

# Z sekwenatorem do lasu

Urządzeniem testowanym przez pracowników Leśnego Banku Genów Kostrzyca w badaniach związanych z identyfikacją gatunków roślin Puszczy Białowieskiej jest **miniaturowy sekwenator III generacji**. Niepozorne urządzenie wielkości pendrive'a rewolucjonizuje rynek badań molekularnych opartych na analizach sekwencji DNA.

**W**szystko wskazuje na to, że takie „prze-nośne laboratoria” z czasem staną się na tyle popularne, że będą mogli z nich korzystać nie tylko naukowcy posiadający specjalistyczną wiedzę z zakresu badań molekularnych, ale również zwykli użytkownicy (w tym leśnicy) np. w celu odpowiedzi na pytanie, z jakim gatunkiem mają konkretnie do czynienia.

## Kosmiczna technologia w lasach

Urządzenie stosowane jest wszędzie tam, gdzie istnieje potrzeba szybkiej identyfikacji gatunków roślin, zwierząt, grzybów, wirusów bądź bakterii. Jest wykorzystywane w badaniach z zakresu mikrobiologii, wirusologii, ochrony środowiska, genetyki człowieka, roślin, grzybów i zwierząt. Dzięki zastosowaniu najnowszej technologii czas, w jakim urządzenie przeprowadza jedną analizę, wynosi od 1 minuty do maksymalnie 48 godzin. Sposób sekwencjonowania, oprócz skrócenia czasu analiz, posiada także inną przewagę nad tradycyjną technologią, która była wykorzystywana w sekwenatorach starszych generacji – pozwala zwiększyć długość badanych sekwencji, a w związku z tym umożliwia ich analizę w dużo szerszym zakresie.

Urządzenie służy do sekwencjonowania nie tylko wybranych fragmentów DNA badanych organizmów, ale również całych ich genomów. Wykorzystywane jest w badaniach metagenomowych umożliwiających identyfikację całego zestawu mikroorganizmów zasiedlających badaną próbkę.

To niewielkie urządzenie otwiera przed użytkownikami możliwość sekwencjonowania DNA poza przestrzenią laboratorium. Mobilną platformę sekwencyjną można zabrać w dowolne miejsce na Ziemi i nie tylko – urządzenie testowane było m.in. w przestrzeni kosmicznej! Zgodnie z obietnicami producenta sprawdzi się zarówno w lasach tropikalnych, jak również na kole podbiegunowym.

## Miniaturyzacja

Dokładne wymiary urządzenia to 105x33x23 mm, a jego waga to zaledwie 103 gramy – praktycznie są to wymiary przenośnej pamięci *pendrive*. Sekwenator opiera swoje działanie na technologii nanoporowej – w urządzeniu znajduje się bowiem 512 porów (o wielkości nie większej niż kilka nanometrów), przez które następuje rozdział badanych

fragmentów DNA. Każdy z analizowanych fragmentów zbudowany jest z czterech różnych nukleotydów występujących w różnej kolejności. Przechodząc przez pory, generują one inną, charakterystyczną dla każdego nukleotydu, zmianę natężenia prądu. Zmiany te, zarejestrowane w czasie rzeczywistym przez urządzenie, z coraz większą precyzją pozwalają na określenie kolejności wbudowanych nukleotydów w nici DNA, a więc na poznanie ich sekwencji.

## Po co to leśnikom?

W 2017 r. LBG Kostrzyca rozpoczął innowacyjny projekt dot. identyfikacji genetycznej – barkodowania DNA wybranych gatunków roślin Puszczy Białowieskiej. Celem projek-

Fot. Robert Czepielewski (4)



Urządzenie testowane obecnie w laboratorium docelowo ma służyć badaniom prowadzonym w terenie, np. w trakcie inwentaryzacji przyrodniczych



Sekwenator wielkości pendrive'a może wspomóc pracę taksonomów przy identyfikacji gatunków roślin i zwierząt



Laboratorium terenowe



tu jest opracowanie przystępnego klucza do szybkiej identyfikacji gatunków na podstawie niewielkich fragmentów roślin. W związku z wprowadzeniem na rynek sekwencjonowania DNA platformy sekwenatorów III generacji (stworzonej głównie z przeznaczeniem do badań związanych z barkodowaniem DNA) podjęto decyzję o przeprowadzeniu testów, które polegają na porównaniu możliwości sekwencjonowania DNA metodą tradycyjną, tj. metodą Sangera (stosowaną obecnie w LBG Kostrzyca), i z zastosowaniem ww. nowoczesnej platformy. Głównym celem testów jest odpowiedź na pytanie o możliwości rozróżnienia wybranych gatunków roślin za pomocą obu urządzeń.

Wybór sekwenatora III generacji podjęty był jego niewielkim rozmiarem oraz możliwością prowadzenia analiz w terenie,

np. w czasie inwentaryzacji przyrodniczych. Urządzenie w trakcie 3-godzinnych testów, prowadzonych przy współpracy LBG Kostrzyca z Muzeum i Instytutem Zoologii PAN w Warszawie, przeanalizowało jednocześnie 1 328 fragmentów DNA i wygenerowało ponad 5 tys. odczytów (8,8 GB informacji) na łączną długość 2 mln 930 tys. nukleotydów DNA. Tak imponujący wynik potwierdza zapewnienia producenta o tym, że urządzenie jest w stanie odczytać o wiele dłuższe sekwencje w znacznie krótszym czasie, niż pozwala na to tradycyjna metoda Sangera.

### Ile to kosztuje?

Wśród wszystkich gałęzi przemysłu biotechnologicznego rynek sekwencyjny rozwija się bardzo dynamicznie. Firmy produkujące sekwenatory prześcigają się w proponowa-


niu swoim klientom aparatury i aplikacji, które przy zwiększonej wydajności analiz, umożliwiają ograniczenie czasu pracy oraz jej kosztów. Ceny samych aparatów, z racji ogromnej konkurencyjności, również stają się coraz bardziej przystępne. Koszt zakupu sekwenatora III generacji zaczyna się od tysiąca dolarów amerykańskich. Sprawą dyskusyjną pozostaje sam koszt utrzymania aparatu oraz cena jednostkowa za analizę. Kolejne testy powinny przynieść ostateczną odpowiedź na pytanie dotyczące realnego kosztu analizy pojedynczej próbki.

### Sekwenatory I, II czy III generacji?

Na rynku istnieje kilku producentów sekwenatorów, wśród których głównie dominują firmy amerykańskie. Ich urządzenia wykorzystują technikę sekwencjonowania DNA I bądź II generacji. Zasadnicza różnica między nimi polega na ich zdolnościach przetworczych – możliwościach prowadzenia krótkich bądź długich odczytów sekwencji, a także liczbie badanych fragmentów DNA. Sekwenatory I generacji sekwencjonują krótkie, pojedyncze fragmenty, a sekwenatory II generacji – nazywane sekwenatorami następnej generacji NGS (z ang. *Next Generation Sequencing*), są w stanie jednocześnie zsekwencjonować nawet milion długich fragmentów DNA, wykorzystując przy tym różnego typu metody sekwencyjne.

Rozwój różnych technik sekwencjonowania DNA przyczynił się do ich ciągłego udoskonalania. Dla przykładu: przy wykorzystaniu techniki Sangera – pierwszej, opracowanej w 1977 r. metody sekwencjonowania DNA wykorzystywanej w sekwenatorach I generacji (metoda służyła m.in. do zsekwencjonowania ludzkiego genomu) – maksymalna długość sekwencji, które jesteśmy w stanie odczytać w laboratorium LBG Kostrzyca wynosi 1 300 nukleotydów. Za pomocą sekwenatora III generacji, bazującego na najnowszej technologii nanoporowej, analizując te same gatunki, otrzymujemy informacje o sekwencjach do maksymalnej długości 30 tys. nukleotydów.

Przy tak ogromnej ilości generowanych informacji osobnym zagadnieniem jest proces przetwarzania danych, ale to temat na odrębny artykuł.

Więcej informacji o projekcie dotyczącym barkodowania DNA można znaleźć na stronie: [www.barkodowanie.pl](http://www.barkodowanie.pl). 

**Ewa Kaczmarek**