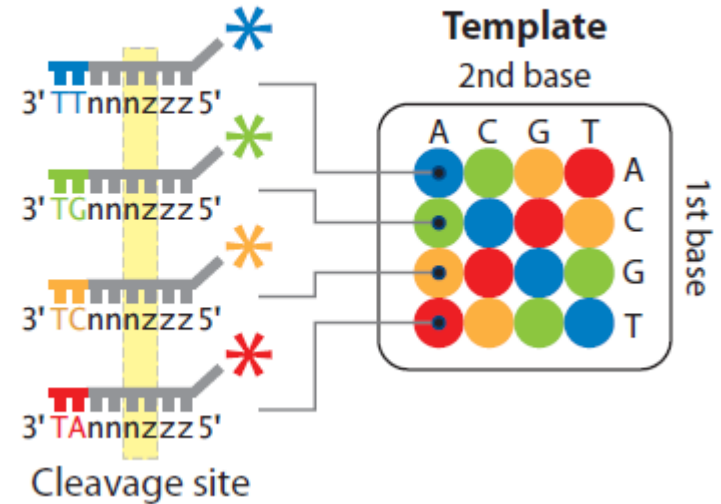


3. Секвенирование лигированием

SOLiD™ substrate



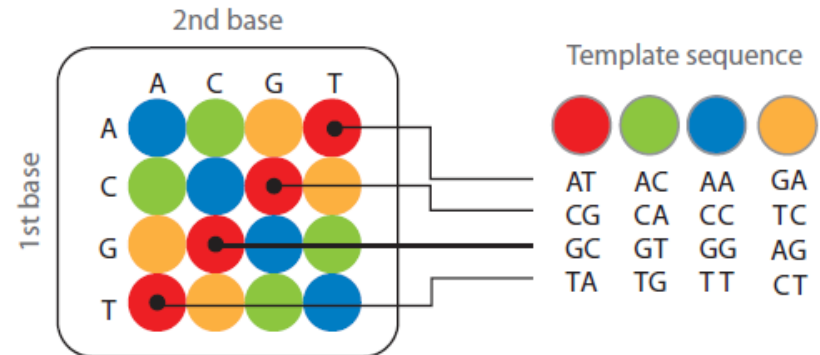
Di base probes



- 8-нуклеотидные зонды
- Два 3'-концевых нуклеотида зонда известны, остальные 6 – вырождены
- Каждый зонд с известным динуклеотидом мечен своим флуорофором

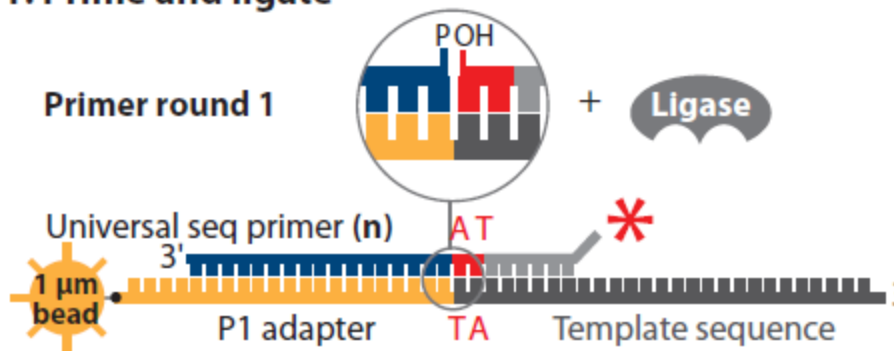
n – любое основание, **z** - инозин

Possible dinucleotides encoded by each color

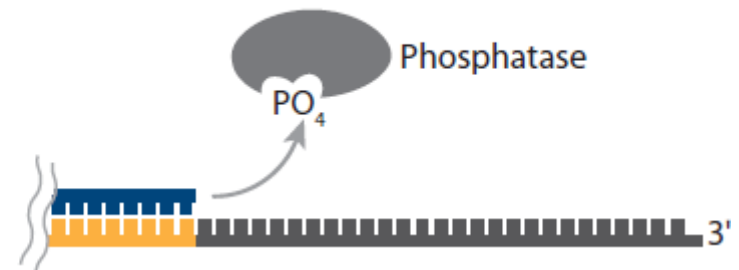


Секвенирование лигированием (Этапы 1 – 4)

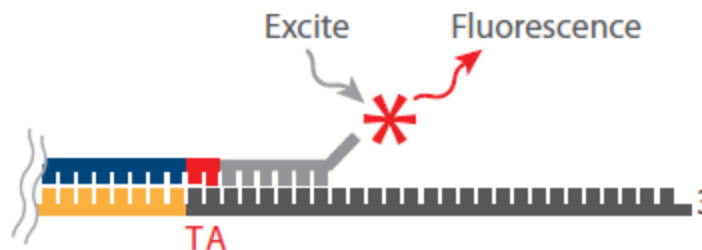
1. Prime and ligate



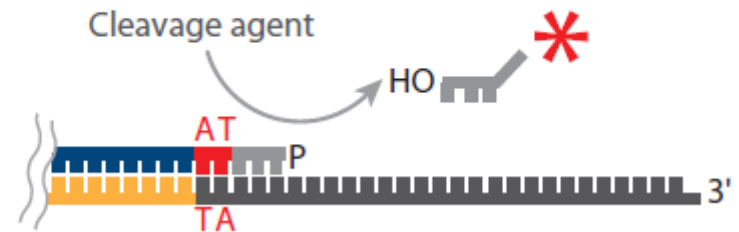
3. Cap unextended strands



2. Image



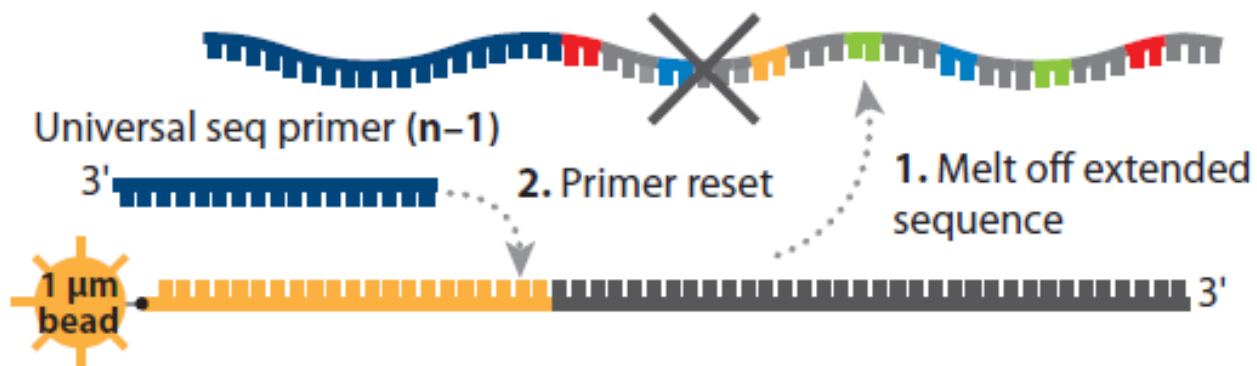
4. Cleave off fluor



Секвенирование лигированием (Этапы 5 – 6)

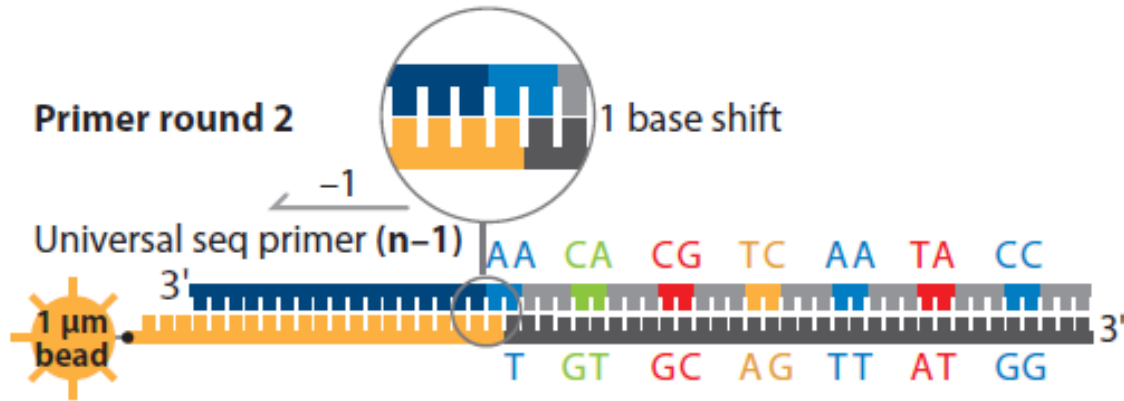
5. Repeat steps 1–4 to extend sequence

Ligation cycle 1 2 3 4 5 6 7 ... (n cycles)



Секвенирование лигированием (Окончание)

7. Repeat steps 1–5 with new primer

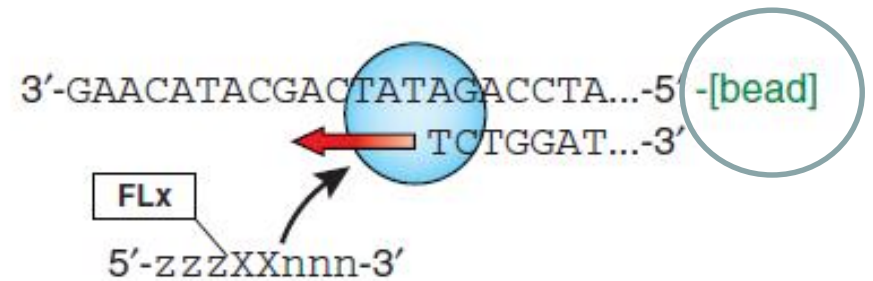
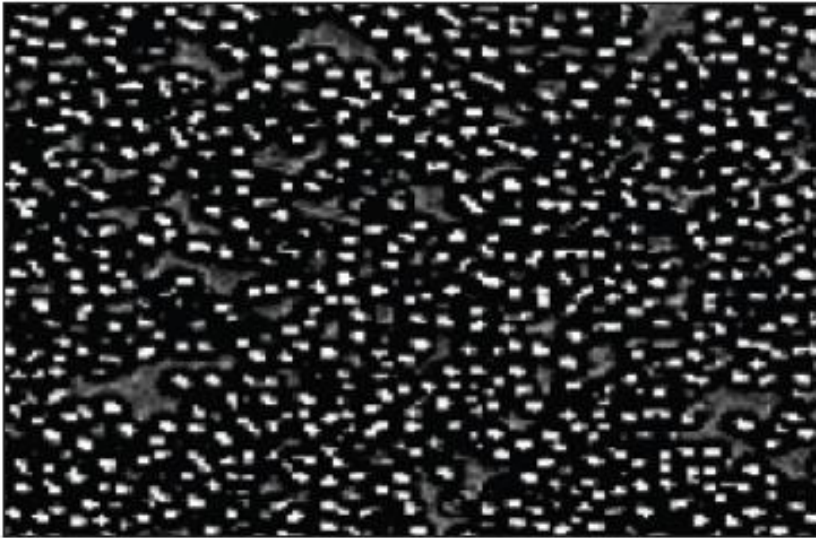


8. Repeat Reset with , n-2, n-3, n-4 primers

		Read position																																					
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
Primer round	1 Universal seq primer (n) 3'		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
	2 Universal seq primer (n-1) 3'	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
	3 Universal seq primer (n-2) 3'	Bridge probe		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
	4 Universal seq primer (n-3) 3'	Bridge probe		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	5 Universal seq primer (n-4) 3'	Bridge probe		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● Indicates positions of interrogation Ligation cycle

Секвенирование лигированием - резюме



1. Ligate labeled, structured octamer population
2. Image, cleave, repeat $\times 5$
3. Reset and start again with new offset

**Картина в ССD-имиджере
после лигирования одного
набора олигонуклеотидных
зондов**

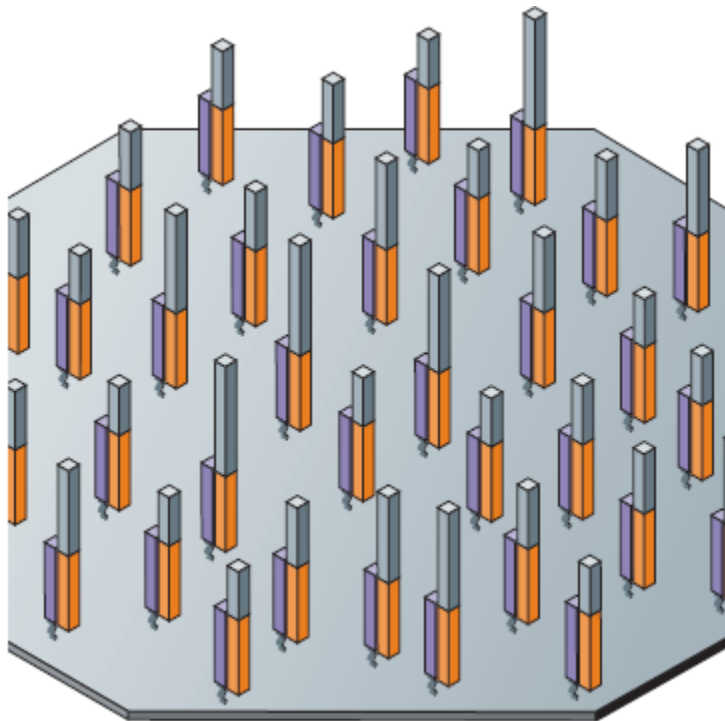
**Общая схема процесса
секвенирования лигированием**

Системы секвенирования ДНК третьего поколения

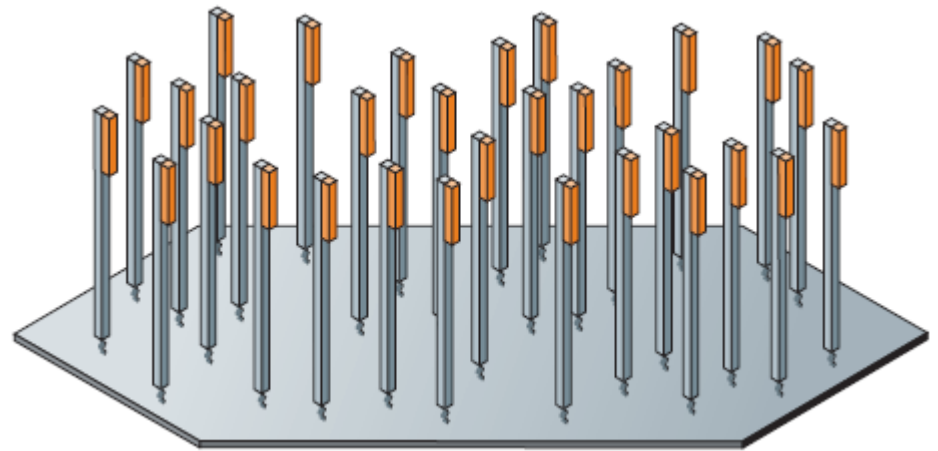
**Секвенирование отдельных молекул
ДНК в реальном времени**

Стратегии подготовки анализируемой ДНК в секвенаторах третьего поколения Helicos

Иммобилизован универсальный праймер,
Секвенирование по одной цепи



Иммобилизованы молекулы ДНК,
Секвенирование по двум цепям



После иммобилизации стеклянные подложки содержат миллиарды молекул секвенируемой одноцепочечной ДНК

HeliScore – секвенатор отдельных молекул ДНК фирмы Helicos (США)

Секвенатор



Анализатор



Проточная микроячейка

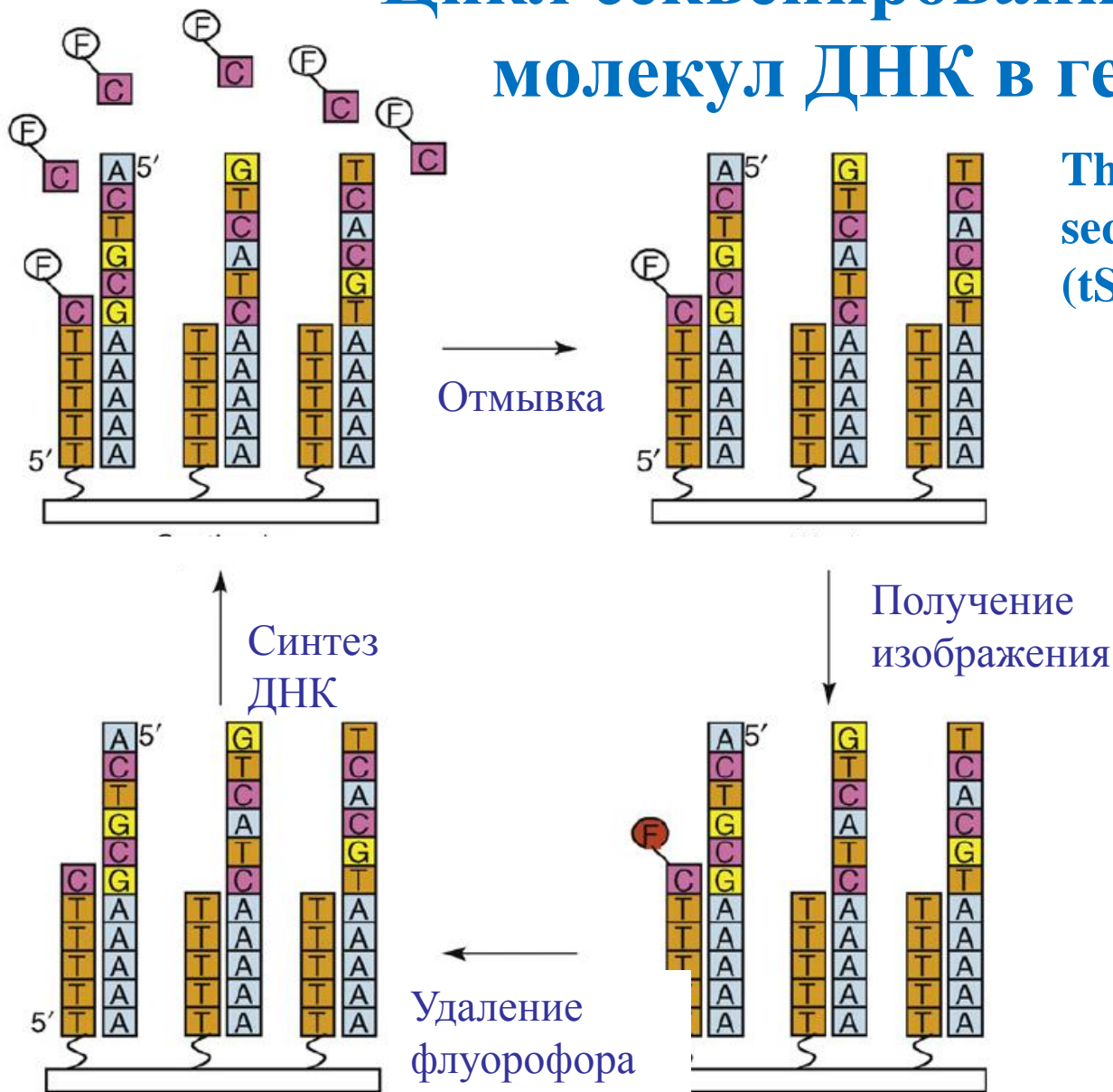


Секвенатор: автоматизированная система одновременного синтеза ДНК, получения и анализа изображений

Анализатор: несколько компьютеров, системный сервер, сеть, 28 Тб памяти – достаточно для двух экспериментов

Проточная микроячейка: 25 каналов, одновременный анализ до 50 образцов ДНК

Цикл секвенирования отдельных молекул ДНК в гелиоскопе



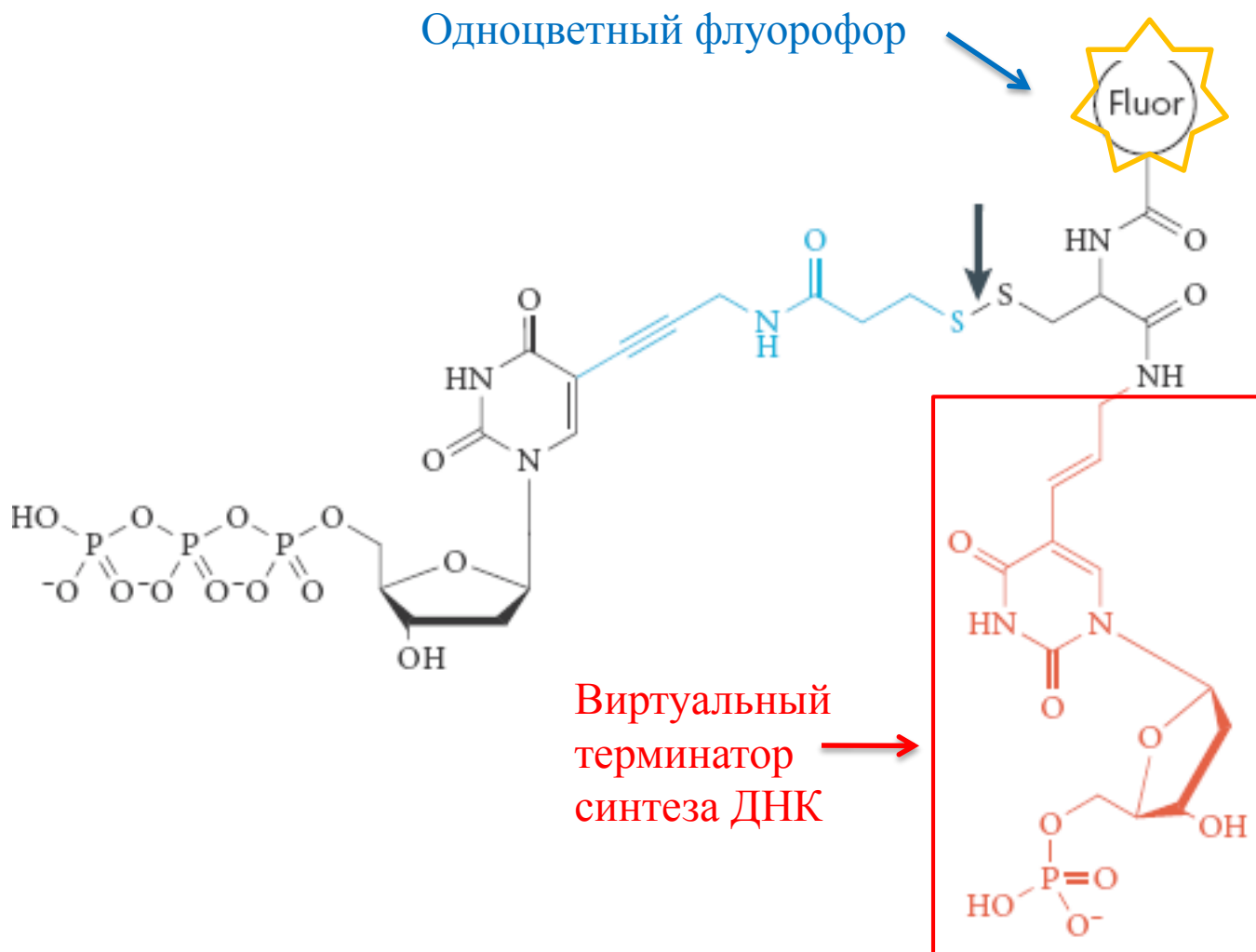
The true single-molecule sequencing technology (tSMS)

Фирма Helicos Biosciences

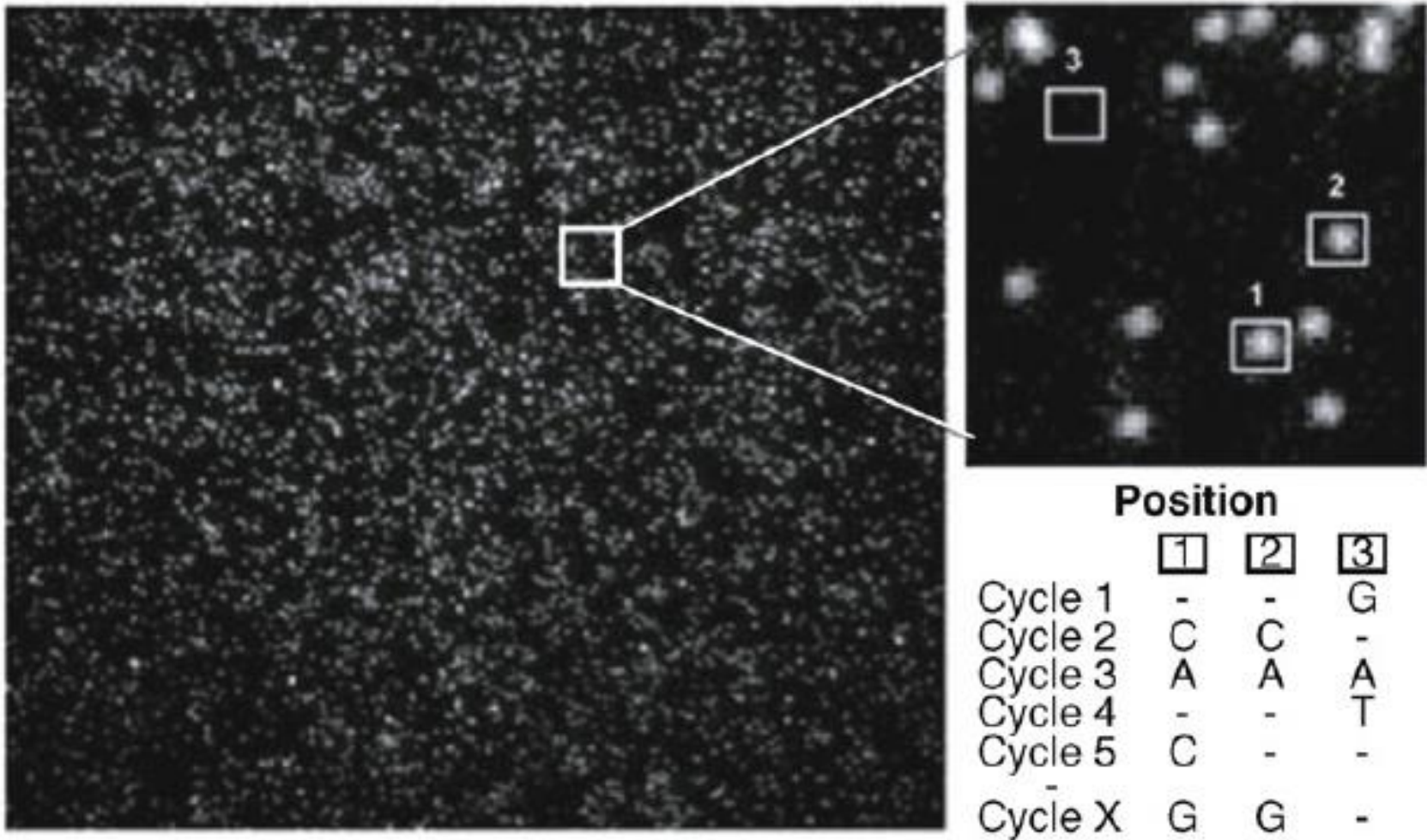
Цикл:

- Нуклеотид, меченый одним и тем же флуорофором, вводят в проточную ячейку
- Отмывают невключившиеся
- Получают изображение
- Удаляют флуорофор и терминатор

Структура нуклеотида с виртуальным терминатором синтеза ДНК (Helicos Biosciences)



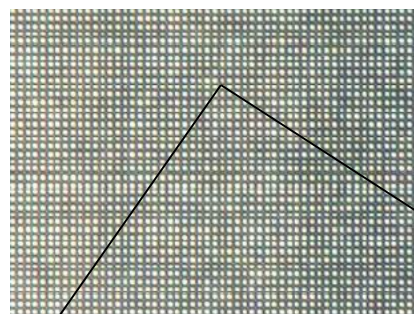
Извлечение информации из изображений, полученных в гелиоскопе



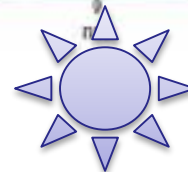
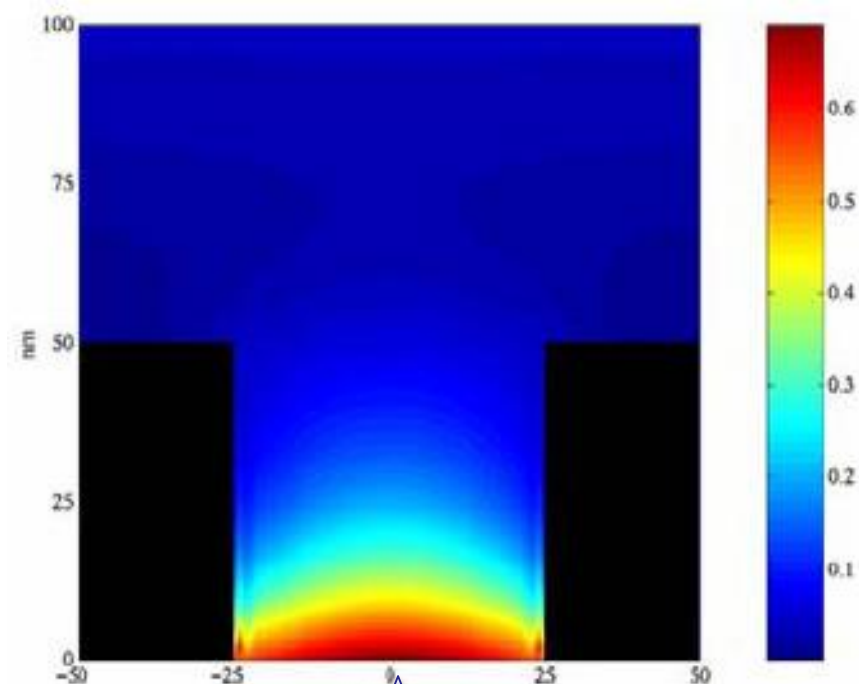
Фирма Helicos

Секвенатор третьего поколения фирмы Pacific Biosciences

Строение и принцип действия SMRT-чипа (Single Molecule Real Time Sequencing-chip)



SMRT-чип
43,5 x 32,8 мкм

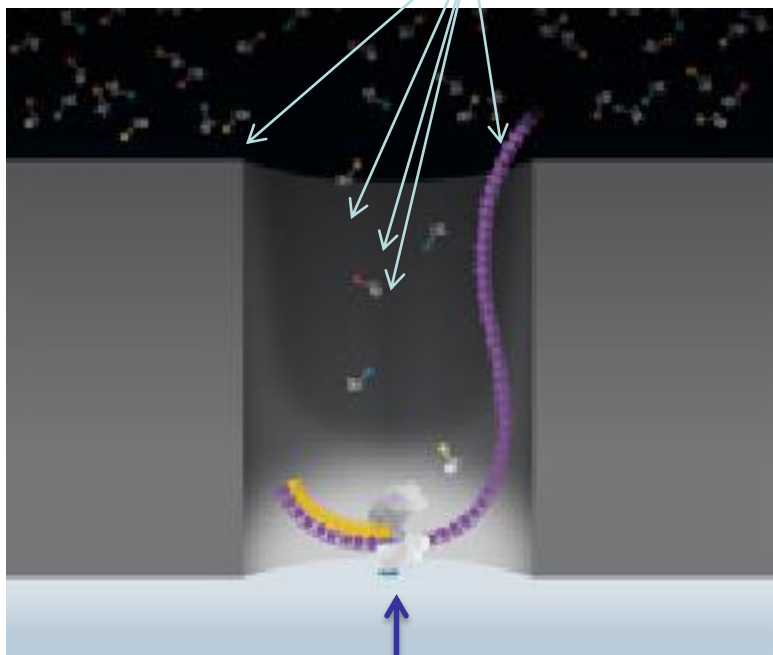


Источник света

Диаметр отверстия каждого волновода (50 нм) в SMRT-чипе значительно меньше длины волны видимого света, поэтому свет проникает вглубь лишь на небольшое расстояние

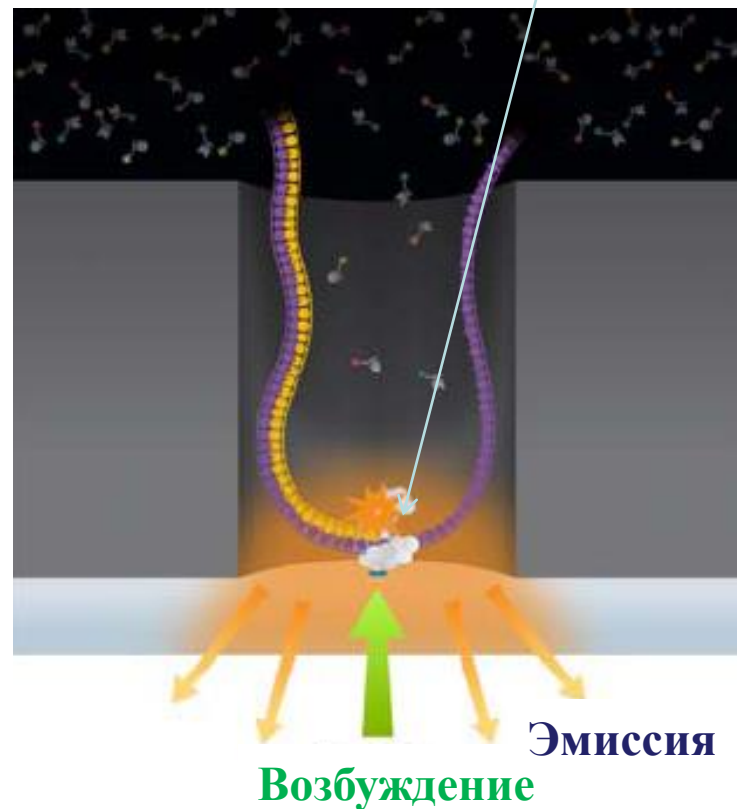
Схема синтеза ДНК в ZMW-волноводе

Меченые
dNTPs



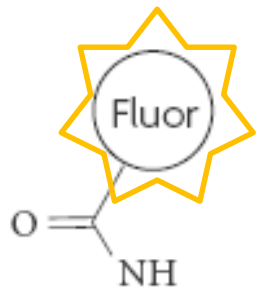
Одна молекула ДНК-
полимеразы иммобилизована на
дне каждого волновода

Включившийся
dNTP

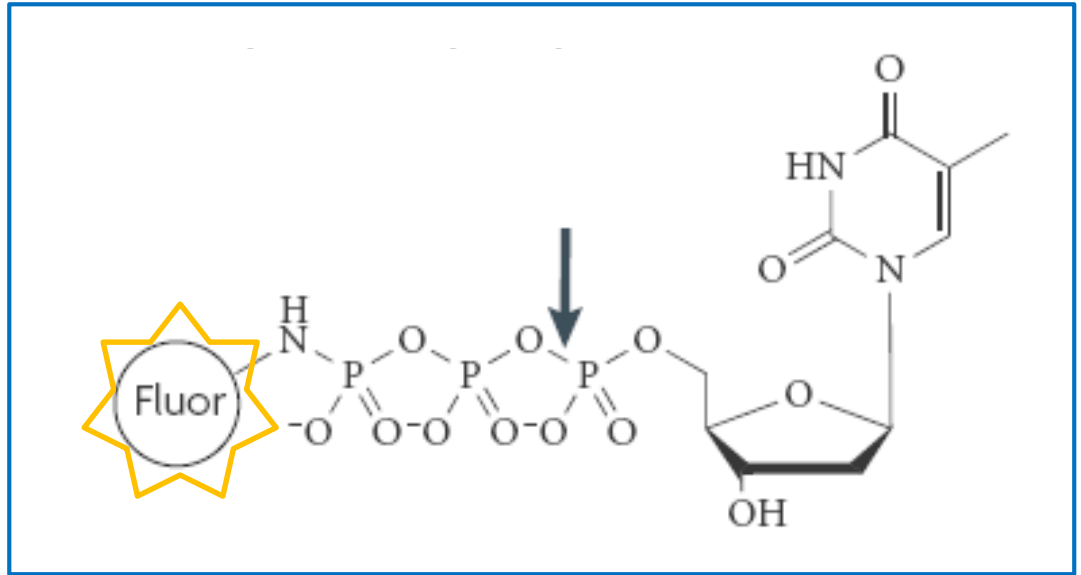
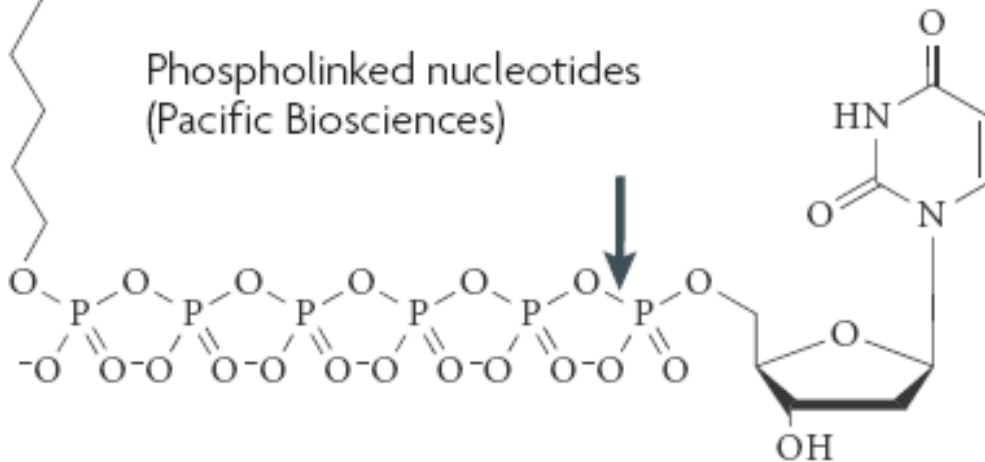


Эмиссия
Возбуждение

Производные нуклеотидов для измерения флуоресценции в реальном времени

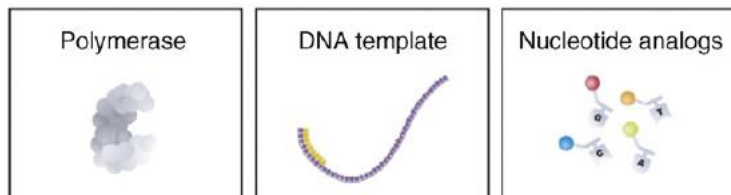


Phospholinked nucleotides
(Pacific Biosciences)

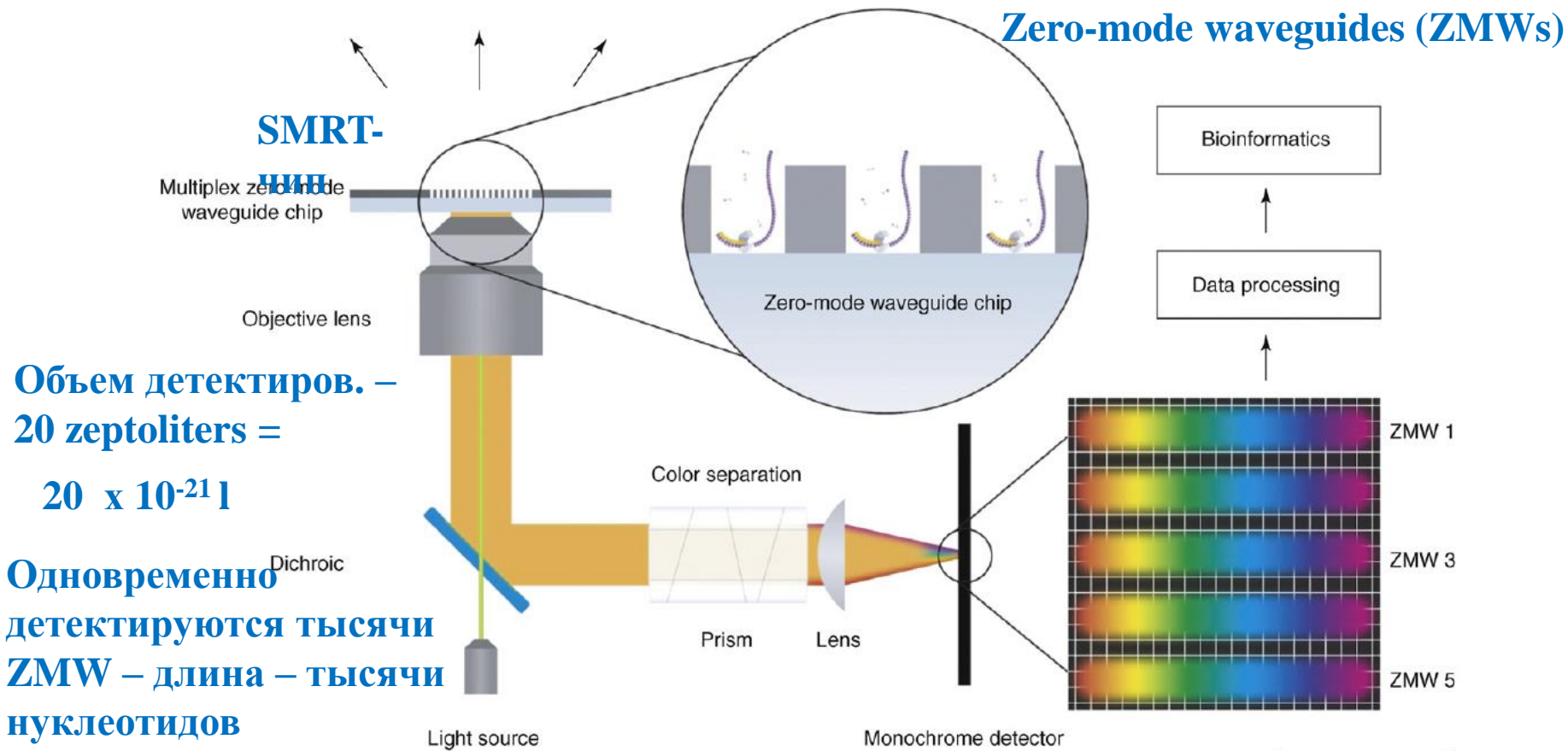


**Включение нуклеотида
в ДНК сопровождается
освобождением
флуорофора**

Секвенирование отдельных молекул ДНК в реальном времени (Pacific Biosciences)



Флуорофор присоединен к фосфатной группе. Каждый нуклеотид мечен своим флуорофором

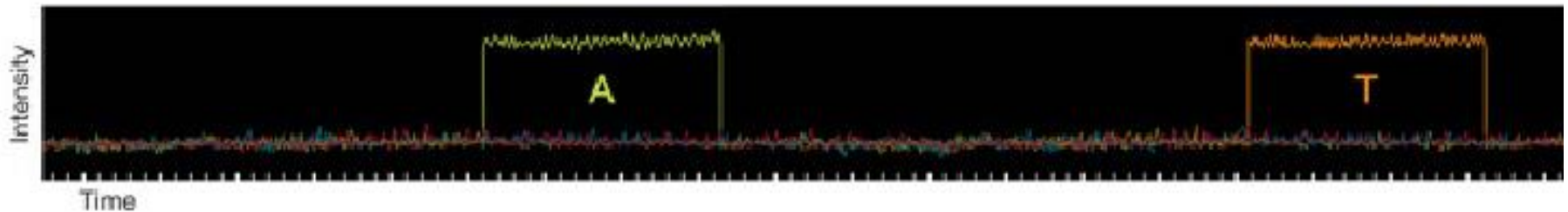


Объем детекторов. –
20 zeptoliters =

$20 \times 10^{-21} \text{ l}$

Одновременно
детектируются тысячи
ZMW – длина – тысячи
нуклеотидов

Процесс секвенирования ДНК на SMRT-чипе

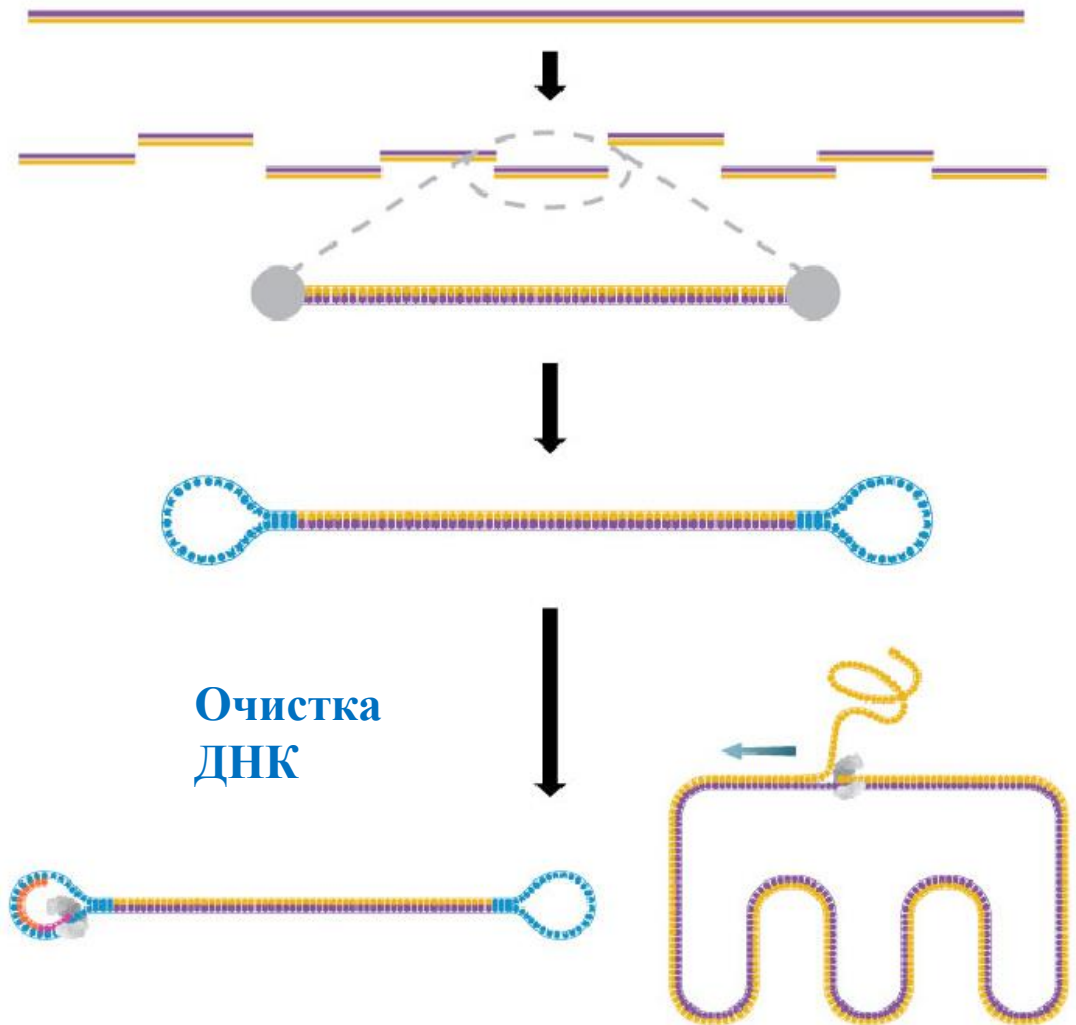


Включающийся в ДНК меченый нуклеотид задерживается в объеме считывания флуоресценции в течение миллисекунд, свободно диффундирующий нуклеотид – в течение наносекунд.

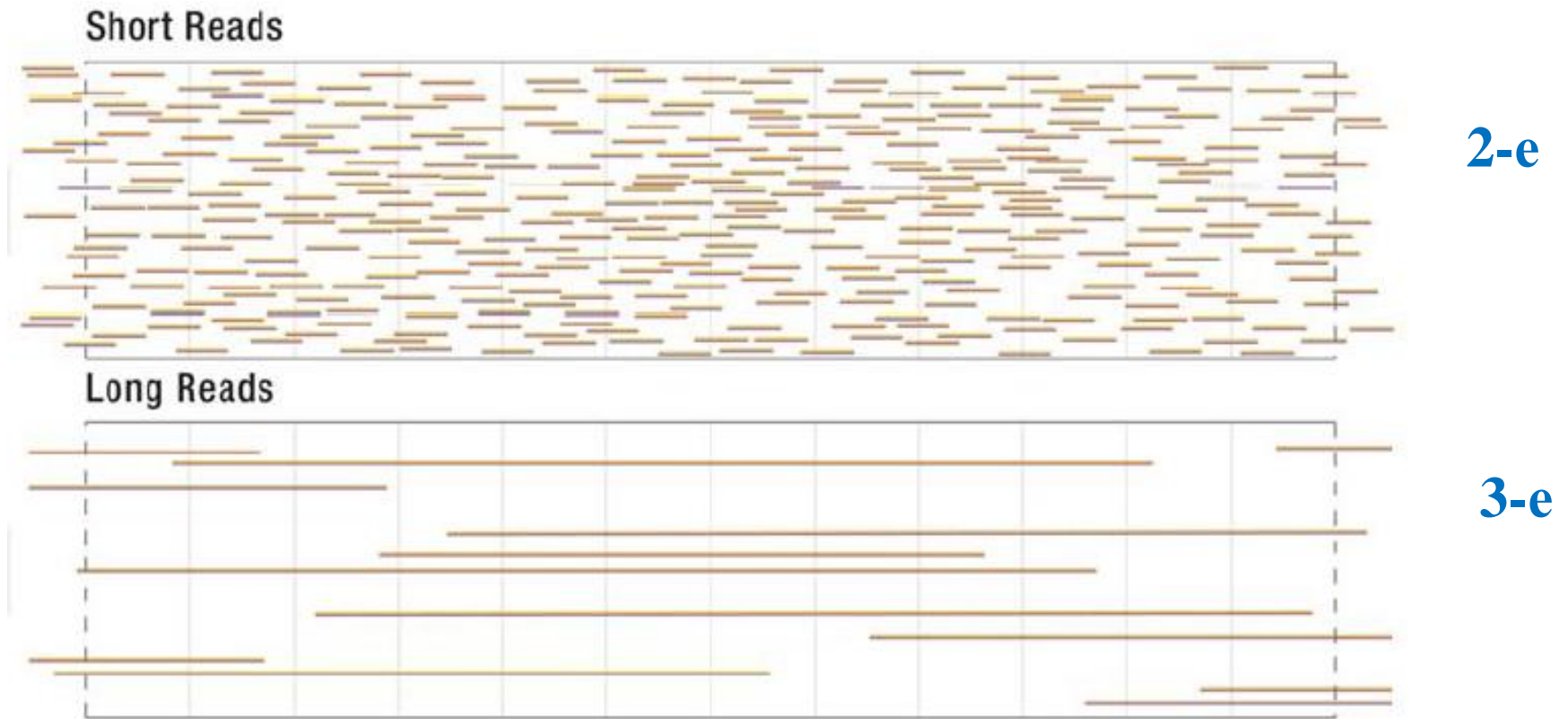
Включение обнаруживается в виде вспышки света определенной длины волны, характерной для конкретного нуклеотида..

Подготовка ДНК к секвенированию на SMRT-чипах

- Геномная ДНК, кДНК и т.п.
- Фрагментация ДНК
- «Затупление» концов ДНК
- Лигирование адаптеров типа «стебель-петля»
- Очистка ДНК
- Отжиг праймера, секвенирование по типу «катящегося кольца»



Размеры продуктов секвенирования ДНК на секвенаторах второго и третьего поколений

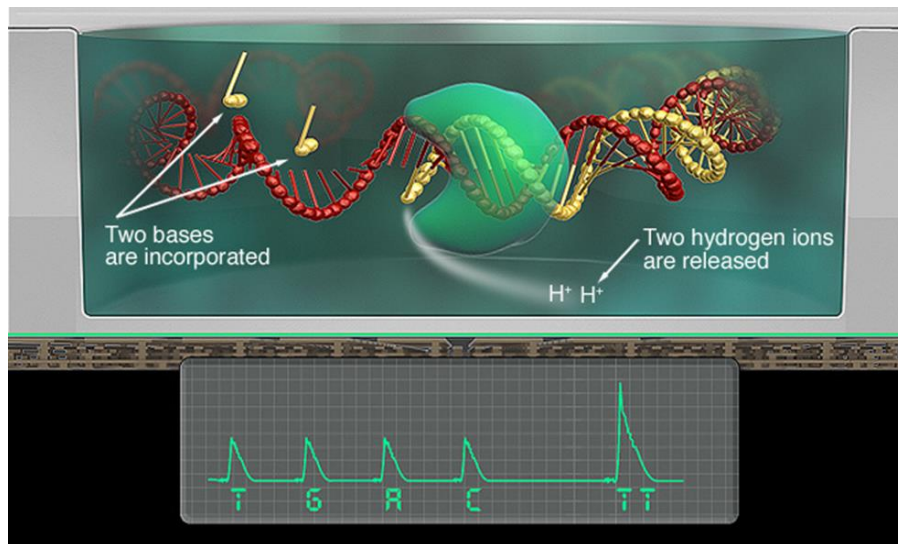
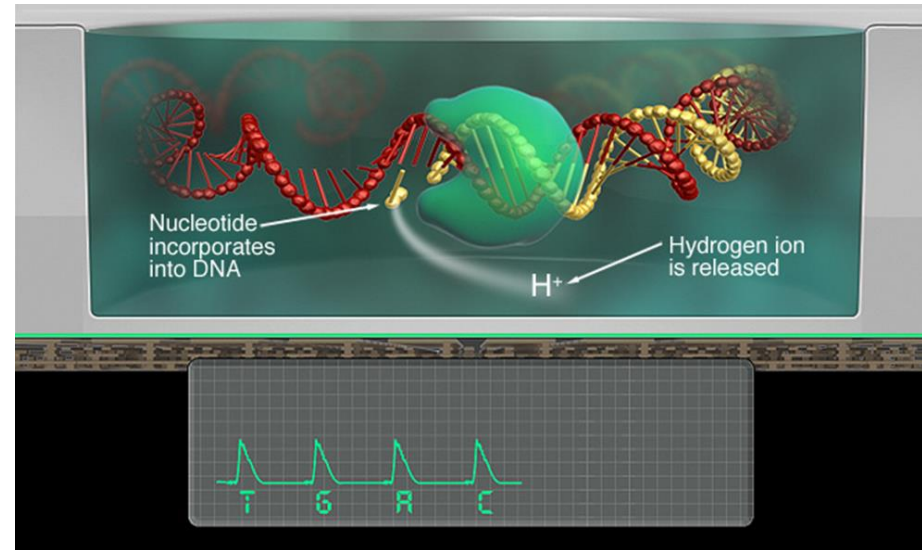
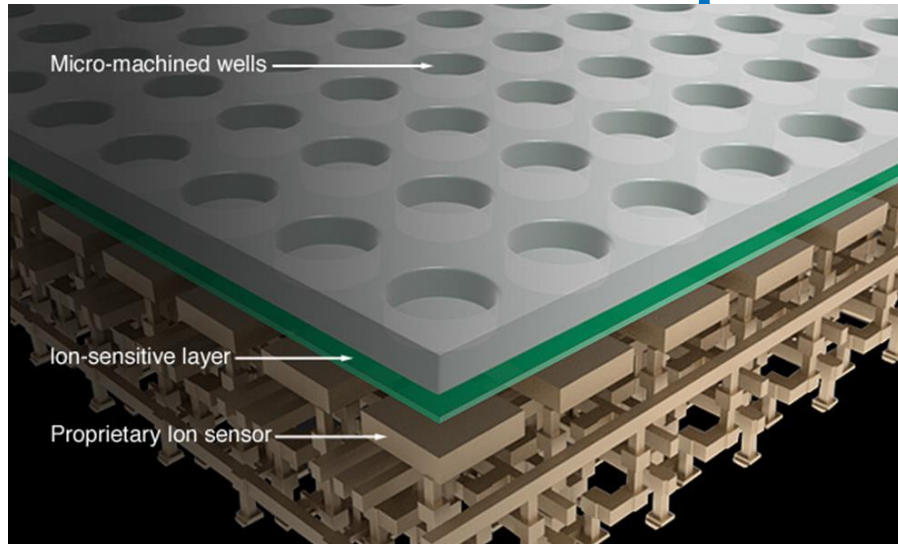


Средний размер секвенированных фрагментов ДНК:

2-е поколение секвенаторов: **<50 п.н.**, пиросеквенаторы – **~500 п.н.**

3-е поколение секвенаторов: **десятки тысяч п.н.**

Протон-чувствительная система секвенирования Ion Torrent



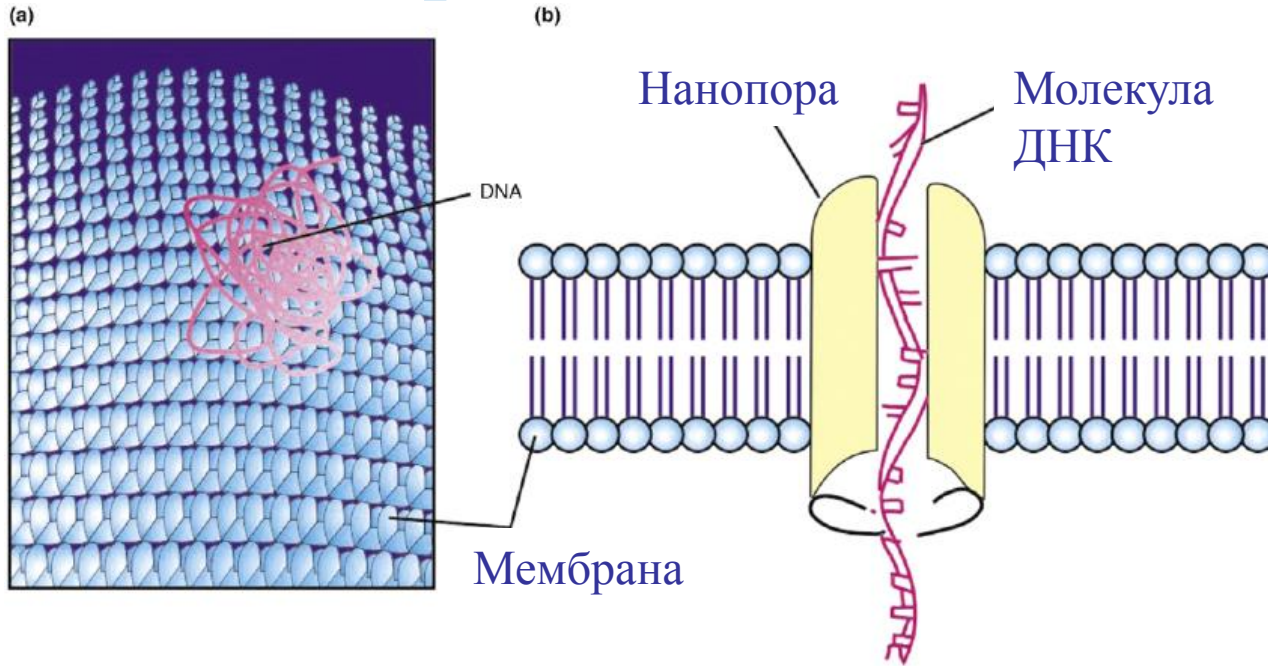
- Детекция иона H^+ , освобождающегося после включения нуклеотида в ДНК
- Микроячейки с отдельными иммобилизованными молекулами ДНК
- Под ними ионо-селективная мембрана
- Ниже под каждой ячейкой расположен протонный биосенсор
- Появление иона сопровождается импульсом электрического тока

Протон-детектирующий секвенатор фирмы *Ion Torrent* (США)

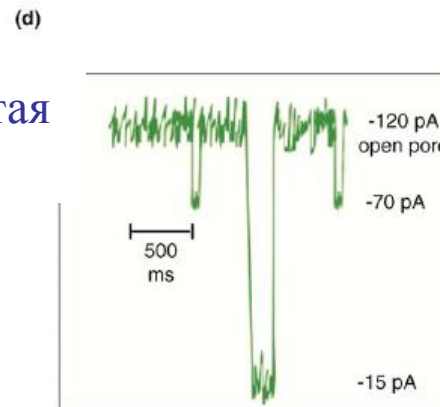
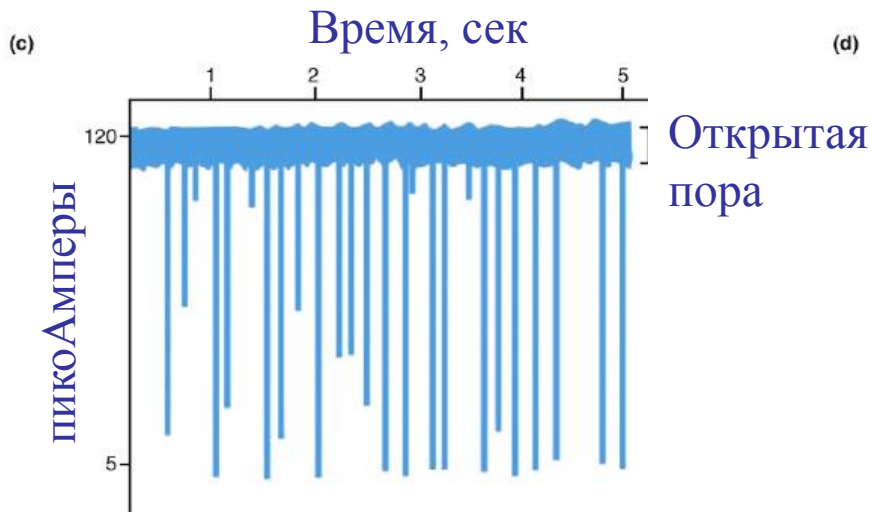


Полный анализ ДНК– 1 час, стоимость анализа <500\$

Секвенирование ДНК с помощью нанопор



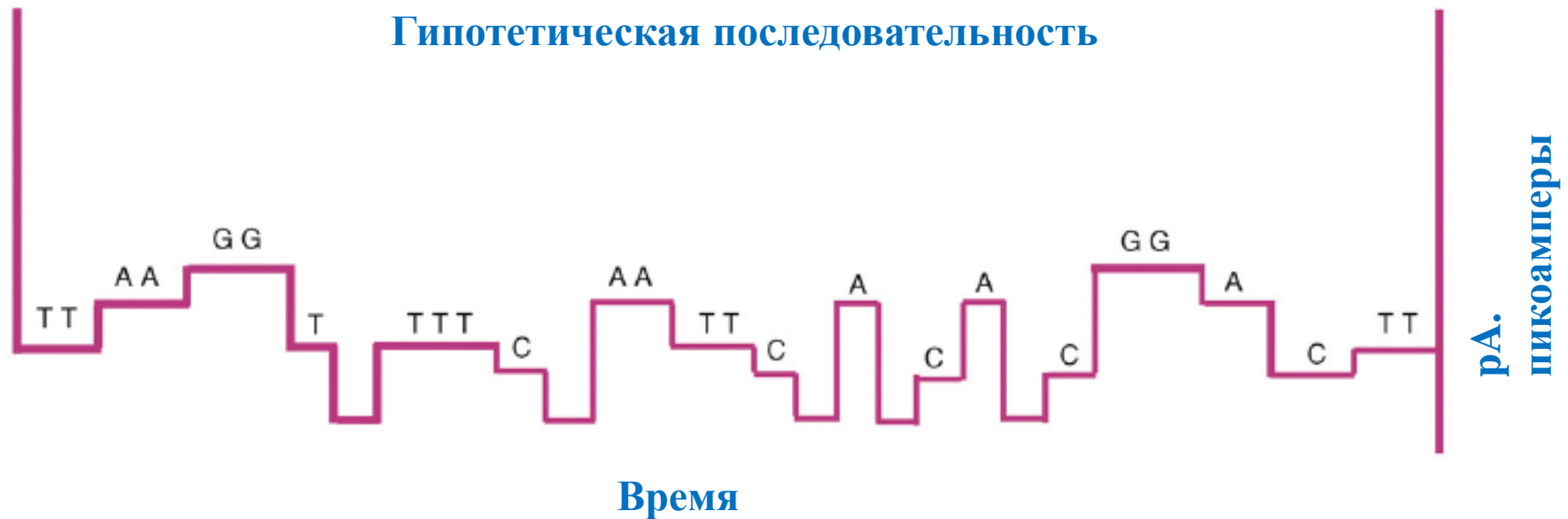
Часть мембраны с нанопорой, через которую проходит одноцепочечная ДНК



Изменения силы тока, проходящего через мембрану, под действием отдельных нуклеотидов ДНК

Уникальная последовательность
Гомодимер

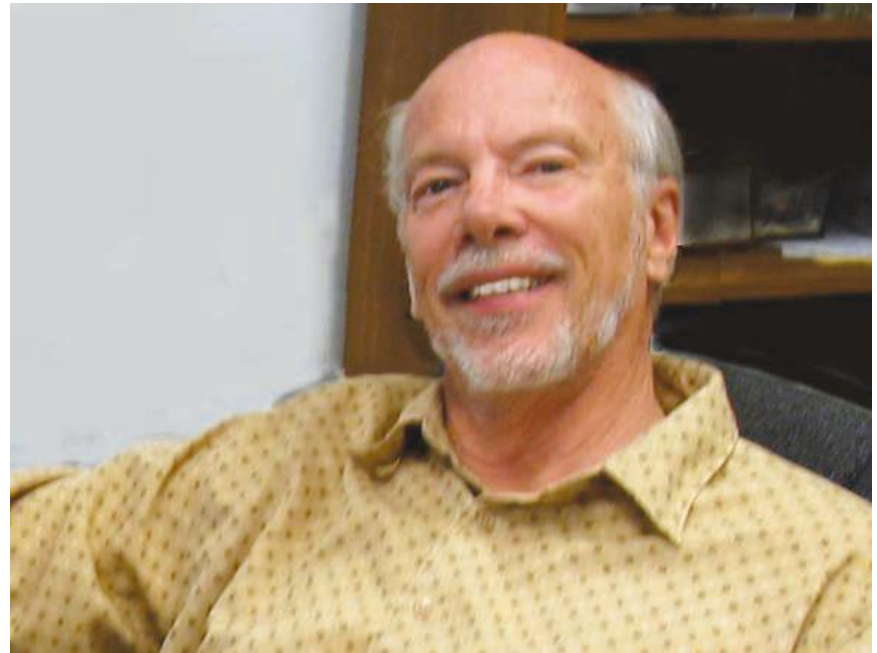
Профиль изменений силы электрического тока во времени при секвенировании ДНК с использованием нанопор



Секвенатор третьего поколения фирмы Oxford Nanopore Technologies (2012 г)



**Производительность 1 млрд
нуклеотидов за 6 часов
Десятки тысяч нуклеотидов/1 прогон
Компьютер – ноутбук с USB-разъемом
Стоимость ~\$900**



**Дэвид Димер (David Deamer) -
Предложил принцип метода
секвенирования через нанопоры в
1989 году**

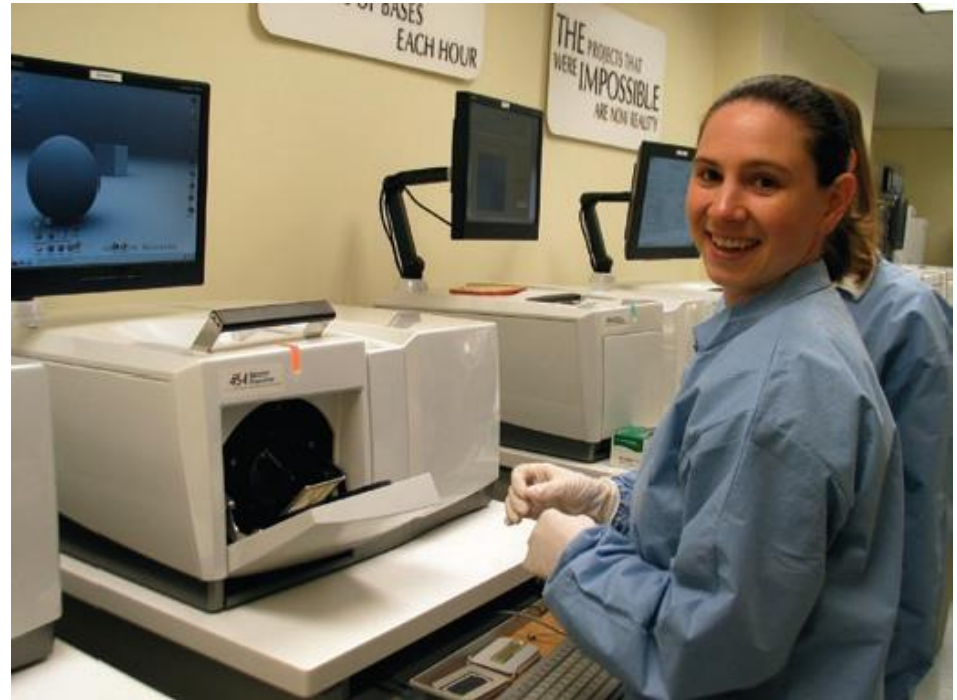
Применение методов секвенирования НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

- **Персонализированная медицина**
- **Сравнительный анализ геномов и генотипов,
решение проблемы генотип-фенотип**
- **Исследование экзона, транскриптома, метилома
и т.д. в рамках системной биологии**

Секвенирование ДНК: смена поколений неизбежна



Фредерик Сэнгер,
Кембридж, 1997 г.



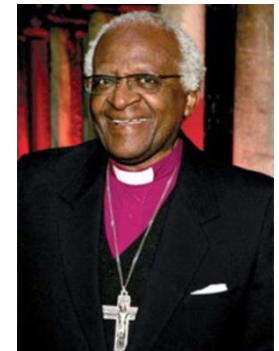
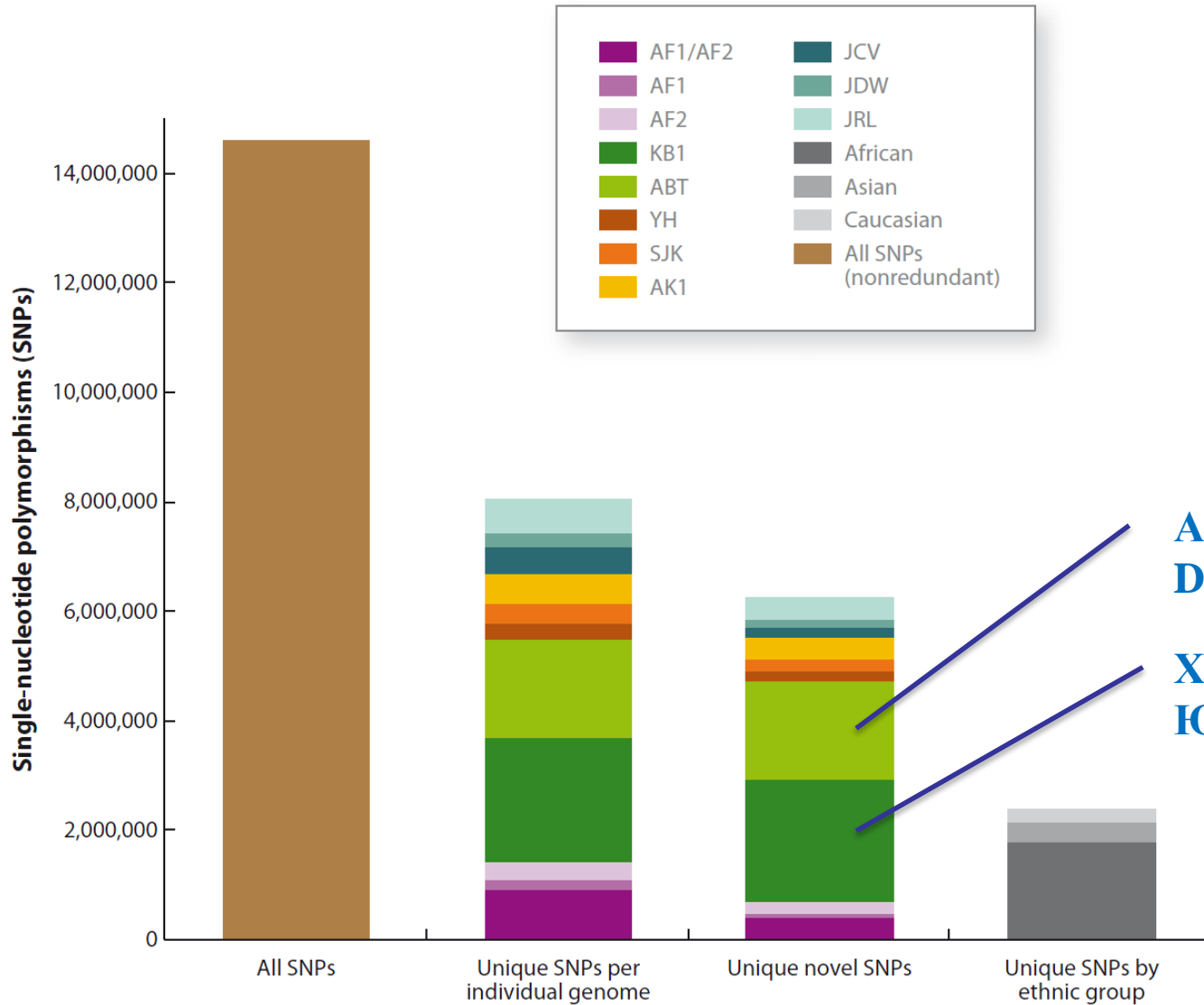
Современный секвенатор Applied Biosystems

По производительности заменяет несколько сотен секвенаторов, основанных на методе Сэнгера

Вариом человека: термины

- ❖ **Референсная (консенсусная) последовательность генома человека: гаплоидная мозаичная последовательность, полученная от нескольких индивидуумов**
- ❖ **Мутации и полиморфизмы (частота $\geq 1\%$)**
- ❖ **SNP – Single Nucleotide Polymorphism**
- ❖ **SNV – Single Nucleotide Variation**
- ❖ **CNV – Copy Number Variation (>500 bp)**
- ❖ **Indel – короткие вставки и делеции (<100 bp)**

Сравнение SNP десяти персональных геномов



**Архиепископ
Desmond Tutu, ЮАР**

**Хойсан (Khoisan),
ЮАР**



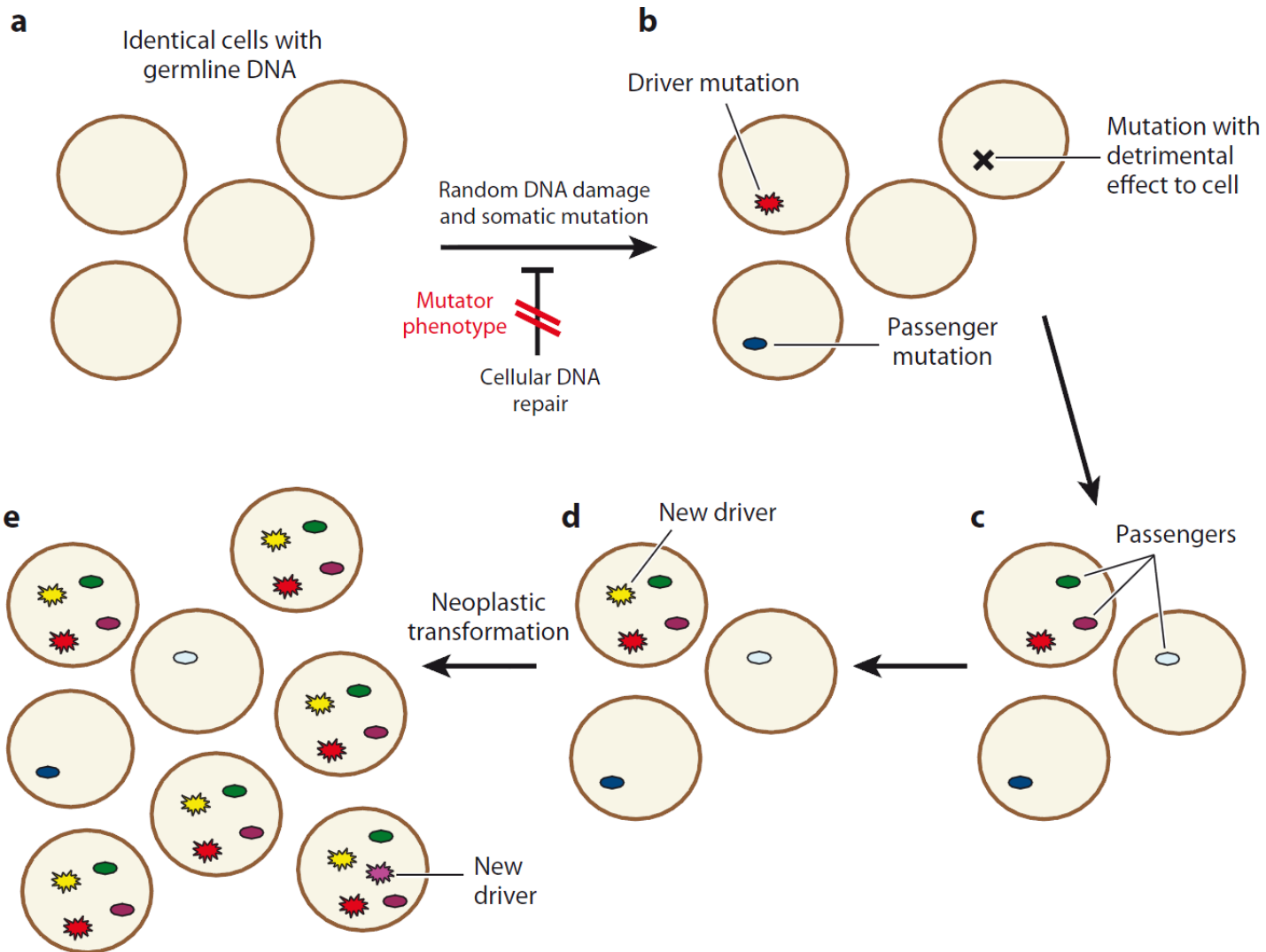
Геном каждого человека уникален

- ❖ ~3 500 000 SNP и ~1000 больших (>500 bp) CNV отличают геном каждого человека от референсной последовательности
- ❖ Каждый персональный геном содержит 400 000-500 000 новых SNP, отсутствующих в dbSNP и ~.
- ❖ В среднем каждый геном содержит 20 000-25 000 вариантов кодирующих частей генов. Из них 9 000-11 000 – несинонимические замены
- ❖ Геном «нормального здорового» индивидуума содержит 40-100 вредных вариантов генов в гетерозиготном состоянии. Это число будет возрастать. У них обнаружены также вредные гомозиготные или гемизиготные мутации.

Пангеном человека

- ❖ **Каждый секвенированный геном человека содержит миллионы пар нуклеотидов некартированных последовательностей, отсутствующих в референсном или любом другом исследованном геноме.**
- ❖ **Среди них есть повторы, регуляторные последовательности и гены.**
- ❖ **По количеству нуклеотидов две гомологичных хромосомы из персональных геномов совпадают на 99,5% (ранее считалось, что сходство составляет 99,99%)**

Генетическая инициация и прогрессия опухолевого роста



Результаты полного секвенирования генома опухолей: исключительная гетерогенность

- ❖ **The International Cancer Genome Consortium (2007)**
- ❖ **Секвенировано более 700 геномов опухолей разных типов**
- ❖ **Каждая опухоль уникальна по набору мутаций, в т.ч. драйверных мутаций**
- ❖ **Паттерны соматических мутаций различаются у опухолей разных типов, у разных опухолей одного типа и одной линии, а также между разными участками одного опухолевого генома**
- ❖ **Громадное число генетических изменений оказывает основное влияние на ограниченное число сигнальных путей**