

ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный специалист по медицинской генетике города Москвы, заведующий кафедрой медицинской генетики ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, главный научный сотрудник отдела информационных технологий и мониторинга врожденных пороков развития ОСП НИКИ педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, д.м.н.

Демикова Н.С.

« 17 » октября 2025 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Региональной общественной организацией «Московским обществом медицинских генетиков» д.м.н., председатель РОО «Московское общество медицинских генетиков», руководитель отдела лабораторной генетики, г.н.с. ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России



Цуканов А.С.

« 20 » Октября 2025 г.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ В ПРАКТИКЕ
КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ № 62

Москва
2025

УДК 577.21

ББК 28.04

Ц17

Организация-разработчик: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»

Составители: *Цапкова Л.А.*, старший научный сотрудник лаборатории онкогенетики и наследственных заболеваний ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы», к.б.н.;

Бодунова Н.А., руководитель городского медико-генетического центра, заведующая центра персонализированной медицины ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы», к.м.н.;

Голодушкин А.А., медицинский лабораторный техник лаборатории диагностики полимеразной цепной реакции ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»;

Серебряков В.В., биолог лаборатории диагностики полимеразной цепной реакции ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»;

Старовойтов Д.В., биолог городского медико-генетического центра ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы».

Рецензенты: *Цуканов А.С.*, д.м.н., главный научный сотрудник отдела лабораторной генетики ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих».

Наседкина Т.В., профессор, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биологических микрочипов ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской Академии наук.

Секвенирование по сэнгеру в практике клиничко-диагностических и научно-исследовательских лабораторий: методические рекомендации / составители: Л.А. Цапкова, Н.А. Бодунова, А.А. Голодушкин [и др.]. – М.: ГБУЗ МКНЦ им. А. С. Логинова ДЗМ, 2025. – 54 с.

Принято решение Экспертным советом по науке Департамента здравоохранения города Москвы и Региональной общественной организацией «Московским обществом медицинских генетиков» (Протокол № 6/1 от 20.10.2025 г.) рекомендовать: методические рекомендации к печати и последующему внедрению в практику московского здравоохранения.

Предназначение Методические рекомендации предназначены для специалистов, занимающихся молекулярно-генетическими исследованиями с применением технологии прямого секвенирования, а именно: врачам клинической лабораторной диагностики, врачам-лабораторным генетикам, врачам-генетикам, врачам-лаборантам, биологам, эксперт-генетикам, научным сотрудникам и иным специалистам. Обобщают информацию об организации молекулярно-генетической лаборатории, определяют возможности метода и его ограничения, содержат

сведения о наиболее типичных проблемах, возникающих в процессе секвенирования и способах их устранения. Составлены на основании установленных стандартов и рекомендаций для молекулярно-генетических лабораторий. Представленные методические рекомендации распространяются в качестве руководства для медицинских и научно-исследовательских организаций.

Авторы несут ответственность за предоставленные данные в методических рекомендациях.

ISBN:

©ГБУЗ МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ, 2025
© Коллектив авторов, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

Нормативные ссылки.....	5
Определения.....	6
Список сокращений.....	9
Введение.....	10
I. Цели и задачи методических рекомендаций.....	10
II. Организации деятельности лабораторий.....	11
2.1. Нормативные документы, регламентирующие деятельность лабораторий, выполняющих молекулярно-генетические исследования.....	12
2.2. Общие требования к организации работ.....	13
2.2.1. Требования к квалификации персонала.....	13
2.2.2. Требования к помещениям лаборатории, выполняющей молекулярно-генетические исследования методом секвенирования по Сэнгеру.....	17
2.2.3. Необходимое оборудование для выполнения исследований методом секвенирования по Сэнгеру.....	18
III. Область применения метода секвенирования по Сэнгеру. Преимущества и ограничения.....	20
IV. Теоретические основы секвенирования по Сэнгеру. Этапы секвенирования по Сэнгеру.....	23
V. Анализ и интерпретация данных секвенирования по Сэнгеру.....	34
VI. Составление отчета (заключения) по результатам молекулярно-генетического исследования.....	40
VII. Контроль качества.....	41
VIII. Описание типичных проблем, возникающих в процессе секвенирования по Сэнгеру.....	43
IX. Серия клинических случаев из практики клинико-диагностической лаборатории.....	47
X. Источники литературы.....	51

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. N 464н "Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований" (с изменениями и дополнениями), вступил в силу с 1 сентября 2021 года и действует до 1 сентября 2027 года.
2. Приказ Минздрава России от 23.11.2021 N 1088н «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021 г. N 464н Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований (Зарегистрировано в Минюсте России 30.11.2021 N 66103)», Стандарт оснащения клинико-диагностической лаборатории 3 уровня А. Основное оборудование, Молекулярно-генетические исследования; "Приложение N 8 к Правилам проведения лабораторных исследований, утвержденным приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021 г. N 464н, Стандарт оснащения микробиологической лаборатории.
3. Приказ Минздрава РФ от 21.04.2022 N 274Н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями» (редакция от 21.04.2022 - действует с 31.12.2022), Приложение 3 «Стандарт оснащения медико-генетической консультации (Центра), 8. Стандарт оснащения молекулярно-генетической лаборатории.
4. ГОСТ Р 58505—2019/ ISO/TS 20428: 2017 Информатизация здоровья (Элементы данных и их метаданные для описания структурированной информации о клиническом геномном секвенировании в электронных медицинских картах).
5. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. N 4 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" (с изменениями и дополнениями), введены в действие с 1 сентября 2021 г. и действуют до 1 сентября 2027 г.
6. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».
7. Приказ Министерства труда и социальной защиты РФ от 14 марта 2018 г. № 145н "Об утверждении профессионального стандарта "Специалист в области клинической лабораторной диагностики".
8. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 2 мая 2023г. № 206н "Об утверждении Квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием".
9. Приказ Минтруда РФ от 12.01.2016 № 2н «Об утверждении профессионального стандарта "Младший медицинский персонал".

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Инсерция - вставка одной или нескольких пар нуклеотидов в последовательность ДНК.

Делеция - выпадение одной или нескольких пар нуклеотидных оснований из последовательности ДНК.

NGS (Next Generation Sequencing) - секвенирование нового поколения, группа методов, который позволяет расшифровать последовательность нескольких генов или целого генома.

SNV (Single Nucleotide Variant) - однонуклеотидный генетический вариант, наследственное изменение, связанное с изменением одной пары нуклеотидов.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм.

STR (Short Tandem Repeat) - короткий тандемный повтор, длина которого составляет от 2 до 6 нуклеотидов.

VUS (Variant of Uncertain Significance) - вариант с неопределенной клинической значимостью.

Аллели – варианты гена, расположенные в одинаковых участках гомологичных хромосом и отвечающие за один признак.

Гемизиготность – аллельное состояние при котором, ген представлен лишь одним аллелем. Характерно для генов расположенных в X и Y хромосомах.

Ген - участок молекулы ДНК, кодирующий последовательность аминокислот в полипептиде.

Геном – полный набор генетической информации организма.

Генотип - комбинации аллелей гена, локуса гена или варианта гена конкретного организма.

Гетерозиготность – это генотип организма, при котором в одной паре гомологичных хромосом находятся разные аллели одного и того же гена.

Герминальная мутация - врожденное изменение ДНК, возникающее в половых клетках человека и передающееся по наследству. Такие мутации, в отличие от соматических, присутствуют во всех клетках организма.

Гомозиготность – это генотип организма, при котором в одной паре гомологичных хромосом находятся одинаковые аллели одного и того же гена.

ДНК - молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты, обеспечивающая хранение, передачу и реализацию наследственной информации.

Инtron - некодирующая область гена, которая вырезается (сплайсинг) на этапе созревания матричной РНК.

Капиллярный электрофорез - электрофорез в полиакриламидном геле, выполняемый в тонкой капиллярной трубке, что обеспечивает высокое разрешение.

Митохондриальный геном - кольцевые молекулы ДНК длиной 16569 нуклеотидов, сосредоточенные в митохондриях клетки.

Мутация – стойкое изменение в нуклеотидной последовательности ДНК.

Патогенный вариант – генетический вариант, приводящий к возникновению заболевания.

Полиморфизм - генетический вариант, встречающийся в популяции с частотой более 1%.

Праймер - синтетическая последовательность нуклеотидов, длиной 20-25 пн., служит затравкой для синтеза комплементарной цепи ДНК.

Псевдогены – неактивные копии обычных генов.

ПЦР – полимеразная цепная реакция, в ходе которой происходит экспоненциальное увеличение копий участка ДНК.

Референсная последовательность - эталонная последовательность ДНК организма, которая используется для выравнивания секвенируемых последовательностей.

Секвенирование - определение нуклеотидной последовательности молекулы ДНК.

Секвенирование по Сэнгеру - определение нуклеотидной последовательности молекулы ДНК методом «обрыва цепи» с использованием дидезокринуклеотидов.

Соматическая клетка - клетка тела человека, которая делится посредством митоза.

Соматическая мутация - мутация, возникающая в соматических клетках и не передающаяся по наследству.

Фармакогенетика – наука, изучающая генетические детерминанты человека, обуславливающие его реакцию на лекарственные препараты, их эффективность, токсичность и риск побочных реакций.

Фенотип – проявление генотипа при взаимодействии генетических характеристик организма и факторов окружающей среды.

Экзон – область гена, кодирующая последовательность белка в полипептиде.

Экзом – совокупность всей кодирующей части генома.

Электрофорез - метод разделения молекул ДНК, РНК, белков по размеру, электрическому заряду.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ACMG - американский колледж медицинской генетики.

AMP - ассоциация молекулярной патологии.

BCR::ABL1 – химерный ген, результат транслокации между 9 и 22 хромосомами.

ГИСО - гастроинтестинальная стромальная опухоль – это редкий вид злокачественный новообразований, которые возникают в стенках желудочно-кишечного тракта из интерстициальных клеток Кахаля.

ДЗМ – Департамент здравоохранения города Москвы.

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота.

dNTP - дезоксинуклеозидтрифосфат (2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфат)

dATP - 2'-дезоксиаденозин-5'-трифосфат.

dCTP - 2'-дезоксцитидин-5'-трифосфат.

dTTP - 2'-дезокситимидин-5'-трифосфат.

dGTP - 2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфат.

ddNTP - дидезоксинуклеозидтрифосфат (2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфат)

ddATP - 2', 3'-дидезоксиаденозин-5'-трифосфат.

ddTTP - 2', 3'-дидезокситимидин-5'-трифосфат.

ddCTP - 2', 3'-дидезоксцитидин-5'-трифосфат.

ddGTP - 2', 3'-дидезоксигуанозин-5'-трифосфат.

ИТК – ингибиторы тиразинкиназ, применяются в терапии различных злокачественных новообразований, останавливают рост и распространение опухолевых клеток, блокируя сигнальные пути, контролируемые эти процессы.

KIT - протоонкоген, кодирующий рецептор тирозинкиназы и участвующий в росте, делении, миграции и выживании клеток.

HLA - лейкоцитарный антиген человека.

MEFV – ген, кодирующий белок - пирин (маренострин), играет важную роль в регуляции воспалительных процессов в организме.

PDGFRa – ген, кодирующий рецептор фактора роста тромбоцитов (PDGF), играет важную роль в росте, делении и выживании клеток.

ПЦР - полимеразная цепная реакция.

STR - простые тандемный повторы.

ХМЛ - хронический миелоидный лейкоз.

Введение

Клиническая лабораторная диагностика является мощнейшим инструментом системы здравоохранения, без которого сегодня невозможно представить, как практическую, так и научную медицину. В связи со стремительным развитием медицинских технологий, цифровизацией медицинской документации и автоматизацией системы выдачи результатов анализов, стало возможным быстро и на высоком уровне получать результаты лабораторных исследований, что в свою очередь существенно ускоряет процесс принятия клинических решений.

Несмотря на активное внедрение в клиническую практику новых технологий секвенирования, не потерял своей значимости и метод прямого секвенирования, предложенный Фредериком Сэнгером в 1977 году. Данный метод занимает достойное место в лабораторной диагностике, дополняя ее в тех случаях, когда другие методы молекулярно-генетической диагностики не подходят для решения поставленных задач, или требуется уточнение или подтверждение результатов. Например, в случаях, когда необходимо секвенировать отдельные экзоны гена, подтвердить обнаруженный генетический вариант после NGS, в том числе в рамках сегрегационного анализа в семье пробанда. Эти и многие другие вопросы по использованию метода прямого секвенирования по Сэнгеру в клинической лабораторной диагностике, будут отражены в данных методических рекомендациях.

Следует отметить, что на сегодняшний день в Российской Федерации отсутствуют методические рекомендации по применению секвенирования по Сэнгеру в лабораторной диагностике, что подчеркивает актуальность и необходимость разработки данных рекомендаций.

I. Цели и задачи методических рекомендаций

Настоящие методические рекомендации разработаны с целью унификации и стандартизации процедур выполнения секвенирования по Сэнгеру в клиничко-диагностических лабораториях, *подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы (ДЗМ)*, научных лабораториях. Применение настоящих методических рекомендаций позволит лабораториям правильно организовать выполнение исследований с применением метода секвенирования по Сэнгеру; обеспечить безопасность персонала лаборатории при выполнении работ; получать репрезентативные результаты; клиницистам правильно маршрутизировать пациента на лабораторное исследование с учетом клинических задач.

Клинические рекомендации могут быть полезны врачам клинической лабораторной диагностики, врачам-генетикам, биологам, специалистам, непосредственно участвующим в проведении секвенирования по Сэнгеру, заведующим и ответственным лицам клиничко-диагностических и научных лабораторий, обеспечивающих контроль качества и соблюдение установленных процедур при проведении секвенирования по Сэнгеру.

Задачи методических рекомендаций:

1. Стандартизация процедуры секвенирования: создание оптимального и унифицированного протокола проведения секвенирования по Сэнгеру, от подготовки образца до анализа результатов, для различных типов клинических задач.
2. Обеспечение аналитической валидности метода: установление и контроль аналитических характеристик метода для различных типов генетических вариантов.
3. Обеспечение правильности клинической интерпретации результатов: рекомендации по клинической интерпретации результатов секвенирования, включая использование баз данных, онлайн-ресурсов и клинических рекомендаций для оценки значимости выявленных мутаций. Клиническая интерпретация требует экспертного подхода и соответствующих познаний в области анализа и клинической интерпретации данных, что должно предоставить врачам-клиницистам инструменты для принятия обоснованных решений.

II. Организация деятельности лабораторий

Деятельность лабораторий в части, касающейся проведения молекулярно-биологических и молекулярно-генетических исследований, осуществляется на основании лицензии, предоставляемой в порядке, установленном законодательством Российской Федерации, в соответствии с Положением о лицензировании медицинской деятельности Федерального закона от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности» и санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями I – IV группы патогенности.

При работе с потенциально опасным биологическим материалом необходимо соблюдать требования, регламентированные Постановлением РФ от 28 января 2021 г. N 4 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" (с

изменениями и дополнениями), введены в действие с 1 сентября 2021 г. и действуют до 1 сентября 2027 г.

2.1. Нормативные документы, регламентирующие деятельность лабораторий, выполняющих молекулярно-генетические исследования

Требования к организации лабораторных помещений, оснащению, оборудованию, штатной численности персонала лабораторий, проведению молекулярно-генетических исследований, в том числе с ПБА I-IV групп патогенности методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенировании, реагентам и расходным материалам регламентируют следующие документы:

- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований», с изменениями и дополнениями от 23 ноября 2021 г.

- Приказ Минздрава России от 23.11.2021 № 1088н «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021 г. N 464н Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований (Зарегистрировано в Минюсте России 30.11.2021 N 66103)», Стандарт оснащения клинико-диагностической лаборатории 3 уровня А Основное оборудование, Молекулярно-генетические исследования; Приложение N 8.

- Приказ Минздрава РФ от 21.04.2022 № 274Н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями", редакция от 21.04.2022 - действует с 31.12.2022, Приложение 3 «Стандарт оснащения медико-генетической консультации (Центра), Стандарт оснащения молекулярно-генетической лаборатории.

- Приказ Министерства труда и социальной защиты РФ от 14 марта 2018 г. № 145н "Об утверждении профессионального стандарта "Специалист в области клинической лабораторной диагностики".

- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 2 мая 2023г. № 206н "Об утверждении Квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием".

- Приказ Минтруда РФ от 12.01.2016 № 2н «Об утверждении профессионального стандарта "Младший медицинский персонал".

2.2. Общие требования к организации работ

- подготовка помещения для установки и эксплуатации оборудования в соответствии с требованиями настоящего руководства и нормативных документов по организации лабораторной деятельности, подготовить рабочие места с соблюдением техники безопасности;
- привлечение к выполнению работ специалистов, обладающими квалификационными требованиями, установленными российским законодательством и обладающих специализированными познаниями в области молекулярной биологии.
- выполнение молекулярно-генетических исследований на основе технологии секвенирования по Сэнгеру в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОПами), прописанными для всех этапов выполнения анализа (от взятия биоматериала до выдачи результата анализа заказчику) и логистики процессов, в целях обеспечения внутреннего и внешнего контроля качества результатов, а также соблюдения юридических и этических норм Российского законодательства и защиты прав пациента;

2.2.1. Требования к квалификации персонала

Исследования на основе секвенирования по Сэнгеру должны выполнять лица, имеющие соответствующую профессиональную подготовку. Требования к квалификации персонала должны соответствовать нормативным документам, действующим на территории Российской Федерации: приказ Минздрава РФ № 464N от 2021 г.; Приказ Минздрава РФ от 2 мая 2023г. № 206н; Приказ Министерства труда и соцзащиты РФ от 14 марта 2018 г. N 145н.

Работать с биологическим материалом, потенциально содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности, имеют право лица старше 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим образованием, ознакомленные с правилами работы с патогенными биологическими агентами I-II групп и/или с микроорганизмами III – IV групп патогенности, получившие дополнительное образование по ПЦР-диагностике и секвенированию.

Лабораторные специалисты, выполняющие секвенирование по Сэнгеру, должны уметь оценивать пригодность биологического материала для секвенирования; выбирать эффективные способы экстракции ДНК в зависимости от типа биологического материала; осуществлять дизайн праймеров, подбирать условия ПЦР, способы очистки ДНК/ПЦР-продуктов/продуктов реакции секвенирования, оценивать полученные данные; следить за научными достижениями в области клинической генетики и молекулярной диагностики;

проводить оценку взаимосвязи между генами, вариантами и фенотипом заболевания, что требует соответствующих теоретических и практических знаний в области молекулярной биологии и знания протоколов секвенирования и интерпретации данных.

Рекомендуемые штатные единицы клинико-диагностической или научно-исследовательской лаборатории/отдела/отделения, квалификационные требования специалистов, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Штатное расписание и квалификационные требования к организации лабораторий, осуществляющих исследования методом секвенирования по Сэнгеру

Должность	Кол-во штат. ед.	Квалификационные требования
Заведующий клинико-диагностической лабораторией/отделом/отделением	1	<p>1. Высшее медицинское образование: (специальность: "Лечебное дело", "Педиатрия", "Стоматология", "Медико-профилактическое дело", "Медицинская биохимия") и подготовка в интернатуре и (или) ординатуре по специальности "Клиническая лабораторная диагностика" или дополнительное профессиональное образование (программы профессиональной переподготовки по специальности "Клиническая лабораторная диагностика") при наличии подготовки в интернатуре и (или) ординатуре по одной из основных специальностей или специальности, требующей дополнительной подготовки; специалитет по специальности "Медицинская биохимия" для специалистов, завершивших обучение с 2017 года и опыт практической работы не менее трех лет в области клинической лабораторной диагностики.</p> <p>2. Высшее медицинское образование по одной из специальностей: "Лечебное дело", "Медико-профилактическое дело", "Медицинская биофизика", "Медицинская биохимия", "Медицинская кибернетика" "Педиатрия", "Стоматология". Подготовка в ординатуре по специальности "Лабораторная генетика" или Профессиональная переподготовка по специальности "Лабораторная генетика" при наличии подготовки в интернатуре/ординатуре по одной из специальностей: "Генетика", "Клиническая</p>

		<p>лабораторная диагностика". Повышение квалификации не реже одного раза в 5 лет в течение всей трудовой деятельности.</p> <p>3. <i>Высшее немедицинское образование</i> по одному из направлений подготовки: "Биология", "Биотехнология", "Биотехнология", "Биофизика", "Биохимия", "Генетика", "Микробиология", "Молекулярная биология". Профессиональная переподготовка по направлению профессиональной деятельности в объеме не менее 450 часов. Для лиц, принятых на должность до 1 сентября 2021 г. (для клиничко-диагностических лабораторий).</p>
<p>Врач клинической лабораторной диагностики/врач-лабораторный генетик/биолог/врач-лаборант</p>	<p>не менее 1*</p>	<p>1. Высшее образование по одной из специальностей: "Лечебное дело", "Медико-профилактическое дело", "Медицинская биофизика", "Медицинская биохимия", "Медицинская кибернетика", "Педиатрия". Подготовка в интернатуре/ординатуре по специальности "Клиническая лабораторная диагностика" или Профессиональная переподготовка по специальности "Клиническая лабораторная диагностика" при наличии подготовки в интернатуре/ординатуре по одной из специальностей укрупненных групп специальностей "Клиническая медицина" или "Науки о здоровье и профилактическая медицина" (с 1 января 2016 г.). Повышение квалификации не реже одного раза в 5 лет в течение всей трудовой деятельности.</p> <p>2. Высшее образование по одной из специальностей: "Лечебное дело", "Медико-профилактическое дело", "Медицинская биофизика", "Медицинская биохимия", "Медицинская кибернетика" "Педиатрия", "Стоматология". Подготовка в ординатуре по специальности "Лабораторная генетика" или Профессиональная переподготовка по специальности "Лабораторная генетика" при наличии подготовки в интернатуре/ординатуре по одной из специальностей: "Генетика", "Клиническая лабораторная диагностика". Повышение</p>

		<p>квалификации не реже одного раза в 5 лет в течение всей трудовой деятельности</p> <p>3. Высшее образование по одному из направлений подготовки: "Биология", "Биотехнология", "Биотехнология", "Биофизика", "Биохимия", "Генетика", "Микробиология", "Молекулярная биология", "Физиология".</p> <p>Профессиональная переподготовка по направлению профессиональной деятельности в объеме не менее 450 часов. Повышение квалификации не реже одного раза в 5 лет в течение всей трудовой деятельности</p>
Медицинский технолог, медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), лаборант	не менее 3**	<p>Среднее профессиональное образование - программы подготовки специалистов среднего звена по специальности "Лабораторная диагностика" (для лиц, завершивших образование до 2021 г.)</p> <p>Среднее профессиональное образование - программы подготовки специалистов среднего звена по специальности "Лабораторная диагностика", в части, касающейся профессиональных компетенций, соответствующих обобщенной трудовой функции кода А профессионального стандарта "Специалист в области лабораторной диагностики со средним медицинским образованием". Сертификат специалиста по специальности "Лабораторная диагностика" и (или) свидетельство об аккредитации специалиста по специальности "Лабораторная диагностика"</p>
Санитар	не менее 1	Среднее общее образование.

*- в соответствии с объемом лабораторных исследований;

** - в соответствии с объемом лабораторных исследований, но не менее 3 на каждую должность врача клинической лабораторной диагностики/ врача-лабораторного генетика/биолога/врача-лаборанта/.

Штатное расписание и количество необходимого персонала рассчитывается в соответствии с планируемым объемом выполняемых исследований. Например, для выполнения исследований методом секвенирования по Сэнгеру в объеме 500 исследований

в месяц необходим один врач клинической лабораторной диагностики/врач-лабораторный генетик, один биолог или врач-лаборант, два медицинских техника.

Перед выполнением исследований, сотрудники, выполняющие исследования, должны пройти инструктаж по технике безопасности и правилам работы в лаборатории и оказании первой медицинской помощи в случае необходимости (СанПиН 3.3686-21 от 25 мая 2022 года).

2.2.2. Требования к помещениям лаборатории, выполняющей молекулярно-генетические исследования секвенирования по Сэнгеру

В лаборатории должны быть выделены отдельные зоны (боксы) с предбоксами, пространственно отделённые друг от друга:

- 1) зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала;
- 2) “чистая” зона - зона пробоподготовки и экстракции нуклеиновых кислот;
- 3) зона приготовления реакционных смесей и раскапывания ПЦР реакций;
- 4) амплификационная – зона, в которой будет проходить этап термоциклирования (ПЦР);
- 5) зона секвенирования - зона, где проходит этап капиллярного гель-электрофореза;
- 6) зона горизонтального агарозного гель-электрофореза - эта зона должна быть максимально удалена от остальных, так как данный этап представляет собой открытую систему, есть высокий риск контаминации ампликонами.

Лабораторные зоны, в которых планируется выполнение секвенирования по Сэнгеру могут быть совмещены с лабораторными зонами, в которых выполняются исследования другими молекулярно-генетическими методами. Например, зоны пробоподготовки и экстракции нуклеиновых кислот, приготовления и раскапывания реакционных смесей для ПЦР, могут быть общими при выполнении других молекулярно-генетических исследований.

Лабораторное оборудование, мебель должны быть строго стационарными в каждой зоне, категорически запрещается перемещение оборудования, расходных материалов и предметов мебели между зонами. Каждая лабораторная зона, должна быть снабжена ультрафиолетовыми лампами и средствами деконтаминации. В состав лаборатории могут быть включены вспомогательные помещения (комнаты персонала, кабинет заведующего лабораторией, раздевалки для сотрудников, комната приема пищи, туалет, подсобные складские помещения), которые должны быть вынесены за пределы рабочей зоны.

Вспомогательные помещения должны располагаться отдельно от рабочих зон (помещений) в соответствии с действующими санитарными правилами, регламентирующими обеспечение безопасности работ с микроорганизмами I-IV групп

патогенности. Необходимо предусмотреть наличие автоклавной комнаты для обеззараживания исследуемого материала.

2.2.3. Необходимое оборудование для выполнения исследований методом секвенирования по Сэнгеру

Таблица 2

Перечень необходимого оборудования для выполнения исследований методом секвенирования по Сэнгеру

Наименование оборудования	Количество*	Назначение
Станция для выделения нуклеиновых кислот или ручное выделение.	1	Экстракция нуклеиновых кислот
Амплификатор нуклеиновых кислот (термоциклер);	не менее 1	Проведение ПЦР-реакций
Секвенатор нуклеиновых кислот (генетический анализатор) для выполнения секвенирования по Сэнгеру	1	Для проведение капиллярного гель-электрофореза (разделения нуклеиновых кислот)
Перемешивающее устройство (встряхиватель, вортекс)	2	Для встряхивания перемешивания реакционных смесей, ДНК
Термостат твердотельный	2	Для инкубирования проб
Набор автоматических пипеток (пипеточных дозаторов)	по количеству рабочих мест	Для дозирования растворов/реагентов
Центрифуга настольная общего назначения	2	Для центрифугирования проб
Микроцентрифуга/ вортекс для микропробирок	2	Для центрифугирования проб
Камера для горизонтального электрофореза	1	Для оценки эффективности ПЦР-реакции и накопления ПЦР-продукта

Источник питания для электрофоретической камеры	1	Для проведения горизонтального гель-электрофореза
Трансиллюминатор	1	Для визуализации изображения результатов гель-электрофореза
Спектрофотометр или флуориметр	1	Для измерения концентрации и оценки качества ДНК
Бокс биологической безопасности класса II	на каждое рабочее место	Для работы с биологическим материалом (пробоподготовка)
ПЦР-бокс	на каждое рабочее место	Приготовление ПЦР смесей
Персональный компьютер и Программное обеспечение анализа данных секвенирования	1	Анализ данных секвенирования
Холодильник низкотемпературный для хранения медицинских изделий и образцов биоматериала	не менее 4	Для хранения медицинских изделий и образцов биоматериала
Холодильник низкотемпературный	1	Для хранения медицинских изделий и образцов биоматериала

А также другое вспомогательное оборудование и мебель, регламентированные Приказом Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. N 464н "Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований" (с изменениями и дополнениями), а также Приказом Минздрава России от 15.11.2012 N 917н (ред. от 21.02.2020) "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным с врожденными и (или) наследственными заболеваниями" (Зарегистрировано в Минюсте России 21.12.2012 N 26301).

В соответствии с Постановлением Правительства РФ № 2026 от 24 ноября 2021 года с 1 марта 2022 года в России разрешено применять в медицинской деятельности незарегистрированные медицинские изделия для диагностики *in vitro*, однако порядок предусматривает получение разрешения Росздравнадзором и устанавливает требования к таким изделиям, их изготовителям, а также правила их использования и утилизации, постановление действует до 1 марта 2028 года.

III. Области применения метода секвенирования по Сэнгеру. Преимущества и ограничения

3.1. Область применения метода

Несмотря на развитие высокопроизводительных методов секвенирования (NGS), секвенирование по Сэнгеру по-прежнему сохраняет свою актуальность и является предпочтительным методом диагностики в определенных клинических ситуациях. Секвенирование по Сэнгеру может быть использовано в следующих случаях:

Подтверждение результатов, полученных другими методами (например, NGS): секвенирование по Сэнгеру может использоваться для верификации результатов, полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS), особенно в случаях, когда результаты имеют важное клиническое значение или являются новыми и ранее не описанными. Секвенирование по Сэнгеру признано "золотым стандартом секвенирования" и позволяет подтвердить результаты, полученные другими методами.

Подтверждение выявленного варианта у родственников пробанда: исследование проводится в помощь врачам-генетикам, например, сегрегационный анализ с целью доказательства типа наследования; выявления носительства генетического варианта у родственников пробанда, определения рисков рождения больных детей в семье пробанда.

Анализ небольших участков генов: секвенирование по Сэнгеру может использоваться для анализа небольших генов или экзонов гена, а также конкретных участков ДНК, с целью выявления мутаций в гене, связанном с определенным заболеванием, либо с целью определения мутационного статуса опухоли для назначения таргетной терапии. Например, методом секвенирования по Сэнгеру можно секвенировать весь ген *VHL* (von Hippel-Lindau tumor suppressor) для подтверждения диагноза синдром Хиппеля-Линдау, или всю кодирующую часть гена *TTR* для подтверждения диагноза наследственный амилоидоз, или клинически значимые экзоны генов *KIT* (proto-oncogene, receptor tyrosine kinase) для назначения таргетной терапии *KIT*-ингибиторами. При подозрении на болезнь Бехчета проводят секвенирование 2-3 экзонов гена *HLA-B* и т.д. Примеры использования метода секвенирования по Сэнгеру более подробно будут представлены в разделе "Серия клинических случаев из практики клинко-диагностической лаборатории".

Идентификация STR-маркеров (коротких tandemных повторов): Секвенирование по Сэнгеру может использоваться для определения количества повторов в STR-локусах. Например, определение числа тринуклеотидных повторов в гене *HTT* для диагностики болезни Гентингтона, анализ числа CAG-повторов в гене андрогенового рецептора *AR* и т.д.

Однако для исследования коротких tandemных повторов предпочтительным методом все же является фрагментный анализ.

Построение библиотеки праймеров (primer walking): когда необходимо определить последовательность очень длинного фрагмента ДНК, для которого невозможно подобрать один набор праймеров, перекрывающих всю область, применяется метод "primer walking". Секвенирование проводится поэтапно с использованием нескольких наборов праймеров, конструируемых на основе ранее полученных последовательностей. Позволяет прочесть последовательность ДНК большей длины, чем возможно при однократном секвенировании.

Мониторинг мутационного статуса после терапии: если необходимо отслеживать динамику мутационного статуса опухоли в процессе лечения, секвенирование по Сэнгеру может быть более экономичным и быстрым, чем повторное проведение NGS. Например, определение мутационного статуса *BCR-ABL* при ХМЛ.

3.2. Преимущества и ограничения метода секвенирования по Сэнгеру

Как и любой другой метод, секвенирование по Сэнгеру обладает своими преимуществами и ограничениями, которые следует учитывать при выборе оптимальной стратегии анализа.

3.2.1. Преимущества

Высокая точность: секвенирование по Сэнгеру обеспечивает очень высокую точность определения нуклеотидной последовательности (более 99.9%), что делает его "золотым стандартом" для подтверждения результатов, полученных другими методами. Высокая точность критически важна для клинической диагностики и выявления редких генетических вариантов.

Доступность оборудования и реактивов: оборудование и реактивы для секвенирования по Сэнгеру широко доступны на рынке и относительно недороги.

Низкая стоимость при анализе небольшого числа мишеней: при анализе небольшого количества генов или участков ДНК секвенирование по Сэнгеру может быть более экономичным, чем другие методы.

Длительный срок службы оборудования: секвенаторы на основе капиллярного электрофореза могут эксплуатироваться в течение многих лет при условии соблюдения правил технического обслуживания.

3.2.2. Ограничения

Низкая пропускная способность: секвенирование по Сэнгеру позволяет анализировать только одну последовательность за одну реакцию.

Относительно высокая стоимость анализа большого числа генов: при анализе большого количества генов или геномных областей стоимость секвенирования по Сэнгеру значительно возрастает по сравнению с высокопроизводительными методами.

Ограничения по длине прочтения: секвенирование по Сэнгеру обеспечивает получение последовательностей длиной до 700-900 нуклеотидов, что может быть недостаточно для анализа протяженных геномных областей.

Невозможность одновременного анализа множества генов: каждая реакция секвенирования позволяет анализировать только один участок ДНК, что делает невозможным одновременный анализ множества генов в одной пробирке, как это возможно при использовании NGS.

Трудности при анализе смешанных образцов: секвенирование по Сэнгеру не подходит для анализа образцов, содержащих смесь ДНК (например, мозаичные образцы или образцы с низкой долей мутантного аллеля), из-за чувствительности метода (не ниже 15% мутантного аллеля).

Зависимость от качества матрицы: секвенирование по Сэнгеру требует использования высококачественной ДНК-матрицы без деградации и контаминации, что может быть сложным в работе с некоторыми типами образцов.

Чувствительность метода в отношении опухолевой ткани: чувствительность метода составляет 15% и содержание мутантного аллеля в образце ниже этого порогового значения не дает возможности его обнаружения секвенированием по Сэнгеру.

IV. Теоретические основы секвенирования по Сэнгеру. Этапы секвенирования по Сэнгеру

4.1. Принцип метода секвенирования по Сэнгеру

Метод секвенирования по Сэнгеру, также известный как метод обрыва цепи, представляет собой метод определения нуклеотидной последовательности ДНК, основанный на избирательном включении дидезоксинуклеотидов (ddNTPs) в процессе репликации ДНК *in vitro*.

Метод был предложен Фредериком Сенгером и его группой в 1977 году. Сущность метода состоит в синтезе новых нитей ДНК, комплементарных одонитевой матрице. Однако, синтез нити ДНК не продолжается неопределенно долго, потому что в реакцию смесь наряду с четырьмя дезоксинуклеотидами, добавляют четыре дидезоксинуклеотида, которые блокируют дальнейшую элонгацию, так как к 3'-углероду присоединен атом водорода вместо гидроксильной группы (рис.1), которая необходима для образования связи со следующим нуклеотидом - синтез новых нитей ДНК прекращается.

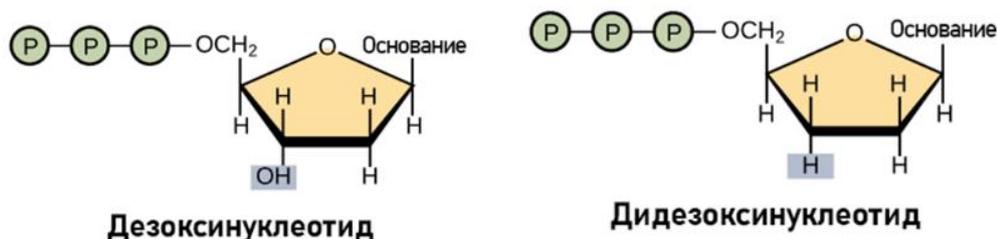


Рис.1. Схематическое изображение dNTP и ddNTP,

Каждый дидезоксинуклеотид помечен своим флюорофором. В ходе капиллярного гель-электрофореза меченые молекулы ДНК перемещаются в геле и проходят мимо датчика флуоресценции, который распознает дидезоксинуклеотиды (рис.2). Далее информация передается в систему формирования изображения. (рис.3).

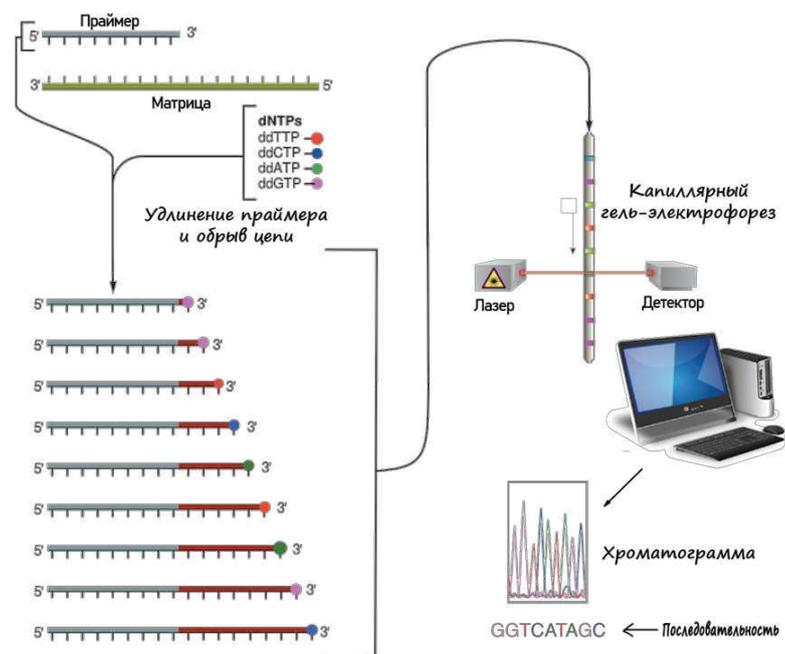


Рис. 2. Суть метода обрыва цепи. Разделение фрагментов ДНК после реакции секвенирования методом капиллярного гель-электрофореза.

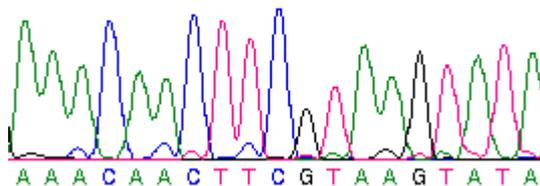


Рис. 3. Хроматограмма нуклеотидной последовательности ДНК, полученной в процессе секвенирования по Сэнгеру.

4.2. Этапы секвенирования по Сэнгеру

Прежде чем перейти к описанию этапов секвенирования по Сэнгеру, нужно отметить, что успешность получения качественного результата секвенирования будет зависеть, во-первых, от того, насколько правильно были выполнены все этапы процесса, начиная от преаналитического и заканчивая этапом анализа сиквенса и интерпретации выявленного в ходе него генетического варианта. Во-вторых, от качества используемых реагентов в процессе всех этапов секвенирования, качества синтезированных праймеров.

Преаналитический этап является ключевым параметром качества молекулярно-генетического исследования, в данном случае секвенирования по Сэнгеру. Кровь для молекулярно-генетического исследования должна быть собрана в пробирки с ЭДТА, в ней не должно быть признаков гемолиза. Качество приготовления парафинового блока с фиксированной в нем тканью также будет влиять на целостность ДНК в данном

биологическом материале, на качество сиквенса, да и в целом на пригодность данного биоматериала для секвенирования по Сэнгеру. Если говорить о ткани заключенной в парафиновый блок, как правило, это опухолевая ткань, то целью исследования данного материала является поиск мутаций непосредственно в опухолевой ткани. Перед тем как взять данный материал в работу, рекомендуется сделать (если есть такая возможность) морфологический пересмотр блока с целью оценки количества опухолевых клеток в парафиновом блоке. Так как чувствительность метода секвенирования по Сэнгеру составляет 15%, то количество опухолевой ткани в парафиновом блоке должно составлять примерно 70%.

Если все преаналитические процедуры выполнены правильно и первичная оценка пригодности материала к анализу проведена, можно приступать к этапу экстракции ДНК из биологического материала.

4.2.1. Пробоподготовка

Существует несколько способов выделения ДНК из биологического материала:

- экстракция органическими растворителями (фенол-хлороформ) с последующей спиртовой преципитацией;
- выделение на колонках (использование коммерческих наборов на основе сорбции ДНК на силикагелевых мембранах);
- выделение с использованием магнитных частиц (связывание ДНК с магнитными частицами, последующее отделение комплекса с помощью магнита и отмывка от примесей).

Выбор метода выделения ДНК зависит от типа биологического материала, требуемой степени чистоты и изначального объема образца. Чаще всего выделение ДНК осуществляется с помощью коммерческих наборов, инструкции к которым содержат информацию о том, для какого типа биологического материала подходит конкретный набор и для какого типа анализа можно использовать ДНК, выделенную с его помощью.

4.2.2. Контроль качества ДНК

Прежде, чем приступить к последующим этапам секвенирования необходимо оценить качество экстрагированной ДНК. Для оценки качества ДНК используют следующие способы:

- спектрофотометрия (определение концентрации и чистоты ДНК по поглощению ультрафиолетового света);

- флуориметрия (использование флуоресцентных красителей, связывающихся с ДНК, для более точного определения концентрации, например, с использованием Qubit Fluorometer);
- электрофорез в агарозном геле (оценка целостности ДНК).

Качество выделенной ДНК должно отвечать следующим требованиям: высокая степень очистки, отсутствие РНК, белков, ингибиторов ПЦР и других примесей, высокая молекулярная масса, отсутствие деградации ДНК. Минимальная концентрация ДНК: от 1 до 10 нг/мкл.

Показатели чистоты препарата ДНК:

A260/A280: 1.8-2.0 (отношение поглощения при 260 нм к поглощению при 280 нм, характеризует содержание белка).

A260/A230: 2.0-2.2 (отношение поглощения при 260 нм к поглощению при 230 нм, характеризует содержание органических растворителей и солей).

Белки, детергенты, перегруз ДНК матрицы загрязняют капилляры, снижают длину чтения. При наличии множественных матриц ДНК (наличие «шмера») снижается длина чтения, качество сиквенсов падает, сиквенсы становятся нечитаемыми. Наличие солей, EDTA, буферов ингибируют ДНК-полимеразу, мешают инъекции.

4.2.3. Разведение ДНК

Если в процессе измерения наблюдается высокое содержание ДНК, необходимо развести препарат ДНК до требуемого количества в соответствии с протоколом секвенирования. Обычно рекомендуется 1-10 нг ДНК на реакцию секвенирования. Использование оптимальной концентрации ДНК обеспечивает получение качественных результатов секвенирования. Используйте следующее правило: длина продукта (пн)/50 = количество ДНК в нг в реакцию.

Таблица 3

Рекомендуемое количество ДНК-матриц

Длина ПЦР-продукта	Кол-во ДНК матрицы
100-200 пн	1-3 нг
200-500 пн	3-10 нг
500-1000 пн	5-20 нг
1000-2000 пн	10-40 нг
>2500 пн	20-50 нг

4.2.4. Дизайн праймеров

Для того чтобы секвенировать определенный участок ДНК необходимы праймеры - короткие одноцепочечные фрагменты нуклеотидов, используемые для инициации синтеза новой цепи ДНК, которые будут специфичны к исследуемому участку ДНК.

Правильный дизайн праймеров является ключевым фактором успеха ПЦР-амплификации исследуемого участка ДНК. Праймеры должны обеспечивать специфичное и эффективное связывание с целевым участком ДНК. Неправильно спроектированные праймеры могут приводить к неспецифической амплификации, образованию димеров праймеров и другим артефактам, что снижает качество секвенирования. При выборе праймерных последовательностей, необходимо учитывать версию референсной геномной сборки, номер транскрипта, в случаях если вариант необходимо подтвердить после NGS анализа. При разработке праймеров необходимо учитывать следующие критерии:

длина: обычно 18-25 нуклеотидов. Праймеры должны быть достаточно длинными для обеспечения специфичности, но не слишком длинными, чтобы не снижать эффективность амплификации. Оптимальная длина обеспечивает баланс между специфичностью и эффективностью.

Содержание GC: 40-60%. Оптимальное содержание GC обеспечивает стабильное связывание праймера с ДНК-матрицей. Слишком низкое или слишком высокое содержание GC может снижать эффективность амплификации.

Температура плавления (T_m): 55-65°C. Температура плавления - это температура, при которой половина молекул ДНК находится в двухцепочечном состоянии, а другая половина - в одноцепочечном. Важно, чтобы прямой и обратный праймеры имели близкие значения T_m (разница не более 1-2°C). Праймеры с близкими значениями T_m будут эффективно отжигаться на ДНК-матрице при одинаковой температуре отжига.

Специфичность: праймеры должны быть комплементарны только целевому участку ДНК и не иметь значительной гомологии с другими участками генома. Специфичность праймеров обеспечивает амплификацию только целевого продукта.

Отсутствие самокомплементарности и образования шпилек: праймеры не должны образовывать стабильные вторичные структуры (шпильки, димеры), которые могут препятствовать связыванию с ДНК-матрицей. Вторичные структуры снижают доступность праймеров для связывания с ДНК-матрицей.

Отсутствие повторов: следует избегать длинных последовательностей одного и того же нуклеотида (например, ААААА или GGGGG), так как они могут снижать специфичность праймера. Повторы могут приводить к неспецифическому связыванию праймера.

Расположение на ДНК-матрице: праймеры должны быть расположены на противоположных цепях ДНК и фланкировать целевой участок.

3'-конец праймера: важно, чтобы 3'-конец праймера содержал хотя бы один G или C нуклеотид, что способствует более прочному связыванию с ДНК-матрицей. Нуклеотиды G и C образуют три водородные связи, что обеспечивает более стабильное связывание.

Программы для дизайна праймеров: существует множество программ для автоматического дизайна праймеров, которые должны учитывать вышеперечисленные критерии. Некоторые из них: Primer3, Primer-BLAST, Oligo, Primer Express, Primer Premier, Geneious Prime, CLC Main Workbench, PrimerSelect и др.

После разработки праймеров рекомендуется проверить их специфичность с помощью базы данных BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и при необходимости выполнить повторный дизайн. BLAST позволяет проверить, не будут ли праймеры связываться с другими участками генома.

Синтез праймеров: после дизайна оптимальных праймеров, их синтез заказывают в специализированных компаниях, предоставляющих услуги синтеза олигонуклеотидов.

4.2.5. ПЦР-амплификация

Для того чтобы визуализировать последовательность определенного участка ДНК одной ее копии будет недостаточно в силу ограничения разрешающей способности оборудования, поэтому исследователю необходимо произвести многократное копирование интересующего участка ДНК и сделать это можно путем проведения полимеразной цепной реакции (амплификации). Состав реакционной смеси должен быть тщательно оптимизирован для обеспечения максимальной эффективности и специфичности амплификации. Типичный состав реакционной смеси включает следующие компоненты:

- *ДНК-матрица:* препарат ДНК, выделенной из образцов биологического материала;
- *праймеры:* прямой и обратный, обеспечивающие специфическое связывание с участками ДНК, фланкирующими целевой регион. Количество каждого праймера обычно составляет 5-10 пмоль. Оптимальное соотношение праймеров и матрицы влияет на эффективность амплификации;
- *ДНК-полимераза:* термостабильная ДНК-полимераза, обеспечивающая синтез новой цепи ДНК. Количество фермента определяется активностью и объемом реакционной смеси, обычно 1-2.5 единиц на реакцию объемом 25-50 мкл.;
- *дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTPs):* dATP, dCTP, dGTP и dTTP, необходимые для синтеза ДНК. Концентрация каждого dNTP обычно составляет 200 мкМ.

-буферный раствор: обеспечивает оптимальные условия для работы ДНК-полимеразы (рН, ионная сила). Состав буфера зависит от используемой ДНК-полимеразы и обычно поставляется вместе с ферментом;

- ионы магния ($MgCl_2$): необходимы для активности ДНК-полимеразы. Оптимальная концентрация $MgCl_2$ зависит от используемых праймеров и ДНК-матрицы и обычно составляет 1.5-2.5 мМ в реакционной смеси;

- добавки (опционально): в некоторых случаях добавление BSA (бычьего сывороточного альбумина) или ДМСО (диметилсульфоксида) может улучшить эффективность ПЦР, особенно при амплификации сложных участков ДНК.

Температурные режимы ПЦР должны быть оптимизированы для каждой конкретной пары праймеров и целевого участка ДНК. Типичный температурный профиль ПЦР представлен в таблице 4.

Таблица 4

Типовой температурный режим ПЦР

Этап ПЦР	t (°C)	Время	Характеристика этапа
Начальная денатурация	94-95	2-5'	Полное разделение цепей ДНК за счет разрушения водородных связей
25-35 циклов: Денатурация	94-95	30"	разделение цепей ДНК на одноцепочечные фрагменты
Отжиг праймеров	58-64*	30"	праймеры специфически связываются с молекулой ДНК
Элонгация	72	1-2'	синтез новой цепи ДНК
Финальная элонгация	72	5-7'	завершение синтеза всех ДНК-фрагментов
Охлаждение	4	∞	хранение амплификата

* температура отжига подбирается индивидуально для каждой пары праймеров, обычно на 5°C ниже температуры плавления праймера.

Правильный выбор температурных режимов обеспечивает эффективную и специфичную амплификацию целевого участка ДНК. Рекомендуется поставить ПЦР на градиентном амплификаторе для подбора оптимальных условий.

4.2.6. Проверка накопления целевого ПЦР-продукта с помощью электрофореза в агарозном геле.

Данный этап является крайне важным и определяет целесообразность проведения последующих этапов секвенирования. Позволяет оценить наличие и качество

амплификационной матрицы, размер ампликона, количество ПЦР-продукта, а также наличие побочных продуктов и димеров праймеров. На геле должна визуализироваться четкая полоса ДНК целевого размера без выраженного "смазывания" или других артефактов. Интенсивность окраски полос красителя дает представление о концентрации молекул в образце.

Для анализа продуктов амплификации ДНК, применяется электрофорез в агарозном геле в присутствии флуоресцентных интеркалирующих красителей, например, бромистого этидия, SafeGreen и др., которые образуют с фрагментами ДНК устойчивые соединения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля ультрафиолетом. Краситель SafeGreen является предпочтительным, так как не является канцерогеном в отличие от бромистого этидия.

Определение размеров амплифицированных фрагментов производят путем сравнения проверяемых ампликонов с набором фрагментов ДНК известной длины («DNA ladder», «маркеры длин ДНК») (рис. 4). Как правило, для разделения продуктов 50-1000 пн., используют 2% агарозный гель. Методика приготовления агарозного геля доступна в различных источниках научной литературы и протоколах производителей соответствующих реагентов. Помимо целевого ампликона, на агарозном геле могут наблюдаться дополнительные полосы - неспецифические продукты амплификации, которые впоследствии негативно скажутся на качестве сиквенса. В таком случае можно попытаться предпринять попытку вырезания фрагмента нужной длины из геля при помощи скальпеля и элюции из него образца набором реагентов для экстракции из геля. Если на агарозном геле не визуализируется ПЦР-продукт, следует скорректировать параметры ПЦР или провести повторный дизайн праймеров.



Рис. 4. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в агарозном геле, окрашенного бромистым этидием: 1-6, 8-10 - исследуемые образцы, 7 – маркер длин; 1-5, 8-10 – четкие полосы, успешная амплификация; 6 – свечение слабое, полоса размытая, наличие неспецифических продуктов (необходимо оптимизировать ПЦР).

4.2.7. Очистка продуктов амплификации

После успешной ПЦР-амплификации необходимо подготовить полученный ПЦР-продукт к секвенированию. Этот этап включает очистку ПЦР-продукта от остатков праймеров, dNTPs, солей и других примесей, присутствие которых может негативно повлиять на качество секвенирующей реакции, приводя к зашумлению сигнала и снижению точности определения последовательности. Существует несколько методов очистки ПЦР-продукта:

Ферментативная очистка: использование ферментов для удаления остатков праймеров и dNTPs. После обработки ферментами проводится их инактивация нагреванием.

Очистка с использованием магнитных частиц: метод основан на связывании ПЦР-продукта с магнитными частицами, отмывкой от примесей и элюцией чистого продукта.

Очистка с использованием колонок: пропускание ПЦР-продукта через колонку, содержащую сорбент, связывающий ДНК. После отмывки от примесей чистый ПЦР-продукт элюируют с колонки.

Осаждение этанолом: добавление этанола к ПЦР-продукту для осаждения ДНК, центрифугирование, удаление супернатанта и растворение осадка ДНК в буфере.

4.2.8. Секвенирующая реакция (цикл Сэнгера)

Реакция, аналогичная обычной ПЦР, но с добавлением дидезоксинуклеотидтрифосфатов (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddGTP и ddTTP), ddNTPs отличаются от обычных dNTPs отсутствием 3'-ОН группы, необходимой для образования фосфодиэфирной связи при синтезе ДНК. В качестве матрицы для проведения реакции секвенирования, используют очищенный ПЦР-продукт, а полученные фрагменты ДНК, меченные флуоресцентными красителями, затем разделяются и детектируются на автоматическом секвенаторе.

Подготовка образцов к реакции секвенирования включает смешивание очищенного ПЦР-продукта, секвенирующего праймера, ddNTPs, ДНК-полимеразы в определенной пропорции:

- очищенный ПЦР-продукт: количество, соответствующее рекомендованной концентрации (обычно 1-10 нг);
- секвенирующий праймер (прямой или обратный): количество праймера на пробу обычно составляет 5-10 пмоль. Важно использовать только один праймер (либо прямой, либо обратный) в каждой реакции секвенирования;
- BigDye Terminator или аналогичный набор для секвенирования: содержит ddNTPs, ДНК-полимеразу и буфер;

- деионизированная вода: для доведения объема реакционной смеси до требуемого; перемешать и кратковременно центрифугировать пробирку.

Режим термоциклирования аналогичен обычной ПЦР, но может быть оптимизирован для секвенирования. Например, руководство по секвенированию от ThermoFisher рекомендует следующий режим реакции секвенирования (Таблица 5):

Всегда используйте свежеприготовленные растворы и реактивы. Точно следуйте инструкциям производителей наборов реагентов. Избегайте контаминации образцов ДНК. Правильное соотношение компонентов в реакционной смеси обеспечивает эффективную и сбалансированную реакцию секвенирования.

Таблица 5

Типовой режим реакции секвенирования

Этап	Температура	Время
Денатурация	96°C	1'
Аmplификация: 25 циклов	96°C	10''
	50°C	5''
	60°C	4''

4.2.9. Очистка продуктов секвенирующей реакции

Проводится для удаления невстроенных терминаторов, свободных солей после реакции секвенирования. Очистку можно проводить следующими способами: осаждение этанолом; очистка с помощью *BigDye™ X Terminator™ Purification Kit*; очистка с помощью гель фильтрующих сред (например, Sephadex); очистка при помощи магнитных частиц.

4.2.10. Капиллярный электрофорез

Разделение полученных ДНК-фрагментов по размеру реализуется с помощью капиллярного электрофореза. ДНК-фрагменты перемещаются в капилляре под действием электрического поля. Скорость перемещения зависит от размера фрагмента, чем меньше фрагмент, тем быстрее он движется. Флуоресцентные красители, присоединенные к ddNTP, возбуждаются лазером, и излучаемый ими свет регистрируется детектором. Детектор определяет, какой нуклеотид (А, Т, G, С) находится на конце каждого фрагмента и строит электрофореграмму (хроматограмму). На качество процесса капиллярного электрофореза влияют следующие его параметры:

Напряжение: влияет на скорость перемещения фрагментов ДНК.

Ток: влияет на стабильность электрофореза.

Температура: предотвращает денатурацию ДНК.

Состав буфера: обеспечивает оптимальную ионную силу и pH.

Длина капилляра: определяет максимальную длину прочтения.

Тип полимера: влияет на разрешение и разделение фрагментов ДНК.

Во время работы секвенатора необходимо следить за его состоянием и контролировать параметры электрофореза и детекции: проверять отсутствие ошибок и сбоев в работе прибора, оценивать качество электрофореграмм в реальном времени, в случае возникновения проблем необходимо немедленно остановить процесс и принять меры по их устранению.

V. Анализ и интерпретация данных секвенирования по Сэнгеру

Анализ и интерпретация результатов секвенирования по Сэнгеру является важнейшим этапом, определяющим клиническую значимость полученной информации. Этот процесс требует системного подхода, сочетающего оценку качества данных, идентификацию генетических вариантов и их аннотацию, а также клиническую интерпретацию с учетом контекста заболевания и индивидуальных особенностей пациента. Точная и полная интерпретация данных секвенирования по Сэнгеру критически важна для постановки правильного диагноза, прогнозирования течения заболевания и определения оптимальной тактики лечения.

Одним из ключевых этапов интерпретации результатов секвенирования по Сэнгеру является идентификация генетических вариантов. Это предполагает точное определение различий между полученной последовательностью ДНК и референсной (эталонной) последовательностью, а также классификацию этих различий как вариантов с высокой клинической значимостью и доброкачественных вариантов. Анализ данных секвенирования по Сэнгеру включает следующие основные этапы:

проверка качества электрофореграмм: визуальная оценка электрофореграмм, высоты флуоресцентного сигнала, разрешения пиков и наличия артефактов. Критерии качества хроматограмм: четкие и хорошо разделенные пики, соответствующие каждому нуклеотиду; высокий уровень сигнала и отсутствие или низкий уровень шума; равномерная интенсивность сигнала по всей длине прочтения.

Выравнивание последовательностей: сравнение полученной последовательности с референсной (эталонной) последовательностью генома для определения степени соответствия и выявления различий (генетических вариантов). Выравнивание последовательностей проводят при помощи специального программного обеспечения. Например, *SeqScape software*, *Sequence Viewer software*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> и др.

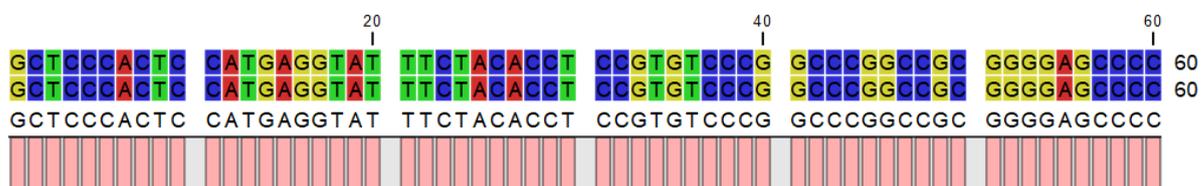


Рис.5. Пример выравнивания последовательности исследуемой ДНК с референсной последовательностью с помощью программы *Sequence Viewer software*.

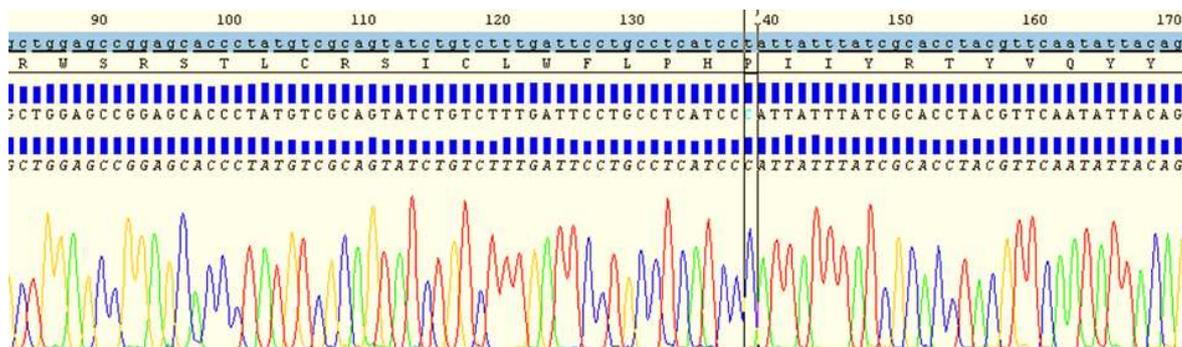


Рис.6. Пример выравнивания последовательности исследуемой ДНК с референсной последовательностью с помощью программы *SeqScape software*.

При анализе и выравнивании последовательностей необходимо учитывать версию референсной геномной сборки, номер транскрипта, используемого для аннотации выявленного варианта, который должен быть доступен в клинических базах данных или представлять собой наиболее длинный транскрипт. Ссылки на базы данных референсных последовательностей и транскриптов представлены в таблице 6:

Таблица 6

Базы данных референсных последовательностей и транскриптов

Наименование БД	Ссылка	Описание
RefSeq	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq	Содержит коллекцию референсных последовательностей геномов, транскриптов, белков эукариот, прокариот и вирусов
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html	Содержит информацию о геномах живых организмов, аннотирует гены, транскрипты
LRG	https://www.lrg-sequence.org	Содержит последовательности, охватывающие один ген (или локус). БД создана для унификации информации о генетических вариантах, обеспечивает общую систему идентификации для исследовательских центров, лабораторий по всему миру.
MitoMap	https://www.mitomap.org	содержит информацию о вариантах митохондриального генома человека, о их клинической значимости

Идентификация генетических вариантов: определение наличия генетических вариантов (однонуклеотидных замен, вставок, делеций и т.д.) путем сравнения полученной последовательности с референсной. Критерии, позволяющие судить о наличии генетического варианта в анализируемой последовательности:

- наличие пиков, отличающихся от референсной последовательности;
- воспроизводимость варианта при прочтении с прямого и обратного праймеров, при повторном секвенировании (в случае необходимости).

Точность выявления мутаций зависит от следующих факторов:

- качество электрофореграммы: высокий уровень сигнала, низкий уровень шума, четкое разрешение пиков;
- глубина прочтения: количество прочтений каждого нуклеотида (чем выше глубина, тем надежнее результат). Для секвенирования по Сенгеру это прочтение с прямого и обратного праймеров, в случае необходимости повторное секвенирование;
- наличие артефактов секвенирования, которые могут имитировать мутацию.

Важно тщательно проверять результаты, полученные с помощью программного обеспечения, так как они могут содержать ошибки, особенно в сложных участках последовательности (например, в областях с повторами или высокой степенью гомологии). Необходимо всегда визуально оценивать место замены, делеции или инсерции.

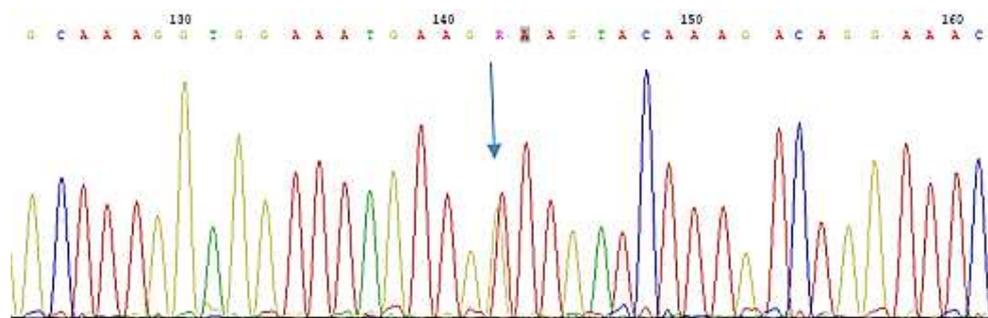


Рис. 7. Пример хроматограммы, демонстрирующий наличие однонуклеотидной замены A>G в гене *SOD1*.

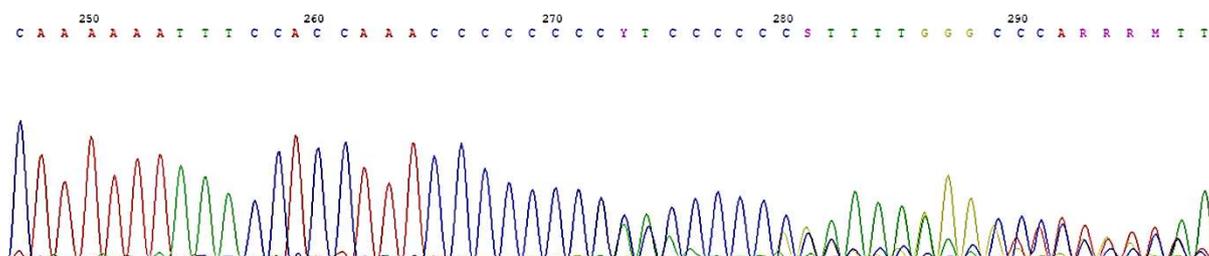


Рис.8. Пример хроматограммы, демонстрирующей наличие дупликации аллеля C в митохондриальной ДНК.

В таблице 7 представлена номенклатура буквенного обозначения нуклеотидных замен.

Таблица 7

Буква	Замены
R	G > A
Y	T > C
M	A > C
K	G > T
S	G > C
W	A > T

Аннотация вариантов: представляет собой процесс получение информации о выявленных вариантах из баз данных. В таблице 8 представлены базы данных и интернет-ресурсах для аннотации вариантов.

Таблица 8

Базы данных и интернет- ресурсы для аннотации генетических вариантов

Наименование БД	Ссылка	Описание
dbSNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/	содержит информацию об известных SNP и небольших инсерциях/делециях
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	содержит информацию о клинической значимости генетических вариантов (патогенный, вероятно патогенный, вариант с неопределенной значимостью и т.д.)
Franklin	https://franklin.genoox.com/clinical-db/home	содержит информацию о клинической значимости генетических вариантов (патогенный, вероятно патогенный, вариант с неопределенной значимостью и т.д.)
Varsome	https://varsome.com/	агрегатор данных из различных баз данных и онлайн-ресурсов, предоставляющий комплексную информацию о генетических вариантах

USCS	https://genome.ucsc.edu/	Геномный браузер, позволяет просматривать интересные регионы хромосом. Содержит информацию о генах, транскриптах, белковой последовательности
MitoMap	https://www.mitomap.org	содержит информацию о вариантах митохондриального генома человека, о их клинической значимости
OMIM	https://www.omim.org	содержит информацию о генетических заболеваниях и генах, связанных с ними
OncoBRCA	https://oncobrca.ru/	содержит информацию о частотах вариантов в генах системы репарации ДНК
PharmGKB	https://www.pharmgkb.org/	База данных о генетических вариантах, обуславливающих переносимость лекарственных препаратов
InterVar	https://wintervar.wglab.org/	программный инструмент, разработанный для клинической интерпретации генетических вариантов в соответствии с рекомендациями ACMG-AMP 2015 года
SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster	Инструменты предсказания влияния на белок in silico	позволяют прогнозировать влияние аминокислотных замен на структуру и функцию белка

Из баз данных можно получить информацию о функциональном значении варианта (кодирующая/некодирующая область, влияние на структуру и функцию белка); популяционной частоте варианта; клиническая значимость (патогенный, вероятно патогенный, неопределенной значимости и т.д.); ссылки на научные публикации.

Клиническая интерпретация: оценка клинической значимости выявленных генетических вариантов на основе данных литературы, баз данных и клинических рекомендаций. При клинической интерпретации генетического варианта необходимо учитывать рекомендации профессиональных сообществ (ACMG, AMP), интерпретация клинической значимости варианта должна быть основана на доказательной базе патогенности варианта или его потенциальной роли в фенотипе пациента. Современные стандарты предлагают заменить устаревшие термины «мутация» и «полиморфизм» на нейтральное понятие «генетический вариант». Выявленные изменения распределяются по пяти категориям:

Патогенный – вариант, который приводит к нарушению функции гена, с установленной клинической значимостью;

Вероятно патогенный – высокая вероятность (более 90%) того, что вариант является патогенным;

Неопределённой значимости – клиническая значимость не установлена;

Вероятно доброкачественный – высокая вероятность (более 90%), что вариант не является причиной заболевания;

Доброкачественный – не является причиной заболевания.

В процессе клинической интерпретации генетических вариантов, необходимо осуществлять фильтрацию: удалять заведомо доброкачественные варианты с высокой частотой в популяции; выносить в заключение варианты, соответствующие клиническому фенотипу пациента с высокой клинической значимостью; приоритетными являются варианты, затрагивающих функционально важные домены белка или консервативные аминокислоты.

Алгоритм интерпретации генетических вариантов должен быть следующим:

1. Поиск варианта в базах данных и литературе.
2. Оценка частоты в популяции.
3. Анализ функционального воздействия (in silico-программы).
4. Применение критериев ACMG (PVS1, PS, PM, PP, BA, BS, BP).
5. Формирование заключения с учётом клинической картины.

Для стандартизированного представления генетических вариантов используется номенклатура, разработанная Human Genome Variation Society (HGVS).

g. - геномная ДНК;

c. - кодирующая последовательность ДНК;

r. – РНК;

p. – белок;

Тип изменения:

del – делеция;

ins – вставка;

dup – дупликация;

inv – инверсия;

> - замена.

Цифрой обозначается положение, в котором произошло изменение нуклеотида или аминокислоты. Например:

c.76A>T - замена аденина на тимин в позиции 76 кодирующей последовательности;

p.Lys76Asn - замена лизина на аспарагин в позиции 76 белка;

g.123_125del - делеция нуклеотидов с 123 по 125 в геномной ДНК;

c.123_124insG - вставка нуклеотида гуанина между положениями 123 и 124 кодирующей последовательности.

Для определения изменений аминокислотных последовательностей используют круговую диаграмму кодонов генетического кода (рис. 9)

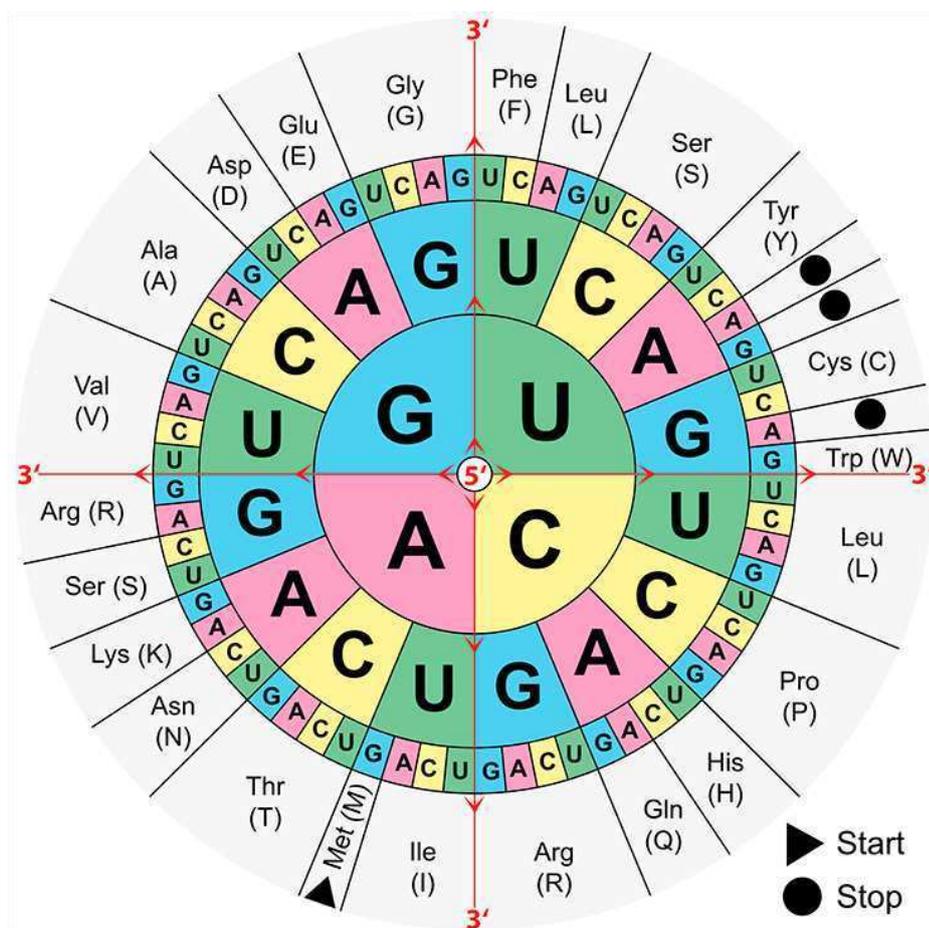


Рис.9. Круговая диаграмма кодонов генетического кода.

Особое внимание следует уделять анализу вариантов, расположенных в интронных областях генов и вблизи сайтов сплайсинга (границы экзонов и интронов). В поиске вариантов, нарушающих нормальный сплайсинг гена, могут быть использованы программы предсказания сайтов сплайсинга (например, SpliceAI или Human Splicing Finder). Варианты, расположенные далеко от экзонов, также могут влиять на сплайсинг гена, создавая новые сайты сплайсинга или нарушая регуляторные элементы. Для анализа таких вариантов могут потребоваться специальные методы (например, секвенирование РНК).

VI. Составление отчета (заключения)

Отчет должен быть понятным, лаконичным и содержать всю необходимую информацию для принятия клинических решений, а именно:

- информацию о пациенте;
- информацию о исследуемом варианте;
- методике исследования;
- результаты секвенирования (описание вариантов);
- интерпретацию результатов (клиническая значимость);
- рекомендации (дальнейшие исследования, генетическое консультирование);
- список литературы или указание на использованные БД;
- предупреждения и ограничения (например, ограничения метода);
- подпись ответственного лица (врач-лабораторные генетик или специалист с соответствующей квалификацией).

При составлении заключения важным остается вопрос: выносить ли в заключение варианты с неопределенной клинической значимостью? В заключение необходимо выносить информацию о вариантах с неопределенным значением (VUS) первой категории, если ген имеет отношение к клиническому вопросу, но не имеет достаточных доказательств патогенности. Информацию о таких вариантах необходимо выносить отдельно (например, в отдельной таблице) или ниже об информации о обнаруженных или не обнаруженных вариантах с высокой клинической значимостью. Пример заключения исследования методом секвенирования по Сэнгеру представлен в Приложении 1.

VII. Контроль качества

Надлежащий контроль качества (КК) является неотъемлемой частью процесса секвенирования по Сэнгеру, обеспечивая надежность и достоверность получаемых результатов. Система КК должна охватывать все этапы процесса, от подготовки образца до анализа данных и интерпретации результатов и даже составления заключения. Без эффективной системы КК, результаты секвенирования могут быть ненадежными, что может привести к неправильной диагностике и неверным клиническим решениям.

Общие принципы контроля качества:

стандартизация процедур: все этапы секвенирования должны быть четко описаны в стандартных операционных процедурах (СОП), которые должны строго соблюдаться. Стандартизация снижает вариабельность и обеспечивает воспроизводимость результатов.

Обучение и аттестация персонала: весь персонал, выполняющий секвенирование, должен быть обучен соответствующим процедурам и аттестован для выполнения этих процедур. Компетентный персонал является ключевым фактором для обеспечения качества результатов.

Ведение документации: необходимо вести подробную документацию обо всех этапах секвенирования, включая информацию об образцах, реактивах, оборудовании, параметрах анализа и результатах контроля качества. Документация позволяет отслеживать процесс секвенирования и выявлять причины проблем.

Регулярный аудит: необходимо регулярно проводить аудит системы КК для выявления слабых мест и внесения необходимых улучшений. Регулярный аудит обеспечивает постоянное совершенствование системы КК. Рекомендуется введение отдельной штатной единицы, сотрудника, который будет осуществлять КК на всех этапах секвенирования.

Контроль качества на этапе подготовки образца:

- перед проведением ПЦР необходимо оценить качество выделенной ДНК, включая концентрацию, чистоту и целостность (см. раздел 4.2.2);
- использование контрольных образцов - включение контрольных образцов (положительного и отрицательного контроля) в каждую серию выделения ДНК позволяет оценить эффективность и специфичность выделения;
- проверка целостности ДНК: оценка целостности ДНК при помощи электрофореза.

Контроль качества ПЦР-амплификации:

- использование контрольных образцов на этапе ПЦР позволяет выявить проблемы с реагентами, праймерами или температурными режимами;

- анализ ПЦР-продукта электрофорезом: проверка размера и количества ПЦР-продукта, отсутствия неспецифики.

Контроль качества секвенирования:

- одновременно с секвенированием исследуемых образцов рекомендуется проводить секвенирование контрольного образца. Обычно коммерческие наборы включают плазмиду pGEM и праймер M13F, но можно использовать любую стандартную матрицу ДНК известного количества, длины и высокого качества очистки. Наличие такого положительного контроля позволяет быстро понять, на каком этапе возникла проблема;
- первый этап оценки результата - это просмотр сырых данных секвенирования (RAW data), который позволяет провести первичную оценку сиквенса: отсутствие сигнала, наличие пузырьков краски, постепенное снижение сигнала, уровень «шума».
- тщательная визуальная оценка электрофореграмм для каждого образца - высота и разрешение пиков, равномерность сигнала, длина прочтения.

Контроль за прибором: проведение регулярной калибровки и обслуживания прибора.

Контроль температуры: температура в комнате секвенирования должна быть не выше 20°C, контроль температуры в холодильниках и морозильниках.

Необходимо вести подробную документацию обо всех результатах контроля качества на каждом этапе процесса секвенирования. Эта документация должна включать:

- даты проведения контроля;
- Ф.И.О. персонала, проводившего контроль;
- использованные реактивы и оборудование;
- результаты контроля (значения параметров, электрофореграммы и т.д.);
- действия, предпринятые в случае выявления отклонений от нормы.

Документирование результатов контроля качества позволяет отслеживать стабильность процесса секвенирования и выявлять тенденции к ухудшению качества.

VIII. Примеры электрофореграмм с описанием типичных артефактов и проблем

В данном разделе будут представлены наиболее типичные проблемы, возникающие на этапе секвенирования и пути их устранения. Визуальный анализ электрофореграмм является важным этапом контроля качества секвенирования по Сэнгеру. Распознавание типичных артефактов и проблем позволяет избежать ошибочной интерпретации результатов.

Пример 1: Качественная электрофореграмма

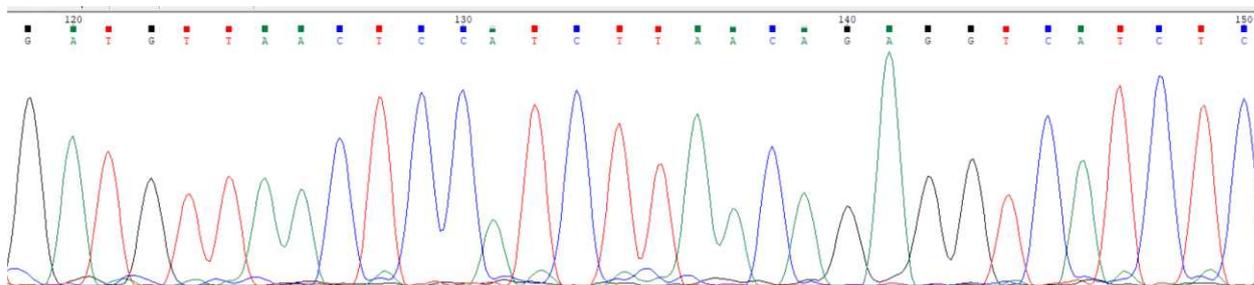


Рис.10. Пример качественной электрофореграммы с четкими хорошо разрешенными пиками, равномерным уровнем сигнала и отсутствием шума.

На данной электрофореграмме наблюдаются четкие, хорошо разрешенные пики, равномерный уровень сигнала и низкий уровень шума. Такая электрофореграмма указывает на высокое качество секвенирования и надежные результаты.

Пример 2: Электрофореграмма с низким уровнем сигнала

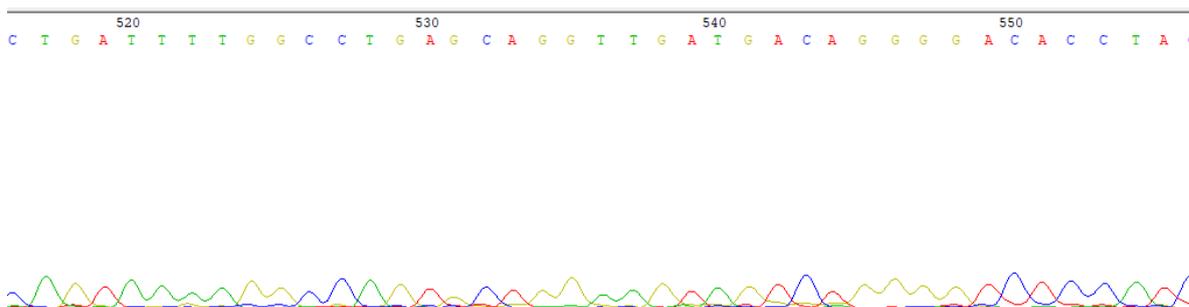


Рис.11. Пример электрофореграммы с низким уровнем сигнала.

На данной электрофореграмме наблюдается низкий уровень сигнала, что затрудняет идентификацию нуклеотидов. Это может быть вызвано низкой концентрацией ДНК, недостаточным количеством праймеров или другими проблемами. Если сиквенс гомогенный, то рекомендуется повторить капиллярный гель-электрофорез с другими

параметрами (вольтаж, время инъекции). Если это не помогло, необходимо оптимизировать параметры ПЦР, повторить секвенирование.

Пример 3: Электрофореграмма с высоким уровнем шума

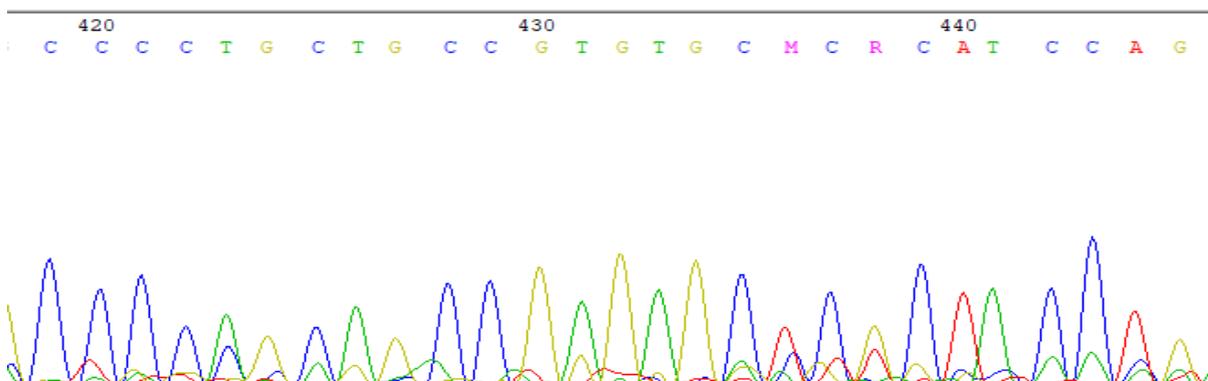


Рис.12. Электрофореграмма с высоким уровнем шума.

На данной электрофореграмме наблюдается высокий уровень шума, что затрудняет идентификацию нуклеотидов. Это может быть вызвано загрязнением образца, использованием некачественных реактивов или другими проблемами. Если высокий уровень шума наблюдается по всему сиквенсу, то причиной может служить перегруз матрицей. Решением проблемы может стать повторная инъекция с меньшим временем, либо разведение образцов в формамиде. Также причинами высокого уровня шума могут быть: неспецифическое связывание праймеров во время ПЦР или реакции секвенирования; образование нескольких ПЦР продуктов в ходе ПЦР; контаминация воды, реактивов. Устранить проблему можно оптимизировав ПЦР. Необходимо проверить качество праймеров, оптимизировать очистку после ПЦР, заменить реагенты при подозрении на контаминацию и повторить секвенирование.

Пример 4: Электрофореграмма с «плечами» на пиках

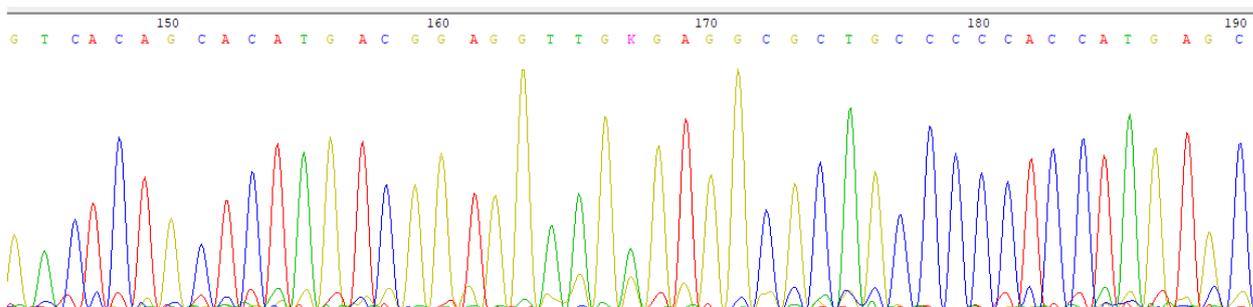


Рис.13. Электрофореграмма с «плечами» на пиках.

Причиной такого явления может быть наличие N-1 праймеров (может быть, стоит пояснить, что это такое?). Решением проблемы может послужить использование праймеров без N-1 артефакта, секвенирование с обратного праймера.

Пример 5: Электрофореграмма со снижением сигнала в конце прочтения

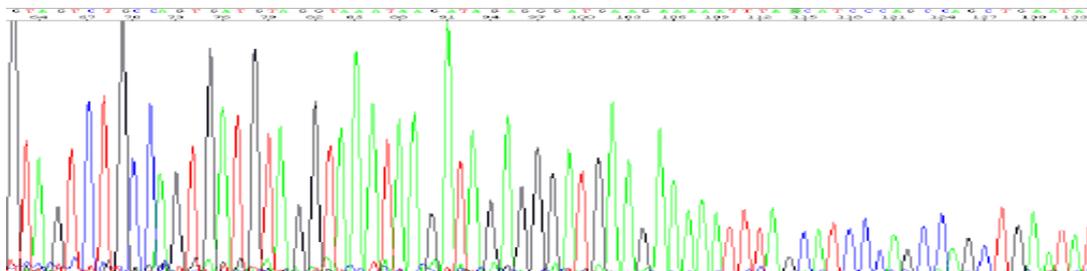


Рис.14. Электрофореграмма демонстрирующая снижение сигнала в конце прочтения (а здесь G – черного цвета).

На данной электрофореграмме наблюдается снижение сигнала к концу прочтения, что может быть вызвано деградацией ферментов, истощением реагентов. Еще одной причиной такого явления может служить перегруз ПЦР продукта в реакции секвенирования. Необходимо оптимизировать условия и повторить секвенирование.

Пример 6: Пузыри краски на электрофореграмме

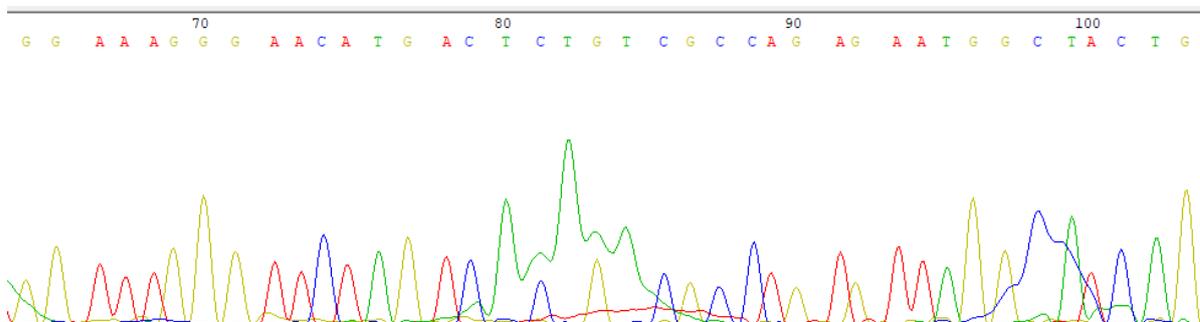


Рис.15. Электрофореграмма с пузырями краски при наличии сиквенса.

Причиной такого явления может быть неоптимальная очистка. Решение проблемы может заключаться в оптимизации метода очистки: например, во время преципитации удалять супернатант полностью. При очистке сефадексом – корректно вносить образец.

Пример 6: Наличие хвостов у пиков на электрофореграмме.

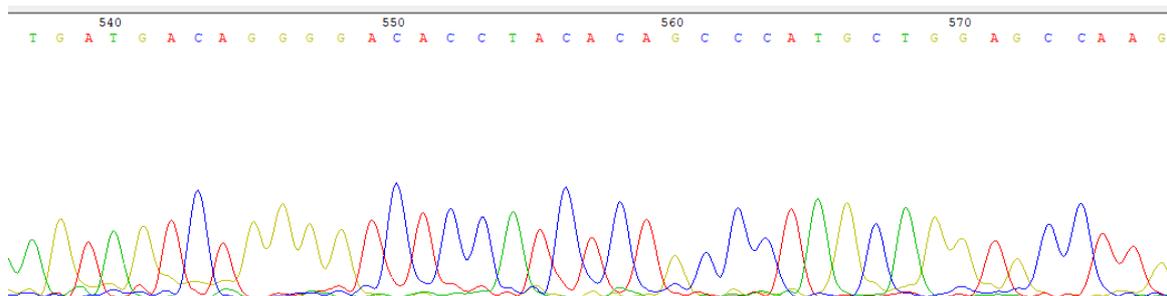


Рис. 16. Электрофореграмма, демонстрирующая наличие «хвостов» у пиков.

Наличие «хвостов» у пиков может служить сигналом изношенности капилляров. Также «хвосты» могут появляться и из-за изменений pH растворов, температуры или длительной экспозиции образца на свету.

Пример 7: Высокий уровень шума на электрофореграмме.

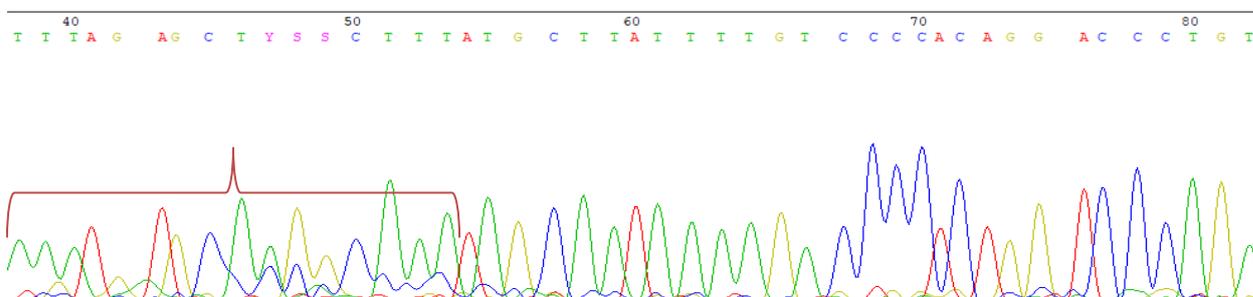


Рис.17. Электрофореграмма, демонстрирующая наличие высокого шума в начале сиквенса.

Причиной такого феномена может служить наличие праймер-димеров. Необходимо оптимизировать этап очистки после ПЦР.

Данные примеры иллюстрируют отдельные, наиболее часто встречающиеся артефакты секвенирования. На практике же электрофореграммы могут содержать различные комбинации артефактов, и для правильной интерпретации требуется опыт и наличие необходимых знаний процесса секвенирования.

Если вы секвенируете короткие фрагменты и необходимо четкое прочтение первых пятидесяти нуклеотидов, лучше использовать BigDye™ Terminator v1.1., так как терминатор BigDye™ Terminator v3.1 рассчитан на секвенирование более длинных фрагментов и при прочтении первые 50 нуклеотидов, как правило, нечитаемы.

Тщательно следуйте инструкциям производителя наборов и оборудования. Регулярно проводите техническое обслуживание оборудования. Ведите подробную документацию о всех этапах секвенирования и результатах контроля качества. При возникновении проблем обращайтесь за консультацией к опытным специалистам или в службу технической поддержки производителя оборудования.

IX. Серия клинических случаев из практики клинико-диагностической лаборатории

Клинически случай №1.

Пациентка М., 26 лет по национальности армянка, обратилась с жалобами на боли в животе, болями в суставах, периодическими приступами лихорадки неясного генеза. У ее сестры отмечались подобные симптомы. Пациентка была направлена на молекулярно-генетическое исследование 10 экзона гена *MEFV*, в результате которого был обнаружен вариант нуклеотидной последовательности с высокой клинической значимостью chr16: 3243310 (NM_000243.3):c.2177T>C (p.Val726Ala) rs28940579 в гетерозиготной форме.

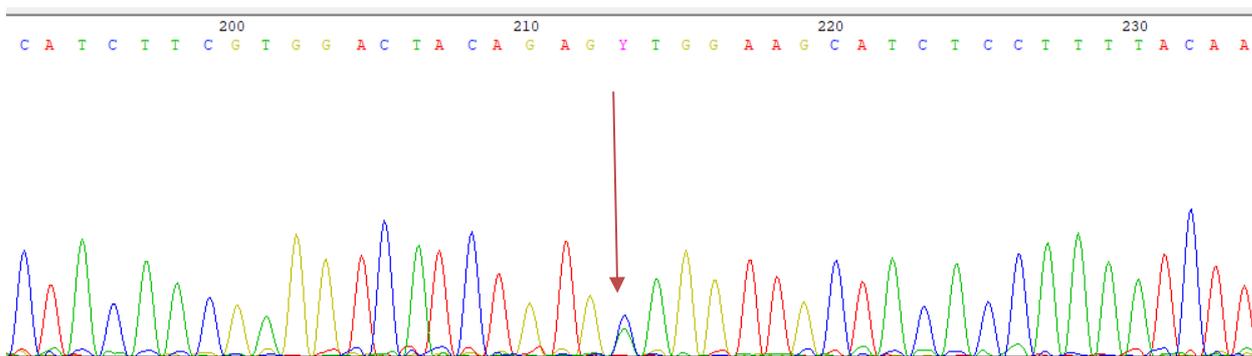


Рис. 18. Электрофореграмма сиквенса, демонстрирующая наличие варианта chr16: 3243310 (NM_000243.3):c.2177T>C (p.Val726Ala) rs28940579 в гетерозиготной форме.

Ген *MEFV* кодирует белок пирин (маренострин), который экспрессируется в белых кровяных клетках (нейтрофилах, эозинофилах и моноцитах), участвующих в регуляции воспалительных процессов иммунной системы. Патогенные и вероятно патогенные варианты гена *MEFV* ассоциированы с редким аутоиммунным заболеванием — периодической болезнью.

Клинически случай №2.

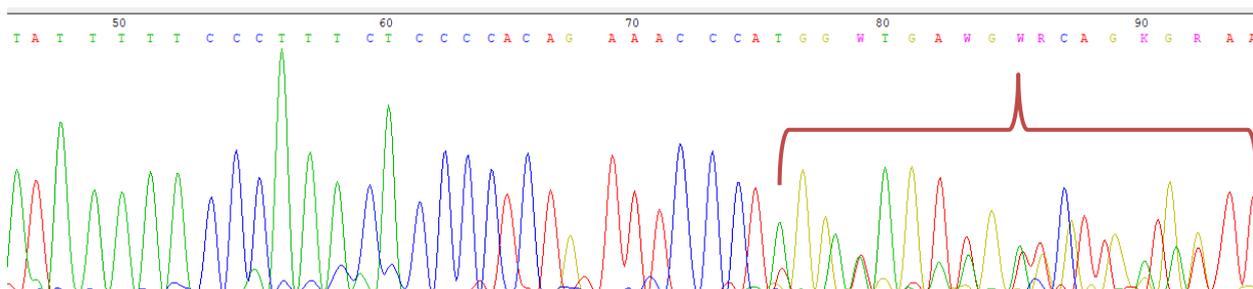
Пациент Г., 70 лет с диагнозом гастроинтестинальная стромальная опухоль (ГИСО) был направлен на молекулярно-генетическое исследование: поиск мутаций в 9,11,13,17 экзонах гена *KIT* и 12, 14, 18 экзонах гена *PDGFRA* (*PDGFRA* – так обозначается белок). Материалом для исследования послужила опухолевая ткань, заключенная в парафиновый блок. В ходе исследования в 11 экзоне гена *KIT* был обнаружен вариант нуклеотидной последовательности chr4: 54727424 (NM_000222.3): c.1657_1671del p.(Tyr553_Trp557del) в гетерозиготной форме. В международных базах данных Varsome, Franklin описан, как патогенный. В 12, 14, 18 экзонах гена *PDGFRA* вариантов с высокой клинической значимостью не обнаружено.

Согласно клиническим рекомендациям «Гастроинтестинальные стромальные опухоли», 2020 г. необходимо выполнять молекулярно-генетическое исследование мутаций

в генах *KIT* (экзоны 9, 11, 13, 17) и *PDGFRA* (12, 14, 18) в опухоли в биопсийном и/или операционном материале при негативных ИГХ исследованиях на экспрессию CD117 и/или DOG1. Анализ мутационного статуса имеет прогностическое и предиктивное значение при ГИСО. При выявлении вариантов с высокой клинической значимостью (патогенные/вероятно патогенные) в 9 экзоне гена *KIT*, пациентам рекомендована терапия иматинибом** в дозе 800 мг ежедневно для достижения ремиссии.

Наиболее высокая эффективность иматиниба** отмечена при ГИСО с мутациями в 11 экзоне ген *KIT* с частотой ответов на лечение до 70–85 % случаев. При выявлении мутаций в 9 экзоне гена *KIT*, а также при диком типом генов *KIT* и *PDGFRA* частота ответов на терапию иматинибом** составляет до 48–50%. При обнаружении мутаций в 13 и 17 экзонах гена *KIT* наблюдается отсутствие эффекта терапии иматинибом**. Варианты с высокой клинической значимостью в данных экзонах гена *KIT* в первичных опухолях встречаются крайне редко. Чаще они развиваются на фоне лечения ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) и приводят к развитию вторичной резистентности к препарату.

А) Прочтение с прямого праймера



Б) Прочтение с обратного праймера

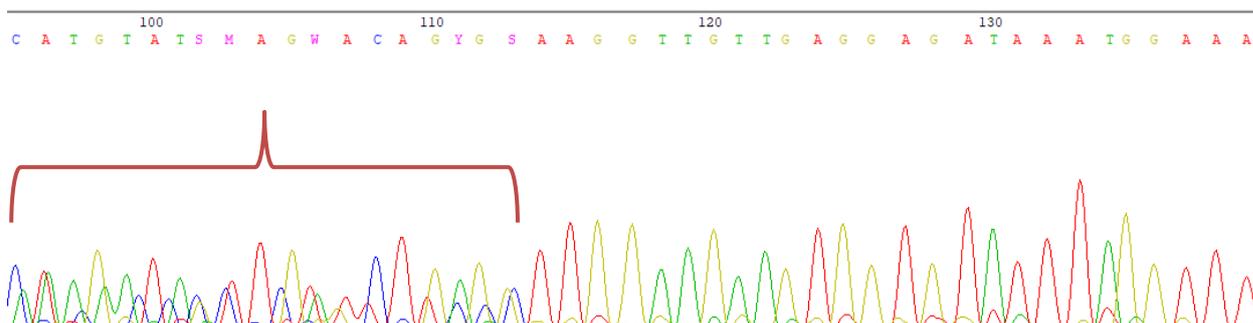


Рис.19. Электрофореграмма сиквенса, демонстрирующая наличие делеции в 11 экзоне гена *KIT*.

Клинический случай №3.

Пациент А., 58 лет. Диагноз по МКБ-10 С92.1 Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ). Было назначено исследование мутационного статуса химерного гена (?) *BCR-ABL1*. Согласно клиническим рекомендациям «Хронический миелоидный лейкоз», 2023 г.

мутационный статус BCR-ABL (имеется ввиду ген или белок?) целесообразно определять при дебюте ХМЛ в фазе акселерации и при бластном кризе. Также наличие мутаций тирозинкиназного домена гена (?) *BCR-ABL1* необходимо исследовать при неудаче терапии и перед сменой ИТК. В ходе молекулярно-генетического исследования образца костного мозга был обнаружен вариант с высокой клинической значимостью chr9: 130872896 (NM_005157.6):c.944C>T p.(Thr315Ile) rs121913459. Терапия ИТК первого и второго поколения (иматиниб**, nilотиниб**, дазатиниб**, бозутиниб**) малоэффективна при наличии варианта Т315I. В случае его наличия рекомендуются терапия ИТК третьего поколения - понатинибом.

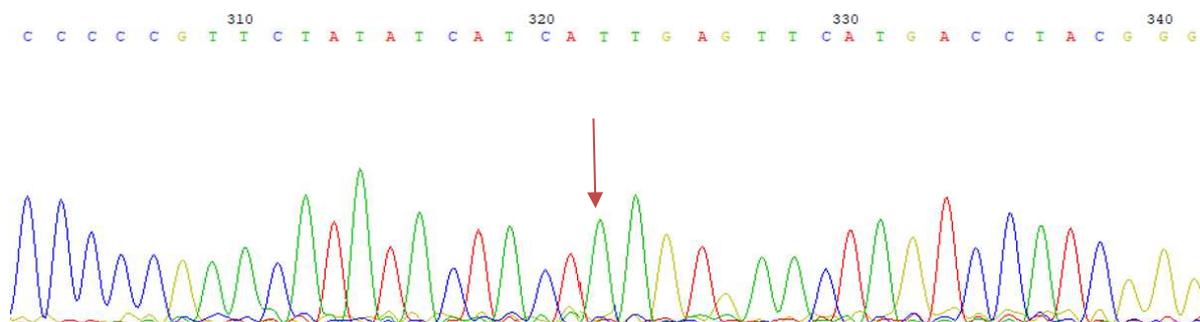


Рис.20. Электрофореграмма сиквенса, демонстрирующая наличие варианта chr9: 130872896 (NM_005157.6):c.944C>T p.(Thr315Ile) rs121913459 в гомозиготном состоянии.

Х. Источники литературы

1. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS>.
2. ACMG Board of Directors. Points to consider for genomic sequencing: A statement of the American College of Medical Genetics. *Genet Med.* 2012;14(8):759-761.
3. Applied Biosystems. ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer Troubleshooting Guide.
4. Applied Biosystems. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol.
5. Applied Biosystems. BigDye™ XTerminator™ Purification Kit Protocol.
6. Applied Biosystems. Nucleic Acid Purification Guide.
7. Baxevanis AD, Bader DS, Wishart DS. *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*. John Wiley & Sons; 2020.
8. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes related to common diseases: Designed for linkage or association? *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:228-237.
9. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rollo C, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. Single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Nature.* 1999;409(6822):995-1001.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Molecular Methods for Clinical Genetics and Genomics; Approved Guideline.* 3rd ed. CLSI guideline MM01. Wayne, PA: CLSI; 2012.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Quality Management System: Development and Implementation; Approved Guideline.* 4th ed. CLSI document QMS01-A4. Wayne, PA: CLSI; 2011.
12. Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA). 42 CFR Part 493.
13. Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L. New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science.* 1998;282(5389):682-689.
14. Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 2000;15(1):7-12.
15. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an easy way to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server issue):W641-W646.
16. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *Genome Res.* 1993;3(3):S30-S37.
17. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Applied Biosystems Chemistry Guide | Third Edition.

18. Durbin R, Eddy SR, Krogh A, Mitchison G. Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids. Cambridge University Press; 1998. (Принципы выравнивания последовательностей).
19. European Molecular Genetics Quality Network (EMQN). Best Practice Guidelines. <https://www.emqn.org/emqn-best-practice>.
20. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred.
21. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998; 8(3):175-185.
22. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. Genet Med. 2013;15(7):565-574.
23. Hanzlikova M, Pavlicek A, Doucha J, Hladil J, Zachova J. Sequence anomalies in capillary electrophoresis. Forensic Sci Int Genet. 2007 Nov 15;172(2-3):110-4.
24. Illustra MicroSpin columns Instruction. Cytiva.
25. Integrated DNA Technologies (IDT). Primer Design.
26. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-S Molkin RL, Voelkerding KV, Nikiforova MN. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017;19(3):341-365.
27. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: public archive of relationships between sequence variation and human phenotype. Nucleic Acids Res. 2016;44(D1):D862-D868.
28. Lesk AM. Introduction to Bioinformatics. Oxford University Press; 2019.
29. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, Nikiforova MN. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn 2017;19:4–23.
30. Manual for using the SeqScape software.
31. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010;11(1):31-46.
32. Mount DW. Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004. Lesk AM. Introduction to Bioinformatics. Oxford University Press; 2019.

33. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med.* 2013;15(9):733-747.
34. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med**. 2015;17(5):405-424.
35. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424.
36. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424.
37. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
38. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
39. Slater GS, Birney E. Large-scale population genomics using high-throughput sequencing. *Genome Res.* 2009;19(7):1081-1092.
40. Valenstein P, Meier FA, Coffman KE, et al. Analytical validation of clinical molecular diagnostic tests. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(11):1725-1732.
41. Westgard JO. *Basic QC Practices: Training in Statistical Quality Control for Medical Laboratories.* 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc; 2010.
42. Whittall EW, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnostic testing for heritable disorders. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(11):1260-1271.
43. Браун Т.А. Геномы / Пер. с англ. - М.-Ижевск: институт компьютерных исследований, 2011.-944с.
44. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В. и др. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора. *Биомика.* 2019, Том 11, № 1, с.23-70.
45. Клинические рекомендации «Гастроинтестинальные стромальные опухоли», 2020 г.
46. Клинические рекомендации. Хронический миелоидный лейкоз. 2023 г.
47. Латыпова М.Ф., Цибин А.Н., Комаров А.Г., Слуцкий Е.А. Бодунова Н.А., Данишевич А.М. Временное руководство по внедрению NGS-тестирования в

- практику клинико-диагностических лабораторий ДЗМ: методические рекомендации.-М.:ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2023.-145 с.
48. Методические указания МУ 1.3.2569 – 09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности.
 49. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 2 мая 2023 г. № 206н "Об утверждении Квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием".
 50. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР в реальном времени.-7-е изд.-М.: Лаборатория знаний, 2019.-223 с.
 51. Рекомендации по постановке ПЦР. Евроген.
 52. Спектор М.А., Ясько Л.А., Друй А.Е. Интерпретация соматических генетических вариантов, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования опухолевой ДНК, на примере онкологических заболеваний детского возраста. Медицинская генетика, 2021; 20(3): 3-25. DOI: 10.25557/2073-7998.2021.03.3-25.
 53. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю. Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных). Биомика. 2016, Том 8, № 3, 215-238.