

КАПИЛЛЯРНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ КАК ОНО ЕСТЬ

Слова «ген» и «ДНК» слышали, наверное, все, словосочетание «прочитать геном» — почти все. Но как технически расшифровывается информация, спрятанная в ДНК? Кто владеет «генетической азбукой Морзе» и что выполняет роль телеграфного ключа? Чтобы ответить на этот вопрос, журналистка «Науки в Сибири» приняла участие в первой научно-практической школе по капиллярному секвенированию ДНК, организованной Институтом молекулярной и клеточной биологии СО РАН, компаниями «Хеликон» и Thermo Fisher Scientific.

В наше время секвенирование — это прочтение последовательности нуклеотидов (элементарных кирпичиков) ДНК и РНК — рутинный процесс, необходимый для работы большинства биологических лабораторий.

— Капиллярное секвенирование (еще его называют секвенированием по Сэнгеру) — один из самых широко используемых методов расшифровки последовательности ДНК в лабораториях. Он применяется в тех случаях, когда нужно проанализировать отдельные молекулы ДНК, чаще всего в генной инженерии или в ходе медицинских исследований. Например, при создании генно-инженерных конструкций исследователю важно удостовериться, что в созданной им искусственной молекуле ДНК всё работает именно так, как он предполагает. В медицине метод применяется при поиске каких-то конкретных мутаций у пациентов, чтобы убедиться — диагнозу поставлен правильно. Соответственно, берут образец ткани или физиологической жидкости этого пациента, выделяют ДНК и прочитывают интересующие места в геноме, — объяснил заместитель директора Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, заведующий лабораторией геномики ИМКБ СО РАН кандидат биологических наук Степан Николаевич Белякин.

— Мы организовали это мероприятие в основном, чтобы поделиться нашим опытом, показать, какие проблемы возникают при капиллярном секвенировании и как их решать. Я предполагал, что придут преимущественно люди из соседних институтов, возможно, потенциаль-

ные заказчики центра коллективного пользования ИМКБ СО РАН. Однако благодаря активности компании «Хеликон», выступившей соорганизатором школы, еще приехали люди из других городов. Поскольку у нас большой опыт использования метода секвенирования по Сэнгеру, мы, наверное, можем утверждать, что с основными проблемами уже успели столкнуться и как-то их или решить, или развести руками. Этому и были посвящены лекции сотрудников нашего института, а два доклада представителей компании Thermo Fisher Scientific затрагивали стандартные вещи: устройство секвенатора, его настройку и использование, пробоподготовку, — добавил Степан Белякин.

При секвенировании по Сэнгеру фрагмент ДНК, который нужно прочитать, сначала внедряется в плазмиду (кольцевая ДНК у бактерий), затем бактерии, размножаясь, «штампуют» множество копий исходного фрагмента, после чего многократно скопированные участки ДНК выделяют из микроорганизмов и добавляют в смесь для секвенирующей реакции. А уже в этой смеси начинается самое интересное — исходный фрагмент снова много раз тиражируется, но уже не полностью, а «обрывками», длина которых может различаться как минимум на один нуклеотид. Множить фрагмент помогает ДНК-полимераза, синтез начинается с «затравки» — праймера, а «обрывает» кусочки ДНК терминатор — нуклеотид, обладающий свойством прекращать синтез цепи ДНК. Каждый терминатор несет на себе флуоресцентную метку, которая позволяет однозначно определить его «имя»: А (аденин), Т (тимин), G (гуанин) или С (цитозин).

Чтобы наконец-то прочитать нуклеотидную последовательность исходного фрагмента, «обрывки» ДНК дифференцируются по длине с помощью электрофореза — перемещения частиц в геле под действием электрического поля. Когда на отрицательно заряженную молекулу ДНК действует электрическое поле, она двигается по капилляру секвенатора, заполненному гелем, к положительному полюсу.

Капилляры представляют собой тонкие трубочки, диаметр которых меньше сечения человеческого волоса: они состоят из сверхчистого кремния и окружены металлической оболочкой. Известно, что в плотном геле короткие «кусоч-



Приготовление смеси для секвенирующей реакции

ки» ДНК «проходят» быстрее, чем длинные. Соответственно, их можно ранжировать по длине, а разрешающая способность равна одному нуклеотиду.

Когда «кусочки» ДНК «добегают» до положительного полюса капилляра, на фотографической матрице секвенатора определяется цвет нуклеотида-терминатора по его флуоресцентной метке. Таким образом, можно определить последовательность нуклеотидов исходного фрагмента — например, если короткий кусочек ДНК из двух нуклеотидов маркирован буквой Т, то значит на втором месте последовательности ДНК тоже стоит нуклеотид тимин и так далее.

Участникам школы предстояло самим приготовить реакционную смесь (фрагмент ДНК для прочтения последовательности был предоставлен уже готовый), провести секвенирующую реакцию в амплификаторе — приборе, который многократно (на протяжении 35 циклов) нагревает и охлаждает смесь в течение двух часов для того, чтобы в ней произошло образование «обрывочков» ДНК, а затем очистить продукты реакции и загрузить их в секвенатор.

На взгляд неопытного человека, самое сложное в приготовлении реакционной смеси — правильно пользоваться автоматической пипеткой. Поскольку компоненты измерялись в микролитрах (1 мкл — 1/1000 миллилитра), очень сложно было заметить, набран ли необходимый реагент, на глаз это определить практически невозможно.

Затем, после двухчасового циклического нагревания смеси в амплификаторе, проводилась очистка продуктов реакции от неотреабавших праймеров. После чего участники познакомились с восьмиканальным (восьмиканальным) секвенатором, производительность которого — до 1 000 пар нуклеотидов за один цикл работы прибора, а загрузить одновременно можно восемь образцов. На аналогичных машинах был впервые, в течение 13 лет, прочитан геном человека. Сейчас, конечно, расшифровка таких больших объемов информации производится методом полногеномного секвенирования, а не капиллярного.

Надо отметить, первые секвенаторы были не только громоздки и медлительны, но и опасны для здоровья — терминаторы помечались не флуоресцентной, а радиоактивной меткой. Современный же прибор занимает не больше ме-

ста, чем средних размеров копировальный аппарат. Более того, всю работу по определению последовательности нуклеотидов секвенатор выполняет сам и в качестве результата выгружает последовательность ДНК и таблицу с графиками, похожими на кардиограммы, — на ней визуализированы цветом разные нуклеотиды, а каждая буква («имя» нуклеотида) выглядит на графике, как пик. После получения результата участникам школы предстояло оценить качество последовательности по интенсивности пиков и другим параметрам.

К сожалению, отсутствие навыков работы с автоматической пипеткой не прошло даром — корреспонденту «Науки в Сибири» «прочитать» ДНК не удалось. Зато у всех остальных участников получилось отлично. Завершилась школа обзором бесплатного программного обеспечения для анализа данных и современных решений для секвенирования.

Надежда Дмитриева
Фото автора

ПОДПИСКА

Не знаете, что подарить интеллигентному человеку? Подпишите его на газету «Наука в Сибири» — старейший научно-популярный еженедельник в стране, издающийся с 1961 года! И не забывайте подписаться сами, ведь «Наука в Сибири» — это:

— 8–12 страниц эксклюзивной информации еженедельно; 50 номеров в год плюс уникальные спецвыпуски;

— статьи о науке — просто о сложном, понятно о таинственном; самые свежие новости о работе руководства СО РАН;

— полемичные интервью и острые комментарии; яркие фоторепортажи; подробные материалы с конференций и симпозиумов;

— объявления о научных вакансиях и поздравления ученых.

Если вы хотите забирать газету в Президиуме СО РАН, можете подписаться в редакции «Науки в Сибири» (пр. Академика Лаврентьева, 17, к. 217, пн-пт с 9.30 до 17.30), стоимость полугодовой подписки — 120 рублей. Если же вам удобнее получать газету по почте, то у вас есть возможность подписаться в любом отделении «Почты России».



Внутреннее устройство капиллярного секвенатора

Наука в Сибири
УЧРЕДИТЕЛЬ — СО РАН
Главный редактор
Елена Владимировна Трухина

ВНИМАНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ
«НВС» В НОВОСИБИРСКЕ!
Свежие номера газеты можно приобрести или получить по подписке в холле здания Президиума СО РАН с 9.00 до 18.00 в рабочие дни (Академгородок, пр. Ак. Лаврентьева, 17), а также в НГУ, НГПУ, НГТУ и литературном магазине «Капиталь» (ул. М. Горького, 78)

Адрес редакции:
Россия, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 17.
Тел./факс: 330-81-58.
Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов
При перепечатке материалов ссылка на «НВС» обязательна

Отпечатано в типографии
ОАО «Советская Сибирь»
630048, г. Новосибирск, ул. Н.-Данченко, 104.
Подписано к печати 16.05.2018 г.
Объем 2 п.л. Тираж 1 500.
Стоимость рекламы: 65 руб. за кв. см
Периодичность выхода газеты — раз в неделю

Рег. № 484 в Мининформпечати России
Подписной инд. 53012
в каталоге «Пресса России»
Подписка-2018, 1-е полугодие, том 1, стр. 122
E-mail: presse@sbras.nsc.ru, media@sbras.nsc.ru
© «Наука в Сибири», 2018 г.