

Методи секвенування генної інформації

Дар'я Милостива

кандидатка сільськогосподарських наук, старша наукова співробітниця, судова експертка, Дніпропетровський науково-дослідний інститут судових експертиз Мін'юсту України, м. Дніпро, Україна,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3609-776x>, e-mail: mylostivad@i.ua

Анна Бабченко

кандидатка біологічних наук, наукова співробітниця, судова експертка, Дніпропетровський науково-дослідний інститут судових експертиз Мін'юсту України, м. Дніпро, Україна,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3491-931x>,
e-mail: lineanna83@gmail.com

Наведено перелік методів секвенування ДНК, які умовно поділено на класичні (секвенування із застосуванням капілярного електрофорезу та піросеквенування), нові (високопродуктивне піросеквенування, циклічне лігазне й напівпровідникове секвенування) і новітні (зчитування інформації зі значної кількості одиничних фрагментів ДНК без їх попереднього клонування).

Ключові слова: секвенування; методи; ДНК.

Methods for Genetic Information Sequencing

Daria Mylostiva, Anna Babchenko

The paper outlines a list of DNA sequencing methods, which can be conditionally categorized into classical (sequencing using capillary electrophoresis and pyrosequencing), new (high-throughput pyrosequencing, sequencing by cyclic ligation, and semiconductor sequencing) and novel (reading information from a large number of single DNA fragments without their prior cloning).

Keywords: sequencing; methods; DNA.

Нові досягнення й відкриття криміналістики сприяють скороченню часу на розслідування та розкриття злочинів. Міцне місце в методиках розкриття злочинів посіли сучасні ДНК-технології.

Класичні методи секвенування ДНК розроблено наприкінці минулого століття. Сьогодні вони найпоширеніші в науково-дослідних і меди-

ко-діагностичних установах усього світу.

Для проведення секвенування за допомогою капілярного електрофорезу застосовують найпоширеніший сьогодні спосіб підготовки ДНК — «метод термінації ланцюга». Особливість методу «термінації ланцюга» полягає у застосуванні хімічно модифікованих

дезоксирибонуклеотидів, що складають нуклеотидну послідовність ДНК. Кожен різновид нуклеотиду «помічений» своєю флуоресцентною молекулою-маркером. Коли один із таких модифікованих нуклеотидів під час синтезу комплементарного ланцюга ДНК вбудовується у нього, подальша добудова цього ланцюга припиняється. Видозмінені різновиди нуклеотидів присутні в реакційній суміші у значно менших кількостях, аніж звичайні нуклеотиди. У результаті отримуємо суміш, що містить повний набір синтезованих фрагментів ДНК, кожен із яких починається в тому самому місці, але закінчується в усіх можливих положеннях уздовж ланцюга ДНК-матриці [1].

Метод піросеквенування ДНК ґрунтується на визначенні пірофосфату, що утворюється під час синтезу комплементарного ланцюга ДНК. Основний принцип цього методу полягає в тому, що в процесі секвенування фрагментів ДНК розчини чотирьох типів нуклеотидів додають послідовно й відмивають після кожної реакції. Під час включення чергового нуклеотиду в синтезований комплементарний ланцюг на підготовленій одноланцюговій ДНК-матриці відбувається детекція пірофосфату, що вивільняється шляхом зв'язування його з білком люциферазою та, зрештою, отриманням світлового сигналу. Протягом реакції комплементарний ланцюг ДНК добудовується, а послідовність нуклеотидів визначається за світловими сигналами у вигляді піків на пірограмі, інтенсивність яких пропорційна кількості вбудованих у ланцюг ДНК нуклеотидів одного виду

з чергової реакційної суміші [2]. Цей метод здебільшого застосовують для швидкого визначення значної кількості коротких послідовностей (маркерних зон) ДНК і РНК, виявлення одиничних мутацій нуклеотидів, повторного секвенування тощо. Водночас значно скорочується час і знижується вартість дослідження порівняно з капілярним електрофорезом [3].

Застосовують також модифікований метод піросеквенування, який полягає у використанні емульсійної ПЛР з одночасною паралельною підготовкою багатьох сотень тисяч фрагментів ДНК для їх секвенування [4]. Довжина одиничного фрагмента ДНК, що секвенується методом високоефективного піросеквенування, досягає 1000 п. н. з точністю до 99 %.

У разі застосування циклічного лігазного секвенування використовують емульсійну ПЛР, після якої кожна з мікросфер містить на своїй поверхні приблизно мільйон копій одного з вихідних ДНК-фрагментів. Методи секвенування третього покоління покликані виправити основні недоліки методів другого покоління, а саме: складну пробопідготовку, незначну довжину одиничних зчитувань, потребу в посиленні сигналу від кожного з аналізованих фрагментів ДНК шляхом їхньої ампліфікації, тривалий час циклу, необхідність численного повторного секвенування.

Отже, класичні, нові й новітні методи секвенування спрямовані на виконання різнопланових завдань, пов'язаних із визначенням нуклеотидної послідовності ДНК, які застосовуватимуть криміналісти.

Перелік джерел посилання

1. Heather J., Chain B. The Sequence of Sequencers: The History of Sequencing DNA. *Genomics*. 2015. Vol. 107. Is. 1. Pp. 1—8. DOI: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003 (дата звернення: 24.09.2024).
2. Loman N. J., Misra R. V., Dallman T. J., Constantinidou Ch., Gharbia S. E., Wain J., Pallen M. J. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature Biotechnology*. 2012. Vol. 30. Is. 5. Pp. 434—439. DOI: 10.1038/nbt.2198 (дата звернення: 24.09.2024).
3. Montero C. I., Shea Y. R., Jones P. A., Harrington S. M., Tooke N. E, Witebsky F. G., Murray P. R. Evaluation of Pyrosequencing Technology for the Identification of Clinically Relevant Non-Dematiaceous Yeasts and Related Species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2008. Vol. 27. Is. 9. Pp. 821—830. DOI: 10.1007/s10096-008-0510-x (дата звернення: 24.09.2024).
4. Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine Biotechnology*. 2012. Art. 251364. DOI: 10.1155/2012/251364 (дата звернення: 24.09.2024).