

Генетический анализатор Нанофор 05 в качестве средства измерений при секвенировании ДНК

Александр Анатольевич Волков¹, Илья Алексеевич Волков², Александр Геннадиевич Плугов³, Елена Вячеславовна Кулябина⁴, Ольга Николаевна Мелкова⁵, Георгий Сергеевич Лавров⁶, Дария Владимировна Бочарова⁷, Яков Игоревич Алексеев⁸

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия, alexavolkov@gmail.com

^{2, 3, 8} Научно-производственная фирма «Синтол», Москва, Россия

²iv@syntol.ru, ³ap@syntol.ru, ⁸jalex@syntol.ru

^{4, 5} Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы, Москва, Россия

⁴kuliabina@vniims.ru, ⁵melkova@vniims.ru

^{6, 7, 8} Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁶lavrik641@mail.ru, ⁷souldarydary@gmail.com, ⁸jalex01@mail.ru

Аннотация. Разработано метрологическое обеспечение секвенирования ДНК. Секвенирование стандартного образца митохондриальной последовательности ДНК человека выполнено методом Сенгера на отечественных генетических анализаторах капиллярного электрофореза Нанофор 05. Результаты проведенных работ использованы при утверждениях типов стандартного образца митохондриальной последовательности ДНК человека и средства измерений последовательности ДНК.

Ключевые слова: секвенирование ДНК, стандартный образец ДНК, погрешность секвенирования ДНК, генетический анализатор, капиллярный электрофорез

Для цитирования: Волков А. А., Волков И. А., Плугов А. Г., Кулябина Е. В., Мелкова О. Н., Лавров Г. С., Бочарова Д. В., Алексеев Я. И. Генетический анализатор Нанофор 05 в качестве средства измерений при секвенировании ДНК // Измерительная техника. 2021. № 1. С. 60–65. <https://doi.org/10.32446/0368-1025it.2021-1-60-65>

Genetic analyzer Nanophore 05 as a measuring instrument for DNA sequencing

Aleksandr A. Volkov¹, Il'ya A. Volkov², Aleksandr G. Plugov³, Elena V. Kulyabina⁴, Olga N. Melkova⁵, Georgii S. Lavrov⁶, Dariya V. Bocharova⁷, Yakov I. Alekseev⁸

¹ Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, Russia, alexavolkov@gmail.com

^{2, 3, 8} Limited Liability Company Syntol, Moscow, Russia

²iv@syntol.ru, ³ap@syntol.ru, ⁸jalex@syntol.ru

^{4, 5} All-Russian Research Institute of Metrological Service, Moscow, Russia

⁴kuliabina@vniims.ru, ⁵melkova@vniims.ru

^{6, 7, 8} Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

⁶lavrik641@mail.ru, ⁷souldarydary@gmail.com, ⁸jalex01@mail.ru

Abstract. The paper presents the results of studies on the development of metrological support for DNA sequencing. The sequencing of a standard sample of the human mitochondrial DNA was carried out according to the Sanger method on domestic capillary electrophoresis genetic analyzers Nanophore 05. The results of the work were used to validate standard reference material for human mitochondrial DNA sequence and to confirm the DNA sequencer as a measurement instrument.

Keywords: DNA sequencing, standard DNA sample, DNA sequencing error, genetic analyzer, capillary electrophoresis

Введение. Расшифровка первичной структуры (секвенирование) ДНК является общепризнанным «золотым стандартом» при идентификации любых объектов биологического

происхождения, так как в результате анализа обеспечивается точность идентификации объекта, близкая к 100 % [1]. Технологии секвенирования ДНК стремительно развиваются,

поскольку информация, получаемая при расшифровке ДНК, чрезвычайно актуальна для различных отраслей деятельности человека – медицины, сельского хозяйства, пищевой промышленности, криминалистики, обеспечения биологической безопасности и др. В настоящее время существует несколько методов секвенирования ДНК, отличающихся принципом реализации на молекулярном уровне. Первым автоматизированным методом секвенирования ДНК является метод секвенирования по Сенгеру [2]. В последние годы появились и уже внедрены в практику молекулярно-генетических исследований технологии массового параллельного (полногеномного) секвенирования ДНК, основанные на методе секвенирования путём синтеза [3, 4]. Активно ведутся разработки в области так называемого одномолекулярного секвенирования [5]. Однако до сих пор отсутствует метрологическое обеспечение процесса секвенирования ДНК, поэтому ДНК-исследования в испытательных лабораториях являются проблематичными, несмотря на попытки создания в РФ метрологического обеспечения геномных анализаторов [6, 7]. В частности, был разработан стандартный образец для калибровки и метрологического обеспечения пиросеквенатора CS FLX, представляющий собой фрагмент последовательности ДНК плазмиды pUC18 размером 271 нуклеотид. Затем был разработан и утверждён государственный стандартный образец (ГСО) фрагмента последовательности ДНК плазмиды pUC18 размером 717 нуклеотидов [8]. Однако в 2016 г. пиросеквенаторы CS FLX были сняты с производства, а срок действия свидетельств на государственный стандартный образец плазмиды закончился. Размер эталонной последовательности, по-видимому, должен определяться техническими возможностями калибруемого (поверяемого) генетического анализатора, прежде всего длиной расшифровываемой ДНК с указанием определённой для данной длины погрешности расшифровки.

Цель настоящей работы – оценивание погрешности расшифровки последовательности ДНК с использованием средства измерений – генетического анализатора капиллярного электрофореза Нанопор 05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия).

Секвенирование ДНК методом Сенгера. Принцип работы генетического анализатора Нанопор 05 основан на разделении фрагментов ДНК с помощью капиллярного гель-электрофореза с детекцией флуоресценции, индуцированной лазером [9]. Анализируют образцы, полученные реакцией секвенирования ДНК методом Сенгера. Реализация данного метода состоит из нескольких этапов. Сначала проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для амплификации исследуемого фрагмента ДНК, а затем – реакцию секвенирования с применением четырёх различных друг от друга по максимуму длины волны испускания флуоресцентно-меченных дидезоксинуклеозидтрифосфатов, где в качестве матричной ДНК используют 10–200 нг ампликона. После проведения реакции продукты секвенирования ДНК разделяют методом капиллярного гель-электрофореза (рис. 1).

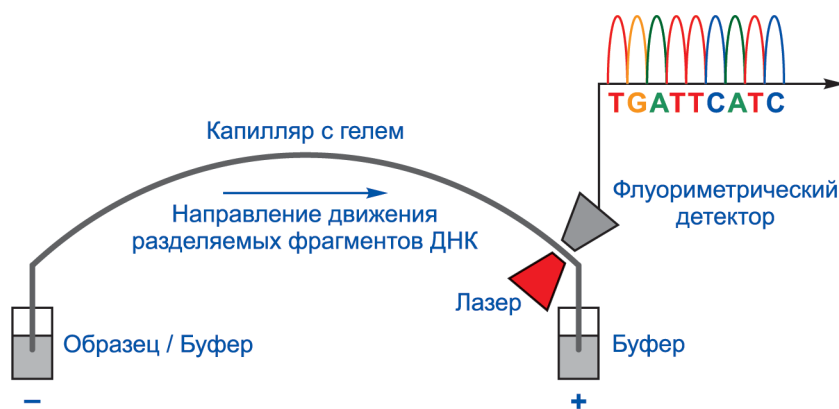


Рис. 1. Схема капиллярного гель-электрофореза с индуцированной лазером детекцией флуоресценции

Fig. 1. Scheme of capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection

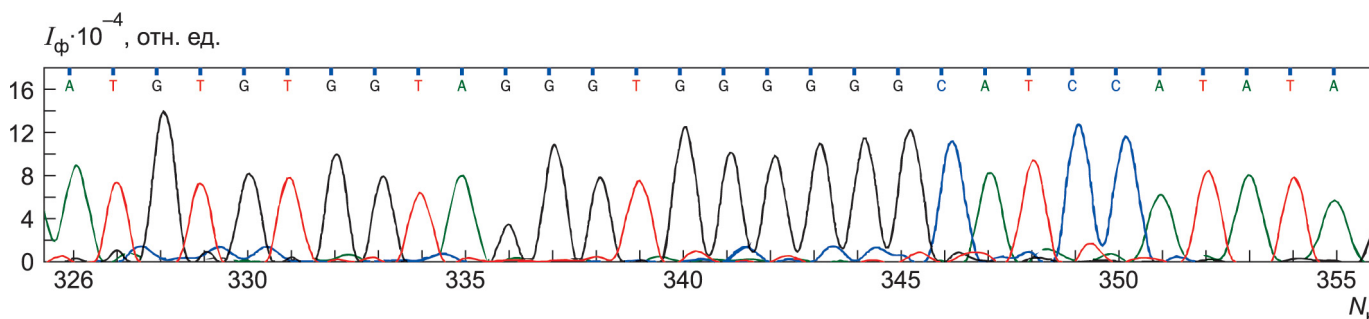


Рис. 2. Графическое изображение (электрофореграмма) последовательности фрагмента ДНК, полученное на генетическом анализаторе Нанопор 05; I_ϕ – интенсивность флуоресценции; N_n – порядковый номер нуклеотида; буквы – нуклеотиды, пики – сигнал флуоресценции

Fig. 2. Graphic image (electrophoregram) of the sequence of a DNA fragment obtained on the Nanophor 05 genetic analyzer; I_f is the fluorescence intensity; N_n is the sequence number of the nucleotide; letters – nucleotides, peaks – fluorescence signal

Фрагменты ДНК, проходящие через зону детекции капилляра с гелем и содержащие определённую флуоресцентную метку, возбуждаются лазерным излучением, и сигнал флуоресценции регистрируется детектором. Капилляры представляют собой тонкие стеклянные трубочки длиной 46–60 см и внутренним диаметром 50 мкм. При разделении фрагментов ДНК в геле короткие фрагменты движутся быстрее длинных, что позволяет ранжировать фрагменты по длине. Разрешающая способность капиллярного электрофореза позволяет достоверно разделять фрагменты ДНК с погрешностью не более одного нуклеотида при длине фрагмента ДНК несколько сотен нуклеотидов [10]. Результаты разделения записывают с помощью компьютера в виде четырёхцветной электрофореграммы, в которой каждый пик флуоресценции определённого цвета соответствует одному из четырёх нуклеотидов, а последовательность выхода пиков соответствует последовательности расшифровываемой ДНК, кодируемой четырьмя буквами: А (аденозин), G (гуанозин), С (цитидин), Т (тимидин), как показано на рис. 2.

Основной проблемой, которая может возникнуть при работе генетического анализатора, является так называемая «ошибка считывания». При секвенировании методом Сенгера длина прочитываемого фрагмента ДНК может составлять до 1000 нуклеотидов, причём точность прочтения начинает заметно уменьшаться только после 700–800 нуклеотидов. Сам процесс секвенирования по Сенгеру предопределяет эффект падения качества (труднее отличить молекулу длиной 700 нуклеотидов от молекулы длиной 701 нуклеотид, чем 100 от 101 соответственно). При этом итоговая разрешающая способность обусловлена как параметрами электрофореза, так и типом используемого для разделения полимера [11]. Тем не менее, несмотря на разнообразие разработанных к настоящему времени методов секвенирования ДНК, метод Сенгера наиболее предпочтителен при быстрой (в течение нескольких часов) расшифровке фрагмента генома размером не более нескольких сотен нуклеотидов. Также это относительно недорогой (по сравнению с полногеномным секвенированием) и довольно точный метод для решения чётко поставленных задач.

Оценивание погрешности генетического анализатора Нанофор 05. Для определения процента ошибочных прочтений последовательности ДНК необходимо оценить погрешность генетического анализатора при секвенировании образца ДНК с известной последовательностью нуклеотидов, зарегистрированного в качестве ГСО (SRM – standard reference material). Для исследований выбран выделенный из культуры промиелоцитарных клеток линии HL-60 образец ДНК человека с острым промиелоцитарным лейкозом. Данный образец разработан Национальным институтом Стандартов и Технологий (NIST) США [12]. Этот SRM предназначен для обеспечения контроля качества при ПЦР и секвенировании митохондриальной ДНК (мтДНК) человека для судебной идентификации, медицинской диагностики или обнаружения мутаций. Он также может служить для контроля при амплификации (ПЦР) и секвенировании любой ДНК [13–15]. Стандартный образец ДНК SRM 2392-I (NIST, США) представляет собой 65 мм³ раствора выделенной из культуры клеток линии ДНК человека концентрацией 1,4 нг/мм³.

Нуклеотидный состав (А, G, C, T) каждой позиции митохондриального генома человека клеток линии HL-60, а также выявленные отличия по сравнению с Кембриджской эталонной последовательностью [15] указаны в сертификате анализа SRM 2392-I. В настоящей работе в качестве источника сопоставимости идентичности HL-60 для митохондриального генома и секвенирования любой ДНК использована Кембриджская эталонная последовательность ДНК, которая также применяется при оценке погрешности средства измерений – генетического анализатора Нанофор 05.

Испытания в целях утверждения типа ГСО на основе SRM 2392-I. Испытания проведены ВНИИМС совместно с НПФ «Синтол» и ВНИРО. На первом этапе выполняли амплификацию участка ДНК HL-60 SRM 2392-I. Для проведения ПЦР использовали праймеры из списка рекомендованных пар праймеров, указанных в сертификате анализа SRM 2392-I (NIST 02.02.2018). Требования к амплифицируемому фрагменту: участок мтДНК должен минимально отличаться по нуклеотидному составу относительно Кембриджской эталонной последовательности; длина ампликона должна быть достаточной для обеспечения последующей проверки погрешности секвенирования ДНК на приборе Нанофор 05. В соответствии с техническими характеристиками, указанными производителем генетического анализатора, длина расшифровываемых последовательностей ДНК составляет 750 нуклеотидов с точностью не менее 98,5 %. Так как практически все рекомендованные пары праймеров предназначены для получения продукта амплификации длиной не более 1000 пар нуклеотидов (далее – п.н.), авторы настоящей статьи подобрали комбинацию прямого и обратного праймеров из разных пар с целью получить продукт амплификации длиной 1000–2000 п.н. В качестве прямого праймера использовали F5999 (5' TCTAA GCCTC CTTAT TCGAG C 3'), в качестве обратного – праймер R7792 (5' GGGCA GGATA GTTCA GACGG 3'). ПЦР осуществляли по следующей схеме:

предварительная денатурация ДНК 2 мин при 95 °С;
синтез ПЦР-продуктов (30 циклов) – денатурация ДНК 10 с при 95 °С;
отжиг праймеров 30 с при 55 °С;
синтез цепи ДНК 60 с при 72 °С;
окончательная достройка цепей 10 мин при 72 °С.

Полученный продукт амплификации участка митохондриальной ДНК человека от 5999 до 7792 нуклеотида имел длину 1794 п.н.

На втором этапе определяли последовательность полученного ПЦР-продукта классическим методом Сенгера. Для проведения реакции секвенирования использовали праймер R7792 и набор реагентов для секвенирования ДНК «BigDye™ v3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit» (ThermoFisher Scientific, США). В микропробирку вместимостью 0,2 см³ вносили 1 мм³ праймера R7792 молярной концентрацией 4 мкмоль/дм³, добавляли 2 мм³ реагента для секвенирования, 1 мм³ 5-кратного буфера из набора для секвенирования, 1 мм³ ПЦР продукта концентрацией 20 нг/мм³, также добавляли 5 мм³ деионизованной воды для молекулярной биологии и перемешивали. Микропробирки помещали

в амплификатор с термостатируемой крышкой T100 (Bio-Rad, США) и запускали программу секвенирования по следующей схеме:

предварительная денатурация ДНК 2 мин при 95 °С;

секвенирование ДНК (40 циклов):

денатурация ДНК 10 с при 95 °С;

отжиг праймера 10 с при 52 °С;

синтез с обрывом цепи ДНК 4 мин при 60 °С;

охлаждение постоянно при 10 °С.

Для получения достаточного количества образцов проводили 48 таких реакций. Продукты реакции секвенирования объединяли в одну пробирку объёмом 1,5 см³ для усреднения образца и очищали с использованием микроколонок Centri-Sep (Princeton Separations, США) в соответствии с инструкцией, после чего очищенный образец также объединяли. От очищенного водного раствора образца отбирали 0,4 мм³ и смешивали с 9,6 мм³ деионизованного формамида Hi-Di (ThermoFisher Scientific, США). Денатурацию образцов проводили в течение 1 мин при 95 °С. Таким образом было подготовлено 48 повторов одного образца для анализа в 96-ти луночной планшете генетического анализатора Нанофор 05. Планшет загружали в генетический анализатор и выполняли анализ в соответствии со стандартным протоколом из руководства пользователя прибора: условия электрокинетического нанесения образца – 3 кВ, 30 с; напряжение электрофореза 10,5 кВ («Нанофор 05» Руководство пользователя. Приложение 5, С. 147: [Интернет-ресурс]. URL: http://www.syntol.ru/docs/Руководство_Нанофор_05_14102019.pdf). Длина капилляров, установленных в приборах, составляла 60 см (50 см до окна детектора). В качестве разделяющего полимера использовали ПДМА-6 (НПФ «Синтол», Россия). Для оценки повторяемости результатов 48 повторов одного и того же образца анализировали дважды в течение одних суток на генетическом анализаторе Нанофор 05 (серийный номер 031301, год производства 2013), в лаборатории НПФ «Синтол». Для оценки воспроизводимости сравнивали результаты, полученные для 48 повторов того же образца на генетическом анализаторе в НПФ «Синтол» с результатами, полученными на генетическом анализаторе Нанофор 05 (серийный номер 061901, год производства 2019) в лаборатории Института аналитического приборостроения РАН. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «ДНК АЛ версия 5.0.4.3» (Институт аналитического приборостроения РАН).

Компьютерный анализ полученной и референсной последовательностей. Сравнение полученных в результате анализа последовательностей и фрагмента референсной последовательности стандартного образца SRM 2392-I

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1380 bits(747)	0.0	749/750(99%)	0/750(0%)	Plus/Plus
Query 5	GTTAGTTTTGTTGTGAGTGTAGGAAAAGGGCATACAGGACTAGGAAGCAGATAAGGAAA	64		
Sbjct 1	GTTAGTTTTGTTGTGAGTGTAGGAAAAGGGCATACAGGACTAGGAAGCAGATAAGGAAA	60		
Query 65	ATGATTATGAGGGCGTGATCATGAAAGGTGATAAGCTCTTCTATGATAGGGGAAGTAGCG	124		
Sbjct 61	ATGATTATGAGGGCGTGATCATGAAAGGTGATAAGCTCTTCTATGATAGGGGAAGTAGCG	120		
Query 125	TCTTGAGACCTACTTGCCTGTCATGTGCCATTAAGATATAGGATTTAGCCTATAATT	184		
Sbjct 121	TCTTGAGACCTACTTGCCTGTCATGTGCCATTAAGATATAGGATTTAGCCTATAATT	180		
Query 185	TAACCTTGACGAAGTTATGAAATGGTTTTCTAATACCTTTTGAAGAAAGTCATGGAGGC	244		
Sbjct 181	TAACCTTGACGAAGTTATGAAATGGTTTTCTAATACCTTTTGAAGAAAGTCATGGAGGC	240		
Query 245	CATGGGGTTGGCTTGAACACAGCTTTGGGGGGTTCGATTCTCTCTTTTGTCTAGATT	304		
Sbjct 241	CATGGGGTTGGCTTGAACACAGCTTTGGGGGGTTCGATTCTCTCTTTTGTCTAGATT	300		
Query 305	TTATGTATACGGGCTCTTCGAATGTGTGGTAGGGTGGGGGGCATCCATATAGTCACTCCA	364		
Sbjct 301	TTATGTATACGGGCTCTTCGAATGTGTGGTAGGGTGGGGGGCATCCATATAGTCACTCCA	360		
Query 365	GGTTTATGGAGGGTCTTCTACTATTAGGACCTTTCGCTTCGAAGCGAAGGCTTCTCAAA	424		
Sbjct 361	GGTTTATGGAGGGTCTTCTACTATTAGGACCTTTCGCTTCGAAGCGAAGGCTTCTCAAA	420		
Query 425	TCATGAAAATTATTAATATTACTGCTGTAGAGAAATGAATGAGCCTACAGATGATAGGA	484		
Sbjct 421	TCATGAAAATTATTAATATTACTGCTGTAGAGAAATGAATGAGCCTACAGATGATAGGA	480		
Query 485	TGTTTCATGTGGTGTATGCATCGGGTAGTCCGAGTAACGTGGGGCATTCCGGATAGGC	544		
Sbjct 481	TGTTTCATGTGGTGTATGCATCGGGTAGTCCGAGTAACGTGGGGCATTCCGGATAGGC	540		
Query 545	CGAGAAAGTGTGTGGGAAGAAAGTTAGATTACGCCGATGAATATGATAGTGAATGGA	604		
Sbjct 541	CGAGAAAGTGTGTGGGAAGAAAGTTAGATTACGCCGATGAATATGATAGTGAATGGA	600		
Query 605	TTTTGGCGTAGGTTTGGTCTAGGGGTAGCCTGAGAAATAGGGGAAATCAGTGAATGAAGC	664		
Sbjct 601	TTTTGGCGTAGGTTTGGTCTAGGGGTAGCCTGAGAAATAGGGGAAATCAGTGAATGAAGC	660		
Query 665	CTCCTATGATGGCAAAATACAGCTCCTATTGATAGGACATAGTGGAAAGTAGCTACAACGT	724		
Sbjct 661	CTCCTATGATGGCAAAATACAGCTCCTATTGATAGGACATAGTGGAAAGTAGCTACAACGT	720		
Query 725	AATACGTGTCGTGTAGTACGATGTCTAGTG 754			
Sbjct 721	AGTACGTGTCGTGTAGTACGATGTCTAGTG 750			

Рис. 3. Пример выравнивания референсной последовательности SRM 2392-I фрагмента мтДНК человека в диапазоне 6987–7737 п.н. (Query) и расшифрованной на генетическом анализаторе Нанофор 05 последовательности (Sbjct); ошибка прочтения – один из 750 нуклеотидов (показан стрелкой)

Fig. 3. An example of alignment of the reference sequence SRM 2392-I fragment of human mtDNA in the range 6987–7737 bp (Query) and the sequence (Sbjct) decoded on the Nanophor 05 genetic analyzer; read error – one in 750 nucleotides (arrowed)

длиной 750 нуклеотидов, выполняли в программе BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: [Электронный ресурс]. U.S. National Library of Medicine: [сайт]. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). В основе программы BLAST лежит семейство компьютерных алгоритмов, которые признаны международным экспертным и научным сообществом, используются для поиска гомологичных участков ДНК (и белков), хранящихся в базах данных биологических последовательностей, путём выравнивания нуклеотидных (аминокислотных) последовательностей и вычисления статистической значимости найденного сходства последовательностей. Результат сравнения приведён на рис. 3.

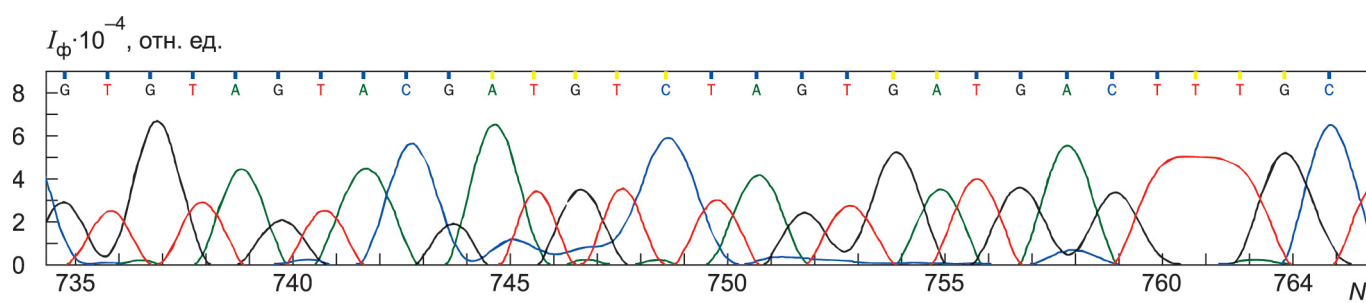


Рис. 4. Электрофореграмма разделения продуктов реакции секвенирования фрагмента ПЦР и выравнивание проанализированной последовательности на референсную последовательность SRM 2392-I фрагмента мтДНК человека длиной 750 нуклеотидов (диапазон 6987–7737 п.н.)

Fig. 4. Electrophoregram of the separation of the sequencing products of the PCR fragment and the alignment of the analyzed sequence to the reference sequence SRM 2392-I of the human mtDNA fragment 750 nucleotides in length (range 6987–7737 bp)

Статистические характеристики, рассчитанные по результатам испытаний ГСО

Характеристика	Прибор 031301		Прибор 061901
	Анализ 1	Анализ 2	
E_{48}	4	4	2
δ , %	0,53	0,53	0,27

Полученные результаты анализа сравнивали с той же референсной последовательностью с помощью Программы анализа и редактирования результатов секвенирования (ПАР²СЕК, Институт аналитического приборостроения РАН). Результат анализа в программе ПАР²СЕК приведен на рис. 4.

Статистические характеристики, рассчитанные по результатам испытаний образца, представляющего собой продукты реакции секвенирования фрагмента мтДНК человека SRM 2392-I длиной 750 нуклеотидов в 48 повторах для каждой постановки, приведены в таблице. Здесь E_{48} – среднее по 48 повторам количество ошибок секвенирования фрагмента ДНК SRM 2392-I длиной 750 нуклеотидов; δ – относительная погрешность секвенирования, вычисляемая по формуле

$$\delta = (N - n) / N \cdot 100,$$

где N – общее число выровненных позиций двух (референсной и экспериментально расшифрованной) нуклеотидных последовательностей (в данном случае $N = 750$ нуклеотидов); n – число несовпадающих оснований в выровненных позициях экспериментально расшифрованной нуклеотидной последовательности относительно референсной.

Закключение. Испытания генетического анализатора Нанофор 05 в целях утверждения типа, проведенные во ВНИИМС, показали соответствие заявленных производителем характеристик – длины и погрешности расшифровки последовательности ДНК – фактическим характеристикам. Подтверждены повторяемость и воспроизводимость измерений. ГСО на основе SRM 2392-I – ГСО фрагмента митохондриальной ДНК человека культуры клеток линии HL-60 (участок 5999–7792) – внесён в Федеральный информационный

фонд (№ 11607-2020). Данный ГСО можно использовать в испытательных лабораториях для метрологического обеспечения генетических анализаторов, принцип работы которых основан на разделении фрагментов ДНК при помощи капиллярного электрофореза с индуцированной лазером детекцией флуоресценции.

Работа выполнена по Государственному заданию Министерства науки и высшего образования РФ № 075-00780-19-00 по теме № 0074-2019-0017.

Список литературы

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: в 3-х т.: Пер. с англ. канд. биол. наук Т. Н. Власик, канд. биол. наук В. П. Коржа, канд. биол. наук В. М. Маресина, Т. Д. Аржановой, Г. В. Крюковой / Под ред. акад. Г. П. Георгиева, докт. биол. наук Ю. С. Ченцова. М.: Мир, 1994. Т. 1. 517 с.
2. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
3. Bentley David R., Balasubramanian S., Swerdlowe H. P. et al., *Nature*, 2008, vol. 456, no. 6, pp. 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature07517>
4. Rusk N., *Nature Methods*, 2011, vol. 8, no. 1, p. 44. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.331>
5. Larkin J., Henley R., Jadhav V. et al., *Nature Nanotechnology*, 2017, vol. 12, pp. 1169–1175. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.176>
6. Голубев С. С., Кононогов С. А., Равин Н. В., Скрябин К. Г. Выбор эталона для определения нуклеотидных последовательностей молекул ДНК // Измерительная техника. 2011. № 12. С. 45–47.
7. Голубев С. С., Кононогов С. А., Кудеяров Ю. А., Марданов А. В., Николаева П. Ю., Равин Н. В., Скрябин К. Г. Метрологическое обеспечение секвенирования молекул ДНК // Измерительная техника. 2012. № 3. С. 64–72.
8. Голубев С. С., Кудеяров Ю. А., Николаева П. Ю., Марданов А. В., Равин Н. В. Стандартный образец нуклеотидной

последовательности ДНК // Законодательная и прикладная метрология. 2013. Т. 124. № 3. С. 44–48.

9. Алексеев Я. И., Белов Ю. В., Малюченко О. П., Монахова Ю. А., Натыров А. Н., Орехов В. А., Коновалов С. В., Курочкин В. Е., Петров А. И. Генетический анализатор для фрагментного анализа ДНК // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. № 4. С. 86–92.

10. Heller C., *Electrophoresis*, 2000, vol. 21, no. 3, pp. 593–602.

11. Бочарова Д. В., Алексеев Я. И., Курочкин В. Е. Изучение влияния напряжения электрического поля на эффективность разделения одноцепочечных фрагментов ДНК при капиллярном гель-электрофорезе в полимерах на основе линейного поли-N,N-диметилакриламида // Журнал аналитической химии. 2020. Т. 75. № 12. С. 1148–1152. <https://doi.org/10.31857/S0044450220100035>

12. Barbara C. Levin, Koren A. Holland, Diane K. Hancock, Michael Coble, Thomas J. Parsons, Laura J. Kienker, Diana W. Williams, MaryPat Jones, Kristy L. Richie., *Mitochondrion*, 2003. vol. 2, iss. 6, pp. 387–400. [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(03\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(03)00010-2)

13. Levin B. C., Cheng H., Reeder D. J., *Genomics*, 1999, vol. 55, pp. 135–146. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5513>

14. Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., deBruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R., Young I. G., *Nature*, 1981, vol. 290, pp. 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>

15. Andrews R., Kubacka I., Chinnery P. et al., *Nature Genetics*, 1999, vol. 23, p. 147. <https://doi.org/10.1038/13779>

References

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., *Molecular Biology of the Cell*, 2 ed., New York, London, Garland Publishing, Inc., 1994.

2. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

3. Benthley David R., Balasubramanian S., Swerdlowe H. P. et al., *Nature*, 2008, vol. 456, no. 6, pp. 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature07517>

4. Rusk N., *Nature Methods*, 2011, vol. 8, no. 1, p. 44. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.331>

5. Larkin J., Henley R., Jadhav V. et al., *Nature Nanotechnology*, 2017, vol. 12, pp. 1169–1175. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.176>

6. Golubev S. S., Kononogov S. A., Ravin N. V., Skryabin K. G., *Measurement Techniques*, 2012, vol. 54, no. 12, pp. 1408–1411. <https://doi.org/10.1007/s11018-012-9903-4>

7. Golubev S. S., Kononogov S. A., Kudayarov Yu. A., Mardanov A. V., Nikolaeva P. Yu., Ravin N. V., Skryabin K. G., *Measurement Techniques*, 2012, vol. 55, no. 3, pp. 345–350. <https://doi.org/10.1007/s11018-012-9962-6>

8. Golubev S. S., Kudayarov Yu. A., Nikolaeva P. Yu., Mardanov A. V., Nikolaeva P. Yu., Ravin N. V., *Zakonodatel'naya i prikladnaya metrologiya*, 2013, vol. 124, no. 3, pp. 44–48 (in Russian).

9. Alekseev Ya. I., Belov Yu. V., Malyuchenko O. P., Monakhova Yu. A., Natyrov A. N., Orekhov V. A., Kononov S. V., Kurochkin V. E., Petrov A. I., *Nauchnoe priborostroenie*, 2012, vol. 22, no. 4, pp. 86–92 (in Russian).

10. Heller C., *Electrophoresis*, 2000, vol. 21, no. 3, pp. 593–602.

11. Bocharova D. V., Alekseev Ya. I., Kurochkin V. E., *Journal of Analytical Chemistry*, 2020, vol. 75, no. 12, pp. 1633–1637. <https://doi.org/10.31857/S0044450220100035>

12. Barbara C. Levin, Koren A. Holland, Diane K. Hancock, Michael Coble, Thomas J. Parsons, Laura J. Kienker, Diana W. Williams, MaryPat Jones, Kristy L. Richie., *Mitochondrion*, 2003. vol. 2, iss. 6, pp. 387–400. [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(03\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(03)00010-2)

13. Levin B. C., Cheng H., Reeder D. J., *Genomics*, 1999, vol. 55, pp. 135–146. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5513>

14. Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., deBruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R., Young I. G., *Nature*, 1981, vol. 290, pp. 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>

15. Andrews R., Kubacka I., Chinnery P. et al., *Nature Genetics*, 1999, vol. 23, p. 147. <https://doi.org/10.1038/13779>

Статья поступила в редакцию 12.10.2020;
принята к публикации 13.11.2020.