

# 测序技术大比拼

深度测序技术（Deep sequencing technology）可能很快就能和现有的某些芯片技术一较高下了。但目前科研界对这两项技术前景的看法并不一致，究竟哪种技术更好，应用范围更广泛还没有定论。

## 本文将就以下几个方面进行相关探讨

- 两款新型测序仪——Polonator与HeliScop
- 新型测序技术平台
- 多样化的市场
- 市场大角力
- 新旧测序技术整合效应
- 测序设备公司的“钱景”
- 更新一代测序技术前景如何呢？

### 1 两款新型测序仪——Polonator与HeliScop

新一代测序技术（Next-generation sequencing, NGS）正以它强大的测序能力风靡整个科研界。仅仅2008年，就有两款全新型测序仪面世，一款是美国Danaher Motion公司推出的Polonator，另一款是美国Helicos公司的HeliScop。与其它新一代测序仪一样，这两款测序仪也因其测序快速、测序费用低廉而备受好评，也因此被测序界誉为革命性的、突破性的成果。这两款产品不仅能实现人们期待已久的个体基因诊断和个体化用药治疗，更有分析家认为，它们将取代功能类似的芯片类产品。



Polonator测序仪



HeliScope单分子测序仪

### 2 新型测序技术平台

自从2005年454 Life Sciences公司（2007年该公司正式被Roche收购）推出了454 FLX焦磷酸测序平台（454 FLX pyrosequencing platform）以来，曾推出过3730xl DNA测序仪（3730xl DNA Analyzer）的Applied BioSystem（ABI）这家一直占据着测序市场最大份额的公司的领先地位就开始动摇了，因为他们的拳头产品毛细管阵列电泳测序仪系列（series capillary array electrophoresis sequencing machines）遇到了两个强有力的竞争对手，一个是2006年美国Illumina公司推出的Solexa基因组分析平台（Genome Analyzer platform），另一个是2007年ABI公司推出的新产品SOLiD测序仪（见表1）。

表1 部分开发新一代测序技术的公司

| 公司名称                                        | 新一代测序技术（中文/英文）                                                                                                                        | 技术开发者                                        | 商业模式                                      | 设备价格（每台售价）                                             |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Applied Biosystems (ABI)                    | 基于磁珠的大规模并行克隆连接DNA测序法/<br>Bead-based massively parallel clonal ligation based DNA sequencing                                           | 美国Agencourt 私人基因组学公司 (APG)                   | 上市公司：<br>销售设备及试剂获取利润                      | 2007年10月推出 SOLiD系统（59.1 万美元）                           |
| Complete Genomics                           | DNA纳米阵列与组合探针锚定连接测序法/Combinatorial probe-anchor ligation on DNA nanoarrays                                                             | 美国Complete Genomics公司首席科学家<br>rade dramangc  | 私人公司：<br>投资额为4650万美元                      | 2008年10月推出个人基因组测序服务（5千美元/人）                            |
| Danaher Motion Company                      | 聚合酶克隆连接测序法/<br>Polymerase colony sequencing by ligation                                                                               | 美国哈佛大学遗传学教授<br>George Church                 | 上市公司：<br>销售设备及试剂获取利润                      | 2008年2月售出第一台Polonator测序仪（15万美元）                        |
| Helicos                                     | 大规模并行单分子合成测序法/<br>Massively parallel single molecule sequencing by synthesis                                                          | 美国斯坦福大学生物工程学家<br>Stephen Quake               | 上市公司：<br>2007年5月首次公开募股（IPO）               | 2008年2月推出 Helicos遗传分析系统，接受两台预定（135万美元）                 |
| Illumina                                    | 合成测序法/<br>Sequencing by synthesis                                                                                                     | 英国Solexa公司首席科学家<br>David Bentley             | 上市公司：<br>销售设备及试剂获取利润                      | 2007年1月推出 IG 基因组分析仪（IG Genome Analyzer），售出约200台（45万美元） |
| Intelligent Bio-Systems                     | 基于可逆荧光核苷终止法的大规模并行合成测序法/<br>Massively parallel sequencing by synthesis using proprietary reversible fluorescent nucleotide terminators | 美国哥伦比亚大学化学工程师车靖岳（Jingyue Ju）                 | 私人公司                                      | 设备尚在研发阶段                                               |
| Pacific BioSciences (formerly nanofluidics) | 单分子、实时合成测序法/<br>Single molecule, real time sequencing by synthesis                                                                    | 美国康乃尔大学的<br>Walter Webb和<br>Harold Craighead | 私人公司：<br>投资额1.78亿美元                       | 设备尚在研发阶段                                               |
| Roche                                       | 大规模并行焦磷酸合成测序法/<br>Massively parallel pyrosequencing by synthesis                                                                      | 美国454 Life Sciences公司的创始人Jonathan Rothberg   | 上市公司：<br>销售设备及试剂获取利润                      | 2005年推出GS 454 FLX测序仪，售出约180台（价值50万美元/台）                |
| VisiGen Biotechnologies                     | 大规模并行实时单分子测序法/<br>Massively parallel real-time single-molecule sequencing                                                             | 美国休斯顿大学的Susan Hardin                         | 私人公司：<br>由ABI公司和位于美国休斯顿的Seqwright公司共同投资成立 | 设备尚在研发阶段                                               |

目前，尽管这些测序仪的价格相对来说还比较昂贵，也都存在一次测序序列长度短于传统毛细管阵列电泳测序技术的问题。

不过，这些所谓“深度测序”技术具有快速、高通量、高准确性等优势，使得人们能够：

- 1) 对转录本进行测序；
- 2) 在全基因组范围内对染色质免疫沉淀（ChIP）的结果进行测序；
- 3) 能够进行基因拷贝数分析以及进行代谢组学的研究等等。

2008年《自然-方法》（*Nature Methods*）杂志上报道了一项由澳大利亚昆士兰大学（University of Queensland, Australia）Sean Grimmond研究小组开展的工作。他们借助ABI公司的SOLiD测序仪开发出了一种新的RNA测序方法。使用该方法，他们得以对小鼠胚胎干细胞分化前后的转录组进行比较，弥补了传统测序法在转录组测序方面的不足之处。

新一代测序技术对于分析ChIP试验（在基因组范围内找出能和某些蛋白质相互作用的DNA序列、位点）结果来说也是非常实用的。2007年6月，美国斯坦福大学（Stanford University）David Johnson研究小组和美国加州理工学院（California Institute of Technology）的Barbara Wold研究小组合作，使用Illumin公司的Solexa测序仪开发出一种高通量的专门用于分析转录因子结合位点的新方法。他们使用该方法发现了1946个人类基因组中神经元限制性沉默因子（neuron-restrictive silencer factor）的结合位点。

深度测序技术不仅能与传统的毛细管电泳Sanger测序法竞争，也能和基于芯片的测序技术，例如Affymetrix公司以原位光刻专利技术合成的寡核苷酸芯片（photolithographically synthesized oligonucleotide chips）测序技术和Illumina公司独特的光纤微珠芯片（oligo bead arrays coupled to optical fibers）测序技术竞争，后两项技术是目前基因组测序相关领域最先进的技术。

### 3 多样化的市场

目前，大多分析家都无法相信新一代测序技术能完全取代目前的芯片测序技术。不过，有些分析家也的确认为芯片测序技术正面临着挑战，他们认为到了2012年新一代的测序技术将会带来高达2.15亿美元的产值。

2006年，整个芯片测序市场大概价值8亿美元，其中65%的市场份额都是有关基因表达谱分析产品的，剩下35%的市场份额则由基因型分析芯片占据。不过美国哈佛大学（Harvard University）遗传学教授George Church（正是他的实验室开发了Polonator测序仪）认为，这部分市场也会受到新一代测序技术的冲击。重测序芯片（resequencing arrays）、单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms, SNP）分析芯片以及基因拷贝数目变异分析芯片（copy number variant array）市场也会受到影响。

也有分析家不赞同这个观点，他们认为即使新一代测序技术很便宜，还是有不少人会选择传统的测序仪的。

### 4 市场大角力

新一代测序技术相对传统芯片测序技术的优势，最终还得依靠广告和市场营销手段的推广才能获得大众的认可。去年夏天，由Frost & Sullivan公司对学术科研机构 and 私人研究团体进行的一项调查研究结果表明，在实际应用领域，例如进行表达谱分析时，人们还是倾向于选择传统的芯片产品，而并非青睐新一代的测序产品。

新一代测序仪推广困难可能由其价格昂贵导致。平均采购一台新一代测序仪大约要花费50万美元，除非该实验室测序的工作量非常大，否则是不会考虑购买的。即使像Polonator这样的新一代测序仪也需要花费15万美元左右，这笔费用对于一个小实验室来说是无法承受的。这时，只需要150美元一块的芯片就非常有竞争力了。

以基因芯片产品享誉业界的美国Affymetrix公司市场部副总裁Jay Kaufman认为，新一代测序技术对于芯片市场来说的确会带来一定的冲击，不过要完全取代表达谱分析芯片还需要一定的时间。他还指出，在未来一段时间内，Affymetrix公司的芯片产品在基因组相关研究领域还是非常具有竞争力的。由于在基因组相关研究领域中，待分析的样品量大小、拷贝数变异情况等因素都非常重要，而新一代测序技术在这方面的表现就不如传统的测序技术那么好了，所以它们要完全取代传统芯片技术还不是那么容易的。

Jay Kaufman的这观点对于稳定芯片市场来说非常重要，尽管他们面临着来自新一代测序技术的挑战。



图片说明：美国Affymetrix公司的基因芯片

图片来源：Affymetrix

## 5 新旧测序技术整合效应

仪器制造商和他们的投资人可能也会选择保护传统的芯片产品。就像Illumina公司和ABI公司都有自己的芯片产品，所以他们不可能看着自己的芯片产品市场被新一代产品吞噬而坐视不理。Illumina公司的主打芯片产品是基因分型芯片产品，所以他们要力保该产品不会被新一代测序产品所取代。

2007年，Roche公司战略性并购了美国NimbleGen公司，从而将该公司选择性针对基因组某区域进行测序的技术收入囊内。整合新旧两种测序技术后，罗氏公司推出了新一代序列捕获系统（Sequence Capture System）。

业内人士认为，芯片与测序本来就是两种互补的技术，将它们整合在一起，对于在全基因组内搜索、发现以及确认导致疾病的基因变异区域是非常有用的。如果有哪家公司能很好地将这两者结合在一起，那么这家公司一定会获得巨大的成功。

实际上，已经有芯片-NGS（新一代测序技术）融合技术的雏形出现了。例如，可以先通过高通量NGS技术锁定几个关键区域，再在芯片中对这几个区域进行详细分析。

实际上，大部分的芯片都非常适合用于分析基因表达谱，不过只能用于分析已知序列基因的表达谱，而NGS技术正好可以弥补芯片技术的这块空缺。”

Illumina公司最近就开发了一套这样的融合产品。他们使用该公司的Solexa测序仪发现了24000个牛基因的SNP。基于这些SNP信息，他们开发了一款芯片产品——BovineSNP50 BeadChip。按照该公司



图片说明：Illumina公司的BovineSNP50 BeadChip。

图片来源：Illumina

Flatley的说法，他们的客户将来会越来越多地用到他们新旧技术的融合产品。

相反，Affymetrix公司则拒绝接受NGS技术。不过该公司的市场部副总裁Kaufman表示，他们会关注并借鉴新技术中有用的信息。

2007年末，Affymetrix公司兼并了USB公司，同时，Affymetrix公司的CEO Stephen Fodor宣布该公司将推出一款新的芯片产品，该芯片上携带的寡核苷酸链将长达75个碱基而不是常见的25个，他们在芯片上设置了酶测序反应，使用该芯片就能进行测序了。

## 6 测序设备公司的“钱景”

目前，大部分的NGS技术都已经能将个人基因组测序的费用降到10万美元这一数量级了，剩下的就是测序个人基因组只需花费1000美元这个终极目标了（该目标由位于美国马里兰州贝塞斯达的美国国立人类基因组研究会（NHGRI）于2007年设定）。

有一些小型的研究团体、机构，例如美国Pacific BioSciences公司、美国休斯顿的VisiGen Biotechnologies公司，还有美国Intelligent Bio-Systems公司等等，都计划在5年内实现1000美元这个最终目标。这些小公司利用的融资渠道也是传统的融资渠道，例如获得政府资助或者争取风险投资等等。今年7月，Pacific BioSciences公司获得了美国Deerfield投资管理公司和美国Intel Capital风险投资公司共同提供的1亿美元E级风险投资。还有一些公司则参加了X大奖赛（见文后小词典1），希望能获得1000万美元的大奖（见知识框1）。

### 知识框1

获奖者是……还没揭晓



图片说明：Archon Minerals公司的主席 Stewart Blusson 于2006年10月4日在华盛顿特区举行的一次新闻发布会上宣布他们专为基因组学设立Archon X Prize大奖。X大奖基金会（X Prize Foundation）宣布将用1000万美元重奖能够研制出10天内完成100个人类基因组样本测序任务设备的第一支研究小组。

图片来源：Newscom.com/Alex Wong/Getty Images

Ansari X Prize基金会——为私人太空飞行器大赛提供了1000万美元奖金的基金会。它是一个非营利性组织，X Prize最著名的活动，是奖金1000万美元的“Ansari X Prize”，由来自七个国家、总共26支队伍参赛，比赛项目是在地表上方100公里处驾驶可再利用率宇宙飞船。2004年，Paul Allen赞助的SpaceShipOne赢得这项大奖，而那艘宇宙飞船已成为英国维京集团巨亨Richard Branson旗下Virgin Galactic太空旅游公司的蓝本。现今X Prize又将奖励的目标投向了人类基因组测序计划。他们宣布将用1000万美元重奖能够研制出10天内完成100个人类基因组样本测序任务设备的第一支研究小组。到2008年10月，已经有7支参赛队伍交了1000美元的报名费，不过没有一只队伍有获胜的把握。每个日历年度（calendar year）有两个开始比赛的日期，每支参赛队伍必须在开始比赛前至少4个月向大赛委员会证明他们已经做好了一切准备工作，以便通知其他参赛队参加比赛。每个参赛队都会收到100份DNA样品，并要求在10天内完成任务。

参赛队目前普遍使用的方法是芯片测序法。与其它Ansari X Prize不同，本次由政府的实验室和受联邦政府资助的实验室也能参加比赛。

## 参赛团队简介

| 参赛者类别 | 参赛者                                                         | 备注                   |
|-------|-------------------------------------------------------------|----------------------|
| 商业公司  | Roche 454 Life Sciences公司                                   |                      |
|       | 美国VisiGen公司                                                 |                      |
|       | 美国ZS Genomics公司                                             | 开发使用电镜技术进行DNA测序的一家公司 |
| 科研团体  | 美国应用分子进化基金会（Foundation for Applied Molecular Evolution）     |                      |
|       | 美国技术研发机构Reveo                                               |                      |
|       | 英国base4 Innovation机构                                        |                      |
|       | 哈佛大学的George Church组成的私人基因组X团队（the Personal Genomics X team） | 开发出Polonator测序仪      |

按照Archon Prize大奖协调员Michael Timmons的说法，每个基因组测序费用降低的速度正在不断减慢，有些参赛队有可能在两年内完成任务。尽管现在还没有宣布评奖委员会成员名单，像Craig Venter和Leroy Hood这样的人物肯定是会名列其中的。

尽管许多NGS技术还处于研发阶段，但是风险投资人还是坚信NGS技术有着广阔的市场前景。比如上个月，美国Complete Genomics公司也加入了这场技术竞赛之中。他们宣布将在位于美国加利福尼亚州山景城的公司总部设立一个测序中心，该中心专门提供商业化的个人基因组测序服务，不销售测序设备或试剂。他们也是第一个推出该服务项目的公司，而且他们的价格在目前的市场上也是占绝对优势的——测一个人的基因组只需要5000美元。而目前市场上唯一的一家竞争对手，美国Knome公司的价格则高达35万美元。

Complete Genomics公司的投资人Zipkin说道：“这项业务的市场前景大到超乎你的想象，对于各家公司来说都有足够的业务空间。”这项业务也将成为NGS技术最大的利润来源。美国Frost & Sullivan公司的分析师Witonsky则评价道，就好像没有人能预测PCR技术和基因重组技术会给人类带来多么大的影响一样，NGS技术的前途也是不可限量的，NGS技术将给科学界带来一场革命。

另外，传统测序设备销量的不断增长，也从一个侧面说明了NGS的市场潜力有多么巨大。据

Flatley介绍，Illumina公司的新旧技术结合设备的销售额从2007年第一季度的2540万美元猛增到2008年第二季度的4320万美元。虽然公司目前还没有披露具体的设备销售数据，不过这高达70%的增长额肯定是由新一代的测序仪Genome Analyzer II所创造的。

全球DNA测序仪市场经过了数年的销量下滑，现在已开始逐步稳定了。这同时也是测序费用经过几年的降低，已逐步平稳的缘故。今天的高质量DNA测序仪比上世纪90年代进行人类基因组计划时使用的测序仪要快200倍，测一个基因组序列的费用更是只需那时费用的千分之一。由于这些技术上的改进带来的费用减少以及近几年来测序仪市场需求的小量减少，导致了全球DNA测序仪市场的销售额从2003年的12亿美元降到了2006年的8.85亿美元。

由于ABI公司占据了高速测序市场60%的份额，所以分析家就将ABI公司的销售收入作为判断整个市场走向的风向标。2008年ABI公司今年财政年度结束的时候，公司宣布去年销售收入增加了6%，同时，公司宣布将花费67亿美元并购美国Invitrogen公司。

## 7 更新一代测序技术前景如何呢？

风险投资人认为现在还无法知道究竟哪一种测序技术更好。Illumina公司和ABI公司正在为他们的短测序长度测序产品在市场上展开激烈的竞争，454公司则专注于长测序长度的测序产品和传统Sanger测序法产品的市场。Illumina公司最近和迷你焦磷酸测序（minipyrosequencing）公司——Avantome这家源自斯坦福大学基因组技术中心（Stanford University's Genome Technology Center）的科技公司之间的并购，表明他们也将目光投向了长测序长度的产品市场，尽管这本不在他们的计划之中。

就商业经营模式以及市场竞争而论，公司要发展新型技术平台也需要克服一系列的困难。由于NGS技术会对市场造成根本性的变革，所以在新市场中，现在的业界领袖就有可能失去其领先者的地位。就好像随着技术的进步，10万美元个人基因组目标的实现，更快、更便宜的新设备也就开始进入了市场。

### 以新测序设备取代旧设备的公司及其产品

| 公司         | 旧产品（被淘汰）          | 新产品（受重视）           |
|------------|-------------------|--------------------|
| Illumina公司 | Genome Analyzer I | Genome Analyzer II |
| 454公司      | GS FLX系统          | 升级版GS FLX系统        |
| ABI公司      | 第二代测序仪SOLiD       | 第三代测序仪——SOLiD 3    |

在这场市场竞争中获胜的关键就取决于如何让自己的新产品更快、更有效地占领市场。Witonsky认为在这些NGS技术的市场定位问题上最重要的是如何做得更大，尤其要关注它们在医疗保健领域的应用。

拥有不同产品系列的大公司有巨大的利润空间，因此能保证他们有充足的资金开发新技术、新产品以及开拓新市场。

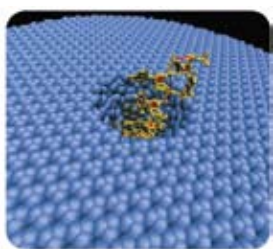
美国Sequenom公司的首席科学家Charles Cantor认为，对于1000美元个人基因组计划来说，可能还得等到纳米通道测序技术（文后小词典）成熟的那一天才能实现。纳米通道测序技术相比其它测序技术速度更快、因此更加适合做高通量的测序工作。

不过，他也强调，纳米通道测序技术的完善还需要好几年的时间。这些所谓的“新世代测序技术（next, next generation）”有望能在1000美元个人基因组时代大展拳脚。Sequenom公司就是一家致力于研究纳米通道测序技术以及其它各种互补技术的公司，不过Cantor也同意未来的测序应该是由几种测序方法结合来进行的。

测序设备供应商应该将现在的市场成长历程作为他们的参考资料，例如PCR的商业化历程。

没人知道将来会发生什么，只能等待事情的发生，不过随着技术的进步，未来的市场会和今天的市场有很大的不同。

原文检索：Amy Coombs. (2008) The sequencing shakeup, *Nature Biotechnology* 26 (10): 1109-1112.



图片说明：DNA以及纳米通道。

图片来源：Johan Lagerqvist

## 小词典

## 纳米通道技术 (nanopore method)

纳米通道技术是近年来发展的一种直接解读核酸分子编码信息的新方法,它通过将单链核酸上的核苷酸序列直接转化为电信号,能以每秒超过1000个碱基的速度对其进行超快速序列分析,较现有测序方法更简便快速和省钱。该技术除可用于核酸超快速外,还在病原体基因诊断、单核苷酸多态性和样品多成分的快速检测等多个领域有重要用途。纳米通道直径约为10到20纳米之间,长度为数百纳米,它们是由内部结合了单链DNA的硅质通道构成的。每个通道都在一个很薄的硅膜上制造,然后放入含有DNA的液体中。由于DNA是带负电的,跨膜施加一个电压就会造成遗传物质穿过通道。科学家发现那些和通道内部附着的DNA完全匹配的DNA能更快速的移动,并且穿过孔的数量也更大。能通过测量通道的电流大小来确定特定DNA链的移动。本质上而言,可以利用特殊的信号脉冲作为特定DNA移动的结果。当液体中的DNA能和通道内的完美匹配时,电流脉冲要比哪怕只有一个基不匹配时都要短促得多。这一技术能快速探测DNA分子,并且不需要任何标记分子,它有望用于很多DNA检测领域。

科研综述 研究前沿 热点话题  
 技术方法 专题译述 生命百态  
 会议展览 教学视频



www.LifeOmics.com