



# Методы молекулярно-генетической диагностики

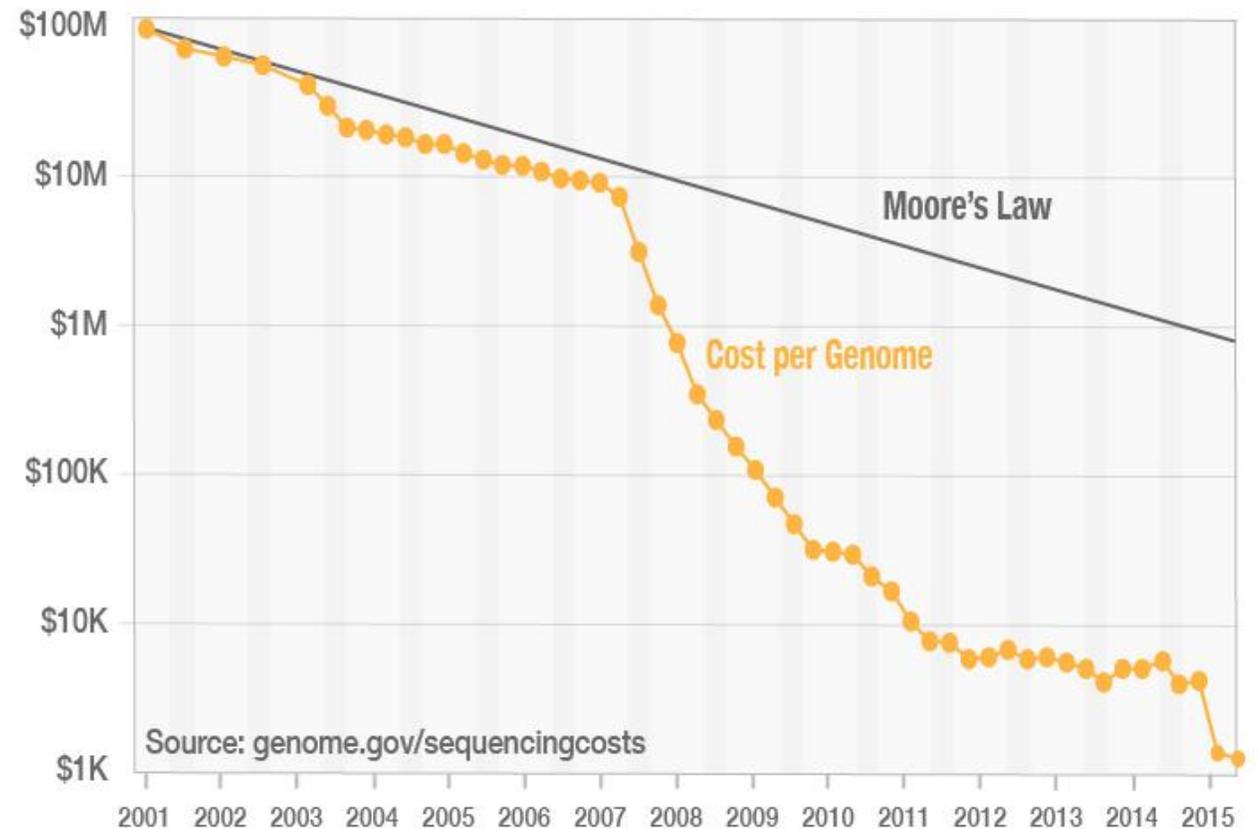
---

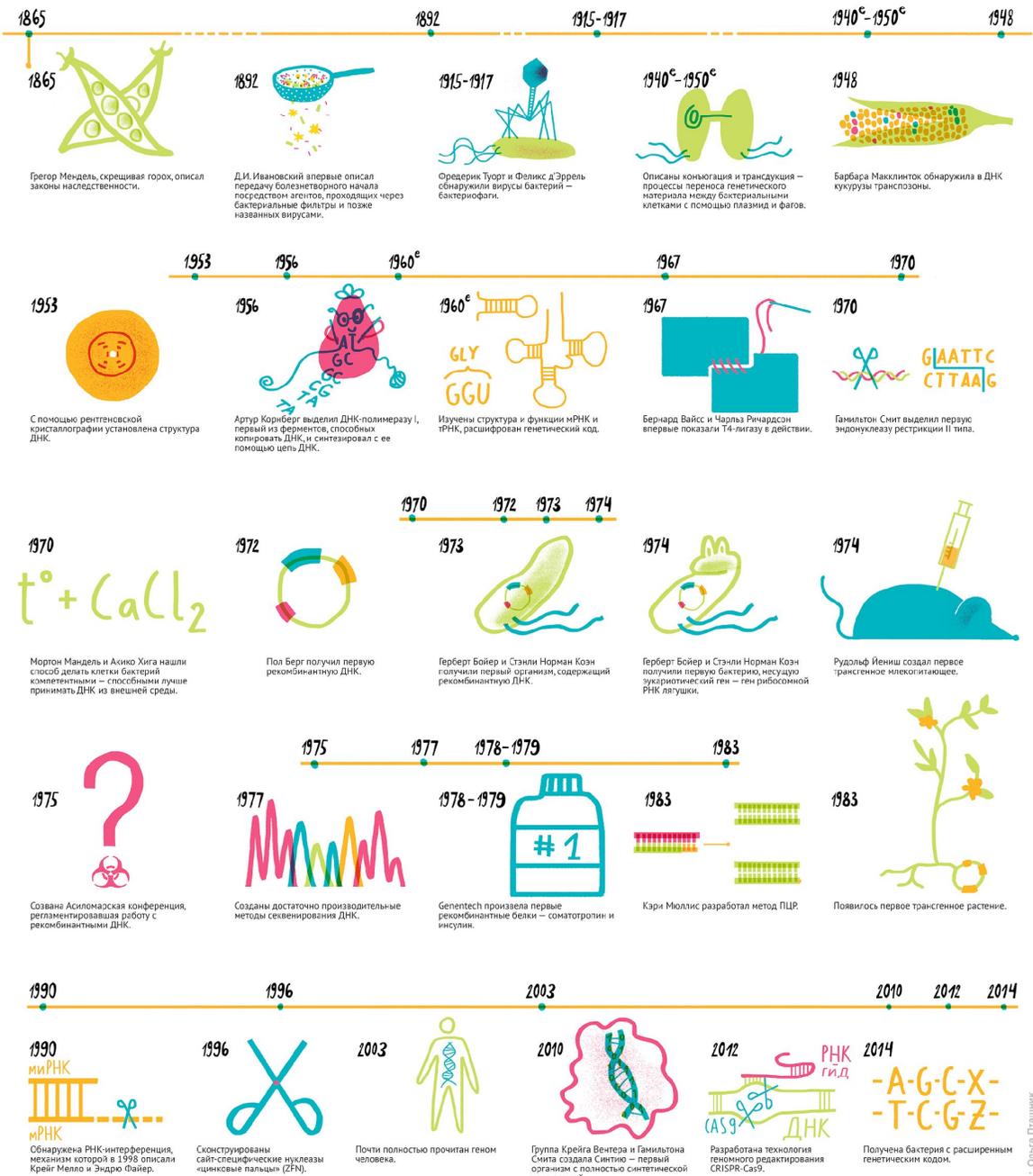
Заведующий лабораторией  
**Пьянков Денис Валерьевич**

2020

# Индустрия генетического тестирования

- 2019: 13 billion USD
- CAGR 2020-2026: 12%







Крейг Мелло и Эндрю Фаер. «цинковые пальцы» (ZFN).



Гордон Смит и Стэнли Митчелл. Первый полностью синтетический организм с синтетической ДНК. CRISPR-Cas9. Биоспекуляция.

Биоспекуляция



ДНК



ПРАЙМЕРЫ



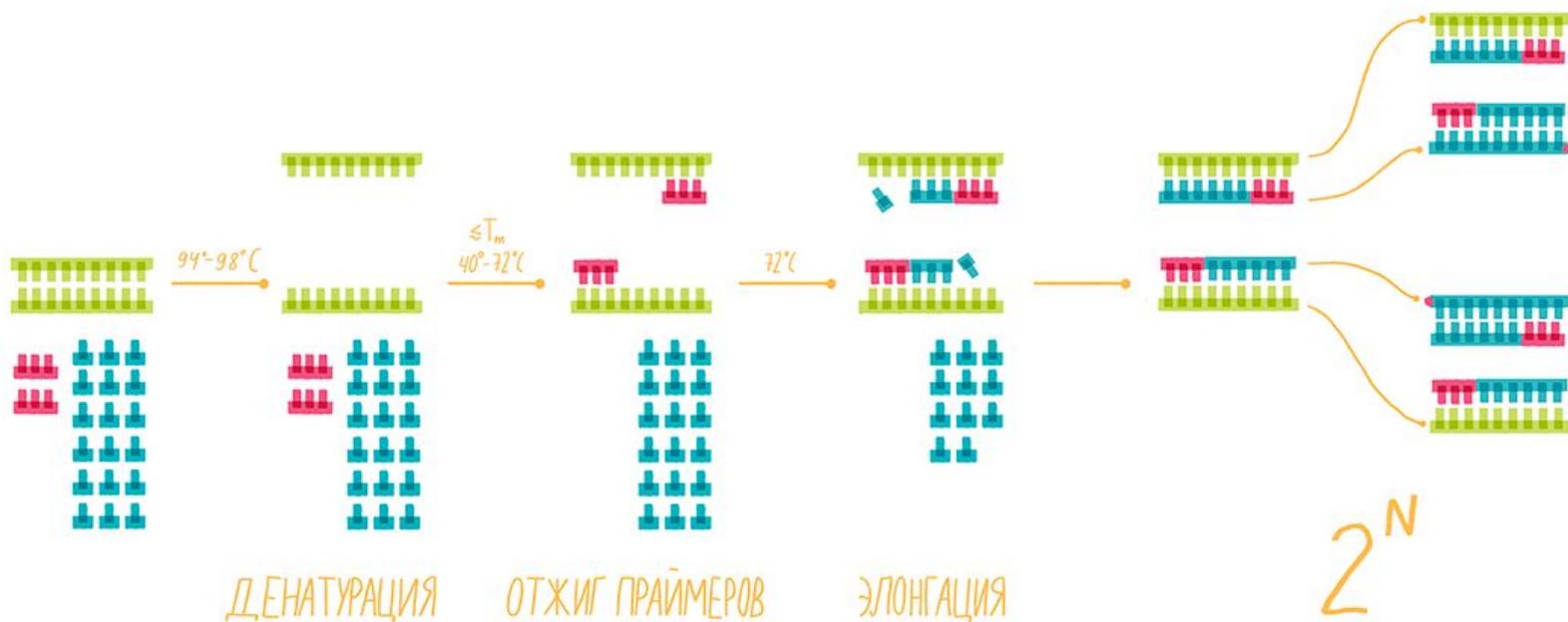
НУКЛЕОТИДЫ



ДНК-ПОЛИМЕРАЗА



РАСТВОР

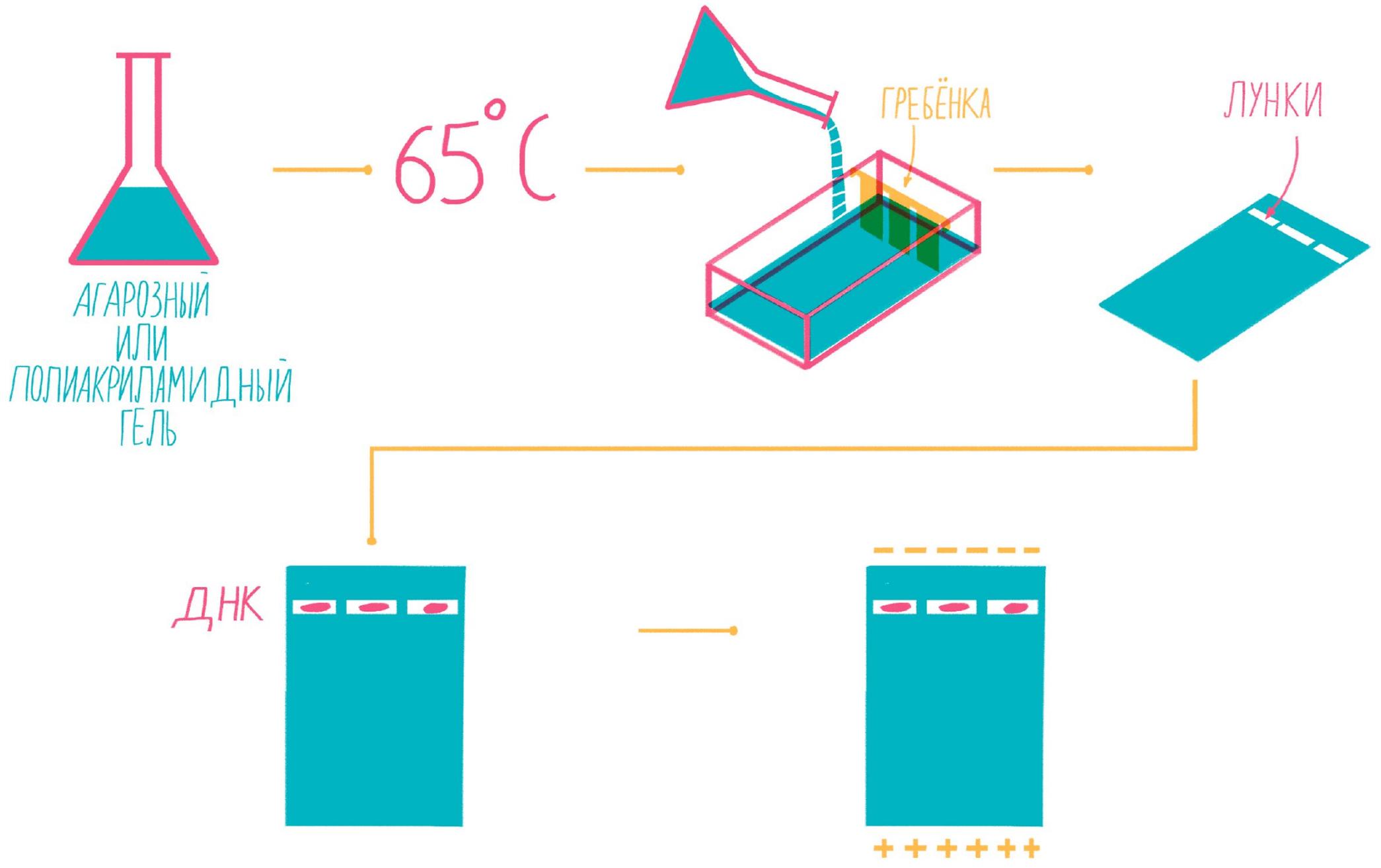


В конечном итоге получается  $2^n$  молекул ДНК, где  $n$  – количество циклов.

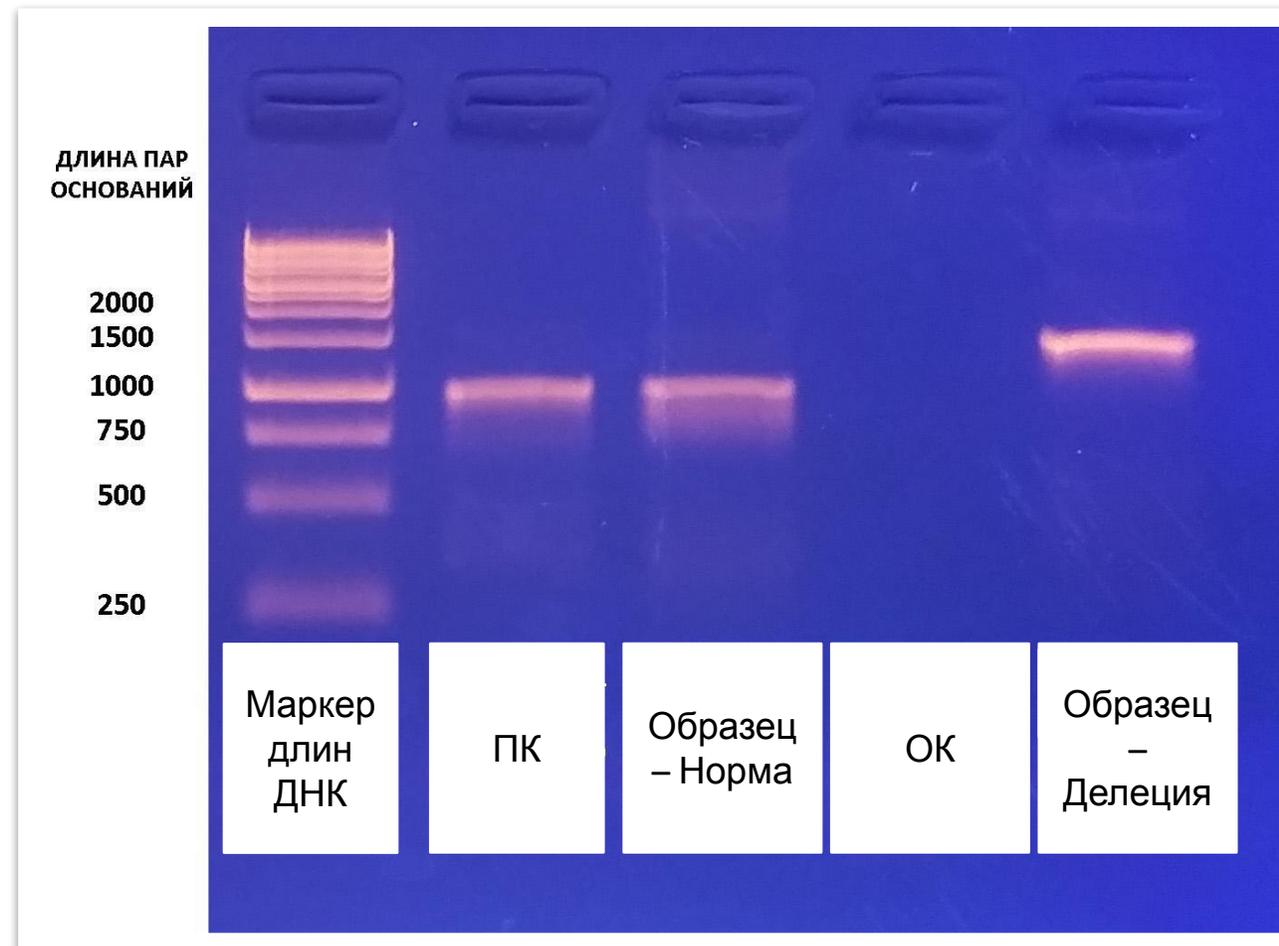
Все этапы от выделения ДНК до получения результатов занимают 2-3 часа.

Длина продукта реакции составляет от 50 – 20000 п.о.

Цена реакции крайне мала.

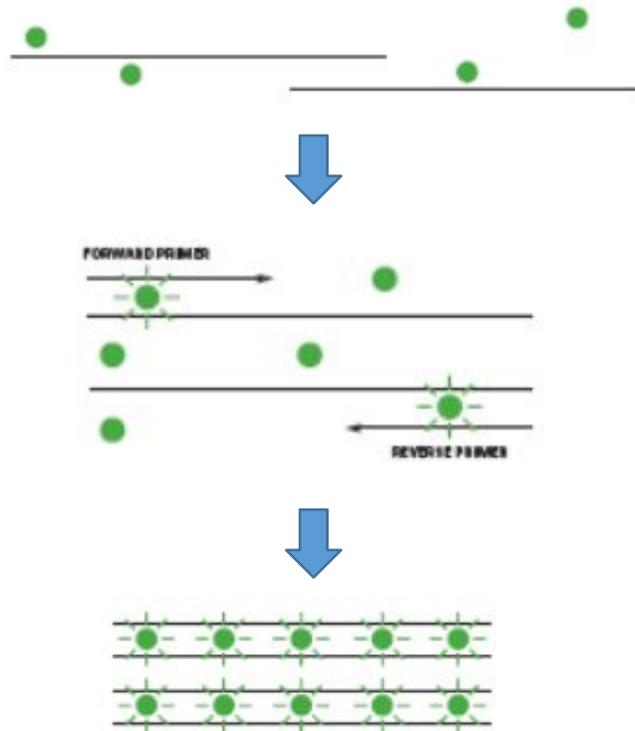


# Полимеразная цепная реакция



# ПЦР в реальном времени

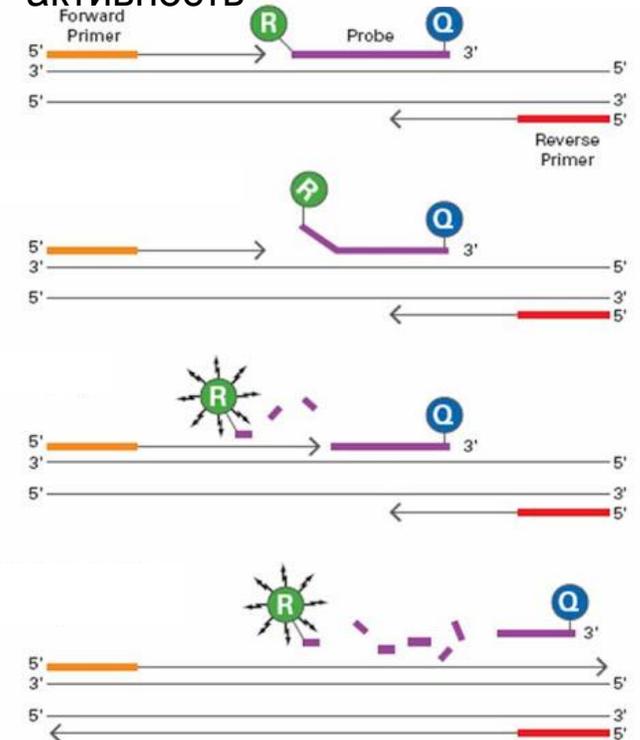
- Интеркалирующий краситель



- Флуоресцентные зонды

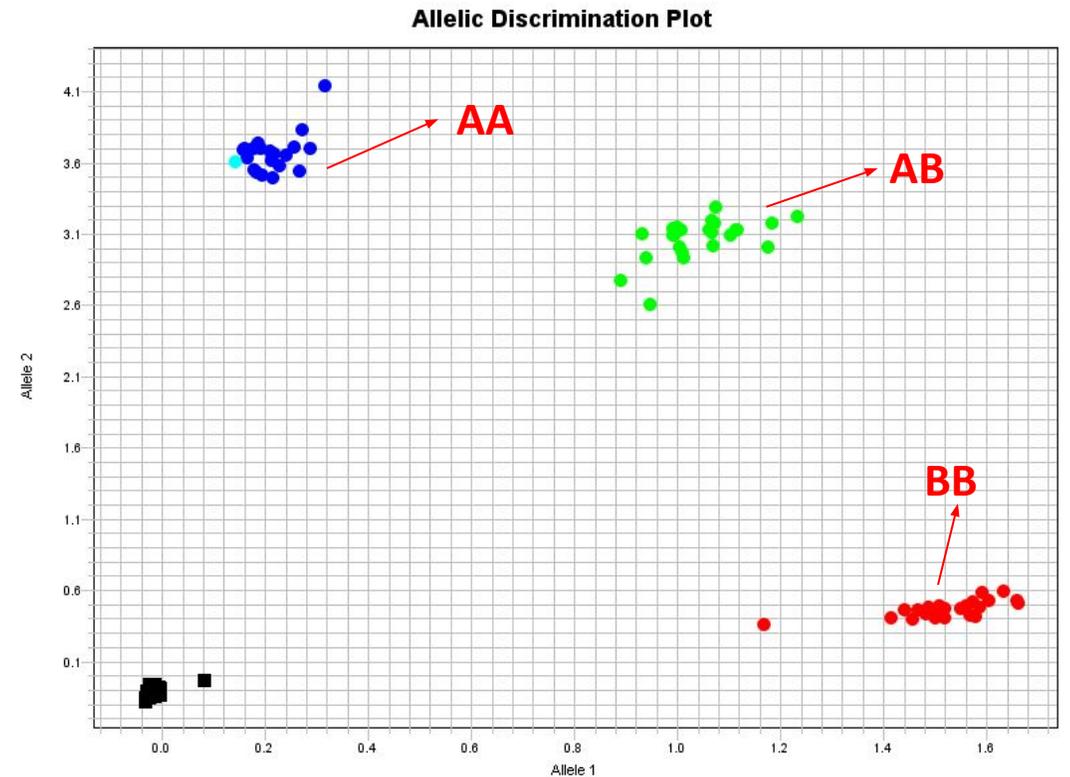
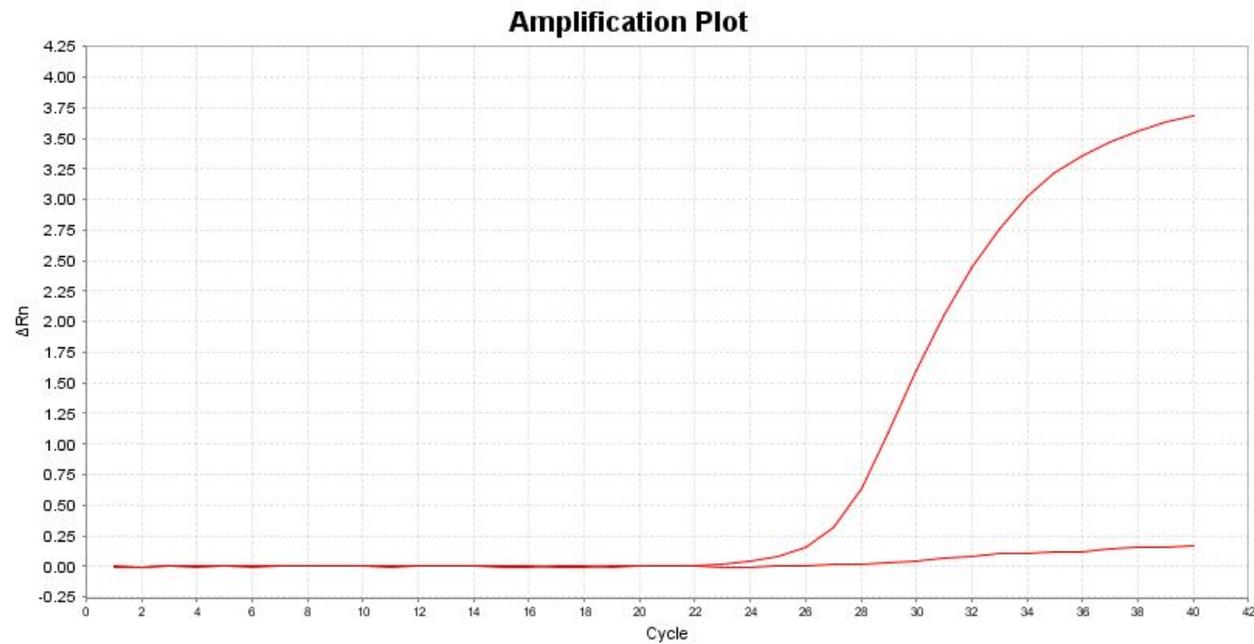
5'–3' экзонуклеазная

активность



Длина продукта реакции составляет от 75 – 200 п.о.

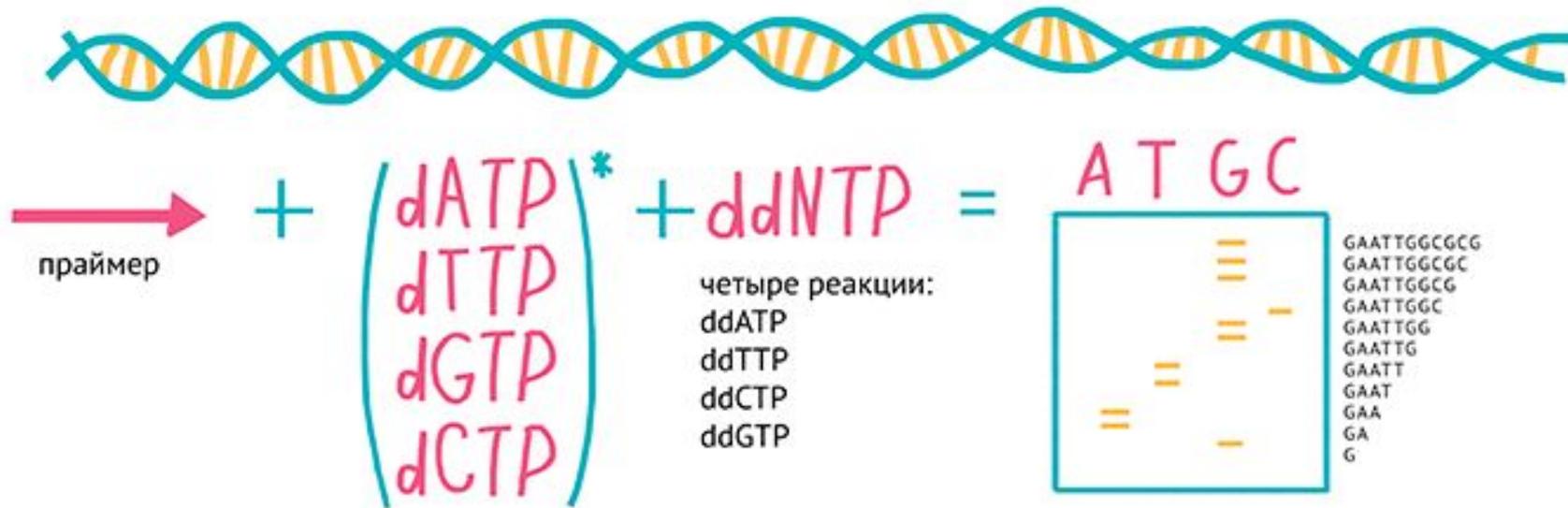
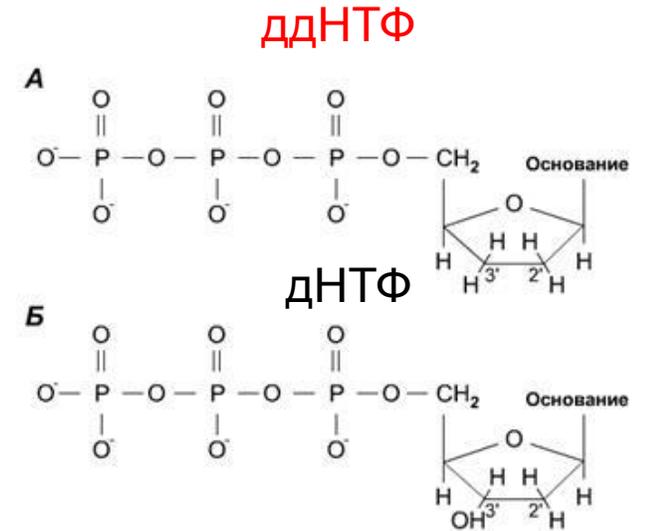
# ПЦР в реальном времени



- Определение однонуклеотидных полиморфизмов

# Секвенирование по Сэнгеру

- Золотой стандарт
- Метод «флуоресцентно-меченых терминаторов»



# Секвенирование по Сэнгеру



3130/3130xL  
4/16 капилляров



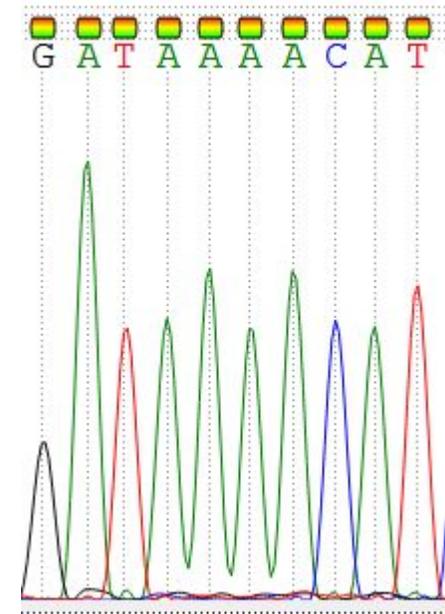
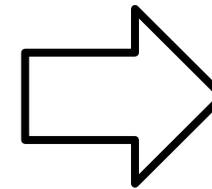
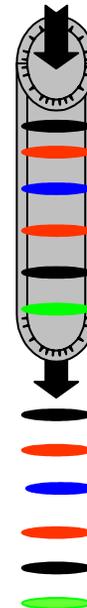
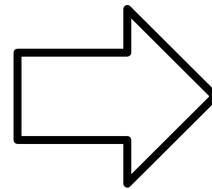
SeqStudio  
4 капилляра



3500/3500xL  
8/16 капилляров

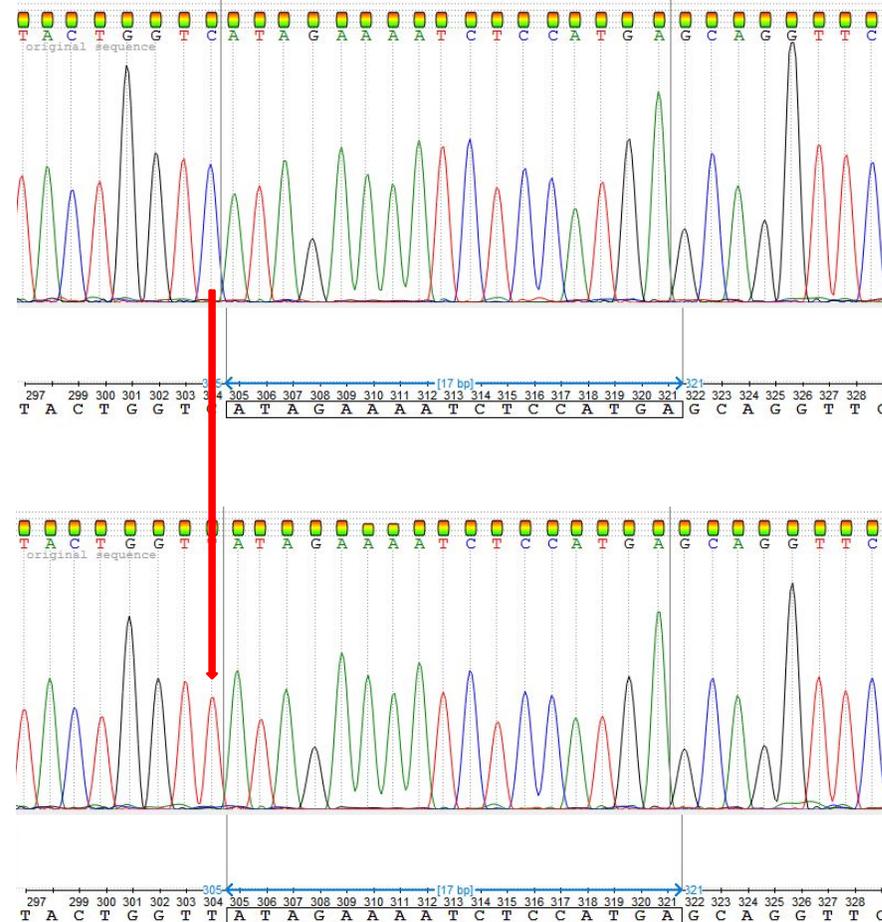
# Секвенирование по Сэнгеру

Автоматический капиллярный электрофорез



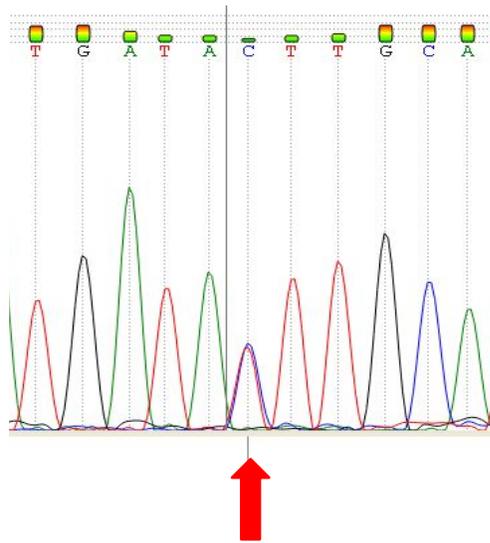
# Секвенирование по Сэнгеру

Вариант chr7:103159789 C>T,  
RELN выявлена в  
гомозиготной форме

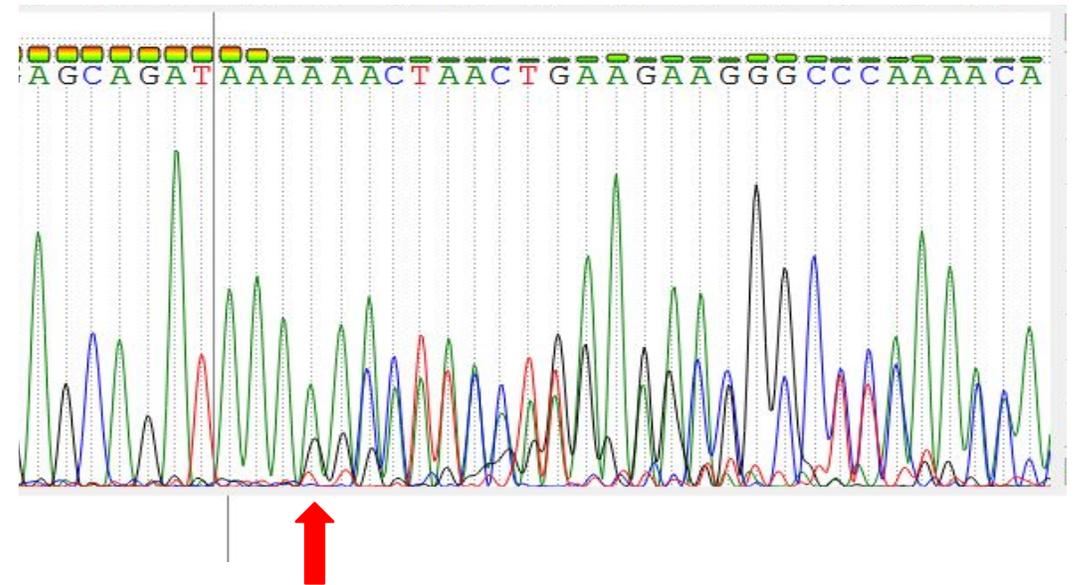


# Секвенирование по Сэнгеру

chr12:112915524 A>G, PTPN11 в гетерозиготной форме



chrX:70444013 CT>C, GJB1 в гетерозиготной форме



# Секвенирование по Сэнгеру

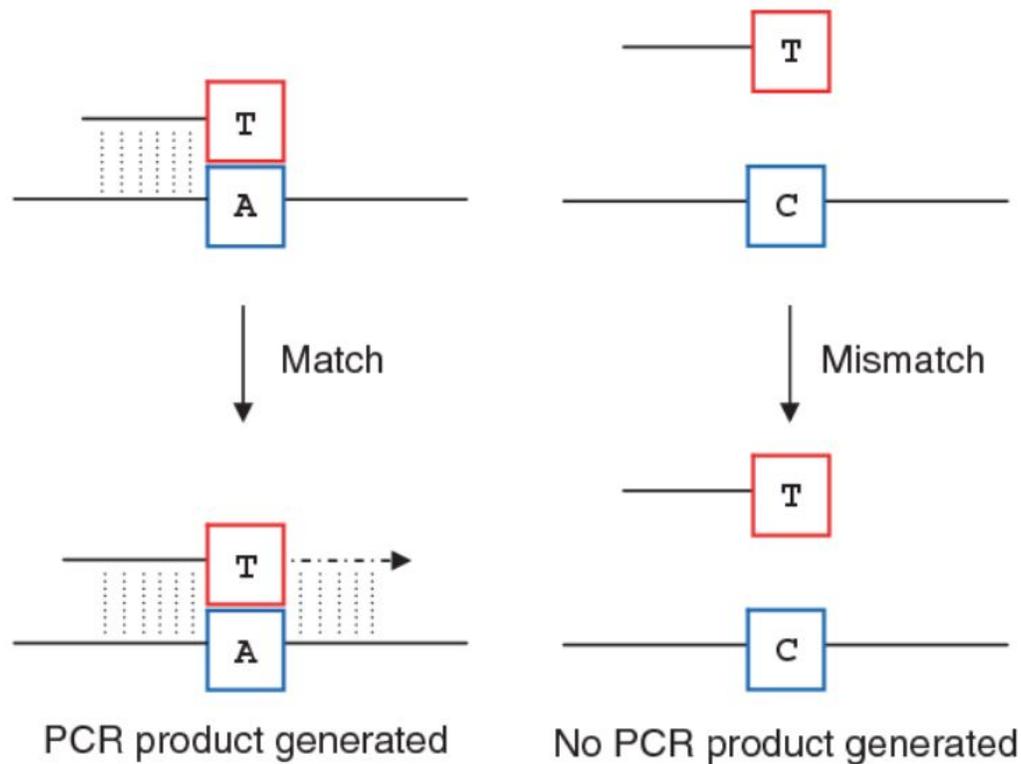
---

Этапы подготовки образцов:

- Выделение ДНК – 1 час
- Подбор праймеров – 1 час
- Синтез праймеров – 2-4 дня
- Подбор оптимальной температуры отжига – 1-3 часа
- Амплификация необходимого фрагмента и его очистка – 2 часа
- Амплификация перед секвенированием с дидезоксинуклеотидами и секвенирование – 24 часа



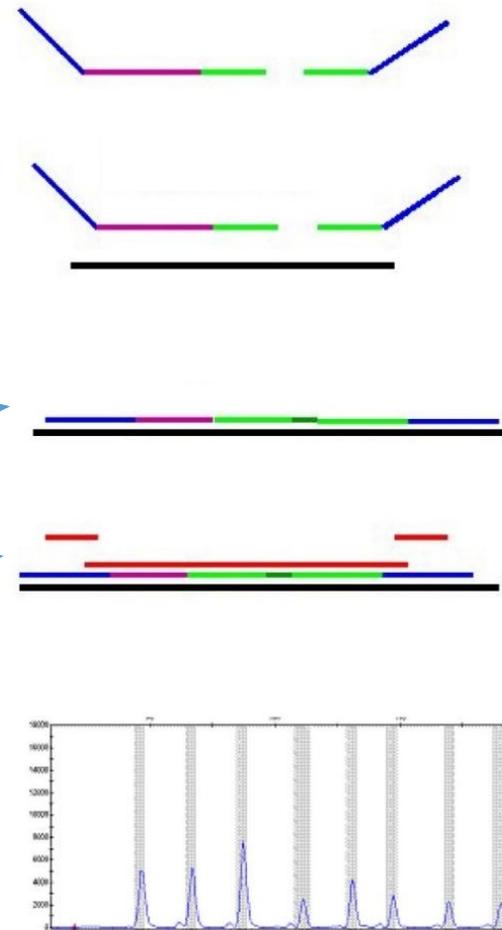
# Секвенирование по Сэнгеру



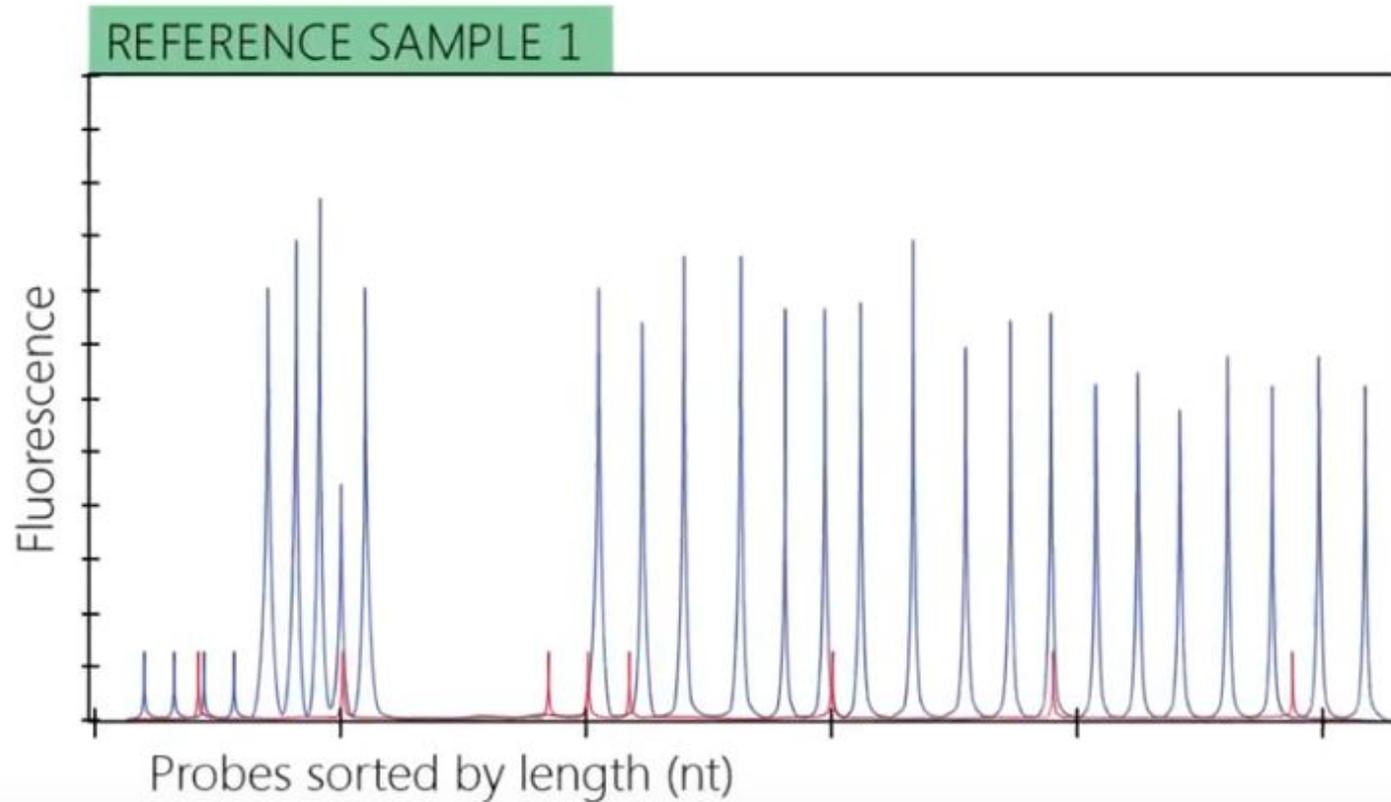
Аллель специфичные праймеры - при попадании однонуклеотидного полиморфизма в 3' область праймера

# Мультиплексная амплификация лигаз-связанных проб Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

- Денатурация (минуты)
- Гибридизация (16-20 часов)
- Лигирование (20 минут)
- ПЦР (1,5 часа)
- Фрагментный анализ (2 часа)



# Мультиплексная амплификация лигаз-связанных проб Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)



# Мультиплексная амплификация лигаз-связанных проб

## Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

---

### Плюсы:

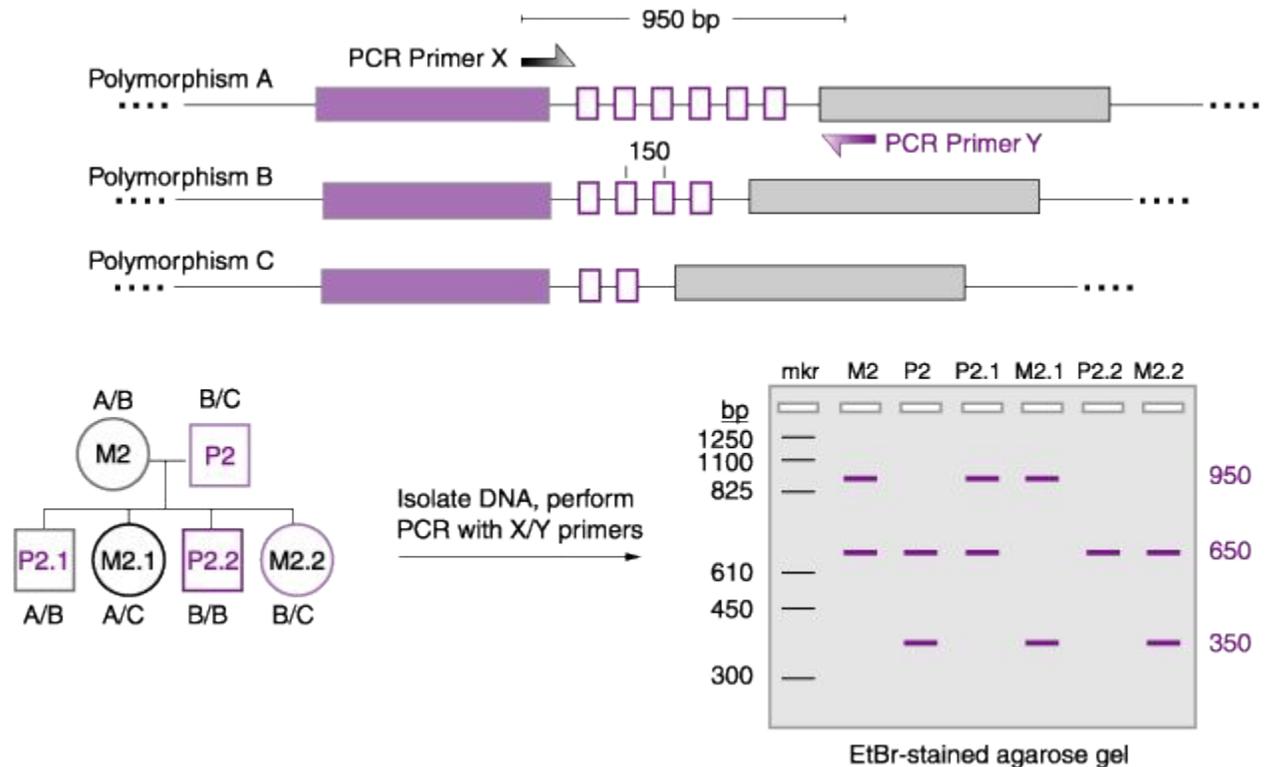
- Позволяет одновременно детектировать большое количество мутаций или наличие/отсутствие определенных участков ДНК (до 50) (SNP, делеции, дупликации, число копий генов, анализ метилирования, анеуплоидии)
- Позволяет работать с деградировавшей ДНК
- Низкая стоимость реакции

### Минусы:

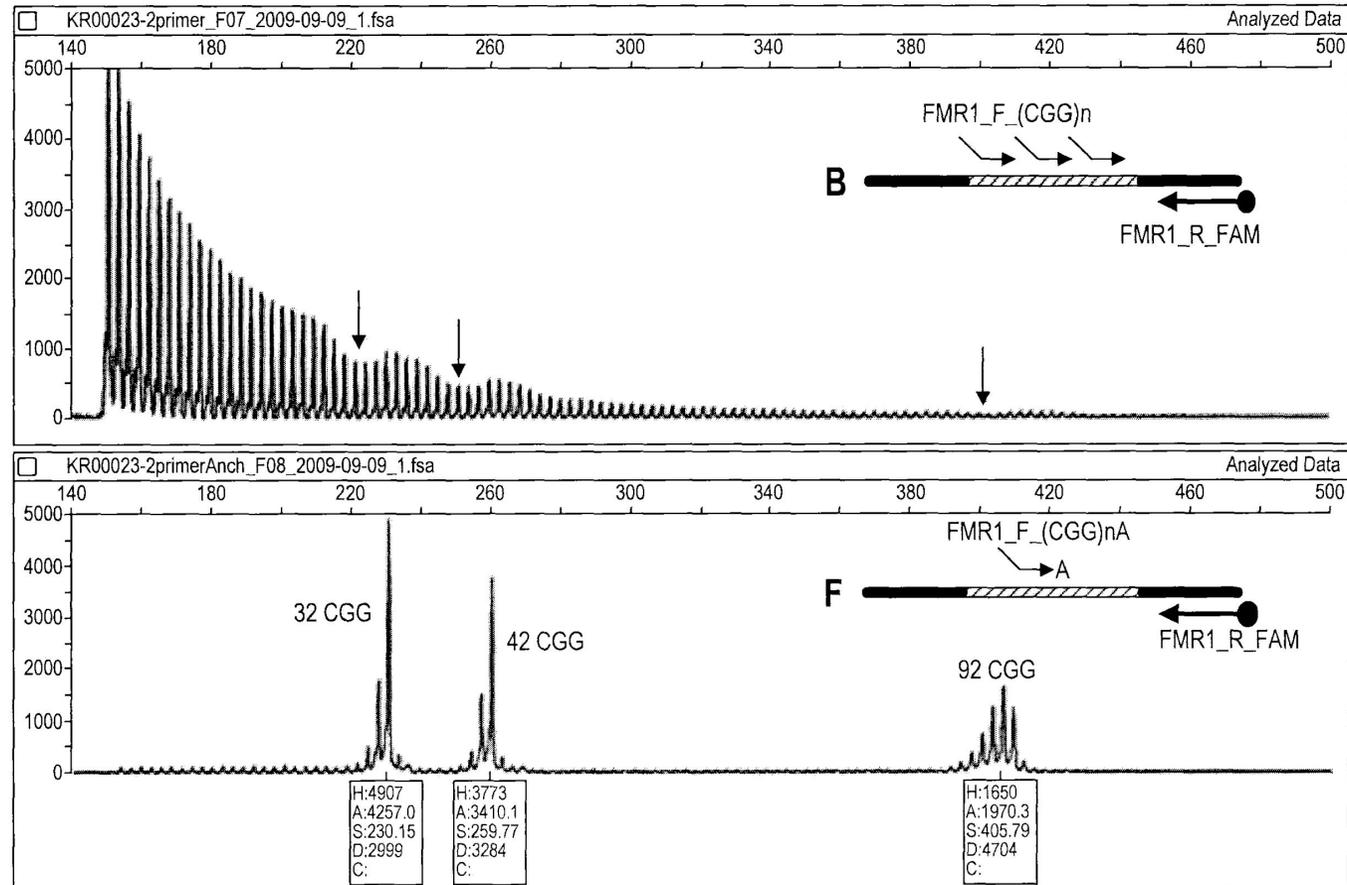
- Необходимо иметь коммерческие готовые наборы
- Сложность и длительность в разработке
- Нет возможности определять сбалансированные транслокации

# Методы анализа длины тринуклеотидных повторов

- Основным методом является ПЦР-анализ полиморфных повторов с последующей визуализацией продуктов амплификации. ПЦР проводят с использованием праймеров, которые фланкируют область повтора.
- Далее следует либо электрофорез, либо фрагментный анализ.



# Методы анализа длины тринуклеотидных повторов



Фрагментный анализ образцов пациента с Синдромом Мартина — Белла



# Полногеномные методы исследования

---

# Общие принципы подготовки библиотек

**XM**

**A**

**NGS**

- Выделение геномной ДНК
- Фрагментация ДНК
- Лигирование адаптеров
- ПЦР
- Полногеномное секвенирование
- *Обогащение*
- *Таргетное секвенирование*
- Фрагментация
- Окрашивание - мечение
- Гибридизация на чипах
- Промывка, мечение
- Сканирование



# Выделение нуклеионных кислот

- Лизис клеток
- Разделение фаз ц/ф
- Экстракция

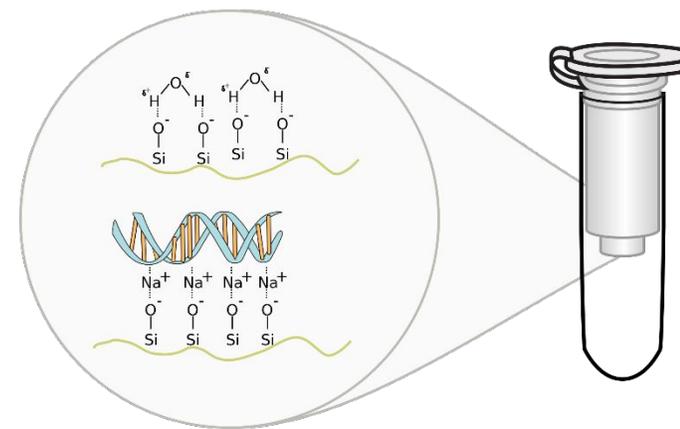
## Очень важный этап!

- От 30 минут до 2 суток
- Очень важно выделить качественную ДНК
- Необходимо предоставлять биологический материал
- Обязательно взаимодействие с лабораторией исполнителем при предоставлении Д

$A_{260}/280 = 1,8$

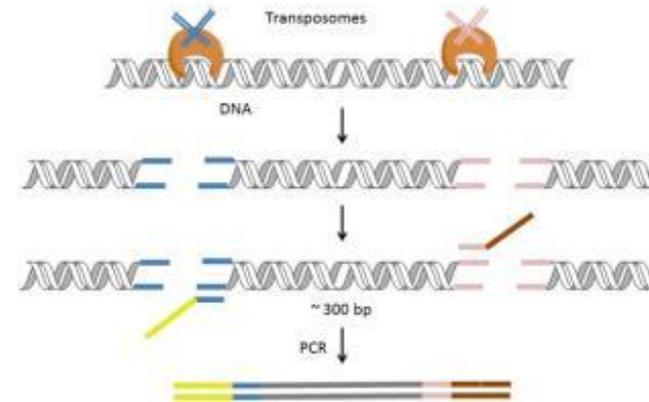
[C]: от 50 нг/мкл (Qubit)

V: от 20 мкл



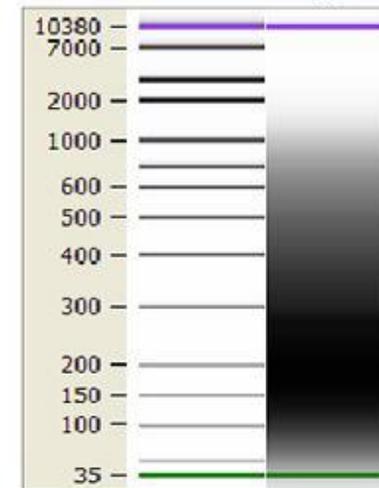
# Высокопроизводительное секвенирование

- Фрагментация ДНК
- Лигирование адаптеров
- ПЦФ

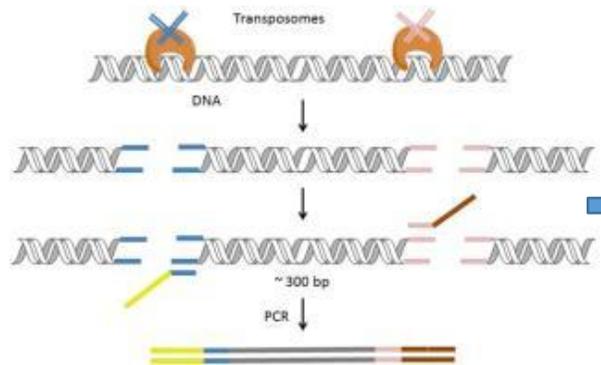


## Очень важный этап!

- Необходимо получить смесь фрагментов ДНК в определенном диапазоне длин (оценить на форезе)
- Больше всего ошибок на стадии фрагментации

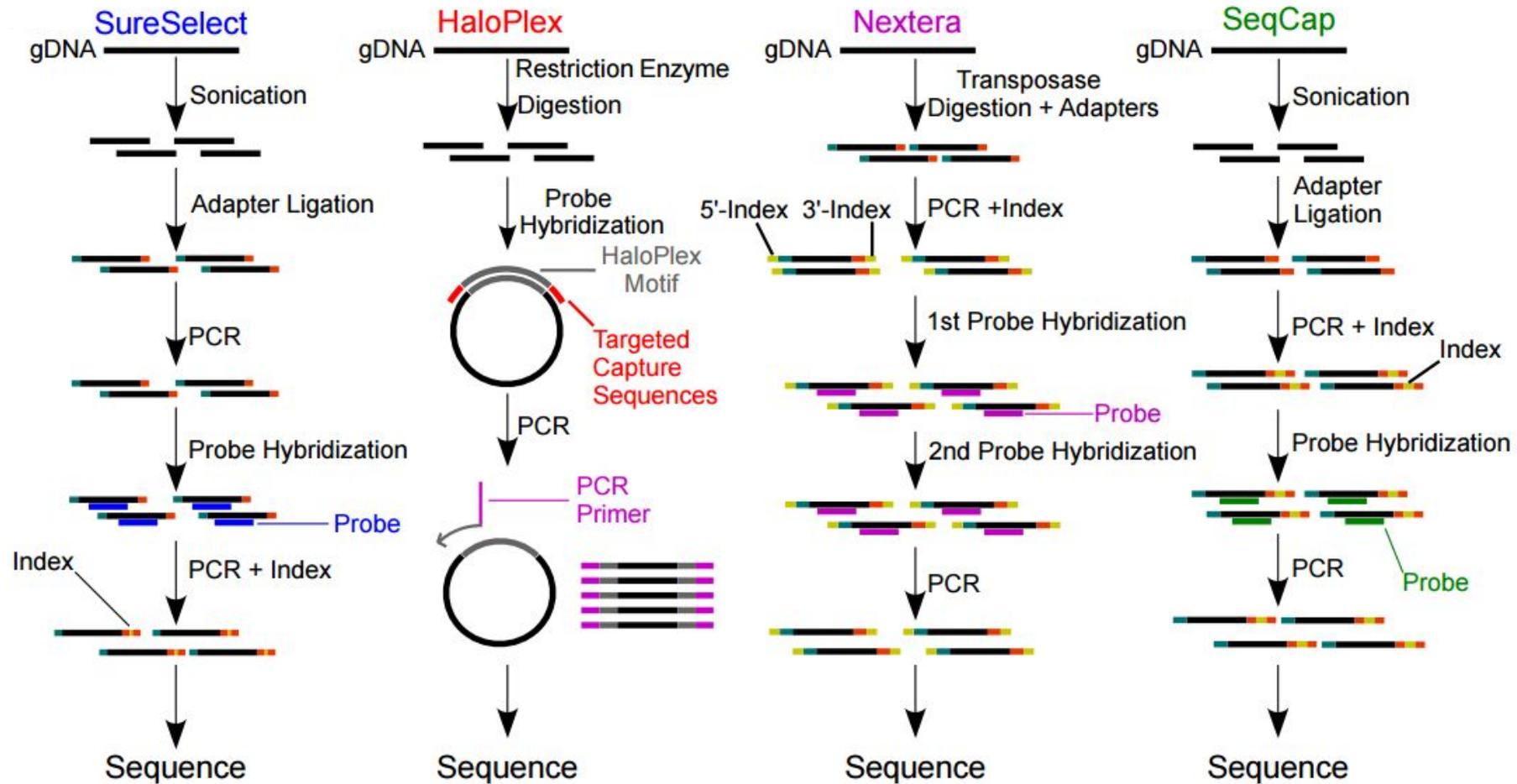


# Высокопроизводительное секвенирование



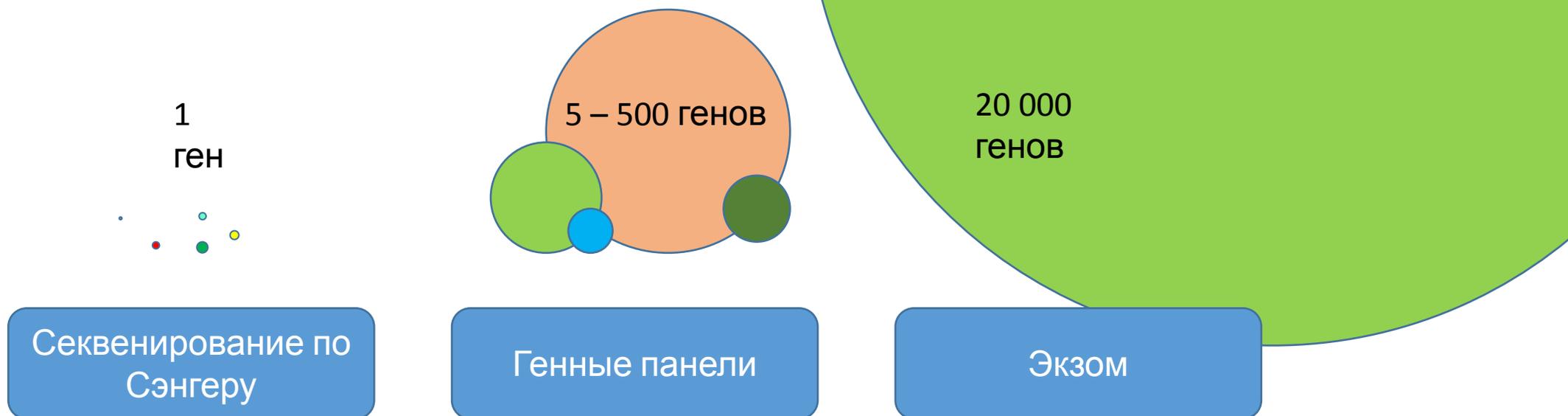
Секвенируем то, что хотим проанализировать. Обогащаем

# Высокопроизводительное секвенирование

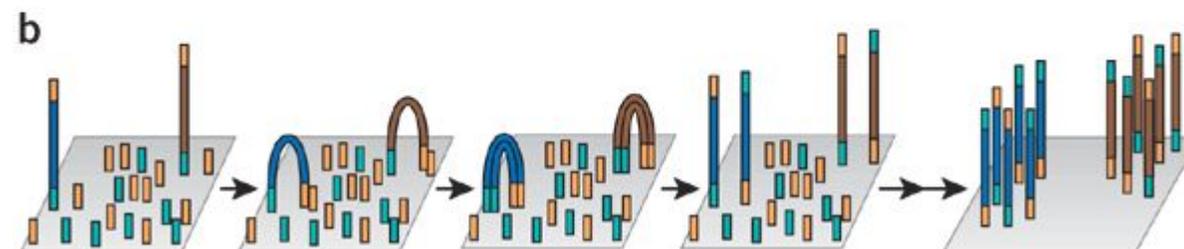
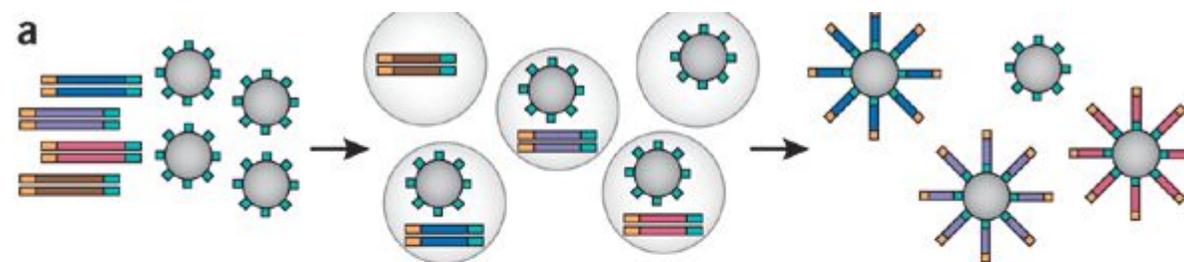
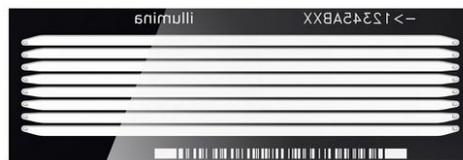


Многим пациентам молекулярный диагноз не может быть поставлен другим способом в разумные сроки и при разумных затратах.

Причины: генетическая гетерогенность, отсутствие частых мутаций, крупные гены.



# Высокопроизводительное секвенирование





# Высокопроизводительное секвенирование

## Illumina:

- Точность сопоставима с секвенированием по Сэнгеру, 0.1%
- Очень высокая производительность
- Низкая стоимость на нуклеотид
- Парные прочтения
- Дорогие приборы и реактивы
- Долгий процесс секвенирования

## Life Technologies:

- Быстрый секвенс
- Высокая производительность
- Длина прочтений может достигать 400 п.н.
- Гомополимеры
- Точность 1%
- Нет парных прочтений

Одна из причин ограничений метода – прочтения 150-400 п.н.

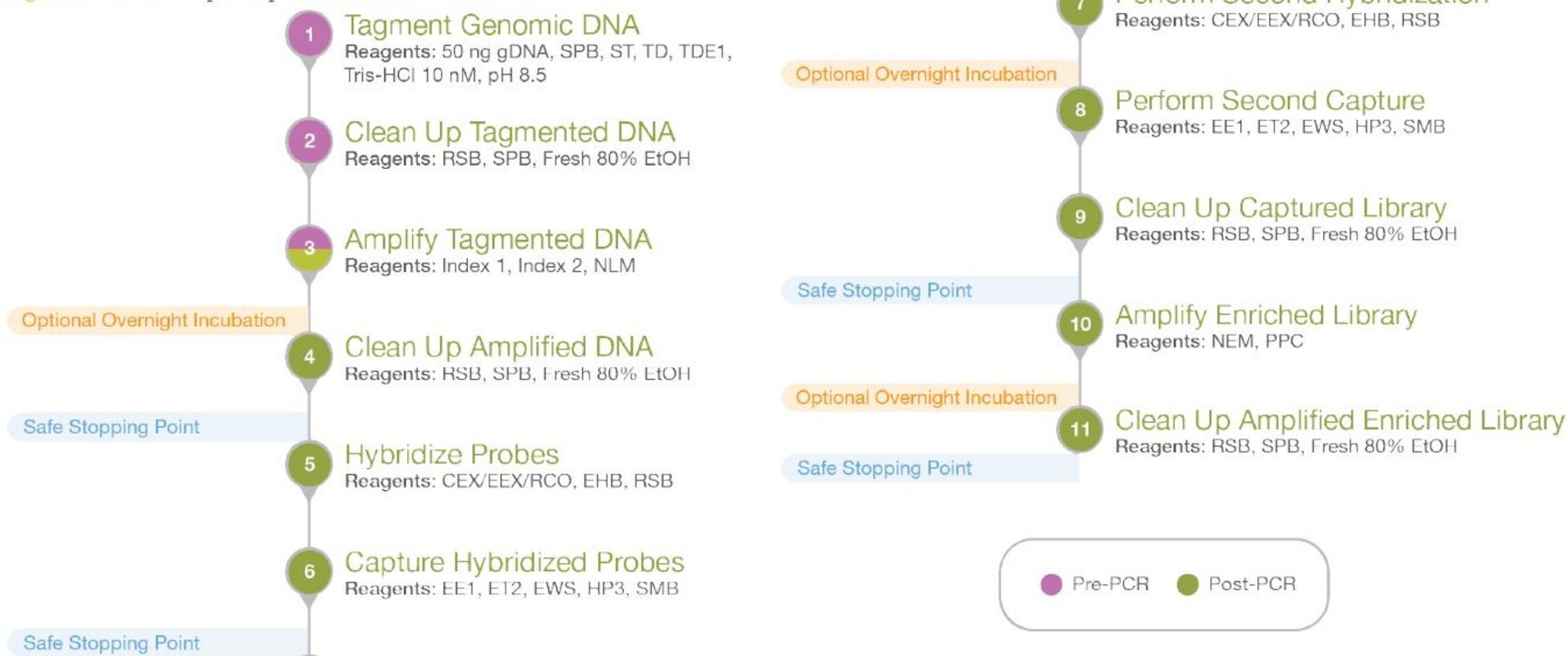
# Высокопроизводительное секвенирование

---

- Повторы
- Покрытие <10x
- Сбалансированные транслокации, инверсии
- То, что не покрыто панелью
- CNV

# NGS: почему так долго?!

Figure 1 Nextera Rapid Capture Enrichment Workflow



А потом секвенирование 1-2 суток...

...обработка данных 1-2 суток...

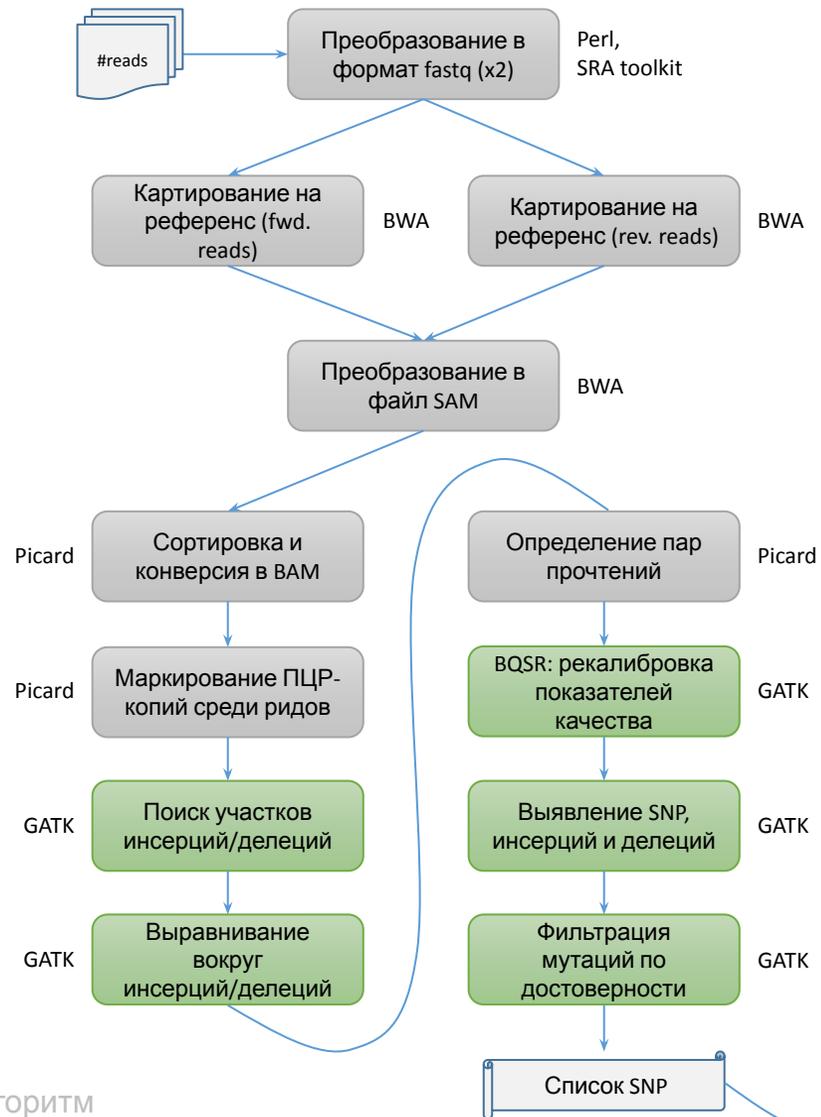
От получения биоматериала до готовых к анализу данных  
примерно 7-10 дней (если все хорошо)

# Высокопроизводительное секвенирование

- Секвенировать 1 образец – глупо
- Собирается «пул» образцов, каждый из которых баркодируется. Все это смешивается в одну пробирку и секвенируется вместе
- Одновременно в лаборатории процессируется огромное количество образцов
- Различные контроли качества - QC
- Много моментов, на которых что-то может пойти не так...



# Обработка данных



Алгоритм  
GATK  
best practices

## АННОТАЦИЯ

### Популяционные частоты:

- «1000 геномов»
- ESP6500
- Exome Aggregation Consortium (~60 000 чел.)

### Функциональная аннотация по всем транскриптам гена (RefSeq)

### Предсказание патогенности:

- SIFT, PolyPhen2 и др. – для замен аминокислот
- Интегрированные показатели (SVM, LR)

### Эволюционная консервативность

### Обнаружение в качестве соматических мутаций при опухолях (COSMIC)

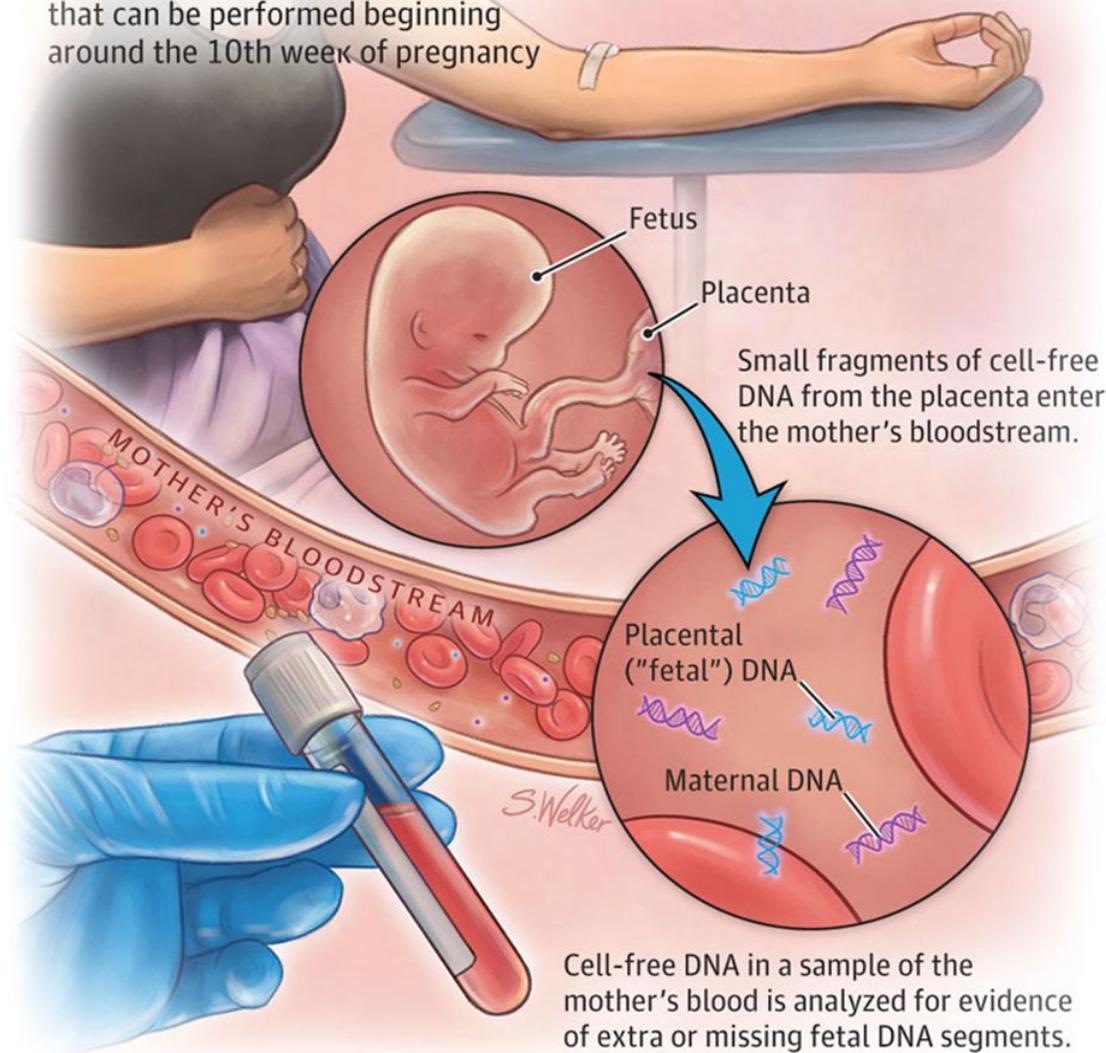
### Клиническая аннотация (ClinVar, HGMD, другие базы)

## Система Genexus – новое решение от Thermo Fisher Scientific для КЛИНИК



## Noninvasive Prenatal Testing (NIPT)

NIPT is a prenatal screening test that can be performed beginning around the 10th week of pregnancy



**НИПТ** – метод для оценки риска хромосомной патологии у плода.

Анализ выполняется по ДНК плода, выделенной из крови матери

## ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Определение принадлежности каждого фрагмента соответствующей хромосоме, подсчет их количества и статистический анализ



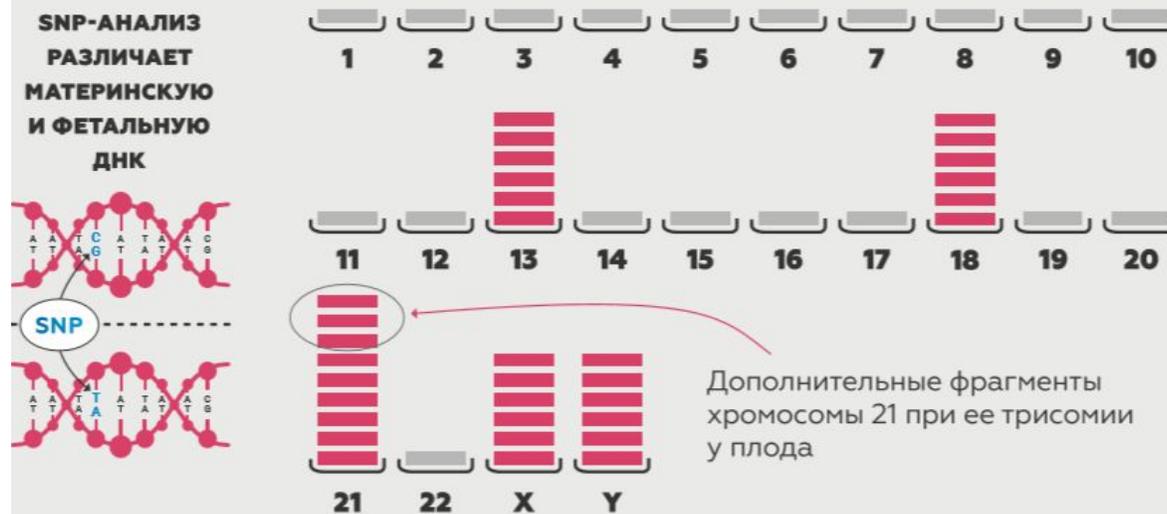
Panorama



НИПС

## ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Для расчета риска хромосомной патологии используются только фрагменты вДНК плода.



Различие в количестве хромосомных фрагментов при трисомии составляет  $\approx 50\%$

# ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ

Молекулярный профиль опухоли

Жидкостная биопсия представляет собой метод диагностики соматических мутации в циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) в крови пациента

Откуда берется циркулирующая ДНК?



В процессе некроза и апоптоза как нормальных клеток организма, так и опухолевых клеток фрагменты ДНК высвобождаются из ядра и могут попадать в кровоток.

Такую свободно циркулирующую в крови ДНК можно детектировать, выделять и изучать!

Проведение жидкостной биопсии может быть рекомендовано следующим пациентам:

- Пациентам с диагностированным раком в случае отсутствия материала опухоли с целью поиска мутаций и подбора оптимальной терапии.
- Пациентам в процессе лечения для диагностики мутации, обуславливающих резистентность к таргетной терапии (мутация T790M в гене EGFR)
- Пациентам после удаления опухоли или в стадии ремиссии с целью мониторинга и раннего выявления возможного рецидива

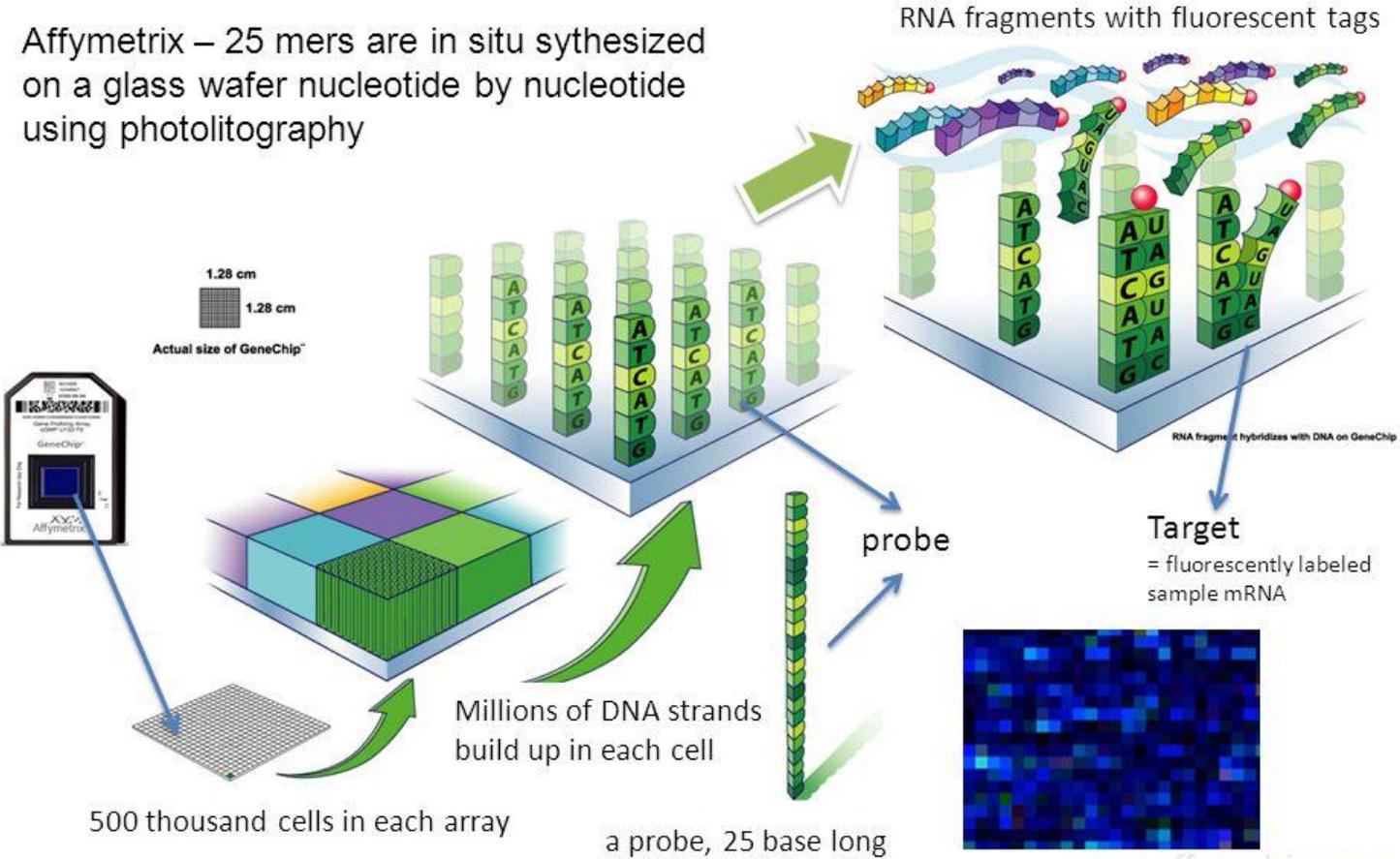
Срок выполнения: 10-14 рабочих дней

# Микроматричный анализ

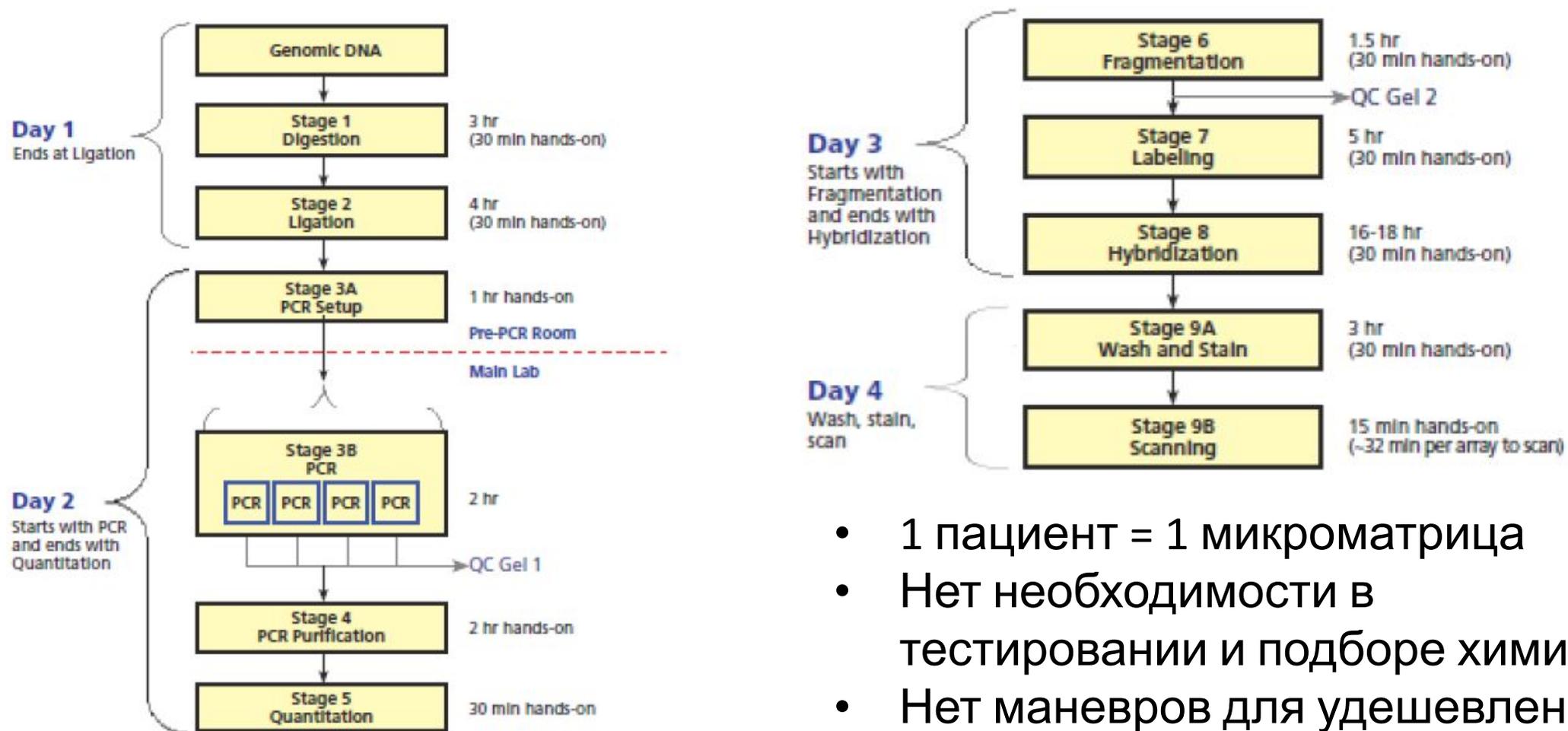
## Affymetrix Microarrays

photolithographic synthesis of oligonucleotide on microarrays

Affymetrix – 25 mers are in situ synthesized on a glass wafer nucleotide by nucleotide using photolithography



# Микроматричный анализ



- 1 пациент = 1 микроматрица
- Нет необходимости в тестировании и подборе химии
- Нет маневров для удешевления процесса путем оптимизации

Chromosomal microarray analysis (Thermo Fisher). 11024 samples processed to date

MCA

MR/ID

ASD

Epilepsy

RPL

Ultrasound  
markers

Cancer

Blood

CVS

Amnio

Cord blood

FFPE

Tissue

POC

HD

750K

Optima

OncoScan

XON

CNVs

Triploidy

Mosaicism

Tumor markers

LOH/AOH

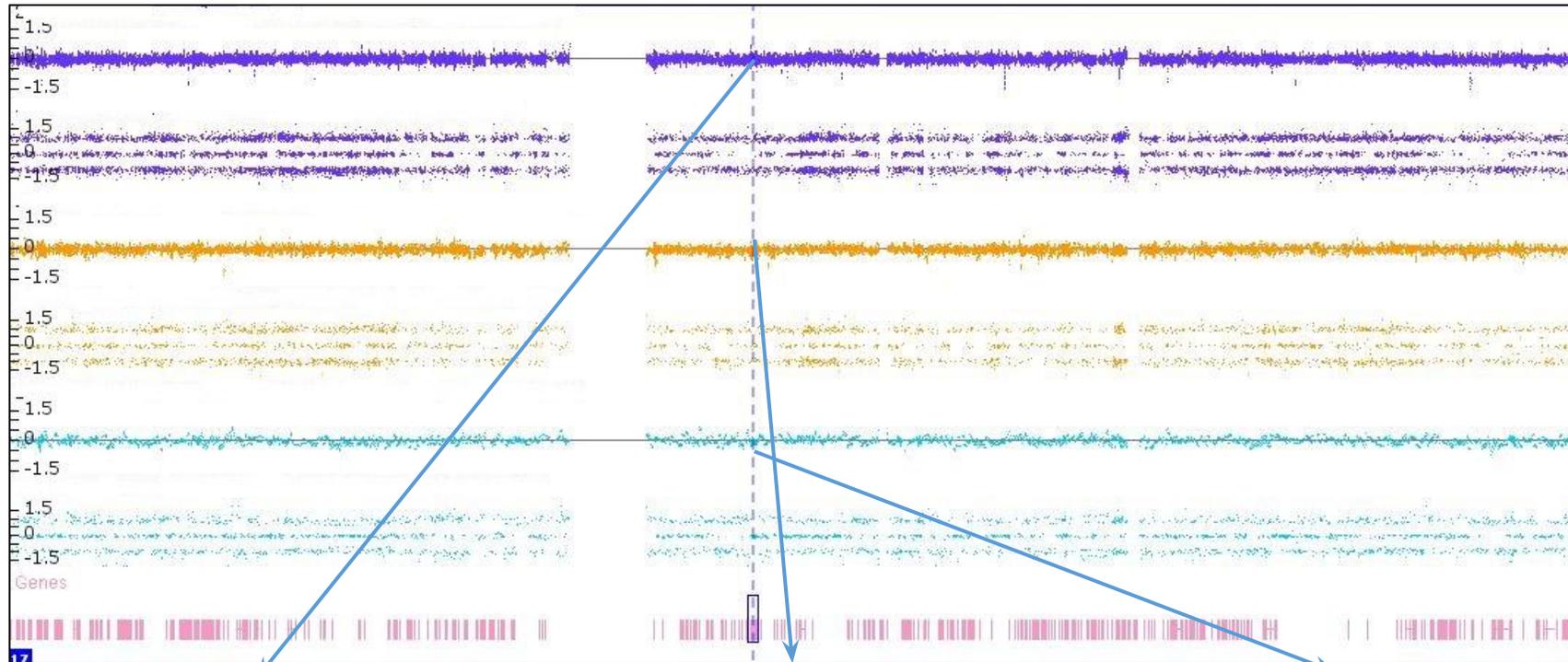
Origin of  
aberrations

Maternal cell  
contamination

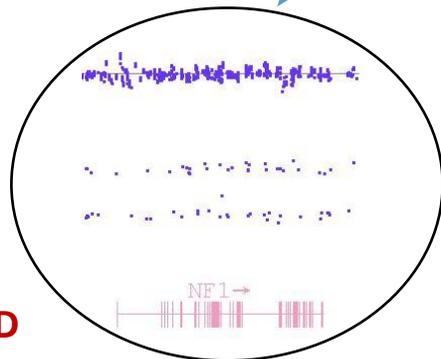
Clinical diagnosis

Research

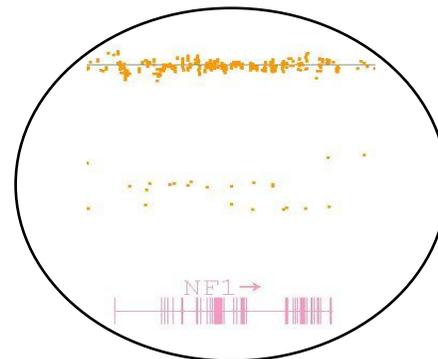
# Coverage of clinically important regions in different microarrays



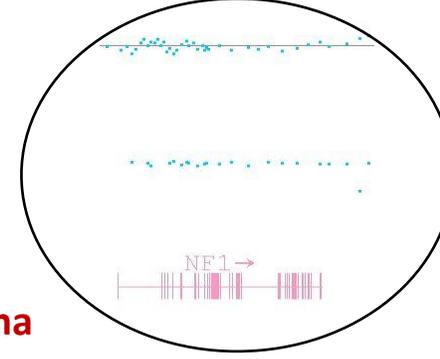
**HD**



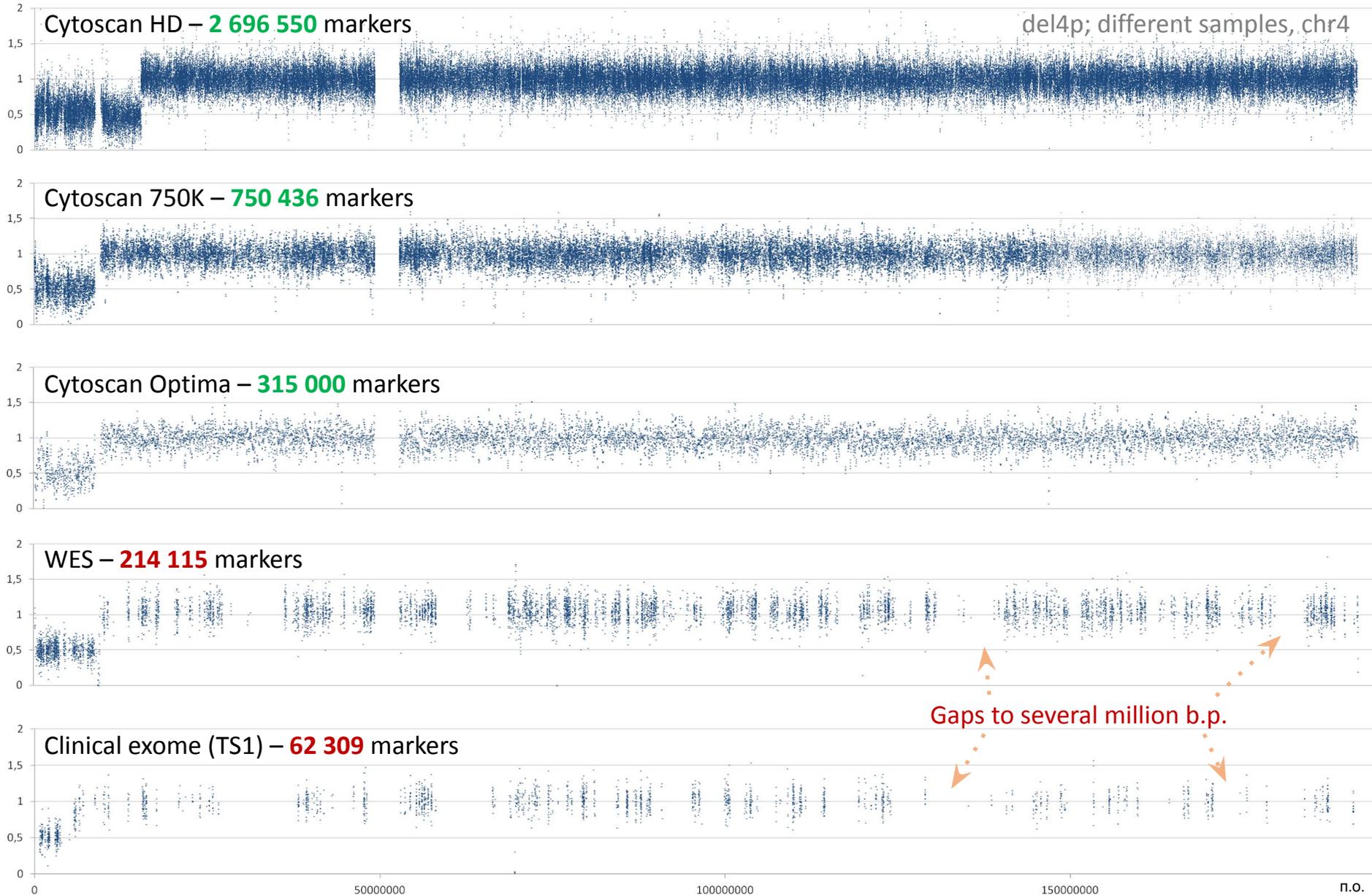
**750K**



**Optima**



# Comparison of marker distribution In different arrays & platforms

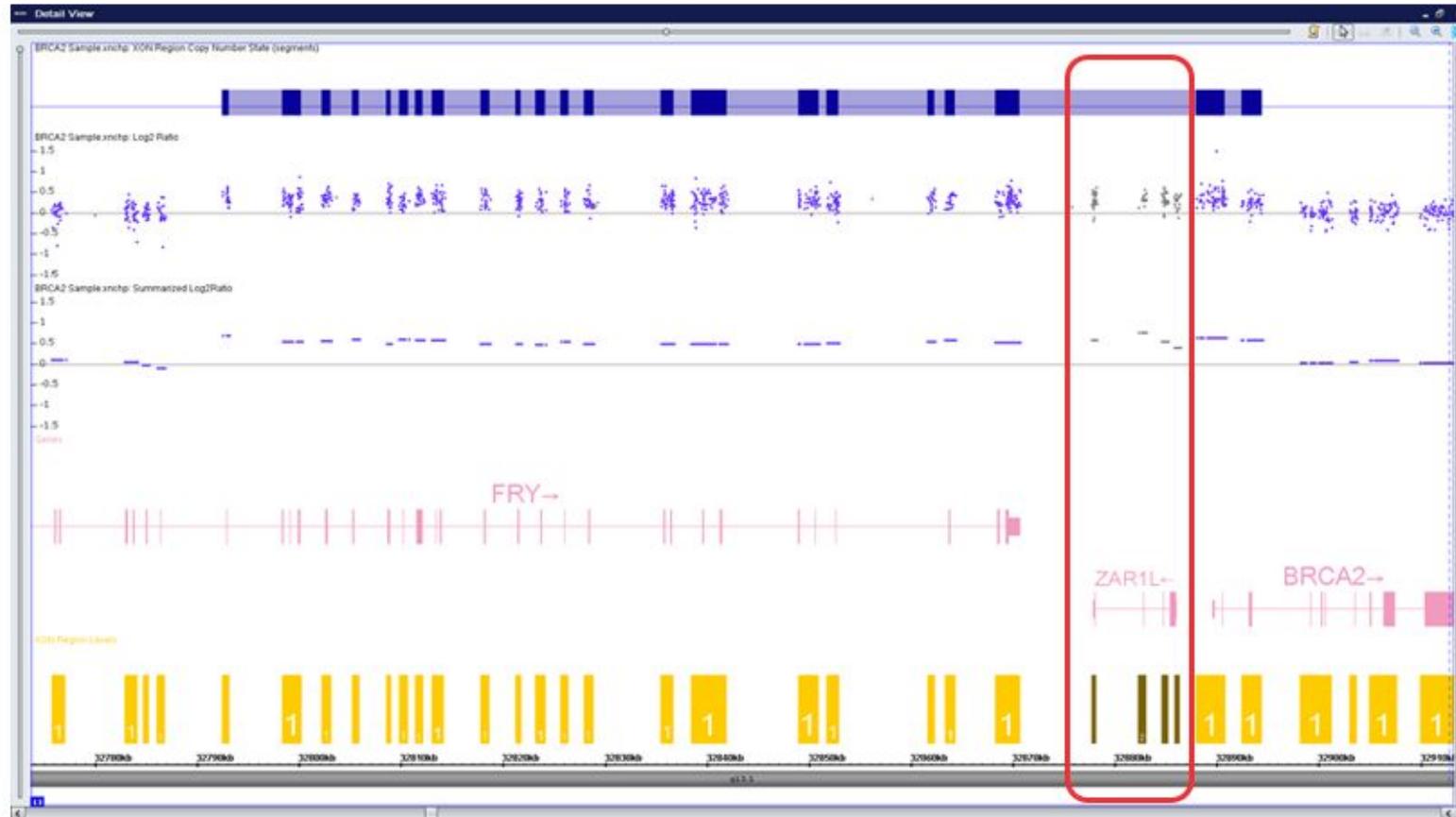


# ХМА: Ограничения

---

- Сбалансированные хромосомные перестройки (транслокации, инверсии)
- Точковые мутации
- Болезни экспансии тринуклеотидных повторов
- Микроделеции/микродупликации, размер которых меньше разрешающей способности микроматрицы

# Микроматричный анализ

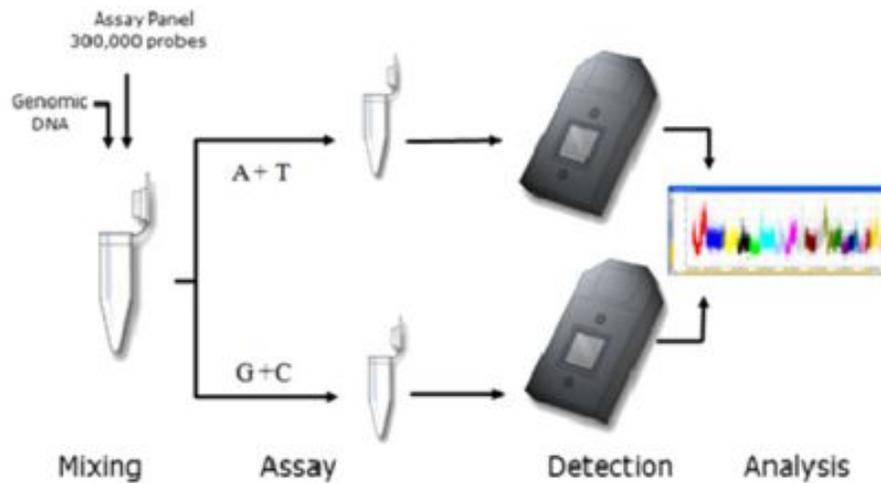
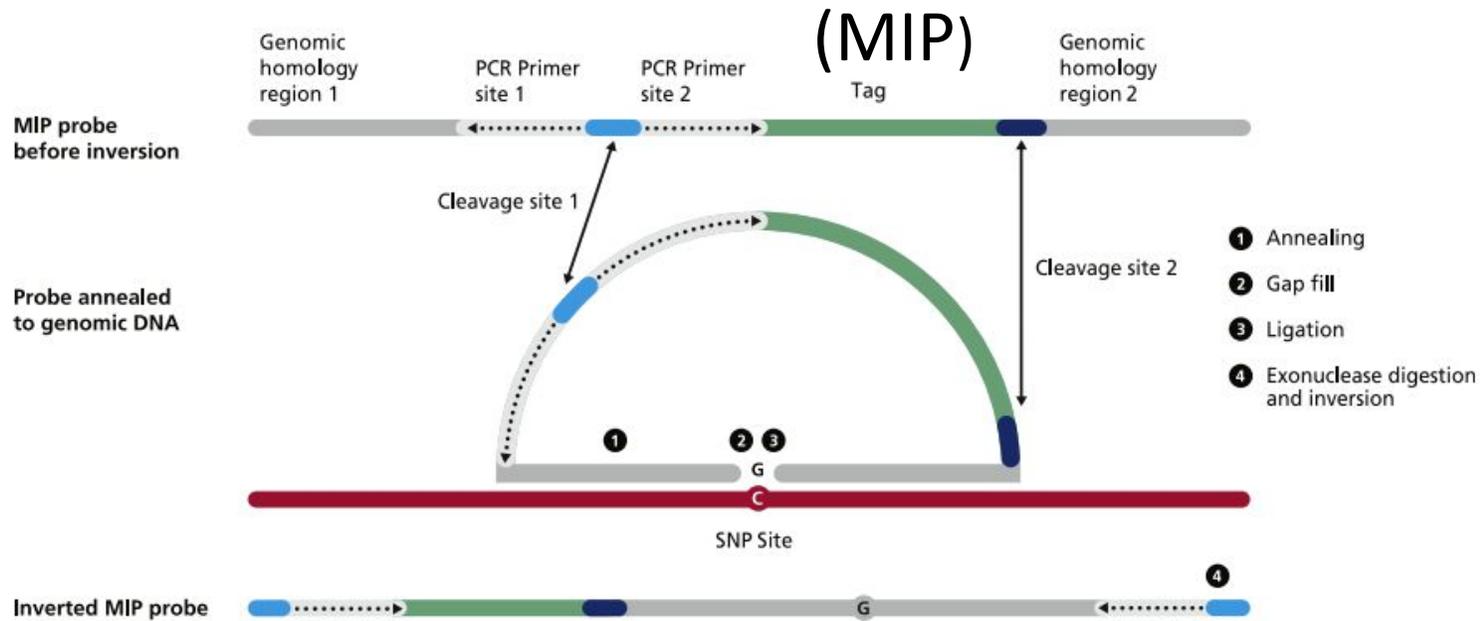


Новые микроматрицы XON смогут заменить MLPA?

# Будущее молекулярного кариотипирования



# Технология молекулярной инверсионной пробы



# Онкоскан

(хромосомный микроматричный анализ)

- 220 000 snp маркеров
  - Полногеномный анализ числа копий генов и хромосомных сегментов, а также участков с потерей гетерозиготности
  - 900 генов, ассоциированных с развитием опухоли на материале одного образца
  - Анализ может проводиться на образцах с сильно деградированной ДНК
  - Для анализа требуется всего 80 нг ДНК
  - 74 мутации в генах KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, IDH1, IDH2, PTEN, TP53, PIK3CA – чувствительность 20%
-

# Научная работа

- Научный сервис для различных государственных и коммерческих учреждений
- Разработка проекта эксперимента, его выполнение, анализ данных, консультации на всех этапах

Кошкин Филипп Александрович [research@genomed.ru](mailto:research@genomed.ru)

**СЕСАНА** – официальный поставщик  
оборудования и реагентов для  
исследований в области молекулярной  
биологии и генетики

[sales@sesana.ru](mailto:sales@sesana.ru)

**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C





**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

# Геномед – первый OEM-партнер Thermo Fisher Scientific в России





**Спасибо за внимание!**



[dp@genomed.ru](mailto:dp@genomed.ru)

+7 915 050 55 56