

Первый отечественный прибор для массового параллельного секвенирования ДНК Нанофор СПС

^{1,2,3,4}Я.И. Алексеев*, ¹А.И. Петров, ¹И.В. Чубинский-Надеждин, ¹В.С. Резник, ¹В.В. Никаноров,
^{1,2}А.А. Пушкин, ^{1,2}К.Д. Ващенко, ²К.Е. Герасимов, ²Д.А. Квон, ⁵А.В. Веретенников,
⁶А.А. Воробьев, ¹В.А. Кудряшов, ¹А.А. Евстапов, ¹В.Е. Курочкин

¹Институт аналитического приборостроения Российской академии наук,
Российская Федерация, Санкт-Петербург

²ООО «НПФ Синтол», Российская Федерация, Москва

³Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук,
Российская Федерация, Севастополь

⁴Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарах»
НИЦ «Курчатовский институт», Российская Федерация, Ялта

⁵АО «ЭЗАН», Российская Федерация, Черноголовка

⁶Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Российская Федерация, Киров

*E-mail: jalex@syntol.ru

Резюме

Статья посвящена разработке первого российского прибора для массового параллельного секвенирования ДНК Нанофор СПС. Прибор задумывался как отечественная альтернатива наиболее распространенного на мировом рынке секвенатора MiSeq, производства американской компании Illumina, имеющего производительность достаточную для расшифровки полных геномов малых организмов – бактерий, вирусов, грибов, а также для проведения расшифровки большого количества образцов по интересующим исследователей группам генов. Такая универсальность при одновременно невысокой (по сравнению с истинно полногеномными высокопроизводительными секвенаторами) стоимости запуска обусловили большую популярность приборам MiSeq. В основе принципа функционирования приборов Нанофор СПС и MiSeq лежит технология секвенирования путем синтеза с детекцией сигнала флуоресценции, базовые элементы которой разработаны советскими и российскими учеными в 90-х годах прошлого века.

Ключевые слова: массовое параллельное секвенирование ДНК, секвенирование путем синтеза, флуоресцентное секвенирование, реакционная ячейка

Цитирование: Алексеев Я.И., Петров А.И., Чубинский-Надеждин И.В., Резник В.С., Никаноров В.В., Пушкин А.А., Ващенко К.Д., Герасимов К.Е., Квон Д.А., Веретенников А.В., Воробьев А.А., Кудряшов В.А., Евстапов А.А., Курочкин В.Е. Первый отечественный прибор для массового параллельного секвенирования ДНК Нанофор СПС. *Biomics*. 2025. 17(2). 121-132. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-9

© **Авторы,** Я.И. Алексеев, А.И. Петров, И.В. Чубинский-Надеждин, В.С. Резник, В.В. Никаноров, А.А. Пушкин, К.Д. Ващенко, К.Е. Герасимов, Д.А. Квон, А.В. Веретенников, А.А. Воробьев, В.А. Кудряшов, А.А. Евстапов, В.Е. Курочкин, 2025

The first domestic device for massive parallel DNA sequencing Nanophore SPS

^{1,2,3,4}Ya.I. Alekseev*, ¹A.I. Petrov, ¹I.V. Chubinsky-Nadezhdin, ¹V.S. Reznik, ¹V.V. Nikanorov, ^{1,2}A.A. Pushkin,
^{1,2}K.D. Vashchenko, ²K.E. Gerasimov, ²D.A. Kvon, ⁵A.V. Veretennikov, ⁶A.A. Vorob'ev, ¹V.A. Kudryashov,
¹A.A. Evstrapov, ¹V.E. Kurochkin

¹Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russian Federation

²Syntol LLC, Moscow, Russian Federation

³A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

⁴All-Russian National Research Institute of Vitia and Winemaking "Magarach" of the National Research Center
"Kurchatov Institute", Yalta, Russian Federation

⁵Joint-stock company "EZAN", Cheernogolovka, Russian Federation

⁶Research Center of the Federal State Budgetary Institution "48 Central Research Institute" of the Ministry of Defense
of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

*E-mail: jalex@syntol.ru

Resume

The article is devoted to the development of the first Russian sequencer for massive parallel DNA sequencing, the Nanophore SPS. The sequencer was conceived as a domestic alternative to the MiSeq sequencer, which is the most widely used sequencer on the world market, manufactured by the American company Illumina, which has sufficient performance to decode the complete genomes of small organisms – bacteria, viruses, fungi, as well as to decode a large number of samples for groups of genes of interest to researchers. This versatility as well as low cost of analysis (compared to really genome-wide high-throughput sequencers) have led to the great popularity of MiSeq devices. The principle of operation of the Nanophore SPS and MiSeq devices is based on the technology of sequencing by synthesis with fluorescence signal detection, the basic elements of which were developed by Soviet and Russian scientists in the 90s of the last century.

Keywords: massive parallel DNA sequencing, sequencing by synthesis, fluorescent sequencing, reaction cell

Citation: Alekseev Ya.I., Petrov A.I., Chubinsky-Nadezhdin I.V., Reznik V.S., Nikanorov V.V., Pushkin A.A., Vashchenko K.D., Gerasimov K.E., Kvon D.A., Veretennikov A.V., Vorob'ev A.A., Kudryashov V.A., Evstrapov A.A., Kurochkin V.E. The first domestic device for massive parallel DNA sequencing Nanophore SPS. *Biomcs*. 2025. 17(2). 121-132. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-9

© **The Authors**, Ya.I. Alekseev, A.I. Petrov, I.V. Chubinsky-Nadezhdin, V.S. Reznik, V.V. Nikanorov, A.A. Pushkin, K.D. Vashchenko, K.E. Gerasimov, D.A. Kvon, A.V. Veretennikov, A.A. Vorob'ev, V.A. Kudryashov, A.A. Evstrapov, V.E. Kurochkin, 2025

Краткое содержание

Технологии секвенирования ДНК или прочтения (расшифровки) последовательности нуклеотидов в молекуле, определяющей свойства всех живых организмов и, в силу этой фундаментальной для Жизни функции исследуемой молекулы, являются критическими с точки зрения огромной научной и практической ценности получаемых данных. В год 50-летия первой публикации метода расшифровки последовательности ДНК в пионерной работе Ф.Сэнгера в 1975 г. [1], оцененной в 1980 году Нобелевской премией по химии, представляется важным описать достижения в области разработки отечественных технологий массового параллельного секвенирования (МПС)

ДНК и, прежде всего, первый Российский прибор для МПС Нанофор СПС.

Рассмотрены молекулярные основы технологии секвенирования путем синтеза, принципиальные схемы построения приборов для МПС и метрики, характеризующие качество получаемых на секвенаторах данных. Проведено сравнение данных, полученных на Нанофоре СПС и MiSeq. Сформулированы перспективы развития научного приборостроения для генетических исследований.

Отмечена важнейшая роль в разработке отечественных технологий секвенирования ДНК, как гарантии независимости Российской Федерации в критических вопросах развития науки, здравоохранения, сельского хозяйства, в обеспечении её биологической безопасности и технологической независимости.

Введение

В рамках выполнения Федеральной целевой программы "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015 - 2020 годы)" Министерством здравоохранения Российской Федерации была поставлена задача по разработке отечественного аналога секвенатора ДНК MiSeq, производства американской компании Иллюмина. За 5 лет до этого в 2014 году консорциум Российские генетические технологии, объединивший специалистов Института аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН), Экспериментального завода научного приборостроения со Специальным конструкторским бюро РАН (АО «ЭЗАН») и ООО «НПФ Синтол» разработал и освоил в серийном производстве первый отечественный классический секвенатор ДНК Нанофор 05 [2]. Основываясь на накопленном положительном опыте совместных работ, коллектив исполнителей под руководством директора ИАП РАН Владимира Ефимовича Курочкина совместно со специалистами компании ООО «НПФ Синтол» осенью 2018 года при поддержке Минздрава России приступил к разработке прибора Нанофор СПС. Уже через 2 года успешно проведены Государственные приёмочные испытания прибора на базе Всероссийского научно-исследовательского института метрологии им. Д.И. Менделеева. В апреле 2023 года между компанией ООО «НПФ Синтол» и Минздравом России было подписано лицензионное соглашение на серийное производство Нанофора СПС, наборов реагентов и расходных материалов к нему.

Первые 3 прибора были выпущены и поставлены пользователям в конце 2023 г. Первыми пользователями приборов стали: ЦКП «Транскриптомика и филогеномика» Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского, где прибор используется в основном для метагеномного анализа [3], Курчатовский геномный центр, где основная задача прибора состоит в расшифровке полных бактериальных геномов, а также Отдел биологии опухолевого роста Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Петрова, где на приборе проводят таргетное секвенирование генов, ассоциированных с риском возникновения наиболее распространенных онкологических заболеваний. По результатам выявленных в ходе практической апробации недочетов и пожеланий пользователей была скорректирована конструкторская документация и доработано программное обеспечение прибора. В 2024 году компанией ООО «НПФ Синтол» выпущена

малая серия из 15 Нанофоров СПС, которые в настоящее время успешно работают в различных научно-исследовательских организациях России.

Рассмотрим подробнее как метод массового параллельного секвенирования путем синтеза реализуется на молекулярном уровне. Прежде всего необходимо остановиться на процедуре подготовки геномных библиотек для массового параллельного секвенирования. Так как длина прочтения в современных секвенаторах ДНК, работающих по принципу секвенирования путем синтеза, составляет не более 300 нуклеотидов, изначально выделенную высокомолекулярную ДНК необходимо фрагментировать до размеров около 300 нуклеотидов при расшифровке ДНК в варианте одностороннего прочтения и около 600 нуклеотидов в варианте двухстороннего или парноконцевого прочтения. Для этого используются различные методы, основными из которых в настоящее время являются метод физической фрагментации ДНК с помощью ультразвука и метод ферментативной фрагментации. Метод подготовки геномных библиотек с использованием ультразвуковой фрагментации ДНК состоит из пяти этапов, суммарная длительность выполнения которых составляет 4-5 часов на образец (рисунок 1А) и требует использования довольно дорогого специализированного оборудования – ультразвукового дезинтегратора ДНК. Преимущество метода ферментативной фрагментации заключается в том, что одновременно с расщеплением ДНК происходит введение в её состав служебных последовательностей (рисунок 1Б шаг 2), благодаря чему сама процедура подготовки библиотеки занимает не более 1 часа. На этапе амплификации (рисунок 1А шаги 4-5, 1Б шаги 2-3) в молекулы геномной библиотеки вводятся служебные последовательности P5 и P7, комплементарные праймерам, иммобилизованным на поверхностях ячейки. В состав праймеров для амплификации могут быть введены индексы (i5 и i7), которые позволяют в ходе последующего биоинформатического анализа данных секвенирования провести расшифровку смеси образцов, зная, какие из них содержали какие индексы.

Индексы представляют собой короткие известные последовательности от 6 до 10 нуклеотидов, и могут быть введены как в один из праймеров для амплификации геномной библиотеки, так и в оба, что существенно повышает количество комбинаций, а, следовательно, позволяет индексировать большее количество образцов.

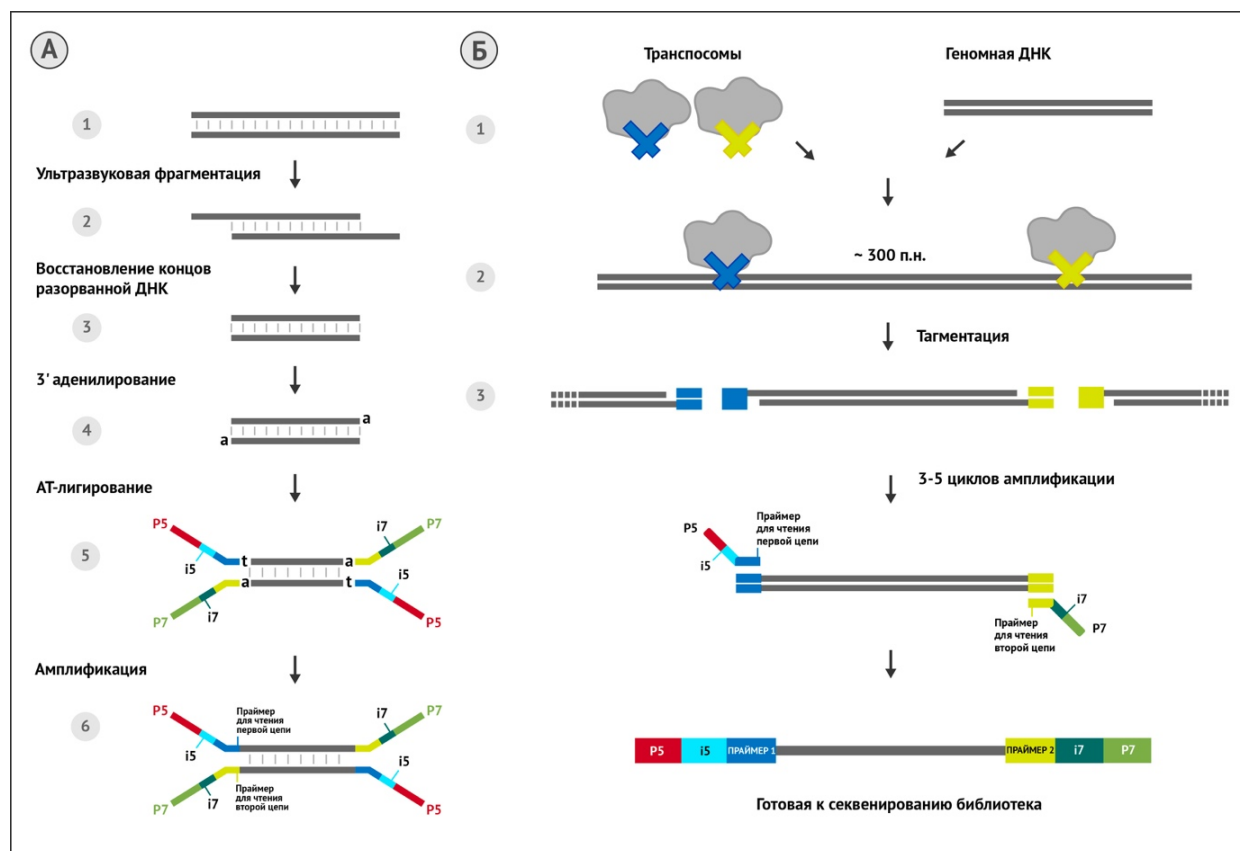


Рисунок 1 – Схемы подготовки геномных библиотек с помощью ультразвуковой фрагментации ДНК (А) и с помощью ферментативной фрагментации ДНК (Б).

Figure 1 – Schemes for the preparation of genomic libraries using ultrasonic DNA fragmentation (A) and enzymatic DNA fragmentation (B).

Таким образом, в настоящее время, например, с помощью наборов реагентов серии SyntEra-DNA (Синтол, Россия) можно индексировать и проводить анализ одновременно до 384 разных образцов. После этапов тагментации и амплификации реакционные смеси обязательно очищают от остатков праймеров со служебными последовательностями. Для этого лучше всего подходит методика селекции фрагментов ДНК по размерам на магнитных частицах, например, с помощью магнитных частиц SynMagBeads (Синтол, Россия). Далее концентрацию очищенных ампликонов измеряют на флуориметре, например, Qubit (Айвок, Россия) с помощью набора для высокочувствительной оценки концентрации двухцепочечной ДНК, например, СинКвант^{HS} ДНК (Синтол, Россия). Основываясь на полученных данных, проводят процедуру смешивания

индексированных образцов и доводят полученную геномную библиотеку до рабочей концентрации (обычно 6-12 пМ). Важно отметить, что оценку концентрации геномных библиотек целесообразно проводить разными методами, такими как ПЦР в реальном времени, например, на приборе ДТпрайм II (ДНК Технологии, Россия), методом флуориметрии, описанным выше, а также с помощью оценки относительной концентрации методом капиллярного гель-электрофореза в неденатурирующих условиях, например, на приборе Нанофор 05 (ИАП РАН, Россия). В последнем случае в автоматическом режиме всего за несколько минут можно точно оценить распределение длин фрагментов геномной библиотеки и её относительное количество (рисунок 2).

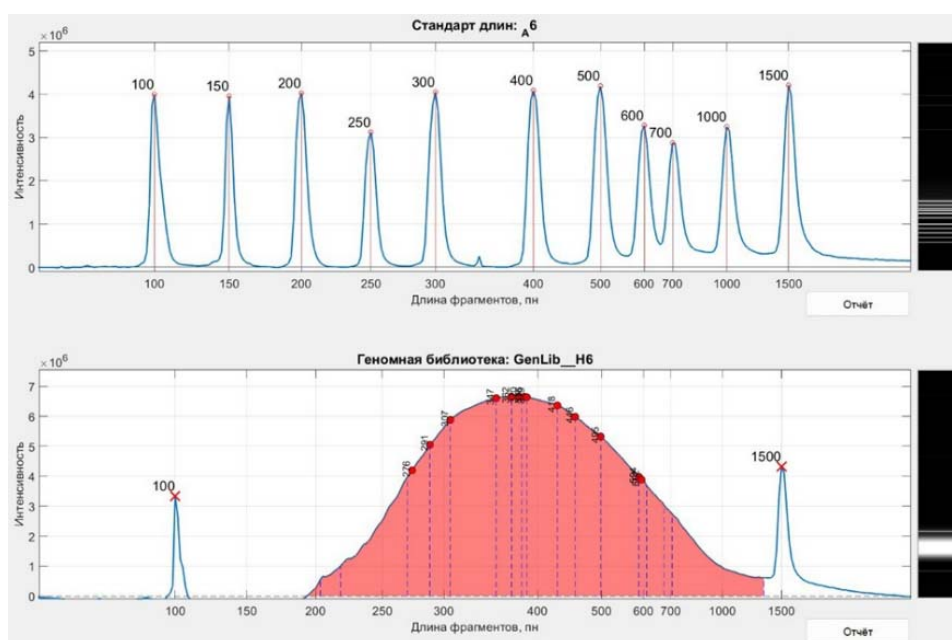


Рисунок 2 – Результат анализа качества (распределение длин фрагментов) и относительного количества геномной библиотеки методом неденатурирующего гель-электрофореза на приборе Нанофор 05.

Figure 2 – Result of quality analysis (distribution of fragment lengths) and relative quantity of the genomic library using non-denaturing gel electrophoresis on the Nanophor 05 device.

Реализация метода массового параллельного секвенирования ДНК путем синтеза состоит из последовательного выполнения нескольких этапов. На первом этапе, молекулы предварительно денатурированной геномной библиотеки вводятся в канал микрофлюидной ячейки к поверхности которой пришиты олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям адаптеров геномной библиотеки P5 и P7. Для повышения эффективности гибридизации температура в ячейке медленно

изменяется с 75°C до 40°C и молекулы библиотеки ДНК распределяются на поверхности ячеек случайным образом. Добавление в ячейку реакционной смеси, содержащей фермент Bst ДНК полимеразу (фермент обладает важной способностью вытеснять цепи, которые встречаются на его пути), природные дезоксинуклеозидтрифосфаты и буфер при температуре 60°C приводит к копированию цепей ДНК так, что полученная копия остается связанной с поверхностью ячейки (рисунок 3, шаг 1).

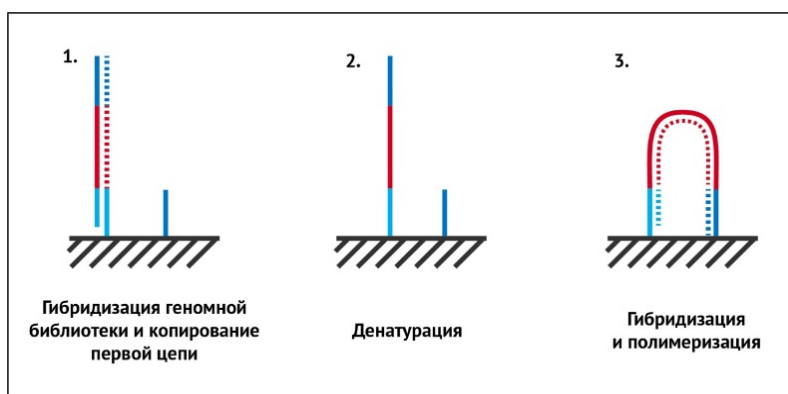


Рисунок 3 – Этап гибридизации молекул геномной библиотеки с поверхностью ячейки и его последующего копирования

Figure 3 – Stage of hybridization of genomic library molecules with the cell surface and its subsequent copying

Затем в ячейку подаётся раствор денатурирующего агента (водный раствор формамида), который удаляет исходную (материнскую) молекулу ДНК (рисунок 3, шаг 2), а последующее добавление гибридизационной и полимеризующей смесей приводит к копированию ковалентно связанной молекулы, в ходе которого на поверхности ячейки возникает копия молекулы,

комплементарной исходной молекуле из геномной библиотеки (рисунок 3, шаг 3). Циклическое повторение шагов: денатурация, гибридизация, полимеризация приводит к увеличению копий исходной материнской молекулы ДНК и возникновению так называемой молекулярной колонии (рисунок 4).

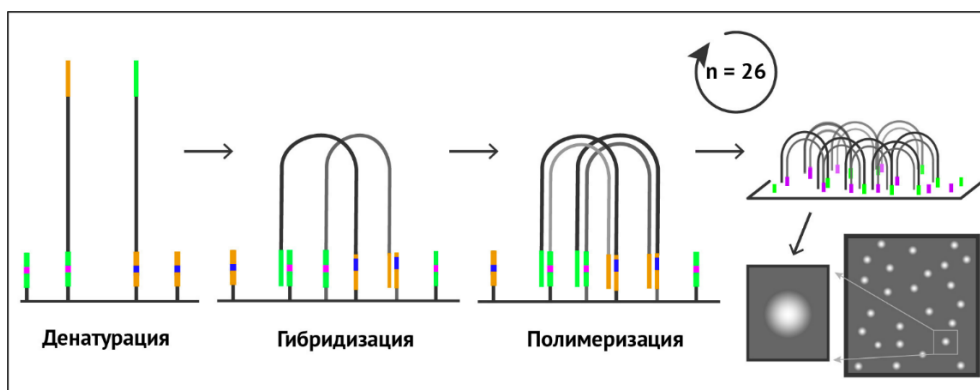


Рисунок 4 – Механизм мостиковой амплификации, приводящей к возникновению молекулярной колонии
Figure 4 – Mechanism of bridge amplification leading to the formation of a molecular colony

Необходимо отметить, что проиллюстрированная на рисунках 3 и 4 молекулярная реализация генерации молекулярных колоний на поверхности ячеек из единственной исходной молекулы ДНК была впервые в мире обоснована и экспериментально подтверждена в 1995 году российским ученым – Александром Борисовичем Четверинным из Института белка РАН (г. Пущино), который запатентовал этот метод амплификации молекулярных колоний в полиакриламидном геле [4]. Также существенный вклад с технологию массового параллельного секвенирования ДНК внесли результаты пионерских разработок исследователей из Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН под руководством Андрея Дарьевича Мирзабекова, занимавшихся разработкой биологических чипов для секвенирования ДНК и разработавших методику простой и эффективной ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности стеклянных ячеек путём их сополимеризации с акриламидом [5].

На следующем этапе, называемом линеаризацией первой цепи, нужно удалить одну из двух комплементарных цепей ДНК, выращенных в молекулярной колонии, чтобы провести расшифровку оставшейся цепи (в ином случае вторая цепь будет препятствовать эффективному прочтению первой).

Для этого в один из олигонуклеотидов, иммобилизованных на поверхности ячейки заранее введен модифицированный нуклеотид – дезоксиуридин (рисунок 5, шаг 1) который эффективно удаляется ферментом Урацил-ДНК-гликозилазой, гидролизующим гликозидную связь, соединяющую гетероциклическое основание с сахарофосфатным остовом. Далее, благодаря специфической активности Эндонуклеазы VIII из *E.coli*, цепочка ДНК в этом месте расщепляется с образованием 3'-фосфатной группы, а освободившаяся цепочка одной из двух цепей ДНК удаляется в присутствии денатурирующего агента (рисунок 5, шаг 2). Обе этих реакции наиболее эффективно идут при температуре 37°C. Укороченный на несколько нуклеотидов праймер на какое-то время «выходит из игры». Оставшаяся иммобилизованная цепь ДНК готова к расшифровке. Для этого в ячейку подается раствор с праймером для чтения первой цепи, начиная с которого слой за слоем происходит прочтение неизвестного участка путем включения модифицированных обратимо-терминированных 3'-О-метилязидных дезоксинуклеозидтрифосфатов А, Т, G, С (рисунок 5, шаг 2). Оптимальным температурным диапазоном их встраивания ДНК полимеразой является 60-65°C.

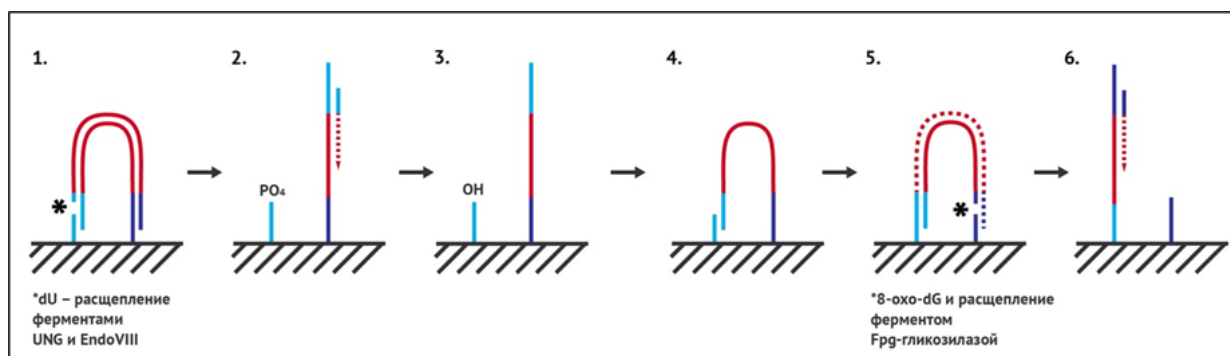


Рисунок 5 – Общая схема секвенирования путем синтеза

Figure 5 – General scheme of sequencing by synthesis

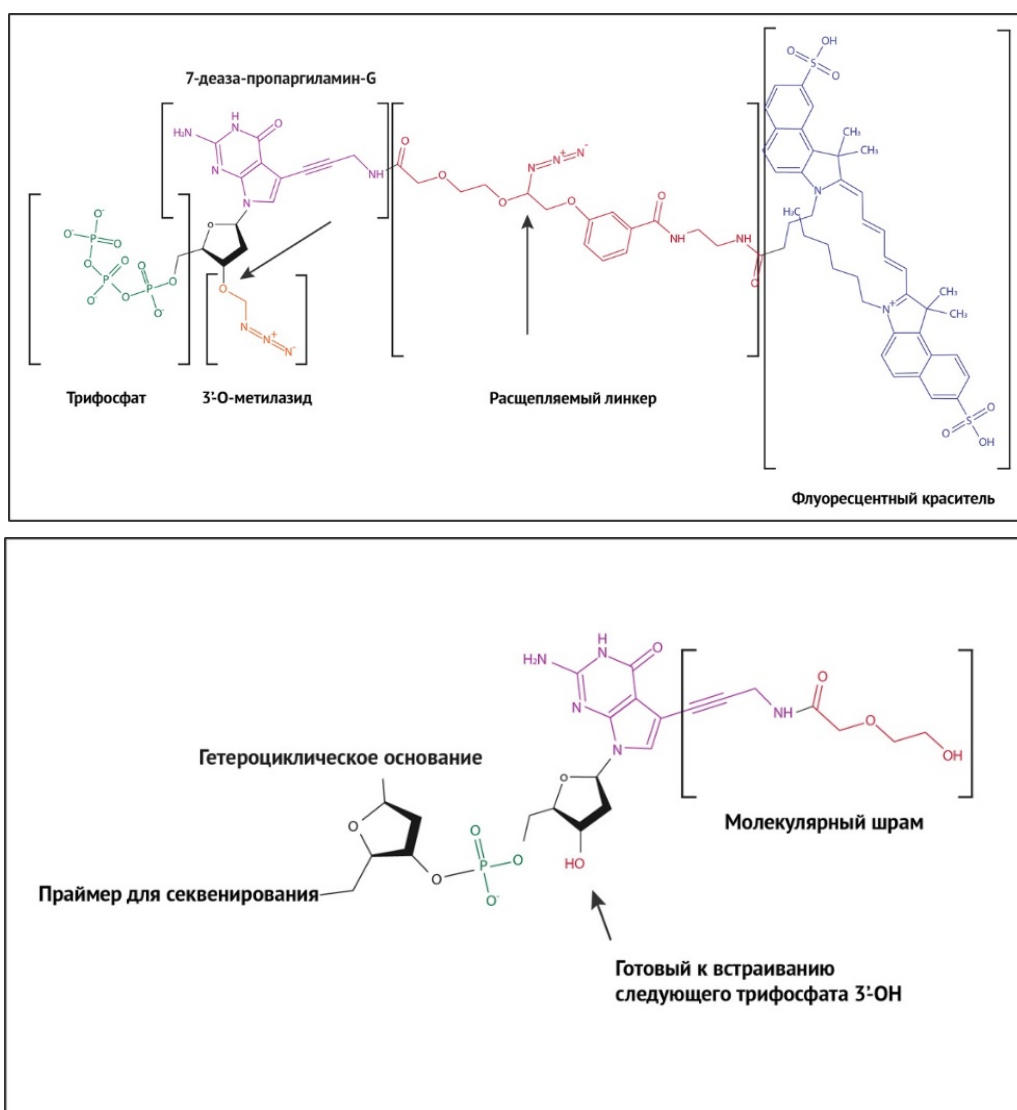


Рисунок 6 – Структура обратимо-терминированного дезоксиинуклеозидтрифосфата G до восстановления 3'-О-метилязидных групп (А) и после встраивания и восстановления 3'-О-метилязидных групп (Б)
Figure 6 – Structure of reversibly terminated deoxynucleoside triphosphate dG before reduction of 3'-O-methylazide groups (A) and after insertion and reduction of 3'-O-methylazide groups (B)

Также необходимо отметить, что использование 3'-О-метилазидных защитных групп, в качестве мягко, без нарушения структуры двойной спирали ДНК, удаляемых групп было впервые предложено в 1991 году советскими химиками [6]. В результате молекулярные колонии окрашиваются в

цвет, соответствующий красителю, введенному в состав встроенного нуклеотида (рисунок 5, шаг 2). Это позволяет определить, какой комплементарный встроенному нуклеотид находится в данной позиции расшифровываемой цепи так, как это изображено на рисунке 7.

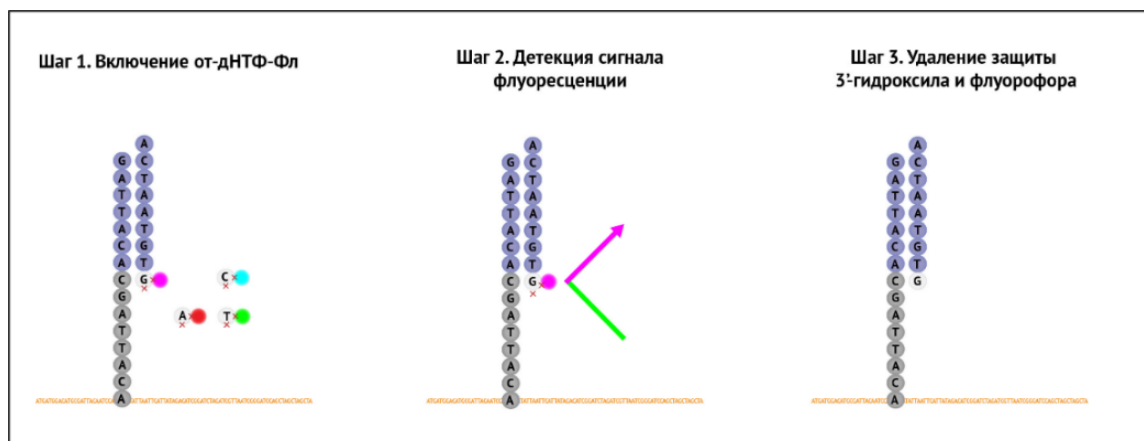


Рисунок 7 – Изображение шагов секвенирования путем синтеза со считыванием сигнала флуоресценции
Figure 7 – Illustration of the steps of sequencing by synthesis with fluorescence signal reading

Каждый дезоксинуклеозидтрифосфат содержит специфический для данного нуклеотида флуоресцентный краситель, соединенный с гетероциклическим основанием через линкер, содержащий отщепляемую в присутствии восстановителя 3'-О-метилазидную группу (рисунок 6). Затем в реакционную ячейку добавляется специальный раствор, обеспечивающий наилучшее соотношение сигнал/шум при температуре 22°C и происходит процедура сканирования поверхностей ячейки оптической системой прибора. Флуоресценция красителей возбуждается лазерным излучением на специфических для них длинах волн. Детекция сигналов флуоресценции колоний осуществляется с помощью высокопрецизионной оптики. После сканирования поверхностей ячейки происходит процедура удаления 3'-О-метилазидной защитной группы, а также отщепление флуоресцентной метки от гетероциклического основания нуклеотида (рисунок 7, шаг 3) в присутствии сильных восстанавливающих агентов, например, трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Процедуры встраивания дезоксинуклеозидтрифосфатов, считывания и определения какой нуклеотид встроился в какую молекулярную колонию и его последующего деблокирования с одновременным удалением флуоресцентного красителя повторяются по циклу от 75 до 300 раз в зависимости от задачи и типа химии, используемой для встраивания модифицированных дезоксинуклеозидтрифосфатов. Так как на каждом цикле синтеза возникают ошибки, связанные с

неточной работой ДНК полимеразы, например, из-за возникновения так называемых молекулярных шрамов в гетероциклических основаниях, после восстановления азидных групп и удаления флуоресцентного красителя (рисунок 6, Б) и целого ряда других факторов, к определенному циклу чтения их количество становится критичным и продолжение дальнейшей расшифровки последовательности перестает быть целесообразным. Основными возможными ошибками, приводящими к ухудшению качества секвенирования, являются ошибки, связанные с неполным встраиванием дезоксинуклеозидтрифосфатов во все цепи молекулярной колонии (так называемый фазинг), ошибочным встраиванием другого типа нуклеотида, либо встраиванием полимеразой не одного, а двух нуклеотидов из-за присутствия в реакционной смеси небольшого процента дезоксинуклеозидтрифосфатов, не имеющих 3'-защитной группы (так называемый префазинг). В настоящее время в мире (в том числе авторами этой работы) ведутся исследования, направленные на повышение стабильности и качества работы компонентов инкорпорирующей реакционной смеси, прежде всего ДНК полимеразы.

Проведя расшифровку заданного протоколом количества нуклеотидов процесс секвенирования может быть завершен и тогда он будет называться одноконцевым (single end), либо продолжен. Для продолжения секвенирования проводится процедура восстановления колоний, которые на этапе прочтения первой цепи были одноцепочечными. Для этого в

ячейку подается реакционная смесь, содержащая фермент T4 полинуклеотидкиназу, который в присутствии аденозиндифосфата АДФ обладает 3'-фосфатазной активностью и удаляет 3'-фосфатные группы с укороченных в ходе первой линейаризации ферментами UDG и Endo VIII цепочек праймера P5 (рисунок 5, шаг 3). После этого происходит мостиковая амплификация колоний так, как это происходило на этапе их генерации, только циклов амплификации проводится не 26, а 12 (рисунок 5, шаг 4). Затем проводят расщепление и удаление уже прочитанной на предыдущем этапе цепи, путем расщепления модифицированного 8-оксо-дезоксигуанозина (8-охо-dG), входящего в состав праймера P7, с помощью фермента системы репарации Fpg-гликозилазы из *E.coli*, селективно удаляющей данный модифицированный нуклеозид и расщепляющей цепочку ДНК в месте его нахождения (рисунок 5, шаг 5). После удаления отщепленной таким образом цепочки ДНК, оставшаяся цепочка готова к расшифровке. В ячейку закачивают праймер для чтения второй цепи и процедура расшифровки

повторяется аналогично процедуре чтения первой цепи (рисунок 5, шаг 6).

В случае использования индексированных геномных библиотек последовательность шагов, изображенная на рисунке 5, должна быть дополнена еще двумя шагами (рисунок 8). После окончания прочтения первой цепи и удаления выращенной с праймера для прочтения первой цепи молекулы ДНК происходит прочтение индекса i7, которое осуществляется путем закачки специального праймера для чтения индексов (рисунок 8, шаг А). Затем происходит прочтение индекса i5 (рисунок 8, шаг Б). Для прочтения индекса i5 используется праймер P5, иммобилизованный на поверхности ячейки. Перед началом прочтения этот праймер, ранее расщепленный в ходе линейаризации первой цепи (рисунок 5, шаг Б), достраивается (без детекции сигналов флуоресценции) до нуклеотида, предыдущего первому нуклеотиду индекса i5 и затем происходит прочтение индексной последовательности.

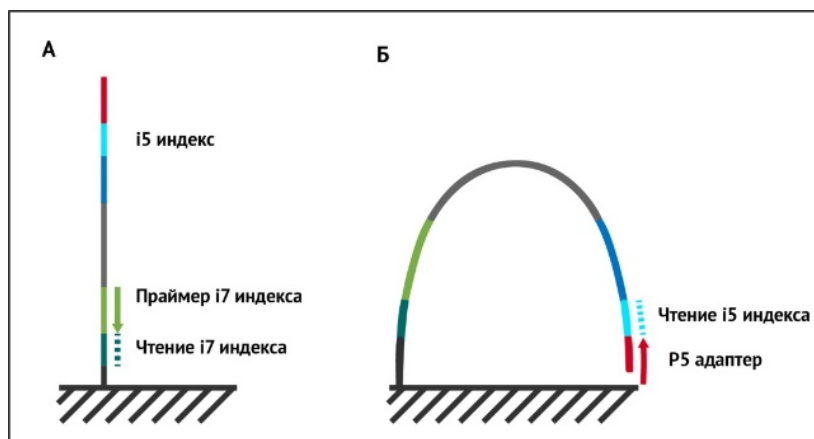


Рисунок 8 – Изображение структуры молекулы ДНК-библиотеки с чтением индекса i7 (А) и индекса i5 (Б)
Figure 8 – Image of the structure of the DNA library molecule with reading of index i7 (A) and index i5 (B)

Как следует из описания молекулярного механизма реализации метода массового параллельного секвенирования, прибор для его реализации должен отвечать ряду ключевых требований:

1. Детектировать сигналы флуоресценции 4-х спектрально разнесенных красителей.
2. Обеспечивать точность позиционирования равную 1 мкм, так как объект детекции – молекулярная колония имеет характерный размер 1 кв. мкм.
3. Обеспечивать заданную протоколом секвенирования последовательность смены реагентов через канал проточной ячейки при заданной температуре ячейки с заданной скоростью в течение заданного времени.

Соответствие указанным и ряду других требований реализованы в первом российском генетическом анализаторе для массового параллельного секвенирования Нанофор СПС (рисунок 9).



Рисунок 9 – Первый отечественный прибор для массового параллельного секвенирования ДНК Нанофор СПС

Figure 9 – The first domestic device for massive parallel DNA sequencing Nanophor SPS

Для реализации метода секвенирования путем синтеза с детекцией сигнала флуоресценции с поверхностей проточных ячеек Нанофор СПС состоит из нескольких основных блоков:

- гидравлический блок, отвечающий за подачу жидкостей из картриджа с реагентами через ячейку;
- оптический блок, отвечающий за детекцию цвета колоний на каждом шаге секвенирования;
- сопряженная с оптической системой система позиционирования ячейки относительно оптического блока;
- термостат ячейки и термостат картриджа с реагентами;
- система управления блоками.

Оптический блок отвечает за считывание сигналов флуоресценции из молекулярных колоний, размеры которых находятся в диапазоне 1-2 кв. мкм, а плотность их на поверхности от 500 тысяч до 1,5 миллиона на кв. мм. Два лазера обеспечивают последовательное попарное возбуждение четырех флуоресцентных красителей, сигнал флуоресценции которых детектируется четырьмя камерами со светочувствительной матрицей на основе комплементарной структуры металл-оксид-полупроводник (КМОП). Оптическая система сопряжена с системой прецизионного (с точностью 1 мкм) перемещения ячейки. Гидравлическая система прибора обеспечивает подачу рабочих и

промывочных растворов через проточный канал ячейки с заданной скоростью. В отсеке, куда помещается штатив с реагентами, поддерживается температура от 4°C до 8°C (так как реагенты содержат ферменты, активность которых при хранении в условиях комнатной температуры снижается в течение времени исполнения протокола секвенирования – от 5 до 60 часов в зависимости от задачи). Также в диапазоне от 22°C до 75°C в зависимости от этапа выполнения протокола секвенирования, термостатируется подложка, на которую установлена ячейка.

Основными характеристиками секвенатора ДНК являются объем генетических данных, полученных за запуск и их качество. Этот показатель напрямую зависит от длины прочтения и того, проводится расшифровка по одной или по двум цепям ДНК. Для прибора Нанофор СПС основные метрики следующие – объем генетических данных не менее 7,5 млрд. нуклеотидов (из них не менее 75% с качеством Q30, то есть одна ошибка на 1000 прочитанных нуклеотидов) в варианте парноконцевого прочтения 2x250 нуклеотидов. Часто производительность секвенатора оценивают в количестве прочтений, которое легко определить, разделив суммарный объем генетических данных за запуск на общую длину прочтения. В случае Нанофора СПС это величина составляет значение 15 миллионов. Таким образом, производительности Нанофора СПС достаточно для расшифровки небольших геномов таких организмов, как вирусы, бактерии, грибы.

Еще одним важным практическим применением Нанофора СПС является возможность секвенирования панелей генов, выявленные нарушения в которых приводят к возникновению наследственных, онкологических, кардиологических, неврологических и других социально-значимых заболеваний. Здесь также существует ограничение по количеству комбинаций таких генов и одновременно загружаемых в прибор образцов. Так, если мы хотим одновременно проанализировать 96 образцов по 22 генам со средней длиной кодирующей части 150 тысяч нуклеотидов и с покрытием каждого целевого участка не менее 30 (прочтение не менее 30 раз), объем геномных данных должен составлять 9,5 миллиардов нуклеотидов.

На рисунке 10 приведен пример качества данных, полученных в результате запуска прибора Нанофор СПС в варианте парноконцевого секвенирования 2x50 (50PE) контрольной библиотеки ДНК Phixv3 (Illumina, США). Как видно, выход данных с качеством Q30 на таком относительно коротком прочтении составил более 300 миллионов нуклеотидов.

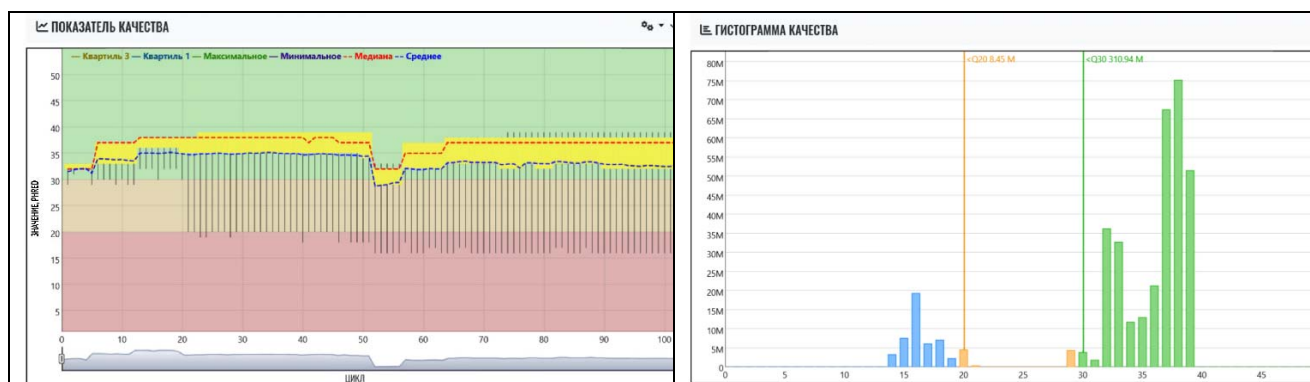


Рисунок 10 – результат запуска Нанофора СПС в варианте 50PE. Слева – показатель качества по циклам, справа – гистограмма качества с указанием количества данных в миллионах нуклеотидов в диапазонах качества: более Q30 (столбцы зеленого цвета), более Q20 (столбцы оранжевого цвета) и менее Q20 (столбцы синего цвета)

Figure 10 – the result of running Nanophor SPS in the 50SE variant. On the left is the quality indicator by cycles, on the right is the quality histogram indicating the amount of data in millions of nucleotides in the quality ranges: more than Q30 (green columns), more than Q20 (orange columns) and less than Q20 (blue columns)

На рисунке 11 приведено сравнение результатов парноконцевого прочтения одинаковых геномных библиотек для таргетного секвенирования панели из двух генов BRCA1 и BRCA2, ассоциированных с риском возникновения рака молочной железы и яичников на приборах MiSeqi Нанофор СПС. Приведенные данные, полученные в одном из запусков на секвенаторе Нанофор СПС, уступают по качеству Q20 на 15% и по качеству Q30 на 17% данным, полученным на секвенаторе MiSeq. В настоящее время продолжается работа над оптимизацией протокола секвенирования и состава реакционных смесей, реализующих принцип секвенирования путем синтеза на приборе Нанофор СПС.

	MiSeq	Нанофор СПС
Количество чтений	29.028458 M	28.253974 M
Количество оснований	3.956668 G	3.910683 G
Q20	3.767017 G (95.206810%)	3.145519 G (80.433993%)
Q30	3.724392 G (94.129499%)	3.007064 G (76.893578%)
Undetermined	1.262784 M (4.350158%)	2.044940 M (7.237707%)
GC-контент	37.481295%	37.663898%

Рисунок 11 – Сравнение результатов запуска одной и той же библиотеки на приборах Нанофор СПС и MiSeq

Figure 11 – Comparison of the results of running the same library on Nanophor SPS and MiSeq sequencers

Очевидно, что прогресс в развитии методов секвенирования ДНК и их производительности напрямую связан с возможностью получения критически важных данных о генах, их функциях, а также о влиянии замен в геноме на эти функции. Здесь ключевую роль играют так называемые популяционные исследования, где на больших

выборках контрастных по признакам организмов удается находить новые гены, а анализируя различия в их последовательностях, выявлять важнейшие различия в свойствах закодированных ими белков [7].

В настоящее время в России закуплено несколько сот зарубежных приборов массового

параллельного секвенирования ДНК. Их закупки регулярно продолжаются. Ретроспективный анализ закупок секвенаторов ДНК и прогноз на ближайшую перспективу будет опубликован вскоре отдельно. Очевидно, что необходимо наращивать усилия по разработке новых отечественных конкурентоспособных приборов. Разработка новой модели высокопроизводительного секвенатора ДНК Нанофор СПС2 с производительностью не менее 120 миллиардов нуклеотидов за запуск начата в июле 2025 г. в рамках выполнения Программы развития научного приборостроения гражданского назначения при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Главным исполнителем является ИАП РАН, а ООО «НПФ Синтол» выступает в качестве промышленного партнера и обеспечивает финансирование работ. Опытный образец прибора будет разработан к концу 2027 года, а до конца 2030 года при участии АО «ЭЗАН» будет налажено его серийное производство.

Литература

1. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975. 94(3). 441-448. doi: 10.1016/0022-2836(75)90213-2
2. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Малюченко О.П., Монахова Ю.А., Натиров А.Н., Орехов В.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Петров А.И. Генетический анализатор для фрагментного анализа ДНК. *Научное приборостроение.* 2012. 22(4). 86-92.
3. Ignateva DA, Gorbunova TYu, Keita I, Alekseev YaI, Gorbunov RV, Shvartsev AA, Volkov AA, Monakhova YuA, Tabunshchik VA, Diakité S, Baldé AM, Sow MD, Diallo AIP. Bacterial composition of soils in the Fatale river basin (Guinea) during the dry season: an examination of its relationship with ecological landscape characteristics. *South of Russia: Ecology, Development.* 2024. 19(4). (73). 110-130.
4. Четверин А.Б., Четверина Е.В. 1995. Способ размножения нуклеиновых кислот, способ их экспрессии и среда для их осуществления. Патент РФ № 2048522
5. Khrapko KR, Lysov YuP, Khorlin AA, Ivanov IB, Yershov GM, Vasilenko SK, Florentiev VL, Mirzabekov AD. A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. *DNA Seq.* 1991. 1(6). 375-388. doi: 10.3109/10425179109020793
6. Zavgorodny S, Polianski M, Besidsky E, Kriukov V, Sanin A, Pokrovskaya M, Gurskaya G, Lönnberg H, Azhayev A. 1-Alkylthioalkylation of Nucleoside Hydroxyl Functions and Its Synthetic Applications: A New Versatile Method in Nucleoside Chemistry. *Tetrahedron Letters.* 32(51). 7593-7596. doi: 10.1016/0040-4039(91)80543-F
7. Zubov VV, Chemeris DA, Vasilov RG, Kurochkin VE, Alekseev YaI. Brief history of high-throughput nucleic acid sequencing methods. *Biomcs.* 2021. V.13(1). P. 27-46. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-4 (In Russian)

References

1. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975. 94(3). 441-448. doi: 10.1016/0022-2836(75)90213-2
2. Alekseev YaI, Belov YuV, Malyuchenko OP, Monakhova YuA, Natyrov AN, Orekhov VA, Konovalov SV, Kurochkin VE, Petrov AI. Genetic analyzer for DNA fragment analysis. *Scientific instrumentation.* 2012. 22(4). 86-92. (In Russian)
3. Ignateva DA, Gorbunova TYu, Keita I, Alekseev YaI, Gorbunov RV, Shvartsev AA, Volkov AA, MonakhovaYuA, Tabunshchik VA, Diakité S, Baldé AM, Sow MD, Diallo AIP. Bacterial composition of soils in the Fatale river basin (Guinea) during the dry season: an examination of its relationship with ecological landscape characteristics. *South of Russia: Ecology, Development.* 2024. 19(4). (73). 110-130.
4. Chetverin A.B., Chetverina E.V. 1995. The method of nucleic acid reproduction, the method of their expression and the medium for their implementation. RF Patent No. 2048522
5. Khrapko KR, Lysov YuP, Khorlin AA, Ivanov IB, Yershov GM, Vasilenko SK, Florentiev VL, Mirzabekov AD. A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. *DNA Seq.* 1991. 1(6). 375-388. doi: 10.3109/10425179109020793
6. Zavgorodny S, Polianski M, Besidsky E, Kriukov V, Sanin A, Pokrovskaya M, Gurskaya G, Lönnberg H, Azhayev A. 1-Alkylthioalkylation of Nucleoside Hydroxyl Functions and Its Synthetic Applications: A New Versatile Method in Nucleoside Chemistry. *Tetrahedron Letters.* 32(51). 7593-7596. doi: 10.1016/0040-4039(91)80543-F
7. Zubov VV, Chemeris DA, Vasilov RG, Kurochkin VE, Alekseev YaI. Brief history of high-throughput nucleic acid sequencing methods. *Biomcs.* 2021. V.13(1). P. 27-46. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-4 (In Russian)