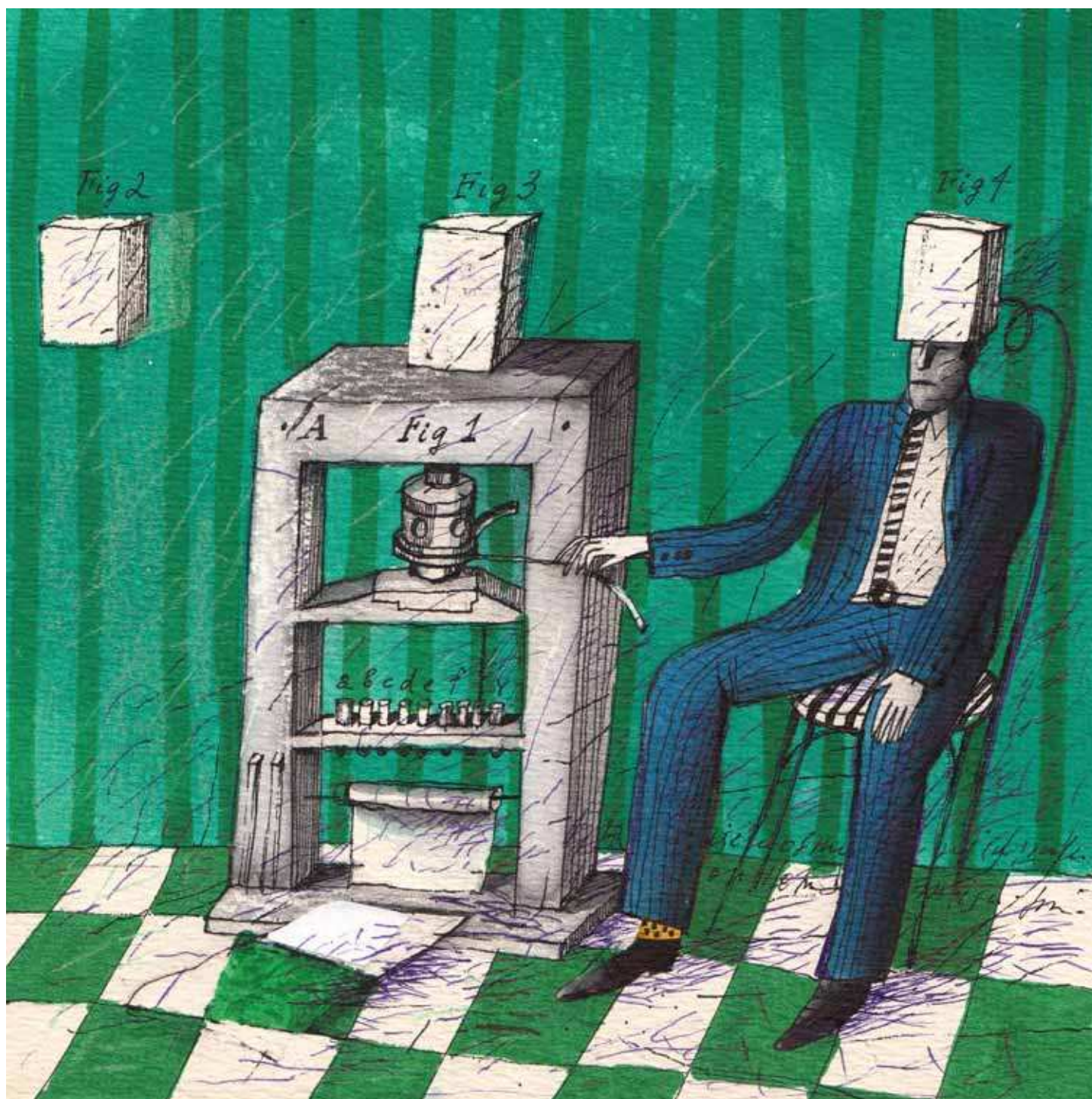




Художник Е. Силина

Приборы для чтения ДНК

Кандидат
биологических наук
В.В.Зубов
ИТЭБ РАН

Что нужно было для определения нуклеотидной последовательности ДНК методом Сенгера в начале 90-х годов XX века? Сущие пустяки: один-два аспиранта или дипломника, пара идеально отполированных стекол длиной в полметра, между которыми заливали полиакриламидный гель, источник высокого напряжения для электрофореза, собственно ДНК в достаточном количестве, фермент полимераза, фирменные реагенты по списку, рентгеновская пленка размером со стекло, реактивы для ее проявления... По большому счету, кажется, все? Ах да, еще допуски для всего коллектива (радиоактивное излучение «меченых» нуклеотидов, хоть и мягкое, требует знания техники безопасности), ловкость рук и немного терпения. К концу недели, если все проходило удачно, вы получали десятки, а то и сотни новых «букв» ДНК.

Это было давно. А недавно «Химии и жизни» задали вопрос: если действие фантастического детектива происходит во второй половине XXI века, может ли в рядовом полицейском управлении стоять прибор для «чтения» ДНК? Запросто, ответили мы. Потом подумали и уточнили: смотря в какой стране.

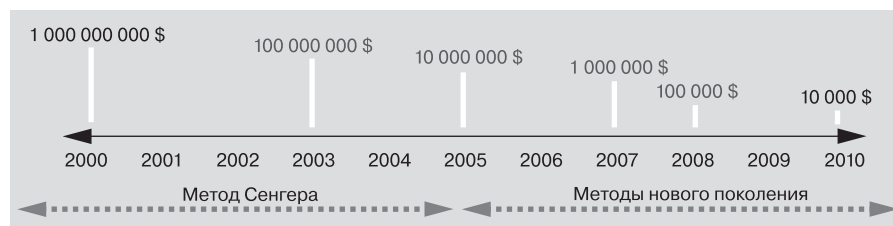
Винчестер с геномом Уотсона

В 1990 году стоимость расшифровки нуклеотидной последовательности ДНК человека оценивалась в три миллиарда долларов. Именно столько в США планировали потратить на проект «Геном человека» — «по доллару за каждый нуклеотид», как сказал Эрик Ландер, основатель Центра геномных исследований института Уайтхеда и МТИ. Работа была рассчитана на 15 лет, но завершить ее удалось немного раньше — в начале 2003 года, когда была получена «обобщенная» последовательность, составленная из фрагментов геномов разных людей. По такому случаю Конгресс США даже принял резолюцию, согласно которой ранее малоизвестный Международный день ДНК, отмечаемый 25 апреля, был объявлен Национальным днем ДНК. В этот день в 1953 году в апрельском номере журнала «Nature» появилась небольшая статья двух авторов — американца Джеймса Уотсона и англичанина Фрэнсиса Крика.

Открытие ими двойной спирали ДНК стало точкой отсчета для всей современной биологии, а в 2007 году появилась еще одна важная веха — был расшифрован (просеквенирован) первый персональный геном человека, и человеком этим стал Джеймс Уотсон. Возможно, вручение винчестера с записью его собственного оцифрованного генома 31 мая 2007 года стало для Уотсона не менее радостным событием, чем получение Нобелевской премии в 1962 году.

Скорость развития технологий секвенирования можно сравнить разве что с прогрессом в области развития вычислительной техники, но сравнение будет далеко не в пользу электронщиков. Производительность компьютеров растет в соответствии с законом Мура, то есть каждые два года удваивается, тогда как производительность секвенаторов увеличивается за те же два года примерно в 10 раз, и такой темп роста сохраняется уже 10 лет. Одновременно с этим снижается стоимость секвенирования ДНК. В 2007 году можно было «оцифровать» ДНК человека за миллион долларов. В мае 2009 года компания «Illumina» начала принимать заказы на

«Закон Мура» для геномного секвенирования:
стоимость снижается на порядок
каждые два года



Джеймс Уотсон получает из рук
Джонатана Ротберга цифровую копию
своего генома (2007)

секвенирование индивидуальных геномов за 48 000 долларов, а с мая этого года — за 19 500, причем если секвенирование способно помочь лечению, то оно обойдется пациенту всего в 9500 долларов.

В начале XXI века продолжалось совершенствование электрофоретических (сенгеровских) секвенаторов, но к концу первой «пятилетки» их потенциал был практически исчерпан. Революционный прорыв наметился в 2005 году (см. «Химию и жизнь», 2006, № 1), когда в продаже появился первый секвенатор нового поколения — GS 20 («454 Life Science Inc.»). Именно он позволил в 2007 году преодолеть ценовой рубеж в миллион долларов. В начале того же года появился секвенатор GA1 («Illumina»), способный за один рабочий цикл считывать миллиард оснований ДНК, а примерно через год конкуренты («Applied Biosystems») выпустили прибор SOLiD 2.0, читающий за один заход до трех миллиардов оснований ДНК.

Если учесть, что гаплоидный (одинарный) набор хромосом человека содержит примерно три миллиарда пар оснований двунитевой ДНК, то можно считать, что в начале 2008 года появился первый прибор, способный за один рабочий цикл оцифровать целый геном человека. Правда, у каждого человека набор хромосом не одинарный, а двойной, да и точность чтения ДНК у высокопроизводительных секвенаторов не идеальна. Поэтому получить качественную генетическую информацию можно только благодаря многократному чтению нуклеотидных последовательностей,

то есть читать нужно не три миллиарда, а десятки миллиардов букв. Например, геном Джеймса Уотсона был прочитан семикратно. Сейчас хорошим тоном в научных кругах считается не менее чем тридцатикратное секвенирование геномов. Еще недавно это казалось непомерной роскошью, но производительность последних моделей секвенаторов измеряется уже не десятками, а сотнями миллиардов букв генетического кода, и похоже, что это далеко не предел.

Гонки по спирали ДНК

Столь быстрый прогресс связан с ожесточенной борьбой за первенство между крупными корпорациями, каждая из которых уже на старте геномных гонок вложила более 100 миллионов долларов в приобретение фирм-разработчиков и в совершенствование технологий геномного секвенирования. Тройку лидеров образуют корпорации «Illumina», «Life Technologies» и «Roche». Первая из них включилась в геномные гонки в начале 2007 года, после того как поглотила компанию «Solexa», разработавшую самую производительную на сегодняшний день кластерную технологию секвенирования геномов. Практически не уступает ей по производительности лигазная технология секвенирования компании «Applied Biosystems», ставшей в прошлом году подразделением корпорации «Life Technologies». С некоторым отрывом за этими лидерами следует корпорация «Roche», которой принадлежит компания «454 Life Science Inc.».

Первопроходцем в разработке секвенаторов нового поколения стал Джонатан Ротберг — учредитель компании «454 Life Science Inc.», разработавшей самый первый прибор нового типа. До 2007 года он был и единственным, но теперь в различных типах приборов и разновидностях секвенирования легко запутаться даже специалисту, поэтому желательно их как-то классифицировать. Обычно выделяют два основных типа секвенаторов — NGS (Next Generation Sequencing) и NNGS (Next-Next Generation Sequencing), но лучше

<http://www.bio-itworld.com>



ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

делить их на мультимолекулярные и мономолекулярные. Лучше потому, что к NNGS относят приборы, считывающие информацию с единичных молекул ДНК, и теоретически у них это должно получаться очень быстро и дешево. Практически же нынешние NNGS по многим показателям явно отстают от большинства мультимолекулярных (NGS) приборов, и относить их к «следующему за следующим» (Next-Next) поколению пока рановато. «Несенгеровских» технологий секвенирования сегодня очень много: полимеразные, лигазные, экзонуклеазные, циклические и нециклические, флуоресцентные и биолюминесцентные, полупроводниковые и нанопорные, гибридизационные и денатурационные и т. д. и т. п. Среди них попадаются вполне достойные претенденты на звание NNGS, а может быть, и NNNGS.

Сейчас на рынке представлено уже около десятка моделей NGS-секвенаторов. По производительности первое место пока удерживает HiSeq 2000 компании «Illumina» (200 миллиардов оснований за рабочий цикл). Он же лидирует и по стоимости (690 000 долларов), хотя правильнее было бы сказать — отстает, поскольку в условиях рыночной конкуренции лидируют самые дешевые приборы. В этом отношении наиболее интересен секвенатор Junior FLX корпорации «Roche» (125 000 долларов), который и по габаритам, и по внешнему виду похож на обычный лазерный принтер. Производительность у него сравнительно невысока — до 35 миллионов оснований, но рабочий цикл занимает примерно 10 часов, тогда как у конкурентов считывание генетической информации может продолжаться больше недели.

Борьба за первенство в геномных гонках не была бы столь напряженной, если бы на пятки лидерам не наступал «пелетон» разработчиков альтернативных технологий оцифровки генетической информации. К их числу относится, например, недавно вышедшая из гонок компания «Helicos». Ее мономолекулярный секвенатор Heliscop по некоторым параметрам даже превосходил конкурентов, но оказался слишком громоздким и стоил около миллиона долларов.

Большие надежды многие специалисты до сих пор возлагают на компанию «Pacific Bioscience», потратившую больше четверти миллиарда долларов на разработку самой скоростной на сегодня технологии мономолекулярного секвенирования ДНК. Правда, прибор получился малопродуктивным и далеко не дешевым (695 000 долларов). Начало продаж этого секвенатора намечено на конец текущего года.

illumina



HiSeq 2000



GS Ix, GS IIe



HiScan SQ

life technologies



SOLiD 4, SOLiD 4hq



SOLiD PI

Roche



GS FLX



GS Junior

Helicos
BioSciences Corporation



Heliscop

PACIFIC BIOSCIENCES



PacBio RS

Danaher Motion - Dover



Polonator G.007

Модельный ряд
секвенаторов

Если ориентироваться только на стоимость прибора, то к лидерам геномных гонок мог бы примкнуть Polonator G.007 (170 000 долларов) компании «Danaher Motion — Dover». Массового распространения секвенаторы этой фирмы не получили не из-за каких-либо конструктивных недоработок, а из-за недостаточной эффективности используемого в них варианта лигазной технологии секвенирования.

Персональный секвенатор

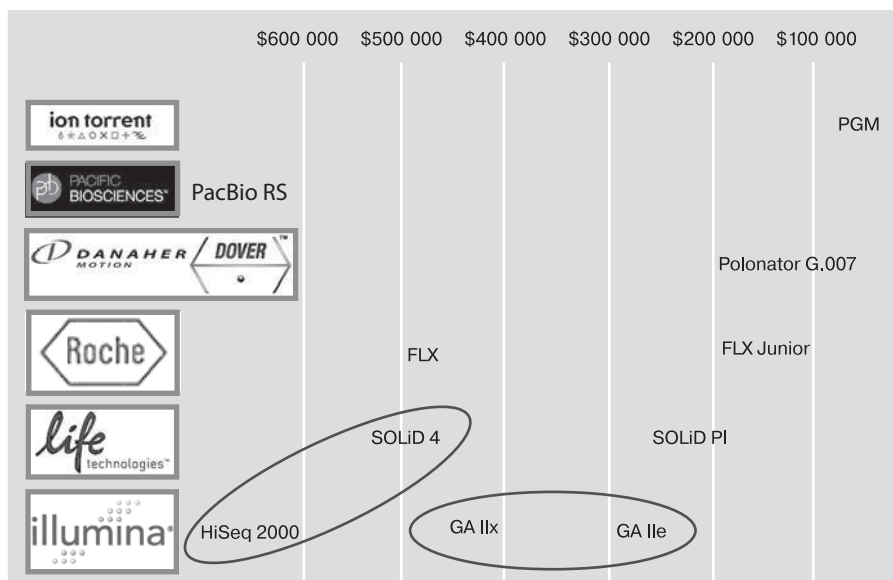
Всего в мире насчитывается уже около двух с половиной тысяч секвенаторов нового поколения (по данным на июль 2010 года). Из них более полутора тысяч произведены компанией «Illumina» и по несколько сотен приборов имеется на счету корпораций «Life Technologies» и «Roche».

Растущие как грибы крупные центры секвенирования ДНК заказывают самые последние модели секвенаторов десятками. Рекорд пока принадлежит Пекинскому геномному институту, заказавшему в начале этого года сразу 128 секвенаторов HiSeq 2000. Их суммарная производительность позволяет расшифровывать более 20 индивидуальных геномов в день, при условии, что эти геномы принадлежат людям. Последняя оговорка необходима, поскольку у некоторых животных и растений геномы намного крупнее, а отдельные виды амёб превосходят человека по этому показателю в 200 раз.

Основными «потребителями» массивов получаемой генетической информации до недавних пор были ученые, работающие в различных областях биологии и медицины. Например, в ходе выполнения проекта «Геном человека» первоочередной задачей было опреде-

Производительность трех приборов,
двух больших и одного маленького

		Число читаемых фрагментов	Длина (нуклеотиды)	Сколько нуклеотидов читает за один цикл
illumina	HiSeq 2000	~ 1 000 000 000	2 x 100	200 млрд.
life technologies	SOLiD 4	~ 1 000 000 000	2 x 50	100 млрд.
Roche	FLX Junior	90 000	400	35 млн.



Цены тоже соревнуются

ление количества и функций всех генов, которых по предварительным подсчетам ожидали найти не меньше 100 000. В действительности их оказалось немногим больше 20 000. Многих ученых интересовало, чем человек разумный отличается от своего ближайшего родственника — неразумной обезьяны. Секвенирование генома шимпанзе позволило определить все отличия, но ничего сенсационного или даже просто существенного не было обнаружено. Зато секвенирование ДНК неандертальцев показало, что избежать генетических контактов с ними удалось только африканцам (см. «Химию и жизнь», 2010, № 6).

Новые технологии секвенирования ДНК позволяют решать и менее глобальные, но более насущные задачи. К таким задачам относится, например, персонализация медицины (лекарства, назначаемые без учета индивидуальной восприимчивости пациентов, могут оказаться бесполезными, вредными, а иногда и смертельными). Обнаружение некоторых мутаций позволяет определить генетическую предрасположенность к различным заболеваниям и

уменьшить риск их развития. Кроме того, при любых инфекционных заболеваниях — от хорошо знакомых всем ОРЗ и ОРВИ до более опасных и малоизученных, таких, как атипичная пневмония, птичий грипп, свиной грипп, или даже совсем неизвестных и неизученных — точный диагноз позволяет поставить секвенирование генома возбудителя. И если уж речь зашла о биобезопасности, то неплохо было бы при помощи секвенирования выяснить, из чего состоят и насколько безвредны некоторые магазинные продукты питания, а не изучать это методом проб и ошибок на собственном организме.

По мере удешевления геномного секвенирования все больший интерес к нему проявляют частные заказчики. Причины такого интереса могут быть самыми разнообразными. Многие хотят исследовать свои генетические корни. Не лишним может быть установление предрасположенности к различным заболеваниям, определение индивидуальной восприимчивости к лекарственным препаратам и т. п. А еще секвенирование индивидуальных геномов можно использовать в рекламных целях, но для этого обладатель генома должен быть достаточно знаменит. Например, сообщение компании «Illumina» о секвенировании генома актрисы Гленн Клоуз прошло почти незамеченным, а вот информация о намерении стареющей звезды тяжелого рока Оззи Осборна провести секвенирование собственного генома недавно облетела многие средства массовой информации. Доживший до 61 года Князь Тьмы решил разобраться в генетических причинах своего необычного для наркоманов и алкоголиков долголетия.

Прогресс в технологиях секвенирования геномов настолько динамичен, что строить более или менее достоверные

ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

прогнозы можно только на самое ближайшее время. В начале ноября, например, в продажу должны поступить сравнительно дешевые (50 000 долларов) и быстродействующие секвенаторы PGM (Personal Genome Machine) компании «Ion Torrent». Кстати, учредитель и исполнительный директор этой компании — уже известный читателям «Химии и жизни» Джонатан Ротберг. По производительности PGM пока что смогут догнать и перегнать только «настольный принтер» корпорации «Roche» (75 миллионов оснований за час у PGM против 35 миллионов за 10 часов у Junior FLX), но через год или два начнут обходить и других конкурентов.

Остальные участники геномных гонок тоже не собираются топтаться на месте. Уже в следующем году производительность секвенаторов компаний «Illumina» и «Life Technologies» должна преодолеть рубеж в 500 миллиардов оснований ДНК за рабочий цикл, и это явно еще не предел.

Но вернемся к началу — к вопросу о возможности установки приборов для чтения ДНК в рядовом полицейском управлении. Это уже не фантастика, а одна из первоочередных задач судебно-медицинской экспертизы. Правда, придется еще немного подождать. И не год или два, а три или даже четыре года. В какой стране это будет? Прежде всего — в той, где День ДНК считается национальным праздником, а школьники своими руками собирают модели двойной спирали ДНК и не задают характерный для наших чиновников вопрос «а зачем это надо?».

Каковы прогнозы для России? Скорее всего, через два-три года страна понемногу оправится от последствий финансового кризиса, вызванного прошлогодним падением цен на нефть, и будет возобновлено финансирование некоторых научных разработок. Уверенно можно предсказать и то, что в начале 2014 года в Сочи состоятся зимние Олимпийские игры. А при чем здесь секвенирование геномов? Да ни при чем.

PGM (Personal Genome Machine) — дешевый и быстрый

ion torrent

