

СПОСОБ ОБОГАЩЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ ВИРУСА ГРИППА ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНОМА С ПОМОЩЬЮ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Пимкина Е.В.¹, Сперанская А.С.¹, Девяткин А.А.^{1,2}, Черкашина А.С.^{1,2}, Судьина А.Е.¹, Минтаев Р.Р.¹, Маркелов М.Л.², Шипулин Г.А.¹

¹ ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБНУ «НИИ медицины труда», Москва, Россия

Современные технологии секвенирования позволяют осуществлять определение последовательностей геномов патогенных для человека вирусов напрямую из клинических образцов, минуя стадию культивирования. Как правило, в биологическом материале преобладают нуклеиновые кислоты организма-хозяина, в огромном массиве данных секвенирования на долю искомым микроорганизмов приходится единичные прочтения. Для повышения доли нуклеиновых кислот патогена в биологическом материале был использован метод обработки исходного материала бензоназой, которая является неспецифичной нуклеазой и способствует деградации ДНК и РНК. Вирусные нуклеиновые кислоты, в отличие от генетического материала организма-хозяина, экранированы капсидом и подвергаются разрушению ферментом в меньшей мере.

Клинический образец представлял собой бронхоальвеолярный смыв от пациента, заболевшего гриппом в январе 2016 года. Обработку клинического материала проводили на стадии, предшествующей лизису. Из обработанного и не обработанного бензоназой клинического материала выделяли РНК, затем путем постановки реакции обратной транскрипции получали кДНК в двух вариантах: в присутствии рассеянной затравки и с использованием специфических праймеров MBTuni12/MBTuni13, гомологичных консервативным фланкирующим участкам сегментов РНК вируса гриппа А [Zhou et al., 2009]. Секвенирование проводили с помощью MiSeq (Illumina). Коли-

чество прочтений, полученное для каждого из образцов, варьировало в диапазоне 28-61,5 тысячи. Увеличение процентного содержания целевых прочтений наблюдалось, если реакция обратной транскрипции проводилась с применением специфических праймеров MBTuni12/MBTuni13. В случае постановки реакции обратной транскрипции в присутствии случайной затравки представленность целевого материала была существенно ниже. Применение бензоназы значительно увеличило долю целевых прочтений (картирующихся на референсные последовательности штамма A/California/41/2009(H1N1)) в общем количестве прочтений (с 0,02% до 2,4% прочтений, приходящихся на образец). В результате была получена информация о 6938 из 13158 нуклеотидов последовательности генома вируса, находящегося в секвенируемом образце.

Заключение. В данной работе нами было показано, что обработка исходного материала бензоназой на стадии, предшествующей лизису, приводит к эффективному обогащению клинического материала вирусными нуклеиновыми кислотами. Нами был продемонстрирован метод подготовки библиотек вируса гриппа А, позволяющий повысить эффективность определения первичной нуклеотидной последовательности генома патогена, не прибегая к культивированию вирусологического материала.

Zhou et al., Journal of virology, Oct. 2009, p. 10309–10313, Vol. 83, No. 19.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ДАННЫХ ПРОЕКТОВ NGS ДЛЯ ПОИСКА РЕШЕНИЯ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОЙ ЗАДАЧИ ПО ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ДИКИХ КАБАНОВ И ДОМАШНИХ СВИНЕЙ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА SNP

Кипень В.Н.

ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

Введение. В экспертной практике ГУ «НПЦ Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь» (г. Минск, Республика Беларусь) за период 2015-2016 гг. было исследовано более 40 случаев незаконной добычи дикого кабана (*Sus scrofa*). Ущерб от незаконного извлечения одной взрослой особи животного из естественной среды обитания оценивается приблизительно в 1100\$ в эквиваленте. Несмотря на массовый отстрел дикого кабана в связи со вспышкой африканской чумы свиней в 2014 г. и сокращение общего поголовья данного вида более чем на 80%, численность дикого кабана в 2016 г. в некоторых охотничьих угодьях Республики Беларусь приближается к показателям эпидемического периода.

Юридическая квалификация правонарушения будет зависеть от решения экспертной задачи по диффе-

ренциации дикого кабана (*Sus scrofa*) от его ближайшего сородича – домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*). В Республике Беларусь распространены следующие породы домашней свиньи: крупная белая, белорусская черно-пестрая, белорусская мясная, дюрок, ландрас, йоркшир, пьетрен и др. Крупная белая свинья, а также созданные на ее основе заводские типы доминируют в племенном поголовье – на их долю в Республике Беларусь приходится более 92% всех особей вида, в Российской Федерации – не менее 85%.

На данный момент в экспертной практике задача по дифференциации дикого кабана от домашней свиньи может быть решена двумя способами: 1) анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в белоккодирующих генах, полиморфизм в которых напрямую связан с фенотипом

животных – MC1R [1], NR6A1 [2]; 2) совокупный анализ большого количества видоспецифичных STR-локусов и математический аппарат для корректной интерпретации результатов генотипирования с отнесением особи к той или иной группе с определенной долей вероятности на основании Байесовского вывода [3, 4].

Цель и задачи. Целью данного исследования являлся поиск видоспецифичных SNP для дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) относительно домашних свиней (*Sus scrofa domestica*) в SRA-данных по полногеномному секвенированию (NGS), размещенных в открытом доступе на облачном сервисе DNAnexus (<http://sra.dnexus.com/>). Поисковой основой служили ранее опубликованные результаты исследования [5], полученные с использованием SNP-чипа «PorcineSNP60» (Illumina).

Материалы и методы. Анализ был выполнен с помощью алгоритма SRA Nucleotide BLAST и программы BioEdit v.7.2.5. Количество включенных в анализ SNP – 193; число полногеномных прочтений для дикого кабана – 24, для коммерческих пород домашних свиней (крупная белая, ландрас, дюрок, пьетрен, мейшань) – 91.

Основные результаты. После уточнения результатов, полученных в проведенном нами ранее исследовании [6], из 193 SNP было обнаружено 16 видоспецифичных, т.е. встречающихся только среди представителей дикого кабана, аллелей (по данным [5] – 28). Таким образом, из изначально предложенных [5] 193 SNP 8,3% способны дифференцировать дикого кабана от крупной белой свиньи, а также от таких пород домашней свиньи, как дюрок, пьетрен, ландрас, йоркшир и мейшань. Также были определены частоты специфичной аллели, которые варьировали в широком диапазоне: от 4,2% для ALGA0058492 до 39,1% в случае ALGA0099936. Для еще двух видоспецифичных полиморфных вариантов – H3GA0051814 и H3GA0051811 – частота специфичной аллели была более 80%. Таким образом, анализ нуклеотидной последовательности в диапазоне X:58911107-X:60656889 – цель дополнительного исследования.

Выводы. Проведен крупномасштабный анализ результатов полногеномного секвенирования для дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и его разновидности – домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*). Проанализировано

более 2 Тб «сырых» данных. Из предложенных в [5] 193 SNP отобраны 16, обладающие дифференцирующей способностью для решения задачи по различению образцов дикого кабана и домашней свиньи. Полученные результаты предстоит проверить на практике ввиду возможного наличия межпопуляционных различий по частоте распространённости того или иного SNP.

Использованная литература

1. Fajardo, V. Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes / Fajardo V., González I., Martín I. [et al.] // Meat Sci. 2008 Mar; 78(3): 314-22. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.06.018.

2. Fontanesi, L. Differentiation of meat from European wild boars and domestic pigs using polymorphisms in the MC1R and NR6A1 genes / Fontanesi L., Ribani A., Scotti E. [et al.] // Meat Sci. 2014 Dec; 98(4): 781-4. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.07.026.

3. Conyers, C.M. Development of a microsatellite-based method for the differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) from domestic pig breeds (*Sus scrofa domestica*) in food / Conyers C.M., Allnutt TR, Hird HJ [et al.] // J Agric Food Chem. 2012 Apr 4; 60(13): 3341-7. doi: 10.1021/jf205109b.

4. Rębała, K. STR Profiling for Discrimination between Wild and Domestic Swine Specimens and between Main Breeds of Domestic Pigs Reared in Belarus / Rębała K., Rabtsava A.A., Kotova S.A. [et al.] // PLoS One. 2016 Nov 16; 11(11): e0166563. doi: 10.1371/journal.pone.0166563.

5. Ramos, A.M Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing / Ramos A.M., Megens H.J., Crooijmans R.P. [et al.] // Anim Genet. 2011 Dec; 42(6): 613-20. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02198.x.

6. Кипень, В.Н. Анализ полногеномных SRA-данных проектов NGS для решения криминалистической задачи дифференциации диких кабанов и домашних свиней на основе уникальных SNP / Кипень В.Н., Котова С.А. // 4-я Всероссийская научно-практическая конференция по геномному секвенированию «Геномное секвенирование – 2016», Москва, 2016, с. 21.

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ – НОВЫЙ ПУТЬ К ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Карпова И.Ю.

ООО «Рош Диагностика Рус»

Современные клинические исследования все больше и больше становятся ориентированными на анализ генома человека, полиморфизмов и мутаций в нем, ассоциированных с заболеваниями. На данный момент, несмотря на постоянное удешевление методов секвенирования, в том числе и нового поколения, секвенирование полного генома для большинства задач все равно представляется избыточным и дорогостоящим, в том числе и с точки зрения анализа и хранения полученных данных.

Известно, что большинство мутаций, вызывающих заболевания, расположены в кодирующих областях гено-

ма, т.е. в экзоне, поэтому имеет смысл их искать именно в нем. Зачастую бывает достаточным проанализировать только определенные регионы генома или гены-маркеры, ассоциированные с заболеванием.

Выявление специфических регионов генома (генов-маркеров) и мутаций в них является ключом к пониманию заболевания. Для этой цели необходимо проведение обогащения образца ДНК предполагаемыми генами-маркерами, ассоциированными с заболеваниями, или экзомом и последующее направленное секвенирование этих областей генома.