



## НЕКОТОРОЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПРОШЛОЕ, НАСТОЯЩЕЕ, А ТАКЖЕ БУДУЩЕЕ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ К 2030 ГОДУ (ЧАСТЬ ПЕРВАЯ)

Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Матниязов Р.Т.,  
Баймиев А.Х., Бикбулатова С.М., Гималов Ф.Р., Вахитов В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук  
Россия, Республика Башкортостан, 450054, г. Уфа, 450054, пр. Октября, 71  
тел./факс: (347) 235-60-88, e-mail: chemeris@anrb.ru

### Резюме

Показано место молекулярной биологии среди других современных биологических дисциплин и довольно кратко прослежено ее развитие с 80-х годов XX века по настоящее время. Проведено сравнение описательной, экспериментальной и теоретической биологической науки. Сопоставлены ряд ранее сделанных прогнозов до 2000 г. и на первое десятилетие XXI века. Основное внимание уделено методам секвенирования ДНК, полногеномному секвенированию, а также амплификации нуклеиновых кислот с помощью различных вариантов ПЦР, олигонуклеотидному синтезу, ДНК-чипам. Отражено методическое состояние и соответствующее ему приборное оснащение физико-химической биологии. Приведена информация о полностью секвенированных геномах различных организмов по состоянию на середину 2013 г. Высказано предположение, что появление в будущем нового сверхвысокопроизводительного и, вместе с тем, дешевого метода секвенирования коренным образом изменит всю биологическую науку, так как это не сможет сделать ни одна другая новая технология. Цитированная литература охватывает более чем столетний период - с 1912 по 2013 гг.

**Ключевые слова:** ДНК, РНК, белок, геном, секвенирование, ПЦР, гель-электрофорез, ДНК-чипы, олигонуклеотиды, геномика, транскриптомика, метиломика, протеомика, биоинформатика, биомика

*Если не грешить против разума  
нельзя вообще ни к чему прийти*

*Альберт Эйнштейн*

### Оглавление

<b>Введение</b>	<b>11</b>
<b>Молекулярная биология и связанные с ней биологические дисциплины</b>	<b>12</b>
<b>Прогнозы 1960, 1970, 2000 гг.</b>	<b>14</b>
<b>1983 - . . . . - 2012 гг.</b>	<b>19</b>
1983 г., 1970-ые, 1960-ые гг.	19
От 1983 г. и до 2012 г.	22
<b>2013 г.</b>	<b>32</b>
Секвенирование ДНК (полногеномное) новых поколений	32
Полные геномы свободноживущих организмов	33
Прочие технологии исследования нуклеиновых кислот	34
<b>Послесловие к первой части статьи</b>	<b>35</b>
<b>Литература, цитированная в первой части статьи</b>	<b>35</b>

### Введение

Предсказывать любое будущее даже всего на два неполных десятка лет вперед - занятие довольно неблагоприятное. Особенно в такой бурно развивающейся области как молекулярная биология. Обязательно в чем-то ошибемся. Уверены в этом. Какие-то вещи будут реализованы много раньше, а что-то так и не состоится... Или вместо него будет сделано совсем иное. А взятым в качестве эпиграфа высказыванием А.Эйнштейна мы, конечно же, не призываем делать постоянно то, о чем он говорил, но эти его слова подтверждают, что немало открытий совершалось вопреки планам и ожиданиям, в чем как раз и есть их особая прелесть.

Лидеры ряда ведущих стран уже неоднократно отмечали, что наступивший век – век биотехнологии. С этим трудно не согласиться по целому ряду причин. Та огромная ответственность за здоровье человека, включая высококачественную диагностику и обеспечение здоровой биологической старости, в XXI веке лежит, в первую очередь, на молекулярных биологах, которые вместе с химиками, физиками, механиками, математиками и представителями некоторых других естественно-научных дисциплин должны разработать соответствующие технологии для получения необходимых и пока недостающих знаний и тем самым создать условия для появления, становления и развития персонифицированной медицины – медицины будущего. Решение продовольственной проблемы также во многом зависит от молекулярной биологии и геной инженерии, все чаще называемых в последние годы «синтетической биологией». Такие направления как экология и охрана окружающей среды, включая изучение и поддержание биоразнообразия всего живого на планете Земля, последние годы все активнее используют технологические приемы молекулярной биологии. Давно и уверенно проникает молекулярная биология и в гуманитарные науки, будь-то история, археология, и эта тенденция будет только нарастать. Еще одной сферой, где находят применение достижения биологической науки, является криминалистика и, как ни странно это может показаться, но и на молекулярных биологах лежит некоторая ответственность за безопасность и спокойствие всего общества.

Наверное, все это и есть задачи современной биологии, в которой не просто успешно ведутся разные исследования, а сама дисциплина продолжает активно развиваться и к 2030 году обязательно достигнет небывалых высот, часть которых, возможно, сейчас даже находится за пределами нашего воображения. Тем не менее,

попытаемся сделать свои прогнозы относительно того, что нас всех ждет впереди.

Поскольку развитие научных направлений идет с заметным ускорением, то для того, чтобы увереннее заглянуть вперед в 2030 год, надо сначала оглянуться назад, и для экстраполяции сегодняшних методических достижений на будущее, попытаться вспомнить технологический уровень не семнадцатилетней, а приблизительно тридцатилетней давности, чтобы оценить, могли ли мы тогда представлять нынешний уровень исследований. Собственно, так делали и все до нас, кто пытался заглянуть в будущее науки, по крайней мере, в биологии. Однако принципиальным отличием нашего прогноза от остальных является сосредоточение на методах исследований. Почему мы акцентируем внимание не на конкретных достижениях, а на методологической базе? Да потому что получение научных результатов зависит от нее, и именно она определяет прогресс в научно-технологической сфере, в первую очередь, благодаря появлению каких-либо прорывных технологий. Которые еще надо стремиться и при этом мочь<sup>1</sup> использовать, в противном случае - означает заведомо отставать! Причем настоящая передовая наука граничит не только с полной неизвестностью, но и подчас с невозможностью, которые, благодаря научному поиску становятся затем известными, реальными, доступными, осязаемыми. При этом просто находиться на «гребне науки» абсолютно недостаточно, поскольку это означает повторение чьих-то (или пусть даже своих собственных) результатов, тогда как надо двигаться еще дальше в неизведанное. Тяжело конечно, но надо. Хотя, помимо движения вглубь, безусловно, должно быть и расширение существующих знаний, которое достигается как раз за счет уже имеющихся методов и технологий.

Если допустить, что никаких принципиально новых методов и подходов в будущем создано не будет, то тогда можно довольно легко спрогнозировать, что будет сделано к любому году, поскольку это будут по существу репликативные исследования<sup>2</sup> и для этого потребуется лишь некое перемножение известной

<sup>1</sup> Подразумеваем здесь не только методические способности экспериментатора, но и наличие самой соответствующей техники в его доступе.

<sup>2</sup> Для некоторых дисциплин, например, для молекулярной генетики, ввиду некоторой неоднозначности получаемых иногда результатов, репликативные исследования предлагается считать так называемым «золотым стандартом».

производительности используемых методов на число работающих над какой-либо сходной темой лабораторий/групп и на потраченное ими на эксперименты время в днях/неделях/месяцах/годах в зависимости от трудоемкости решаемых задач. Но поскольку среди ведущихся научных изысканий обязательно присутствуют соответствующие так называемым «сравнительному анализу» и «научной новизне», то, вне всякого сомнения, что какие-нибудь новые технологии с их помощью или «под них» непременно будут разработаны. Мы же хотим здесь попытаться предсказать их появление. Для уже сейчас существующих методов попробуем сделать прогноз в виде новых пределов их разрешающих способностей. А то, что с помощью новых и улучшенных технологий будут достигнуты принципиально новые сведения о Жизни, не подлежит никакому сомнению, но еще раз повторим, что мы не ставим здесь целью предположить, что за информация это будет. Разве что совсем немногие результаты попытаемся представить, опять-таки, зависящие от новых технологий. Другую задачу статьи видим в попытке дать некие рекомендации, как в той же молекулярной биологии (физико-химической биологии или еще шире - в современной биологии) что называется «идти в ногу со временем» и вовремя переключаться с устаревающих методических подходов на наиболее передовые. А кто-то, прочитав эту статью, может попробовать внести свой вклад в разработку новых методов и технологий. Хотя кто может, тот и без нас знает, что и как ему делать. Прежде чем приступить к изложению ожиданий и остального задуманного для данной статьи, отметим, что мы сознательно не упоминаем ни одного производителя каких-либо приборов и оборудования, производимых ранее или ныне, и, тем более не держим мыслей относительно того, какая фирма какого оборудования освоит выпуск в будущем.

#### **Молекулярная биология и связанные с ней биологические дисциплины**

Молекулярная биология является одной из немногих наук, которая точно «знает» дату своего рождения - 25 апреля 1953 г. В этот день вышел очередной номер журнала Nature, в котором были опубликованы несколько статей, посвященных дезоксирибонуклеиновой кислоте, и среди них была работа Дж.Уотсона и Ф.Крика, предложивших структуру ДНК в виде двойной спирали [Watson, Crick, 1953; 1953a]. За это открытие<sup>3</sup> им в 1962 г.

была присуждена Нобелевская премия. В 2003 г. в 50-ти летний юбилей этого события Конгресс США в связи с еще одной датой - завершением проекта «Геном человека» предложил отмечать этот день как Национальный праздник. С 2008 г. Международный День ДНК стал отмечаться и в Европе, а затем и по остальному миру. А в этом году самой молекулярной биологии исполнилось 60 лет. Вроде как пенсионный возраст, но не для науки и тем более не для молекулярной биологии, которая на седьмом десятке только продолжает набирать силу. Впрочем, биохимии, из которой молекулярная биология выросла, уже больше полутора сотен лет. В свою очередь за эти годы (точнее за последние два-три десятилетия) молекулярная биология подразделилась на многочисленные направления, ставшие «с легкой руки» В.МакКьюзика и его коллег [McKusick, Ruddle, 1987] нести в своих названиях суффикс «-омика». Первой была геномика, потом появились протеомика, транскриптомика, метаболомика, метиломика, липидомика, гликомика и прочие «-омики», которые, на наш взгляд, все вместе можно обобщить одним термином «биомика», который, конечно же, не может подменить собой «молекулярную биологию». Тем более что у «молекулярной биологии» уже давно есть другое официальное название - «физико-химическая биология», что вполне оправданно, поскольку серьезный прогресс был в свое время предопределен достижениями различных разделов именно физической науки. Не меньшее влияние оказали и исследования, посвященные фундаментальным проблемам химической природы различных биологических молекул. И исследования нуклеиновых кислот и, в частности, ДНК могут служить лучшей иллюстрацией этому. Прорыв в понимании организации этой гигантской природной молекулы был обусловлен сначала знаниями химии нуклеиновых кислот. Потом потребовался рентгеноструктурный анализ для того, чтобы выяснить, что ДНК представляет собой двойную спираль. А затем для выяснения особенностей функционирования в клетке этой молекулы на "сцену" вновь вышли биологи. Так что самая главная биологическая молекула раскрыла свою природу благодаря исследованиям, в первую очередь, и самой биологии, и химии, и физики. И теперь, когда накопленных сведений о нуклеотидных последовательностях ДНК стало так много, что их анализ возможен лишь с помощью

---

Дж.Уотсон в своей знаменитой книге "Двойная спираль", вышедшей, в том числе, и в нашей стране в 1969 г. и переизданной в 2001 г. и которую можем рекомендовать прочитать [Уотсон, 1969; 2001].

---

<sup>3</sup> Как было сделано открытие вторичной структуры ДНК очень подробно и занимательно описал

специальных компьютерных программ, настало время других наук. Так, математика, объединившись с биологией, дала начало биоинформатике, которая благодаря стремительному развитию новых методов секвенирования ДНК, все больше становящихся самой что ни на есть обычной технологией, в ближайшем будущем среди биологических дисциплин по значимости станет одной из самых важных. Конечно, кому-то может показаться странным буквально через предложение утверждение о том, что нуклеотидных последовательностей, напротив, пока известно крайне мало, но это действительно так по сравнению с тем, что должно стать известным уже через несколько лет, не говоря уже о годе 2030. И поэтому главная цель данной статьи - попытаться представить, какими методами и подходами эти сведения будут в будущем добываться.

В последние годы, по крайней мере, для части молекулярно-биологических направлений стало использоваться определение «системная биология». Кое-кто вообще считает, что молекулярная биология эволюционирует в системную биологию [Westerhoff, Palsson, 2004], хотя позднее тот же автор [Westerhoff, 2011], проводя параллели: «макромолекулы→молекулярная биология», «метаболические пути→биохимия»; «компарменты клетки→клеточная биология»; «клетка→клеточная физиология»; «ткань→физиология»; «организм→биология»; «экосистемы→экология», обобщает все термином «системная биология». Помимо системной биологии, существует и «синтетическая биология», которая ставит целью изменение живых организмов, вплоть до создания новых, и во многом совпадает с генетической инженерией, которая развивается уже не один десяток лет. Однако некоторыми авторами в понятие синтетической биологии вкладывается несколько иной смысл, в связи с чем, мы к этим «биологиям» во второй части статьи еще вернемся.

Не хотим брать на себя смелость определять здесь точные границы всех этих по сути дочерних молекулярно-биологических дисциплин, тем более, что многие из них весьма сильно перекрываются. Но одним словом все многообразие исследований, проводимых сейчас с помощью молекулярной биологии, уже давно называют «современной биологией». При этом уверены, никоим образом не хотят «обидеть» другие биологические дисциплины, исследования по которым активно проводятся в настоящее время и они не менее важны и современны. Просто их принято считать уже классическими, отчасти потому, что некоторым из них уже многие столетия. К тому же, как будет

видно из дальнейшего изложения, выдающиеся достижения молекулярной биологии (секвенирование ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР)) ныне очень широко внедряются в эти самые классические биологические дисциплины, оказывая на них самое серьезное воздействие, а также не только в биологические, но и во многие другие области человеческого знания и технологического развития.

Так, возникнув как наука, биология была в первое время чисто описательной, однако с течением времени она, превратившись в целую систему биологических наук, становилась все более экспериментальной и в последнюю четверть XX столетия стала даже созидательной, примером чему могут служить рекомбинантные молекулы ДНК, трансгенные организмы, штаммы-суперпродуценты ценных веществ, культуры тканей и т.д. Таким образом, благодаря многочисленным достижениям молекулярной биологии, генной инженерии, биотехнологии и других дисциплин, относящихся, в первую очередь, к физико-химической биологии, биологическая наука все увереннее превращается в непосредственную производительную силу. Но при этом, благодаря новым технологиям, происходит стирание граней между экспериментальной, теоретической и описательной молекулярной биологией. Да, да, мы не опечатались - описательной молекулярной биологией. Такая, можно считать, уже достаточно давно появилась, хотя никогда так и не называлась. И послужили тому, по крайней мере, два обстоятельства - появление метода секвенирования ДНК и ПЦР.

Если попытаться очень упрощенно пояснить высказанную нами выше мысль, то надо заметить, что описательная наука занята измерением неких физических параметров типа размера листьев, стебля, цветков, их окраски или наблюдением за некими явлениями в виде колошения, плодоношения и др. Экспериментальную науку может интересовать тоже самое, но только после того как исследователь произведет некие действия, способные повлиять на эти самые параметры и процессы. Теоретическая наука может попытаться предсказать такие изменения без каких-либо экспериментальных воздействий благодаря экстраполяции уже имеющихся на этот счет сведений или каким-то другим образом. Однако методы и средства измерений и наблюдений постоянно совершенствуются и усложняются. В этой связи секвенирование ДНК, после того, как оно благодаря появлению ПЦР стало выполняться без этапа молекулярного клонирования не только молекулярными биологами, можно рассматривать как новое средство измерений, позволяющее для

выявления родственных отношений каких-либо организмов, например, растений, сравнивать не размеры листьев, стеблей и цветков, а переменные участки некоторых эволюционно-консервативных генов, что значительно точнее позволяет устанавливать таксономические положения анализируемых видов. Причем этот процесс секвенирования консервативно-переменных генов ведется ныне с помощью автоматических ДНК-секвенаторов, можно сказать, без каких-либо дополнительных (новых) экспериментальных действий по давно известной технологии. Выделение ДНК для амплификации с помощью ПЦР с уже известными праймерами и последующего секвенирования (да и сами эти процессы), можно сказать, не в счет, поскольку для подавляющего большинства случаев они отработаны настолько, что выполняются с минимальным участием экспериментатора. Экспериментальная ли наука это теперь в таком разе? Может просто в данном случае средства измерения некой части описательной науки изменились и стали адекватными - сложными, дорогостоящими - под стать новым задачам. Становящиеся известными нуклеотидные последовательности или отдельные однонуклеотидные замены, либо иные отличия в неких генах и прочих участках ДНК необходимо сравнивать между собой с помощью биоинформатики, до некоторой степени представляющей собой теоретическую молекулярную биологию. И где тут тогда четкие грани? А если вспомнить, что фактически есть эксперименты, которые над какими-либо организмами в реальности ставит сама Жизнь, то выяснение их последствий куда должно относиться? По крайней мере, одно можно сказать с уверенностью - там, где со стороны исследователя есть некие продуманные воздействия и обнаружение результатов таковых на уровне биополимерных молекул - это будет экспериментальная молекулярная биология. В других случаях, возможно правильнее считать эти науки описательными как, например, уже имеющие свои принятые научным сообществом названия типа геномики, ДНК-криминалистики и др., хотя, по сути, это ничто иное как молекулярные ботаника, генетика, зоология, микробиология и т.д.

На 2013 г. приходится еще один юбилей (на этот раз тридцатилетний) с момента первого издания в 1983 г. капитального труда «Molecular Biology of the Cell» (MBoC), инициированного Дж. Уотсоном и подготовленным большим коллективом авторов. MBoC, будучи переведенным на 10 языков, выдержав 4 переиздания [Serpente,

2013], фактически еще тогда даже уже в названии указал на неизбежность сближения молекулярной и клеточной биологии, к вопросу о чем мы еще в этой статье вернемся.

#### Прогнозы 1960, 1970, 2000 гг.

Пожалуй, наиболее грандиозный научный прогноз<sup>4</sup> на будущее сделал в конце декабря 1959 г. американский физик Р.Фейнман в своем докладе на ежегодном собрании Американского физического общества в Калифорнийском технологическом институте, опубликованном в феврале следующего года [Feynman, 1960]. Будущий Нобелевский лауреат 1965 г., получивший премию за фундаментальные работы в области квантовой электродинамики, заглянул в технологическое будущее цивилизации и высказал предположение, что со временем многие материалы и устройства будут изготавливаться на молекулярном и атомарном уровнях. В XXI веке эти задачи действительно стала решать набирающая силу нанотехнология. Р.Фейнман тогда не оставил без внимания и биологию, перечислив некоторые ее центральные и фундаментальные проблемы того времени, и поставил на первое место вопрос о последовательности нуклеотидов в ДНК. И сам ответил на него следующим образом - «... Вы будете видеть порядок оснований в цепочке ...», имея в виду цепочку ДНК. При этом он посоветовал, что микроскопы пока слишком «грубы» и надо делать микроскоп, который был бы в сотню раз чувствительнее существующего электронного, благодаря чему многие проблемы биологии будут легко решены. К сожалению, последовательность азотистых оснований в единичной молекуле ДНК биологи до сих пор в микроскоп, можно сказать, не видят (или видят плохо), хотя подобные микроскопы или, вернее, с почти такой чувствительностью, о которой мечталось Р.Фейнману, уже созданы и даже есть попытки (пока малоуспешные) применения сканирующих зондовых микроскопов для секвенирования ДНК [Tanaka, Kawai, 2010]. Как, впрочем, и электронных микроскопов [Thomas, Glover, 2008; Bell et al., 2012]. При этом, как будет говориться в разделе, посвященном будущим годам, существует вероятность такого развития событий, что именно микроскопия сверхвысокого разрешения позволит в

<sup>4</sup> На самом деле самый долгосрочный и очень смелый «прогноз» (получилось, что более чем на сто лет вперед) сделал Ф.Мишер, открыв новое вещество - нуклеин, о чем отдельно поговорим в одной из последних подглав второй части данной статьи.

будущем легко и просто секвенировать не только геномы, включая обнаружение модифицированных оснований, но и транскриптомы любых организмов. А возможно даже и протеомы, причем с посттрансляционными изменениями. В данном случае, видимо как раз уместно выражение «Поживем - увидим!».

Р.Фейнман не определял каких-то конкретных сроков для того или иного события, но в начале своего выступления он упомянул год 2000-ый, заметив, что когда тот наступит, то люди оглянутся назад и удивятся, почему до 1960 г. не было серьезного движения «в этом направлении»<sup>5</sup>. Исходя из этих его слов, можно допустить, что все же неким рубежом для него был 2000 г. На несколько меньший срок вперед, но также до 2000 г. сделал прогноз другой Нобелевский лауреат Ф.Крик [Crick, 1970]. Эта его статья «Молекулярная биология в 2000 г.» также базировалась на докладе, сделанном им осенью 1969 г. на юбилейных торжествах по поводу столетия журнала Nature<sup>6</sup>. К сожалению, нам неизвестно, насколько статья оказалась измененной по сравнению с докладом, поскольку между ними около года, и даже за этот срок произошли очень важные события в молекулярной биологии. Чтобы сделать прогноз на 30 лет вперед, Ф.Крик вспоминал предыдущий уровень знаний в области молекулярной биологии и смежных дисциплинах. При этом Ф.Крик заметил, что «... многие важные открытия довольно неожиданны по своей природе и потому их трудно предсказывать», с чем нельзя не согласиться. Он фактически ограничился общими рассуждениями без излишней детализации, коснувшись целого ряда вопросов и направлений в молекулярной биологии будущего тридцатилетия, в первую очередь тех, что интересовали тогда его самого в большей степени. В своем прогнозе Ф.Крик оговорился, что желающие могут составить свой перечень проблем, которые надо решать и которые им наиболее близки, поскольку сам придерживался того же принципа.

Помимо научных прогнозов, Ф.Крик поразмышлял о ряде околонучных моментов, часть из которых сбылись, например, что молекулярных биологов будет становиться все больше, в биологию будет продолжаться миграция ученых из физики и химии<sup>7</sup>, финансирование будет расти, а Китай

станет одной из крупных научных держав и др. Большинство высказанных им мыслей оказались справедливыми, однако целый ряд важных моментов развития молекулярной биологии, к сожалению, не нашли отражения в его докладе/статье, к чему ниже мы еще вернемся.

Судьбе было угодно так, чтобы эта статья Ф.Крика была дважды опубликована на русском языке в разных переводах сначала в СССР [Крик, 1971], а затем в России [Крик, 2000]. В первом случае ее сопровождала статья акад. В.А.Энгельгардта, в которой автор упомянул, что статья Ф.Крика печатается с незначительными сокращениями, «не касающимися существа дела», и сознательно ушел от каких-либо комментариев и своих собственных прогнозов, а просто изложил, главным образом, тогдашнюю ситуацию вокруг молекулярной биологии в СССР [Энгельгардт, 1971]. В статье 2000 г. дополнительно появился Р.С. в виде письма Ф.Крика в редакцию журнала летом 2000 г., где автор с удовлетворением отмечает, что, перечитывая свою статью, с удивлением обнаружил, что правильно указал основные моменты, добавив, что у него нет ощущения, что он бы мог сделать аналогичный прогноз на следующие 30 лет.

В том же номере журнала «Биоорганическая химия» были опубликованы несколько работ отечественных ученых, решившихся изложить свое видение той прогнозной статьи Ф.Крика, охарактеризовать настоящее молекулярной биологии и смежных дисциплин и немного подумать о будущем. Предваряя тот цикл статей, акад. В.Т.Иванов вместе Ю.А.Берлиным отметили, что у их авторов «оценка достоверности предсказаний варьирует от явного скепсиса до восторженного признания пророческого дара Нобелевского лауреата» [Иванов, Берлин, 2000]. Так, акад. Е.Д.Свердлов даже в заголовок своей статьи вынес слова о том, что Ф.Крик «... был почти абсолютно прав» и привел немало доказательств этому [Свердлов, 2000]. Другие от открывателя двойной спирали ДНК ждали большего внимания, в первую очередь, именно к этой молекуле и связанным с ней направлениям молекулярной биологии.

ДНК (в виде такой аббревиатуры) Ф.Криком вспоминается в статье (возможно, так было и в самом докладе) в связи с прошлым всего один раз (при упоминании работ О.Эвери по трансформации пневмококков) и в связи с будущим только два раза, когда он говорил, что будет в

<sup>5</sup> Движения, говоря современным языком, в область нанотехнологий.

<sup>6</sup> Ф.Крик в своем докладе (статье) совершенно забыл упомянуть об одной очень важной дате. Какой? К этому вопросу мы вернемся ближе к концу данной статьи (ее второй части).

<sup>7</sup> В последние десятилетия в связи с бурным

развитием биоинформатики к физикам и химикам прибавился немалый поток из математиков-программистов, о чем уже говорилось выше.

деталей выяснен механизм репликации ДНК и будет понятно значение повторяющихся последовательностей. Последнего не случилось. На это в своих статьях-откликах обращают внимание В.А.Гвоздев [2000] и С.В.Разин [2000], который развил эту мысль дальше, допустив, что ДНК более сложноустроенных эукариотических организмов, помимо уже привычного нам триплетного кодирования, может нести в себе и некий гипотетический код в виде «строительных инструкций», например для цитоскелета. В этой связи можем упомянуть недавние работы А.Н.Зимницкого [Зимницкий и др., 2007; Zimnitskii, 2012], выдвигающего экстраординарную гипотезу о кодировании простыми повторами ДНК некоторых полисахаридов, имеющих детерминированные длины своих молекул, косвенно свидетельствующие об их матричном синтезе. Сомнительно, конечно, но, возможно, что до 2030 г. эта гипотеза будет или отвергнута, или получит все необходимые доказательства и тогда станет важным открытием, что положит начало новому разделу молекулярной биологии - гликогеномике, поскольку такое направление как гликомика со своими целями и задачами уже есть.

Наиболее серьезные замечания к прогнозу Ф.Крика сделал акад. Л.Л.Киселев [2000], сконцентрировавший свое внимание, главным образом, на том, что Ф.Крик в 1969-1970 гг. не смог предсказать или, может быть, не стал предсказывать. Среди них открытие обратной транскрипции (1970 г.), разработка технологии рекомбинантной ДНК (1972-73 гг.), появление быстрых методов секвенирования ДНК (1975 - 77 гг.), разработка полимеразной цепной реакции (1983 - 88 гг.) и некоторые другие достижения молекулярной биологии, свершившиеся до 2000 г. Одно из объяснений этому Л.Л.Киселев видел в увлечении Ф.Крика в те годы вопросами происхождения Жизни и принципами функционирования нервной системы, не позволившими тому «сфокусироваться», «сконцентрироваться» на упомянутых нами чуть выше и произошедших вскорости после публикации его прогноза методических прорывах и некоторым нежеланием, по словам Л.Л.Киселева, «омрачать обратной стрелкой (ДНК←РНК)» выдвинутую им же центральную догму молекулярной биологии ДНК→РНК→белок [Crick, 1958]. Справедливости ради надо заметить, что буквально за несколько месяцев до опубликования своего прогноза практически сразу же после обнародования на одной из конференций факта построения ДНК по матрице РНК, в том же журнале Nature вышла другая статья Ф.Крика, посвященная вопросам

обратной транскрипции и пересмотру центральной догмы молекулярной биологии [Crick, 1970a].

В 1969 - 1970 гг. действительно не было особых предпосылок к методическим прорывам в виде клонирования, секвенирования и амплификации ДНК, но весьма удивительным является то, что в прогнозе Ф.Крика совсем нет упоминания о синтезе олигонуклеотидов, который тогда уже существовал много лет, но был очень неэффективным. Этому В.Т.Иванов и Ю.А.Берлин [2000] находят объяснение, что слишком далека была органическая химия от его научных интересов. Однако, зная о важности использования олигонуклеотидов в молекулярной биологии, в том числе, для уже случившихся подтверждений различных гипотез Ф.Крик, на наш взгляд, должен был верить, что химия этого процесса может стать иной - быстрой, точной, удобной, количественной и соответственно предсказать прорыв в синтезе этих очень важных для молекулярной биологии соединений. Причем, как будет говориться в последующих разделах, быстрый и удобный синтез олигонуклеотидов стал во многом предопределяющим для целого ряда последующих открытий и методических прорывов, и если бы его удалось предвидеть, то картина молекулярной биологии к 2000 г. в описании Ф.Крика могла (или даже *должна*) быть совсем иной. К тому же интересуясь проблемой возникновения Жизни, Ф.Крик неизбежно должен был думать о синтезе органических молекул, хотя с другой стороны, находясь под впечатлением от чрезвычайно малой скорости таких реакций в добиотической Природе (о чем можно только предполагать) и в тогдашних экспериментальных условиях, он, видимо, не мог представить их протекающими гораздо быстрее. В своем прогнозе он как раз упоминает, что вопросы происхождения жизни на Земле останутся нерешенными, поскольку добыть хоть какие-нибудь прямые доказательства того, что произошло так давно, крайне трудно (читай - невозможно).

Касаясь вопроса зарождения Жизни на Земле, можно заметить следующее. Ведь, если даже в более-менее оптимизированных условиях с реактивами, берущимися в избытке, синтез олигонуклеотидов в 60-х и 70-х гг. прошлого века шел мучительно долго, то в условиях древней Земли, когда концентрации реагирующих веществ были крайне низкими, это затягивалось на миллионы и миллиарды лет. Есть предположение, что повышение концентрации взаимодействующих веществ могло происходить благодаря температурной конвекции в гидротермальных порых [Baaske et al., 2007], возможно ускорившей эволюцию или вообще обеспечившей зарождение

Жизни<sup>8</sup>. Правда, существует точка зрения, что Жизнь на Земле зародиться не могла и привнесена из Космоса. На что есть простой вопрос/ответ - «А там-то как она смогла зародиться?». Да и «доставка» на нашу планету Жизни откуда-нибудь издалека в способном к размножению виде выглядит крайне проблематичной, учитывая силу трения космических тел о воздух в атмосфере Земли из-за гигантских скоростей и возникающие при этом запредельные для живой материи температуры. Да и не ждали их на Земле идеальные условия, где бы они могли без проблем начать размножаться. К тому же хорошо известно, что чтобы началась какая-нибудь инфекция, вызываемая вирусами или бактериями, абсолютно недостаточно попадания в организм единичных агентов, поскольку они скорее успеют погибнуть, нежели оставят потомство. Конечно, у кого-то могут быть совсем иные соображения на сей счет. Однако А.И.Опарин еще в 1924 г. в своем знаменитом труде «Происхождение жизни» [Опарин, 1924] при восстановлении событий пребиотической истории, когда на нашей планете существовали лишь весьма простые химические вещества, построенные, в том числе, из атомов водорода, углерода, азота и кислорода, рассмотрел процессы, которые могли привести к синтезу неких соединений (которые мы сегодня называем органическими) и переходу к первым жизненным формам.

Уже в наши дни была довольно убедительно продемонстрирована принципиальная возможность синтеза из упоминаемых и Опариним цианистоводородной кислоты, аммиака и других соединений - азотистых оснований (пиримидинов и пуринов). Сборка этих мономерных звеньев в полинуклеотидные цепочки, вероятно, происходила на своеобразных твердых фазах, которыми могли служить слюда и некоторые типы глин [Ferris et al., 1996; Ertem et al., 2000]. Моделируя условия примитивной Земли, показано, что благодаря высокой реакционной способности метилурацила, может образовываться большое число разнообразных его производных. Возможно, что среди первых полимерных молекул на нашей планете на этапе предбиотического существования Земли и, может быть, в самом начале биотической жизни действительно были просто устроенные полирибонуклеотиды (только как найти их окаменелые останки?) и господствовал так называемый РНК-мировое, гипотезы о чем в 1968 г. (совсем незадолго до знаменитого доклада-прогноза) были выдвинуты Ф.Криком и Л.Оргелом

<sup>8</sup> Во второй части данной статьи вопроса зарождения Жизни мы еще коснемся.

[Crick, 1968; Orgel, 1968].

Возвращаясь к предсказаниям Ф.Крика и откликам на него, в том числе, по вопросу происхождения Жизни, можно сказать, что самый неутешительный прогноз на будущее сделал Б.Ф.Поглазов [2000], заметивший, что если исходить из того, что на Земле Жизнь возникла, то она должна и закончиться. Правда, делает важную оговорку - «в достаточно отдаленном будущем», но пессимистически прогнозирует, что человечеству все равно не хватит времени для разрешения проблемы происхождения Жизни. Может, его все же хватит на познание закономерностей и особенностей протекания Жизни, чтобы продлить ее подольше?! (Это уже мы вопрошаем!).

С.В.Разин [2000] вообще выразил сомнение, что вопросы происхождения Жизни на Земле в то прошедшее тридцатилетие (с 1970 по 2000 гг.) могли серьезно интересовать каких-либо молекулярных биологов. Наверное, немного таких все же было. До некоторой степени связанные с зарождением Жизни вопросы эволюции виртуальных цифровых организмов заинтересовали кибернетиков, которые на примере особым образом написанных саморазмножающихся компьютерных программ Avida (Artificial vida - искусственная жизнь), совершающих при репликации некие случайные ошибки, убедительно продемонстрировали, что такие программы способны сами упрощать свою организацию, сводя объем «жизненно-важной» информации к максимальному минимуму, однако, если заложить в программу некоторые дополнительные требования по «выживанию», то вновь генерирующиеся цифровые организмы за счет так называемых мутаций способны через несколько тысяч компьютерных поколений заметно усложнить свое устройство, в чем явно просматривается аналогия с настоящей живой материей в ходе эволюции Жизни на Планете [Adami, 1994; 1998; Lenski et al., 1999; 2003 и др.].

Достаточно грустный прогноз для физико-химической биологии первой четверти XXI века делает и Е.С.Северин [2000], отмечающий, что интерес к молекулярной биологии не ослабевает, но ждать новых открытий уже не приходится, поскольку все самое важное уже было открыто в XX<sup>9</sup> веке, проводя аналогию с великими географическими открытиями, сделанными, главным образом, в XV веке, как только началось

<sup>9</sup> Что касается самого главного открытия самой молекулы ДНК, то оно было сделано еще в XIX веке и к этому событию во второй части статьи обязательно вернемся.

межконтинентальное мореплавание. Тут можно возразить, что и в последующие века нет-нет, да и случались географические открытия разного масштаба и, может быть, для молекулярных биологов XXI века не так все безнадежно.

Прогнозируя развитие молекулярной биологии, Л.Л.Киселев указал, что, по его мнению, в 2010 - 2020 гг. произойдет слияние молекулярной и клеточной биологии [Киселев, 2000], свидетелями чему мы сейчас фактически становимся, хотя можно вспомнить, что оно фактически прогнозировалось уже 30 лет назад коллективом авторов, возглавляемым Дж.Уотсоном, при написании книги «Molecular Biology of the Cell». В.Г.Дебабов высказал мысль, что будут конструироваться микроорганизмы, адаптированные только для жизни в ферментерах, и при этом содержащие необходимые для экспериментатора гены [Дебабов, 2000], что, как можно будет видеть из нашего дальнейшего изложения, также «не за горами». В.Т.Иванов и Ю.А.Берлин [2000] предположили, что в первом десятилетии нового века произойдет серьезный прогресс в секвенировании ДНК, который позволит секвенировать эукариотические геномы средних размеров за несколько недель. При этом главная надежда была возложена ими на масс-спектрометрию с ожиданием повышения производительности секвенирования ДНК на 2 порядка, тогда как за эти годы реально произошло повышение другими методами порядков на 6, на 7, что может всех только радовать, определенно включая и предсказателей. Ожидание такого малого увеличения производительности (всего на 2 порядка) в 2000 г. свидетельствует, что тогда особо не думали о разнообразии методов секвенирования ДНК новых поколений. Но пришли методы второго, третьего поколений и теперь, поскольку, как говорится, нет предела совершенству, разработку четвертого, пятого и последующих поколений уже не остановишь, в чем мы далее в этой статье постараемся убедить читателей.

Все же Ф.Крик гораздо большего не предсказал, чем предсказал. В подтверждение этих своих слов хотим привести его высказывания по поводу методов молекулярной биологии, тем более это главная цель нашей статьи. Так, Ф.Крик отмечает колоссальную эффективность экспериментальных методов, заимствованных из физики и химии, которые еще не исчерпали себя, и при этом говорит о новых методах, которые по его словам будут порождены изобретательностью исследователей и позволят достичь многого. При этом, не конкретизируя, что же это могут быть за методы. И это даже не столь важно, поскольку главным является то, что он предполагал их скорое

появление. Хуже другое - чуть дальше он еще раз возвращается к этому вопросу и отмечает, что новые неожиданные прорывы обязательно произойдут. Однако самое главное, что в этом же абзаце он НЕ верит, что исследования в 2000 г. будут всецело определяться прорывами, которые произойдут за эти годы. Но на самом деле именно это и случилось, поскольку главными технологиями в молекулярной биологии 2000 г. были (если вкратце) синтез ДНК (олигонуклеотидов), амплификация ДНК, клонирование ДНК, секвенирование ДНК, на появление которых в 1970 г. фактически не надеялись. Возможно, никто.

При этом к 70-м гг. прошлого века (да и как минимум на десяток лет раньше) важность определения нуклеотидных последовательностей ДНК не вызвала никаких сомнений. Однако отсутствие производительных методов секвенирования ДНК делало решение этой проблемы призрачным, в связи, с чем оно многими откладывалось тогда на следующее столетие. Незадолго до прогноза Ф.Крика известный американский ученый Э.Чаргафф заметил, что "...чтение последовательности ДНК может стать задачей XXI века..." [Chargaff, 1968]. Может быть, это его высказывание (а Ф.Крик мог о нем знать) также смутило Ф.Крика, который тоже не видел возможности разработать эту технологию до 2000 г. Собственно, так и случилось, поскольку быстрое секвенирование полных геномов крупного размера стало возможным только в последние 6-8 лет, и Э.Чаргафф, получается, был прав. Хотя формально в своем прогнозе он все же сильно ошибся, ввиду того, что производительное (в тогдашнем восприятии этого процесса) секвенирование ДНК принципиально уже стало доступно во второй половине 70-х гг. Но такие ошибки скорее должны приносить радость, а не разочарование.

Говоря о сделанных ранее для молекулярной биологии прогнозах, нельзя обойти вниманием статью Б.П.Готтиха в уже упомянутом номере журнала «Биоорганическая химия» [Готтих, 2000]. Автор приводит в ней выдержки из отдельных материалов, принятых во времена СССР, и убедительно показывающих, что молекулярная биология в нашей стране была хорошего высокого уровня и намечаемые исследования находились в русле мировых тенденций и отвечали важнейшим задачам биологической науки. Пожалуй, наиболее интересным (особенно в связи с главным предметом рассмотрения данной статьи) представляется постановка проблемы, озвученная акад. В.А.Энгельгардтом в пленарном докладе на VIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии, где он отмечает, что «На очереди задача

расшифровки последовательности расположения нуклеиновых звеньев в огромной цепи нуклеиновой кислоты.»<sup>10</sup>. И это был март 1959 г. Р.Фейнман в декабре того же 1959 г. говорил об этом же, правда, делая конкретное предположение, что последовательное расположение азотистых оснований когда-нибудь можно будет увидеть в микроскоп.

#### 1983 - . . . . - 2012 гг.

Как отмечалось во Введении, чтобы заглянуть вперед на 17 лет, надо оглянуться назад на все 30, и, вспомнив тогдашний технологический уровень молекулярной биологии, попытаться оценить, могли ли бы мы тогда представить, что будет в году 2013-ом для того, чтобы провести экстраполяцию сегодняшних методических достижений еще дальше - в 2030 г. Причем, как сейчас можно видеть, 1983 г. оказался ознаменован несколькими событиями, предопределившими развитие молекулярной биологии не только на все последующее тридцатилетие, но и продолжающимися оказывать самое серьезное влияние и поныне. Часть из них, несомненно, сохранит свое влияние и в будущем.

#### 1983 г., 1970-ые, 1960-ые гг.

Итак, 1983 г. Применение технологий рекомбинантной ДНК насчитывает уже десяток лет [Jackson et al., 1972; Cohen et al., 1973]. В плазмидных, фаговых и прочих векторах клонировано множество генов различного происхождения, а также иных фрагментов ДНК. Секвенирование ДНК новыми быстрыми методом химической дегградации по Максаму-Гилберту [Maxam, Gilbert, 1977] и ферментативным методом с терминацией роста цепи по Сэнгеру [Sanger et al., 1977] продолжается уже шесть лет. Не так давно преодолен важный рубеж в виде определения полной последовательности нуклеотидов фага лямбда размером 48502 пн [Sanger et al., 1982], но до секвенирования более крупных участков ДНК, включая цельные последовательности нуклеотидов различных органелл и полные геномы свободноживущих организмов, еще очень далеко. При этом довольно активно продолжается так называемое рестриктазное картирование, когда тотальная или клонированная ДНК расщепляется подходящими рестрикционными эндонуклеазами, а затем с помощью гель-электрофореза и блот-гибридизации по Саузерну [Southern, 1975] с соответствующей меченой пробой выясняется локализация сайтов узнавания используемых

ферментов в неких генах или прочих участках ДНК. Фактически вместо более трудоемкого секвенирования анализируемых фрагментов. Теми, кто не хотел или скорее не мог секвенировать. Причем это по инерции будет продолжаться еще довольно долго, даже после определения полных нуклеотидных последовательностей, например, целого ряда генов рибосомных РНК разных организмов, тогда как гораздо проще (и точнее) локализовать сайты фактически любых рестрикционных эндонуклеаз, анализируя с помощью компьютерных программ (или даже вручную, точнее, глазами) ставшие уже известными последовательности нуклеотидов этих высококонсервативных генов. Приходилось с удивлением наблюдать как, например, сайты узнавания рестрикционных эндонуклеаз *Bam*HI, *Eco*RI (и других) разные авторы в своих статьях помещали совсем в иные места рДНК из-за неточностей в определении размеров фрагментов с помощью агарозного гель-электрофореза и/или неверно сделанного анализа полученных первичных данных. И те, кто быстрее остальных поняли правильное направление движения в этой области молекулярной биологии, много преуспели, поскольку раньше освоили новые методы, будь то секвенирование, бисульфитное секвенирование, футпринтинг, «замедление в геле» и другие.

Необходимо заметить, что высококопийным генам рРНК тогда уделялось достаточно большое внимание, тянувшееся еще из 1970-х гг., что объяснялось все же довольно ограниченными методическими возможностями тех лет и как следствие трудностями работы с уникальными генами. Тем не менее, благодаря тогдашним молекулярно-биологическим исследованиям, удалось спустя много десятилетий разрешить известную еще с начала XX века проблему организации некоторых хромосом. Так, российский ученый С.Г.Навашин<sup>11</sup> [Навашин, 1912; 1915] обнаружил у гиацинта и мускари явление ядерного диморфизма, проявляющегося в изменении числа хромосом со спутниками, «привешенными на нитях к концам аутохромосом» (цит. по оригиналу) и, таким образом, отделенными от основной части хромосом участком, известным ныне как вторичная перетяжка и служащим, как мы сейчас знаем, местом локализации генов рРНК. Позднее Навашин-младший [Navashin, 1928] более детально исследовал гибриды скерды из рода *Crepis* и дал эффекту доминирования ядрышка одной хромосомы над ядрышком другой термин

<sup>10</sup> Цит. по Б.П.Готтиху [2000].

<sup>11</sup> С.Г.Навашин более известен как открывший в 1898 г. двойное оплодотворение у растений.

"дифференциальная амфиластия", широко использовавшийся вплоть до конца 70-х годов. Затем это явление стали называть феноменом ядрышкового доминирования, а причины, его вызывающие, стали предметом пристального внимания молекулярных биологов. Оказалось, что от особенностей устройства (ставших известными благодаря секвенированию ДНК) межгенных спейсерных областей (МГС), разделяющих tandemные повторы генов рРНК, (а не от отличий рестриктазных карт кодирующих последовательностей), зависит доминирующая роль образуемыми определенными вариантами повторов рДНК ядрышковых организаторов. Причем, такие схожие особенности организации МГС рДНК, вызывающие сходные эффекты ядрышкового доминирования, характерны как для животных, так и для мира растений [Reeder, 1985; Doelling, Pikaard, 1993; Куликов, Вахитов, 1995; Akhunov et al., 2001].

Собственно мы вспомнили эти результаты не только для того, чтобы продемонстрировать возможности молекулярной биологии решать разные, в том числе, застарелые проблемы, а и с другой целью. Так, противопоставляя построение рестриктазных карт и определение нуклеотидных последовательностей, хотим подчеркнуть, что никакие маркеры (в данном случае - рестриктазные фрагменты ДНК), свидетельствующие о чем-нибудь важном лишь ОПОСРЕДОВАННО, не могут сравниться с конкретной информацией в виде последовательности нуклеотидов, отвечающих за проявление того или иного признака. При этом, безусловно, можно допустить, что если в результате секвенирования и анализа полученной последовательности, например, были бы выявлены сайты каких-либо рестрикционных эндонуклеаз именно в этой важной области, дающих некую специфичную картину расщепления и за счет этого пригодных в качестве маркеров, то для расширения полученных знаний и переноса их на другие объекты в таком случае было бы вполне допустимо использовать эти ферменты, позволяющие обходиться без более трудоемкого секвенирования ДНК. Если таковых не выявлено, то и не надо пытаться фактически окольными путями узнавать, что и как, поскольку это будет вряд ли достоверно. Собственно, такой принцип должен действовать и для ныне используемых разнообразных генетических маркеров и прочих биомаркеров (РНК-маркеров транскриптома, в том числе), к вопросу о чем мы во второй части статьи еще вернемся.

Считаем важным еще немного задержать внимание читателей на генах рРНК, в частности, у растений. Так, значительное число работ в 1970-е гг.

было посвящено подсчету числа копий этих генов у разных видов и сортов. Велись эти эксперименты с помощью твердофазной молекулярной гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах с использованием радиоактивного зонда, коим служили меченные *in vivo* или *in vitro* молекулы рРНК. После соответствующих отмывок, направленных на удаление несвязавшейся (непрогибридизировавшейся) метки, остаточное количество радиоактивности на фильтрах подсчитывалось с помощью сцинтилляционного счетчика; а, зная удельную активность меченой рРНК, можно было определить число кодирующих эти молекулы генов. При этом, при общей выравненности результатов нет-нет, да и случались так называемые «выпады», когда количество распадов радионуклида на каком-то фильтре сильно выбивалось из общего ряда. Разумеется, такие фильтры (результаты) отбраковывались. Однако нет уверенности, что и остальные фильтры были безукоризненными. Думать так позволяет появившаяся в середине 1970-х гг. и упомянутая выше блот-гибридизация по Саузерну [Southern, 1975], предполагающая после до определенной степени сходной процедуры молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот проведение этапа радиоавтографии, в результате которого на рентгеновской пленке проявлялись сигналы гибридизации, соответствующие электрофоретическим полоскам (рестриктазным фрагментам) ДНК. Но, помимо таких специфичных сигналов гибридизации, на радиоавтографах иногда могли присутствовать и неспецифические сигналы в виде радиоактивных точек или неких разводов, возникающих из-за сорбции на мембранных фильтрах незаметных глазу пылинок и прочих нечистот. Экстраполируя такие данные на эксперименты по подсчету числа генов рРНК, можно допустить, что и на некоторых фильтрах (не только на «выпадах») также могли быть подобные неспецифические сигналы, что сразу ставит под некоторое сомнение получаемые прежде результаты. Для повышения достоверности тех анализов, видимо, до того, как в сцинтилляционные флаконы помещать фильтры, надо было проводить радиоавтографию последних с целью исключения из эксперимента содержащих посторонние сигналы и брать для счета радиоактивности фильтры (допуская однородность поверхности и пористости фильтров) только с равномерным фоном (гибридизационными сигналами). Но тогда радиоавтография мембранных фильтров после блот-гибридизации еще только начинала использоваться и перенести данный технологический прием из нового метода в старый не получилось. Однако эта ситуация заставляет

больше внимания впредь уделять технологическим возможностям тех или иных методических подходов, включая их «тонкие места», способные привести к неверным результатам.

Но как бы то ни было, молекулярные биологи довольно быстро поняли, что генов рРНК у высших организмов (и особенно у растений) весьма много и этот показатель может варьировать в широких пределах у одного вида или сорта. И практически перестали считать число генов рРНК. А сам метод как таковой фактически исчез из арсенала молекулярных биологов. Вообще молекулярная биология (как будет видно и из дальнейшего изложения) довольно легко расстается со старыми методами, поскольку им на смену приходят новые - более производительные и достоверные, часть из которых являют собой по-настоящему прорывные технологии, обеспечивающие новый уровень знаний. Возможно, этому надо поучиться у нее другим биологическим дисциплинам.

Наверное, это покажется сейчас удивительным, но такая «мелочь», как проведение горизонтального электрофореза фрагментов ДНК в полностью погруженных в буфер агарозных гелях (получивших в англоязычной литературе обозначение как «submerged gel» или «submarine gel»), на которые все экспериментаторы перешли как раз в 1982-1983 гг. [Sealey, Southern, 1982; Yoshida, 1983], обеспечила кардинальное улучшение электрофоретической картины. До этого уровень буфера в анодном и катодном отсеках не превышал поверхности геля, и анализируемые образцы наносились в сухие колодцы. В процессе электрофореза внесенные с образцом микролитры жидкости испарялись/впитывались и происходило подсыхание колодцев, что приводило в этих местах к искажению линий электрического поля и, как следствие - к деформации (искривлению) полос разделяемых фрагментов ДНК и невозможности четкой интерпретации результатов электрофореза. Для предотвращения этого применяли разнообразные (причем не было ни одного хорошего!) способы сохранения буфера в колодцах и при этом никто (в том числе и мы) долго не решались залить в камеру буфера столько, чтобы он покрыл гель полностью, так как считалось, что при этом произойдет шунтирование. Ныне все камеры для горизонтального гель-электрофореза нуклеиновых кислот от любых производителей рассчитаны на полное погружение геля в буфер. Сейчас уже никто не пытается проводить электрофорез нуклеиновых кислот в вертикальных агарозных гелях по причине трудоемкости этого процесса и плохого качества электрофоретической картинки. Однако, если дотошный читатель (сам не

проводивший гель-электрофорез нуклеиновых кислот в те годы) встретит в каких-либо обзорных статьях начала 80-х гг. упоминание о том, что в вертикальных гелях достигается лучшее качество полос ДНК, чем в горизонтальных, то ему надо знать, что при том сравнении имелись в виду не полностью погруженные в буфер гели. Вспоминаем здесь об этом так подробно только для того, чтобы лишний раз продемонстрировать какой малости порой надо для того, чтобы произошел определенный технологический прорыв, пусть даже и небольшого масштаба. Хотя, что считать в данном случае небольшим масштабом? Использовать-то полностью погруженные в буфер гели очень быстро стали буквально все молекулярные биологи по всему миру!

Попутно вспомним даже более старый молекулярно-биологический метод. В свое время ДНК/ДНК-гибридизация в растворе в виде метода кинетики реассоциации фрагментов ДНК определенного размера сыграла очень значительную роль в познании структурной организации геномов различных организмов [Britten, Kohne, 1968]. Именно благодаря этому методу стало ясно, что геномы эукариот содержат повторяющиеся участки, о чем в своем прогнозе упоминал Ф.Крик, выражая надежду о познании их роли [Crick, 1970]. Позволив получить весьма важную информацию, и этот метод довольно быстро сошел со сцены, поскольку принципиально новых сведений дать уже не мог. Но случилось так, что в конце 90-х гг. про него вспомнили (узнали) некоторые микробиологи и взяли на вооружение. Никак не хотим бросать тень на всех микробиологов, среди которых, уверенны, очень много классных специалистов (в том числе, наших друзей), но указывать, кто именно так делал (чтобы не подумали на остальных) все же не намерены, поскольку нет никакого желания цитировать те работы, коих было, впрочем, немало. Так, на рубеже столетий стали появляться статьи, в которых проводилась реассоциация тотальной ДНК, выделенной из почвы, и по кинетике этого процесса рассчитывалась некая кинетическая сложность геномов (как думали - почвенных микроорганизмов), по характерной кривой которой можно было рассчитать количество отдельных видов (геномов) бактерий. В результате таких анализов цифры о числе видов микроорганизмов, которых тогда считалось, что на Планете всего около 5 тысяч, «полетели» вверх. Были работы, в которых насчитывали уже до миллиарда видов бактерий, считая, что большинство из них не культивируемы, потому и не выявляются классическими микробиологическими методами. На самом деле, выделяемая ДНК из почвы, помимо

самых бактерий, кому только могла не принадлежать - и имеющим геномы внушительных размеров растительным остаткам, зоофауне, грибам, простейшим, что и давало представление, что разных бактериальных геномов там множество. Нам известна статья, где микробиологи проводили сравнение методов выделения ДНК из почвы и остановились на том, который давал больший выход, обеспечивающий большее число «геномов микроорганизмов». К счастью, это закончилось также довольно быстро и должно служить хорошим примером непродуманного использования молекулярно-биологического метода в других дисциплинах.

#### *От 1983 г. и до 2012 г.*

Возвращаясь к секвенированию начала 80-х гг., можно сказать, что к тому времени за прошедшие годы развития обоих вышеупомянутых методов [Maxam, Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977] пробоподготовка для них заметно улучшилась. Появились удобные вектора с так называемым полилинкером, в котором сосредоточены сайты многих гексануклеотидных рестрикционных эндонуклеаз, упростивших клонирование и субклонирование; для ферментативного секвенирования стал использоваться одноцепочечный вектор на основе фага M13, способствующий построению новых цепей ДНК и заметно продливший высокоточное «чтение» нуклеотидов с радиоавтографа геля. Другим способом продления «чтения» последовательностей с радиоавтографов стало применение метки в виде низкоэнергетического изотопа серы  $^{35}\text{S}$  вместо стандартного  $^{32}\text{P}$ , дающего сигналы в виде более «размытых» электрофоретических полос, начинающихся раньше сливаться в верхней части радиоавтографической плёнки. Другой изотоп фосфора  $^{33}\text{P}$ , даже более пригодный для секвенирования, чем сера, был впервые использован российскими учеными только спустя 10 лет [Краев и др. 1992] и меченные им дезоксирибонуклеотидтрифосфаты тогда изготавливались в Ташкентском и чуть позже в Ленинградском отделениях В/О «Изотоп»<sup>12</sup>. Заодно хотим заметить, что один из авторов данной статьи, в начале 1980 г. еще до использования в секвенировании ДНК радионуклида серы  $^{35}\text{S}$ , листая в библиотеке очередное издание справочника The CRC Handbook of Chemistry and Physics, обнаружил в нем упоминание об изотопе фосфора  $^{33}\text{P}$ ,

<sup>12</sup> Радиоизотопы это не оборудование, производителей которого мы обязались не упоминать!

характеризующимся чуть большим периодом полураспада (25,4 дня против 14,3 дня для  $^{32}\text{P}$ ) и заметно меньшей энергией (0,249 МэВ против 1,709 МэВ у  $^{32}\text{P}$ ), и удивившись тому (возможно, раньше многих), что такой удобный во многих отношениях радионуклид в молекулярной биологии не используется, сделать в этом плане ничего не мог. Спустя много лет, в середине 90-х гг., случайно встретившись на проходившей в МГУ конференции по геносистематике с работавшим в те годы в Ташкенте очевидцем создания данной продукции, им удалось обсудить эту ситуацию, порадовавшись, что благодаря отечественной разработке<sup>13</sup> данные изотопы можно было без проблем покупать в России. Однако к тому времени уже десятилетие как в мире использовались автоматические секвенаторы ДНК, рассчитанные на детекцию флуоресцентных меток [Smith et al., 1986]. Сначала разделение продуктов терминирующих реакций в таких приборах осуществлялось в пластинах геля, затем им на смену пришли более производительные ДНК-секвенаторы, оснащенные капиллярами [Luskey et al., 1990], число которых довольно быстро возросло с одного до 96. В середине же 80-х гг. шведскими учеными был разработан люминометрический способ детекции пирофосфата [Nyren, Lundin, 1985], послуживший позднее основой для метода определения нуклеотидных последовательностей [Nyman, 1988], названного позже пиросеквенированием. Во времена фактического доминирования метода секвенирования по Сэнгеру характеризующийся меньшей производительностью и имеющий ряд ограничений метод пиросеквенирования казался некоторой экзотикой, и кто мог тогда подумать, что именно этому методу будет суждено в новом тысячелетии стать первым из группы высокопроизводительных методов полногеномного секвенирования ДНК новых поколений. Но оставим на время секвенирование ДНК и вновь «вернемся» в 1983 г.

В 1983 г. полимеразной цепной реакции как таковой еще нет, хотя, как считают некоторые, ПЦР

<sup>13</sup> На проходившем недавно в Уфе VI Симпозиуме «Белки и пептиды» в разговоре о методическом прошлом молекулярной биологии один из участников из Новосибирска - заместитель директора по научной работе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН В.А.Рихтер поведал о трудностях, которые им пришлось тогда преодолевать, поскольку, как выяснилось - именно он, работая ранее в Ташкенте, явился основным разработчиком данной радиоизотопной продукции для секвенирования ДНК, меченной фосфором  $^{33}\text{P}$ .

была фактически описана в 1971 г. [Kleppre et al., 1971], но довести начатое до конца тогда не удалось в силу разных причин, одна из которых олигонуклеотидные праймеры, точнее их массовое отсутствие. По воспоминаниям будущего Нобелевского лауреата 1993 г. К.Мюллиса [Mullis, 1990] в одну из апрельских ночей этого самого 1983 г., когда он ехал в свой небольшой загородный домик на севере Калифорнии проводить очередной уик-энд и размышлял за рулем о предстоящих экспериментах, ему пришла идея, как можно нарабатывать в больших количествах (амплифицировать в геометрической прогрессии) конкретные ограниченные олигонуклеотидными праймерами участки ДНК с помощью ДНК-полимеразы и дезоксинуклеотидтрифосфатов. Однако прошло много месяцев, прежде чем ему с коллегами удалось экспериментально подтвердить свое открытие. Причем поначалу большинство сослуживцев весьма скептически относились к его выдумке. Первая экспериментальная статья о применении ПЦР была опубликована только в декабре 1985 г. (отчасти из-за подачи заявок на патенты<sup>14</sup>) в журнале Science [Saiki et al., 1985]. В другой престижный журнал Nature К.Мюллис отправил теоретическую статью<sup>15</sup> о ПЦР и получил ответ, что статья принята быть не может, ввиду того, что носит технический характер и неоригинальна. После отказа эту же теоретическую статью К.Мюллис опять направил в журнал Science со своими комментариями в сопроводительном письме, поясняющими отличия этой статьи от предыдущей экспериментальной, принятой в тот момент к публикации в Science, и, тем не менее, она также была отклонена редакцией. Теоретическая статья о ПЦР увидела свет только в очередном томе продолжающейся серии Methods in Enzymology [Mullis, Faloona, 1987], причем в ней оказались поднятыми и даже решенными в первом

<sup>14</sup> На использование ПЦР американским патентным ведомством в то время были выданы два патента [US Patent # 4,683,195 и US Patent # 4,683,202], приведших к возможности коммерческого использования данной реакции и впоследствии неоднократно оспаривающихся (отчасти успешно), но здесь касаться этих вопросов не будем, поскольку непростая ситуация вокруг них является предметом скорее другой статьи.

<sup>15</sup> Теоретической ее называл сам К.Мюллис, хотя собственно чисто теоретической эту работу считать нельзя, поскольку в ней приводятся протоколы экспериментов для различных вариантов ПЦР, что тогда, впрочем, относилось больше к теории этой реакции.

приближении касающиеся особенностей этой реакции очень важные вопросы, получившие впоследствии серьезное развитие.

Как это ни удивительно, но научное сообщество довольно долго не могло оценить перспективность этой реакции. Наверное, это объяснялось и трудоемкостью выполнения ПЦР с использованием не выдерживающей высокотемпературного нагрева ДНК-полимеразы *Escherichia coli*, очередную порцию которой из-за этого требовалось добавлять в каждом новом цикле после этапа денатурации ампликонов, образовавшихся в предыдущем цикле. Только лишь после того, как в реакции стала использоваться термостабильная ДНК-полимераза из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* [Saiki et al., 1988], исключившая необходимость в начале каждого цикла добавлять свежую порцию фермента, ПЦР заняла подобающее ей место в методическом арсенале молекулярных биологов, оказав поистине революционизирующее влияние на всю медико-биологическую науку и практику.

За время использования ПЦР предложены многочисленные вариации этой реакции, которая практически безгранична в своих проявлениях и возможностях, что можно видеть из продолжающегося вала разнообразных работ методического плана по модификации и совершенствованию ПЦР. В качестве некоторых наиболее значимых вех (расставленных здесь по времени их первого появления) нужно упомянуть ПЦР в реальном времени [Higuchi et al., 1992; 1993; Lee et al., 1993], иммуно-ПЦР [Sano et al., 1992], микрофлюидную ПЦР [Northrup et al., 1993; Nakano et al., 1994; Koop et al., 1998], эмульсионную ПЦР [Oberholzer et al., 1995; Nakano et al., 2003], твердофазную ПЦР [Bing et al., 1996; Adessi et al., 2000], цифровую ПЦР [Vogelstein, Kinzler, 1999].

Фактически основные варианты ПЦР сейчас можно подразделить на три поколения этой реакции: ПЦР с детекцией по конечной точке; ПЦР в реальном времени; цифровая ПЦР, имеющих свое предназначение каждая. Так, ПЦР по конечной точке служит как для целей диагностики, так и для наработки целевых продуктов ПЦР, с которыми может вестись дальнейшая разнообразная работа. ПЦР в режиме реального времени задействована в ДНК-диагностике и в научных исследованиях для количественной оценки исходных копий амплифицируемых матриц, будь это фрагменты ДНК или молекулы РНК. Цифровая ПЦР пока только развивается и по своему предназначению несколько совпадает с ПЦР в реальном времени.

О некоторых трудностях обычной ПЦР при пробивании «себе дороги» выше мы уже упомянули,

а что касается ПЦР в реальном времени, то она появилась в методическом арсенале молекулярных биологов довольно неожиданно, хотя над ее разработкой активно трудились, поскольку она была весьма востребована и поэтому все же была ожидаема. Так, из воспоминаний Р.Хигучи [Gingeras et al., 2005] следует, что в конце 80-х годов перед ним и его коллегами стояла задача преобразовать ПЦР так, чтобы продукты амплификации можно было контролировать прямо в ходе самой реакции, не прибегая к помощи гель-электрофореза. Однако ими в течение ряда лет разрабатывался совершенно бесперспективный вариант такой детекции, и неизвестно сколько бы времени еще понадобилось для прогресса в данной области, если бы не помогла счастливая случайность, когда по ошибке<sup>16</sup> была проведена ПЦР в присутствии бромистого этидия, считающегося сильным ингибитором ДНК-полимеразы. Каково же было удивление экспериментаторов, когда после проведения электрофоретического разделения ампликонов они увидели, что на наработку целевых продуктов в присутствии бромиды этидия заметно не повлияло. Результатом этого ошибочного эксперимента стала разработка ПЦР в режиме реального времени, названной ими тогда кинетической [Higuchi et al., 1992; 1993] и повлекшей за собой создание нового типа ДНК-термоциклеров, оснащенных оптическим модулем и способными детектировать изменение флуоресценции реакционной смеси.

Цифровая ПЦР претерпела десятилетнее забвение и только в последние несколько лет стала набирать силу, хотя она и тогда была в состоянии обеспечить высокую точность подсчета исходных матриц в анализируемом образце вплоть до выявления различий, например, между 4 и 5 копиями мишени, тогда как ПЦР в реальном времени уверенно дифференцирует количества мишеней, отличающиеся между собой практически на порядки. Что касается остальных упомянутых выше вариантов ПЦР, то микрофлюидная и эмульсионная ПЦР тоже ощутили задержку «при старте», но в настоящее время очень бурно развиваются и у этих способов амплификации нуклеиновых кислот большое будущее, о котором будет говориться ниже. Твердофазная ПЦР, разработанная в середине 90-х гг., нашла применение в одном из вариантов секвенирования ДНК нового поколения, в виде так называемой «мостиковой» ПЦР также спустя более 10 лет [Wang et al., 2008]. В последние годы становится все более востребованной и иммуно-ПЦР<sup>17</sup>, малоизвестная

еще с 1992 г.

С разработкой ПЦР появилась принципиальная возможность выявлять последовательности нуклеотидов, представленные в анализируемых образцах в малом числе, что стимулировало исследователей, с одной стороны, продолжать работу над серьезным повышением (на порядки) чувствительности методов, направленных на детекцию специфичных участков нуклеиновых кислот без их амплификации *in vitro*, а с другой - разрабатывать новые методы амплификации, отличные от ПЦР. Причем некоторый бум вокруг этого пришелся на самый конец 80-х и начало 90-х гг., когда была разработана значительная часть ныне существующих и развивающихся методов. Так, первыми после ПЦР появились лигазная цепная реакция - ЛЦР [Wu, Wallace, 1989; Barany, 1991], самоподдерживающаяся репликация [Kwoh et al., 1989; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991] и амплификация смещением цепи [Walker et al., 1992; 1992a]. Позднее амплификация смещением цепи получила заметное развитие, дав начало ряду вариаций в виде амплификации по типу катящегося кольца с одним праймером или с двумя, превратив ее тем самым в рамификацию [Lizardi et al., 1998; Zhang et al., 1998]; в виде так называемой LAMP (Loop-mediated isothermal AMPLification) амплификации [Notomi et al., 2000]. Принцип смещения старой цепи ДНК работает и в методе, названном японскими авторами ICAN (Isothermal Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) [Horii et al., 2006; Mukai et al., 2007; Uemori et al., 2007]. На смещении цепей ДНК построен и метод изотермической линейной амплификации Ribo-SPIA, в котором тоже используется гибридный рибо/дезоксирiboолигонуклеотидный праймер [Kurn et al., 2005]. Также были разработаны разветвленная гибридационная проба [Urdea et al., 1987], технология циклирующей пробы [Duck et al., 1990], "AmpliProbe" [Yang et al., 1991]. Позже появился метод, названный Invader технологией [Hall et al., 2000; Lyamichev et al., 2000], особенностью которой является использование специальных инвазивной и гибридационной проб, образующих с мишенью висящий нуклеотид, в результате чего происходит расщепление олигонуклеотида и вовлечение образовавшегося фрагмента ДНК в новый цикл гибридазации и расщепления. Необходимо лишь заметить, что это неполный перечень разработанных к настоящему времени различных реакций амплификации и высокочувствительной детекции специфичных

<sup>16</sup> См. эпиграф к данной статье.

<sup>17</sup> Иммуно-ПЦР будет посвящена отдельная статья

(Чемерис и др.), которая появится в одном из ближайших номеров Биомики.

последовательностей нуклеиновых кислот.

Еще одной довольно производительной технологией изучения нуклеиновых кислот разных организмов ныне являются ДНК-чипы, но в 1983 г. их еще нет, хотя некий прообраз уже существует в виде так называемой дот-блот гибридизации [Kafatos et al., 1979], но до ДНК-чипов в их нынешнем понимании пока очень далеко. В конце 80-х гг. практически одновременно четыре исследовательские группы (две в Англии, одна в СССР и еще одна в Югославии) предложили различные варианты нового подхода к молекулярной гибридизации, ставившие целью разработать производительное и простое секвенирование ДНК с помощью ДНК-чипов [Лысов и др. 1988; Vains, Smith, 1988; Drmanac et al., 1989]. Однако серьезной конкуренции этот метод секвенирования другим подходам к этому важному процессу так пока и не составил, тем не менее ДНК-чипы сейчас довольно широко используются, о чем, в том числе, свидетельствует возникновение и существование множества фирм, специализирующихся на изготовлении разнообразных ДНК-чипов, весьма отличающихся по способам изготовления, по предназначению и принципам детекции гибридизационных сигналов. К вопросу использования ДНК-чипов в будущем мы еще позже вернемся.

Пожалуй, единственная технология обращения с нуклеиновыми кислотами (из взятых нами в рассмотрение и во многом определяющих прогресс в молекулярной биологии в последние десятилетия), уже существовавшая в 1983 г. и дошедшая до наших дней без особых или принципиальных изменений - это химический синтез дезоксирибоолигонуклеотидов. Начало ему было положено еще в середине 50-х гг. двадцатого столетия, когда впервые удалось синтезировать динуклеотид с природной фосфодиэфирной связью [Mitchelson, Todd, 1955]. Огромный вклад в дело химического синтеза олигонуклеотидных блоков с заданной последовательностью в 1960-70-ые гг. внес Нобелевский лауреат 1968 г. Г.Корана, которому вместе с коллегами пришлось преодолеть на этом пути многочисленные трудности. 60-е гг. были периодом фосфодиэфирного синтеза, который оказался непригоден для широкого использования из-за своей крайней медлительности, поскольку средняя скорость наращивания олигонуклеотидной цепи этим методом составляла одно звено в месяц. С появлением в начале 70-х гг. фосфит-триэфирного метода, скорость синтеза несколько возросла, однако, как было замечено в одной статье, синтез гена аланиновой тРНК требовал тогда 20 человеко-лет [Amarnath, Broom, 1977]. Но прошло 4 года

(всего!) и благодаря переходу к амидофосфитному методу синтеза с использованием полимерных носителей в виде твердой фазы и стабильных фосфорамидитных синтонов [Beaucage, Caruthers, 1981] фактически произошла революция в деле синтеза олигонуклеотидов. Благодаря использованию данных высокореакционных соединений трехвалентного фосфора, скорость синтеза и его эффективность возросли настолько, что один цикл синтеза, занимавший прежде целый месяц, сократился до нескольких минут на звено, а конечный выход олигонуклеотидов, достигших в длину 100 звеньев, приблизился к количественному. Сопровождавший новый синтез олигонуклеотидов процесс автоматизации [Alvarado-Urbina et al., 1981; Hunkapiller et al., 1984] превратил процесс получения олигонуклеотидов в довольно рутинную процедуру, что привело к широкому вовлечению олигонуклеотидов в молекулярно-биологические эксперименты. Безусловно, упрощенный синтез олигонуклеотидов поспособствовал появлению метода ПЦР, что в своих воспоминаниях отмечал К.Мюллис. Пожалуй, следует заметить, что до середины 80-х гг. в каталогах многих молекулярно-биологических фирм еще фигурировали комплекты несложного оборудования и наборы реактивов для самостоятельного ручного синтеза олигонуклеотидов. Разновидностью твердофазного синтеза олигонуклеотидов в 90-х гг. стали варианты последовательного присоединения мономерных звеньев на чипе с помощью фотолитографических масок или струйной технологии.

По существу, методология самого синтеза, пожалуй, больше не нуждается в каких-либо усовершенствованиях, полностью обеспечивая потребности молекулярных биологов и других исследователей в олигонуклеотидах заданной последовательности, причем достигающих довольно большой протяженности - до 150 звеньев<sup>18</sup> [LeProust et al., 2010]. Дополнительным доказательством совершенства технологии служит то, что олигонуклеотидный синтез в настоящее время с помощью автоматических синтезаторов ДНК способен осуществлять даже непрофессиональный химик. На плечи же высококлассных специалистов теперь легла задача по разработке методов синтеза различных модифицированных олигонуклеотидов и их производных, число коих выросло значительно и, несомненно, впредь будет продолжать расширяться. Множество фирм (в том числе, и в нашей стране) ведут заказной синтез олигонуклеотидов с наличием

<sup>18</sup> Конечно, хорошо бы было синтезировать с высоким выходом и гораздо более протяженные последовательности.

в них флуорохромов, разных функциональных групп, нетипичных азотистых оснований, измененных фосфодиэфирных или иных связей, а также химерных ДНК/РНК олигов, хотя долго не удавалось осуществить эффективный синтез риболигонуклеотидов. Показателем развития химии синтеза олигонуклеотидов является появившаяся возможность вести синтез в другом, чем всегда раньше, направлении - вместо  $3' \rightarrow 5'$  теперь можно синтезировать и в  $5' \rightarrow 3'$ , под который разработаны соответствующие синтоны и что в некоторых случаях бывает крайне важно.

С осени 2010 г. издательством Landes Bioscience стал издаваться журнал, посвященный исследованиям искусственной ДНК, который так и называется - "Artificial DNA: PNA & XNA"<sup>19</sup>, поскольку кроме стандартных ДНК / РНК (DNA / RNA) уже давно есть PNA (Peptide Nucleic Acid), LNA (Locked Nucleic Acid), также созданы и прочие аналоги: UNA (Unlocked Nucleic Acid), TNA (Treose Nucleic Acid), XNA (Xylo Nucleic Acid); GNA (Glycerol Nucleic Acid); HNA (Hexitol Nucleic Acid) и др. Ряд из них находят довольно широкое применение в молекулярной биологии. Наверное, будут появляться и другие искусственные нуклеиновые кислоты.

Опять возвращаясь к ферментативному секвенированию по Сэнгеру конца 70-х - начала 80-х гг., среди разнообразных имевших место трудностей следует отметить проблему с затравочными молекулами, которыми часто, помимо коротких (8-10 звеньев) синтезированных разными способами олигонуклеотидов, служили так называемые биологические праймеры, вырезаемые рестрикционными эндонуклеазами и бывшие частью подходящей природной ДНК. Поэтому прорыв в химическом синтезе олигонуклеотидов и их изготовление практически любой необходимой протяженности послужили расширению применения метода секвенирования ДНК по Сэнгеру. Другим важным моментом в нарастающем доминировании этого метода стало использование новой ДНК-полимеразы фага T7, получившей после некоторых химических и генно-инженерных модификаций этого фермента торговое наименование «секвенза» версий 1.0 и 2.0 и резко улучшившей построение новых цепей и удлинившей их чтение благодаря своей высокой процессивности [Tabor, Richardson, 1987; 1989]. Появление и развитие ПЦР также заметно повлияло на повышение

производительности определения нуклеотидных последовательностей, причем, благодаря ПЦР, секвенировать стало возможным без использования трудоемкого метода молекулярного клонирования, чем не преминули воспользоваться представители других биологических дисциплин, включая, например ботаников, зоологов, ставших применять секвенирование для проведения геносистематических исследований и ревизии существовавших филогенетических построений.

Но как бы то ни было, производительность секвенирования ДНК ферментативным методом с дидезокситерминаторами оставалась довольно низкой по сравнению с тем, что требовалось для секвенирования полных геномов разных организмов. Тем не менее, в 1988 г. была принята международная программа «Геном человека», ставившая целью к 2003 г. расшифровку всей его последовательности, оцениваемой в 3 млрд. пар оснований. Цель в первом приближении оказалась достигнутой несколько раньше [Lander et al. (International Human Genome Consortium), 2001]. Практически одновременно с международным консорциумом в Институте геномных исследований под руководством К.Вентера было завершено секвенирование еще одного (также составного - т.е. были секвенированы ДНК разных людей) генома человека [Venter et al., 2001]. Но раньше первым полностью секвенированным геномом свободноживущего организма стал геном бактерии *Haemophilus influenzae*, размер которого составил 1 миллион 830 тысяч 137 пар нуклеотидов [Fleischmann et al., 1995]. В выполнении данного проекта приняло участие 40 ученых из 4-х исследовательских центров США, но основная нагрузка выпала на долю сотрудников Института геномных исследований во главе с его директором К.Вентером. Несколько позже этой же группой авторов была определена полная последовательность ДНК археобактерии *Methanobacterium thermoautophicum* [Smith et al., 1997] и особенностью этого проекта было то, что в нем наряду с методом Сэнгера использовался и метод химической дегградации Максама-Гильберта, который в силу многих причин так и не стал высокопроизводительным, хотя японская фирма Seiko Instruments некоторое время производила робот, рассчитанный на автоматизированное проведение химических реакций для данного метода.

Еще одним достижением проекта «Геном человека» стало то, что он привел к целому ряду определенных улучшений процесса секвенирования ДНК и созданию новых более мощных моделей секвенаторов. Однако за все время существования

<sup>19</sup> Здесь под X в аббревиатуре XNA подразумеваются Xeno (т.е. неприродные) нуклеиновые кислоты, тогда как еще есть их Хуло-варианты.

метода секвенирования ДНК по Сэнгеру его производительность (не считая заметного улучшения процесса пробоподготовки) выросла хотя и существенно, но недостаточно. Так, длина чтения возросла с изначальных, меченных радиоизотопами и разделяемых в пластине геля (в четырех соседних дорожках) 100 нуклеотидов до почти 1000 флуоресцентно-меченных нуклеотидов в одном капилляре, а число последних в ряде моделей секвенаторов ДНК достигло 96. Итого в целом производительность секвенирования возросла менее, чем на 2 порядка. Конечно, можно еще и дальше увеличивать число капилляров, но предел возможностей электрофоретического разделения нуклеиновых кислот, обеспечивающих детекцию различий в один нуклеотид, уже достигнут и никакие ухищрения, включая даже применение пульсирующего гель-электрофореза (что уже было опробовано в конце 80-х - начале 90-х гг.), не способны сколько-нибудь ощутимо повысить эффективность этой процедуры. Ну, разве что еще на 10-15%, тогда как производительность секвенирования ДНК от первоначальной (от тысячи нуклеотидов на пластину геля) повышать необходимо было на 9-10 порядков при одновременном резком снижении стоимости процесса, и здесь для целей полногеномного секвенирования электрофоретические методы полностью себя исчерпали.

Удивительно, но на протяжении четверти века активного использования электрофоретических методов секвенирования ДНК очень немногочисленные работы были посвящены разработкам принципиально иных методов определения последовательности нуклеотидов, и буквально все экспериментаторы только и стремились, что улучшить ферментативный метод (главным образом) секвенирования ДНК, просто не задумываясь, что могут быть и какие-то иные способы узнавать последовательность нуклеотидов в ДНК и их следует активно разрабатывать. Это легко заметить, в том числе, из нашей монографии «Секвенирование ДНК» [Чемерис и др. 1999], в которой наибольшее внимание уделено ферментативному методу секвенирования ДНК по Сэнгеру, а альтернативные методы секвенирования ДНК упомянуты довольно коротко, фактически пропорционально их доле в общем потоке методических работ тех лет по секвенированию ДНК. Однако в 2003 г. в умах исследователей словно произошел прорыв и стали один за другим разрабатываться все новые методы секвенирования ДНК на первый взгляд, казалось бы, низкопроизводительные, но за счет возможности использования массивного параллелизма, в итоге

заметно обошедшие по общей скорости секвенирования классический метод ферментативного секвенирования с дидезокситерминаторами. При этом практически единственной страной, оценившей перспективность разработки новых методов секвенирования ДНК, и то какую они сулят прибыль в будущем, оказались США, где, начиная с 2004 г. через NHGRI - National Human Genome Research Institute в рамках Программы развития технологий секвенирования (Sequencing Technology Development Program) оказывается, в том числе, и государственная поддержка проектам нового секвенирования, которые были первоначально поделены на две основные категории. Проекты первой должны были обеспечить секвенирование генома человека за 100 тыс. долларов, а второй - за 1 тыс. долларов и эта сумма позволила бы всерьез говорить о персонализированной медицине будущего, что, помимо самого улучшения здоровья людей, предполагает еще и гигантский бизнес. Забегая вперед, можем сказать, что планка в тысячу долларов так пока и не преодолена.

Более перспективными, как и следовало ожидать, оказались неэлектрофоретические методы секвенирования, дающие возможность использовать массивный параллелизм реакций. И первым таким методом из так называемой группы NGS - Next Generation Sequencing стало обновленное пиросеквенирование, с помощью которого был за 4 часа<sup>20</sup> ресеквенирован [Margulies et al., 2005] небольшой (чуть более 580 тпн) геном бактерии *Mycoplasma genitalium*, секвенированный впервые в 1995 г., на что ушло тогда 4 месяца [Fraser et al., 1995]. С помощью пиросеквенирования в 2007 г. секвенирован первый индивидуальный геном человека ("Project Jim"), принадлежащий Нобелевскому лауреату 1962 г. Дж. Уотсону [Wheeler et al., 2008], причем был достигнут исторический рубеж в один миллион долларов на геном. Позднее было сообщено о завершении проекта по секвенированию генома неандертальца, также выполненного с помощью этой же технологии [Green et al., 2010].

Абсолютно не намереваясь сделать здесь некий обзор новых методов секвенирования ДНК, на некоторых все же остановимся чуть подробнее, только для того, чтобы показать принципиальные возможности определять последовательность нуклеотидов в ДНК весьма разными способами,

<sup>20</sup> На самом деле 4 часа шло само секвенирование в виде построения новых цепей ДНК-полимеразой и детекции протекания этого процесса, а подготовительная работа заняла несколько дней.

чтобы у читателя появилась полная уверенность, что совсем новое секвенирование ДНК будущего может быть совершенно иным, чем мы можем сейчас себе даже его представить.

Помимо пирофосфата при реакции расщепления дезоксинуклеотидтрифосфата и присоединения дезоксинуклеотидмонофосфата к растущей цепочке ДНК, выделяется протон, который также можно детектировать<sup>21</sup>. Этот неоптический подход к секвенированию ДНК, основанный на факте высвобождения протона при присоединении очередного дезоксинуклеотидмонофосфата, получил название полупроводникового секвенирования<sup>22</sup>, при котором регистрируются изменения рН, происходящие при высвобождении протона при полимеризации ДНК. Так, при каждом встраивании в ДНК одного нуклеотида (точнее миллионов одинаковых нуклеотидов в такое же количество идентичных матриц, располагающихся на микрошарики) происходит сдвиг рН на 0,02 единицы, что регистрируется специальными CMOS<sup>23</sup>-сенсорными чипами. Вне всякого сомнения, что у данной технологии хорошие перспективы развития и единственным недостатком остается все та же трудность секвенирования гомополимерных участков, что и в пиросеквенировании, от которых полупроводниковое секвенирование отличается лишь принципом регистрации событий в виде присоединения очередного нуклеотида. Относительно недавно сообщено [Rothberg et al., 2011] об успешном секвенировании с помощью полупроводниковой технологии генома другого известного человека - Г.Мура<sup>24</sup> - одного из основателей компании Intel и выведшего в 1965 г. некий закон развития микроэлектроники [Moore, 1965].

В качестве еще одного примера возможности использования разнообразных

приемов для секвенирования ДНК, ранее нереализованных, можно привести цикл работ других американских авторов, также решивших регистрировать некие изменения, происходящие в результате присоединения дезоксинуклеотидмонофосфата [Esfandyarpour, Davis, 2007; Esfandyarpour et al., 2008]. Поскольку при таком присоединении рвется макроэргическая связь, то в окружающую среду, помимо пирофосфата и протона, выделяется еще некоторое количество тепла и происходит локальный нагрев реакционных ячеек, что можно контролировать. Так, ими обнаружено, что при присоединении дезоксинуклеотидмонофосфата к цепям ДНК, пришитым к микрошарику, помещенному в микроячейку, происходит нагрев последней на несколько сотен микроградусов Кельвина, что специальные высокочувствительные пикокалориметры способны улавливать. Однако все тем же недостатком этого метода термосеквенирования ДНК является сложность определения последовательности нуклеотидов в гомополимерных участках ДНК.

В 2009-ом году появился другой революционно новый мономолекулярный метод чтения ДНК также с использованием ДНК полимеразы, но в отличие от остальных подходов, где на твердой фазе фиксировались нуклеиновые кислоты, здесь к подложке пришта сама ДНК полимеразы (Eid et al., 2009). Фактически секвенирование ведется в режиме настоящего времени. На дно специальных ячеек, расположенных на прозрачном стекле, прикрепляют одиночные молекулы ДНК-полимеразы. Область ничтожного размера, имеющая объем всего около 20 зептолитров ( $10^{-21}$  л) вокруг закрепленного фермента просвечивается с помощью специального лазера. Используются ДНТФ, меченые разными флуорохромами, причем последние присоединены не к азотистому основанию, а к остатку фосфорной кислоты в гамма-положении, который в процессе присоединения нуклеотида (дезоксинуклеотидмонофосфата) к цепи ДНК отщепляется и становится свободной молекулой в виде пирофосфата. Благодаря броуновскому движению, свободно «плавающие» молекулы ДНТФ и высвободившиеся пирофосфаты не задерживаются надолго в каждой точке и не оставляют сигнала, тогда как во время присоединения очередного комплементарного нуклеотида он на некоторое время (порядка долей секунды вместо микросекунд при обычной диффузии) удерживается ДНК-полимеразой и благодаря этому в сканируемой области удастся зарегистрировать сигнал при низком уровне фона. Ввиду того, что происходит

<sup>21</sup> Здесь, пожалуй, стоит заметить, что в 1992 г. японскими авторами была опубликована статья [Sakurai, Husimi, 1992], в которой они утверждали, что при присоединении к цепочке ДНК дезоксинуклеотидмонофосфата не выделяется, а поглощается протон, тем самым возможно «сбив с толку» на некоторое время других экспериментаторов, а так полупроводниковый метод секвенирования ДНК мог появиться бы и раньше.

<sup>22</sup> В данном номере журнала опубликована обзорная статья В.В.Зубова, посвященная детальному анализу полупроводникового секвенирования по Ротбергу.

<sup>23</sup> CMOS - Complementary Metal Oxide Semiconductor

<sup>24</sup> Ниже мы еще не один раз вернемся к Г.Муру и его закону.

построение обычной ДНК, то полимеразы способна построить до тысячи и более нуклеотидов, что отчасти снимает проблему чтения повторяющихся участков и позволяет вести секвенирование в режиме *de novo*. Интересное приложение данной технологии к определению метилированности азотистых оснований было продемонстрировано этими же авторами несколько позже [Flusberg et al., 2010; Fang et al., 2012]. Так, ими было показано, что при присоединении очередного азотистого основания - тимина время этого процесса сильно зависит от того находятся ли в соответствующем положении матрицы обычный аденин или его метилированный аналог (доли секунды против полутора секунд соответственно), что потенциально может найти применение для обнаружения модифицированных нуклеотидов, в том числе метилированных цитозинов, не прибегая к трудоемкой и несколько проблемной процедуре бисульфитного дезаминирования цитозиновых остатков.

В этой связи некоторое внимание необходимо уделить важному вопросу выявления метилированных цитозинов в геномной ДНК. О том, что в состав ДНК входит метилцитозин, известно очень давно. Еще в 1925 г. было обнаружено, что ДНК туберкулезных палочек (называемая тогда туберкулиновой кислотой) содержит 5-метилцитозин [Johnson, Coghill, 1925]. Позже бумажной хроматографией было показано, что, помимо цитозина, в кислотном гидролизате ДНК из тимуса телят обнаруживается его метильное производное, названное автором эпи-цитозином [Hotchkiss, 1948], исходя из принятого обозначения химических соединений, незначительно отличающихся по структуре, даже не подозревая об эпигенетической роли метилцитозина, которая станет известна гораздо позже. Хотя еще в 1942 г. англичанин К.Х. Уоддингтон опубликовал статью, в которой употребил не прижившийся термин «эпигенотип», отвечающий за развитие фенотипа из генотипа [Waddington, 1942]<sup>25</sup>, но тогда еще о роли ДНК как носительнице наследственной информации известно не было, и лишь спустя пару лет наследственная роль молекул ДНК была доказана элегантными экспериментами О.Эвери и его коллег [1944]<sup>26</sup>.

Впервые о возможной роли

метилированных цитозинов в функционировании генетического аппарата различных животных организмов заговорили отечественные ученые [Vanyushin et al., 1970]. В настоящее время уже не вызывает сомнений важная эпигенетическая роль метилированных цитозиновых остатков в проявлении транскрипционной активности у эукариот. Уже на протяжении ряда лет выполняется глобальный проект «Human Epigenome Project» и пополняется соответствующая база данных [Fingerman et al., 2013]. Тем не менее, имеющихся сведений явно недостает, и ощущается некоторое несовершенство применяемых методов для выявления метилированного / деметилированного статуса конкретных цитозинов. Предложенный в 1984 г. метод геномного секвенирования<sup>27</sup> [Church, Gilbert, 1984], основанный на избирательной химической деградации фрагментов ДНК, с последующей блот-гибридизацией, и его последующее усовершенствование [Saluz, Jost, 1986] были крайне сложны и не позволяли уверенно детектировать истинно метилированные и неметилированные цитозины. Метод, основанный на предобработке секвенируемого фрагмента ДНК метабисульфитом натрия [Frommer et al., 1992], превращающего обычные цитозины в урацилы, а метилированные - оставляющим без изменений, оказался довольно удобным и весьма продуктивным, ввиду чего предыдущие подходы к выявлению метилированных цитозинов с помощью тогдашнего геномного секвенирования ушли в прошлое. Здесь можно лишь заметить, что еще в 1948 г. Э.Чаргаффом и соавт. [Vischer, Chargaff, 1948] была отмечена конверсия цитозина в урацил при кислотном гидролизе нуклеиновых кислот. Однако вследствие неполной конверсии и некоторой избирательности амплификации тех или иных фрагментов или цепей ДНК в ходе ПЦР метод геномного бисульфитного секвенирования для обнаружения метилированных цитозинов все же пока остается довольно несовершенным.

Завершая краткое рассмотрение лишь небольшой части методов секвенирования ДНК новых поколений, нельзя не упомянуть так называемое нанопорное секвенирование, которое стало развиваться еще в середине 90-х гг. [Kasianowicz et al., 1996], было многообещающим, таким пока остается и поныне, несмотря на

<sup>25</sup> Нами прочитана перепечатка данной статьи, сделанная в 2012 г. через 70 лет после публикации оригинала - Waddington C.H. The Epigenotype // Int. J. Epidemiol. 2012. V.41. P.10-13.

<sup>26</sup> Эта статья также доступна в виде перепечатки 1995 г. в журнале Molecular Medicine.

<sup>27</sup> На самом деле не имеющий ничего общего с современным геномным секвенированием и названный тогда так, потому что для его проведения требовались фрагменты геномной ДНК (неклонированной и неамплифицированной, хотя последнюю тогда получать еще и не умели).

активную работу многих исследовательских групп в разных странах. Основной принцип нанопорного секвенирования заключается в прохождении под действием приложенного электрического поля молекул нуклеиновых кислот через отверстие нанометрового размера (которым могут быть природные отверстия в молекулах белка  $\alpha$ -гемоллизина диаметром 2,6 нм или белкаMspA, либо искусственные нанопоры, приготовленные из нитрида или оксида кремния, графена) в результате чего в момент прохождения различных азотистых оснований будет по-разному меняться просвет канала и изменяться ионный ток, который можно измерять и регистрировать. Причем по некоторым оценкам на прохождение одного нуклеотида через нанопору требуется около 10 наносекунд, что могло бы составить скорость секвенирования ДНК около 1 миллиона оснований за 0,1 секунды, но на самом деле это слишком быстро для регистрации изменений ионного тока и, потому процесс сознательно замедляют. В ряде работ, посвященных нанопорному секвенированию, использован другой подход для детекции прохождения не цельных молекул ДНК, а отщепленных экзонуклеазой мононуклеотидфосфатов [Astier et al., 2006]. Так, показано, что при этом удается распознавать не только 4 азотистых основания, но и метилированные цитозинового остатка [Clarke et al., 2009], что крайне важно для определения эпигенетического статуса отдельных генов (участков генома), причем весьма важным является то, что это возможно осуществлять без неоднозначного этапа обработки ДНК метабисульфитом. Однако скорость такого секвенирования сильно замедляется, поскольку ограничивается не временем прохождением цепочки ДНК или отдельных нуклеотидмонофосфатов через нанопору, а скоростью отщепления нуклеотидов экзонуклеазой, которая составляет около 300 нуклеотидов в секунду, что уже довольно медленно для высокопроизводительного геномного секвенирования.

Для того чтобы проследить характер удешевления стоимости секвенирования полных геномов за последние 12 лет, необходимо вернуться в 2001 г., когда было объявлено о завершении секвенирования в черновых вариантах двух геномов человека, выполненных международным консорциумом и Институтом геномных исследований под руководством К.Вентера. На первый проект ушло 13 лет (вместо планировавшихся 15 и изначально даже 17 лет) и приблизительно 3 млрд. долларов, из которых считается, что только около 300 млн. долларов пошло непосредственно на проведение секвенирующих процедур, поскольку много сил,

времени и денег консорциум затратил на поиск различных маркеров и построение генетических карт, как оказалось малонужное для САМОГО секвенирования<sup>28</sup>. Что касается проекта К.Вентера, то при его выполнении был применен передовой для того времени так называемый «shot-gun» или иначе «случайный» подход к секвенированию больших геномов, что позволило справиться с секвенированием генома человека всего за несколько лет, затратив около 100 млн. долларов. Причем, весьма показательно, что поначалу многие экспериментаторы использованный К.Вентером подход критиковали, но вскоре сами перешли на эту стратегию. Так, с помощью данного подхода к концу 2003 г. стоимость секвенирования генома млекопитающего, приблизительно равного по размеру человеческому, составила около 25 млн. долларов. В этот период единственным методом секвенирования полных геномов был метод Сэнгера. Дальнейшее снижение стоимости полногеномного секвенирования уже продолжалось с помощью разных методов новых поколений, когда были преодолены стоимостные планки на геном человека в 1 млн. долларов (2008 г., первое поколение NGS), в 100 тыс. долларов (2009 г., второе<sup>29</sup> поколение NGS) и 10 тыс. долларов (2011 г., третье поколение NGS).

Следует заметить, что темпы снижения стоимости секвенирования ДНК генома человека с 2001 г. до конца 2007 г. практически сопоставимы с тем, что происходит в микроэлектронике, для которой в середине 60-х годов прошлого столетия Г.Мур высказал предположение (получившее известность как «закон Мура»), что число транзисторов на кристалле будет удваиваться каждые два года, после того, как он подметил, что это происходит на протяжении нескольких лет [Moore, 1965]. И действительно эта тенденция сохраняется уже на протяжении более полувека. Но с начала 2008 г. кривая стоимости секвенирования

<sup>28</sup> Или даже совсем ненужное, тем более, что после завершения проекта «Геном человека» эти карты практически полностью потеряли свою актуальность ввиду ставшей доступной принципиально иной новой более точной информации в виде полной последовательности нуклеотидов всех хромосом, но это надо было еще вовремя понять!

<sup>29</sup> Деление методов полногеномного секвенирования, на относящиеся ко второму и третьему поколениям NGS, довольно условно, поскольку между ними нет ни четких временных градаций, ни резких отличий по производительности.

пошла резко вниз и к концу 2012 г. вместо того, чтобы согласно закону Мура уменьшиться за этот период приблизительно в 8 раз, она снизилась на два порядка и составила около 6 тыс. долларов.

Справедливости ради следует отметить, что в последние пару лет темпы снижения стоимости секвенирования несколько замедлились.

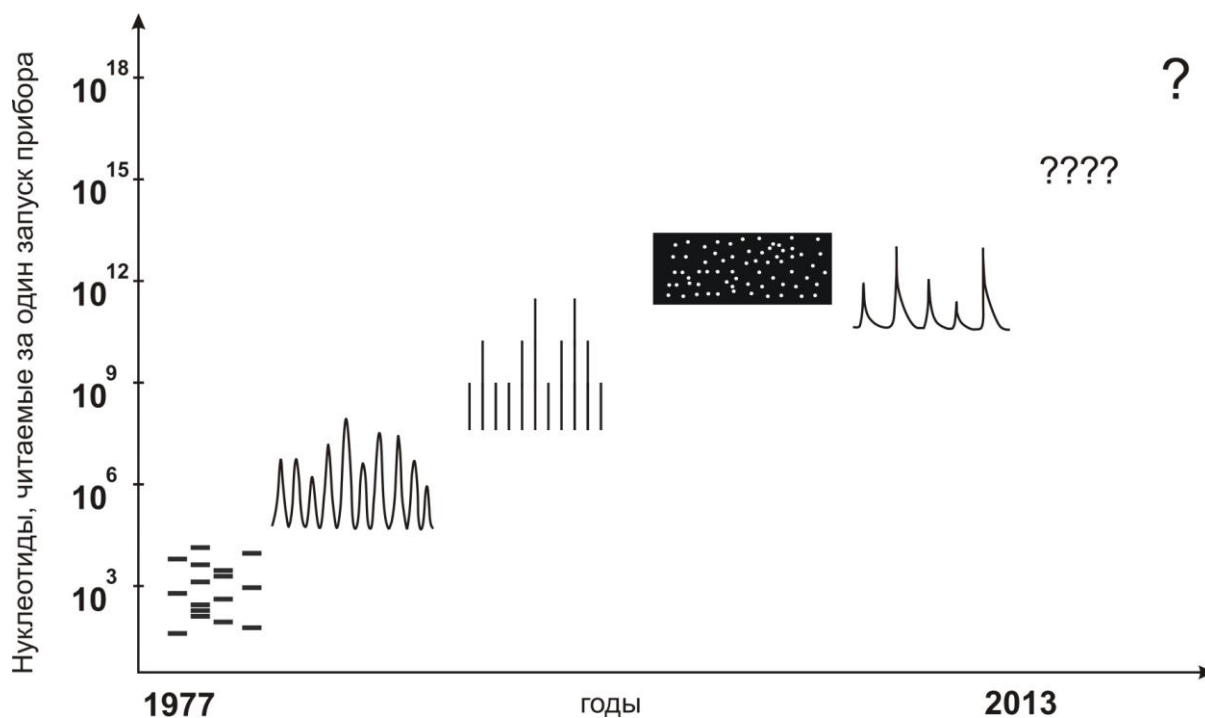


Рис. 1. Объединенный в пространстве и во времени обобщенный «портрет» некоторых технологий производительного секвенирования ДНК

Помимо общей стоимости секвенирования полных геномов, довольно важным показателем является производительность той или иной технологии секвенирования, выражающейся в количестве нуклеотидов, читаемых за один запуск какого-либо ДНК-секвенатора, что до некоторой степени характеризует трудоемкость процесса, основанного на используемом в нем конкретном методе<sup>30</sup>. Так, на рис. 1 отображены некоторые коммерчески реализованные методы секвенирования ДНК в стилизованном виде характерными (надеюсь, узнаваемыми) символами. Тем не менее, во избежание недоразумений назовем таковые. Самую низкую производительность из всех здесь приведенных имеет ручной метод секвенирования по Сэнгеру, представленный кусочком радиоавтографа пластины секвенирующего геля. За ним следует фрагмент записи, выдаваемой

автоматическим капиллярным ДНК-секвенатором, также определяющим последовательности нуклеотидов по методу Сэнгера. Далее представлены методы секвенирования ДНК новых поколений: пиросеквенирование в виде фрагмента типичной пираграммы, полупроводниковое секвенирование в виде всплесков нано рН-метра и между ними участок некоего чипа со светящимися флуоресцентными точками, который сразу символизирует несколько разных методов секвенирования ДНК новых поколений, впрочем, заметно отличающихся между собой по принципам и по производительности. Поскольку данный рисунок носит стилизованный схематичный характер, то приведенные на нем технологии не строго соответствуют годам и выдаваемому количеству информации. Мы преследовали цель показать тенденцию, при продолжении и развитии которой теоретически можно ждать появления новых технологий секвенирования нуклеиновых кислот с производительностью чтения за один запуск некоего ДНК-секвенатора будущего  $10^{15}$  нуклеотидов, что представляется более-менее

<sup>30</sup> Безусловно, общая стоимость секвенирования и производительность этого процесса являются взаимосвязанными вещами, но есть и некоторые отличия.

реальным, тогда над  $10^{18}$  мы поставили один большой вопрос, сомневаясь в возможности такового, хотя будем очень рады ошибиться. Впрочем, мы уже забежали несколько (или даже очень далеко) вперед, тогда как нас ждет еще только 2013 г.

Столь большое внимание, уделенное нами секвенированию ДНК, объясняется крайней важностью этой технологии для настоящего и тем более для будущего современной биологии, которое попытаемся представить в следующих главах. Фактически разработка нового метода секвенирования нуклеиновых кислот, характеризующегося сверхвысокой производительностью, точностью и дешевизной, коренным образом изменит всю биологическую науку, так как это не сможет сделать ни одна другая новая технология.

### 2013 г.

Наконец (здесь в статье) наступает 2013 г. Методам секвенирования ДНК уже три с половиной десятилетия. Срок немалый. Но прогресс - не просто большой, а гигантский. Из них правда четверть века ушла, главным образом, на всевозможное улучшение и повышение производительности ферментативного метода Сэнгера и его автоматизацию. В результате в начале 2000-х гг. оказался достигнут фактический «потолок» разрешающей способности данной технологии. Серьезных работ по дальнейшему улучшению метода Сэнгера уже давно не наблюдается. Тем не менее, этот метод в настоящее время продолжает использоваться, поскольку с его помощью решаются разнообразные каждодневные задачи, например, по проверке правильности состыковки различных фрагментов ДНК при создании различных генно-инженерных конструкций на предмет выяснения сохранения рамки считывания, уточнения ориентации вставки в векторе, ведется мелкомасштабное секвенирование отдельных ампликонов при определении полиморфизма ДНК и др. На завершающих этапах полногеномного секвенирования для стыковки некоторых контигов также применяется метод Сэнгера. И для всех этих случаев альтернативы данному методу пока не видно, несмотря на массовое появление многочисленных методов секвенирования ДНК, относимых к новым поколениям. Главная причина использования для таких задач метода Сэнгера - это плохая масштабируемость новых методов или точнее фактическое отсутствие таковой. Говоря другими словами, практически все ныне применяемые для секвенирования ДНК технологические платформы рассчитаны на получение информации сразу об очень большом количестве нуклеотидных последовательностей, и, если попытаться с помощью какого-либо полногеномного секвенатора определить

последовательность всего тысячи нуклеотидов, то остальная часть соответствующего чипа / проточной ячейки этого прибора и иного расходного материала будет потрачена впустую, а для некоторых моделей она составит и 100 и 200 и более потерянных гигабайт и соответственно немало денег.

### *Секвенирование ДНК (полногеномное) новых поколений*

К вопросу «Есть ли будущее у метода Сэнгера?» мы вернемся во второй части данной статьи в разделе, посвященном будущему современной биологии. А пока немного поговорим о возможностях разных методов полногеномного секвенирования. При этом опять напомним, что не ставим целью провести детальный обзор новых технологий секвенирования нуклеиновых кислот, поскольку этому должна быть посвящена самостоятельная статья. Тем более что различных подходов к секвенированию ДНК становится все больше. Многие рассчитаны только на ресеквенирование геномов с уже известной последовательностью, тогда как некоторые позволяют вести секвенирование *de novo*. По-другому все ныне используемые методы можно подразделить на три группы, исходя из происхождения секвенируемых молекул ДНК, под которым в этом случае понимается следующее. Так, в методе Сэнгера секвенируется некий пул одинаковых фрагментов ДНК, который образуется в результате молекулярного клонирования или путем амплификации с помощью ПЦР. Для части новых методов полногеномного секвенирования, составляющих по этому признаку вторую группу, матрицы также готовятся с помощью ПЦР, но среди них целое множество разных образцов и амплифицируются они независимо или с помощью эмульсионной ПЦР или твердофазной ПЦР (либо иными способами, включая амплификацию по типу катящегося кольца), обеспечивая массивный параллелизм реакций. И наконец, третья группа методов рассчитана на так называемое мономолекулярное секвенирование ДНК, когда определение (разными способами) последовательности азотистых оснований в единичных молекулах ведется также во множестве параллельно, но по отдельности. Каждая группа методов характеризуется своим стилем пробоподготовки и для некоторых она излишне сложна.

Другими свидетельствами большого разнообразия ныне существующих методов полногеномного секвенирования, относящихся к разным поколениям, могут служить как длина чтения, варьирующая от всего 10 до 1000 и более нуклеотидов, так и производительность секвенирующих платформ, обеспечивающих чтение от 10 мегабайт до 600 гигабайт

за вход. При этом нет прямой корреляции с протяженностью секвенируемых участков и общим количеством читаемых нуклеотидов за один запуск прибора. Продолжительность самого процесса секвенирования (без пробоподготовки) для разных платформ варьирует от 2 часов до 14 суток. Стоимость запуска (расходных материалов) для разных моделей секвенаторов и цена определения одного миллиона нуклеотидов также весьма сильно различаются - от 500 до 25 тысяч долларов и от 50 долларов до 5 центов соответственно<sup>31</sup>. Для сравнения можно привести нынешнюю стоимость подобных процедур для секвенирования по методу Сэнгера - соответственно 10 долларов и 1500 долларов<sup>32</sup> при том, что 96-ти капиллярный секвенатор через 2 часа работы выдаст информацию всего о 60 тысячах нуклеотидах. Правда точность секвенирования по Сэнгеру пока остается выше, чем у методов новых поколений, и считается, что для установления полной последовательности какого-либо генома этим методом формально достаточно 6-ти кратного покрытия, тогда как другими методами будет требоваться и 10-ти и даже 30-ти кратное покрытие, что определяется как длинами читаемых участков, так и увеличенным процентом возможных ошибок.

Как следует из информации на сайте National Human Genome Research Institute, на протяжении ряда лет внимательно отслеживающего стоимости ресеквенирования генома человека, в США в январе 2013 г. таковая составила всего 5671 доллар. Причем эта сумма (усредненная по нескольким секвенирующим центрам) включает в себя помимо стоимости пробоподготовки и расходных материалов на само секвенирование, еще амортизацию ДНК-секвенаторов, биоинформатическую составляющую, труд работников, административные расходы и прочие издержки в виде некоторых не прямых расходов. Что касается стоимости самих ДНК-секвенаторов, то следует заметить, что эти приборы весьма дороги. В России цены на них варьируют в пределах от 10 до

50 миллионов рублей. В этой связи можем заметить, что в России, насколько нам известно, наметилась тенденция к постройке своего геномного ДНК-секвенатора полупроводникового типа, который будет по целому ряду параметров не уступать и даже превосходить своих конкурентов, но при этом будет все же дешевле их, но потребует некоторое время на ожидание готовой продукции.

#### **Полные геномы свободноживущих организмов**

Как уже упоминалось выше, первый геном свободноживущего организма - бактерии *Haemophilus influenzae* был секвенирован в 1995 г. [Fleischmann et al., 1995], после чего последовало определение нуклеотидных последовательностей полных геномов других микроорганизмов, а затем и эукариотических организмов. На рис. 2 нами приведена диаграмма, отражающая рост числа полногеномных последовательностей для основных групп организмов (прокариот, архей, эукариот и отдельно человека) по настоящее время, из которой видно, что серьезный прогресс в выполнении таких проектов стал возможен благодаря появлению в 2005 г. методов секвенирования новых поколений. Необходимо заметить, что здесь нами приведена информация о числе секвенированных ГЕНОМОВ, а не видов организмов. Так, для разных групп организмов секвенированы геномы как видов, так и их отдельных представителей (штаммов, изолятов, сортов, индивидов и т.д.), что для тщательного подсчета таковых по отдельности (равно как и только самих видов) потребует столько усилий, что вряд ли будет для этой статьи оправдано.

Приведенные цифры по секвенированным геномам не являются абсолютно точными отчасти по причине того, что такая информация бывает разного толка. Например, публикуется статья, сообщающая о секвенировании полного генома (в том числе черного варианта) какого-нибудь организма, или вносится в базу данных последовательность какого-либо генома, и лишь спустя некоторое время может быть сообщено о полном завершении секвенирования этого организма, тогда как для другого, помимо черного варианта, финишного варианта может так и не появиться. Однако и в подобном случае уже имеющаяся информация покрывает практически весь геном, и его нуклеотидная последовательность может использоваться при полногеномном сравнении с другими родственными организмами. Более того, для эукариот, включая человека, геномы полностью до сих пор не секвенированы из-за технологических ограничений, по которым чтение протяженных повторяющихся участков пока остается практически недоступным.

<sup>31</sup> Стоимость тех или иных операций сознательно приведена нами в виде округленных цифр, а для грубой оценки затрат на них в России и перевода их долларов в наши рубли с учетом прибыли торгующих организаций, оплаты таможенных процедур и доставки (преимущественно на холоду) данные суммы необходимо увеличивать приблизительно раз в 40-60.

<sup>32</sup> Что составляет около 1,5 центов за десяток нуклеотидов, тогда как в начале 1990-х гг. стоимость определения только одного азотистого основания с помощью того же метода Сэнгера обходилась в доллар США.

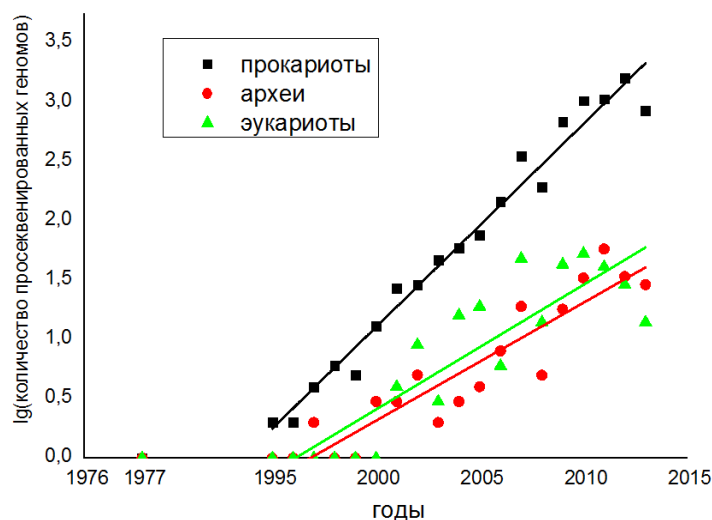


Рис. 2. Характер накопления информации о полногеномных последовательностях свободноживущих организмов (без учета 1092 геномов человека, секвенированных в рамках проекта 1000 геномов, и без учета около 30 геномов арабидопсиса, секвенированных при выполнении проекта 1001 геном арабидопсиса)

Считаем сделанные допущения не принципиальными, поскольку главной целью было отразить тенденцию секвенирования полных геномов по годам. Желающие могут сами произвести необходимый им (например, по штамму), подсчет полностью секвенированных геномов, используя web-ресурс - [www.genomesonline.org](http://www.genomesonline.org), курируемый DOE Joint Genome Institute (США).

Так, к середине 2013 г. согласно упомянутому выше ресурсу стали известны нуклеотидные последовательности полных геномов уже довольно большого числа видов свободноживущих организмов из всех ветвей Жизни - архей, прокариот и эукариот - 227, 6330 и 311 геномов, соответственно. Последняя группа объединяет организмы различных таксонов - простейшие, многоклеточные, грибы, мхи, плауны, водоросли, растения, насекомых, ракообразных, рыб, земноводных, пресмыкающихся, птиц, сумчатых, млекопитающих и человека. Еще более 20 тысяч геномов разнообразных организмов в настоящее время находятся на разных стадиях секвенирования. Среди них есть и наше скромное участие в виде шести секвенируемых геномов прокариот из родов *Halomonas*, *Phyllobacterium*, *Sinorhizobium*, *Bacillus* и *Paenibacillus*.

Самым крупным геномом, секвенирование которого завершается (включая и размеры всех ранее секвенированных геномов) стал геном гексаплоидной мягкой (хлебной) пшеницы *Triticum aestivum*, оцениваемый в 17 миллиардов пар оснований [Brenchley et al., 2012], что почти в шесть раз превышает размер человеческого генома. При

этом, конечно же, надо учитывать, что мягкая пшеница, имеющая геномную формулу **BAD**, состоит из трех независимых, хотя и родственных субгеномов **B**, **A** и **D**, принадлежащих *Aegilops speltoides* (субгеном **B** - предположительно), *Triticum urartu* (субгеном **A** - предположительно) и *Aegilops tauschii* (субгеном **D**). Причем геномы двух последних видов также секвенируются и уже получены их черновые варианты [Ling et al., 2013; Luo et al., 2013].

#### Прочие технологии исследования нуклеиновых кислот

Теперь кратко вспомним о некоторых других важных технологиях изучения нуклеиновых кислот. Так, в 2013 г. продолжается использование ПЦР по конечной точке, которая для целей диагностики являет собой уже уходящий способ, активно вытесняемый ПЦР в реальном времени, использующейся и в научных исследованиях для количественной оценки исходных копий амплифицируемых матриц, будь это фрагменты ДНК или молекулы РНК. В мире в настоящее время производится несколько сотен моделей обычных ДНК-термоциклеров и пока менее ста ДНК-термоциклеров с оптическим модулем для детекции протекающей амплификации в режиме реального времени<sup>33</sup>. Для цифровой ПЦР также

<sup>33</sup> Обзор практически всех производящихся ДНК-термоциклеров с оптическим модулем и цифровых ДНК-термоциклеров проведен нами ранее в специальной статье [Магданов и др., 2011], продолжение которой будет опубликовано в следующем номере журнала.

расширяется спектр производимого оборудования, равно как и растет применение этой реакции. Фактически цифровая ПЦР сейчас невозможна без или микрофлюидной или без эмульсионной ПЦР. Микрофлюидная ПЦР сама по себе становится все более и более разнообразной, хотя в виде коммерческих приборов для нее (если не считать оборудования для цифровой ПЦР) производятся совсем единичные модели. Иммуно-ПЦР все же недостаточно используется, хотя потенциал у реакции довольно большой. Аптамерные технологии также применяются довольно сдержанно. Помимо ПЦР, более-менее активно используются еще пара-тройка реакций амплификации нуклеиновых кислот. ДНК-чипы пока еще востребованы. Синтез олигонуклеотидов идет что называется «своим чередом», при этом постоянно увеличивается выбор модификаций для разных задач и целей. Стандартными хорошо отработанными методами ведутся разнообразные работы с рекомбинантной ДНК, хотя уже появились довольно революционные методы ускорения эволюции на молекулярном и даже организменном уровнях.

Немалое число исследователей продолжают упорно работать над новыми методическими приемами и технологиями, часть из которых

должны оправдать возлагаемые на них надежды в будущем, в том числе и недалеком.

#### **Послесловие к первой части статьи**

В этом далеко не кратком (или наоборот, очень кратком - как считать!) изложении в первой части статьи некоторых методов и технологий современной физико-химической биологии мы постарались подвести читателя к ожидаемым в уже близком будущем изменениям на поле медико-биологических наук, поскольку новое сверхвысокопроизводительное секвенирование полных геномов и полных транскриптомов затронет не только молекулярную биологию, а практически все биологические дисциплины. Ввиду того, что полная версия статьи получилась бы излишне большой, мы решили разделить ее на две логичные части, первая из которых посвящена прошлому и настоящему, тогда как вторая, нацеленная, главным образом, в будущее, будет делать и некоторые экскурсы назад в настоящее и прошлое. Вторая часть данной статьи, оглавление которой приведено ниже, и написание которой завершается, будет опубликована, мы надеемся, в очередном номере данного журнала.

#### **Оглавление второй части статьи**

##### **Предисловие ко второй части статьи**

**2014 - .... - 2030 гг.**

*Полногеномное секвенирование будущего*

*Перспективы использования полногеномного и полнотранскриптомного секвенирования*

*Количество полных геномов и транскриптомов к 2030 году*

*Биоинформатика*

*Archea и Procarya*

*Биоразнообразие высших организмов*

*ДНК-идентификация и ДНК-паспортизация личности*

*Синтетическая и системная биологии*

*Миниатюризация и прочее*

*«Китизация»*

*Экстракторы нуклеиновых кислот или начала начал 1870 год*

*Протеомные технологии*

##### **Заключение**

##### **Благодарности**

##### **Литература, цитированная во второй части статьи**

##### **Литература, цитированная в первой части статьи**

1. Гвоздев В.А. Фрэнсис Крик об исследованиях в области регуляции активности генов // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С.782-783.

2. Готтих Б.П. Стоит вспомнить не только прогнозы Ф. Крика // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С.772-776.

3. Дебабов В.Г. Жизнь в динамике // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С.789-789.

4. Зимницкий А.Н., Башкатов С.А., Уразбаев В.Н. Взаимодействие нуклеиновых кислот и гликанов

- // Биофизика. 2007. Т.52. С.443-451.
5. Иванов В.Т., Берлин Ю.А. Молекулярная биология в 2000 году: прогнозы, реальность и снова прогнозы // Биоорг. химия. 2000, Т. 26. С.752-755.
  6. Киселев Л.Л. Молекулярная биология от 1970 до 2000 и дальше // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С.767-771.
  7. Краев А.С., Ли Н.Н., Сидоров Ю.Д., Твердохлебов Е.Н. Новая пленка для регистрации секвенирующих гелей // Молекуляр. биология. 1992. Т.26. С.876-879.
  8. Крик Ф. Молекулярная биология в 2000 году // Природа. 1971. №7. С.42-45.
  9. Крик Ф. Молекулярная биология в 2000 году // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С.756-760.
  10. Куликов А.М., Вахитов В.А. Новый класс повторяющихся элементов в межгенном спейсере рДНК диплоидного эгилопса *Aegilops umbellulata* // Молекуляр. биология. 1995. Т.29. С.1166-1171.
  11. Лысов Ю.П., Флорентьев В.Л., Хорлин А.А., Храпко К.Р., Шик В.В., Мирзабеков А.Д. Определение нуклеотидной последовательности ДНК гибридизацией с олигонуклеотидами. Новый метод // ДАН СССР. 1988. Т.303. С.1508-1511.
  12. Навашин С. О диморфизме ядер в соматических клетках у *Galtonia candicans* // Изв. Имп. Акад. Наук. Сер. VI. 1912. №4. С.373-385.
  13. Навашин С. Гетеро- и идиохромозомы растительного ядра, как причина ядерного диморфизма некоторых видов растений, и значение ядерного диморфизма в процессе видообразования // Изв. Имп. Акад. Наук. Сер. VI. 1915. №17. С.1821-1834.
  14. Опарин А.И. Происхождение жизни. М., «Московский рабочий», 1924. 71 С.
  15. Поглазов Б.Ф. Некоторые замечания по поводу статьи Ф. Крика // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С.795-796.
  16. Разин С.В. Молекулярная биология на рубеже третьего тысячелетия // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С.790-793.
  17. Свердлов Е.Д. Фрэнсис Крик в его прогнозе на 2000 (Molecular Biology in the Year 2000) был почти абсолютно прав // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С.761-766.
  18. Северин Е.С. Физико-химическая биология в первой четверти XXI века // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С.777-778.
  19. Уотсон Дж.Д. Двойная спираль. Воспоминания об открытии структуры ДНК // М.: Мир, 1969. 144 С. или Уотсон Дж.Д. Двойная спираль. Воспоминания об открытии структуры ДНК // М.: "Регулярная и хаотическая динамика", 2001. 144 С.
  20. Чемерис А.В., Ахунув Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК / М.: Наука, 1999. 429 С.
  21. Энгельгардт В.А. К статье Ф.Крика «Молекулярная биология в 2000 году» // Природа. 1971. №7. С.46-48.
  22. Adamski J., Suhre K. Metabolomics platforms for genome wide association studies--linking the genome to the metabolome // Curr Opin Biotechnol. 2013. V. 24. P. 39-47.
  23. Adamski J. Genome-wide association studies with metabolomics // Genome Med. 2012. V. 4. P. 34.
  24. Akhunov E.D., Chemeris A.V., Kulikov A.M., Vakhitov V.A. Functional analysis of diploid wheat rRNA promoter by transient expression // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V.1522. P.226-229.
  25. Astier Y., Braha O., Bayley H. Toward single molecule DNA sequencing: direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter // J. Am. Chem. Soc. 2006. V.128. P.1705-1710.
  26. Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III // J. Exp. Med. 1944. V.79. P.137-158 (перепечатка - Mol. Med. 1995. V.1. P.344-365).
  27. Adessi C., Matton G., Ayala G., Turcatti G., Mermod J.J., Mayer P., Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms // Nucleic Acids Res. 2000. V.28. E87.
  28. Alvarado-Urbina G., Sathe G.M., Liu W.C., Gillen M.F., Duck P.D., Bender R., Ogilvie K.K. Automated synthesis of gene fragments // Science. 1981. V.214. P.270-24.
  29. Amarnath V., Broom A.D. Chemical synthesis of oligonucleotides // Chem. Rev. 1977. V.77. P.183-217.
  30. Baaske P., Weinert F.M., Duhr S., Lemke K.H., Russell M.J., Braun D. Extreme accumulation of nucleotides in simulated hydrothermal pore systems // Proc Natl Acad Sci U S A. 2007. V. 104. P. 9346-9351.
  31. Bains W., Smith G.C. A novel method for nucleic sequence determination // J. Theor. Biol. 1988. V.135. P.303-307.
  32. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991. V.88. P.189-193.
  33. Beaucage S.L., Caruthers M.H.

- Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis // *Tetrahedron Lett.* 1981 V.22. P.1859-1862.
34. Bell D.C., Thomas W.K., Murtagh K.M., Dionne C.A., Graham A.C., Anderson J.E., Glover W.R. DNA base identification by electron microscopy // *Microsc Microanal.* 2012. V. 18. P. 1049-1053.
35. Bing D.H., Boles C., Rehman F.N., Audeh M., Belmarsh M., Kelley B., Adams C.P. Bridge amplification: A solid phase PCR system for the amplification and detection of allelic differences in single copy genes // In: Genetic Identity Conference Proceeding, Seventh International Symposium on Human Identification. Promega Corporation. 1996.
36. Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker GL, D'Amore R, Allen AM, McKenzie N, Kramer M, Kerhornou A, Bolser D, Kay S, Waite D, Trick M, Bancroft I, Gu Y, Huo N, Luo MC, Sehgal S, Gill B, Kianian S, Anderson O, Kersey P, Dvorak J, McCombie WR, Hall A, Mayer KF, Edwards KJ, Bevan MW, Hall N. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing // *Nature.* 2012. V.491. P.705-710.
37. Britten R.J., Kohne D.E. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms // *Science.* 1968. V.161. P. 529-540.
38. Caruthers M.H. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses // *Science.* 1985. V.230. P.281-285.
39. Chargaff E. What really is DNA? Remarks on the changing aspects of a scientific concept // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* (Davidson J.N., Cohn W.E., eds.) 1968. V.8. P.297-333.
40. Church G.M., Gilbert W. Genomic sequencing // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 1991-1995.
41. Clarke J., Wu H.C., Jayasinghe L., Patel A., Reid S., Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing // *Nat. Nanotechnol.* 2009. V.4. P.265-270.
42. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973. V.70. P.3240-3244.
43. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification // *Nature.* - 1991. - V.350. - P.91-92.
44. Crick F. On protein synthesis // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1958. V.12. P.138-163.
45. Crick F.H. The origin of the genetic code // *J. Mol. Biol.* 1968. V.38. P.367-79.
46. Crick F. Central dogma of molecular biology // *Nature.* 1970. V.227. P.561-563.
47. Crick F. Molecular biology in the year 2000 // *Nature.* 1970. V.228. P.613-615.
48. Doelling J.H., Gaudino R.J., Pikaard C.S. Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* rRNA gene and spacer promoters in vivo and by transient expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V.90. P.7528-7532.
49. Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I., Crkvenjakov, R. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method // *Genomics.* 1989. V.4. P.114-1128.
50. Duck P., Alvarado-Urbina G., Burdick B., Collier B. Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides // *BioTechniques.* 1990. V. 9. P. 142-148.
51. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, Peluso P, Rank D, Baybayan P, Bettman B, Bibillo A, Bjornson K, Chaudhuri B, Christians F, Cicero R, Clark S, Dalal R, Dewinter A, Dixon J, Foquet M, Gaertner A, Hardenbol P, Heiner C, Hester K, Holden D, Kearns G, Kong X, Kuse R, Lacroix Y, Lin S, Lundquist P, Ma C, Marks P, Maxham M, Murphy D, Park I, Pham T, Phillips M, Roy J, Sebra R, Shen G, Sorenson J, Tomaney A, Travers K, Trulson M, Vieceli J, Wegener J, Wu D, Yang A, Zaccarin D, Zhao P, Zhong F, Korf J, Turner S. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules // *Science.* 2009. V.323. P.133-138.
52. Ertem G., Prabakar K.J., Joshi P.C., Ferris J.P. Bridging the prebiotic and RNA worlds: prebiotic RNA synthesis on clay // *J. Biomolecular Structure and Dynamics.* 2000. V. 11. P. 207-210.
53. Esfandyarpour H., Davis R.W. An integrated differential nanocalimeter with on-chip microfluidic multiplexing for high throughput genomics and proteomics // 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 3 - 7 October 2010, Groningen. P.1349-1351.
54. Esfandyarpour H., Zheng B., Pease R.F., Davis R.W. Structural optimization for heat detection of DNA thermosequencing platform using finite element analysis // *Biomicrofluidics.* 2008. V.2. P.24102.
55. Fang G, Munera D, Friedman DI, Mandlik A, Chao MC, Banerjee O, Feng Z, Losic B, Mahajan MC, Jabado OJ, Deikus G, Clark TA, Luong K, Murray IA, Davis BM, Keren-Paz A, Chess A, Roberts RJ, Korf J, Turner SW, Kumar V, Waldor MK, Schadt EE. Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic *Escherichia coli* using single-molecule real-time sequencing // *Nat. Biotechnol.* 2012. V.30. P.1232-1239. Erratum in *Nat. Biotechnol.* 2013. V.31. P.566.

56. Ferris J.P., Hill A.R. Jr., Liu R., Orgel L.E. Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces // *Nature*. 1996. V. 381. P. 59-61.
57. Feynman R.P. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics // *Engineering and Science* (California Institute of Technology). 1960. V.23. P.22-36.
58. Fingerman I.M., Zhang X., Ratzat W., Husain N., Cohen R.F., Schuler G.D. NCBI Epigenomics: what's new for 2013 // *Nucleic Acids Res.* 2013. V.41 (Database issue). D221-225.
59. Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J-F., Dougherty B.A., Merrick J.M., McKenney K., Sutton G., Fitz H.W., Fields C., Gocayne J.D., Scott J., Shirley R., Liu L-I, Glodek A., Kelley J.M., Weidman J.F., Phillips C.A., Spriggs T., Hedblom E., Cotton M.D., Utterback T.R., Hanna M.C., Nguyen D.T., Saudek D.M., Brandon R.C., Fine L.D., Fritchman J.L., Geoghagen N.S.M., Gnehm C.L., McDonald L.A., Small K.V., Fraser C.M., Smith H.O., Venter J.C. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd // *Science*. 1995. V.269. P.496-512.
60. Flusberg B.A., Webster D.R., Lee J.H., Travers K.J., Olivares E.C., Clark T.A., Korlach J., Turner S.W. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing // *Nat. Methods*. 2010. V.7. P.461-465.
61. Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D., Bult C.J., Kerlavage A.R., Sutton G., Kelley J.M., Fritchman J.L., Weidman J.F., Small K.V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T.R., Saudek D.M., Phillips C.A., Merrick J.M., Tomb J-F., Dougherty B.A., Bott K.F., Hu P-C., Lucier T.S., Peterson S.N., Smith H.O., Hutchinson C.A., III, Venter J.C. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium* // *Science*. 1995. V.270. P.397-403.
62. Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V.89. P.1827-1831.
63. Gingeras T.R., Higuchi R., Kricka L.J., Lo Y.M., Wittwer C.T. Fifty years of molecular (DNA/RNA) diagnostics // *Clin. Chem.* - 2005. - V.51. - P.661-671.
64. Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH, Hansen NF, Durand EY, Malaspina AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prüfer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Höber B, Höffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Z, Gusic I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PL, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Pääbo S. A draft sequence of the Neandertal genome // *Science*. 2010. V.328. P.710-722.
65. Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwoh D.Y., Barringer K.J., Richman D.D., Gingeras T.R. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1990. - V.87. - P.1874-1878. – Erratum - Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwoh D.Y., Barringer K.J., Richman D.D., Gingeras T.R. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V.87. P.7797.
66. Hall J.G., Eis P.S., Law S.M., Reynaldo L.P., Prudent J.R., Marshall D.J., Allawi H.T., Mast A.L., Dahlberg J.E., Kwiatkowski R.W., de Arruda M., Neri B.P., Lyamichev V.I. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 8272-8277.
67. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences // *Biotechnology*. 1992. V.10. P.413-417.
68. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions // *Biotechnology*. 1993. V.11. P.1026-1030.
69. Horii T., Monji A., Uemura K., Nagura O. Rapid detection of fluoroquinolone resistance by isothermal chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids from clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* // *J. Microbiol. Methods*. 2006. V. 65. P. 557-561.
70. Hotchkiss R.D. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography // *J. Biol. Chem.* 1948. V. 175. P. 315-332.
71. Hunkapiller M., Kent S., Caruthers M., Dreyer W., Firca J., Giffin C., Horvath S., Hunkapiller T., Tempst P., Hood L. A microchemical facility for the analysis and synthesis of genes and proteins // *Nature*. 1984. V.310. P.105-111.
72. Hyman E.D. A new method of sequencing DNA // *Anal. Biochem.* 1988. V.174. P.423-436.
73. Jackson D.A., Symons R.H., Berg P. Biochemical method for inserting new genetic

- information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1972. V.69. P.2904-2909.
74. Johnson T.B., Coghill R.D. Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus // *J. Biol. Chem.* 1925. V.47. P.2838-2844.
75. Kafatos F.C., Jones C.W., Efstratiadis A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure // *Nucleic Acids Res.* 1979. V.7. P.1541-1552.
76. Kasianowicz J.J., Brandin E., Branton D., Deamer D.W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V.93. P.13770-13773.
77. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases // *J. Mol. Biol.* 1971. V.56. P.341-361.
78. Koop M.U., Mello A.J., Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip // *Science*. 1998. V.280. P.1046-1048.
79. Kurn N., Chen P., Heath J.D., Kopf-Sill A., Stephens K.M., Wang S. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification systems for highly multiplexed applications // *Clin. Chem.* 2005. V.51. P.1973-1981.
80. Kwoh D.Y., Davis G.R., Whitfield K.M., Chappelle H.L., DiMichele L.J., Gingeras T.R. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V.86. P.1173-1177.
81. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., и еще более 300 авторов - International Human Genome Sequencing Consortium Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature*. 2001. V.409. P.860-921.
82. Lee L.G., Connell C.R., Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 3761-3766.
83. Lenski R.E., Ofria C., Collier T.C., Adami C. Genome Complexity, Robustness, and Genetic Interactions in Digital Organisms // *Nature*. 1999. V.400. P.661-664.
84. Lenski R.E., Ofria C., Pennock R.T., Adami C. The Evolutionary Origin of Complex Features // *Nature*. 2003. V.423. P.139-145.
85. LeProust E.M., Peck B.J., Spirin K., McCuen H.B., Moore B., Namsaraev E., Caruthers M.H. Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process // *Nucleic Acids Res.* 2010. V.38. P.2522-2540.
86. Ling HQ, Zhao S, Liu D, Wang J, Sun H, Zhang C, Fan H, Li D, Dong L, Tao Y, Gao C, Wu H, Li Y, Cui Y, Guo X, Zheng S, Wang B, Yu K, Liang Q, Yang W, Lou X, Chen J, Feng M, Jian J, Zhang X, Luo G, Jiang Y, Liu J, Wang Z, Sha Y, Zhang B, Wu H, Tang D, Shen Q, Xue P, Zou S, Wang X, Liu X, Wang F, Yang Y, An X, Dong Z, Zhang K, Zhang X, Luo MC, Dvorak J, Tong Y, Wang J, Yang H, Li Z, Wang D, Zhang A, Wang J. Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu* // *Nature*. 2013. V.496. P.87-90.
87. Liu G.E., Bickhart D.M. Copy number variation in the cattle genome // *Funct. Integr. Genomics*. 2012. V.12. P609-624.
88. Lizardi P.M., Huang X., Zhu Z., Bray-Ward P., Thomas D.C., Ward D.C. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification // *Nat. Genet.* 1998. V.19. P. 225-232.
89. Luckey J.A., Drossman H., Kostichka A.J., Mead D.A., D' Cunha J., Norris T.B., Smith L.M. High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis // *Nucl. Acids Res.* 1990. V.18. P.4417-4421.
90. Luo MC, Gu YQ, You FM, Deal KR, Ma Y, Hu Y, Huo N, Wang Y, Wang J, Chen S, Jorgensen CM, Zhang Y, McGuire PE, Pasternak S, Stein JC, Ware D, Kramer M, McCombie WR, Kianian SF, Martis MM, Mayer KF, Sehgal SK, Li W, Gill BS, Bevan MW, Simková H, Dolezel J, Weining S, Lazo GR, Anderson OD, Dvorak J. A 4-gigabase physical map unlocks the structure and evolution of the complex genome of *Aegilops tauschii*, the wheat D-genome progenitor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V.110. P.7940-7945.
91. Lyamichev V.I., Kaiser M.W., Lyamicheva N.E., Vologodskii A.V., Hall J.G., Ma W.P., Allawi H.T., Neri B.P. Experimental and theoretical analysis of the invasive signal amplification reaction // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 9523-9532.
92. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H,

- Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // Nature. 2005. V.437. P.376-380.
93. Matteucci M.D., Caruthers M.H. Studies on nucleotide chemistry IV. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V.103 P.3185-3191.
94. Maxam A.M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V.74. P.560-564.
95. McKusick V.A., Ruddle F.H. A new discipline, a new name, a new journal // Genomics, 1987, V.1, P.1-2.
96. Michelson A.M., Todd A.R. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage // J. Chem. Soc. 1955. P.2632-2638. DOI: 10.1039/JR9550002632
97. Moore G.E. Cramming more components onto integrated circuits // Electronics. 1965. V. 38. P. 114-117.
98. Mukai H., Uemori T., Takeda O., Kobayashi E., Yamamoto J., Nishiwaki K., Enoki T., Sagawa H., Asada K., Kato I. Highly efficient isothermal DNA amplification system using three elements of 5'-DNA-RNA-3' chimeric primers, RNaseH and strand-displacing DNA polymerase // J.Biochem. 2007. V. 142. P. 273-281.
99. Mullis K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction // Sci. Am. 1990. V.262. P.56-61, 64-65.
100. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction // Methods Enzymol. 1987. V.155. P.335-350.
101. Nakano H., Matsuda K., Yohda M., Nagamune T., Endo I., Yamane T. High speed polymerase chain reaction in constant flow // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. V.58. P.349-352.
102. Nakano M., Komatsu J., Matsuura S., Takashima K., Katsura S., Mizuno A. Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion // J. Biotechnol. 2003. V.102. P.117-124.
103. Navashin M. "Amphiplastie" - eine neue Karyologische Erscheinung // Ztschr. ind. Abst. und Vererbungslehre. - 1928. - V.2. - Suppl. - S.1148-1152. (русский перевод — М.С. Навашин "Амфипластия" - новое кариологическое явление // В кн.: Проблемы кариологии и цитогенетики в исследованиях на видах рода *Crepis*. - М.: Наука. 1985. С.108-111.)
104. Northrup M.A., Ching M.T., White R.M., Watson R.T. DNA amplification with a microfabricated reaction chamber / In Transducers'93: The 7th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators. June 7-10, 1993, Yokohama, Japan. 1993. P. 924-926. [цит. по Daniel J.H., Iqbal S., Millington R.B., Moore D.F., Lowe C.R., Leslie D.L., Lee M.A., Pearce M.J. Silicon microchambers for DNA amplification // Sensors and Actuators A. 1998. V. 71. P. 81-88].
105. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. E63.
106. Nyren P., Lundin A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis // Anal. Biochem. 1985. V.151. P.504-509.
107. Oberholzer T., Albrizio M., Luisi P.L. Polymerase chain reaction in liposomes // Chem Biol. 1995. V.2. P.677-682.
108. Orgel L.E. Evolution of the genetic apparatus // J. Mol. Biol. 1968. V.38. P.381-93.
109. Reeder R.H. Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants // J. Cell. Biol. 1985. V.101. P.2013-2016.
110. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA, Huber M, Branciforte JT, Stoner IB, Cawley SE, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, Sabina J, Feierstein E, Schorn M, Alanjary M, Dimalanta E, Dressman D, Kasinskas R, Sokolsky T, Fianza JA, Namsaraev E, McKernan KJ, Williams A, Roth GT, Bustillo J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing // Nature. 2011. V.475. P.348-352.
111. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. 1988. V.239. P.487-491.
112. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Ibid. 1985. V.230. P.1350-1354.
113. Sakurai T., Husimi Y. Real-time monitoring of DNA polymerase reactions by a micro ISFET pH sensor // Anal Chem. 1992. V.64. P.1996-1997.
114. Saluz H., Jost J.P. Optimized genomic sequencing as a tool for the study of cytosine

- methylation in the regulatory region of the chicken vitellogenin II gene // *Gene*. 1986. V.42. P.151-157.
115. Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F., Petersen, G.B. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\lambda$  DNA // *J. Mol. Biol.* 1982. V.162. P.729-773.
116. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V.74. P.5463-7.
117. Sano T., Smith C., Cantor C.R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates // *Science*. 1992. V.258. P.120-122.
118. Sealey P.G., Southern E.M. Gel electrophoresis of DNA // In: *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids. A practical approach*. IRL Press. Oxford, 1982. - P.39-76.
119. Smith D.R., Doucette-Stamm L.A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Safer H., Patwell D., Prabhakar S., McDougall S., Shimer G., Goyal A., Pietrokovski S., Church G.M., Daniels C.J., Mao J-I., Rice P., Nolling J., Reeve J.N. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautrophicum*  $\Delta$ H: Functional analysis and comparative genomics // *J. Bacteriol.* 1997. V.179. P.7135-7155.
120. Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connel C.R., Heiner C., Kent S.B.H., Hood L.E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis // *Nature*. 1986. V.321. P.674-679.
121. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.* 1975. V.98. P.503-517.
122. Southern E.M., Maskos U., Elder J.K. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models // *Genomics*. 1992. V.13. P. 1008-1017.
123. Tabor S., Richardson C.C. Selective oxidation of the exonuclease domain of bacteriophage T7 DNA polymerase // *J. Biol. Chem.* 1987a. V.262. P.15330-15333.
124. Tabor S., Richardson C.C. Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7 DNA polymerase by in vitro mutagenesis // *J. Biol. Chem.* 1989. V.264. P.6447-6458.
125. Tanaka H., Kawai T. Partial sequencing of a single DNA molecule with a scanning tunnelling microscope // *Nature Nanotechnol.* 2009. V.4. P.518-522.
126. Thomas W.K, Glover W. Direct sequencing by TEM of Z-substituted DNA molecules / *Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*. M.Janitz (ed.). 2008. P.103-116.
127. Uemori T., Mukai H., Takeda O., Moriyama M., Sato Y., Hokazono S., Takatsu N., Asada K., Kato I. Investigation of the molecular mechanism of ICAN, a novel gene amplification method // *J.Biochem.* 2007. V.142. P.283-292.
128. Urdea M., Running J., Horn T., Clyne J., Ku L.L., Warner B.D. A novel method for the rapid detection of specific nucleotide sequences in crude biological samples without blotting or radioactivity; application to the analysis of hepatitis B virus in human serum // *Gene*. 1987. V. 61. P. 253-264.
129. Vanyushin B.F., Tkacheva S.G., Belozersky A.N. Rare bases in animal DNA // *Nature*. 1970. V. 225. P. 948-949.
130. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfankoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon

- M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome // *Science*. 2001. V.291. P.1304-1351. Erratum in: *Science*. 2001. V.292. P.1838.
131. Vischer E., Chargaff E. Studies on the composition of nucleic acids // *Fed Proc*. 1948. V. 7. P. 197.
132. Vogelstein B., Kinzler K.W. Digital PCR // *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 9236-9241.
133. Waddington C.H. The epigenotype // *Endeavour*. 1942. 1. P.18-20. (перепечатка - Waddington C.H. The epigenotype // *Intern. J. Epidemiol*. 2012. V.41. P.10-13.)
134. Walker G.T., Fraiser M.S., Schram J.L., Little M.C., Nadeau J.G., Malinowski D.P. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique // *Nucleic Acids Res*. 1992. V. 20. P.1691-1696.
135. Walker G.T., Little M.C., Nadeau J.G., Shank D.D. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992a. V. 89. P. 392-396.
136. Wang J, Wang W, Li R, Li Y, Tian G, Goodman L, Fan W, Zhang J, Li J, Zhang J, Guo Y, Feng B, Li H, Lu Y, Fang X, Liang H, Du Z, Li D, Zhao Y, Hu Y, Yang Z, Zheng H, Hellmann I, Inouye M, Pool J, Yi X, Zhao J, Duan J, Zhou Y, Qin J, Ma L, Li G, Yang Z, Zhang G, Yang B, Yu C, Liang F, Li W, Li S, Li D, Ni P, Ruan J, Li Q, Zhu H, Liu D, Lu Z, Li N, Guo G, Zhang J, Ye J, Fang L, Hao Q, Chen Q, Liang Y, Su Y, San A, Ping C, Yang S, Chen F, Li L, Zhou K, Zheng H, Ren Y, Yang L, Gao Y, Yang G, Li Z, Feng X, Kristiansen K, Wong GK, Nielsen R, Durbin R, Bolund L, Zhang X, Li S, Yang H, Wang J. The diploid genome sequence of an Asian individual // *Nature*. 2008. V.456. P.60-65.
137. Watson J.D., Crick F.H.C. A structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature*. 1953. V.171. P.737-738.
138. Watson J.D., Crick F.H.C. Genetic implication of the structure of deoxyribonucleic acid // *Nature*. 1953a. V.171. P.964-967.
139. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing // *Nature*. 2008. V.452. P.872-876.
140. Westerhoff H.V. Systems biology left and right // *Methods Enzymol*. 2011. V. 500:P. 3-11.
141. Westerhoff H.V., Palsson B.O. The evolution of molecular biology into systems biology // *Nat Biotechnol*. 2004. V. 22. P. 1249-1252.
142. Wu D.Y., Wallace R.B. The ligation amplification reaction (LAR)--amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation // *Genomics*. 1989. V.4. P.560-569.
143. Yang J.Q., Tata P.V., Park-Turkel H.S., Waksal H.W. The application of AmpliProbe in diagnostics // *Biotechniques*. 1991. V. 11. P. 392-397.
144. Yoshida K. A highly simplified horizontal electrophoretic apparatus including a handmade power supply and its application // *Anal Biochem*. 1983. V. 130. P. 246-259. Zhang D.Y., Brandwein M., Hsuih T.C., Li H. Amplification of target-specific, ligation-dependent circular probe // *Gene*. 1998. V.211. P.277-285.
145. Zimnitskii A.N. (2012). Concept of Template Synthesis of Proteoglycans, The Complex World of Polysaccharides, Dr. Desiree Nedra Karunaratne (Ed.), ISBN: 978-953-51-0819-1, InTech, DOI: 10.5772/48085. Available from: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/concept-of-template-synthesis-of-proteoglycans>

**SOME TECHNOLOGICAL PAST, PRESENT  
AND ALSO FUTURE OF MODERN BIOLOGY UNTIL THE YEAR 2030**

*(PART ONE)*

Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Matniyazov R.T.,  
Baymiev A.K., Bikbulatova S.M., Gimalov F.R., Vakhitov V.A.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

**Abstract**

The place of molecular biology among other modern biological disciplines is shown. The development of molecular biology from 80-ies of XX century to the present is quite briefly traced. A comparison of the narrative, experimental, and theoretical biology is carry out. A number of earlier forecasts made prior to 2000 and the first decade of the XXI century are compared. The focus is on the methods of DNA sequencing, whole genome-sequencing and amplification of nucleic acids by different variations of PCR, oligonucleotide synthesis and DNA chips. The methodical state and the corresponding instrumentation of physico-chemical biology are described. There is an information about the completely sequenced genomes of various organisms as of mid-2013. It is suggested that the emergence in future of a new ultrahigh throughput and at the same time, low-cost DNA sequencing method will drastically change all biological sciences, since it can not do any other new technology. References cover more than hundred years - from 1912 to 2013.

**Keywords:** DNA, RNA, genome, sequencing, PCR, gel electrophoresis, DNA-chips, oligonucleotide, genomics, transcriptomics, methylomics, proteomics, bioinformatics, biomics