



**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
СИБИРСКИЙ
НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ
ЦЕНТР**
ФМБА РОССИИ

**НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ**



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBIRIAN FEDERAL UNIVERSITY

Использование метода секвенирования по Сэнгеру для анализа герминальных и соматических мутаций в геноме человека

Т. Н. Субботина

27.10.2021

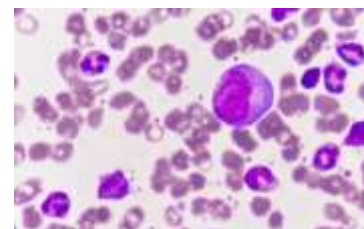
- Лаборатория является совместным проектом СФУ и СНКЦ ФМБА России;
- Основная цель функционирования лаборатории – внедрение молекулярно-генетической диагностики в практическую медицину.





Основные направления деятельности:

1. Онкогематология



2. Неврология



3. Трансплантология



4. Кардиология





ДНК (РНК) - диагностика

1. Анализ **полиморфизмов**; известно более 15 млн полиморфизмов, лишь некоторые из них влияют на развитие заболеваний (тромбофилия и др.)

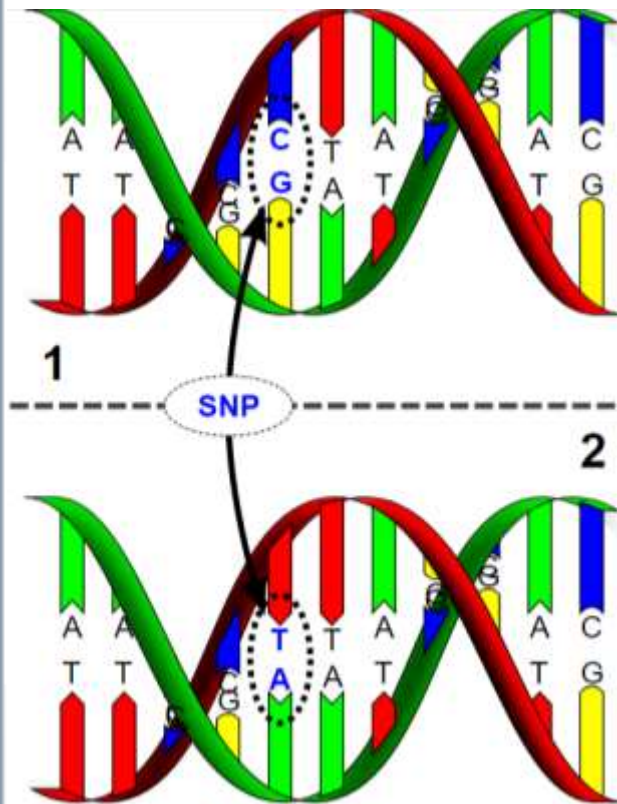
2. Анализ **герминальных мутаций**; многие из них ассоциированы с развитием моногенных наследственных заболеваний (фенилкетонурия и др.);

3. Анализ **соматических мутаций**; многие из них ассоциированы с развитием онкологических заболеваний (хронические миелопролиферативные неоплазмы и др.)

4. Анализ **динамических мутаций** (VNTR, CNV); многие из них ассоциированы с развитием неврологических, онкологических и др. заболеваний (болезнь Паркинсона и др.)

5. Анализ **уровня экспрессии генов**;

6. Анализ **эпигенетических маркеров** (метилование промоторов, микро-РНК и др.)





ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ И МУТАЦИИ

❖ Однонуклеотидные полиморфизмы (**ОНП**), англ. Single nucleotide polymorphism, **SNP**; Точечные замены).

Лишь некоторые SNP приводят к тому, что организм становится предрасположенным к развитию одних заболеваний и резистентным к возникновению других.

(частота в популяции более 1-2%)

❖ Мутации либо несовместимы с жизнью, либо ведут к неэффективному функционированию генома и развитию патологии.

(частота в популяции менее 1-2%)

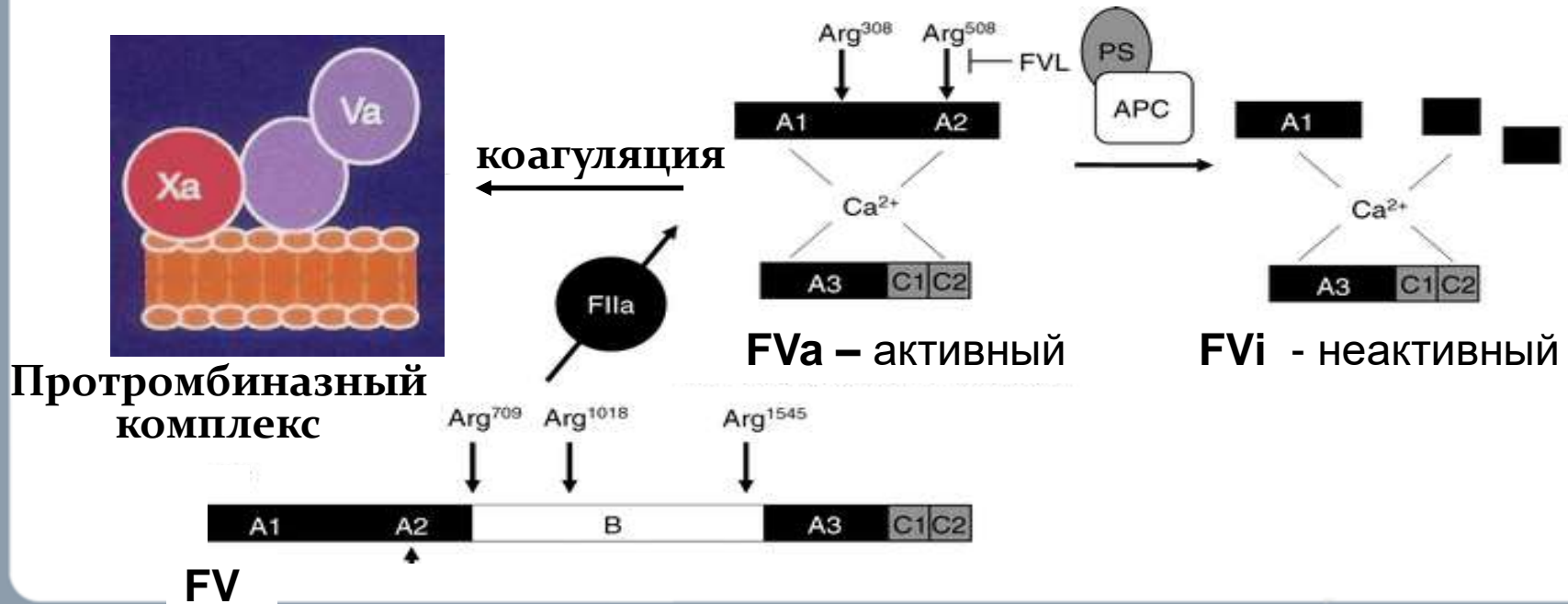
Принципиальное отличие мутаций от полиморфизмов генов заключается не в их распространенности, а в последствиях изменений ДНК!



Полиморфизмы

(лишь некоторые из них влияют на предрасположенность к тому или иному заболеванию)

- **Полиморфизм Leiden** G1691A (Arg506Gln) коагуляционного фактора FV является показателем риска развития венозных тромбозов
- В норме Fva расщепляется по Arg506 и Arg306 под действием С-белка
- Мутантный вариант FVa накапливается в крови и приводит к гиперкоагуляции





Полиморфизм Leiden

- Распространенность в Европе 3%-8%
- Риск венозных тромбозов: в 3-8 раз выше у гетерозигот, в 18-80 раз выше у гомозигот

- Факторы, увеличивающие риски:

пероральные контрацептивы - ↑ в 30 раз ГтЗ, ↑ в 100 раз ГЗ

беременность - ↑ в 16 раз

гормонзаместительная терапия - ↑ в 2 - 4 раза

катетеризация центральных вен - ↑ в 2 - 3 раза

хирургические вмешательства - ↑ в 13 раз

авиаперелёты - ↑

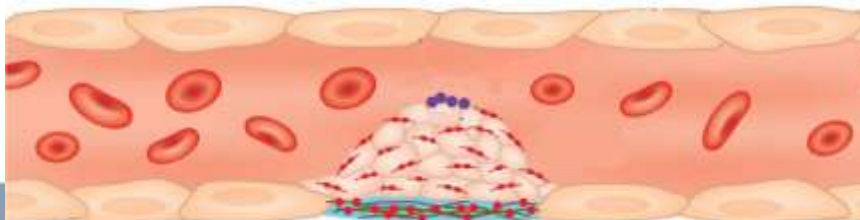
Гормональный статус

Повреждения вен

Обездвиженность

Gene Reviews, www.genetests.org by J.Kujovich

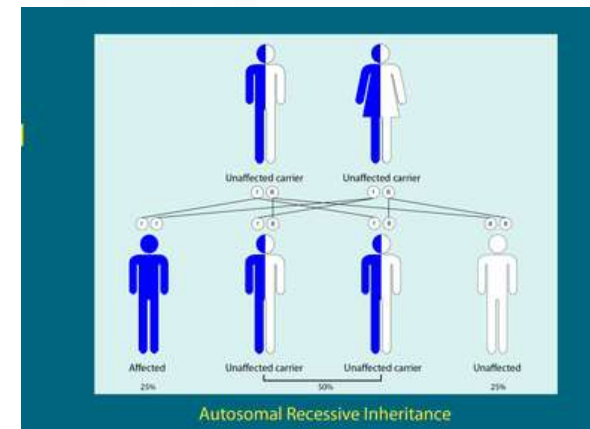
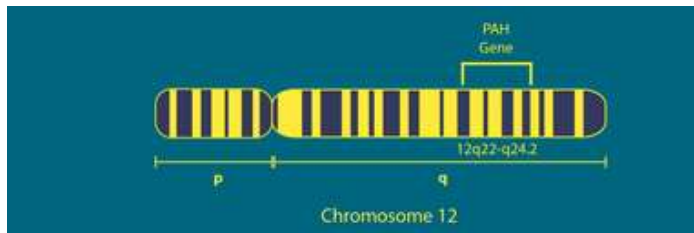
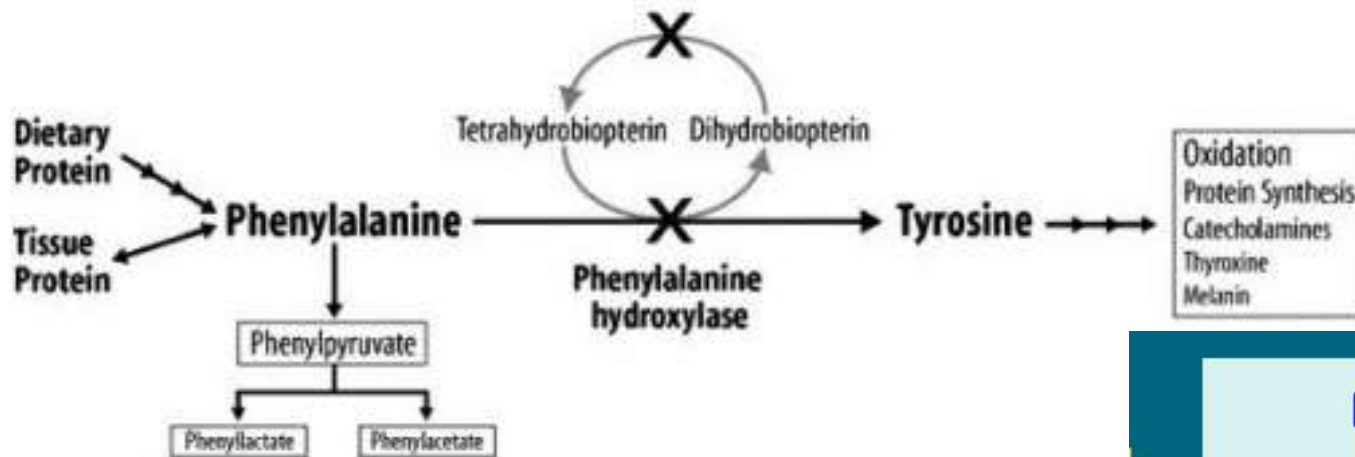
Определение Лейденской мутации фактора V направлено на постановку диагноза у пациентов с подозрением на тромбофилию





Герминальные (наследственные) мутации
(ассоциированы с развитием моногенных наследственных заболеваний)

Phenylketonuria (PKU)



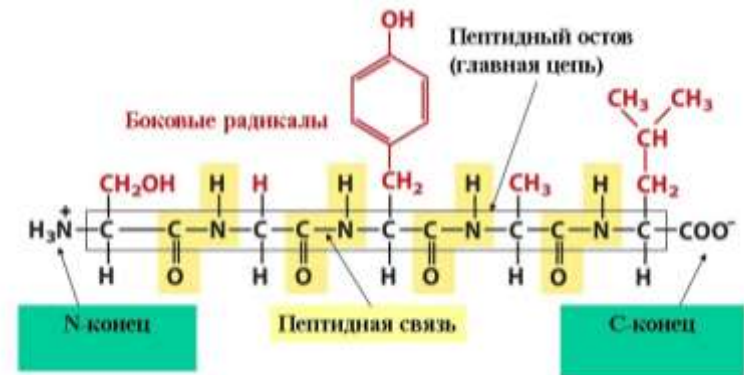


Важно!

✓ Каждый полиморфизм или мутация имеет свой номер (rs).

Use sets of variation IDs (including RefSNP (rs) IDs, Submitted SNP (ss) IDs, and Local SNP IDs) collected from other queries to generate a variety of SNP reports.

✓ Один и тот же полиморфизм или мутация могут иметь несколько обозначений.



Полиморфизм Leiden (rs 6025):

Обозначение полиморфизма по аминокислоте в белке – p. Arg506Gln

Обозначение полиморфизма по нуклеотиду на мРНК - c. G1691A



ДНК (РНК) - диагностика

1. Анализ **полиморфизмов**; известно более 15 млн полиморфизмов, лишь некоторые из них влияют на развитие заболеваний (тромбофилия и др.)

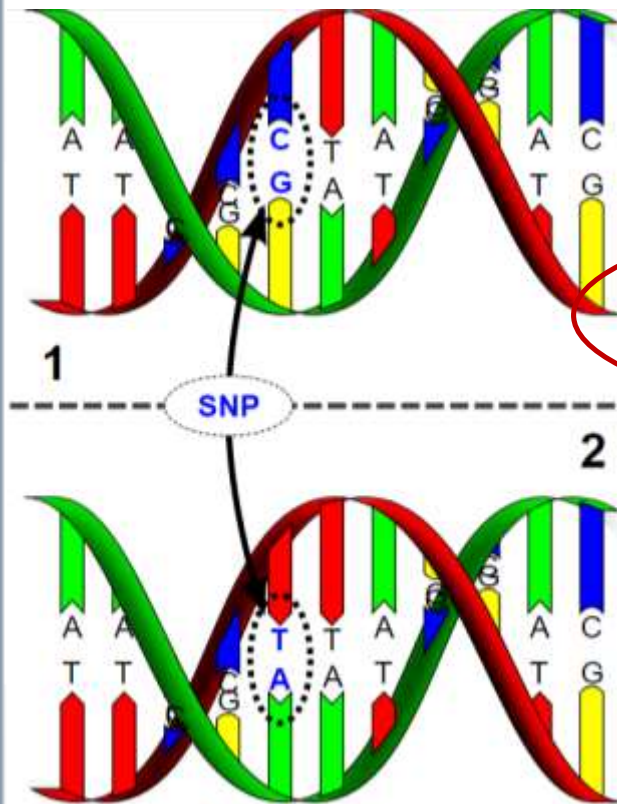
2. Анализ **герминальных мутаций**; многие из них ассоциированы с развитием моногенных наследственных заболеваний (фенилкетонурия и др.);

3. Анализ **соматических мутаций**; многие из них ассоциированы с развитием онкологических заболеваний (хронические миелопролиферативные неоплазмы и др.)

4. Анализ **динамических мутаций** (VNTR, CNV); многие из них ассоциированы с развитием неврологических, онкологических и др. заболеваний (болезнь Паркинсона и др.)

5. Анализ **уровня экспрессии генов**;

6. Анализ **эпигенетических маркеров** (метилование промоторов, микро-РНК и др.)





Мутации

Герминальные

Соматические

Родитель

Ребёнок



Мутация в
половых
клетках

Все клетки
поражены

Уровень аллельной
нагрузки – количество
мутантных аллелей
в образце ДНК

- Присутствуют в половых клетках
- Наследуются
- примеры: Мутации в генах ФАГ (ФКУ), PARK2 (БП) и др.

- Не присутствуют в половых клетках
- Не наследуются
- примеры: Мутации в генах JAK2 и CALR (ХМН), BRCA (РМЖ), и др.



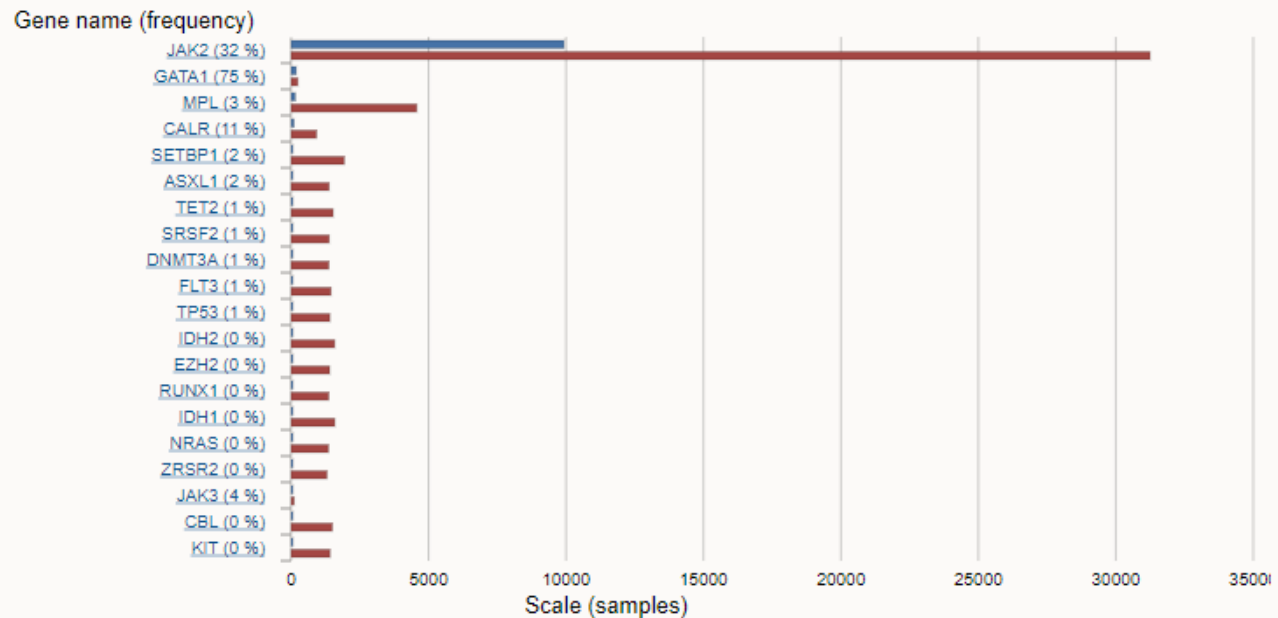
❖ Известно, что более 1% всех генов человека посредством мутаций в них участвуют в возникновении рака

<http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n3/abs/nrc1299.html>

❖ Примерно 90% из этих мутаций являются **соматическими**, остальная часть мутаций – это либо мутации зародышевой линии, либо мутации, которые могут быть как гаметическими, так и соматическими.

Catalogue Of Somatic
Mutations In Cancer (COSMIC)

Top 20 genes for Myeloproliferative neoplasm



Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) — одна из самых больших онлайн баз данных соматических мутаций, свойственных различным типам опухолевых заболеваний человека. Накопленная COSMIC информация о 2500 раковых заболеваниях человека делает возможными выводы о соответствии мутаций определенному типу опухоли.



cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=JAK2&ln1=JAK2&start=540&end=555&coords=AA%3AAA&sn=&ss=&hn=&

COSMIC

Catalogue of somatic mutations in cancer

Home About Licensing Data Download News Help Enter search here... **tatiana subbotina**

Cosmic » Gene » Analysis » JAK2

[View in GRCh37 Archive](#)

Gene View Genome Browser Overview Tissue Distribution Data References

Position	Substitutions
540	N → I, I → T
542	G
544	G → N, G → S, V
546	L → V, V → F
554	L

Filters

Gene: JAK2

Position: Start 540, End 555

Sequence Type: cDNA, Amino Acid

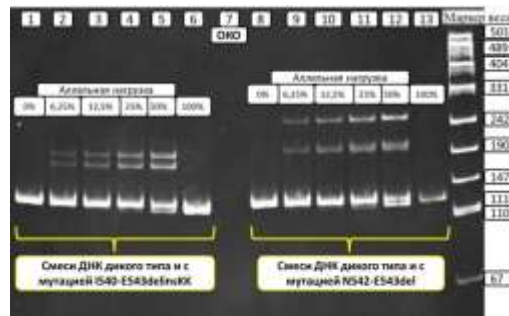
Cancer type: [Select](#)

- Systematic Screen
- Somatic Status
- Tumour Source
- Mutation Impact ⓘ
- Mutation Type

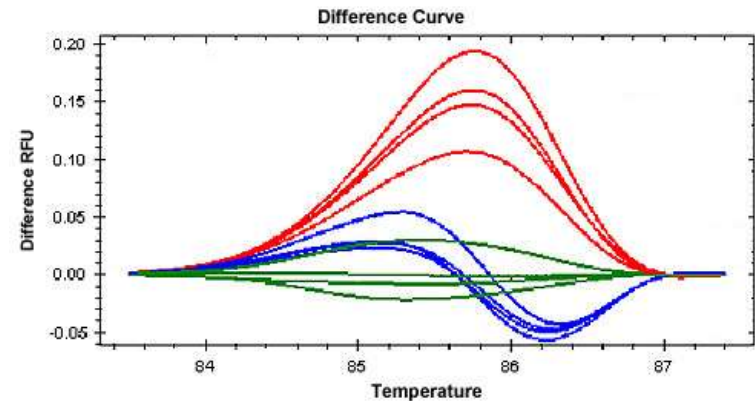


Используемые молекулярно-генетические методы:

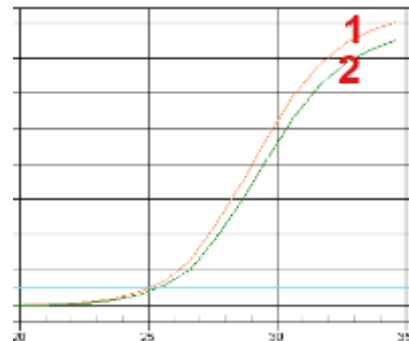
1. Электрофорез (горизонтальный и вертикальный)



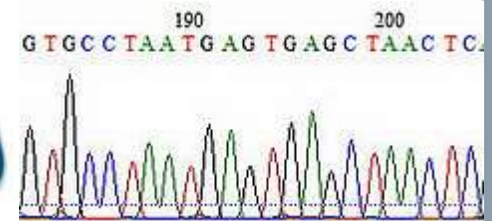
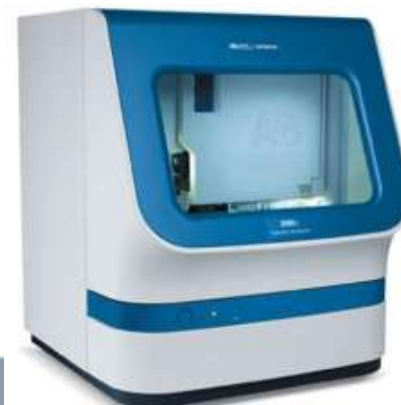
3. HRM-анализ



2. ПЦР с детекцией в режиме РВ



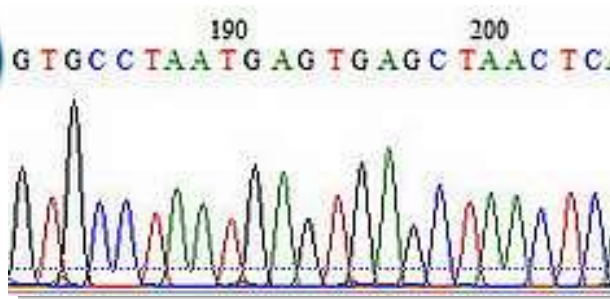
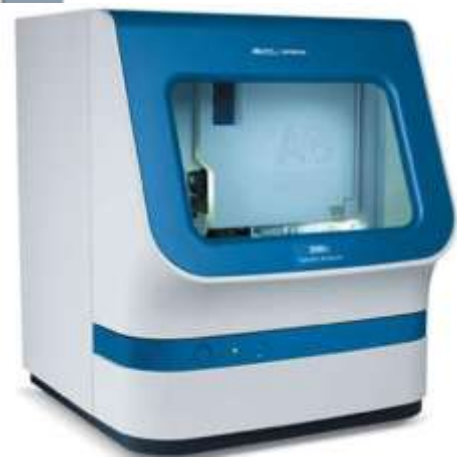
4. Секвенирование по Сенгеру и фрагментный анализ





- ❖ **Секвенирование по Сэнгеру** относится к классическим методам секвенирования.
- ❖ Метод был разработан в 1977 г. Фредериком Сэнгером и его коллегами.
- ❖ С его помощью в 1990-2003 г.г. в рамках проекта «Геном человека» был впервые полностью расшифрован человеческий геном.
- ❖ Секвенирование по Сэнгеру и в настоящее время не теряет своей актуальности и является рутинным методом как в генетической диагностике, так и в научно-исследовательской практике.
- ❖ С его помощью **за один рабочий цикл можно «прочитать» последовательности длиной до 1000 пар нуклеотидов с высокой точностью — до 98%.**

- ❖ Сейчас метод секвенирования по Сэнгеру полностью автоматизирован.
- ❖ Автоматизация делает его надежным и простым в исполнении, он **является «ЗОЛОТЫМ стандартом»** современного секвенирования.



Последовательность этапов секвенирования по Сэнгеру

1. Выделение ДНК



2. Проведение ПЦР + ЭФ

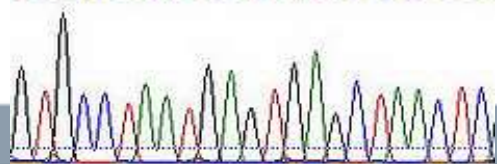


3. Проведение секвенирующей ПЦР

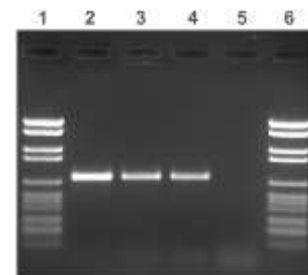


4. Капиллярный электрофорез

190 200
GTGCC TAA TGA GTGAGC TAACTC



CFX 96



Veriti 96



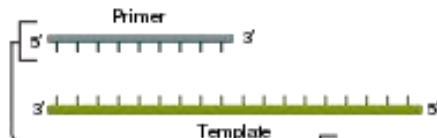
AB 3500



Метод секвенирования по Сэнгеру

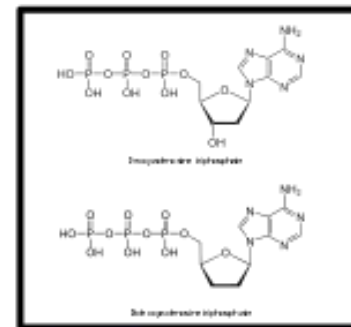
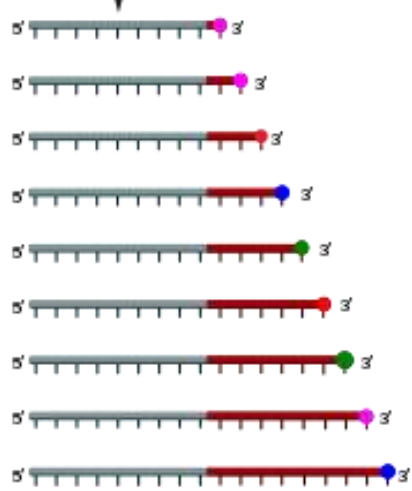
1 Reaction mixture

- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)

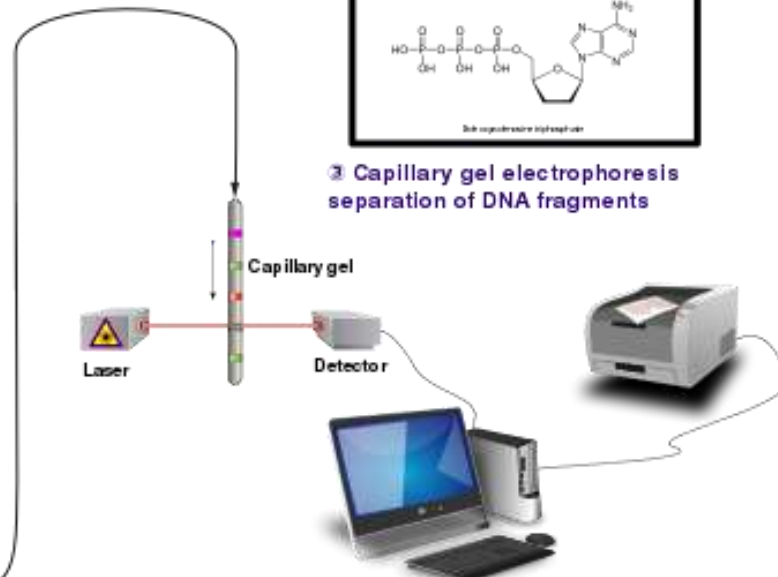


- ddNTPs
- ddTTP
- ddCTP
- ddATP
- ddGTP

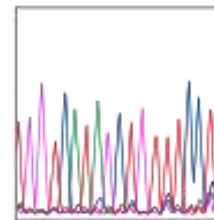
2 Primer elongation and chain termination



3 Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



4 Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



Chromatograph



ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ

- выявление соматических мутаций;
- определение уровня аллельной нагрузки соматических мутаций;
- оценка экспрессии генов;
- разработка алгоритмов генетического анализа при различных формах лейкозов.

1. ДРАЙВЕРНЫЕ МУТАЦИИ (Ph(-) и Ph(+)-МПН):

- ❖ Мутация V617F в 14 экзоне гена *JAK2*
- ❖ Мутации в 12 экзоне гена *JAK2* (скрининг + секвенирование по Сенгеру)
- ❖ Мутации в 9 экзоне гена *CALR* (скрининг + секвенирование по Сенгеру)
- ❖ Мутации W515L/K в гене *MPL*
- ❖ Экспрессия мРНК химерного онкогена *BCR-ABL*

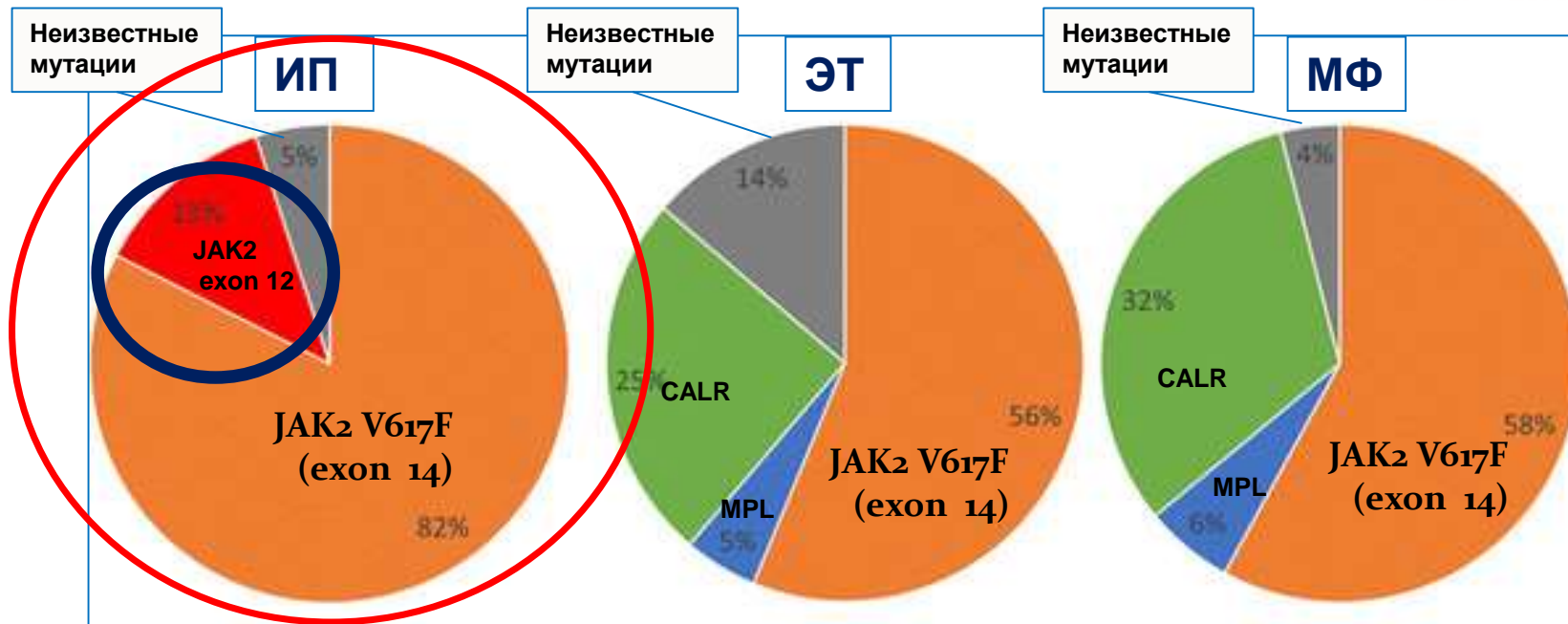
2. ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ (МПН, ОЛ, МДС и др.):

- ❖ Мутации в гене *ASXL1* (секвенирование по Сенгеру)
- ❖ Мутации в гене *FLT3*, *NPM1* (фрагментный анализ + секвенирование по Сенгеру)
- ❖ Мутационный статус киназного домена гена *BCR-ABL* на резистентность к ИТК (секвенирование по Сенгеру)



РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ПРИ Rh(-)МПН

СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBIRIAN FEDERAL UNIVERSITY



- ✓ Большая часть случаев ИП связана с развитием одного вида мутации в 14 экзоне гена *JAK2* (V617F);
- ✓ Меньшая часть случаев ИП связана с развитием какой-либо из 40-ка известных мутаций в 12 экзоне гена *JAK2* ;
- ✓ Мутации в 12 экзоне описаны только для пациентов с диагнозом ИП; При ЭТ и МФ такие мутации не встречаются;

Список изученных мутаций в 12 экзоне гена JAK2, ассоциированных с развитием ИП.

Согласно рекомендациям ВОЗ:

мутация в 12 экзоне - БОЛЬШОЙ критерий для постановки диагноза ХМН

SUBSTITUTIONS

wildtype

F533IK539L

F537IK539L

H538QK539L

H538DK539LI540S

K539L

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFHKIRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**F**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**I**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**SEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**EDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**KDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**MDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**MLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**SKDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**ILIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRDIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNLIIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNEIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFHKIRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**L**IRNEDLIF

Более 40-ка мутаций

DELETIONS

wildtype

F537-K539delinsK

F537-K539del

F537-K539delinsL

H538del

H538-K539del

H538-K539delinsF

H538-K539delinsI

H538-K539delinsL

I540-N542delinsS

I540-N542delinsK

I540-E543delinsKK

I540-E543delinsMK

I540-D544delinsMK

I540S,R541-E543delinsK

R541-E543delinsK

R541-D544del

N542-E543del

N542-D544delinsN

E543-D544del

D544-L545del

DUPLICATIONS

wildtype

V536-I546dup11

V536-F547dup12

V536F, F37-I546dup10

F537-F547dup11

F537-I546dup10,F547L

F547L, I540-F547dup8

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFHKIRNEDLIF

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNEDLIVFHKIRNEI

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNEDLIFVFKIRNEI

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNEDLIFFKIRNEI

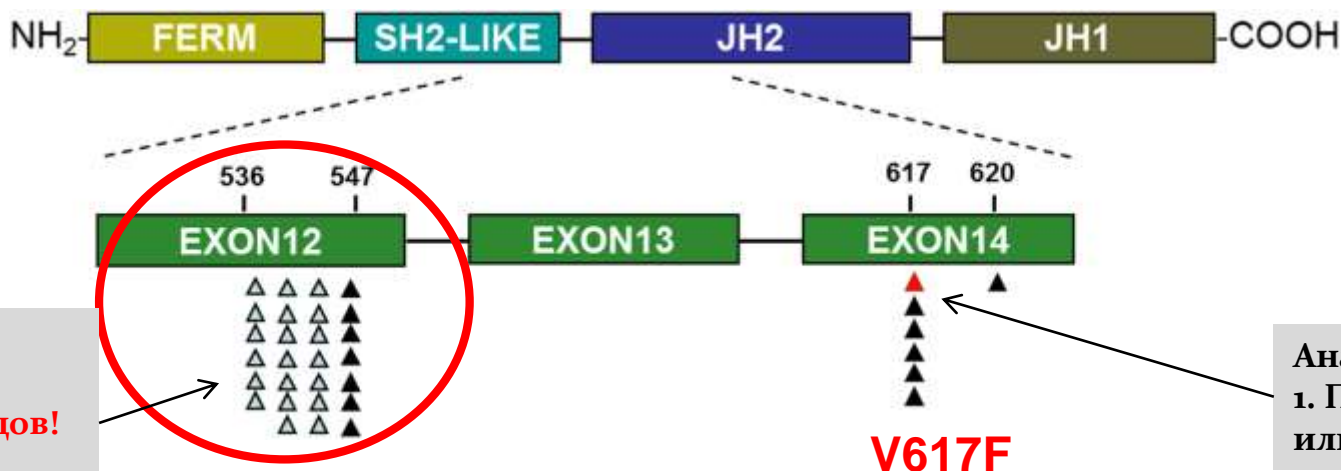
(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNEDLIFFKIRNEI

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNEDLIFFKIRNEI

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNEDLIFFKIRNEI

(D) KSNLLVFRITNGVSDVPTSPITLQRPHTMNMVVFH**K**IRNEDLIFLIRNEDLIF

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В 12 И 14 ЭКЗОНАХ ГЕНА JAK2 ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ДИАГНОЗА ИП



Анализ:
**! Требуется
сочетание методов!**
1. Скрининг;
2. Секвенирование.

Анализ:
1. ПЦР-РВ (кач.
или колич.)

! На сегодняшний день анализ мутаций в 12 экзоне JAK2 гораздо более трудоёмок и дорог, чем анализ мутации в 14 экзоне, поэтому проводится лишь в некоторых лабораториях (Москва, Санкт-Петербург, Красноярск);

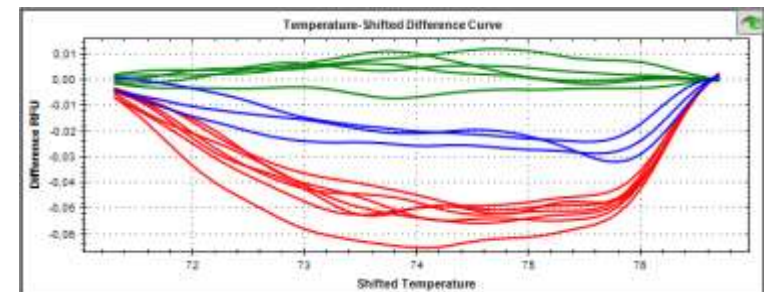
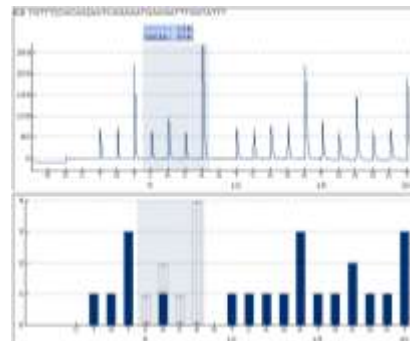
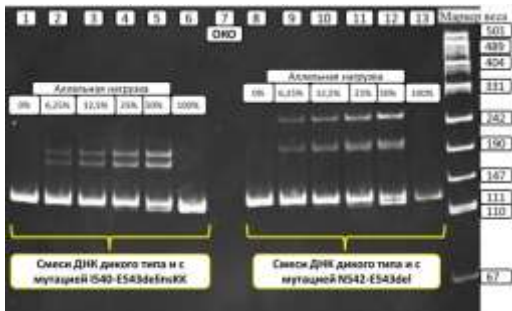
! Критерии отбора пациентов для анализа мутаций в 12 экзоне:

- Подозрение на диагноз ИП;
- Отсутствие мутации V617F в 14 экзоне гена JAK2;
- Повышенные значения Hb и Hct;
- Изолированный эритроцитоз (отсутствие тромбоцитоза и лейкоцитоза);



ЧТО СДЕЛАНО ПО ЭТОЙ ТЕМЕ :

- Разработан метод **качественного** анализа мутаций с использованием гетеродуплексного анализа и вертикального электрофореза в ПААГ (чувствительность - от 6% мут. аллеля);
- Разработан метод анализа данных мутаций методом HRM-анализа;
- Разработан алгоритм анализа данных мутаций с дополнительным тестированием методом **количественного** пиросеквенирования (совместно с ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) (чувствительность - от 7% мут. аллеля);
- Дополнительно проводится секвенирование по Сенгеру. Но низкая чувствительность (от 20%) - проблема при анализе соматических мутаций.

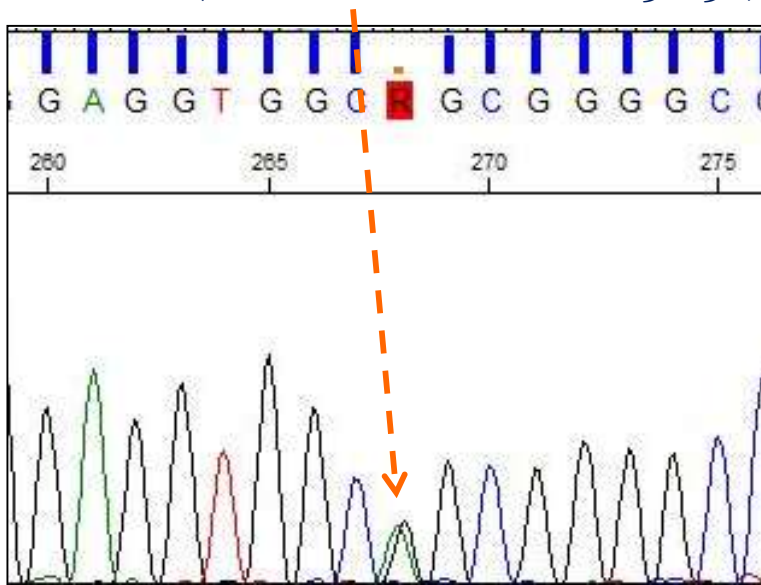


- ✓ Разработанные методы апробированы на пациентах (более 300 человек).
- ✓ Полученные результаты используются врачами гематологами для дифференцировки случаев ИП и вторичного эритроцитоза.

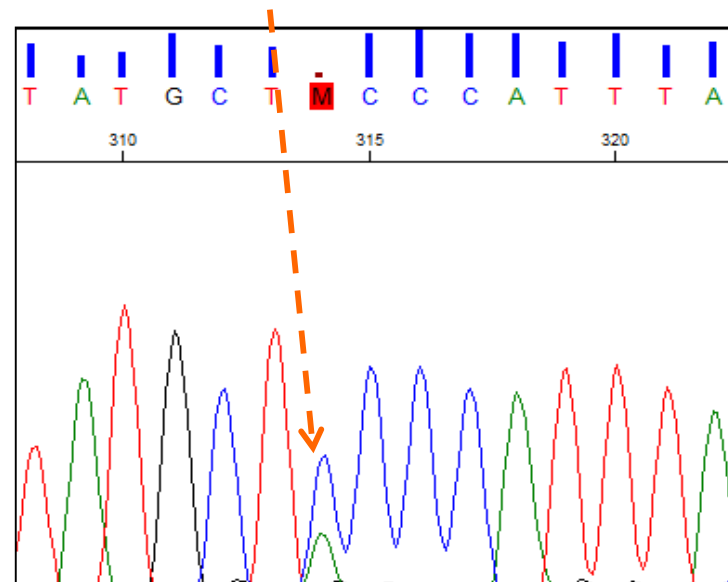


Пример анализа герминальных и соматических мутаций типа однонуклеотидных замен

Пример выявления герминальной
мутации в гене *ASXL1* с.1954G>A (p.G652S)
(соотношение аллелей 50\50)



Пример выявления соматической
мутации в гене *ASXL1* с.2113G>T (p.E705*)
(соотношение аллелей 30\70)



! ОГРАНИЧЕНИЕ !

Метод Сэнгера не позволяет определять соотношение аллелей при
соматических мутациях.

Специализированные программы для обработки результатов после секвенирования по методу Сэнгера



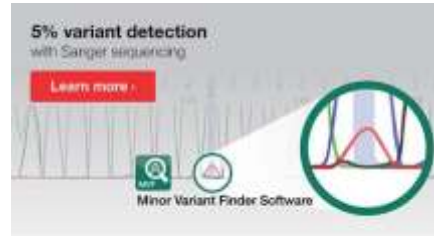
СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBIRIAN FEDERAL UNIVERSITY

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Search All

Search

Minor Variant Finder Software



p.W583*; c.1748G>A

Уровень аллельной нагрузки – 9%.



!ОГРАНИЧЕНИЕ!
Анализирует только
однонуклеотидные
замены!

p.G652S; c.1954G>A

Уровень аллельной нагрузки – 50%.

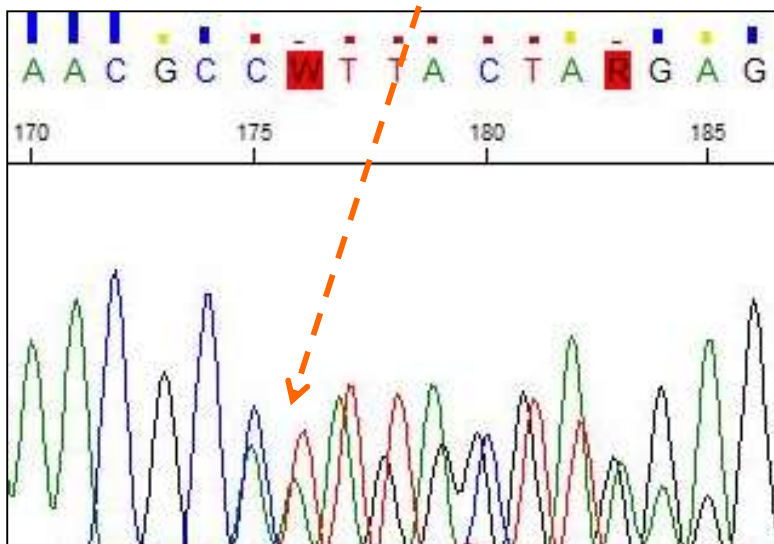




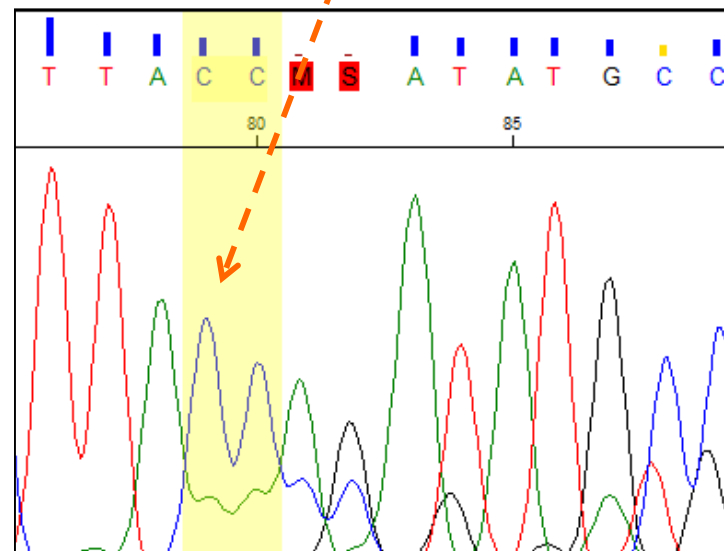
Пример анализа соматических мутаций типа INDEL (инсерции\делеции)

Пример выявления соматических
мутаций в гене **CALR**

1. с.1128_1129insCTTTGCTT(p.Lys377Leufs*?)
2. с.1131_1133delAGA(p.Glu381del)



Пример выявления соматической
мутации в гене **ASXL1**
с.1772_1773insAA(p.Y591fs*1)





ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ

АНАЛИЗ ГЕРМИНАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С СЕМЕЙНЫМИ ЭРИТРОЦИТОЗАМИ (секвенирование по Сэнгеру).

❖ EPOR, VHL, HIF2 α (EPAS₁), PHD2 (EGLN₁).



Генетики помогут снять с биатлониста Устюгова обвинения в допинге

Текст: Галина Мисливская

Постоянно повышенный уровень гемоглобина в крови - генетическая особенность биатлониста Евгения Устюгова, а не следствие употребления допинга. К такому выводу пришли российские генетики после исследования ДНК спортсмена и его родителей.



"И что же оказалось? В трех генах наиболее важных и ассоциированных с повышением содержания гемоглобина, были выявлены крайне редкие мутации, определяющие повышенный уровень гемоглобина. И таким образом постоянно повышенный уровень гемоглобина у этого прославленного спортсмена объясняется его уникальными генетическими особенностями", - рассказал Макаров.

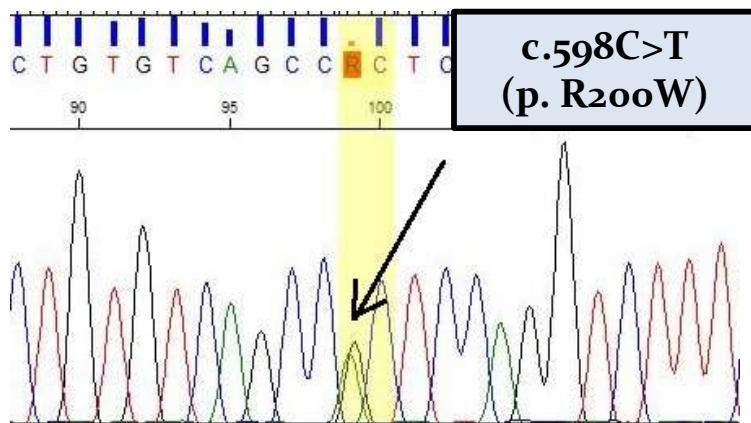
"Полученные генетические данные позволили поставить вопрос о снятии обвинений и будут использованы юристами в процессе антидопинговой панели спортивного арбитражного суда", - добавил он.

Глава государства поблагодарил ученых за помощь спортсменам. "Она как никогда кстати. Думаю, что это будет весомым аргументом в диалоге по этому вопросу", - сказал он.

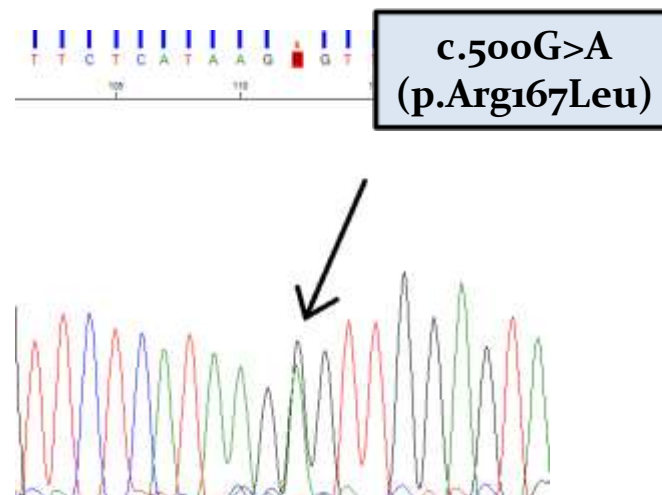


Результаты обследования пациентов с эритроцитозом на наличие наследственных мутаций в гене *VHL*

Из 37 пациентов мутации в 3 экзоне гена *VHL* обнаружены у двух человек



- Частота встречаемости 0.00023% (ExAC)
- Приводит к возникновению Чувашской полицитемии



- Частота встречаемости $A=0.00000$ (1/246232, GnomAD)
- В литературе описаны два случая наличия данной мутации



Секвенирование по Сенгеру

Сравнение с другими методами

Плюсы

- Длина рида 300-1000 пн.
Для сравнения у
пиросеквенирования
(NGS) этот параметр не
превышает 150
нуклеотидов
- Высокая точность
($\geq 99.999\%$)

Минусы

- Высокая стоимость (сотни
долларов за Mbp)
- Особо "трудные" участки
(тандемные повторы,
псевдогены)
- Нельзя обнаружить крупные
транслокации, делеции
- Необходимость клонировать
каждый фрагмент



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
СИБИРСКИЙ
НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ
ЦЕНТР
ФГБНУ РОССИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBIRIAN FEDERAL UNIVERSITY

Спасибо за внимание!

Контактные данные

г. Красноярск, ул. Коломенская 26, к.4

тел.: +79135602681

e-mail:

stn.25@mail.ru

Заведующая НПЛМГМИ СФУ

к.б.н., доц. Субботина Татьяна Николаевна