

**РОССИЙСКИЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ
ПРОБОПОДГОТОВКИ К
NGS–СЕКВЕНИРОВАНИЮ
ОТ КОМПАНИИ «ДНК–ДИСПЛЕЙ»**

АБОРНЕВА АНАСТАСИЯ, К.Б.Н.

Компания «ДНК-дисплей»

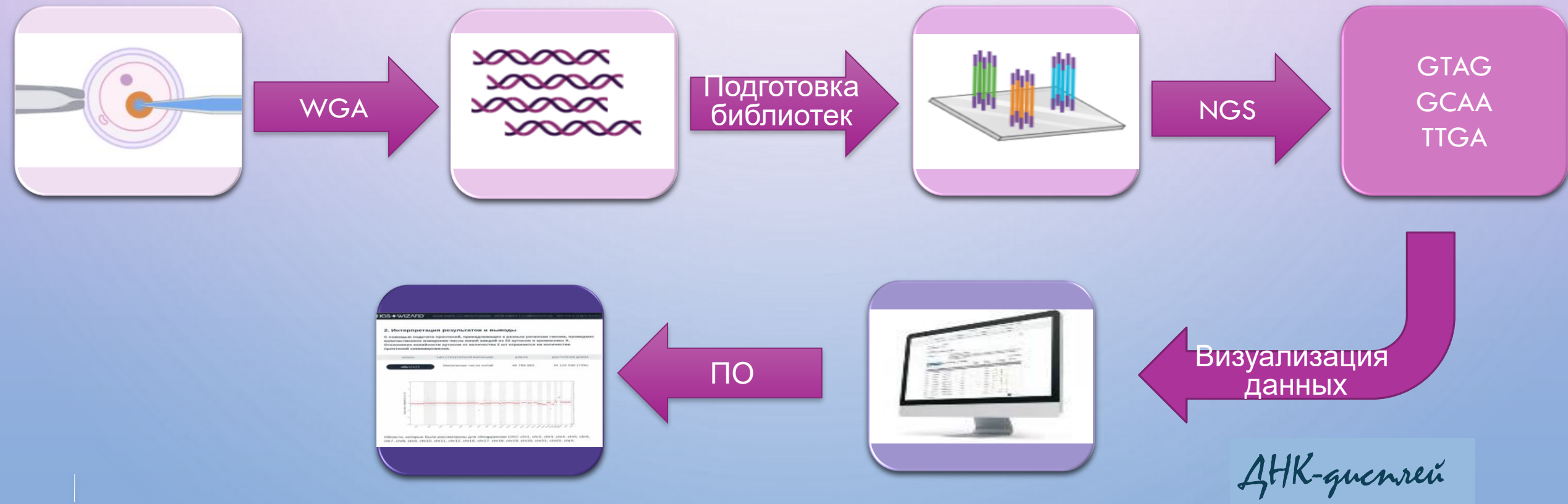


ООО «ДНК-дисплей» создано в 2019 году с целью разработки и продвижения на рынок реагентов, необходимых при использовании самых современных методов генетического анализа – геномика единичных клеток, полногеномная амплификация, пробоподготовка для NGS. Один из проектов компании (ПГТ-А) был поддержан Фондом содействия развитию инноваций в научно-технической сфере (Фонд Бортника)

Успешному развитию ООО «ДНК-дисплей» способствует сотрудничество с компанией «БиоЛинк», которая одна из первых в России начала специализироваться на разработке и внедрении в практику методов современной молекулярной диагностики.

Технология ПГТ-А методом NGS

Преимплантационное генетическое тестирование на хромосомные аномалии (ПГТ-А) — скрининговое исследование, которое используется в цикле вспомогательных репродуктивных технологий и позволяет отобрать для переноса в полость матки эмбрионы с нормальным хромосомным набором. В настоящее время для ПГТ-А чаще всего применяется технология NGS, которая позволяет выявлять широкий спектр хромосомных нарушений.



Биопсия клеток трофобласта

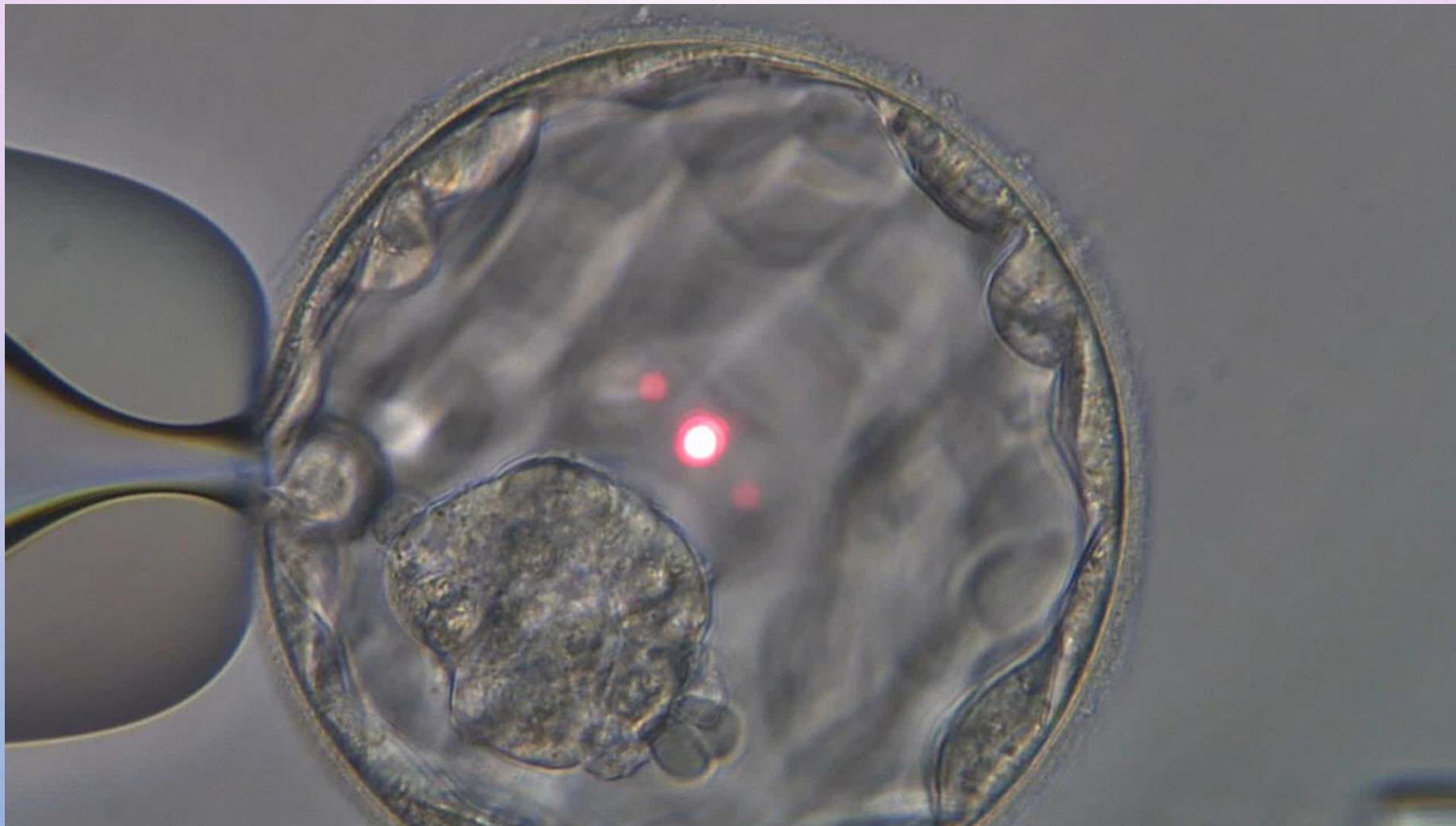
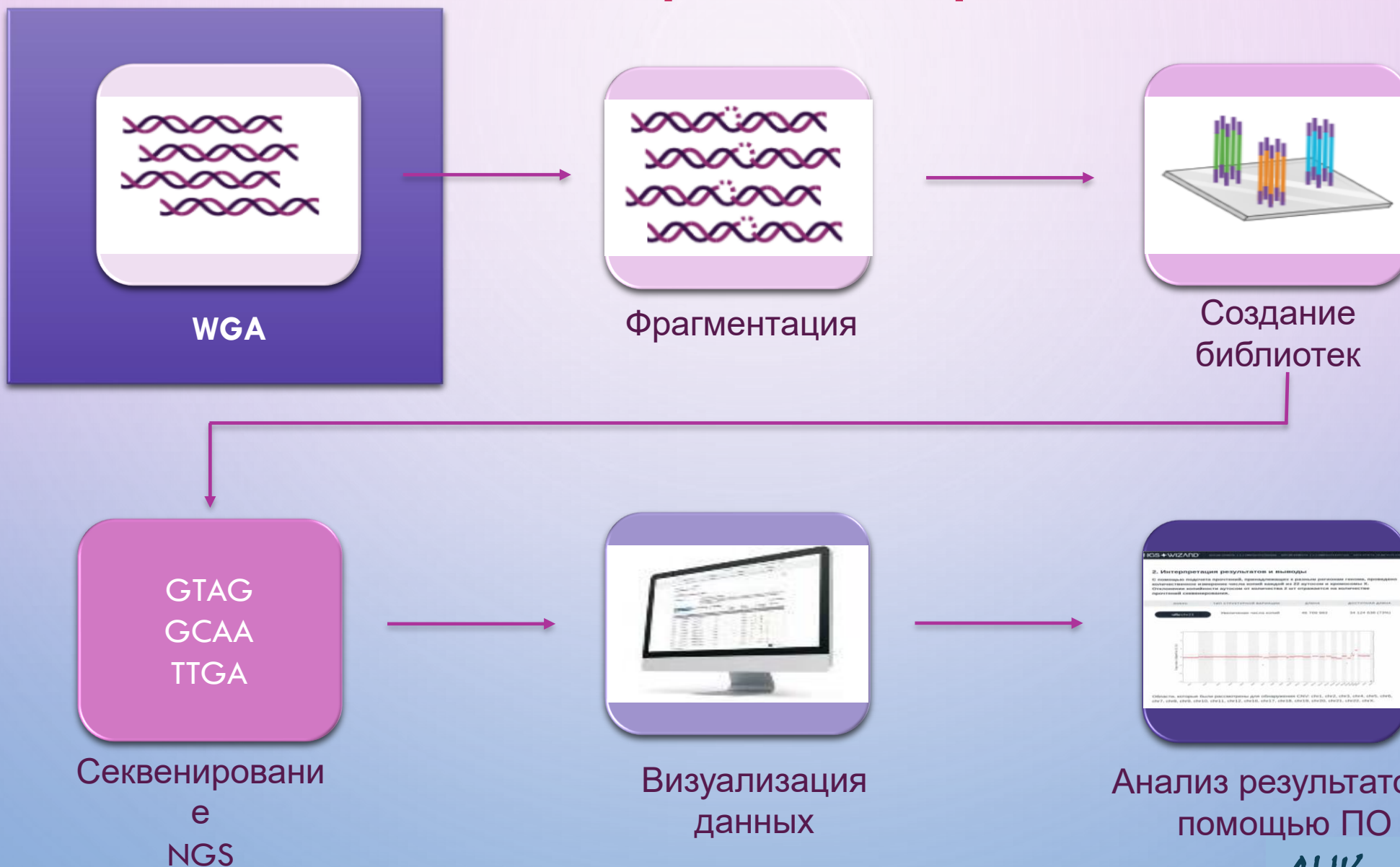


Схема рабочего процесса



ДНК-генетик

WGA DISPLAY – НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛНОГЕНОМНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

WGA Display – набор реагентов для полногеномной амплификации

Области применения

- Single-cell sequencing – исследование генетического материала единичных клеток (ПГТ, изучение генетического мозаицизма или геномный анализ клеточных субпопуляций раковых опухолей)
- Исследования древней ДНК (исключение контаминации ДНК бактерий и грибов).
Археологические образцы всегда содержат некоторое количество ДНК бактерий и грибов, которые колонизируют останки, пока те лежат в земле. Кроме того, в процессе исследования древней ДНК в образец может попасть микробная ДНК, присутствующая в любой лаборатории
- Криминалистика
- Животноводство – *in vitro* продуцирование сельскохозяйственных животных, редактирование генома
- Научные исследования

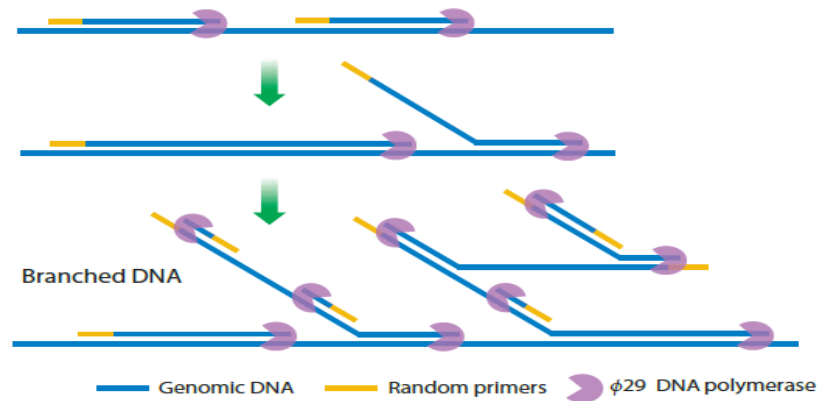
WGA Display – набор реагентов для полногеномной амплификации

Методы полногеномной амплификации

Амплификация со множественным замещением цепи ПЦР с вырожденными праймерами

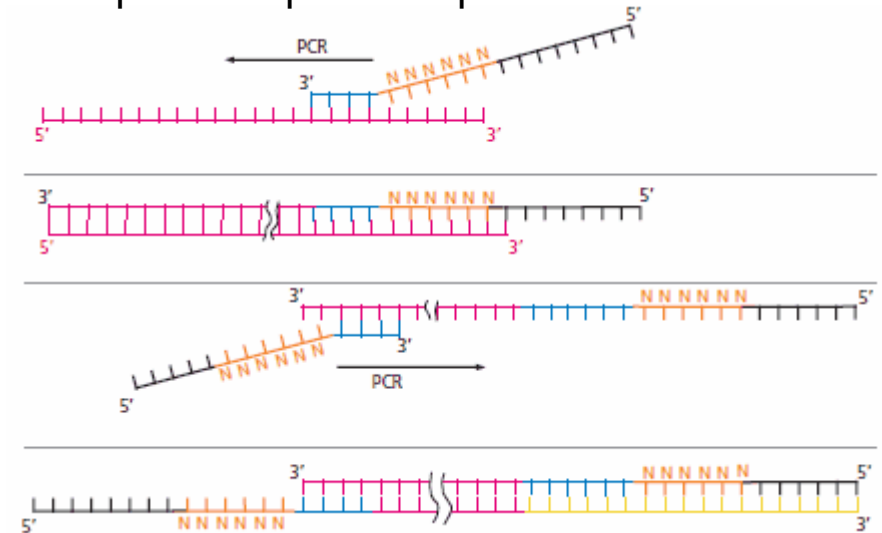
Multiple displacement amplification (MDA)

MDA это самый распространённый метод изотермической WGA. Используются случайные последовательности из 6 нуклеотидов в качестве праймеров, а также ДНК-полимераза из бактериофага Phi29 DNA с вытесняющей активностью.



Degenerative oligonucleotide primer (DOP) PCR

Метод DOP ПЦР основан на использовании набора праймеров с вырожденной последовательностью на 3'-конце и фиксированной последовательностью на 5'-конце. Дизайн праймеров должен обеспечивать относительно равномерное покрытие всего генома.



WGA Display – набор реагентов для полногеномной амплификации

Протокол iDOP-PCR – очень просто!

10 μ l Мастермикс
1 μ l SD ДНК-пол
X μ l образец (1-14 μ l) Уменьшение риска контаминации ▶ ПЦР



25 μ l PC



Неспецифический
отжиг + ПЦР

Минимальное
количество ДНК – от 10
пг

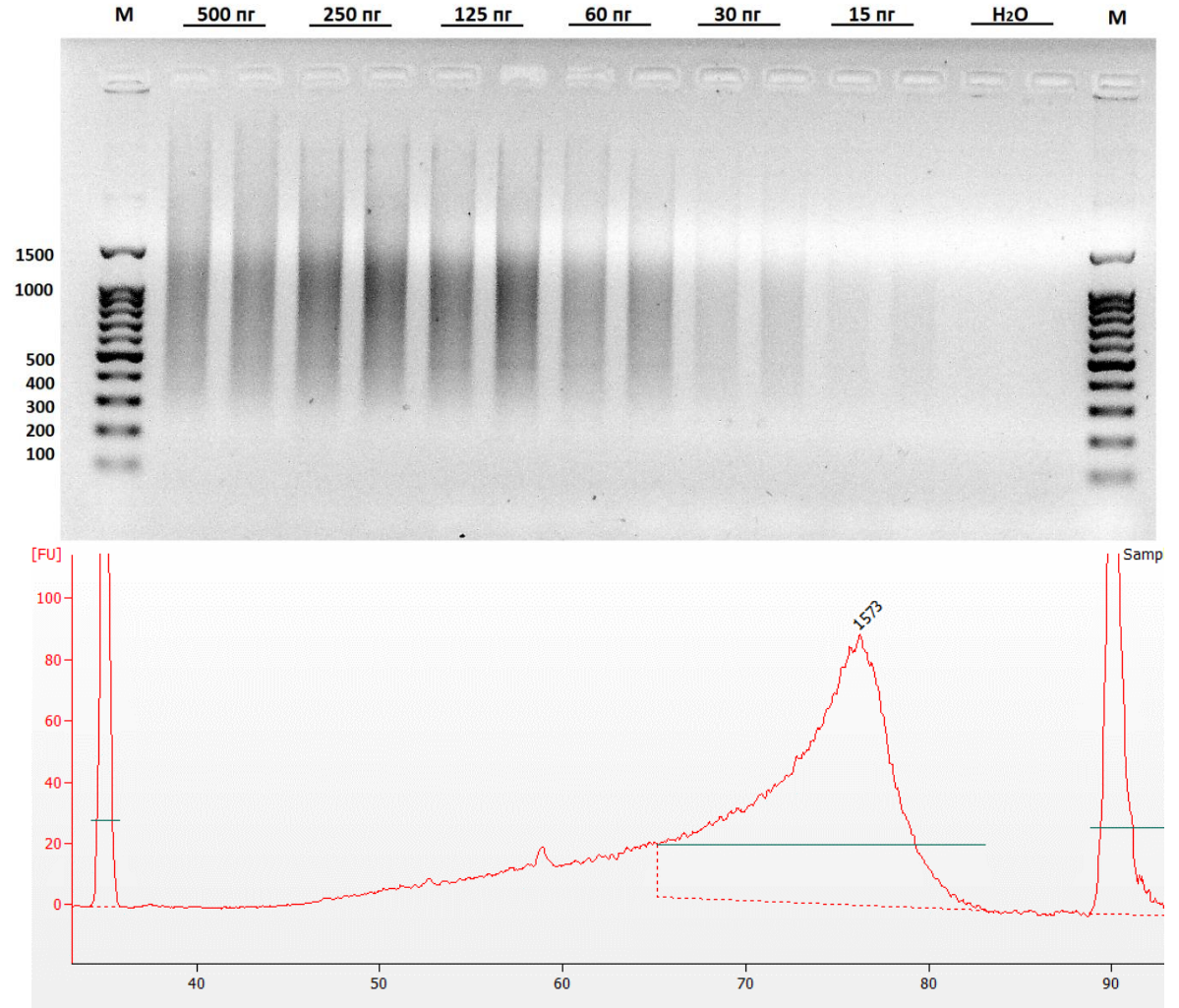
Выход = 2-4 μ g

Общее время = 3
часа

WGA Display – набор реагентов для полногеномной амплификации

Количество ДНК-матрицы, вносимой в реакцию	15 – 500 пг
Количество продукта после проведения ПГА	360 – 1000 нг

Результат успешной полногеномной амплификации ДНК человека (60 пг). Продуктом амплификации являются фрагменты, длина большей части которых находится в диапазоне 645-2775 пн



WGA Display – набор реагентов для полногеномной амплификации

Сравнение наборов PicoPlex и WGA Display (iDOP-PCR) с помощью NGS

WGA method	Sample	Genome coverage	Unmappable sequences	Reproducibility
PicoPlex	1	51.0%	42.4%	98.1%
	2	50.8%	44.6%	
iDOP-PCR	1	61.5%	31.5%	97.6%
	2	60.7%	33.1%	

Ключевые характеристики метода полногеномной амплификации – область покрытия, количество некартируемых прочтений, воспроизводимость.

Каждый образец был проанализирован с помощью двух разных наборов (PicoPlex и WGA Display).

WGA Display – набор реагентов для полногеномной амплификации

Whole genome amplification methods, what is better for PGT-A?

BSc. Martínez, L.¹; PhD. García-Pascual, C.M.¹; PhD. Navarro-Sánchez, L.¹; MSc. Navarro, R.²; PhD. Jiménez, J.²; MD. PhD. Simón, C.¹; PhD. Rubio, C.¹

¹ PGS Research Department. Igenomix, Ronda Narciso Monturiol, 11 B. Parque Tecnológico Paterna 46980 – Paterna – Valencia.

³PGD Molecular Cytogenetics. Igenomix, Ronda Narciso Monturiol, 11 B. Parque Tecnológico Paterna 46980 – Paterna – Valencia.

³Department of Obstetrics & Gynecology, Valencia University & INCLIVA, Spain.

⁴Igenomix, Ronda Narciso Monturiol, 11 B. Parque Tecnológico Paterna 46980 – Paterna – Valencia



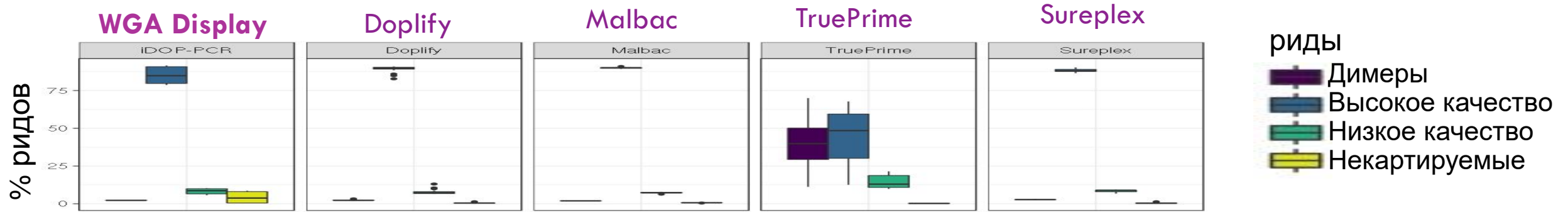
Corresponding author. E-mail: carmen.garcia@igenomix.com

Компания **IgenomiX** провела сравнительное исследование нескольких наборов для полногеномной амплификации:

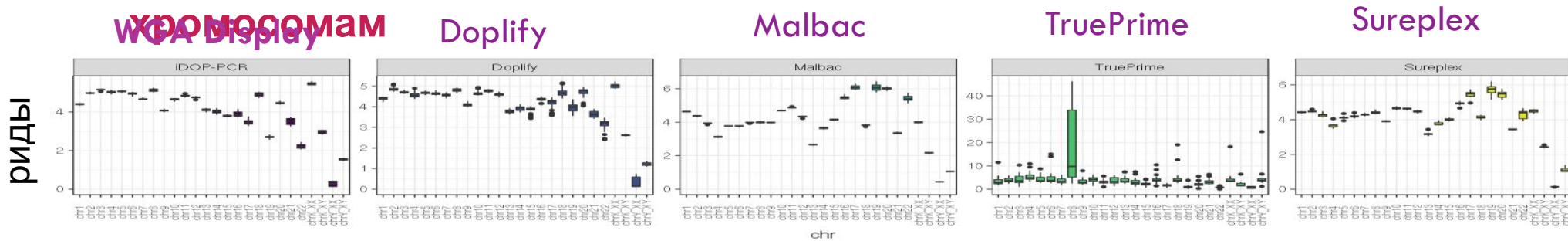
- WGA Display (iDOP-PCR)
- Doplify
- Malbac
- TruePrime
- Sureplex

WGA Display – набор реагентов для полногеномной амплификации

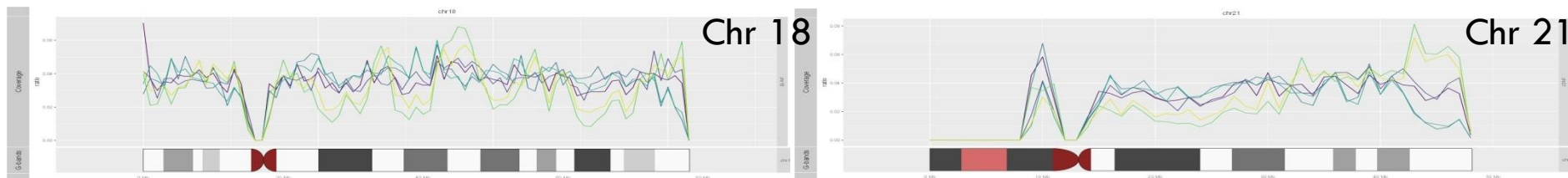
- Качество ридов



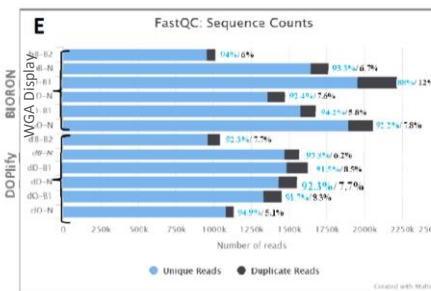
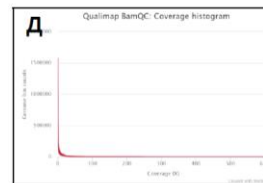
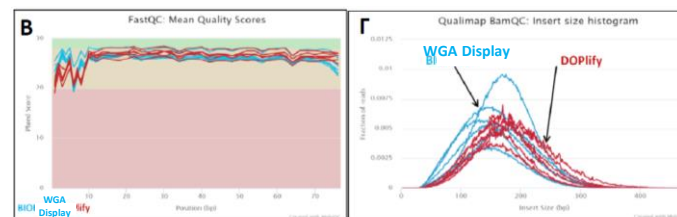
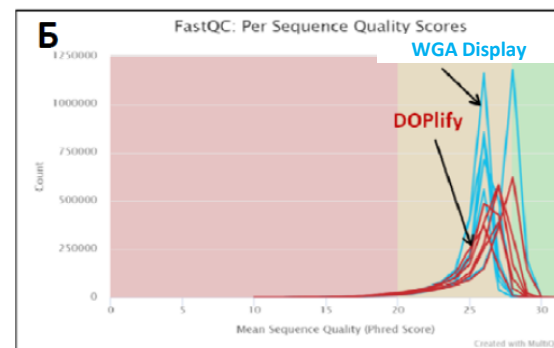
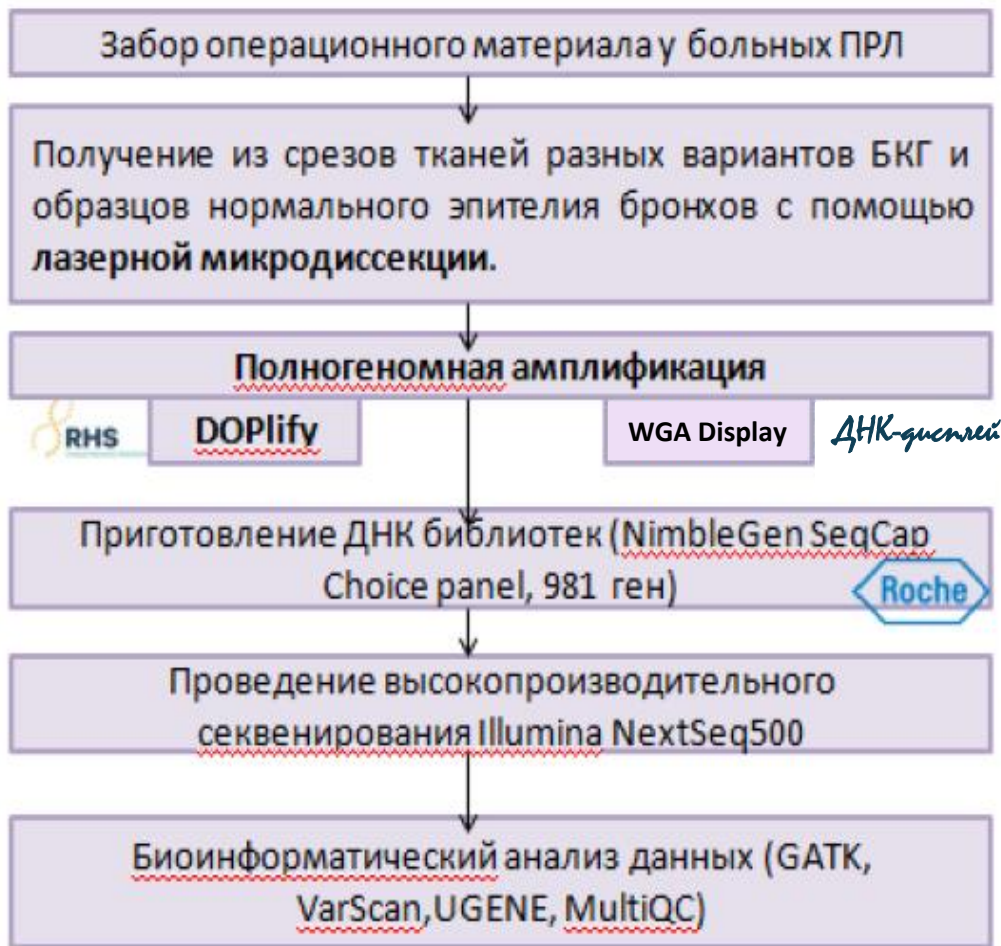
- Распределение ридов по хромосомам



- Только WGA Display (iDOP-PCR) и Doplify показали равномерное покрытие



WGA Display – набор реагентов для полногеномной амплификации



Образцы, подготовленные с помощью набора WGA Display, имели больше качественных прочтений, чем образцы DOPlify

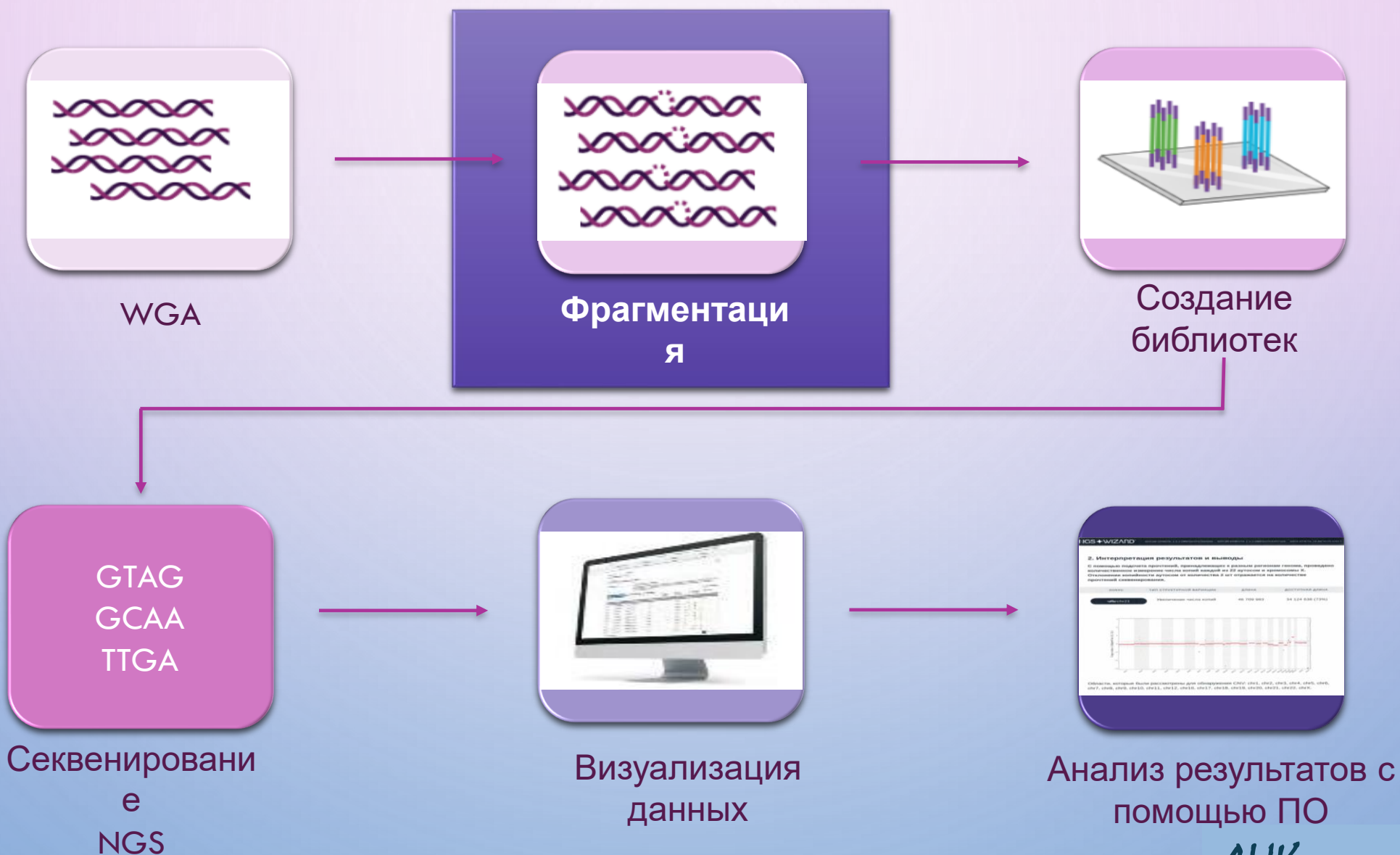
- анализ средних значений качества для каждой позиции оснований
 - распределения средней длины прочтенных последовательностей
 - глубины покрытия
 - количества уникальных прочтений и дубликатов для каждого образца
- показал отсутствие значительных отличий между образцами**

WGA Display – набор реагентов для полногеномной амплификации

Преимущества набора

- Минимальное необходимое количество ДНК – от 10 пг
- Простая и быстрая процедура амплификации в одну стадию и в одной пробирке благодаря использованию уникального инновационного фермента – SD ДНК-полимеразы
- Специфичность к геному млекопитающих
- Возможность реамплификации
- Универсальность использования ампликонов – микрочипы (CGH), массовое параллельное секвенирование (NGS) на различных платформах, ПЦР (Real Time, Digital)

Схема рабочего процесса



ДНК-генетик

**FTP DISPLAY – НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ ДЦ ДНК**

FTP Display – набор реагентов для ферментативной фрагментации дцДНК

Смесь ферментов ДНКазы I + SD ДНК-полимераза



Эндонуклеаза ДНКазы I создает множество случайных одноцепочечных разрывов в дцДНК, образуя полинуклеотиды с концевым-5'-фосфатом и свободной гидроксильной группой на 3'-конце

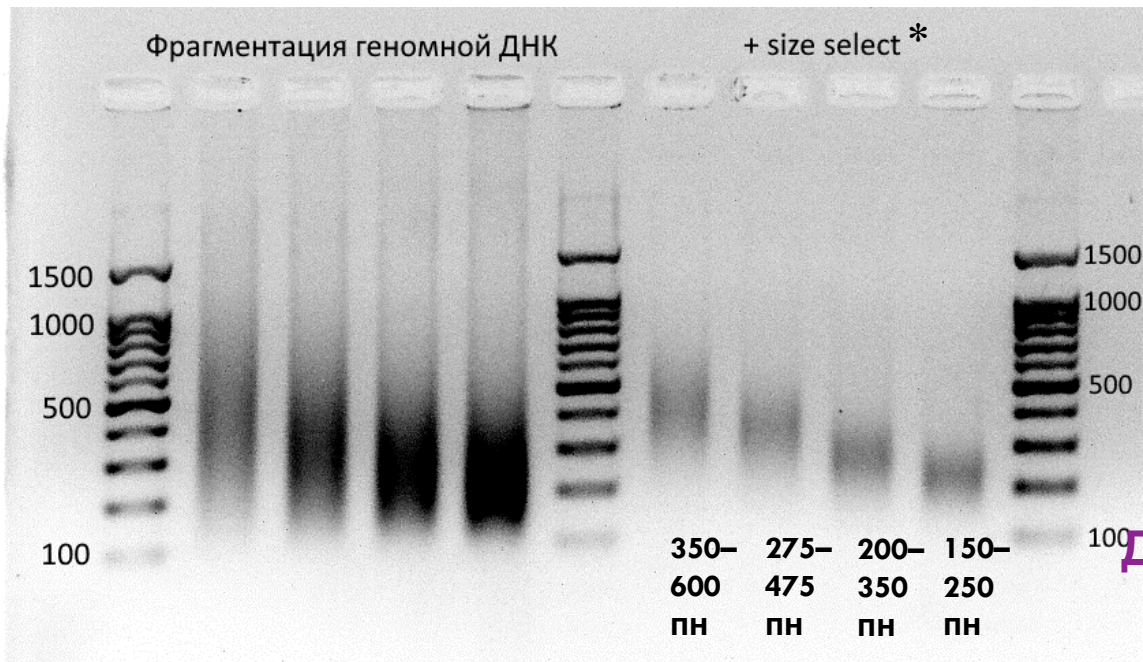
SD ДНК-полимераза вытесняет нити ДНК и достраивает полинуклеотиды с 3'-конца методом полимеризации ДНК с вытеснением цепи

Полученные двуцепочечные фрагменты имеют **перекрывающиеся последовательности** и **3'-А-выступы** на концах, что позволяет проводить прямое лигирование фрагментов с ДНК-адаптерами, исключая необходимость восстановления и дополнительного аденилирования. Кроме того, за счет перекрывания областей, происходит дополнительное увеличение количества материала.

FTP Display – набор реагентов для ферментативной фрагментации дцДНК



FTP Display – набор реагентов для ферментативной фрагментации дцДНК



Диапазон длин фрагментов дцДНК, п.н.	Объем активатора, мкл
150 – 250	8
200 – 350	7
275 – 475	6
350 – 600	5

Диапазон длин фрагментов контролируется объемом вносимого активатора реакции, все остальные условия остаются неизменными

Количество матрицы, вносимой в реакцию – **10 - 1000 нг** любой двуцепочечной ДНК (геномная ДНК человека, животных, растений, бактерий или вирусов, продукты амплификации)

*Селекция по размеру проводилась с помощью магнитных частиц

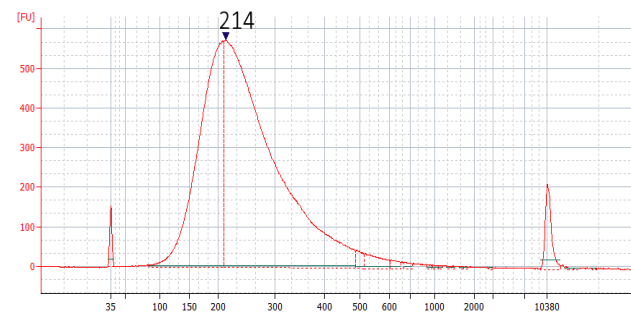
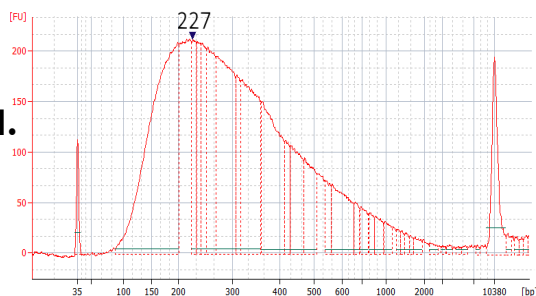
FTP Display – набор реагентов для ферментативной фрагментации дцДНК

Результат проведения фрагментации геномной дц ДНК человека (100 нг)

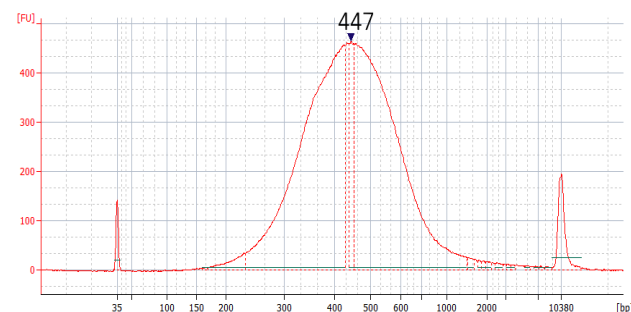
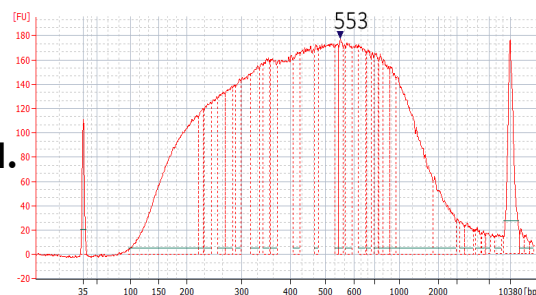
до селекции

после селекции*

150 – 250 п.н.



350 – 600 п.н.



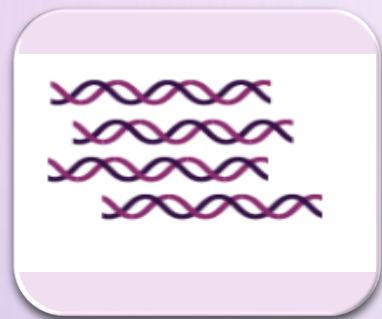
*Селекция по размеру проводилась с помощью магнитных частиц

FTP Display – набор реагентов для ферментативной фрагментации дцДНК

Преимущества набора

- Заменяет ультразвуковые технологии при пробоподготовке для NGS – нет необходимости в дополнительном оборудовании и расходных материалах
- Простая и быстрая процедура фрагментации в одной пробирке
- Возможность контролировать размер получаемых фрагментов
- Обеспечивает сохранность структуры ДНК в процессе фрагментации
- Объединяет в одном этапе фрагментацию, восстановление концов ДНК и аденилирование - нет необходимости использования дополнительных наборов

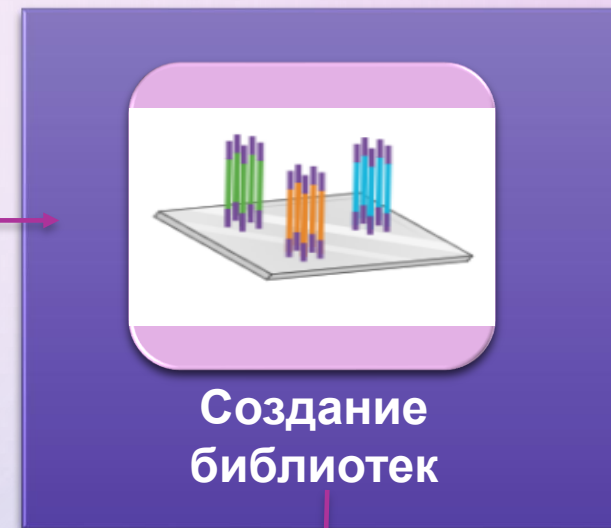
Схема рабочего процесса



WGA



Фрагментация



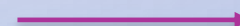
Создание библиотек



Секвенирование NGS



Визуализация данных



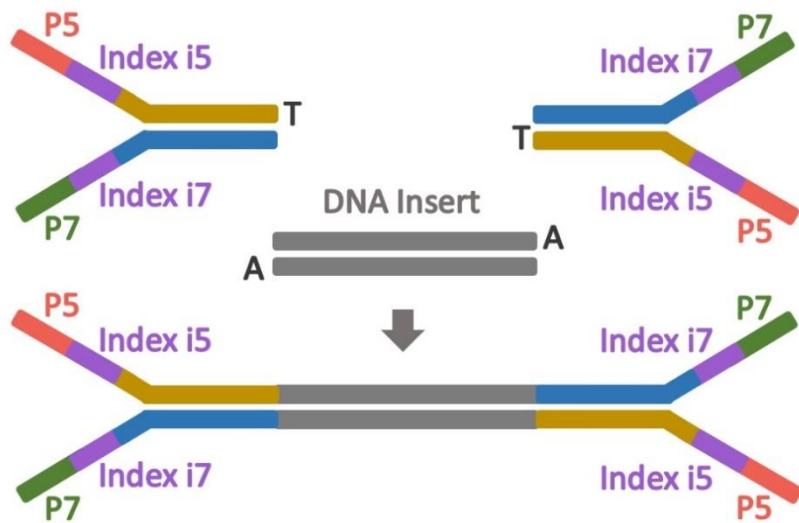
Анализ результатов с помощью ПО

ДНК-генетик

LIV DISPLAY – НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДНК БИБЛИОТЕК

LIB Display – набор реагентов для приготовления ДНК-библиотек

Первый этап приготовления библиотек – Т-А лигирование Y-адаптеров с фрагментами исследуемой ДНК.



DNA Insert – фрагмент исследуемой дц ДНК

Index i5/i7 - уникальная последовательность из 6 – 8 нуклеотидов, комбинация которых позволяет однозначно маркировать образцы ДНК.

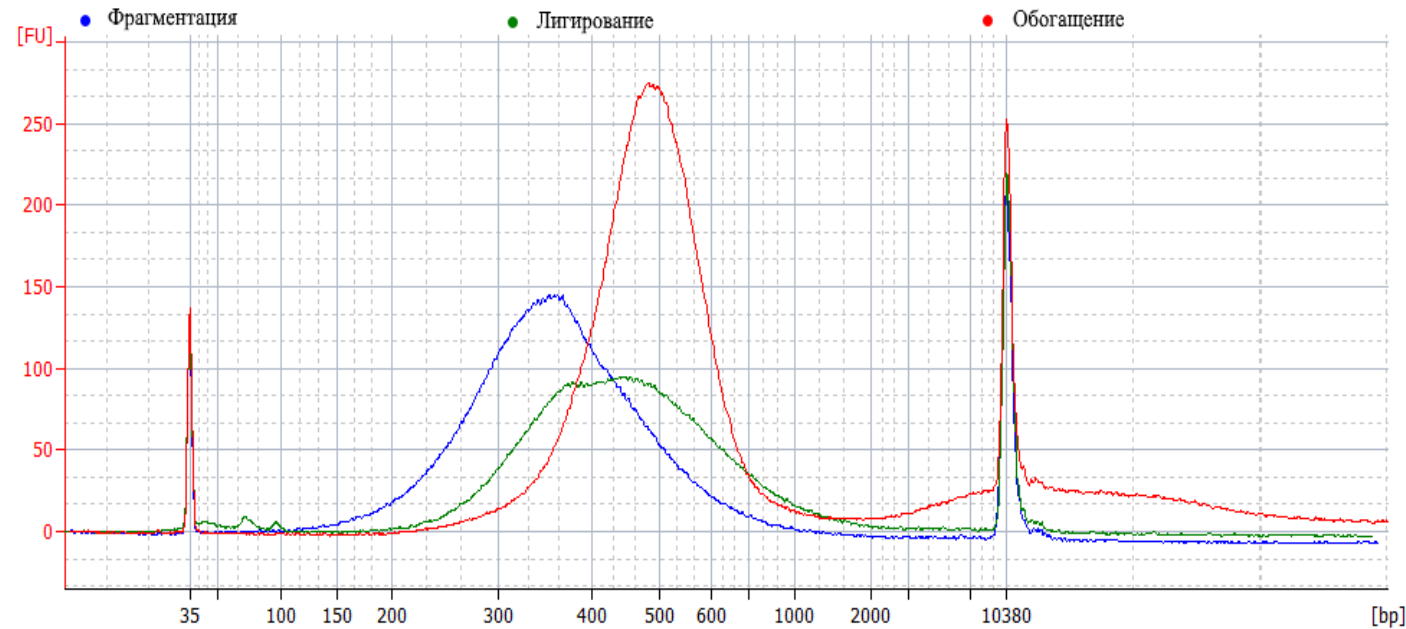
P5/P7 - сайты связывания с поверхностью проточной кюветы секвенатора

Второй этап приготовления библиотек – обогащение полученных продуктов с помощью ПЦР.

Приготовленные библиотеки предназначаются для секвенирования на платформах Illumina с использованием соответствующих реагентов

LIV Display – набор реагентов для приготовления ДНК-библиотек

Результаты проведения различных этапов приготовления библиотеки геномной дц ДНК человека (100 нг*)



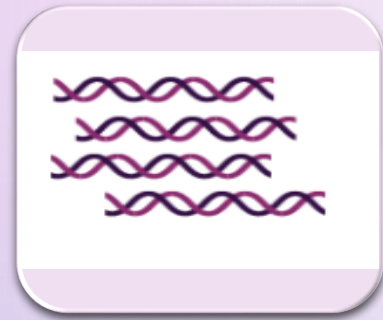
*Количество ДНК, вносимой в реакцию – 10 -100 нг

LIV Display – набор реагентов для приготовления ДНК-библиотек

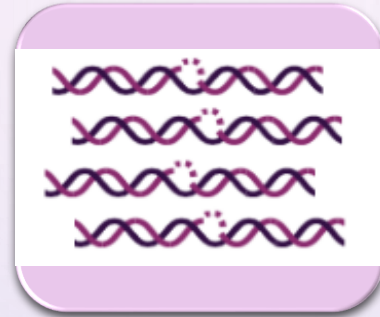
Преимущества набора LIV Display

- Удобные протоколы – получение готовых библиотек в два этапа
- Небольшое количество исходного материала (10-100 нг)
- Экономия времени – получение готовых библиотек за 4 часа
- Подготовка до 96 образцов с помощью набора адаптеров ADP Display
- Возможность использования с любыми наборами адаптеров, ориентированных на принцип T-A лигирования

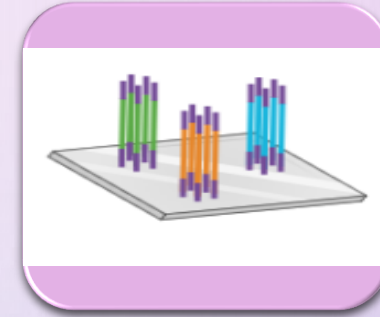
Схема рабочего процесса



WGA



Фрагментация



Создание библиотек



Секвенирование NGS



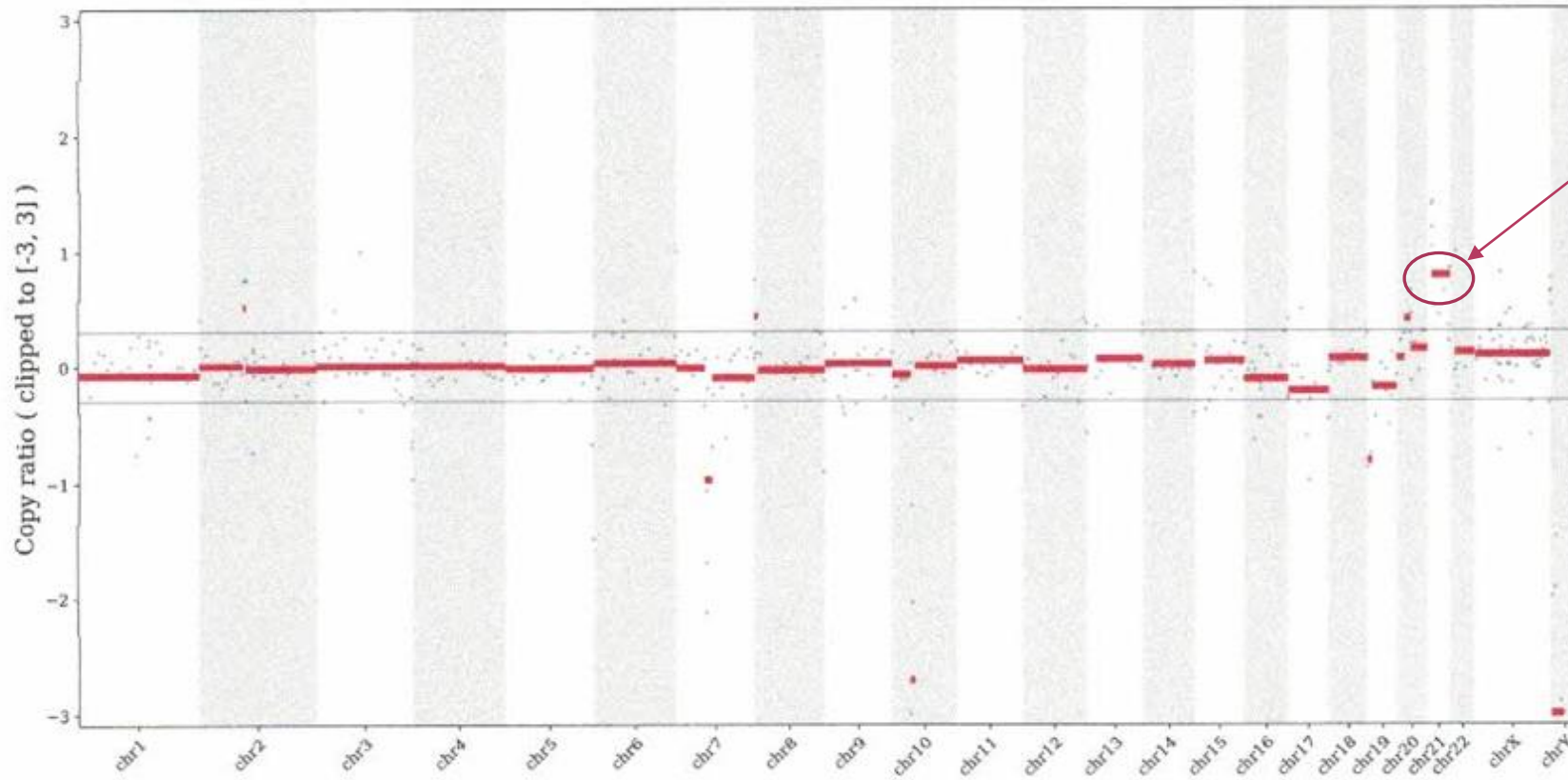
Визуализация данных



Анализ результатов с помощью ПО

Пример обработки результата ПГТ-А

NGS WIZARD by Genominal



Трисомия по 21 хромосоме

Наборы ДНК Дисплей

WGA Display – набор для полногеномной амплификации (для работы с геномной ДНК)	(12, 24 и 96 реакций)
SC WGA Display – набор для полногеномной амплификации (для работы с единичными клетками)	(12, 24 и 96 реакций)
FTP Display – набор для ферментативной фрагментации дцДНК	(8, 24 и 96 реакций)
LIB Display – набор для подготовки библиотек	(8, 24 и 96 реакций)
ADP Display – набор адаптеров для подготовки библиотек	(8, 24 и 96 реакций)

The background features a vertical gradient from light purple at the top to light blue at the bottom. Numerous realistic water droplets of various sizes are scattered across the frame, with some showing highlights and shadows. A large, faint, circular watermark is centered in the upper half of the image.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ