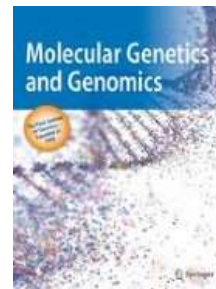
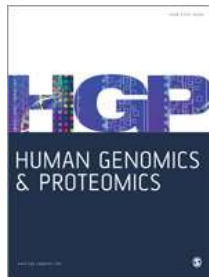


# ТЕХНОЛОГИИ NGS В МЕДИЦИНЕ (НА ПРИМЕРЕ ПЛАТФОРМ ILLUMINA)

---

# Что такое «Геномика»?

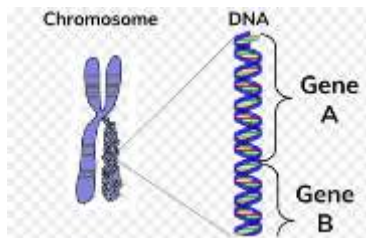
- Термин «**геном**» (genome) был предложен немецким ботаником проф. Hans Winkler (1877- 1945) в 1920 г. (University of Hamburg), который объединил термины «**ген**» (“**gene**”) и «**хромосома**» (“**chromosome**”) для обозначения одновременно всех генов во всех хромосомах ядра клетки
- Термин «**геномика**» (genomics) был предложен относительно недавно в 1986 г. Thomas Roderick (Jackson Laboratory, USA) для нового журнала Genomics и описания научной дисциплины связанной с секвенированием, картированием и анализом генома



- Геномика более широкое понятие в настоящее время и охватывает сравнение геномов разных видов (**comparative genomics**), их эволюцию (**evolutionary genomics**) и функционирование генома в целом (**functional genomics**)

**Геномика – это изучение генов и их функций в их полной совокупности и взаимодействии**

# Основы геномной структуры



ГЕН

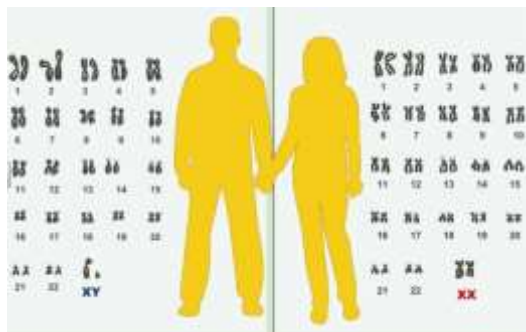
ХРОМОСОМА

ГЕНОМ

ГЕНОФОНД

Строчка в тексте / Предложение (состоящие из 4-х «букв» - нуклеотидов А, Т, С и G, и 3-х буквенных «слов» –триплетов и кодонов )

ГЛАВА

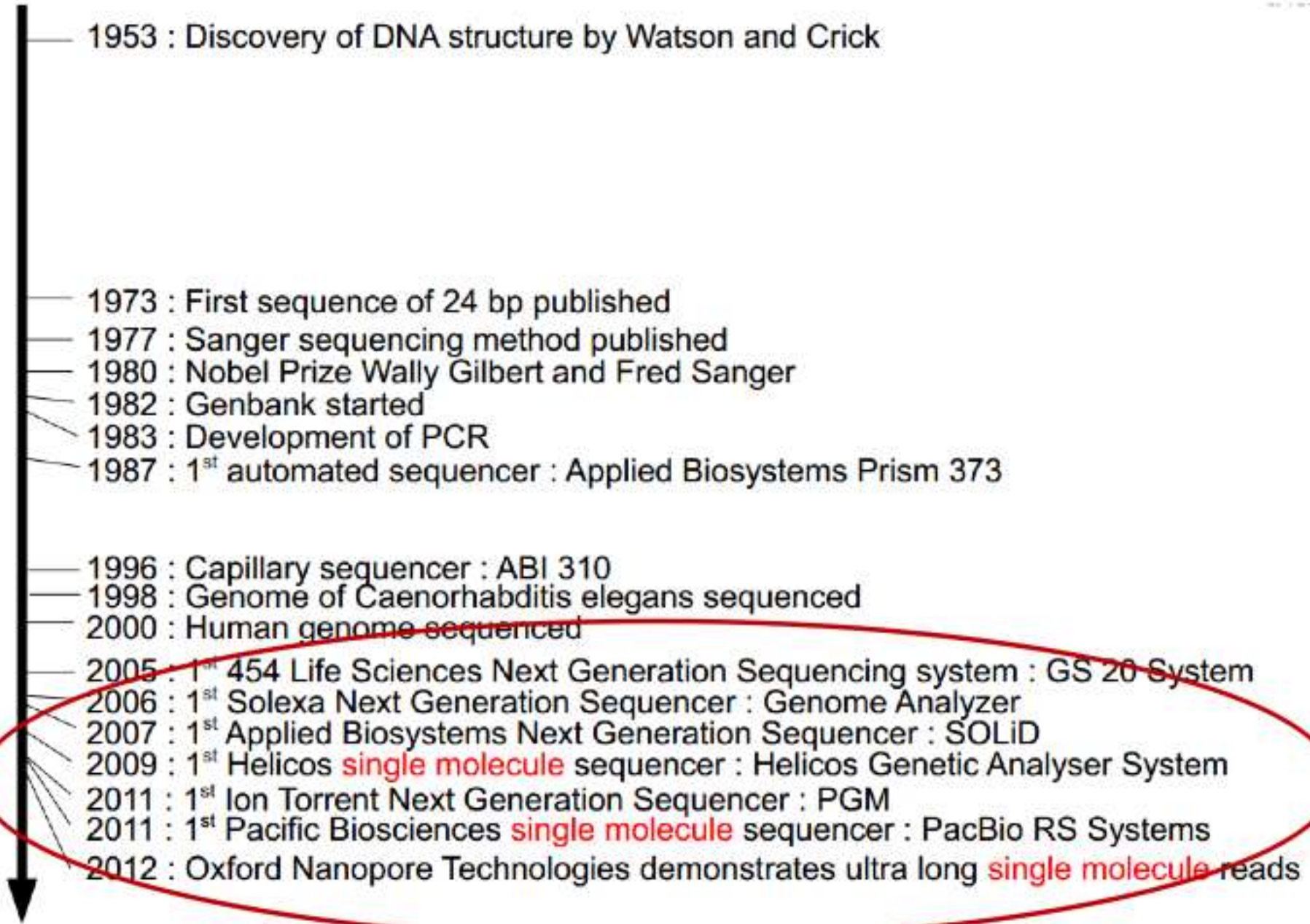


**Основная задача геномики – полное секвенирование и расшифровка генома**

**Секвенирование (sequencing)** — это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК.

Цели и задачи:

- Секвенирование отдельных генов
- Секвенирование целых геномов
- Сборка: вирусных, бактериальных, эукариотических геномов, экзомов
- Поиск геномных перестроек (genomic rearrangements)
- Genotyping by sequencing
- RNA-seq
- Исследование профилей метилирования



# Второе поколение секвенаторов – NGS

NGS (секвенирование следующего поколения, Next Generation Sequencing) – это группа методов основанных на параллельном прочтении множества индивидуальных молекул ДНК.

В сравнении с методом Сэнгера:

- Удешевление процесса.
- Увеличение эффективности чтения ДНК (более длинные фрагменты, способность читать ДНК быстрее).
- Более высокая степень автоматизации процесса.



Roch 454



Illumina HiSeq 4000



PGM Ion Torrent



SOLiD Applide Biosystems



Вся технология NGS упрощенно состоит из трех основных этапов, которые могут отличаться друг от друга в зависимости от вида используемой платформы секвенирования:

## **I. Подготовка библиотек (матриц), оценка их качества**

- а) Выделение ДНК или РНК
- б) Разрушение ДНК на короткие участки (ультразвуком, ферментами и т.п.)
- в) Достройка ДНК под требования платформы секвенирования
- г) Амплификация – формирование молекулярных кластеров

## **II. Секвенирование (виды)**

- Пиросеквенирование
- Полупроводниковое секвенирование
- Секвенирование через лигирование
- Синтез с обратимым терминированием

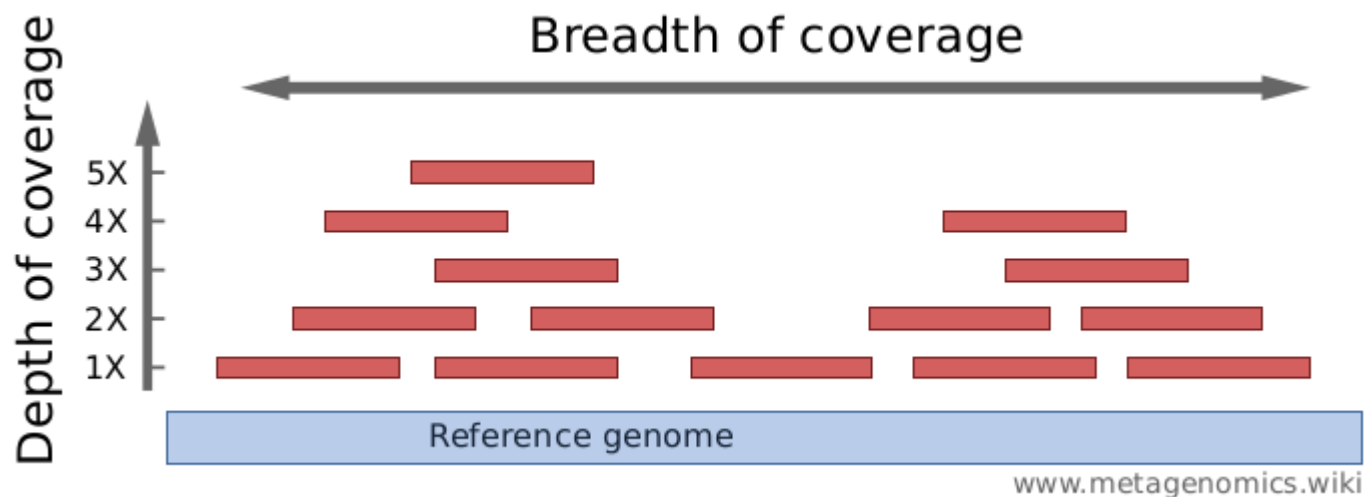
## **III. Анализ данных – биоинформатика**

- а) Фильтрация ридов, построение метрик качества
- б) Сборка – выравнивание ридов так, чтобы они сформировали разумную последовательность
- в) Анализ биологического смысла данных



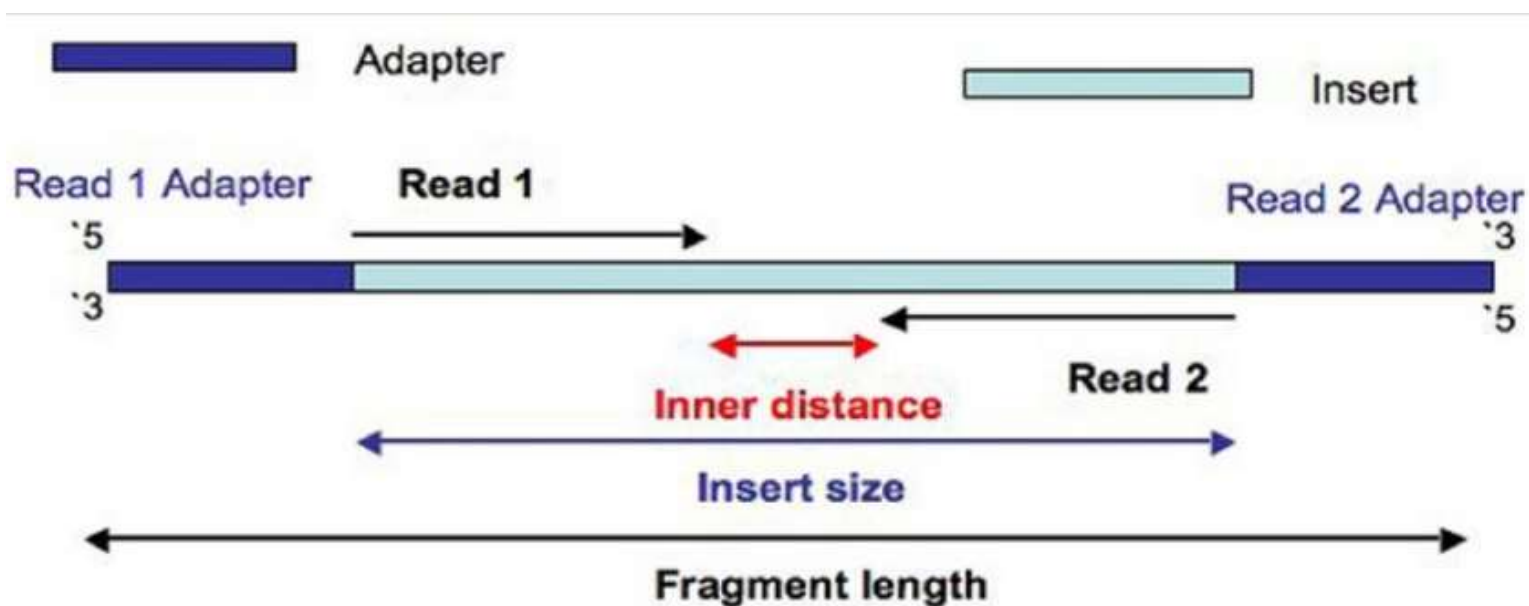
# Глубина секвенирования (Depth)

- Важный параметр методов NGS: кратность прочтения каждого нуклеотида.
- Для каждой задачи необходимо свое покрытие (обычно не менее 30-кратного).
- «Эффективный» объем данных равен выходу секвенирования, деленному на покрытие.



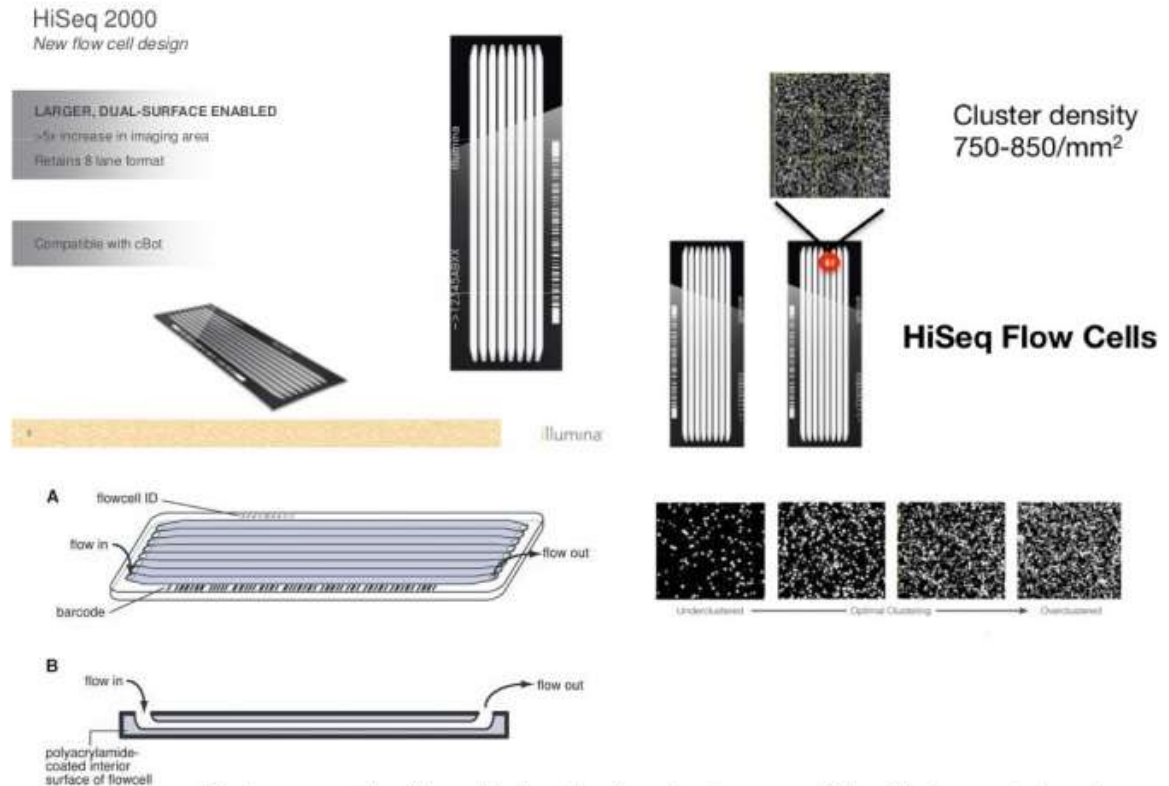
# Структура фрагмента библиотеки

Фрагмент библиотеки состоит из адаптеров (технических последовательностей) и информативной части – вставки (insert).



# Секвенирование с обратимым терминованием

- На чипе секвенатора проводят мостиковую ПЦР и осуществляют несколько циклов полимеразной реакции синтеза, в каждом из которых добавляют 4 типа флуоресцентно-меченных обратимых терминирующих dNTP.
- Комплементарный dNTP включается в новую цепь, высвобождая флуорофор и терминирует дальнейший рост цепи.
- Сигнал детектируется, а блокировка с 3'-конца снимается ферментом. Цикл повторяется.

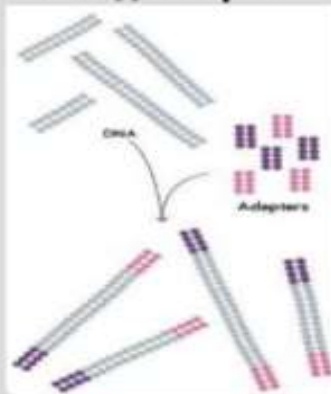


Illumina uses a glass 'flowcell', about the size of a microscope slide, with 8 separate 'lanes'.

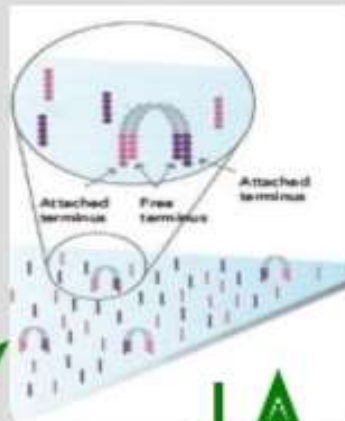
The HiSeq instrument scans both upper and lower surfaces of each flowcell lane.

# Секвенирование Illumina: принцип метода

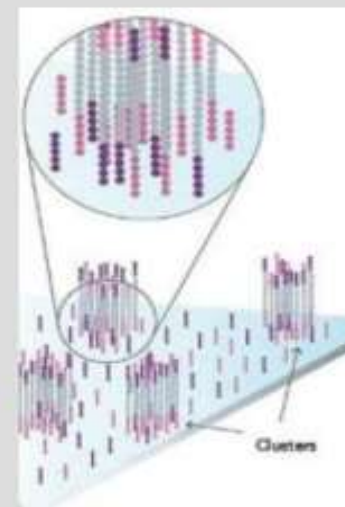
1. ДНК фрагментируют и присоединяют к фрагментам адаптеры



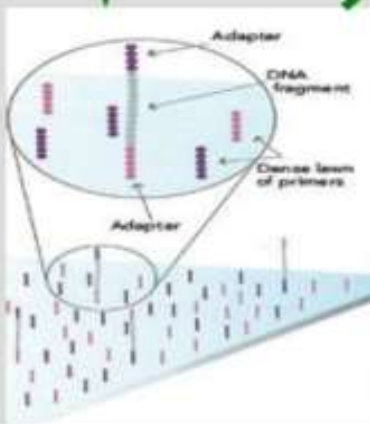
3. Через ячейку пропускают реагенты для достраивания второй цепи ДНК



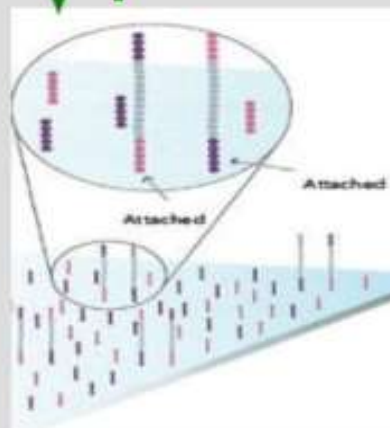
bridge amplification



Стадии 3-4 повторяются 30-35 раз



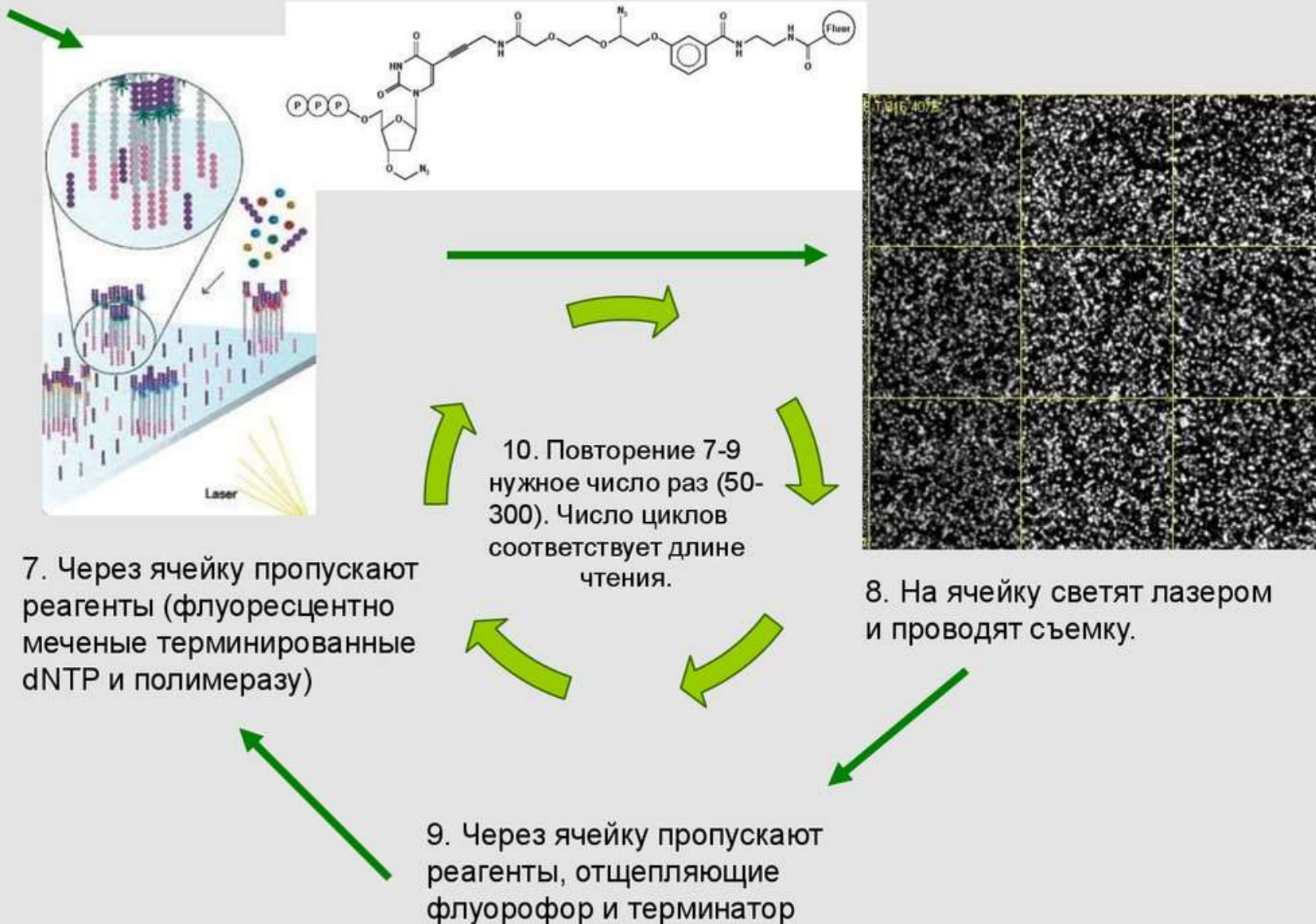
2. ДНК пропускают через каналы ячейки, покрытые праймерами, комплементарными концам адаптеров



4. Двухцепочечные фрагменты денатурируют

5. Каждый фрагмент оказывается окружен группой идентичных молекул («кластеры»).

# Секвенирование Illumina - принцип метода





# Применение Illumina

- + Высокая точность прочтения (0.1%)
- + Высочайшая производительность
- + Возможность осуществлять парные прочтения
- + Удобная пробоподготовка (без эПЦР)

- Дороговизна оборудования

Прибор	MiSeq	HiSeq 2500
Длина прочтения	2 x 300 bp	2 x 150 bp
Производительность	15 Gb	180 Gb
Уровень ошибки	0,1-0,5% (замены)	0,1% (замены)
Время запуска	65 ч.	40 ч.
Стоимость: 1 запуск / 1Mb	1600 \$ / 0,14 \$	6145 \$ / 0,05 \$
Оптимальное применение	1. De novo секвенирование 2. Ресеквенирование 3. Анализ экспрессии 4. ДНК-белковые взаимодействия 5. Метагеномика	
	16S метагеном	WGS метагеном

# Актуальная линейка секвенаторов Illumina



iSeq 100



MiniSeq



MiSeq Series



NextSeq 550 Series



NextSeq 1000 &amp; 2000



NovaSeq 6000

	iSeq 100	MiniSeq	MiSeq Series	NextSeq 550 Series	NextSeq 1000 & 2000	NovaSeq 6000
Run Time	9.5–19 hrs	4–24 hours	4–55 hours	12–30 hours	11–48 hours	~13 – 38 hours (dual SP flow cells) ~13–25 hours (dual S1 flow cells) ~16–36 hours (dual S2 flow cells) ~44 hours (dual S4 flow cells)
Maximum Output	1.2 Gb	7.5 Gb	15 Gb	120 Gb	330 Gb*	6000 Gb
Maximum Reads Per Run	4 million	25 million	25 million †	400 million	1.1 billion*	20 billion
Maximum Read Length	2 × 150 bp	2 × 150 bp	2 × 300 bp	2 × 150 bp	2 × 150 bp	2 × 250**



## Приборы и реагенты технологии NGS, зарегистрированные как медицинские изделия (РУ)

- Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq 550 Dx
- Картридж NextSeq550DX v 2,5 300 циклов



- Генетический секвенатор MiSeqDx
- Картридж MiSeqDx v3



Для использования с олигонуклеотидами пользователя:

- Набор реагентов для создания «библиотеки» нуклеиновых кислот TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:



# Какие тесты доступны в клинике

illumina  
NextSeq550DX

illumina  
MiSeqDX

Оба прибора и  
базовые реагенты  
для них  
зарегистрированы



- В Москве тестируется BRCA1/BRCA2 в рамках ОМС



Таргетные панели для разных нозологий:

- панели разработки Р-ФАРМ
- панели разработки Pillar BioSciences (США)
- панели других производителей

- Расширенные панели:
  - send-out модель
  - **TSO500** от illumina (523 гена, NTRK фьюжн, tissue mutation burden)



Благодаря развитию технологий секвенирования NGS появились уникальные возможности анализа генома, которых не было ранее. Новейшие тесты позволяют анализировать клинически значимые области генома человека, дают возможность выявления патогенных мутаций, генетических предрасположенностей, хромосомных и субхромосомных аномалий.

**HLA-типирование** – анализ комплекса гистосовместимости человека (HLA), играющего очень важную роль в распознавании организмом инородных и инфекционных агентов, способных оказать на него агрессивное воздействие, а также участвующего в формировании иммунного ответа и поддержании общего состояния здоровья ( [TruSight HLA Sequencing Panel](#) )

**Трансляционная геномика** – анализ данных, полученных от целевого секвенирования генов, ассоциированных с конкретными заболеваниями или состояниями ( [TruSight Myeloid](#), [TruSight Cancer](#), [TruSight Cardio](#), [TruSight Autism](#) и др.)

**Репродуктивное здоровье** - исследований в области репродуктивного и генетического здоровья человека. Это предимплантационный генетический скрининг (PGS), предимплантационная генетическая диагностика (PGD), неинвазивное пренатальное тестирование (NIPT), а также диагностика наследственных состояний (Inherited Condition Screening).

**Анализ микробиома человека** - это изучение микробных сообществ, обнаруженных в организме человека и на нём.

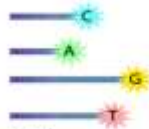
Целью исследований микробиома человека является понимание роли микробов в его здоровье и заболеваниях.

**Метагеномика окружающей среды** - это изучение микроорганизмов на основе анализа ДНК в образцах окружающей среды. NGS предоставляет возможность профилировать любые микробные сообщества, открывать новые организмы и исследовать микробные популяции в динамике.

# DNA sequencing

## Sanger sequencing

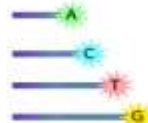
uses dideoxy nucleotides (chain terminators)



by adding a mix of normal and terminator you can get pieces of different lengths where you know the last letter

## illumina

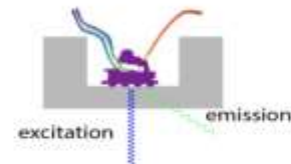
sequencing by synthesis  
reversible-terminator nucleotides



read fluorescence after each letter is added, then remove fluorophore and allow more adding

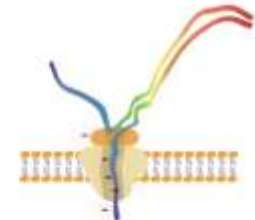
## PacBio

Single Molecule Real Time Sequencing (SMRT)



read fluorescence as letter is added

## NanoPore



read changes in current as letters pass through pore

average read length

accuracy

## combining methods

longer reads are often used as a scaffold for aligning shorter, more accurate reads - great for figuring out where repetitive sequences go

