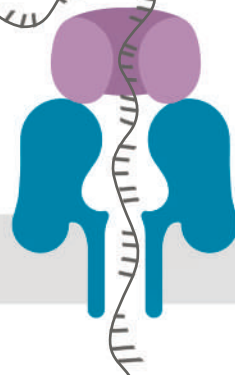




Революция секвенирования нового поколения: Oxford Nanopore Technologies



кислот с использованием белковых нанопор, разработанный специалистами из Великобритании и США. Его принцип заключается в пропускании одной из двух комплементарных цепей ДНК через канал в особом белке-нанопоре, закреплённом в твёрдой мембране, и одновременной регистрации колебаний ионного тока.

По сравнению с прочими технологиями NGS нанопоровое секвенирование позволяет получать неограниченно длинные прочтения, что помогло ему быстро завоевать большую популярность среди исследователей всего мира.

Приборы, предназначенные для подобного секвенирования, называются «нанопоровыми секвенаторами». Их ключевым компонентом и основным расходным материалом являются проточные ячейки, которые и содержат мембраны с нанопорами.

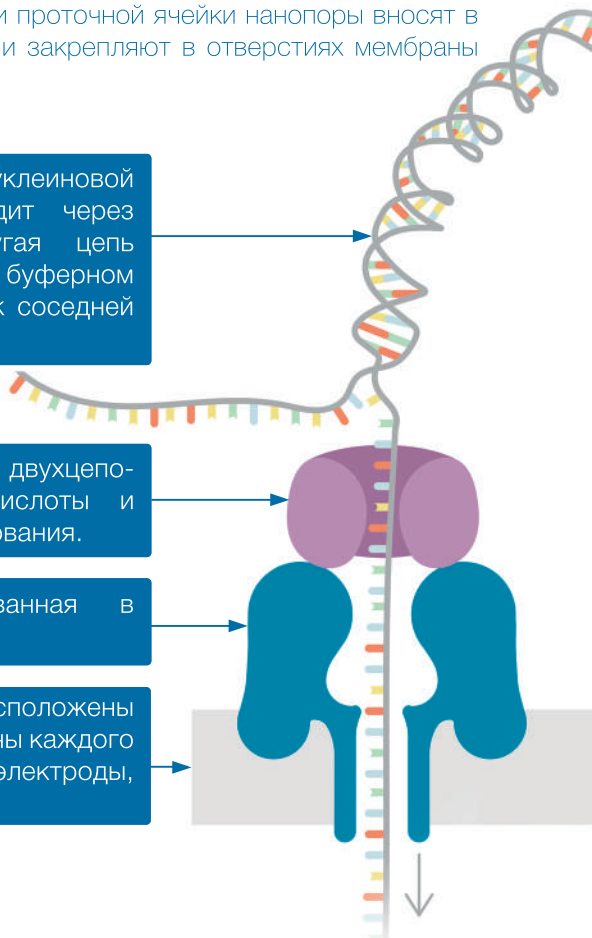
В качестве трансмембранных белков для формирования нанопор используют модифицированные липопротеины CsgG *E.coli*, состоящие из 9 субъединиц (36-нитевые β-бочки). При изготовлении проточной ячейки нанопоры вносят в камеру для образца в виде суспензии и закрепляют в отверстиях мембраны путем подачи напряжения.

Двухцепочечный фрагмент нуклеиновой кислоты. Одна из цепей проходит через нанопору и секвенируется. Другая цепь остаётся в омывающем мембрану буферном растворе и может присоединиться к соседней нанопоре.

Моторный белок, расплетающий двухцепочечный фрагмент нуклеиновой кислоты и контролирующий скорость секвенирования.

Белковая нанопора, зафиксированная в отверстии твёрдой мембраны.

Мембрана, в отверстиях которой расположены белковые нанопоры. С нижней стороны каждого отверстия находятся платиновые электроды, управляющие напряжением.

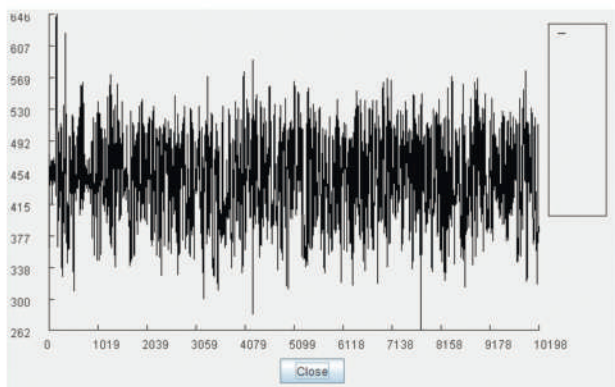


При запуске нанопорового секвенатора между двумя сторонами мембраны возникает разность потенциалов. Под действием электрического поля и при участии молекул АТФ моторные белки расплетают двухцепочечную нуклеиновую кислоту и направляют одну из цепей в нанопору. Дальнейшее движение фрагмента нуклеиновой кислоты через канал осуществляется за счет её отрицательного заряда.

Одновременно с исследуемой молекулой под напряжением через нанопоры движутся ионы, содержащиеся в растворах электролитов, окружающих мембрану. Поскольку размер нуклеотидов неодинаков, величина ионного тока зависит от последовательности участка нуклеиновой кислоты, проходящего через канал в данный момент времени.

Специальные детекторы в мембране регистрируют колебания этого тока (первичные данные секвенирования), а программное обеспечение – распознаёт нуклеотидную последовательность по исходному сигналу.

Системы нанопорового секвенирования чувствительны к чистоте исходного образца. Например, при высоком содержании соли повышается скорость продвижения нуклеиновой кислоты через нанопору, сигнал становится нечётким, а качество результата ухудшается.



Первичный сигнал нанопорового секвенирования. Данные сохраняются в формате .Fast5.



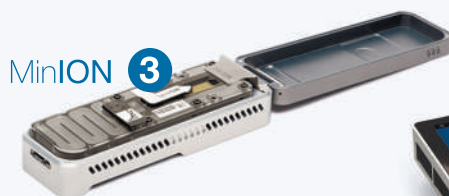
Подготовка



1
Наборы для
подготовки библиотек



2
VolTRAX V2



3
MinION



4
MinIT



5
MinION
Mk1C



6
GridION



7
PromethION

Секвенирование

Портфолио Oxford Nanopore Technologies

включает нанопоровые секвенаторы, совместимые с ними проточные ячейки и наборы для пробоподготовки нуклеиновых кислот.

1 Наборы для подготовки библиотек

В качестве материала для нанопорового секвенирования можно использовать любые ДНК и полиаденилированные РНК. Процесс пробоподготовки заключается в создании библиотеки двухцепочечных фрагментов любой длины, несущих на 5'-конце (ДНК) или 3'-конце (РНК) специальные Y-адаптеры с моторными белками.

2 VolTRAX V2

VolTRAX V2 – прибор для автоматизации пробоподготовки. Исходный образец загружают в специальный картридж, заполненный масляной эмульсией и реагентами для создания библиотек. Подготовленный материал можно наносить на проточную ячейку секвенатора.

3 MinION

MinION – портативный высокопроизводительный нанопоровый секвенатор (до 30 Гб), предназначенный для запуска одной стандартной проточной ячейки R9 или R10.

4 MinIT

MinIT – компактный компьютерный модуль с предустановленной ОС Linux, ПО MinKNOW и мощными графическими ускорителями для более быстрой первичной обработки данных (до 50 раз по сравнению с ПК или ноутбуком). Работает по беспроводной сети (Bluetooth или Wi-Fi) и подключается к любому цифровому устройству с дисплеем, включая смартфон и планшет.

5 MinION Mk1C

MinION Mk1C – автономный прибор, объединяющий в себе секвенатор MinION с отсеком для проточной ячейки, вычислительный модуль на графических ускорителях с предустановленным ПО и сенсорный дисплей. При желании может быть подключен к проводной сети.

6 GridION

GridION – нанопоровый секвенатор повышенной производительности (до 150 Гб), процессирующий до 5 стандартных проточных ячеек R9 или R10 независимо друг от друга.

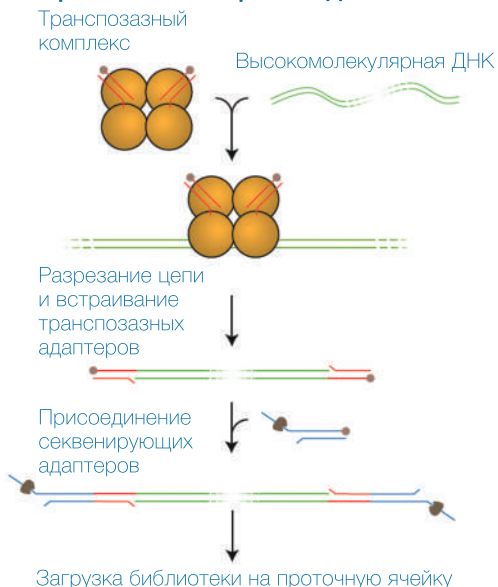
7 PromethION

PromethION – самый высокопроизводительный секвенатор в мире. Представлен двумя моделями – на 24 (до 4,8 Тб) и на 48 (до 9,6 Тб) проточных ячеек.

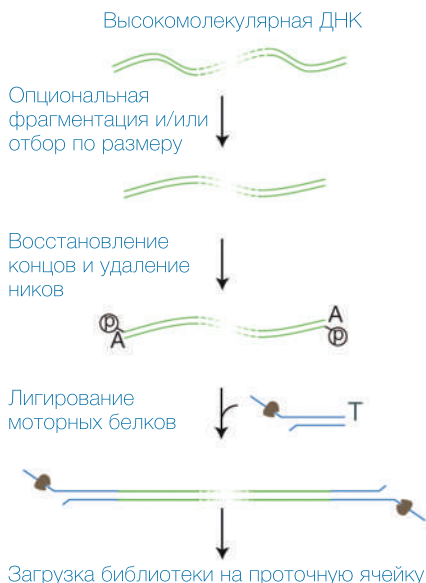
Подготовка образцов ДНК

Подготовить библиотеку ДНК к нанопоровому секвенированию можно двумя способами: по быстрому протоколу с помощью специальных химических агентов Rapid Attachment Chemistry производства **Oxford Nanopore Technologies** (~5 мин) и по более длительному протоколу на основе лигирования с помощью смесей ферментов производства New England Biolabs (1-2 часа). Выбор протокола зависит от длины исходных фрагментов ДНК и желаемой длины прочтений.

Протокол быстрой подготовки



Подготовка на основе лигирования



Баркодирование образцов

Подготовленные по различным протоколам библиотеки нуклеиновых кислот можно баркодировать с помощью лигирования нативных баркодов или методом ПЦР с индексирующими праймерами.

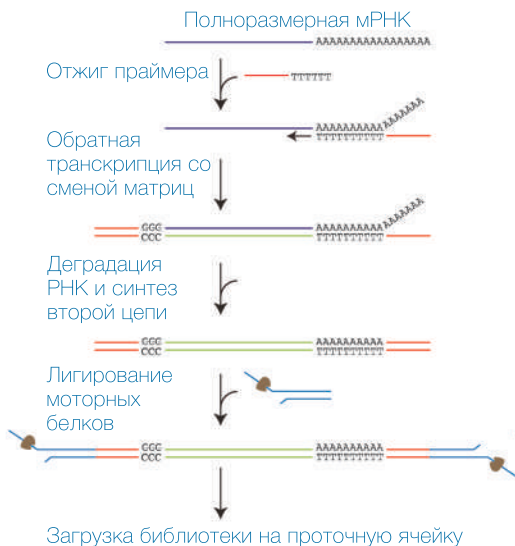
Нативные баркоды **Oxford Nanopore Technologies** позволяют пометить уникальными индексами до 24 образцов и затем пулировать их в единую смесь. Концы баркодов уже восстановлены, поэтому сразу после пулирования следует этап лигирования моторных белков.

При баркодировании методом ПЦР используют специальные индексирующие праймеры **Oxford Nanopore Technologies** (до 96 шт.), частично комплементарные адаптерам-затравкам на концах фрагментов ДНК. Присоединение адаптеров-затравок к ДНК осуществляют лигированием. Если же в качестве образца используют ампликоны, то этап лигирования адаптеров можно исключить, заранее добавив их последовательность на 5'-конец праймеров, используемых для амплификации.

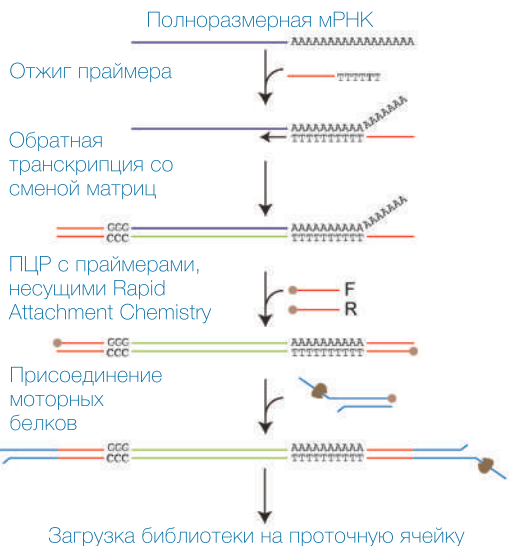
Подготовка образцов РНК

На данный момент существует три подхода к анализу РНК с помощью технологии **Oxford Nanopore Technologies**: прямое секвенирование РНК, прямое секвенирование кДНК, секвенирование кДНК после ПЦР. Прямое секвенирование транскриптома позволяет оценить экспрессию генов без искажений, вносимых ПЦР, а также профиль модификаций РНК и альтернативный сплайсинг. Протокол прямого секвенирования РНК используется, в основном, только для анализа модификаций и не является популярным среди пользователей.

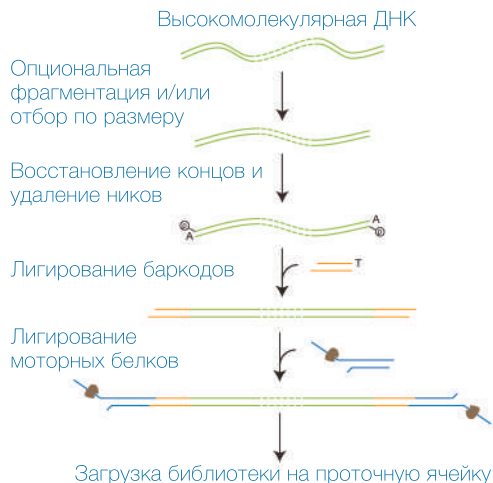
Прямое секвенирование кДНК



Секвенирование кДНК после ПЦР



Баркодирование образцов нативными баркодами



Проточная ячейка

Проточная ячейка – ключевой расходный материал, необходимый для работы платформ **Oxford Nanopore Technologies**. Именно в ней находится мембрана с нанопорами, обеспечивающая процесс секвенирования.

Каждая ячейка состоит из двух систем: проточной и детектирующей. Проточная система служит для внесения в ячейку буферов для прайминга, готовых библиотек, а также удаления отходов. Она представлена портами, каналами, клапанами и камерами.

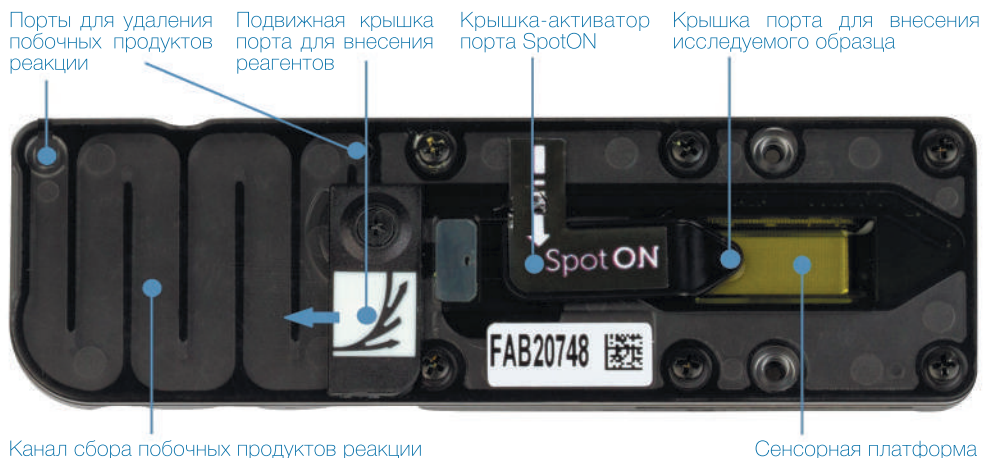
Основные компоненты детектирующей системы – сенсорная матрица и интегральная микросхема (ASIC). Сенсорная матрица представляет собой мембрану, с одной стороны которой закреплены нанопоры, а с другой – платиновые электроды. Микросхема ASIC усиливает и передаёт сигнал к управляющей станции, а также контролирует параметры детекции в соответствии с командами, поступающими от ПО.

Общий принцип устройства проточных ячеек для разных нанопоровых секвенаторов одинаков. Отличия заключаются в расположении систем и их отдельных характеристиках.

Проточные ячейки R9 и R10 для MinION/GridION

Максимально возможное количество нанопор на мембране таких ячеек – 2 048 шт. И в этом случае одному электроду в сенсорной матрице соответствует одна рабочая нанопора. Каждые 4 электрода объединены в один электронный канал для контроля напряжения и детекции ионного тока на каждой из 4-х соответствующих пор.

Таким образом, суммарное количество электронных каналов в проточной ячейке составляет 512 шт. Внутри одного канала поры используются по очереди.



Фактическое количество нанопор на мембране ячейки всегда отличается от теоретического и в среднем составляет 1 000–1 500 шт. Перед экспериментом этот показатель проверяют с помощью ПО MinKNOW.

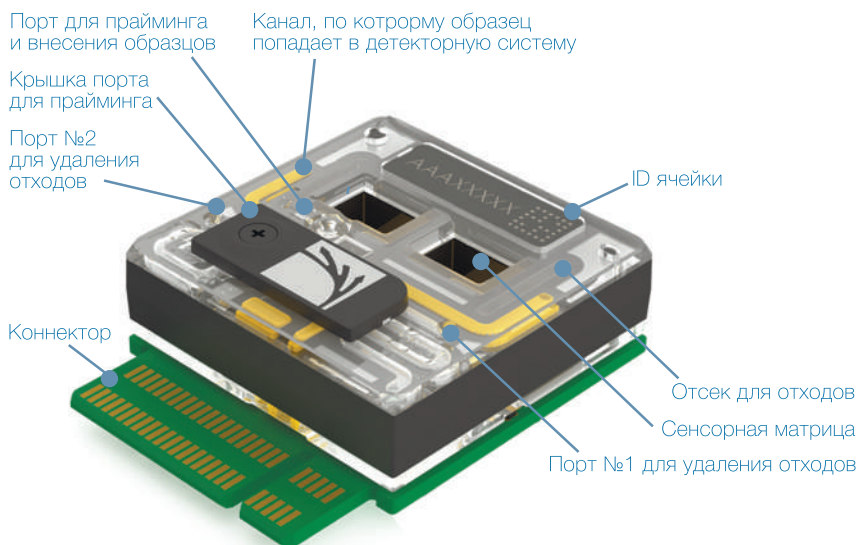
Ячейки R9 имеют одну точку детекции ионного тока в каждой нанопоре, и основной вклад в итоговый сигнал вносят только 5 ближайших к ней нуклеотидов. Это накладывает ограничения на способность точного прочтения гомополимеров. Обновлённые ячейки R10 имеют уже два участка детекции сигнала и характеризуются улучшенной точностью прочтения.

Максимальная производительность обеих версий ячеек составляет 30 Гб данных. Реальный показатель зависит от типа эксперимента, количества рабочих пор в момент запуска, количества библиотеки и длины фрагментов нуклеиновых кислот.

Проточные ячейки PromethION

В отличие от ячеек для MinION/GridION проточная система этих ячеек расположена над детектирующей, а буферы и библиотеки загружают через один и тот же порт.

Максимально возможное количество пор – 12 000 шт., фактическое – 6 000 – 9 000 шт. Количество электронных каналов контроля пор – 3 000 шт. Максимальная производительность – 200 Гб данных.



Приборы



MinION

- До 30 Гб данных
- Компактный: 87 г, 105 x 33 x 23 мм
- Можно использовать в «полевых» условиях
- Управление с помощью ноутбука, ПК или модуля MinIT



MinION Mk1C

- MinION с управляющим модулем и дисплеем
- До 30 Гб данных
- Графический процессор
- Работает без подключения к сети Интернет



GridION

- До 150 Гб данных
- Встроенная управляющая станция
- Предустановленное ПО
- Небольшие размеры и вес: 36 x 36 x 20 см, 11 кг



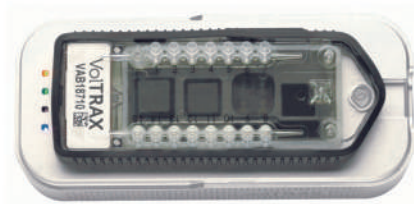
PromethION

- PromethION 48: до 9,6 Тб данных
- PromethION 24: до 4,8 Тб данных
- Секвенирующий и управляющий модули
- Предустановленное ПО
- Самая низкая в мире стоимость прочтения одного нуклеотида!



MinIT

- Управляющий модуль для MinION
- ОС Linux и ПО MinKNOW
- Графический процессор
- Bluetooth, WiFi, Ethernet
- Подключается к внешним устройствам



VoITRAX V2

- Автоматизированная пробоподготовка
- Быстрый протокол с очисткой
- Питание от управляющей станции
- Совместим со всеми платформами ONT

Програмное обеспечение

Oxford Nanopore Technologies располагает оригинальным ПО для первичной и вторичной обработки данных.

MinKNOW – программа, контролирующая параметры секвенирования, записывающая первичные данные в формате .Fast5 и осуществляющая бейсколлинг в режиме реального времени. Предустановлена на MinIT, MinION Mk1C, GridION, PromethION.

Guppy – программа для бейсколлинга по итогам запуска в режиме offline.

Epi2Me – облачный сервис с программными модулями для вторичной обработки данных, например:

- **WIMP** (What's in my pot) – модуль для анализа метагеномных образцов. Картирует полученные прочтения на референсные последовательности из базы данных NCBI, определяя организмы в образце и выстраивая их в иерархию по таксонам.
- **ARMA** – модуль для идентификации антибиотикорезистентности у прокариот. Ищет в прочтениях участки, схожие с известными локусами, ассоциированными с устойчивостью к антибиотикам.

Методы

Полногеномное секвенирование

Секвенирование *de novo*
Анализ структурных изменений
Ресеквенирование



Целевое секвенирование

Секвенирование длинных ампликонов
Анализ генов 16S рРНК
Анализ SNP



Секвенирование РНК

Прямое секвенирование РНК и кДНК
Анализ полноразмерных транскриптов
Исследование химерных генов



Метагеномика

Определение видовой принадлежности с использованием длинных прочтений
Анализ смешанных образцов в реальном времени



Эпигенетика

Анализ метилирования
Определение модификаций гистонов
Исследование активности некодирующих РНК



Области применения



Клинические
исследования



Онкология



Анализ
транскриптома



Генетика



Исследования
генома



Микробиология



Изучение
микробиома



Исследование
растений



Исследование
животных



Экология

Области применения

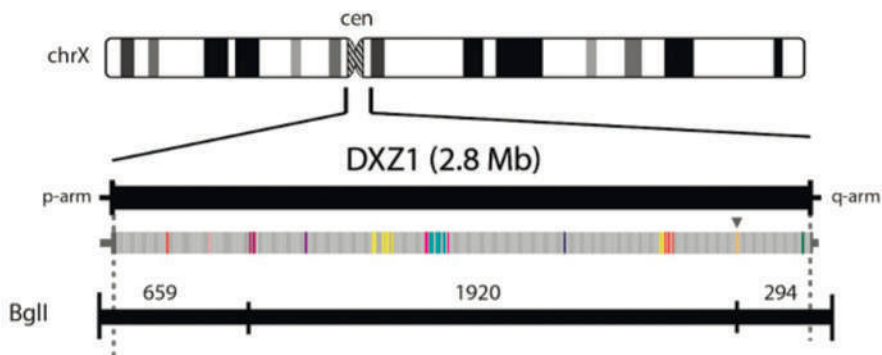
Гибридная сборка

Гибридная сборка генома – это определение последовательности ДНК хромосом на основании длинных и коротких прочтений, полученных на разных секвенирующих платформах. Это ключевое применение технологии **Oxford Nanopore Technologies**.

Например, недавно учёным из США удалось впервые собрать X-хромосому человека от теломеры до теломеры методом гибридной сборки*. Длинные прочтения получали с помощью нанопорового секвенатора GridION, короткие – на платформах Illumina.

Исследователям удалось восстановить полную последовательность центромерной области – сателлитной ДНК DXZ1 длиной 2,8 Мб. Также они смогли заполнить 29 пробелов, имеющих в актуальной референсной последовательности X-хромосомы, одновременно с этим открыв новые псевдоаутосомные области и участки, содержащие раково-тестикулярные гены семейств CT-X и GAGE.

Наконец, используя ПО Nanopolish авторы впервые в мире определили паттерны метилирования сложных тандемных повторов.



На рисунке представлена структура восстановленной центромерной сателлитной области DXZ1. Вертикальные полосы – повторы длиной ~2 кб: серые – канонические последовательности, цветные – структурные варианты. Треугольник показывает сайт инсерции единичного повтора LINE/L1Hs.

Внизу изображена смоделированная карта расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции BglI. Участки слева и справа от пунктирной линии лежат за пределами области DXZ1, но они были бы частью рестрикционного фрагмента.

* Miga K.H. et al. (2019). Telomere-to-telomere assembly of a complete human X chromosome. DOI: 10.1101/735928.

Области применения

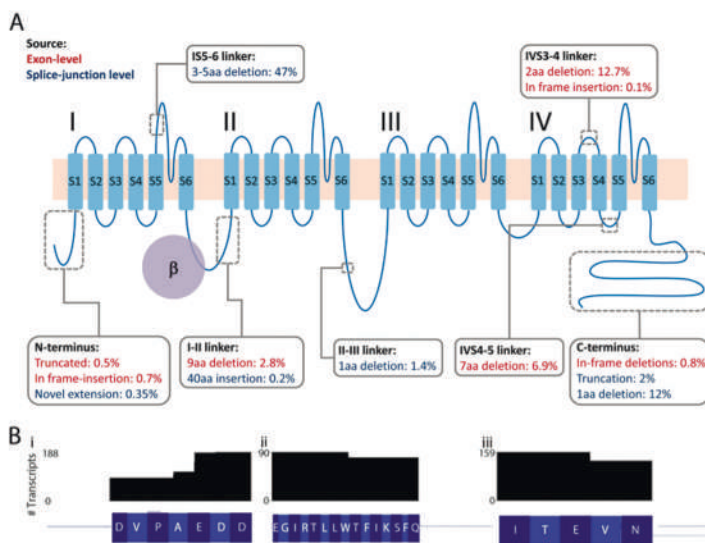
Альтернативный сплайсинг

Ген CACNA1C кодирует субъединицу Cav1.2 потенциалзависимых кальциевых каналов. Некоторые локусы в нем ассоциированы с психиатрическими заболеваниями, включая биполярное расстройство и шизофрению.

Исследователи из Оксфордского университета изучили сплайс-варианты транскриптов гена CACNA1C *. Для этого *post mortem* из 6 разных участков головного мозга 3 взрослых человек выделили РНК и методом ОТ-ПЦР амплифицировали кДНК. Последовательность транскриптов определяли методом нанопорового секвенирования на платформе MinION с последующей биоинформатической обработкой.

Авторам удалось идентифицировать 241 неизвестную ранее транскрипционную изоформу и 38 новых потенциальных экзонов. При этом уровень экспрессии разных сплайс-вариантов отличался для разных участков мозга сильнее, чем между индивидуумами.

Это исследование открывает новые направления для разработки психотерапевтических препаратов.



Влияние выявленных эффектов сплайсинга на белок Cav1.2. **A** - Cav1.2 имеет 4 домена (I-IV), каждый домен состоит из 6 трансмембранных участков (S1-S6). С внутриклеточной петлей I-II связана субъединица β . В рамках указаны положения обнаруженных инсерций/делеций и относительное количество содержащих их прочтений (в %). **B** – количество белковых изоформ, содержащих три микроделеции: I - в линкере I-II, II – в линкере IVS4-5, III – в линкере IVS3-4.

* Clark M.B. et al. (2019). Long-read sequencing reveals the complex splicing profile of the psychiatric risk gene CACNA1C in human brain. DOI: 10.1038/s41380-019-0583-1.

Области применения

Анализ метагеномов

Анализ бактериального гена 16S рРНК – популярный метод исследования метагеномов различных образцов. В то время как другие NGS-решения для метагеномики заключаются в секвенировании лишь отдельных регионов гена 16S рРНК (например, V3-V4), технология **Oxford Nanopore Technologies** позволяет проанализировать его целиком.

Нанопоровые секвенаторы, специальный набор с 24 баркодами и программный модуль WIMP, разработанные этой компанией, существенно упрощают метагеномные исследования.

Так участники проекта Extreme Microbiome Project провели анализ метагенома воды из озера Хиллиер (Австралия)*, которое известно своим необычным розовым цветом.

Традиционный культуральный метод позволил выявить в нем всего 13 видов микроорганизмов. Секвенируя 16S-ампликоны короткими прочтениями, исследователи установили, что в образце содержатся и другие прокариоты, но определить видовой состав они смогли только с помощью платформы MinION.

За 24 часа секвенирования на этом приборе удалось построить полное филогенетическое дерево всех водорослей, архей, бактерий и вирусов, присутствовавших в образце (см. рис.). Многие из обнаруженных видов имеют розовую окраску, что объяснило цвет воды в озере.



* McGrath, K. (2016) The eXtreme Microbiome Project (XMP) presents: The Mystery of the Pink Lake. Доступно по адресу: <https://vimeo.com/169892664> [Accessed: 2 October 2016]

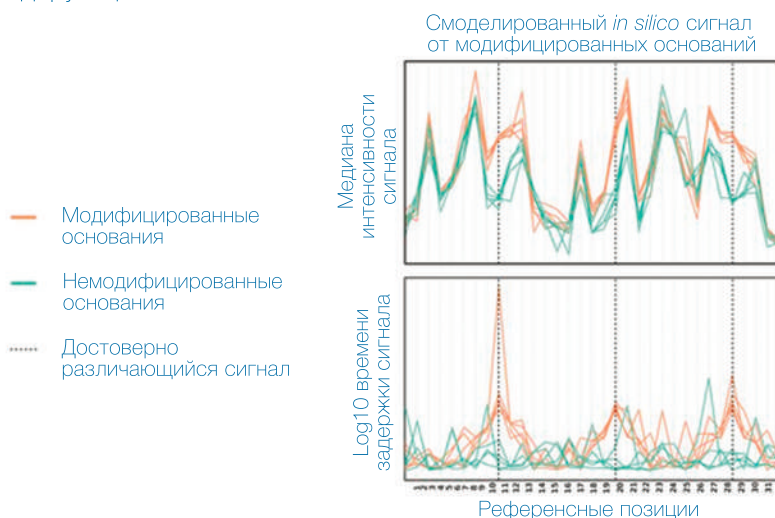
Области применения

Исследование эпигенетических модификаций

Платформы **Oxford Nanopore Technologies** позволяют детектировать эпигенетические модификации ДНК и РНК. Такой анализ происходит прямо во время процесса обычного секвенирования. При этом он не требует предварительной специальной обработки образцов, например бисульфитной конверсии ДНК.

Сигналы от модифицированных и немодифицированных оснований отличаются. Эти отличия и, соответственно, эпигенетические модификации в нуклеиновых кислотах выявляют специальные программы для обработки первичных данных секвенирования (Tombo, Nanopolish, EpiNano и др.).

В 2019 году группа исследователей разработала алгоритм анализа модификаций РНК Nanocompore на основании данных её прямого секвенирования с помощью технологии **Oxford Nanopore Technologies***. Для этого они сравнивали сигналы от опытных образцов РНК с сигналами от немодифицированных контрольных образцов РНК с такой же последовательностью. Алгоритм подходит для анализа как поли(А) РНК, так и некодирующих РНК.



Графики, сгенерированные алгоритмом Nanocompore. Они отражают медиану интенсивности (вверху) и временную задержку (внизу) сигнала в исходных данных секвенирования. Пунктирными линиями обозначены позиции наибольшего расхождения сигналов от немодифицированных (зеленый) и модифицированных (оранжевый) образцов.

* Leger A, et al. (2019). RNA modifications detection by comparative Nanopore direct RNA sequencing. DOI: 10.1101/843136.

Области применения

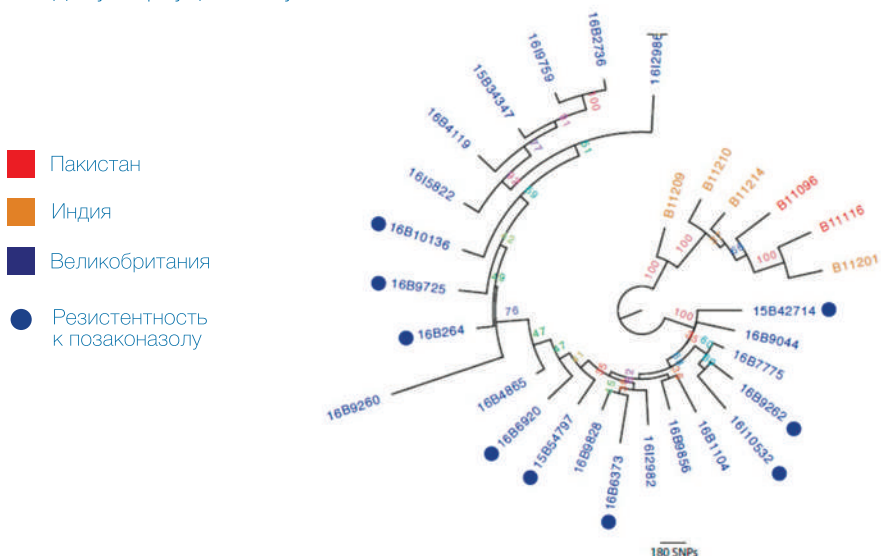
Исследование устойчивости к противогрибковым препаратам

Candida auris – патогенный грибок с множественной лекарственной устойчивостью, вызывающий вспышки внутрибольничных инвазивных инфекций.

С помощью платформ MinION и Illumina исследователи из Имперского колледжа Лондона секвенировали геномы 27 грибковых изолятов, собранных в 2015/16 гг. во время такой вспышки в больнице Ройал Бромптон*.

Для сборки референсного генома *C. auris* авторы использовали данные секвенирования пяти изолятов. Геномы остальных изолятов сравнивали с референсом для поиска мутаций, отвечающих за лекарственную устойчивость, которые появились в течение вспышки.

Мутация Y132F в гене *ERG11* всех образцов *C. auris* была причиной снижения их чувствительности к флуконазолу. Один из изолятов имел дополнительные мутации в генах *FKS1* (S652Y) и *FUR1* (F211I), вызывающие резистентность к эхинокандину и флуцитозину соответственно.



Эволюционные связи изолятов *C. auris* из разных стран. Схожесть изолятов из Великобритании с изолятами из Индии и Пакистана позволяет делать вывод об их общем происхождении.

* Rhodes J. et al. (2018). Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris*. DOI: 10.1038/s41426-018-0045-x.

Области применения

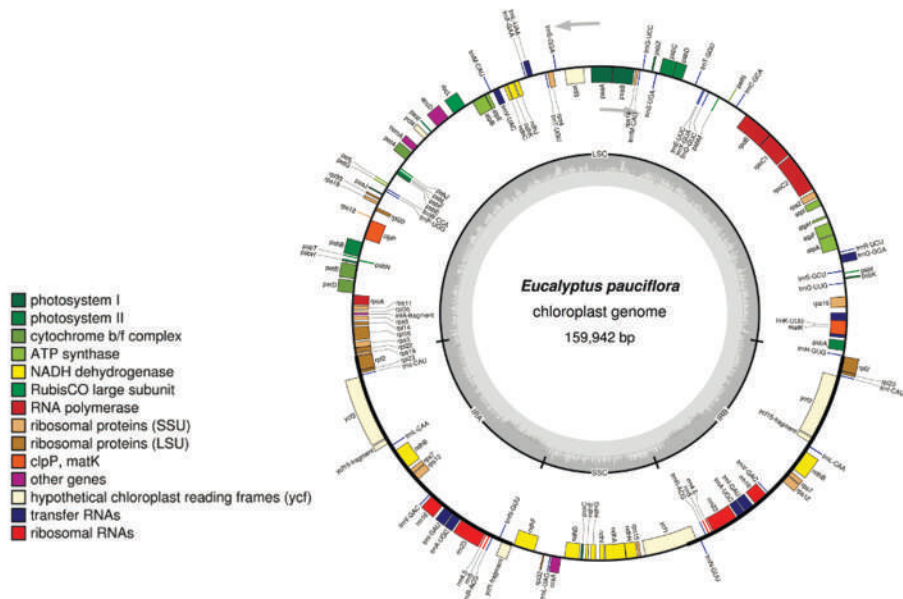
Секвенирование генома растений

Геном хлоропластов – молекула дцДНК длиной 120–160 кб, кодирующая около 100 генов белков, участвующих в фотосинтезе и других метаболических процессах. Как правило, она замкнута в кольцо и содержит два уникальных региона, разделенных двумя длинными инвертированными повторами (10-30 кб). Подобное строение геномов хлоропластов затрудняет их сборку в единый контиг при секвенировании на основе коротких прочтений.

Группа ученых из Австралийского национального университета сравнила 3 подхода к *de novo* секвенированию генома хлоропластов *Eucalyptus pauciflora*: сборка только из коротких прочтений (HiSeq-2500), сборка только из длинных прочтений (MinION) и гибридная сборка*.

Оптимального результата они достигли при комбинировании длинных и коротких прочтений с 20-кратным покрытием в каждом случае. Причём покрытие прочтениями, превышающими по длине инвертированные повторы, было 5-кратным.

Полученный единый контиг генома хлоропластов *E. pauciflora* состоит из 159 942 п.н. и кодирует 131 ген, включая 37 генов тРНК и 8 генов рРНК.



Аннотированный геном хлоропластов эвкалипта мелкоцветкового *E. pauciflora*. Внутренний круг серого цвета отображает GC-состав.

* Wang W. et al. (2018). Assembly of chloroplast genomes with long- and short-read data: a comparison of approaches using *Eucalyptus pauciflora* as a test case. DOI: 10.1186/s12864-018-5348-8.



ООО СкайДжин

115093, Москва, ул. Люсиновская, д. 36, стр. 1

Тел/факс: 8 (495) 215-02-22

Бесплатная линия: 8 (800) 333-12-26

www.skygen.com

info@skygen.com

