

Межинститутский Центр коллективного пользования секвенирования ДНК

История создания

ЦКП секвенирования ДНК начал свою работу в 2000 г. с получением однокапиллярного автоматического секвенатора ДНК «ABI Prizm 310». Центр был создан на паритетных началах в результате сотрудничества двух институтов: Института цитологии и генетики и Института биоорганической химии СО РАН (сейчас Институт химической биологии и фундаментальной медицины). Базовыми подразделениями при его создании служили лаборатория регуляции экспрессии генов (ИЦиГ) и группа функциональной геномики (ИХБФМ), сотрудники этих подразделений и сейчас составляют основной штат сотрудников Центра. В полном согласии с современной политической модой ЦКП управляется тандемом руководителей – один от ИХБФМ, другой от ИЦиГ.

Материально-техническая база

За время работы ЦКП в технологии и аппаратном обеспечении секвенирования ДНК произошли поистине революционные изменения. Одновременно изменялись и оборудование Центра, и спектр выполняемых им задач. Полученные изначально однокапиллярный и четырехкапиллярный секвенаторы отработали свой срок и уже выведены из эксплуатации. Вместо них установлены более современные и высокопроизводительные модели.

В настоящий момент Центр располагает следующим оборудованием:

- 16-капиллярные секвенаторы ABI Prizm 3130 (4 шт.);
- 96-капиллярный секвенатор ABI Prizm 3730;
- автоматическая станция пробоподготовки Parallax 350;
- роботизированная станция Tecan Evo;
- секвенатор второго поколения SOLiD, модифицированный до версии 3.5;
- секвенатор второго поколения GS FLX Titanium.

Имеется также комплекс дополнительного оборудования, обеспечивающего нормальное функционирование как капиллярных секвенаторов, так и приборов высокопроизводительного массового секвенирования.

Направления деятельности

Базовой услугой, оказываемой пользователям, является секвенирование ДНК по методу Сэнгера с последующим анализом полученных данных на 16-капиллярных секвенаторах. Эти приборы позволяют осуществить достоверное прочтение 700–800 нуклеотидов на одну реакцию. Сотрудники ИЦиГ, ИХБФМ и ИСЭЖ получают реактивы для секвенирования в ЦКП или при желании приобретают их сами, проводят реакции Сэнгера самостоятельно и передают готовые образцы в ЦКП в сухом виде в пробирках или 96-луночных планшетах. Для пользователей сторонних организаций секвенирующие реакции в основном выполняют сотрудники Центра.

Кроме этого, на 16-капиллярных секвенаторах выполняется большой объем фрагментного анализа.

96-капиллярный секвенатор ABI Prizm 3730XL используется в ходе выполнения проектов, требующих большого объема секвенирования, таких, например, как изучение транскриптома *O. felineus* или секвенирование ВАС-библиотек генома пшеницы. Пробоподготовка в этом случае может осуществляться как с помощью имеющихся в ЦКП роботизированных станций Parallax 350 и Tecan Evo, так и самостоятельно пользователями; образцы для 96-капиллярного прибора подаются в 384-луночных или 96-луночных планшетах.

Кроме капиллярных секвенаторов в ЦКП в настоящий момент функционируют два современных высокопроизводительных секвенатора второго поколения – SOLiD и GS FLX Titanium. Эти приборы обладают принципиально иной производительностью в секвенировании ДНК. Например, SOLiD v.3.5 позволяет получить за полный цикл работы прибора, занимающий 8–9 дней, 10–15 млрд п.о., что эквивалентно 2–3-кратному прочтению генома человека. Для задач, не требующих такой высокой производительности, можно анализировать до 16 образцов одновременно (и до 64 с использованием технологии баркодов).

Приборы SOLiD и GS FLX Titanium способны выполнять широкий спектр задач, среди которых – ресеквенирование генома человека или других организмов, имеющих референсный геном; поиск и идентификация SNP, целевое



Секвенаторы 3130XL в ЦКП секвенирования ДНК.

ресеквенирование определенных участков генома, полный анализ транскриптома, полногеномный анализ локализации ДНК-связывающих белков, анализ спектра метилирования генома, секвенирование бактериальных геномов и метаномов и многие другие задачи.

На этих приборах для сотрудников ИЦиГ уже выполнены или находятся в процессе работы следующие проекты:

- анализ видо- и тканеспецифичности экспрессии микроРНК у трех видов описторхид;
- полногеномный сравнительный анализ локализации транскрипционных факторов на хроматине (ChIP-Seq) для факторов FoxA и FoxO мыши, факторов SF1 и LRH крысы;
- ресеквенирование гена LDLR для выявления полного спектра мутаций, обеспечивающих предрасположенность к заболеваниям сердечно-сосудистой системы;
- сравнительное изучение изменений транскриптома меристемы корня растений при дифференцировке;
- изучение изменений транскриптома печени хозяина при ответе на инвазию паразитов.

Примерно такое же количество проектов выполнено или выполняется для сотрудников ИХБФМ. Объем информации, получаемой в ходе проектов, столь велик (измеряется десятками гигабайт), что для ее анализа требуется специализированное программное обеспечение, установленное на высокопроизводительном кластере ВЦ и обслуживаемое специалистами-биоинформатиками.

Источники снабжения реактивами

Реактивы и расходные материалы для работы ЦКП обеспечиваются за счет средств Приборно-комиссии СО РАН и Программы СО РАН «Геномика, протеомика, биоинформатика». Это позволило на настоящий момент решить

проблему с обеспечением пользователей реактивами для секвенирования, но оставляет нерешенной острую проблему ремонта и технического обслуживания имеющегося оборудования, равно как и адекватной оценки труда сотрудников ЦКП.

Востребованность ЦКП

Результатом обновления приборного парка ЦКП явилось удвоение объемов секвенирования каждые два года. Если за 2004 г. было обработано более 5 000 образцов, то за 2007 г. – 13 000, а за 2010 г. – уже 35 000. Для сравнения стоит отметить, что данный объем работы превышает необходимый для секвенирования среднего бактериального генома методом Shotgun.

В целом за все время работы в Центре обработано более 135 000 образцов. Расширялся как круг пользователей ЦКП, так и набор выполняемых Центром работ. Сотрудниками ЦКП создан и поддерживается сайт (<http://sequest.niboch.nsc.ru/>), создана удобная электронная система для удаленной работы пользователей, хранения и получения результатов секвенса.

Только в ИЦиГ СО РАН ЦКП секвенирования ДНК обслуживает 23 лаборатории.

Центр выполняет работы не только для сотрудников двух институтов-основателей, но и для целого ряда других организаций. Так, в 2010 г. к услугам Центра обращались:

- Институт систематики и экологии животных СО РАН;
- Лимнологический институт СО РАН;
- Биолого-почвенный институт ДВО РАН;
- Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН;
- Институт биофизики СО РАН;



Секвенатор второго поколения SOLiD в ЦКП секвенирования ДНК.

- Институт клинической иммунологии СО РАМН;
- НИИ биохимии СО РАМН;
- НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН;
- НИИ онкологии СО РАМН;
- ЗАО «Вектор-Бест»;
- ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора;
- Новосибирский государственный университет.

Условия взаимодействия с ЦКП для пользователей из ИЦиГ

Необходимо отметить, что работа приборов SOLiD и GS FLX Titanium – это сложно организованный многостадийный процесс, где запуск самого прибора является вершиной пирамиды предварительной подготовки. Кроме того, данные работы являются весьма затратными. Например, только стоимость реактивов на один цикл работы SOLiD с анализом двух

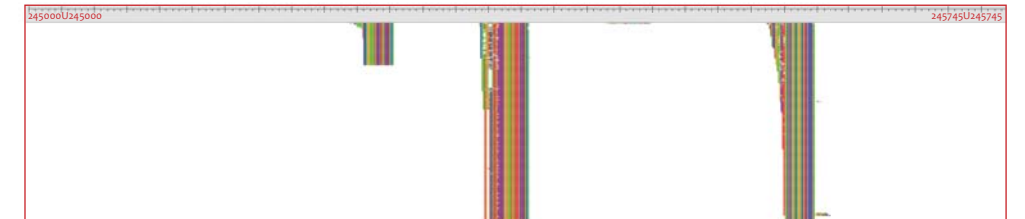
слайдов может стоить до 300 000 рублей, GS FLX Titanium – 700 000 рублей. Поскольку процедура пробоподготовки для приборов массового параллельного секвенирования является весьма сложным и дорогостоящим процессом, то основную часть данной работы выполняет оператор прибора. Каждый научный проект, предусматривающий секвенирование на SOLiD, рассматривается и утверждается совместно руководством ЦКП и администрацией Института. Существенная часть средств на выполнение утвержденных администрацией ИЦиГ проектов при работе на SOLiD погашена из средств, полученных по программе «Геномика, протеомика, биоинформатика», однако пользователи также тратят значительные средства в процессе пробоподготовки.

Для пользователей ИЦиГ и ИХБФМ существуют особые льготные условия, не изменявшиеся с 2000 г., – для каждой лаборатории или проекта установлен ежемесячный лимит выдачи реактива для секвенирования BigDye. При этом плата

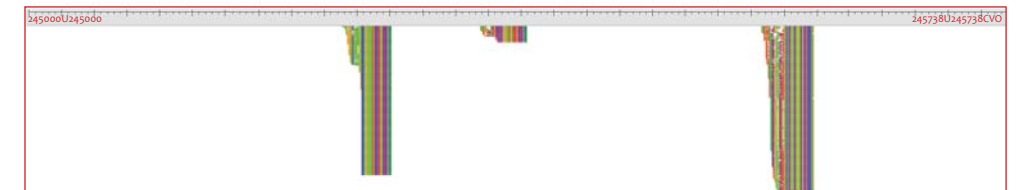
O. felinus / часть
мариты без матки



O. felinus /
метацеркарий



O. viverini



Пример анализа микроРНК различных видов и жизненных стадий описторхид, выполненного на приборе SOLiD в ЦКП секвенирования ДНК.

за реактив взимается лишь в случае неудачного проведения секвенирующей реакции; оплата расходных материалов для работы собственно секвенатора составляет 15 руб. при себестоимости анализа 50–70 руб. Таким образом, за 2010 г. все пользователи ИЦиГ (23 лаборатории), выполнившие 13 376 анализов, получили суммарную экономию на сумму, приближающуюся к миллиону рублей.

Условия взаимодействия с ЦКП для сторонних пользователей

Для пользователей сторонних организаций возможно выполнение научных проектов при условии соответствующего финансирования с их стороны либо организации совместных проектов. При выполнении анализа с использованием GS FLX Titanium на настоящий момент вся оплата работы ложится на плечи заинтересованного пользователя.

Сторонним пользователям предлагается широкий выбор различных вариантов секвенирования плазмидных ДНК или ПЦР-фрагментов:

- анализ готовых реакций Сэнгера или фрагментный анализ. Предусматривает роботизированное растворение готовых реакций, проведенных Заказчиком, их разгонку на генном анализаторе и обработку. Стоимость – 200 руб./образец;
- проведение реакций Сэнгера и их анализ. Заказчик самостоятельно проводит подготовку и очистку образцов

ДНК для секвенирования. Сотрудники Центра выполняют реакции Сэнгера и их разгонку на генном анализаторе с последующей обработкой результатов. Оплачиваются все образцы, в том числе и не получившиеся. Стоимость – 300 руб./образец;

- секвенирование ДНК с гарантией результата. До постановки секвенирующей реакции сотрудники Центра выполняют необходимую очистку ДНК. Оплачиваются только получившиеся образцы. Стоимость – 700 руб./образец;
- полный цикл секвенирования ДНК с гарантией результата. Сотрудник Центра проводит все необходимые, на его взгляд, операции пробоподготовки ДНК для секвенирования, вплоть до реамплификации. Оплачиваются только получившиеся образцы. Стоимость – 1100 руб./образец.

Контактная информация

Руководители ЦКП к.б.н. Геннадий Владимирович Васильев, (ИЦиГ СО РАН),
к.б.н. Игорь Владимирович Морозов (ИХБФМ СО РАН)
г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8,
корпус ИХФМБ СО РАН, ком. 209.
тел. +7(383) 363-51-69
e-mail: sequest@niboch.nsc.ru
Сайт ЦКП в Интернете – <http://sequest.niboch.nsc.ru/>