

Массовое параллельное секвенирование ДНК — шаг в будущее

Недавно в Центре коллективного пользования СО РАН «Секвенирование ДНК» были запущены секвенаторы нуклеиновых кислот нового поколения, которые открыли принципиально новые возможности в биологических и медицинских исследованиях.

Слово «секвенирование» происходит от английского sequence, «последовательность», и означает, таким образом, определение аминокислотной последовательности белка или нуклеотидной последовательности ДНК или РНК, содержащих от нескольких сотен до сотен миллионов звеньев-мономеров, в результате чего получается символическое описание структуры молекулы. Расшифровывать структуру нуклеиновых кислот научились достаточно давно, однако первоначально методы расшифровки были малопродуктивными, неэффективными и дорогими. Всего несколько лет назад появились приборы следующего поколения, производительность которых измеряется не в нуклеотидах, а в геномах.

У истоков секвенирования стояли методы Гилберта и Сэнгера; последний не утратил позиций наиболее широко используемого метода и сегодня. При секвенировании ДНК по Максому-Гилберту гомогенный фрагмент ДНК или РНК, предварительно меченый радиоактивной меткой по одному из концов, расщепляют химическими агентами, специфичными к одному из четырёх нуклеотидных остатков, и по длинам образующихся радиоактивных фрагментов определяют положение каждого нуклеотида в цепи нуклеиновой кислоты. Основные идеи, позволившие создать данный метод, были сформулированы и экспериментально доказаны академиком Е.Д. Свердловым, однако Нобелевскую премию получил, как водится, не он, а его зарубежные коллеги. Сибирские учёные в те годы также находились в первых рядах, в частности, М.А. Грачёв, который тогда ещё не был академиком, а заведовал лабораторией в Новосибирском Институте биоорганической химии СО АН, где проводились работы по расшифровке генома вируса клещевого энцефалита.

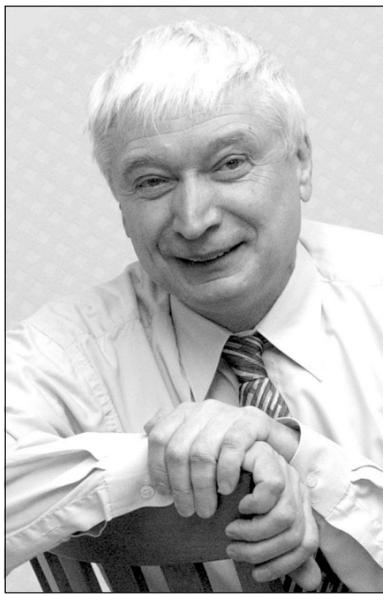
Таковую же задачу ставил перед собой ряд зарубежных лабораторий — это было своего рода соревнование, в котором победили сибиряки, первыми прочитав вирусный геном размером более одиннадцати тысяч нуклеотидов. В последующие годы мировое научное сообщество ускоренно развивало методы и технику секвенирования, а Россия, в силу определенных причин, всё более отставала, практически не принимая участие в международной программе «Геном человека». Правда, в последние годы ситуация стала исправляться: в Москве успешно функционируют коллективы под руководством академиков К.Г. Скрябина и В.М. Говоруна, располагающие современной техникой. И, конечно, исследования на самом современном уровне проводятся в Сибирском отделении Российской академии наук.

Рассказывает директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН академик Валентин Викторович Власов:

— Следует заметить, что работы по расшифровке геномов животных и растений в последние годы развивались стремительно. Лидерами в данной области пока являются американские учёные, однако недавно в Китае было создано несколько настоящих фабрик, располагающих сотнями секвенаторов последних моделей. Для них не представляет сложности расшифровать геном любого размера. Возможности отечественных лабораторий несопоставимо скромнее, и вопрос о соревновании не стоит.

Имеющиеся сейчас в мире мощности по секвенированию таковы, что начался поиск — что бы ещё такое изучить. Интересным представляется сейчас изучение экзотических геномов и сравнительные исследования в практических целях; биологические исследования стали немислимы без изучения генов исследуемых объектов и их экспрессии. Таким образом, центр тяжести перемещается к изучению всё более сложных систем, например, изменений уровня экспрессии разных генов в ходе развития организма. В медицине ведется массовое исследование геномов микробов, изучаются мутации у больных разными заболеваниями с целью поиска тех из них, которые приводят к болезням. Медицинские приложения требуют самой высокопроизводительной техники — уже начаты работы, в которых секвенируют гены клеток из различных участков опухолей.

В Сибирском отделении РАН новый этап развития работ по секвенированию наступил после организации программы «Геномика, протеомика, биоинформатика». Тогда были выделены значительные средства для создания центров компетенции, осна-



щенных приборами, без которых биологическую и медицинскую науку развивать невозможно. В рамках этой программы два института, при активном участии к.б.н. Игоря Владимировича Морозова — руководителя центра от ИХБФМ и к.б.н. Геннадия Владимировича Васильева — соруководителя центра от ИЦиГ, создали ЦКП «Секвенирование ДНК» с целью обеспечения потребности в секвенировании нуклеиновых кислот для биологов, как ведущих фундаментальных исследований, так и создающих новые генетические конструкции для нужд биотехнологий.

Располагая капиллярными секвенаторами, этот центр успешно функционировал, решая задачи секвенирования важных участков геномов различных организмов (например, дальневосточного женьшеня и микроорганизмов, населяющих оз. Байкал) относительно небольших геномов (десятки тысяч пар нуклеотидов), например, вируса клещевого энцефалита, а также генетических конструкций для исследовательских организаций и биотехнологических фирм Сибири. В последние годы резко возросли потребности в секвенировании больших геномов, а в области технологий секвенирования нуклеиновых кислот произошла настоящая революция: были созданы принципиально новые подходы, с помощью которых геном человека может быть прочитан за несколько часов (в отличие от традиционных капиллярных секвенаторов).

В 2010 году в Центре коллективного пользования «Секвенирование ДНК» были установлены и запущены приборы новых поколений, способные быстро решать широкие группы сложных задач — генные анализаторы массового параллельного секвенирования SOLID (производства ABI) и FLX (LS 454) производства Roche. Этими приборами на паритетных началах пользуются учёные институтов Химической биологии и фундаментальной медицины и Цитологии и генетики. На приборах работают научные сотрудники, которые прошли специальную подготовку в фирме-производителе, получили сертификаты: четыре человека на SOLID и два человека на Roche, при этом зачастую один сотрудник выполняет часть работы одновременно для нескольких проектов. В настоящее время коллективы биологических институтов ведут несколько проектов, направленных на секвенирование и изучение геномов различной сложности, причем некоторые из проектов близки к завершению. Таким образом, развитие биологии в СО РАН сейчас переживает новый этап. Открылись и совершенно новые возможности для медицинских исследований...

Проекты, которые ведутся Институтом химической биологии и фундаментальной медицины, связаны, в основном, с исследованием циркулирующих нуклеиновых кислот в организме человека, что необходимо для выяснения того, как их состав зависит от физиологических состояний, нормальных и патологических. Особенный интерес вызывает онкопатология, маркеры ранней диагностики, которые просты для использования в практике и имеют достаточно высокую эффективность — это проект по циркулиру-

ющим РНК, которым руководит к.б.н. Д.В. Семёнов (лаборатория биотехнологий); другой проект касается внеклеточных циркулирующих ДНК (руководитель группы к.б.н. П.П. Лактионов). Работа проходит на ДНК и РНК, выделенных из крови больных, но выборки должны быть гораздо шире, поскольку существует большой индивидуальный разброс, особенно в таком сложном организме как человек. Сейчас считаются репрезентативными выборки в тысячи, десятки тысяч, а не несколько человек. Кроме того, учёные задались вопросом о том, что представляет собой апоптотическая ДНК. Данная проблема до сих пор окончательно не решена — бытует мнение, что это просто продукт неспецифического гидролиза геномной ДНК, грубо говоря, «равномерно порубленные» фрагменты геномов. Задача работы — выявить специфичность фрагментации ДНК клетки при апоптозе, если таковая имеется.

Есть ещё одно направление работ по циркулирующим нуклеиновым кислотам, которое возглавляет д.б.н. М.А. Зенкова — там рассматривается онкотрансформация и способы её супрессии, пока в культуре клеток и на мышцах. Данная работа по изучению спектра малых РНК — часть комплексного исследования. Необходимо определить, насколько модель воспроизводится, насколько она важна. Этот феномен изучается со всех сторон, а супрессором является нуклеаза. Получены важные данные о циркулирующих в крови людей малых РНК, регулирующих гены, которые ответственны за развитие сложных организмов и контролируют опухолевый рост.

Реализуется также проект по секвенированию хлоропласта кедра сибирского — это очень важный и перспективный генетический маркер для филогенетических исследований, возможность эффективного использования которого до сих пор подвергается сомнению из-за предполагаемого высокого уровня полиморфности внутри одного организма. Работы по «генеографии» и филогении кедра особенно актуальны для России, т.к. биозапасы его в нашей стране самые большие, а знания о нем достаточно ограничены.

И последний, пятый проект по Институту химической биологии и фундаментальной медицины (руководитель к.х.н. Н.В. Фоменко) — изучение генома боррелии. Нужна информация о геноме и структуре белков этого патогена, против которого собираются делать вакцину. Это обязательный этап, чтобы перейти к изготовлению более эффективных вакцин. После определения генома, в первую очередь, будет понятно, против какой конкретно боррелии действует та или иная вакцина. Более того, возникнет возможность делать вакцины нового поколения, не используя живого паразита в качестве источника антигенов.

Институтом цитологии и генетики на приборе SOLID осуществляется проект по секвенированию микро-РНК описторхид и по секвенированию генома этого паразита. У этого опасного для жителей Сибири паразита имеется много стадий, отличающихся по жизненным условиям и активности, и регуляция исключительно полярных стадий жизни представляет большой интерес. Существует три вида описторхид; морфологически их очень трудно различать, хотя они радикально отличаются по времени жизни: один не живет в организме человека дольше месяца, а другой может «продержаться» до 30 лет. Имеется ещё один вид, распространённый в Таиланде — это один из главных канцерогенов печени. Учёными ИЦиГ уже выполнена работа по установлению спектра микро-РНК, сейчас идет анализ теоретичес-

ких данных — какие различия, как их локализовать.

Помимо этого, выполняются два фундаментальных исследования механизмов работы генов. Исследуются сайты связывания транскрипционных факторов, в частности, семейства fox и двух SF1 и LRH. Такие работы сейчас активно развиваются — биологи как бы исследуют in vivo «геномный ландшафт», где находятся интересные их транскрипционные факторы, регулятор транскрипции и активности генов, влияние данного транскрипционного фактора на работу конкретного гена. Исследователи не только получают общую картину со всеми регуляторными сетями, но и могут определять процессы, количество посадок транскрипционных факторов.

Ещё один проект, совместная работа Института цитологии и генетики СО РАН и Института терапии СО РАМН — это попытка установить наиболее массовые особенности генов, полиморфизмы, ассоциированные с предрасположенностью к инфарктам и сердечно-сосудистым заболеваниям. Рассматривается несколько категорий пациентов: с ярко выраженными инфарктами, в основном ранними; со средними нарушениями, не очень яркими или поздними инфарктами или тяжёлыми стенокардиями, и те, которые не показывают никаких признаков сердечно-сосудистых заболеваний. Из образцов взятой коллекции крови были амплифицированы участки тех генов, которые, возможно, влияют на развитие таких заболеваний, после чего проводилось сравнение этих трёх групп, чтобы выявить основной набор полиморфизмов, которые могут оказывать влияние на развитие данного заболевания.

На секвенаторах нового поколения планируются также исследования по транскриптомам. Один из проектов — изучение транскриптома у растений при дифференцировке клеток под воздействием растительных гормонов.

Все вышперечисленные проекты — это работы первого плана, наиболее интересные в научном аспекте и дающие знания, которые необходимы для решения важных практических задач — создания новых средств диагностики и терапии заболеваний. На очереди новые проекты. Уже проводится расшифровка геномов вирусов, поражающих вредителей леса и сельскохозяйственные культуры. Практически завершена расшифровка генома бактерии, выделенной из вечной мерзлоты и оказывающей мощное стимулирующее воздействие на организм млекопитающих. Планируется и изучение сложных геномов, в частности, сибирского шелкопряда. Крупный перспективный проект, координатором которого выступает Сибирский федеральный университет, касается расшифровки генома лиственницы.

Важной проблемой является обеспечение работ соответствующей компьютерной техникой. Производительность секвенаторов столь высока, что современная вычислительная техника не справляется с накапливаемой информацией. Впрочем, эта проблема существует во всех центрах секвенирования — не стал исключением и центр СО РАН «Геном», хотя он только начал накапливать данные, получаемые с помощью современных секвенаторов. Кластер Вычислительного центра, на который возлагались надежды, работает в настоящее время неустойчиво, и расчёты сейчас приходится вести с использованием менее мощной техники, имеющейся в институтах. Возможно, проблему удастся решить с помощью кластера в НГУ, который на сегодня более надёжен.

Ю. Александрова, «НБС»

Конкурс

Учреждение Российской академии наук Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН объявляет конкурс на замещение вакантной должности ведущего научного сотрудника по специальности 01.04.20 «физика пучков заряженных частиц и ускорительная техника». Дата проведения конкурса — 20 июня 2011 г.; время: 12.00; место: зал Учёного совета. Документы (с пометкой «на конкурс») направлять в адрес отдела кадров ИЯФ СО РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 11. Справки по тел.: 329-47-88.

Учреждение Российской академии наук Институт углеродной и химической материаловедения СО РАН (ИУХМ СО РАН) объявляет конкурс на замещение ва-

кантных должностей на условиях срочного трудового договора: научного сотрудника, к.х.н. по специальности 02.00.04 «физическая химия» — две вакансии. Требования к кандидатам в соответствии с квалификационными характеристиками, утвержденными постановлением Президиума РАН № 196 от 25.03.2008 г. Срок подачи документов — не позднее двух месяцев со дня публикации. Заявление и документы направлять в конкурсную комиссию по адресу: 650000, г. Кемерово, пр. Советский, 18, ИУХМ СО РАН. Справки по тел.: (8-384-2) 36-38-44 (отдел кадров). Объявление о конкурсе и перечень необходимых документов опубликованы на сайте КемНЦ СО РАН (<http://www.kemsc.ru>).