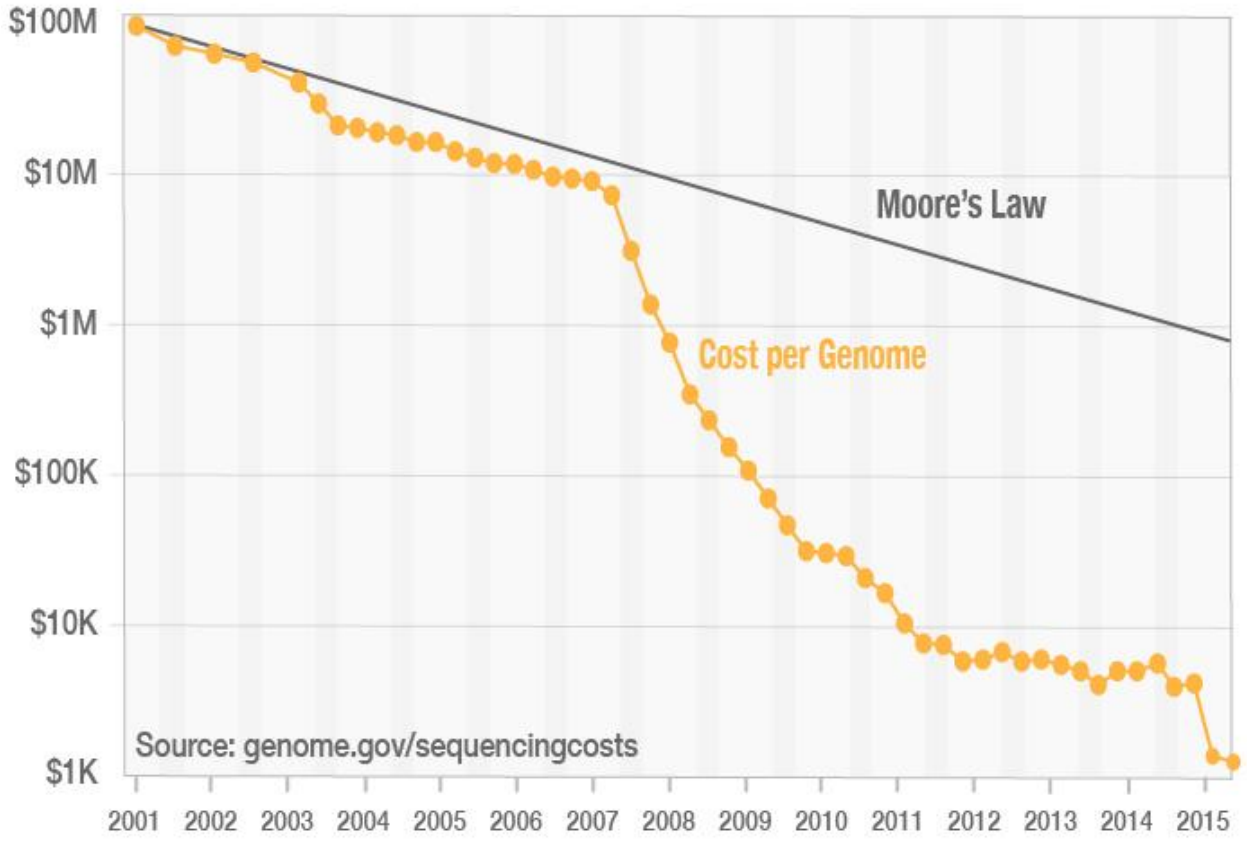
Методы молекулярно-генетической диагностики

Заведующий лабораторией
Пьянков Денис Валерьевич

2020

Индустрия генетического тестирования

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



1865 · 1892 · 1915–1917 · 1940с–1950с · 1948

1865

Грегор Мендель, скрещивая горох, описал законы наследственности.

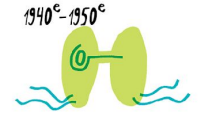
1892

Д.И. Ивановский впервые описал передачу болезнетворного начала посредством агентов, проходящих через бактериальные фильтры и позже названных вирусами.

1915–1917

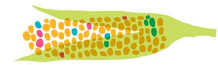
Фредерик Туорт и Феликс д'Эррель обнаружили вирусы бактерий — бактериофаги.

1940с–1950с



Описаны конъюгация и трансдукция — процессы переноса генетического материала между бактериальными клетками с помощью плазмид и фагов.

1948



Барбара Макклинток обнаружила в ДНК кукурузы транспозоны.

1953 · 1956 · 1960с · 1967 · 1970

1953

С помощью рентгеновской кристаллографии установлена структура ДНК.

1956

Артур Корнберг выделил ДНК-полимеразу I, первый из ферментов, способных копировать ДНК, и синтезировал с ее помощью цепь ДНК.

1960с

Изучены структура и функции мРНК и тРНК, расшифрован генетический код.

1967

Бернард Вайсс и Чарльз Ричардсон впервые показали Т4-лигазу в действии.

1970

Гамильтон Смит выделил первую эндонуклеазу рестрикции II типа.

1970 · 1972 · 1973 · 1974

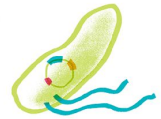
1970

Мортон Мандель и Акико Хига нашли способ делать клетки бактерий компетентными — способными лучше принимать ДНК из внешней среды.

1972

Пол Берг получил первую рекомбинантную ДНК.

1973



Герберт Бойер и Стэнли Норман Коэн получили первый организм, содержащий рекомбинантную ДНК.

1974

Герберт Бойер и Стэнли Норман Коэн получили первую бактерию, несущую эукариотический ген — ген рибосомной РНК лягушки.

1974

Рудольф Иениш создал первое трансгенное млекопитающее.

1975 · 1977 · 1978–1979 · 1983

1975

Созвана Асиломарская конференция, регламентировавшая работу с рекомбинантными ДНК.

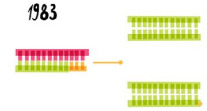
1977

Созданы достаточно производительные методы секвенирования ДНК.

1978–1979

Genentech произвела первые рекомбинантные белки — соматотропин и инсулин.

1983



Кэри Мюллис разработал метод ПЦР.

1983

Появилось первое трансгенное растение.

1990 · 1996 · 2003 · 2010 · 2012 · 2014

1990

Обнаружена РНК-интерференция, механизм которой в 1998 описали Крейг Мелло и Эндрю Файер.

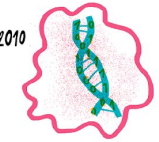
1996

Сконструированы сайт-специфические нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN).

2003

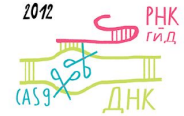
Почти полностью прочитан геном человека.

2010



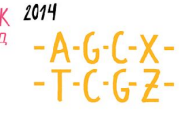
Группа Крейга Вентера и Гамильтона Смита создала Синтию — первый организм с полностью синтетической хромосомой.

2012



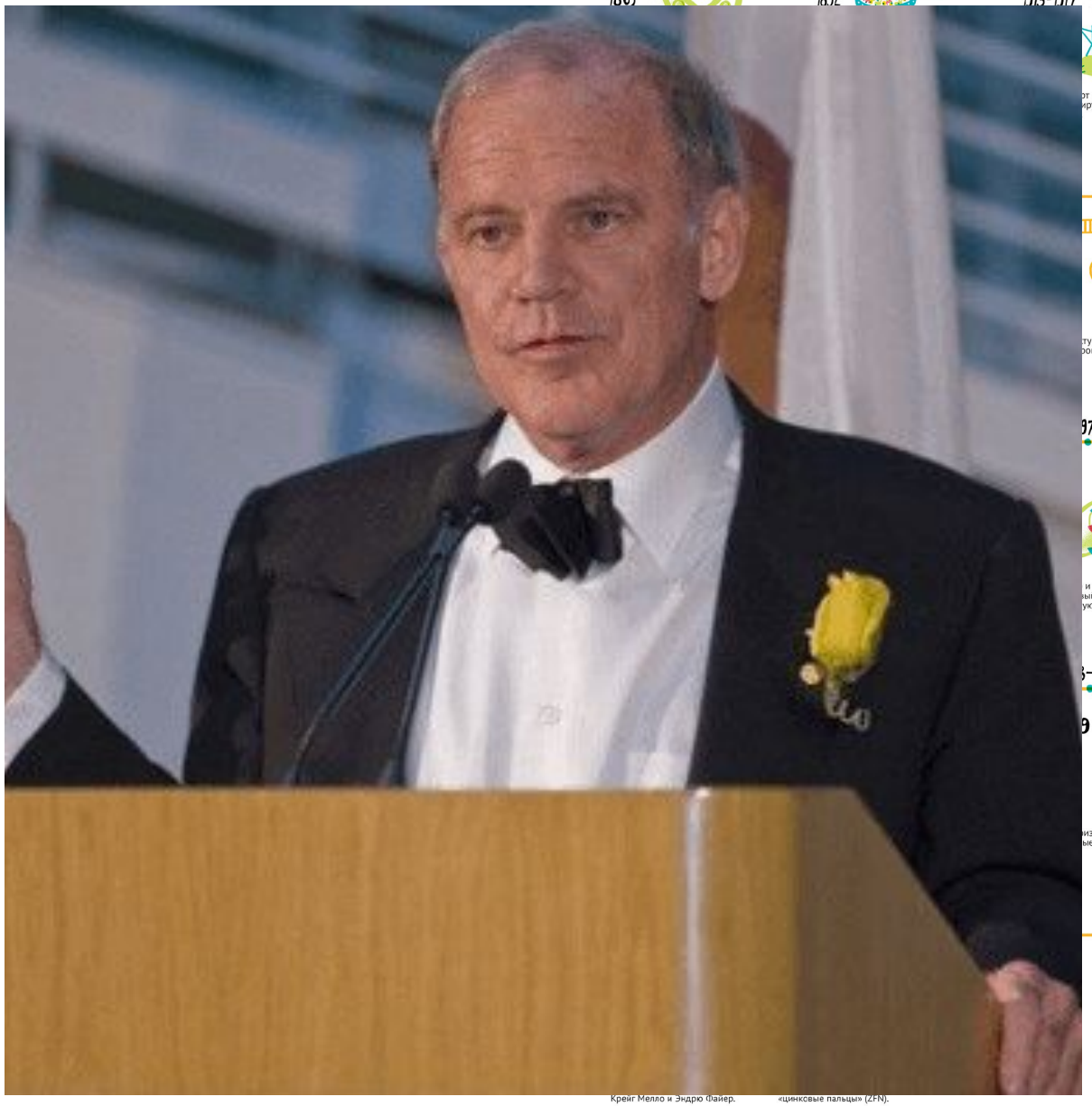
Разработана технология геномного редактирования CRISPR-Cas9.

2014



Получена бактерия с расширенным генетическим кодом.

Биомолекула: Ольга Плашник

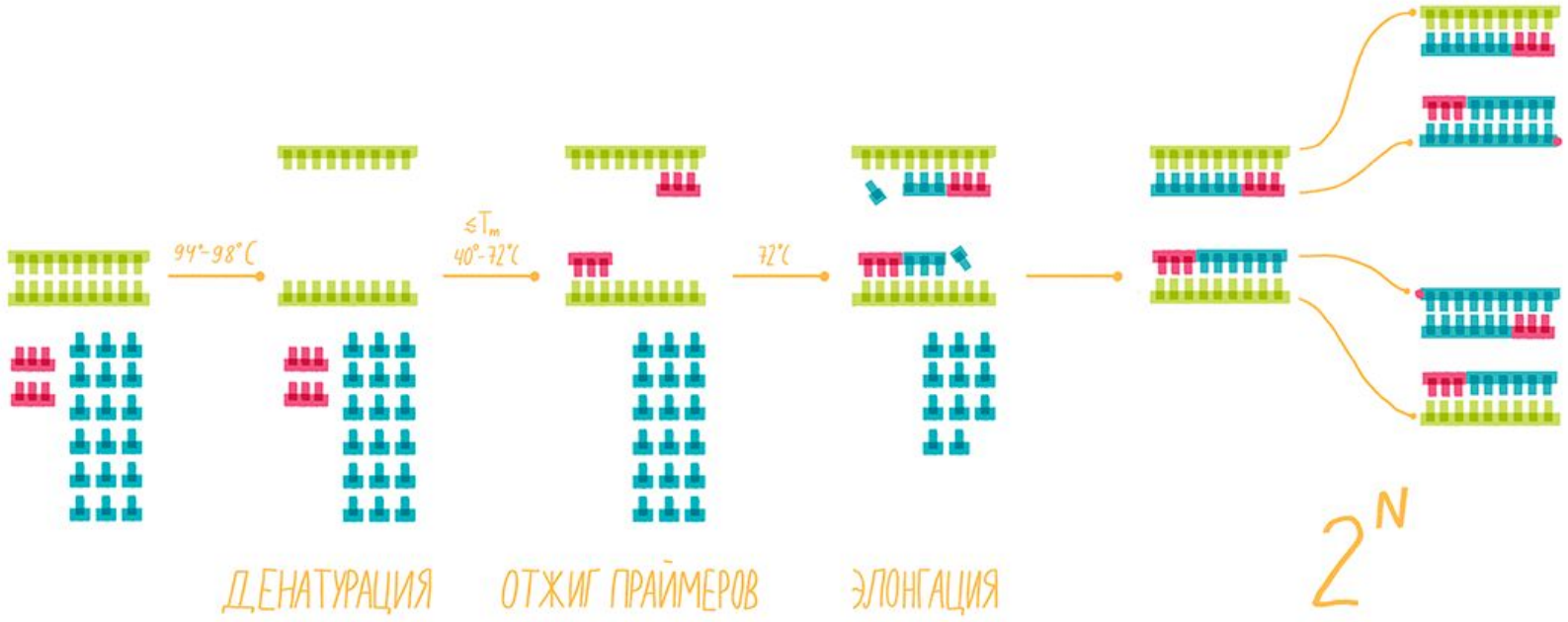


Крейг Мелло и Эндрю Файер.

«цинковые пальцы» (ZFN).

организм с полностью синтетической хромосомой.

CRISPR-Cas9.

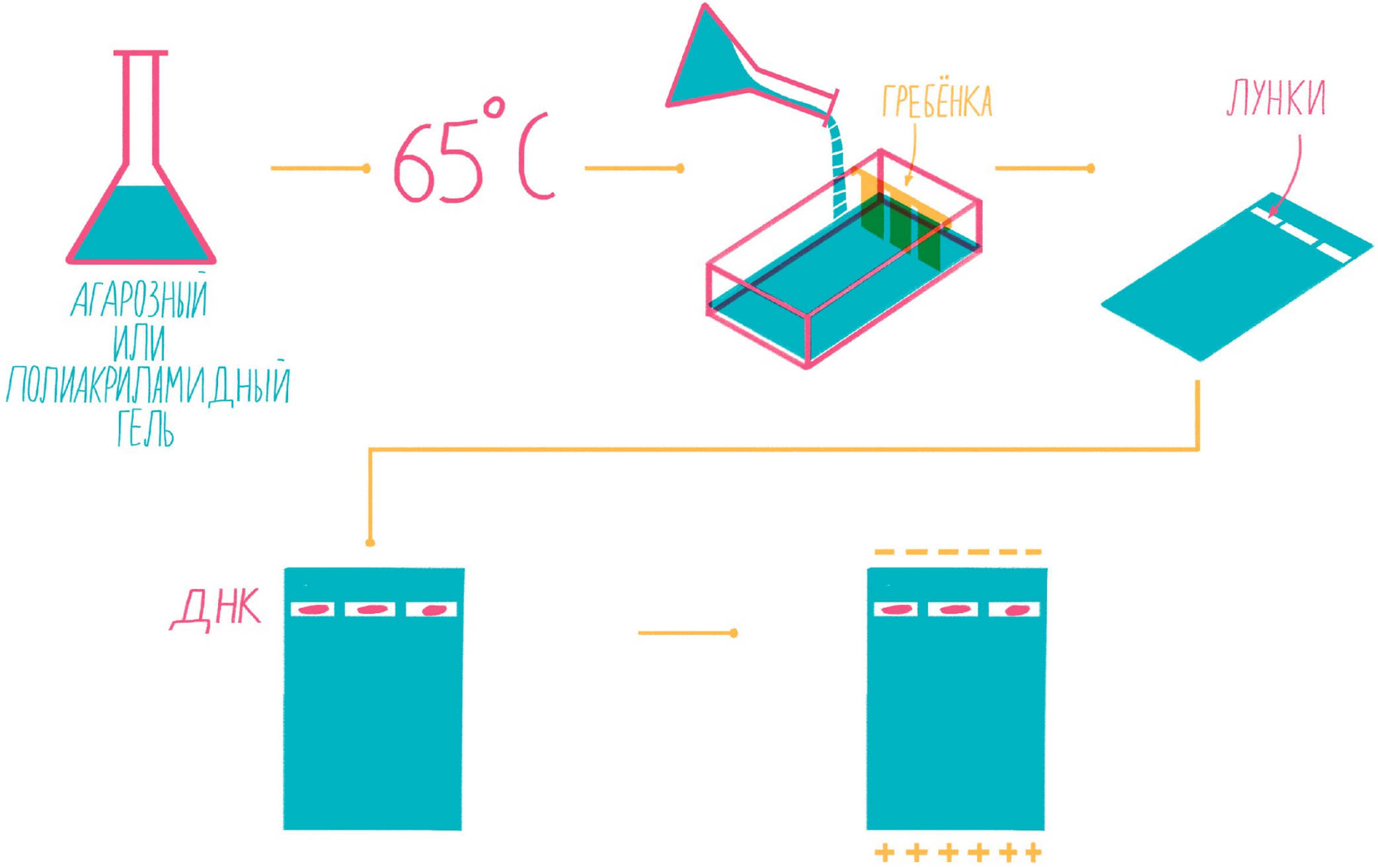


В конечном итоге получается 2^n молекул ДНК, где n – количество циклов.

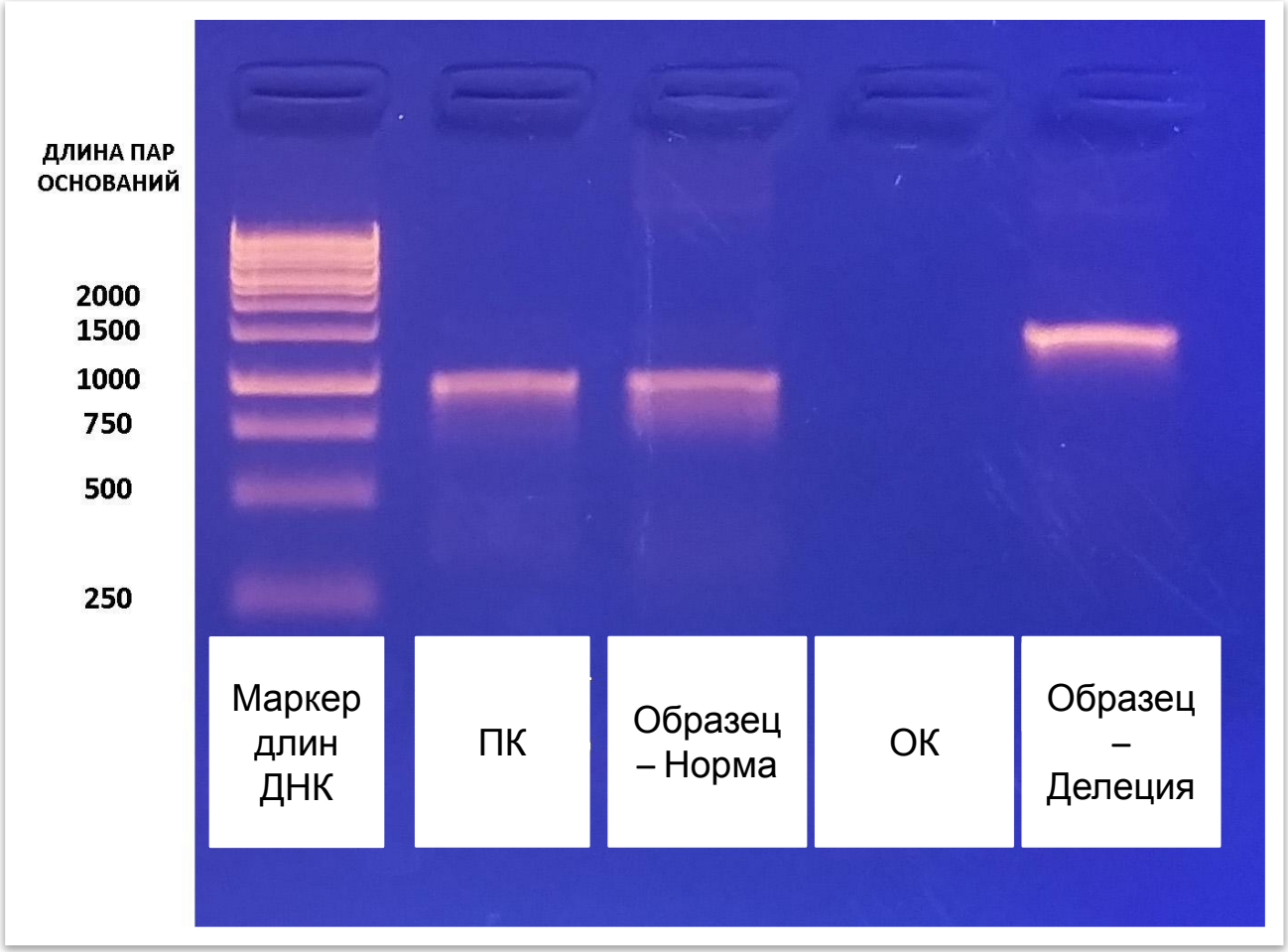
Все этапы от выделения ДНК до получения результатов занимают 2-3 часа.

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

Цена реакции крайне мала.

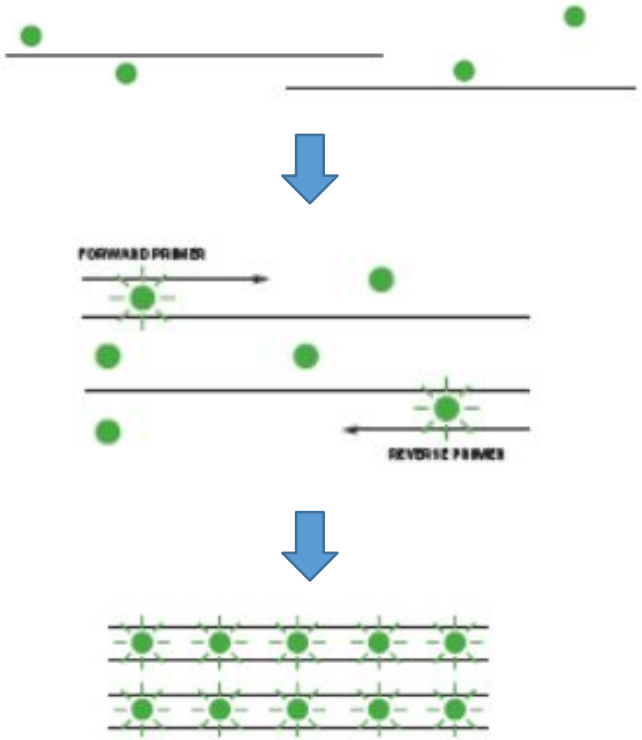

АГАРОЗНЫЙ
ИЛИ
ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ
ГЕЛЬ
65°C
ГРЕБЁНКА
ЛУНКИ
ДНК
+ + + + + +

Полимеразная цепная реакция



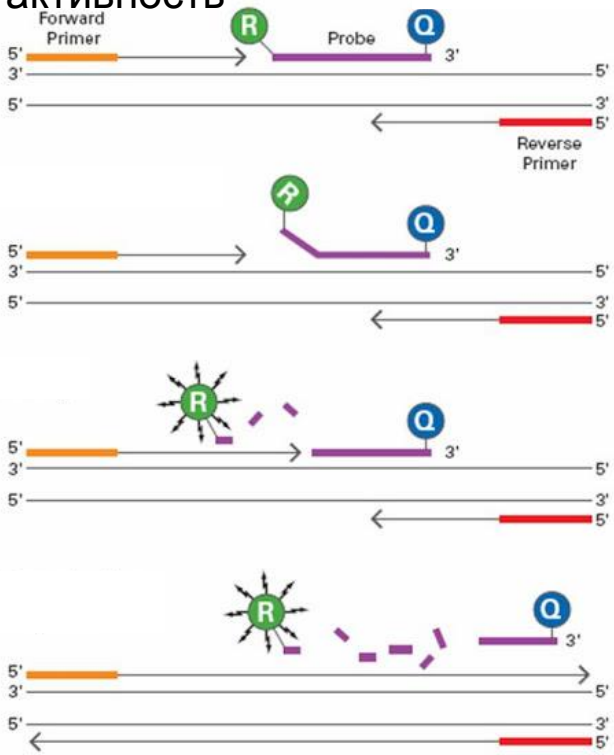
ПЦР в реальном времени

- Интеркалирующий краситель



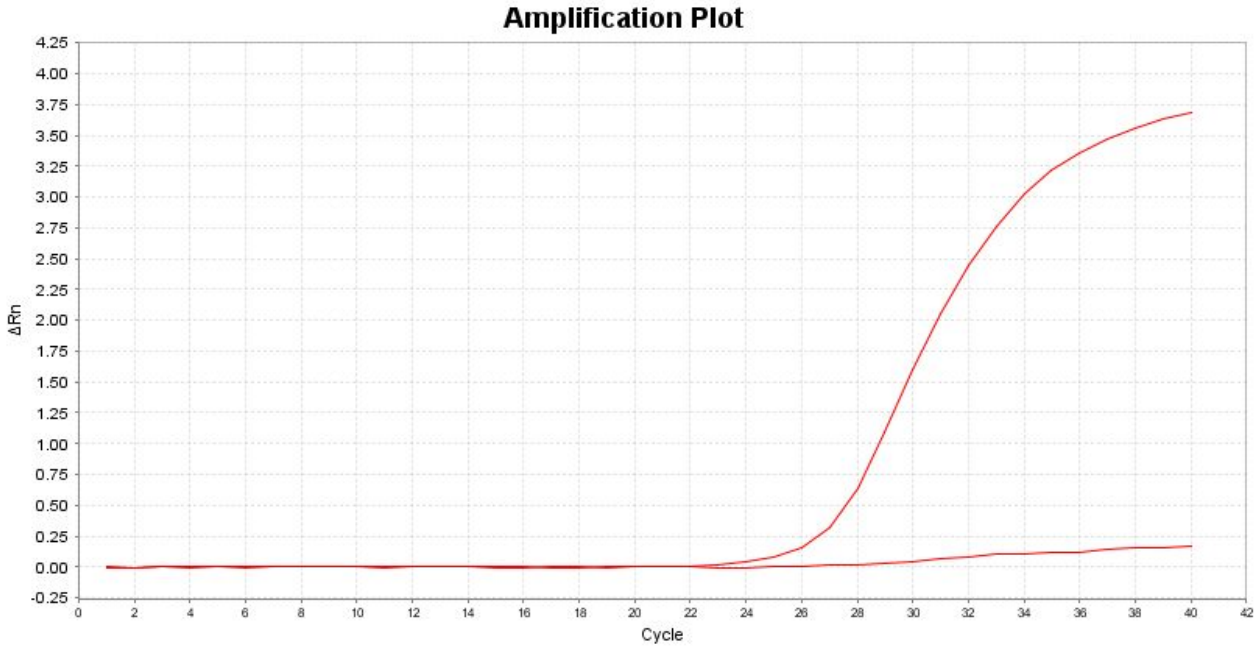
- Флуоресцентные зонды

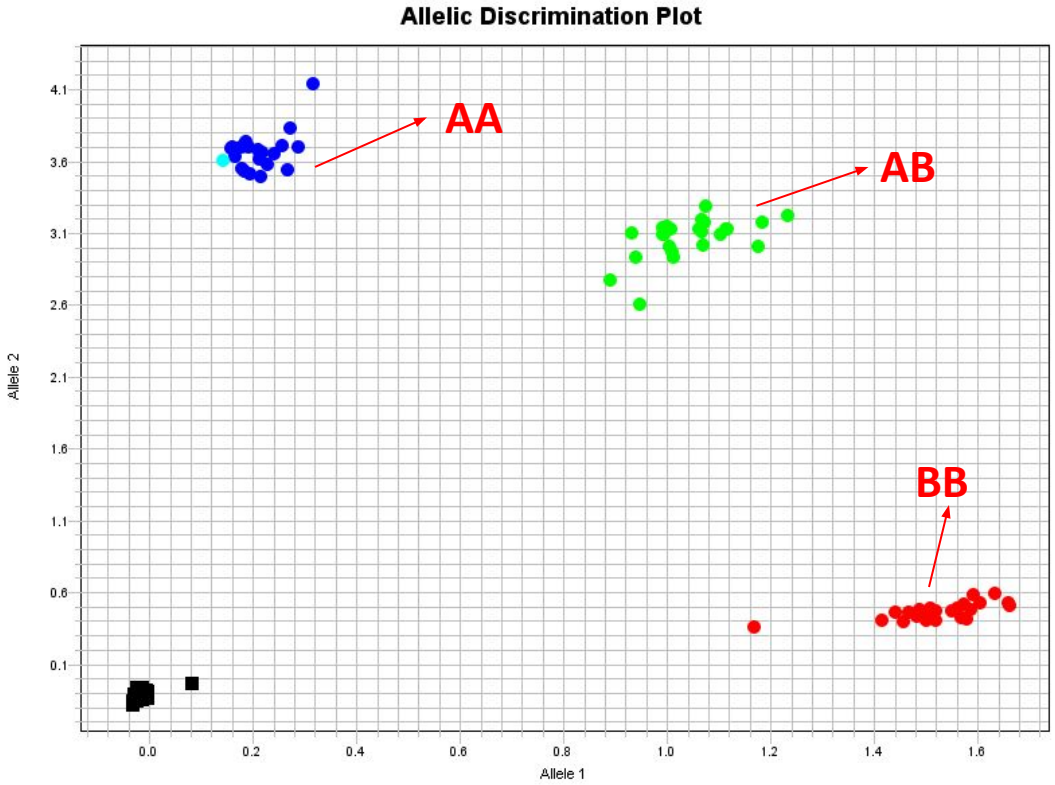
5´–3´ экзонуклеазная активность



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

ПЦР в реальном времени

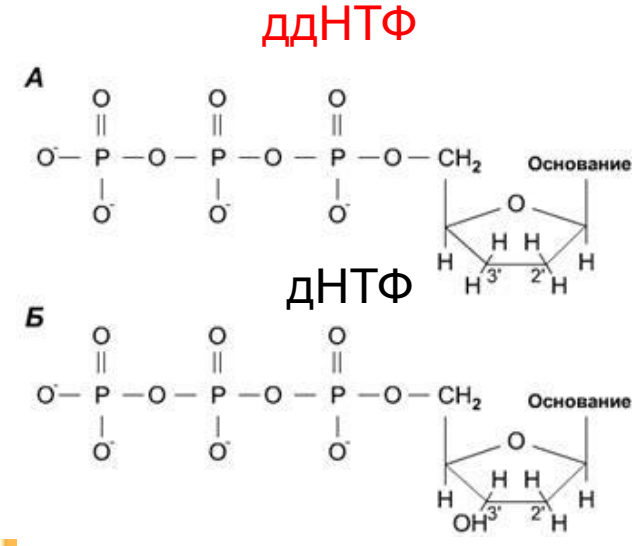




- Определение однонуклеотидных полиморфизмов

Секвенирование по Сэнгеру

- Золотой стандарт
- Метод «флуоресцентно-меченых терминаторов»



Секвенирование по Сэнгеру

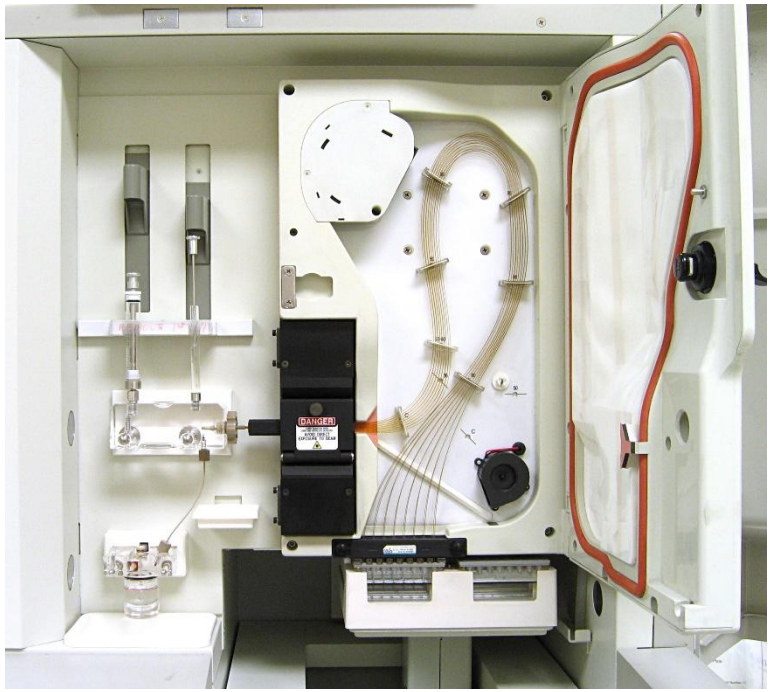
3130/3130xL
4/16 капилляров

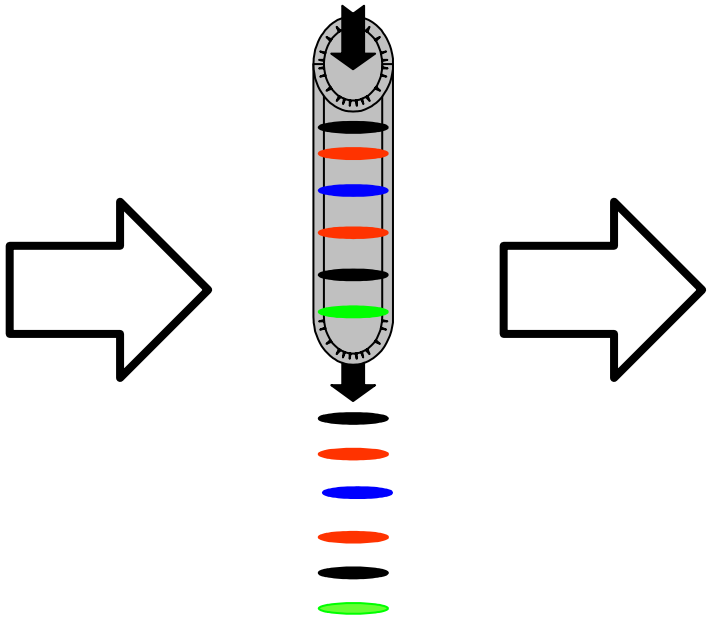
SeqStudio
4 капилляра

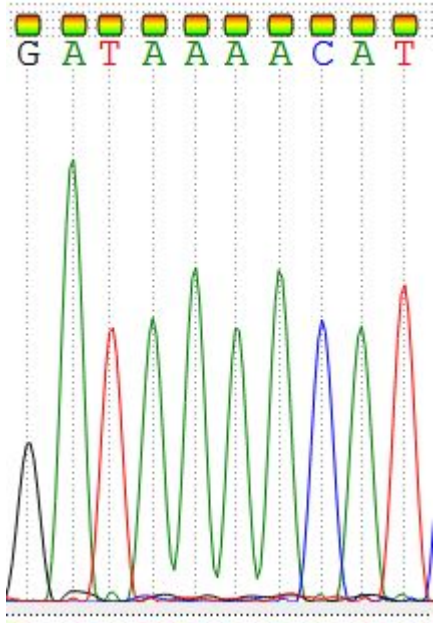
3500/3500xL
8/16 капилляров

Секвенирование по Сэнгеру

Автоматический капиллярный электрофорез

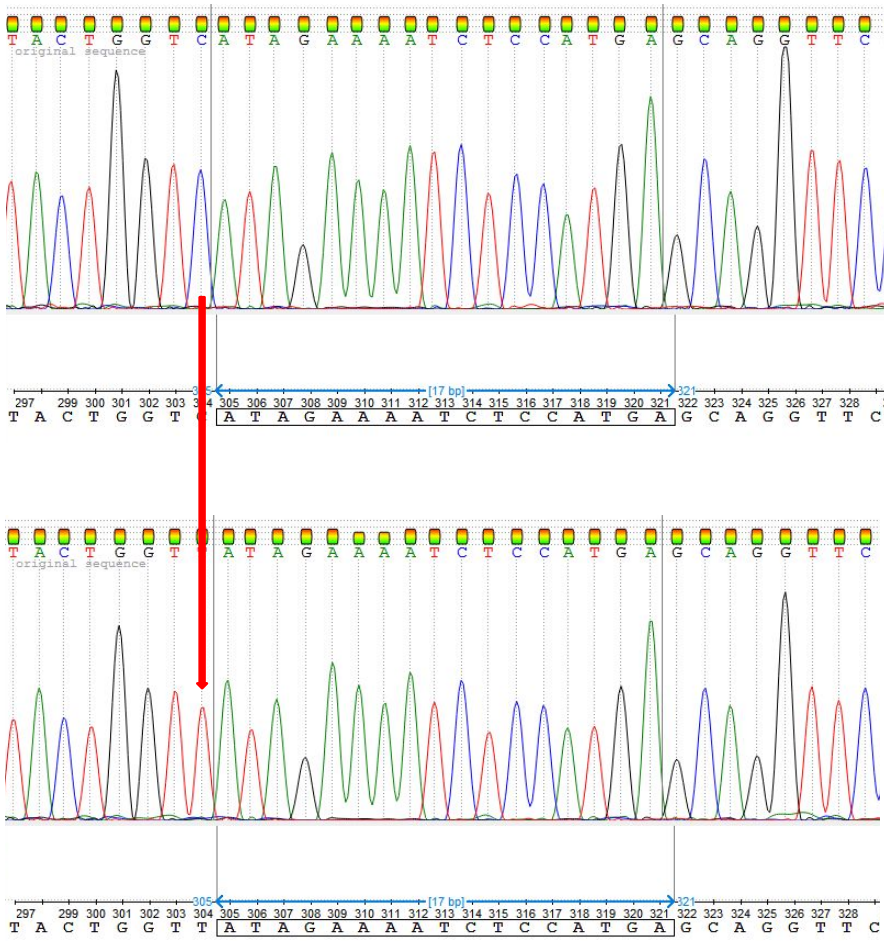






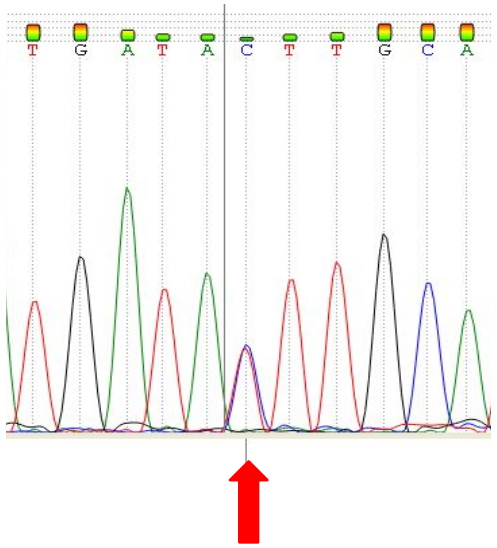
Секвенирование по Сэнгеру

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

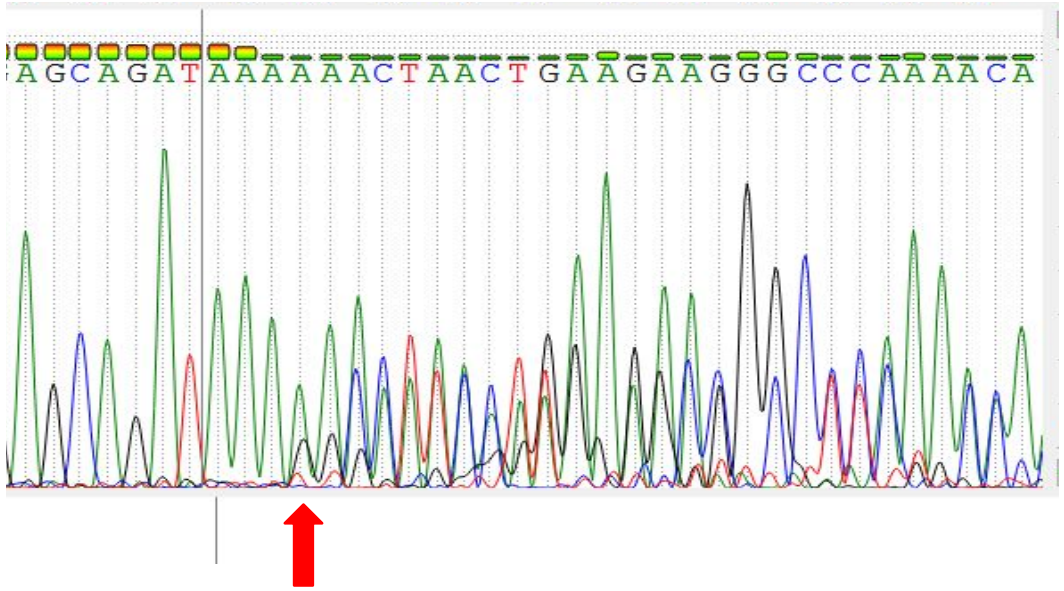


Секвенирование по Сэнгеру

chr12:112915524 A>G, PTPN11 в гетерозиготной форме



chrX:70444013 CT>C, GJB1 в гетерозиготной форме



Секвенирование по Сэнгеру

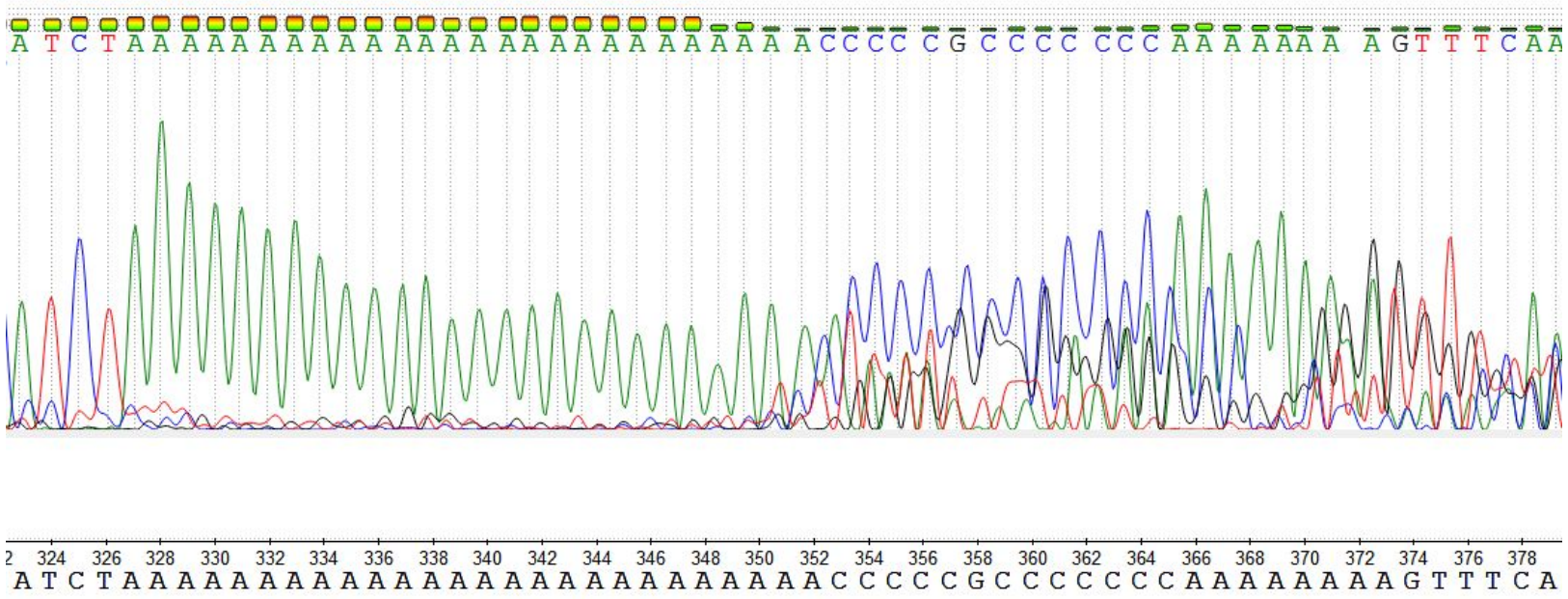
Этапы подготовки образцов:

- 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

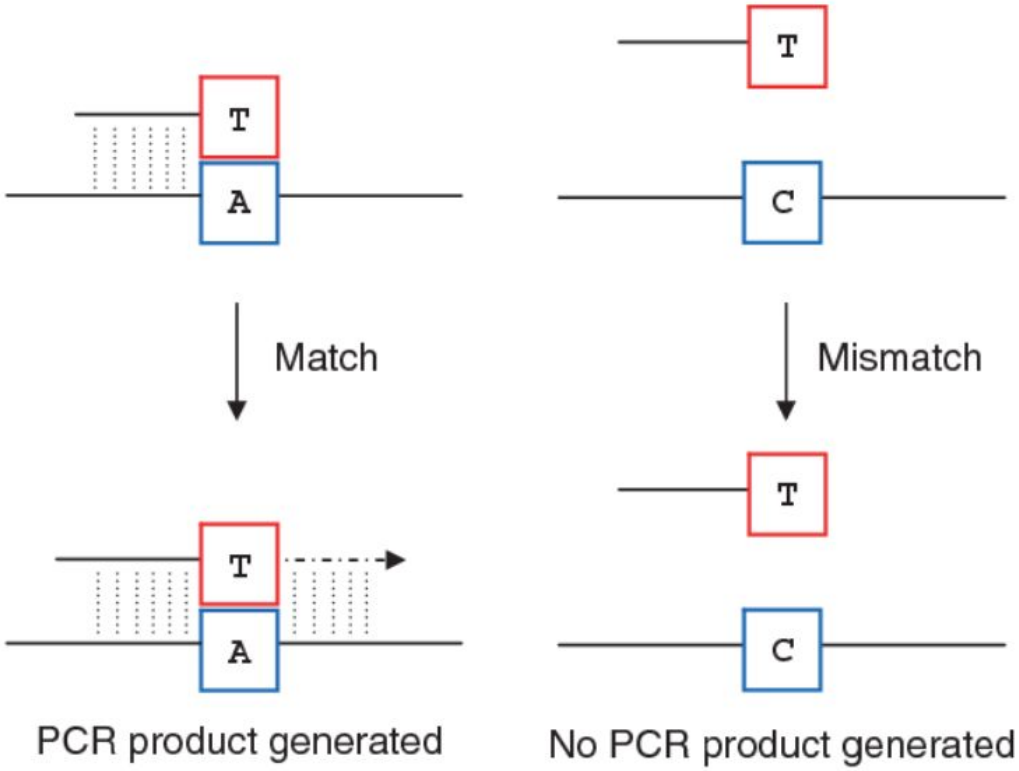
Секвенирование по Сэнгеру

Проблемы:

- Сложность при прохождение гомополимерных последовательностей


A T C T A A A

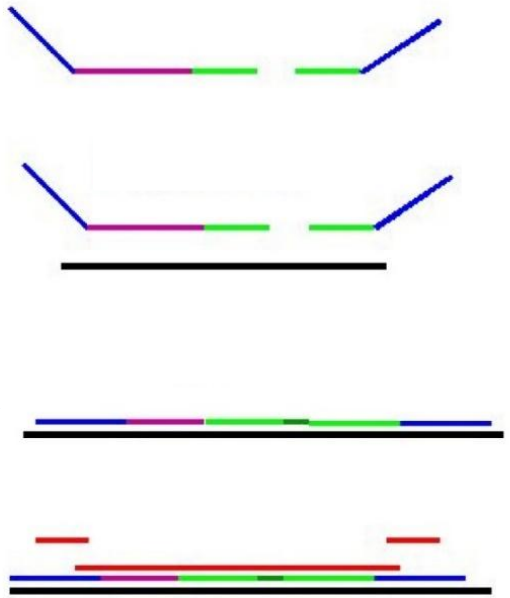
Секвенирование по Сэнгеру

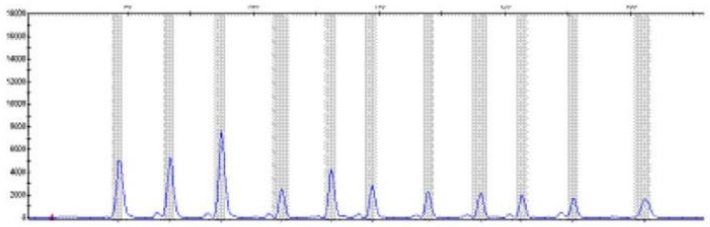


Аллель специфичные праймеры - при попадании однонуклеотидного полиморфизма в 3’ область праймера

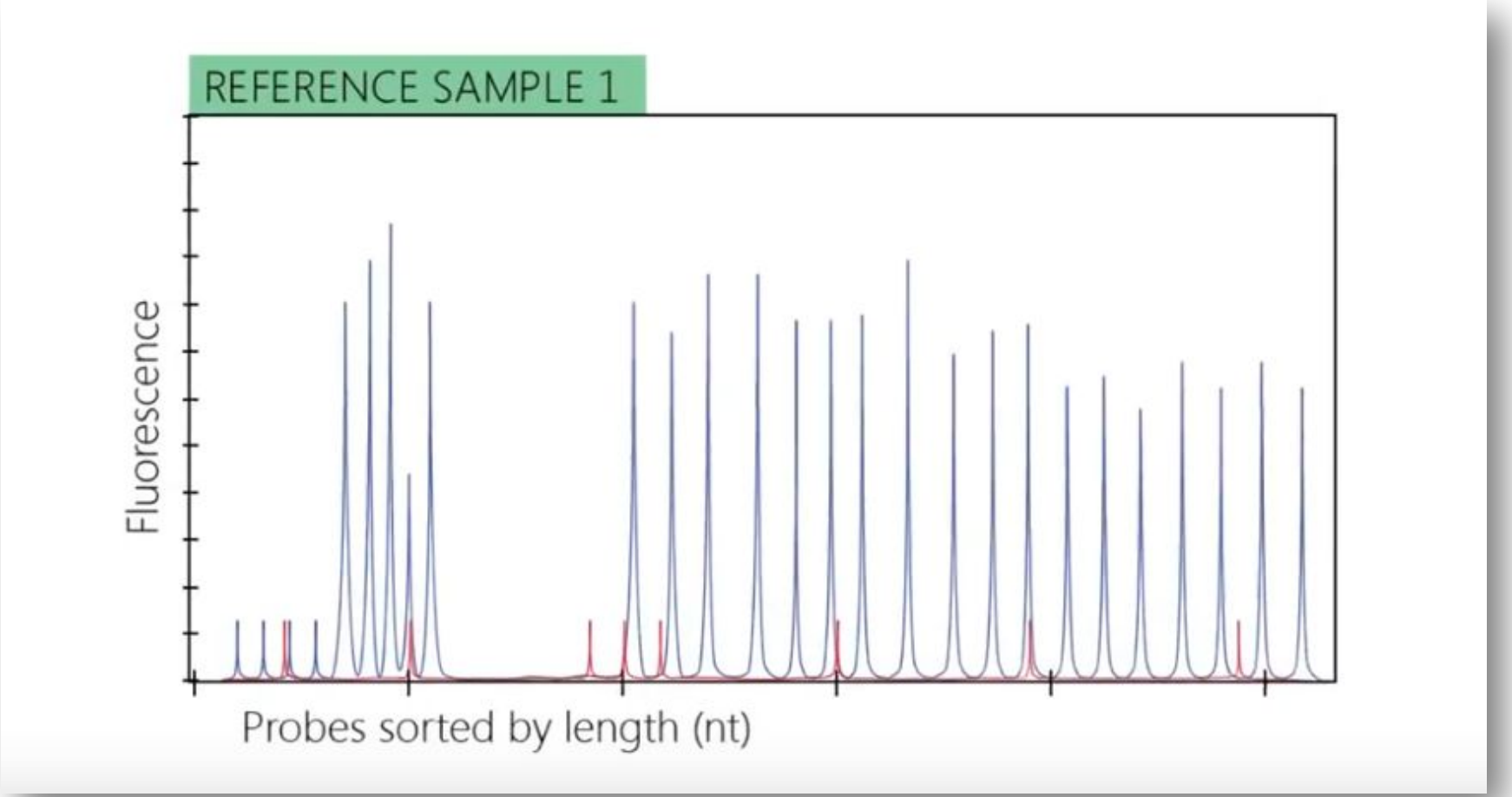
Мультиплексная амплификация лигаз-связанных проб
Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

- 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:

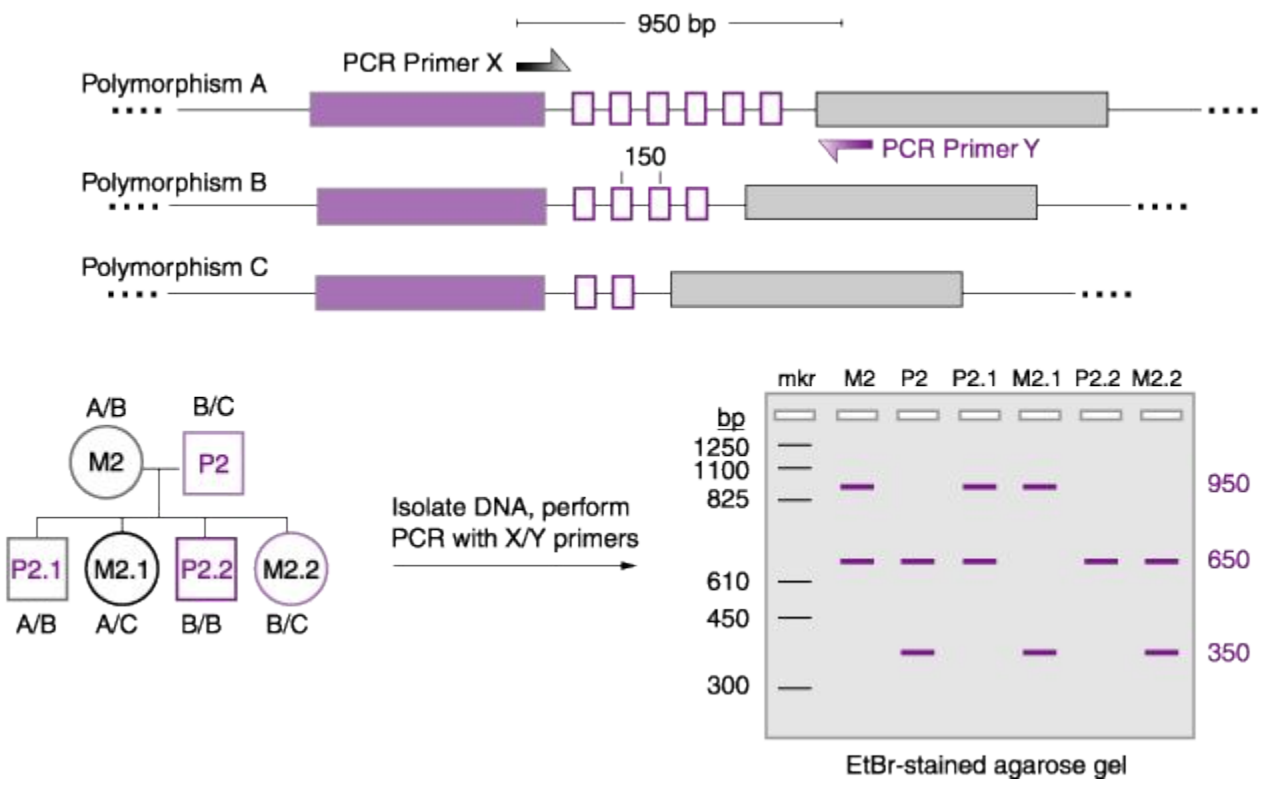
- Позволяет одновременно детектировать большое количество мутаций или наличие/отсутствие определенных участков ДНК (до 50) (SNP, делеции, дупликации, число копий генов, анализ метилирования, анеуплоидии)
- Позволяет работать с деградировавшей ДНК
- Низкая стоимость реакции

Минусы:

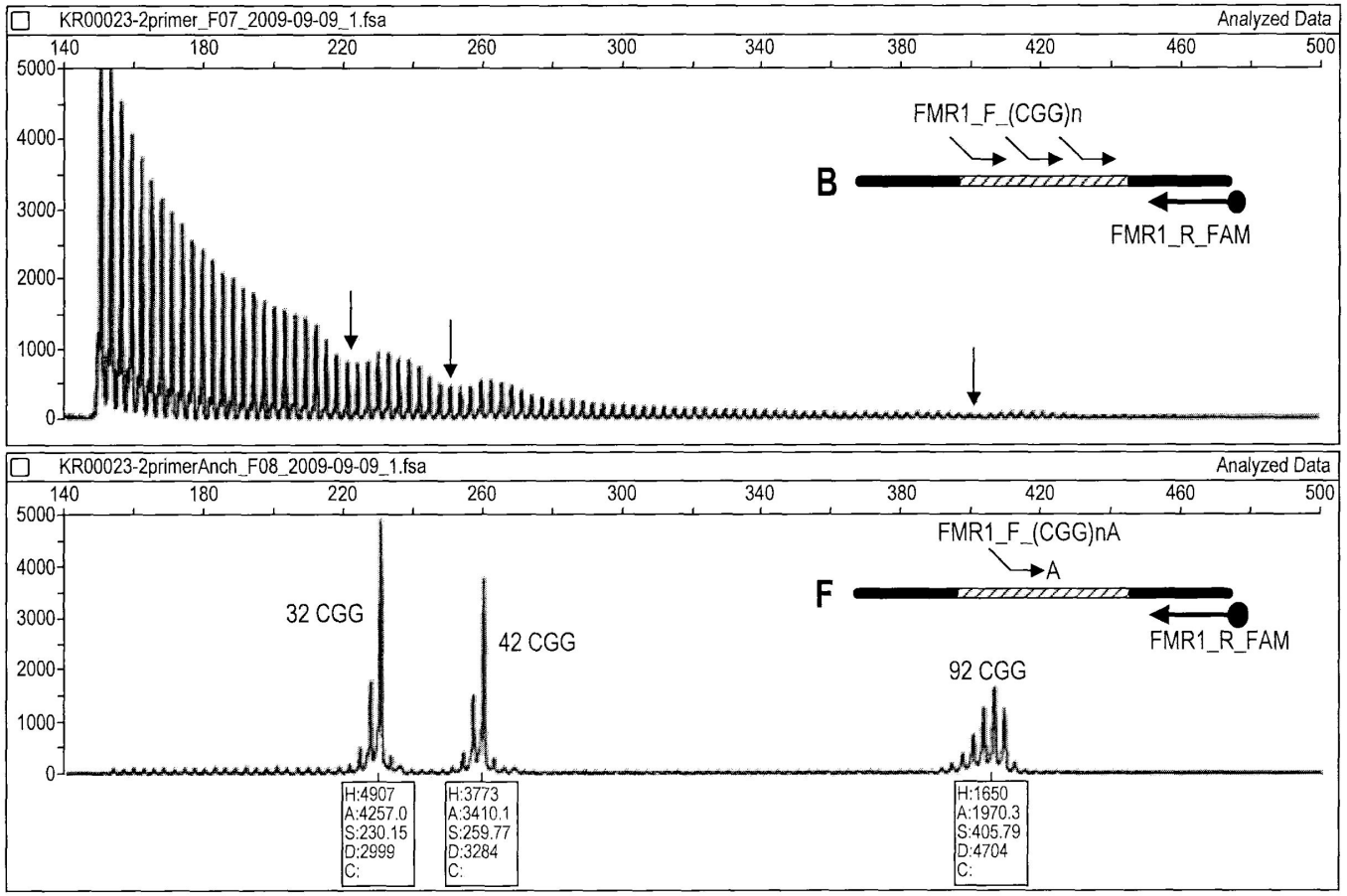
- Необходимо иметь коммерческие готовые наборы
- Сложность и длительность в разработке
- Нет возможности определять сбалансированные транслокации

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

Общий принцип подготовки библиотек

ХМА

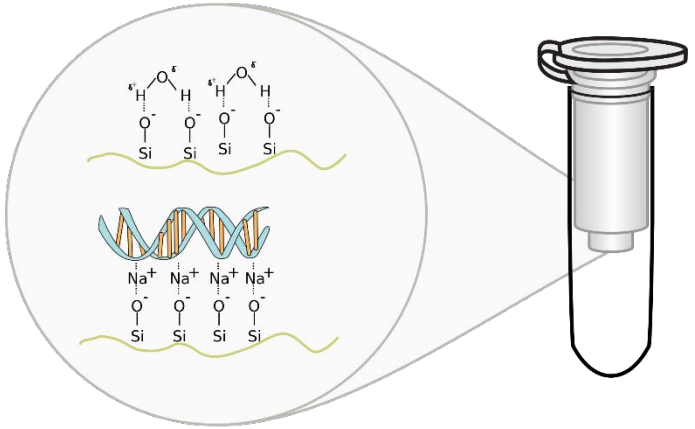
NGS

- Выделение геномной ДНК
- Фрагментация ДНК
- Лигирование адаптеров
- ПЦР
- Полногеномное секвенирование
- *Обогащение*
- *Таргетное секвенирование*

- Фрагментация
- Окрашивание - мечение
- Гибридизация на чипах
- Промывка, мечение
- Сканирование

Выделение нуклеионвых кислот

- Лизис клеток
- Разделение фаз ц/ф
- Экстракция



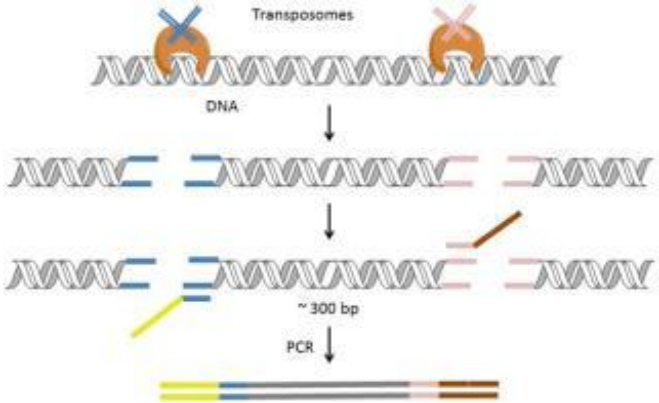
Очень важный этап!

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

A260/280 = 1,8
[C]: от 50 нг/мкл (Qubit)
V: от 20 мкл

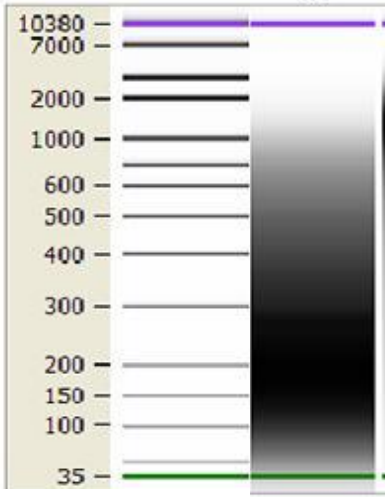
Высокопроизводительное секвенирование

- Фрагментация ДНК
- Лигирование адаптеров
- ПЦР

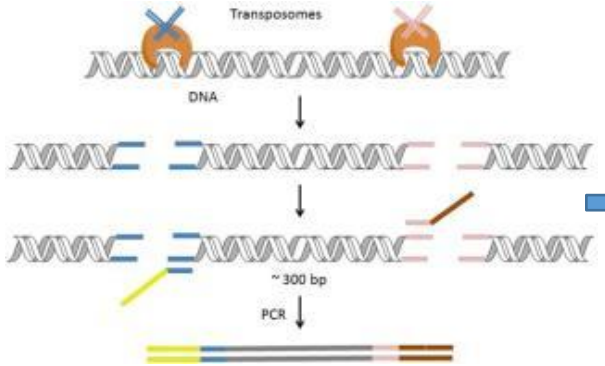


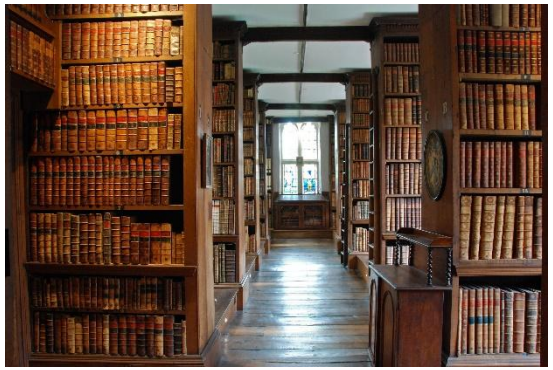
Очень важный этап!

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



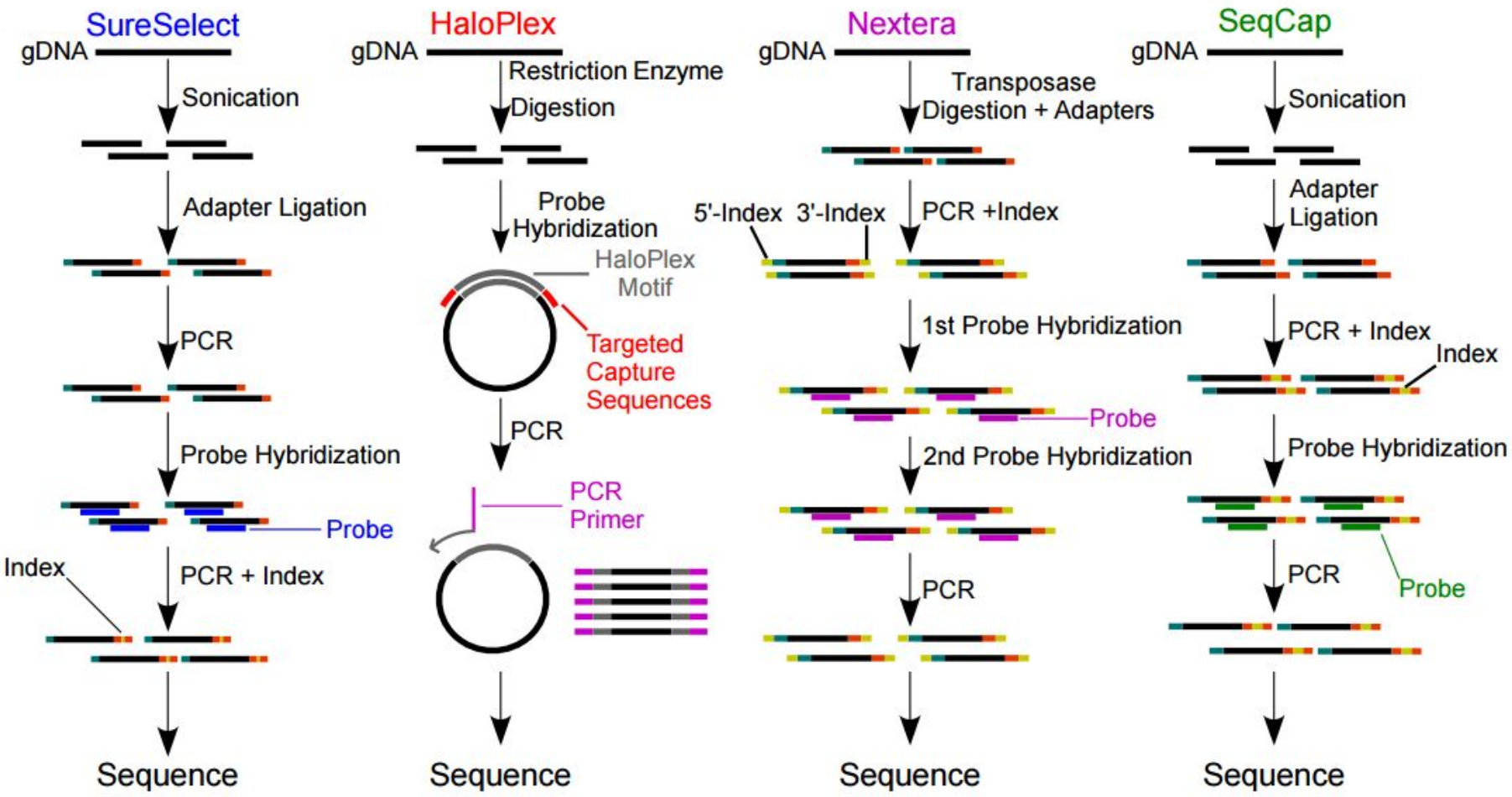
Высокопроизводительное секвенирование





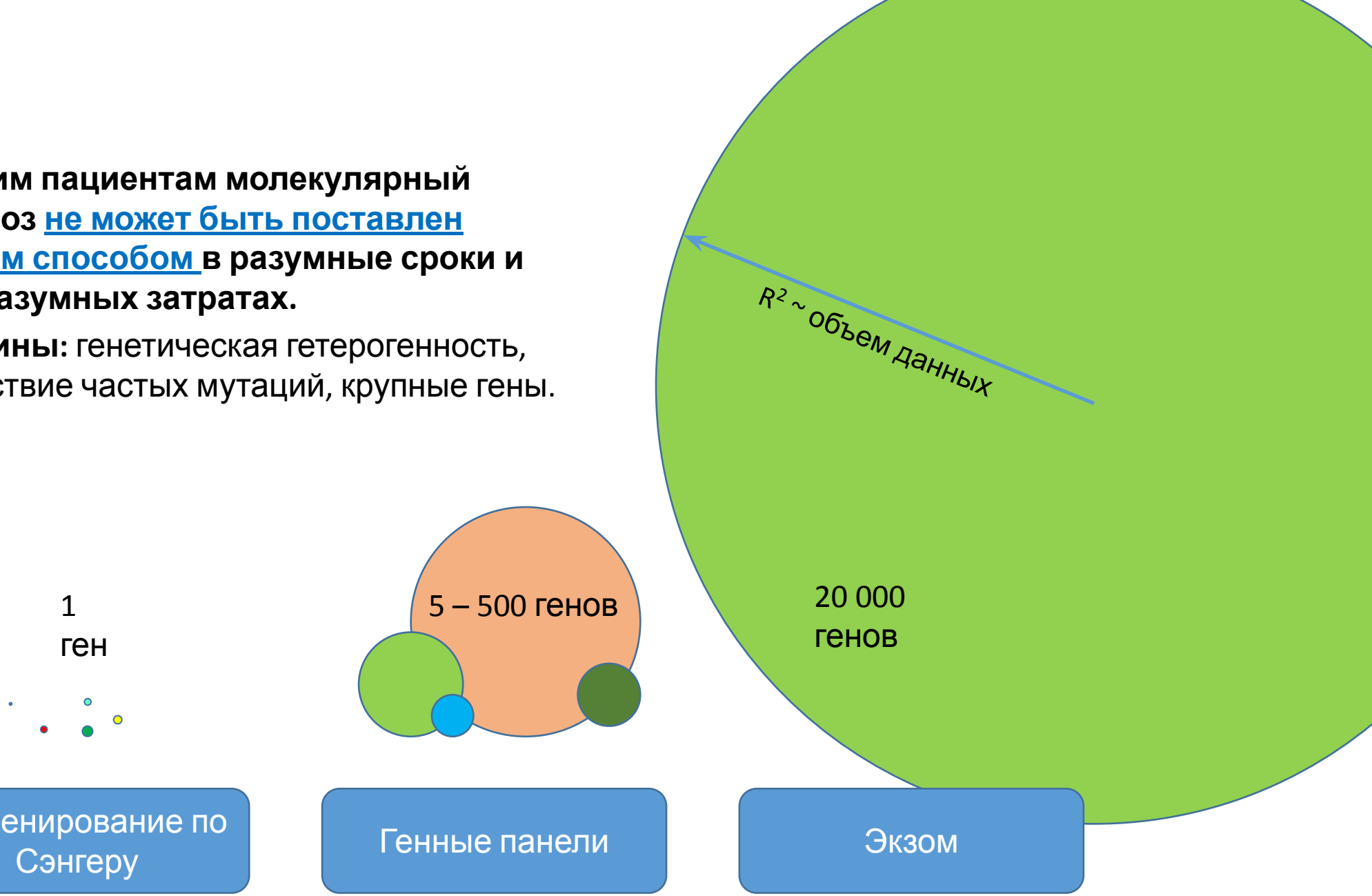
Секвенируем то, что хотим проанализировать. Обогащаем

Высокопроизводительное секвенирование

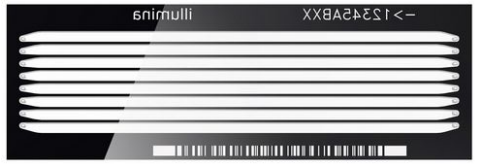


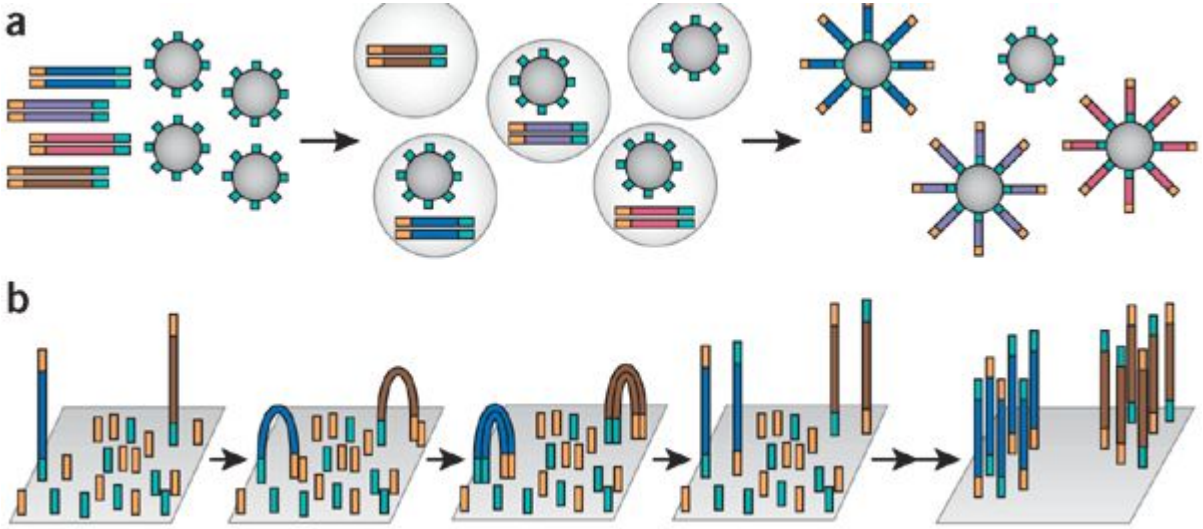
Многим пациентам молекулярный диагноз [не может быть поставлен другим способом](#) в разумные сроки и при разумных затратах.

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



Высокопроизводительное секвенирование





C G G T A A G T C?
+ dGTP

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:

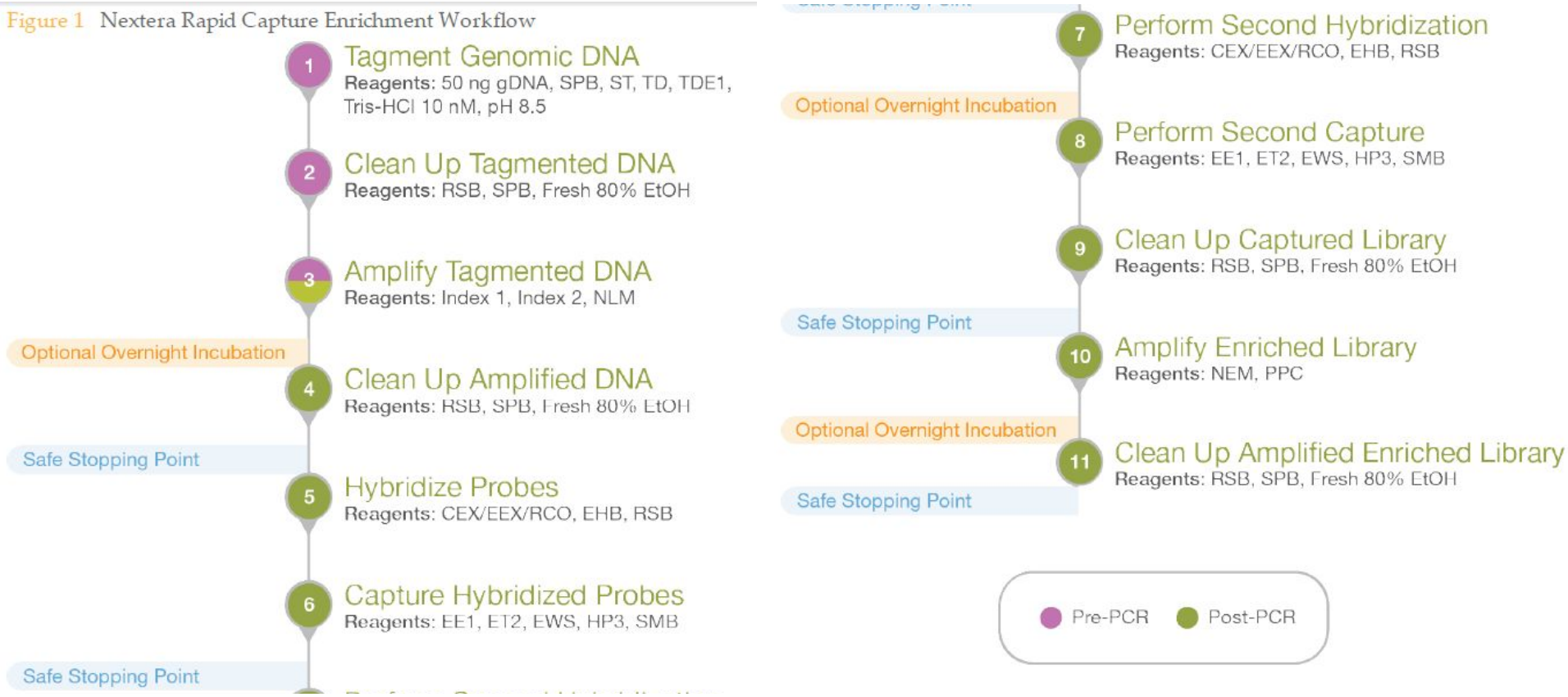
- Быстрый сиквенс
- Высокая производительность
- Длина прочтений может достигать 400 п.н.
- Гомополимеры
- Точность 1%
- Нет парных прочтений

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?!



А потом секвенирование 1-2 суток…

…обработка данных 1-2 суток…

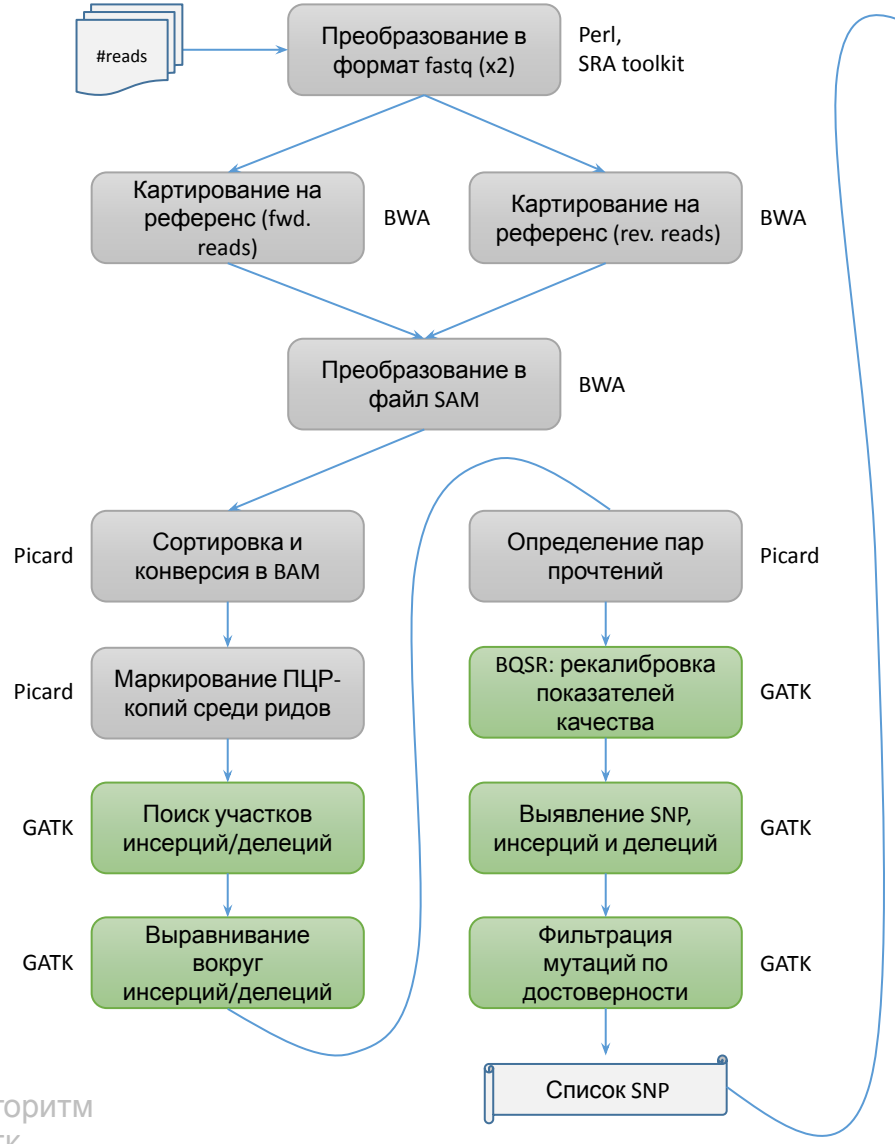
От получения биоматериала до готовых к анализу данных

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:

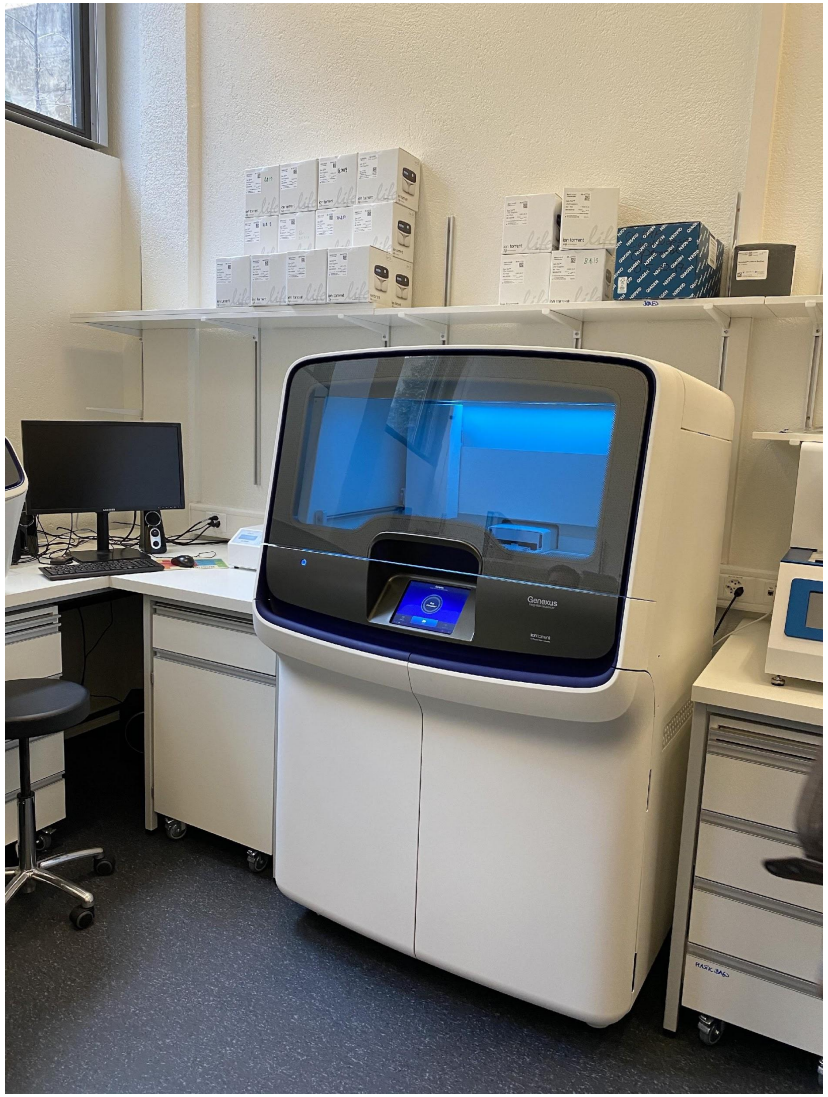
- SIFT, PolyPhen2 и др. – для замен аминокислот
- Интегрированные показатели (SVM, LR)

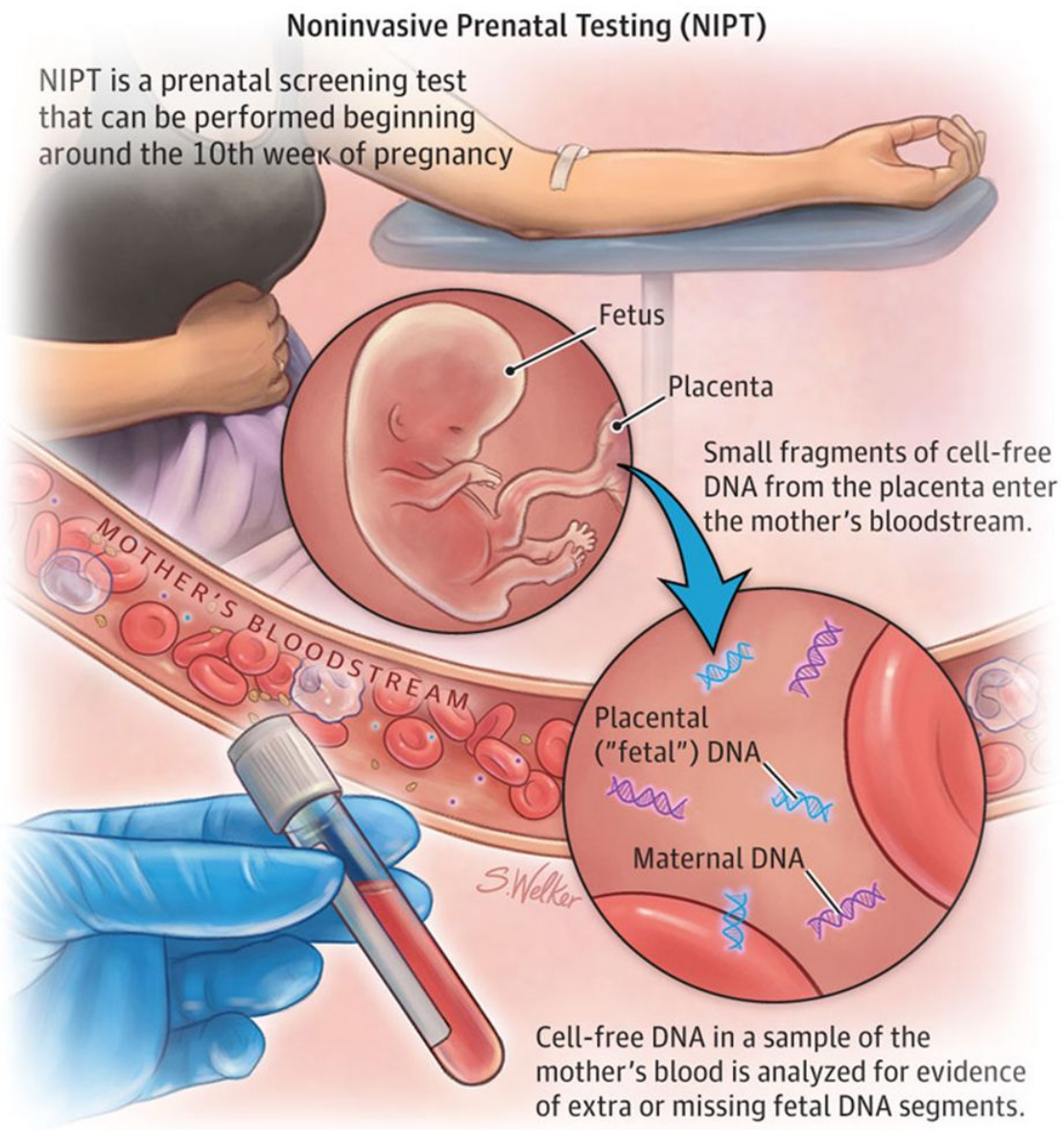
Эволюционная консервативность

Обнаружение в качестве соматических мутаций при опухолях (COSMIC)

Клиническая аннотация (ClinVar, HGMD, другие базы)

Система Genexus – новое решение от Thermo Fisher Scientific для клиник





© American Medical Association

НИПТ– метод для оценки риска хромосомной патологии у плода.

Анализ выполняется по ДНК плода, выделенной из крови матери

Методика анализа по cffDNA

НИПС

Panorama

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.

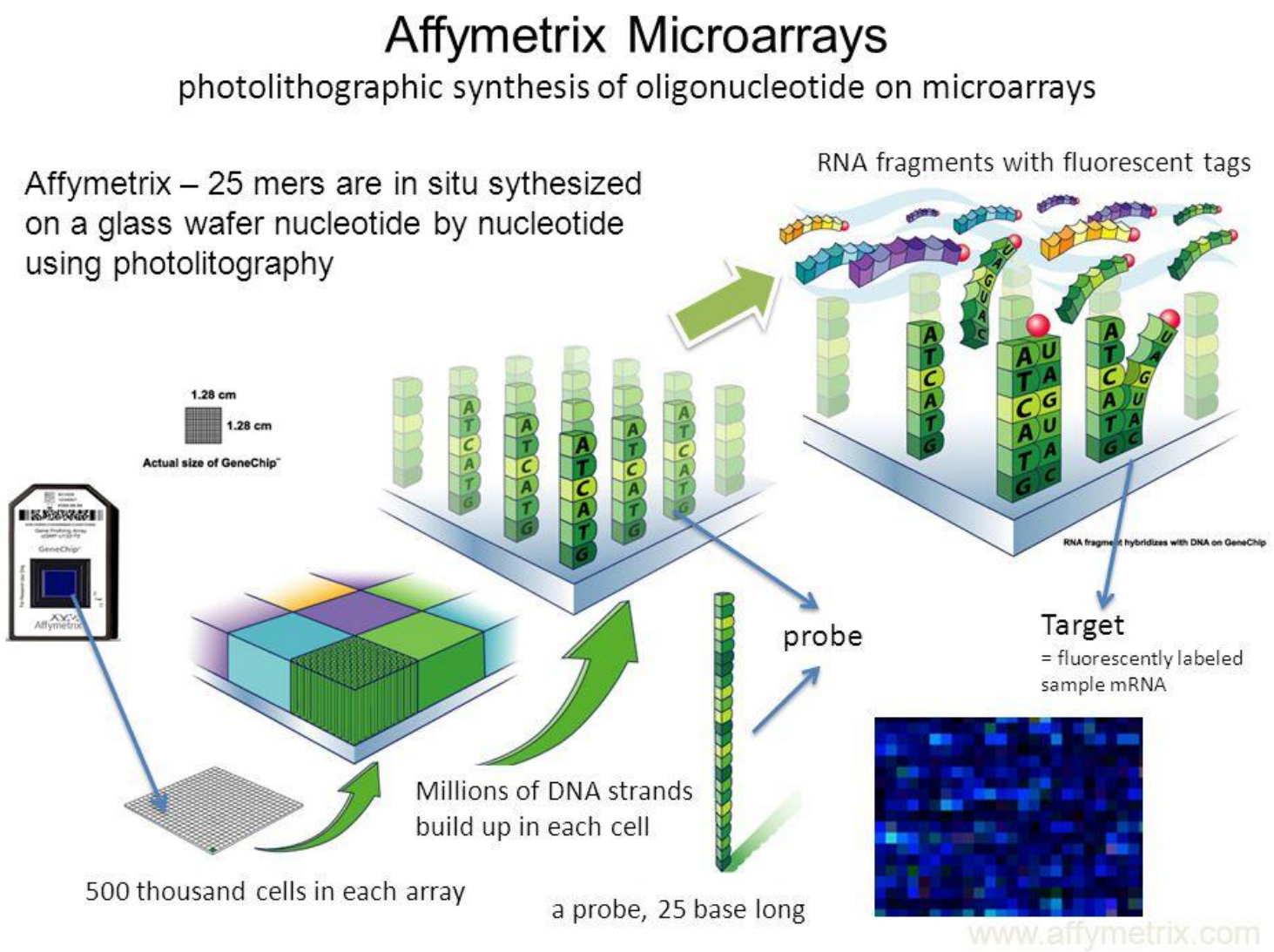
Такую свободно циркулирующую в крови ДНК можно детектировать, выделять и изучать!

Проведение жидкостной биопсии может быть рекомендовано следующим пациентам:

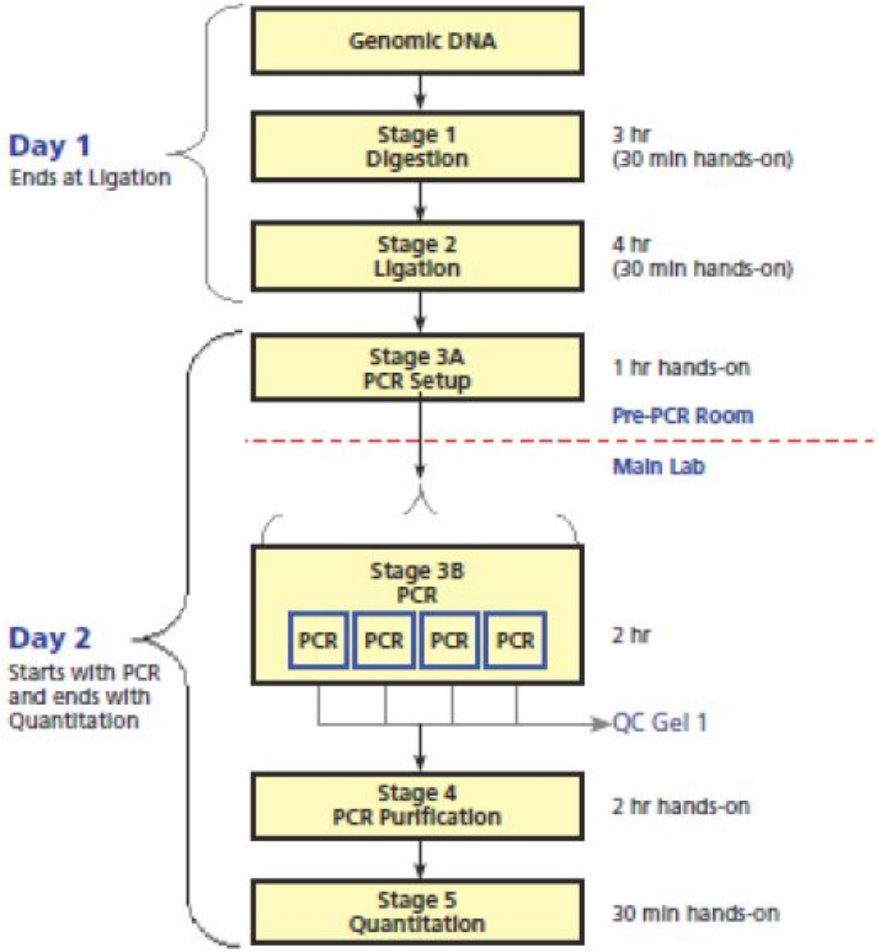
- Пациентам с диагностированным раком в случае отсутствия материала опухоли с целью поиска мутаций и подбора оптимальной терапии.
- Пациентам в процессе лечения для диагностики мутации, обуславливающих резистентность к таргетной терапии (мутация T790M в гене EGFR
- Пациентам после удаления опухоли или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

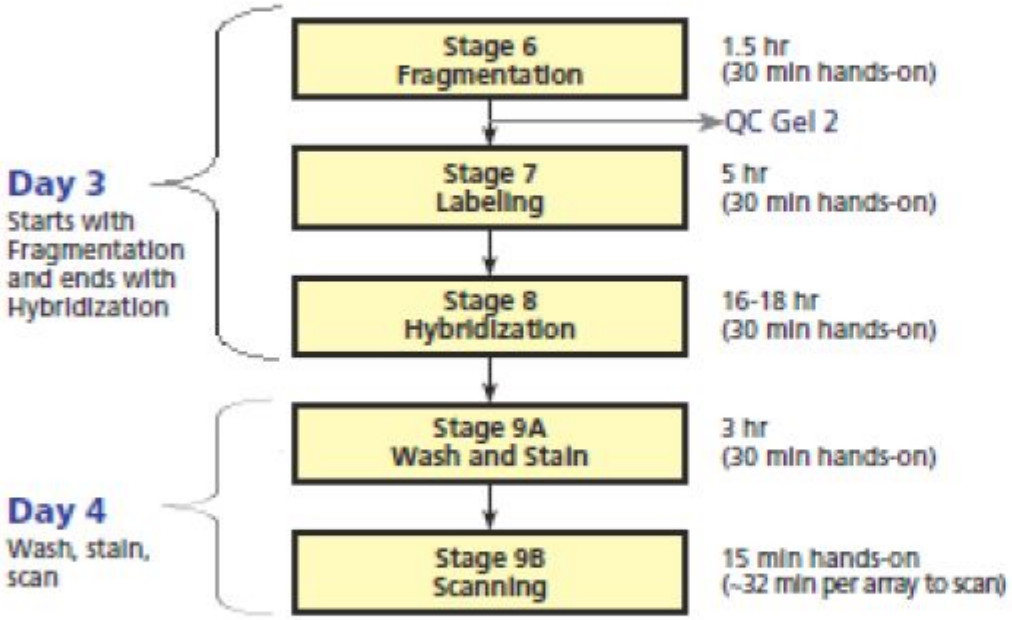
Срок выполнения: 10-14 рабочих дней

Микроматричный анализ

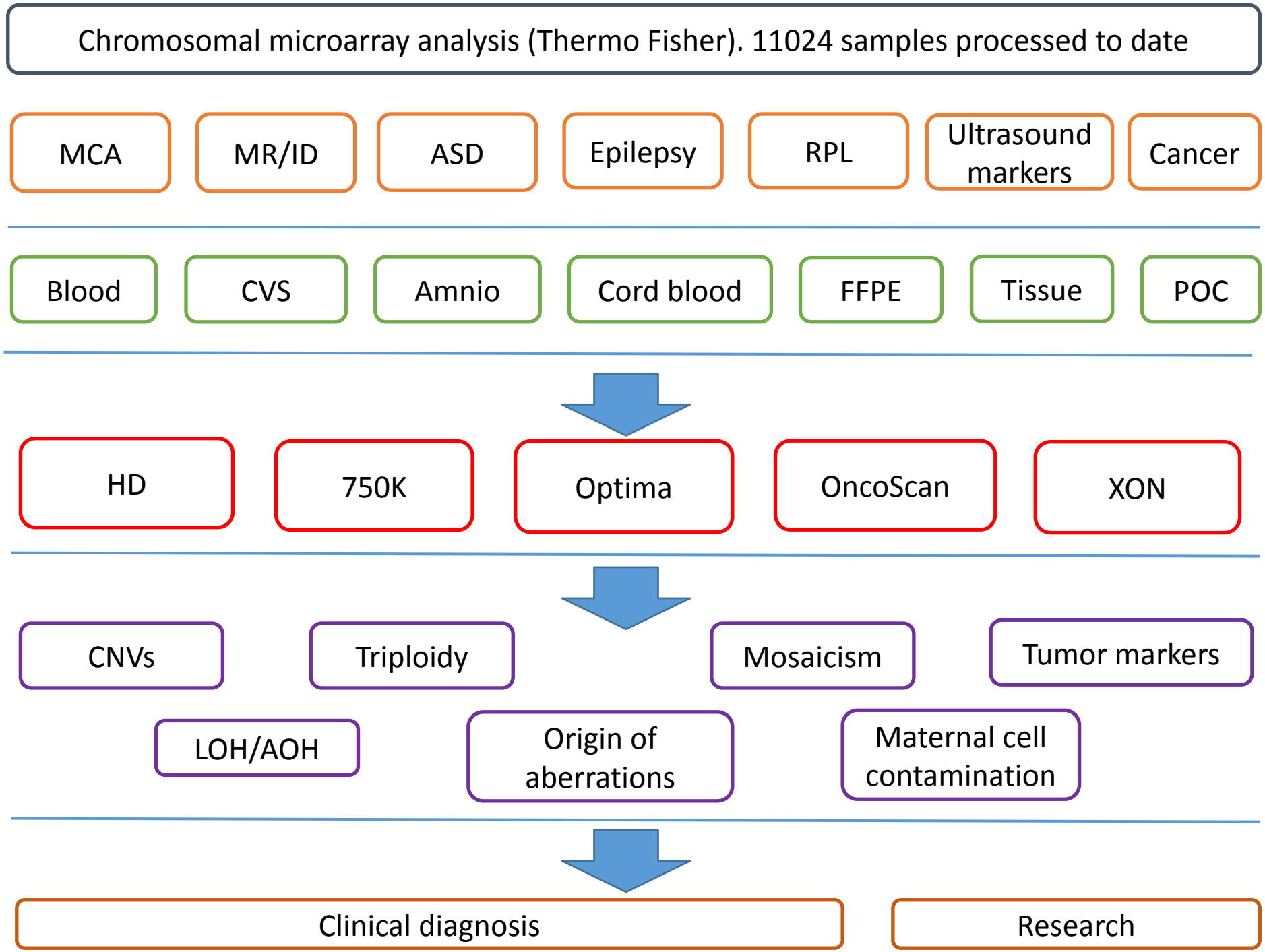


Микроматричный анализ

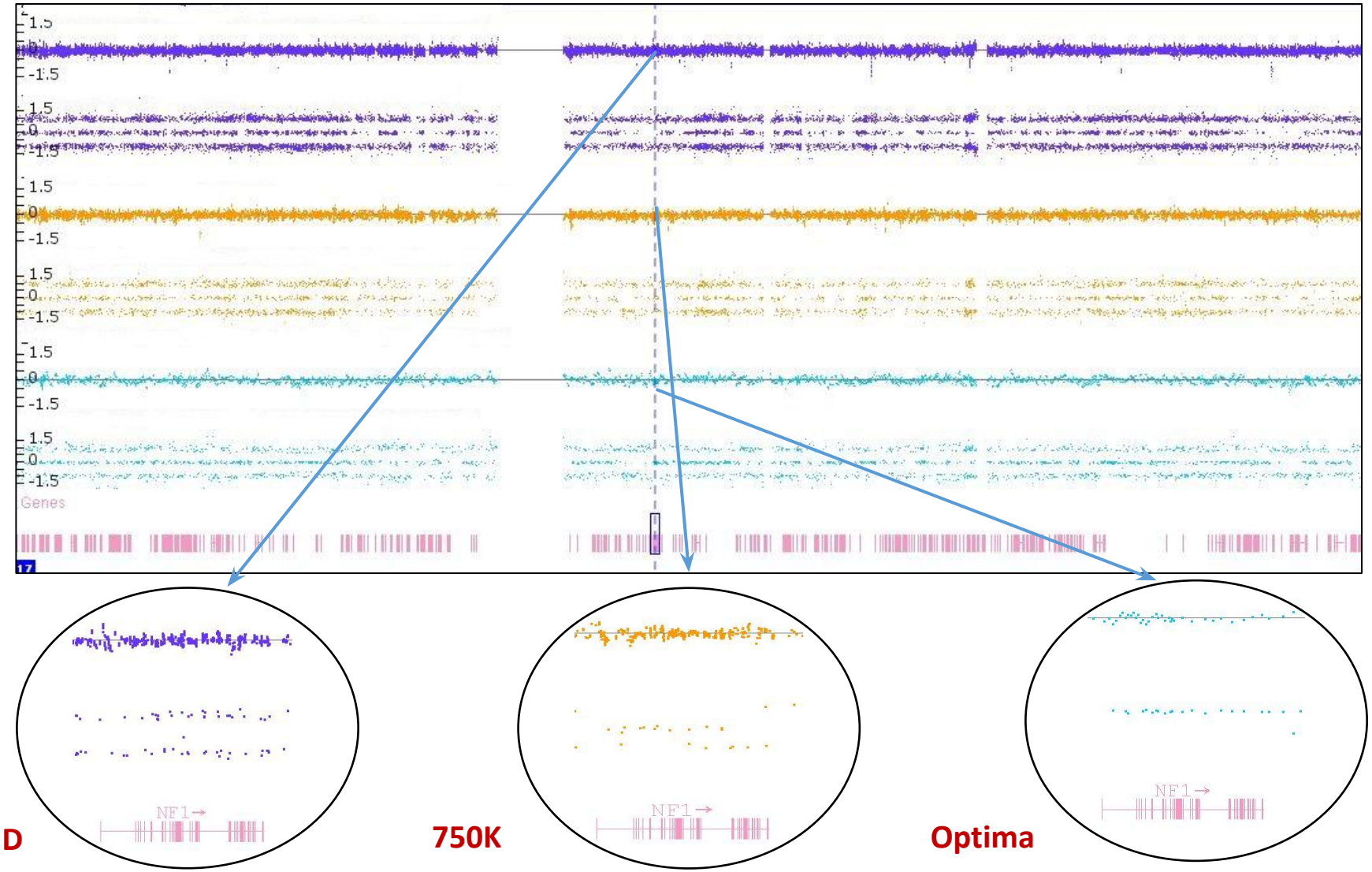




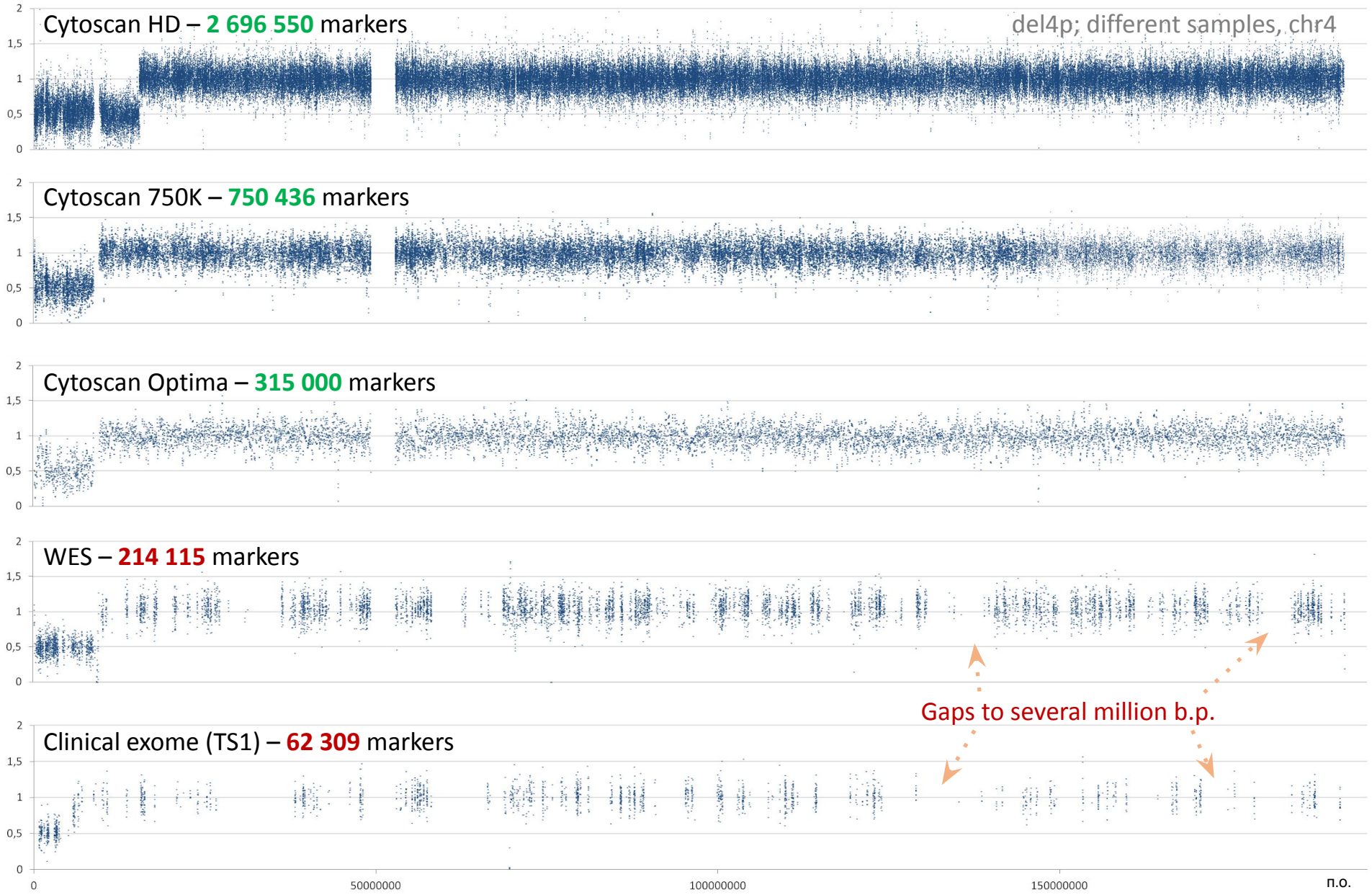
- 1 пациент = 1 микроматрица
- Нет необходимости в тестировании и подборе химии
- Нет маневров для удешевления процесса путем оптимизации


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



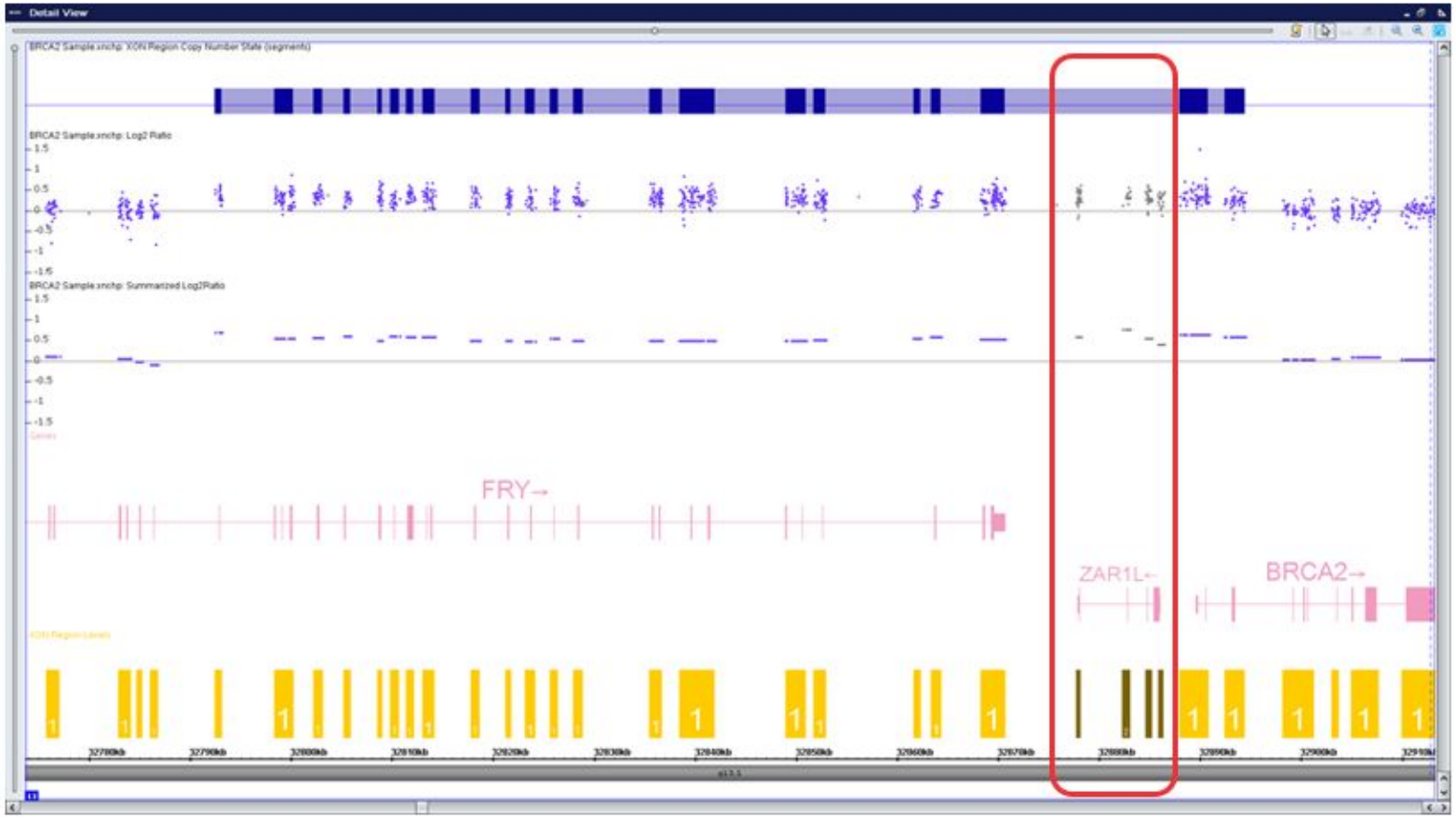
Comparison of marker distribution In different arrays & platforms



ХМА: Ограничения

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

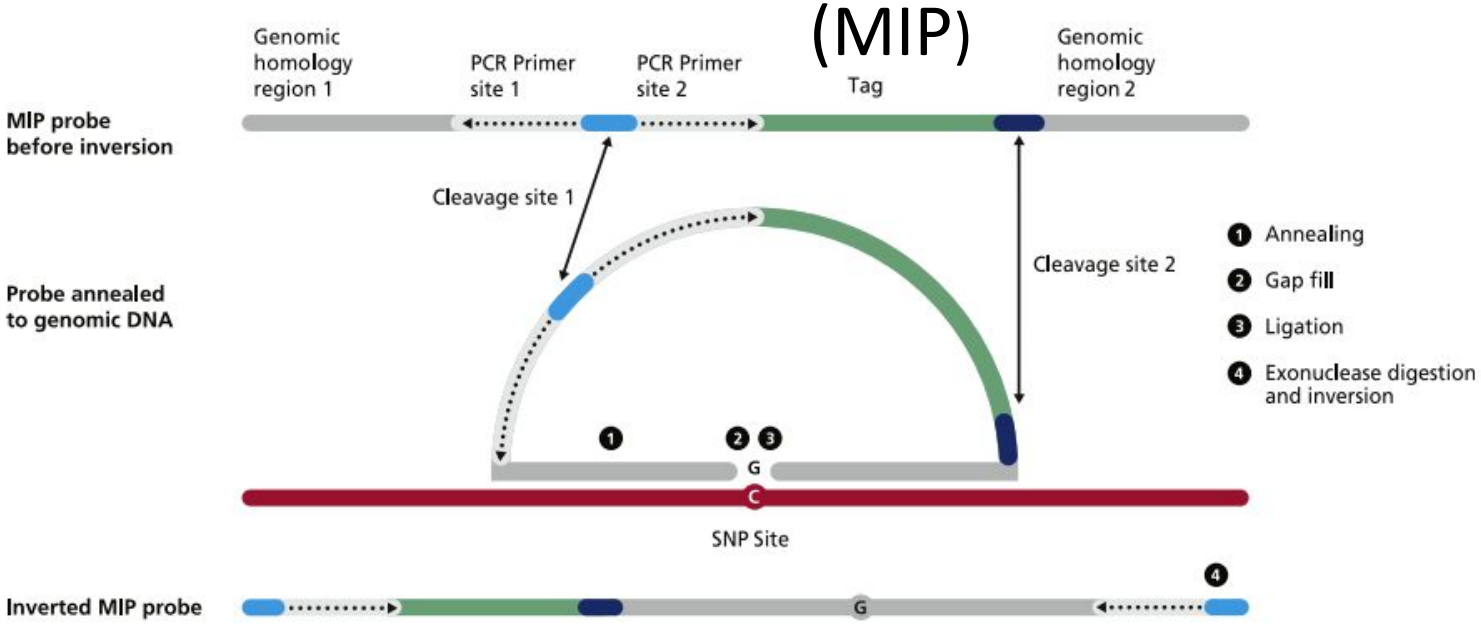
Микроматричный анализ

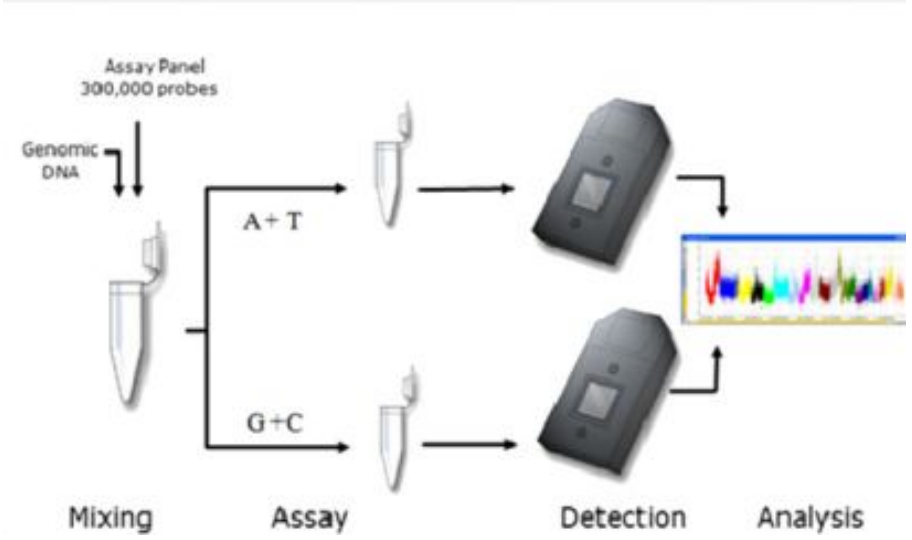


Новые микроматрицы XON смогут заменить MLPA?

Будущее молекулярного кариотипирования

Технология молекулярной инверсионной пробы (MIP)





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

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

sales@sesana.ru

ThermoFisher SCIENTIFIC

opentrons

Isohelix DNA Sampling and Purification

TWIST BIOSCIENCE

Swift BIOSCIENCES

BGI GLOBAL GENOMIC SERVICES

ОСН. 2007
ГЕНОМЕД

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Геномед – первый OEM-партнер Thermo Fisher Scientific в России

Спасибо за внимание!

dp@genomed.ru

+7 915 050 55 56