

第三代测序基本原理

李明爽 赵敏[△]

(东北林业大学 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 文章阐述了以单分子实时测序和纳米孔技术为标志第三代测序的基本原理,介绍了 Helicos 的 Heliscope 单分子测序仪、Pacific Bioscience 的 SMRT 技术和 Oxford Nanopore Technologies 公司正在研究的纳米孔单分子测序技术。与其他测序技术进行了简单的对比以并提出一些单分子测序仍需面对的问题以及对未来单分子测序的展望。

关键词: 第三代测序 原理 问题

中图分类号: Q-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273 (2012) 10-1980-03

The Mechanisms of the Third Generation Sequencing Technology

LI Ming-shuang, ZHAO Min[△]

(Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

ABSTRACT: In this review, I describe the mechanisms and features of the third generation sequencing technology which is a new generation of single molecule sequencing technology, introduce the True Single Molecule Sequencing (tSMSTM) of Helicos, the Single Molecule Real Time (SMRTTM) DNA Sequencing of the Pacific Bioscience, and the single-molecule nanopore DNA sequencing of the Oxford Nanopore Technologies. The advantages compared with the second generation sequencing, the problems and its future perspectives will be discussed here.

Key words: The third generation sequencing; Mechanisms; Problems

Chinese Library Classification (CLC): Q-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1980-03

引言

从第一代测序技术到第二代测序技术,从 Sanger 的链末端终止法^[1]和 Gilbert 的化学裂解法^[2]到 Roche 公司的 454 技术、Illumina 公司的 Solexa 技术和 ABI 公司的 SOLID 技术^[3-5]。已经成功的把人们带到了高通量测序时代,也满足了人们从单个基因位点的研究到全基因组层面的研究。尽管如此,人们并没有停止高通量测序技术的研究,被称为第三代的测序的 Helicos 单分子测序仪^[6,7]、Pacific Bioscience 的 SMRT 技术^[8,9,15]和 Oxford Nanopore Technologies 公司正在研究的纳米孔单分子测序技术^[10-13]正向着高通量、低成本、长读取长度的方向发展。不同于第二代测序依赖于 DNA 模板 PCR 扩增,使 DNA 模板与固体表面相结合然后边合成边测序的方法,第三代测序为单分子测序,不需要进行 PCR 扩增。第三代测序方法与现在的测序技术相比之下的优点为 1) 更高的通量 2) 更短的测序时间; 3) 更长的读取长度 4) 更高的精确性,可以检测出极少的变异; 5) 需要很少的起始量 6) 低成本。

1 Helico BioScience 单分子测序技术

该测序是基于边合成边测序的思想,将待测序列随机打断成小分子片段并用末端转移酶在 3' 末端加上 poly(A),以及在

poly(A)的末端进行荧光标记和阻断,阻断的目的是防止在测序过程中核苷酸在模板的 3' 末端进行延伸。把这些小片段与带有 poly(T)的平板杂交,poly(T)的作用不仅是捕获模板,也是延伸时的引物。成像来获得已经杂交模板所处的位置,建立边合成边测序的位点。加入聚合酶和被 Cy3 荧光标记脱氧核苷酸进行 DNA 合成,每次只加入一种脱氧核苷酸,然后将未参与合成的 dNTP 和 DNA 聚合酶洗脱,直接对 Cy3 成像,观测模板位点上是否有荧光信号,然后化学裂解核苷酸上的燃料并释放。加入下一种脱氧核苷酸和聚合酶的混合物,进行下一轮反应(图 1^[6])。Heliscope 的读取长度约为 30-35nt,每个循环的数据产出量为 21-28CB。

这种技术不仅被用在 DNA 测序中,把 DNA 聚合酶用逆转录酶代替还可以进行 RNA 直接测序^[14]。

2 Pacific Bioscience SMRTT 技术

该测序也是基于边合成边测序的原理,这项技术的核心在于使用了 Zero-Mode Waveguide(ZMW)(零级波导)。ZMW 是一种直径只有几十个纳米的纳米孔,用激光照射 ZMW 的底部时,由于底部上的小孔比激光的单个波长还短,因此,激光不能直接穿过小孔,而会在小孔处发生光的衍射,只照亮 ZMW 的底部小片区域。DNA 聚合酶被锚定在 ZMW 底部的这片区域内,当有单个的脱氧核苷酸加载在 DNA 聚合酶上形成新的化学键时,这个脱氧核苷酸上的荧光物质被激活而发光,从而被检测到。还有这个孔很小,在这个小孔内 DNA 链的周围,被标记的脱氧核苷酸有限,并且这四种荧光标记的脱氧核苷酸非常快速的从外面进入到孔内又出去,由于以上原因,所以形成了

作者简介: 李明爽(1984),女,硕士研究生,主要研究方向:人和其他物种进化和衰老的分子机制等方面的研究,

Tel:15221725886,E-mail:limingshuang2007@126.com

[△]通讯作者 赵敏,E-mail:82191513@163.com。

(收稿日期:2011-10-09 接受日期:2011-11-05)

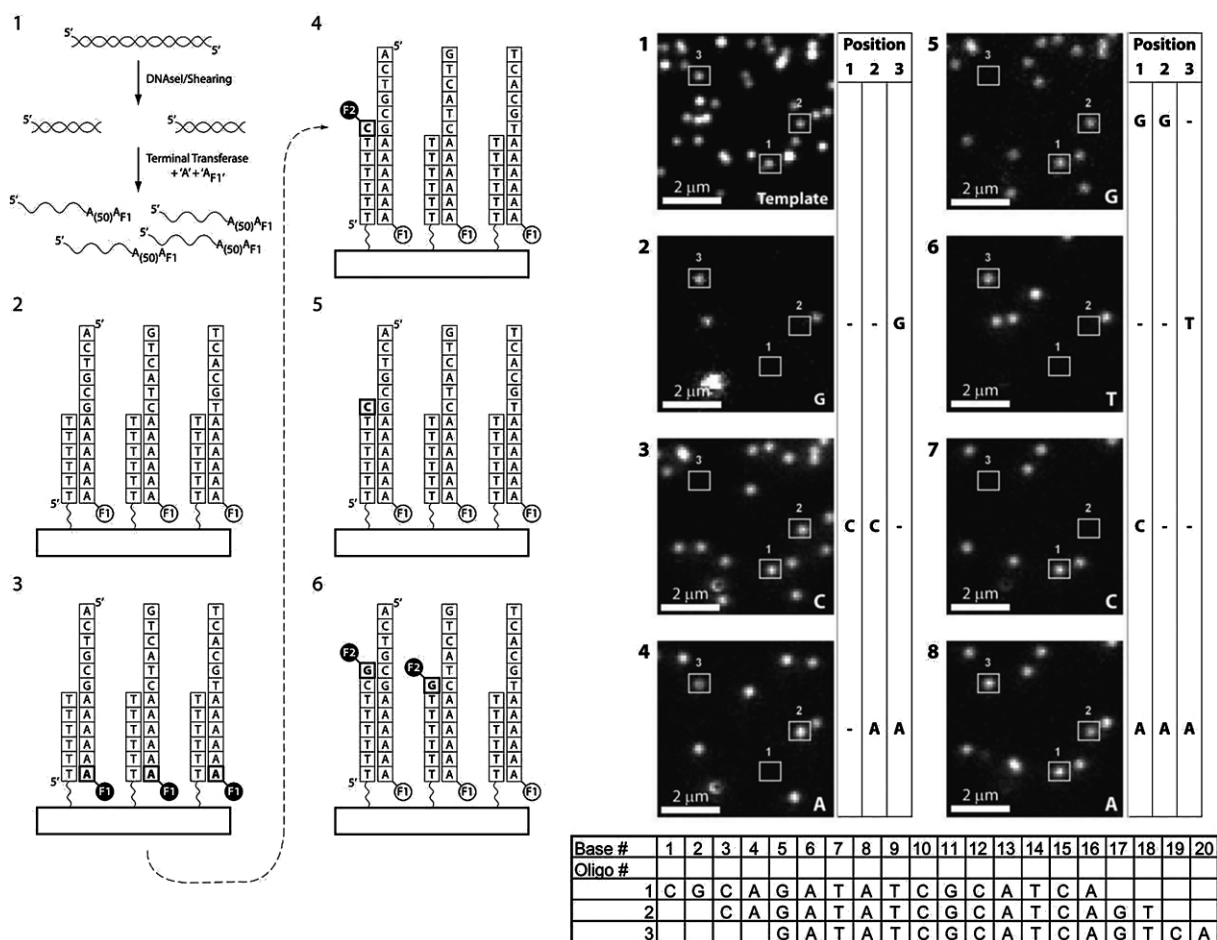


图 1 Helicos 单分子测序仪原理

Fig. 1 Single-molecule sequencing sample preparation and imaging of single-nucleotide incorporation.

非常稳定的并且很弱的背景荧光信号,才使在有大量溶液背景上检测单个荧光标记的核苷酸成为可能。另外一个特点是,荧光标记的位置是磷酸集团而不是碱基,因此可以在没有空间位阻的情况下连续观测到数以千计的碱基。

测序的过程 被荧光标记磷酸集团的核苷酸在聚合酶活性位点上与模板链结合(每种脱氧核苷酸被不用颜色的染料标记),被激发出荧光,在荧光脉冲结束后,被标记的磷酸集团被

切割并释放。聚合酶转移到下一个位置,下一个脱氧核苷酸连接到位点上开始释放荧光脉冲,进行下一个循环(图 2^[8])。

DAN 聚合酶的活性在激光的照射下逐渐减弱,所以 DNA 合成的长度有限。第一代商用的 SMRT 测序仪由大约 75,000 个 ZMW 组成,每个 ZMW 都可以有一个 DNA 聚合酶和一条不同的 DNA 样本链,也就是说一次可以同时进大约 75,000 个单分子的测序工作。

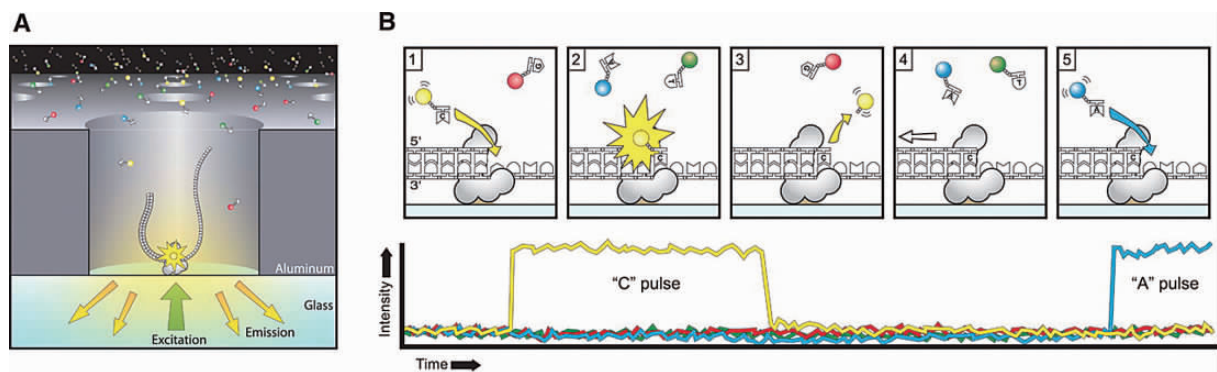


图 2 SMRT 测序技术

Fig. 2 Principle of single-molecule,real-time DNA sequencing.

3 Oxford Nanopore Technologies 的纳米孔单分子测序技术

大多数纳米孔测序技术的基本原理是当 DNA 分子或者它的组成碱基从一个孔洞经过时而检测到被影响的电流或光信

号。由于这种技术使用 DNA 单分子,所以纳米孔必须有能在极低的初始量的情况下迅速工作的能力。以蛋白质为基础的生物纳米孔和全合成纳米孔都正在开发中。

Oxford Nanopore 测序技术是以 α -溶血素来构建生物纳米孔,核酸外切酶依附在孔一侧的外表面,一种合成的环糊精做为传感器共价结合到纳米孔的内表面。这个系统被镶嵌在一个脂双分子层内,为了提供既符合碱基区分检测又满足外切酶活性的物理条件,脂双分子层两侧为不同的盐浓度。在适合的电压下,核酸外切酶消化单链 DNA,单个碱基落入孔中,并与

孔内的环糊精短暂的相互作用,影响了流过纳米孔原本的电流,腺嘌呤与胸腺嘧啶的信号大小很相近,但胸腺嘧啶在环糊精停留时间是其他核苷酸的 2~3 倍,所以每个碱基都因其产生电流干扰振幅是特有的而被区分开来。纳米孔检测的另一个特点是可以直接读取甲基化的胞嘧啶,因为在相同条件下,甲基化的胞嘧啶在环糊精的停留时间基本为胞嘧啶停留时间的两倍。纳米孔单分子测序技术的准确率能达到 99%,而且被检测过的碱基能很快的从纳米孔清除而不会出现重复测序(图 3^[12])。

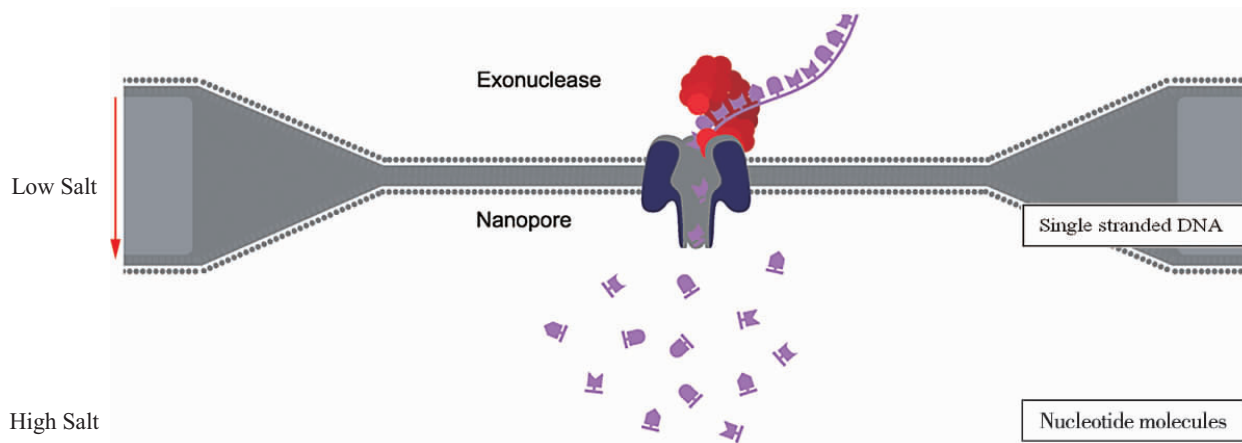


图 3 纳米孔单分子测序

Fig. 3 Oxford Nanopore technology

4 总结

在过去的几年里,人们对单分子测序技术越来越关注,这个技术已经发展成商业化平台。所有的努力方向均是为了减少成本和测序时间,并且避免二代测序中的 PCR 扩增的环节。Table 1^[7]列举了各技术平台的特点比较。尽管平台的仪器(从 Roche/454, Illumina 和 ABI 平台的\$600,000 到 HeliScope 平台

的\$1,350,000)和试剂的费用从表面上来看是高的,但没个碱基的消费明显低于 Sanger 测序技术^[16]。在介绍的这几种单分子测序技术里,需要荧光标记的技术已经商业化和概念化,并用于 M13 和人类基因组测序。Nanopore 技术是一种很有发展的无标记测序方法,但仍需要致力于背景噪音的减少和 DNA 移动速度的控制等问题的解决。

Table 1

	Second-generation sequencers			Third-generation sequencers		
	454-FLX	Solexa	SOLID	Helicos TSMS	PacBio SMRT	Nanopore
Read-length (bp)	240-400	35	35	30	100 000	Potentially unlimited
Cost/human genome(US\$)	1 000 000	60 000	60 000	70,000	Low	Low
Run time (h/Gb)	75	56	42	~12	<1	>20
Ease of use	Difficult	Difficult	Difficult	Easy	Easy	Easy

第三代测序有高通量、低成本、长读取长度、测序时间短等优点,并且避免了二代测序中 PCR 扩增的环节,因此减少了测序的错误率,真正的实现了单分子测序。但每种测序技术仍然有许多要加以攻克挑战,需要用酶的测序技术,如何保持酶的活性与稳定性就是一个重要的问题,如聚合酶与核酸外切酶,需要荧光标记的测序技术,怎样提高单分子信号灵敏度同时又不能把信号变成噪音增加荧光背景也是一个需要解决的事情;还有在 DNA 的固定方面如何保持 DNA 的延展性而不出现二聚体结构等问题。单分子测序是一种很有前景的测序技

术,因其表现出了比其他测序技术相比更多的优点而在这个领域里被广泛关注,但由于测序技术建立的时间还很短,技术不是很成熟,还需要继续努力。但相信在不久的将来,测序技术将会更加的成熟和完善并得到更加广泛的应用。

参考文献(References)

- [1] Sanger, F., S. Nicklen, et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977, 74(12): 5463

(下转第 1948 页)

- 化杂志. 2005, 25(4):222-225.
- Cao Qian, Hu Wei-ong, Gao Min, et al. Clinical characteristics of 379 patients with inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Digestion, 2005, 25(4): 222-225
- [2] Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, et al. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices[J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103(1): 162-169
- [3] 向军英, 欧阳钦, 李国栋. 粪便乳铁蛋白在评价溃疡性结肠炎活动性中的价值[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(32): 2262-2264
- Xiang Jun-ying, Ouyang Qin, Li Guo-dong. Signification of fecal lactoferrin in evaluation of disease activity in ulcerative colitis [J]. National Medical Journal of China, 2007, 87(32): 2262-2264
- [4] 陈垦, 祝斌, 梁坚, 等. 溃疡性结肠炎患者血清粒细胞集落刺激因子和 C-反应蛋白检测及意义[J]. 中国现代医学, 2000, 10(12): 31-32
- Cheng Ken, Zhu Bin, Liang Jin, et al. Ulcerative colitis patients with granulocyte colony-stimulating factor and C-reactive protein and its significance [J]. China Journal of Modern Medicine, 2000, 10(12): 31-32
- [5] Schoepfer AM, Trummel M, Seeholzer P, et al. Accuracy of four fecal assays in the diagnosis of colitis[J]. Dis Colon Rectum, 2007, 50(10): 1697-1706
- [6] Kayazawa M, Saitoh O, Kojima K, et al. Lactoferrin in whole gut lavage fluid as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(2):360-369
- [7] Gisbert JP, González-Lama Y, Maté J. Role of biological markers in inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterol Hepatol, 2007, 30(3): 117-129
- [8] Suleiman S, Sonnenberg A. Cost-effectiveness of endoscopy in irritable bowel syndrome [J]. Arch InternMed, 2001, 161(3): 369-375
- [9] Renata D'I, Pont ED, Leo VD, et al. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease [J]. Int. J. Colorectal. Dis, 2006, 22(4): 1506-1051
- [10] Shine B, Berghouse I, Jones JE, et al. C-reactive protein as an aid in the differentiation of functional and inflammatory bowel disorders[J]. Clin. Chim. Acta, 1985, 73(4): 105-109
- [11] Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Gut. Laboratory markers in IBD: Useful, magic, or unnecessary toys[J]? 2006, 55(3): 426-431
- [12] Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, et al. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic and radiographic activity in inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2005, 11(8): 707-712
- [13] Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, et al. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease [J]. Am J. Gastroenterol, 2000, 95(2): 359-367
- [15] 戴军, 刘文忠, 赵永平, 等. 粪便乳铁蛋白与炎症性肠病的相关性研究[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(6): 393-395
- Dai Jun, Liu Wen-zhong, Zhao Yong-ping, et al. A study of relationship between fecal lactoferrin and inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Digestion, 2006, 26(6): 393-395

(上接第 1982 页)

- [2] Maxam, A. M. and W. Gilbert. A new method for sequencing DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977, 74(2): 560
- [3] Shendure, J. and H. Ji. Next-generation DNA sequencing [J]. Nature biotechnology, 2008, 26(10): 1135-1145
- [4] Schuster, S. C. Next-generation sequencing transforms today's biology [J]. Nature, 2008, 200(8): 16-18
- [5] Mardis, E. R. Next-generation DNA sequencing methods [J]. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet, 2008, 9: 387-402
- [6] Harris, T. D., P. R. Buzby, et al. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome[J]. Science, 2008, 320(5872): 106
- [7] Lipson, D., T. Raz, et al. Quantification of the yeast transcriptome by single-molecule sequencing [J]. Nature biotechnology, 2009, 27(7): 652-658
- [8] Eid, J., A. Fehr, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. Science, 2009, 323(5910): 133
- [9] Levene, M. J., J. Korlach, et al. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations[J]. Science, 2003, 299(5607): 682
- [10] Clarke, J., H. C. Wu, et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing [J]. Nature nanotechnology, 2009, 4(4): 265-270
- [11] Stoddart, D., A. J. Heron, et al. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(19): 7702
- [12] Schadt, E. E., S. Turner, et al. A window into third-generation sequencing[J]. Human molecular genetics, 2010, 19(R2): R227
- [13] Howorka, S., S. Cheley, et al. Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores [J]. Nature biotechnology, 2001, 19(7): 636-639
- [14] Ozsolak, F., A. R. Platt, et al. "Direct RNA sequencing [J]. Nature, 2009, 461(7265): 814-818
- [15] Treffer, R. and V. Deckert. Recent advances in single-molecule sequencing[J]. Current opinion in biotechnology, 2010, 21(1): 4-11
- [16] Voelkerding, K. V., S. A. Dames, et al. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics[J]. Clinical chemistry, 2009, 55(4): 641
- [17] Gupta, P. K. Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research [J]. Trends in biotechnology, 2008, 26(11): 602-611