

Масс-спектрометрическая детекция генных вариантов: возможности ее применения в геномике

Чухловин А.Б.

*Научно-образовательный центр «Лабораторная медицина»,
Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова
Санкт-Петербург, Российская Федерация*

Введение

Современная молекулярная биология использует ряд стандартных методов диагностики и идентификации организмов по сходству и различиям их нуклеотидных последовательностей. Базовыми методиками здесь являются полимеразная цепная реакция (ПЦР) с анализом полученных продуктов и классическая гибридизация с ДНК-зондами (в настоящее время – технологии биочипов или microarrays).

Анализ последовательностей оснований в генных фрагментах можно также проводить различными методами, среди которых особенно часто используют секвенирование по Сэнджеру. Этот метод считается «золотым стандартом» определения последовательности нуклеотидов в составе ДНК.

Детекция и идентификация известных специфических продуктов ПЦР могут проводиться и другими способами, среди которых все большее внимание уделяется масс-спектрометрическому анализу.

С физической точки зрения, любой масс-спектрометр состоит из трех функциональных блоков: 1) источника ионов, где происходит ионизация анализируемого вещества (например, лучом лазера) и его испарение в газовую среду; 2) анализатора масс, где происходит разделение ионов по их массе/заряду, и 3) детектора частиц (ионов), который регистрирует их последовательную регистрацию. Кроме того, каждый современный масс-спектрометр содержит систему для обработки и хранения информации, поступающей с детектора, статистической оценки результатов и их сравнения с соответствующими стандартными образцами, в том числе – встроенными базами данных.

Таким образом, масс-спектрометрия основана на оценке характеристического соотношения «масса-заряд» конкретных биологических молекул, находящихся в составе исследуемого образца.

Ранние методы масс-спектрометрии были пригодны, главным образом, для выявления малых молекул (жирных кислот, сахаров, молекул лекарственных препаратов и т.п.). Однако за последние 20 лет разработаны и усовершенствованы методики «мягкой» ионизации, к которым относится

MALDI (лазерная десорбция/ионизация с матрицы), а также ESI (ионизация с электрораспылением). Мягкий вариант ионизации обеспечивает интактность более крупных молекул, и, например, дает возможность высокоточного анализа пептидов с определением их состава. Аналогичным образом можно проводить и анализ нуклеотидных цепочек изучаемых генов.

MassARRAY® Genetic Analysis System



Применение метода MALDI-TOF в сочетании с автоматизированной обработкой информации получаемых сигналов легло в основу эффективных аналитических систем (платформ) для выявления сложных молекул (например, полинуклеотидов) в больших количествах образцов. Так, Leushner, Chiu (2000) сообщили о разработке аналитической платформы MassArray (фирма Sequenom). Эта система состоит из миниатюрных двумерных биочипов, для получения фрагментов генов. Их последующая детекция и идентификация осуществляются с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Для исследования требуются нанолитровые объемы биоматериала, а определение проводится в большом числе отдельных ячеек, что обеспечивает высокую производительность метода.

Наибольший спрос на высокопроизводительные методы генотипирования наблюдается в медицинской и сельскохозяйственной генетике, что обусловлено задачами множественного анализа генных вариантов и полиморфизмов. Проблема состоит в том, что за последнее десятилетие стало известно большое число индивидуальных генных вариантов в геноме человека и других живых организмов. Подобные генные полиморфизмы обычно представляют собой замены, делеции, вставки нуклеотидов или небольших участков генома. Эти генные варианты ранее выявляли методом обычной или мультиплексной ПЦР с последующей их идентификацией методом электрофореза. Довольно часто полученные ПЦР-продукты обрабатывают рестриктазами с дополнительным анализом генных фрагментов. Все это требовало времени и дополнительного персонала.

Так, уже через 10 лет после завершения первичной расшифровки проекта «Геном человека» выявлено более 7 млн. полиморфных генных сайтов. Некоторые из этих маркеров могут быть связаны с риском развития тех или иных заболеваний человека. Доказать это можно только при обследовании больших выборок и/или большого числа генных вариантов.

Таким образом, возникла нужда в повышении производительности генотипирования.

1. Внедрение систем для секвенирования – автоматического анализа нуклеотидных последовательностей – привело к значительному сокращению сроков и стоимости выявления генных вариантов. Классический метод секвенирования продуктов ПЦР основан на серийном

микроэлектрофорезе с выдачей сиквенсов (последовательностей) нуклеотидов в автоматическом режиме.

2. Микрочипы (microarrays), среди которых наиболее известна платформа Affimetrix, дающие возможность обнаруживать в образцах нуклеиновых кислот известные генные варианты путем гибридизации со специфическими ДНК-зондами
3. Для тех же целей разработаны системы с гибридизацией в суспензиях - системы Bio-Plex (фирма Bio-Rad) и ряд аналогичных устройств. Обычно эти методики применяют на начальном этапе крупных полногеномных исследований для общей оценки генетического разнообразия в данной популяции. Из них производят отбор для более точной характеристики конкретных генных вариантов на следующем этапе.
4. Наконец, в последние годы стала возможной детекция специфических генных фрагментов с помощью масс-спектрометрии с применением методики MALDI-TOF. В частности, система iPLEX Gold (фирма Sequenom) считается точной и быстрой технологией для генотипирования однонуклеотидных генных полиморфизмов (полиморфных вариантов генов). Платформа для генотипирования MassARRAY включает в себя систему для полимеразной цепной реакции и масс-спектрометрическую установку для разделения генных продуктов по их массе и заряду. Система iPLEX Gold ранее уже применялась для генотипирования во многих исследованиях в режиме мультиплексной ПЦР (до 40 ОНП одновременно), что позволяет проводить высокопроизводительный анализ полинуклеотидов значительной протяженности.

Целью настоящей статьи является краткий обзор научных и практических приложений MALDI-TOF, главным образом – с применением систем Sequenom, для решения прикладных задач молекулярной генетики. Работа основана на анализе ряда научных публикаций последних лет, обнаруженных в открытом доступе (базы данных PubMed, PMC).

MALDI-TOF в детекции генных полиморфизмов (ОНП) и медицинской генетике

За последнее десятилетие в медицинской и сельскохозяйственной генетике появился большой спрос на высокопроизводительные методы генотипирования, в особенности – мультиплексные методы анализа генных вариантов и полиморфизмов.

Универсальным способом выявления множества специфических генных мутаций и ОНП стали микрочипы (microarrays), среди которых наиболее известна платформа Affimetrix, дающие возможность обнаруживать в образцах нуклеиновых кислот известные генные варианты путем гибридизации со специфическими ДНК-зондами.



Для тех же целей разработаны системы с гибридизацией в суспензиях - системы Bio-Plex (фирма Bio-Rad) или Illumina. Обычно эти методики применяют на начальном этапе крупных полногеномных исследований для общей оценки генетического разнообразия в данной популяции. Из них производят отбор для более точной характеристики конкретных генных вариантов на следующем этапе.

Наконец, в последние годы стала возможной детекция специфических генных фрагментов с помощью масс-спектрометрии с применением методики MALDI-TOF. В частности, система iPLEX Gold (фирма Sequenom) считается точной и быстрой технологией для генотипирования однонуклеотидных генных полиморфизмов (полиморфных вариантов генов) при полногеномном поиске генетических ассоциаций, а также для рутинного тестирования индивидуальных сочетаний ОНП в геноме. Платформа для генотипирования MassARRAY включает в себя систему для полимеразной цепной реакции и масс-спектрометрическую установку для разделения генных продуктов по их массе и заряду. Система iPLEX Gold ранее уже применялась для генотипирования во многих исследованиях в режиме мультиплексной ПЦР (до 40 ОНП одновременно), что позволяет проводить высокопроизводительный анализ.

Методы масс-спектрометрии в последнее время внедряются даже в такой традиционной отрасли, как определение групп крови. Как известно, групповые антигены уже на протяжении 100 лет выявляют с помощью иммунологических тестов, хотя различия между антигенными вариантами, по сути, отражают конкретные генные полиморфизмы. Поэтому метод MALDI-TOF оказался достаточно эффективным для детекции множественных эритроцитарных маркеров (Gassner et al., 2013). В данной работе описаны результаты швейцарско-немецкого проекта, направленного на применение масс-спектрометрии для определения групп крови Rh, Kell, Kidd, Duffy, и других, более редких антигенов эритроцитов а также тромбоцитарных и гранулоцитарных антигенов HPA и HNA. В сумме изучали более 100 групповых антигенов, по 170 информативным аллелям. Авторы характеризуют эту технологию как достаточно быструю, точную и рентабельную (при больших объемах исследований) в таких областях, как судебная медицина, фармакогенетика, онкология и гематология. Особый интерес в этом плане представляет выявление малых количеств антиген-специфических генов, например – в крови беременных женщин для оценки риска их возможной иммунизации антигенами плода.

Некоторые другие примеры использования систем Sequenom для исследования ОНП в медицинской генетике перечислены в таблице 2.

Таблица. 2. Генотипирование ОНП с применением MALDI-TOF

Объект исследования	Какие гены (SNP)	Число маркеров	Размер выборки	Система генотипирования	Результат	Ссылка
Больные с ВИЧ-инфекцией и контрольная	IL10, IL19, IL20, IL24,	104 ОНП	204 –ВИЧ-позитивные, 106 – группа	GoldenGate assay (Illumina) и iPLEX (Sequenom)	Ассоциации ВИЧ-инфекции с ОНП в	Shrestha et al., 2010

группа	IL10R		сравнения	MassARRAY)	IL10RB и IL20	
Больные с хронической обструктивной болезнью легких	Гены н-АХР локуса 15q24	2 ОНП в гене субъединицы н-АХР	ХОБЛ – 653, группа сравнения 1226-	Технология iPLEX, MassARRAY Compact	Ассоциация ОНП rs1051730 и rs8034191 со снижением легочной функции	Mohamed Hoesein et al., 2013
Новорожденные дети с респираторным дистресс-синдромом (РДС)	Ген АТФ-зависимого транспортера А3 ABCA3	8 ОНП	95 детей с РДС и 108 здоровых новорожденных	MassARRAY system (Sequenom)	Связь минорного аллеля rs323043 с РДС	Jiang et al., 2012
Дети с различными математическими способностями	Полногеномный поиск	43 ОНП	2449 детей 10-летнего возраста	GeneChip arrays (Affimetrix) MassARRAY system iPlex Gold (Sequenom) (validation)	10 ОНП коррелировали с МС, при отсутствии моногенных влияний	Docherty et al., 2010
Больные шизофренией	Полногеномный поиск	198 ОНП	1396 больных и 1803 – контроль	Sequenom MassARRAY genotyping platform	rs4757144 в гене ARNTL и rs8057927 в CDH13	Borglum et al., 2013
Женщины в возрасте до менопаузы (Китай)	Полногеномный поиск	317,759 ОНП	17438 женщин	Illumina Infinium Sentrix HumanHap550 chip.	Выявлены 23 ОНП, ассоциированные с возрастом менархе и менопаузы	He et al., 2009
Женщины со снижением овариальных функций (Китай)	22 гена	41 ОНП в 22 генах-кандидатах	371 пробанд, 800 – контрольная группа	Sequenom MassARRAY iPLEX	Выявлены 3 ОНП, связанные с патологией в <i>ESR1</i> , <i>HK3</i> и <i>BRSK1</i>	Quin et al., 2012
Женщины и мужчины с различным индексом массы тела	<i>NEGRI</i> , <i>TMEM18</i> , <i>MTCH2</i> , <i>FTO</i> , <i>MC4R</i> , <i>SH2B1</i> , <i>KCTD15</i>	7 ОНП в 7 генах	12462 человека	MassARRAY с применением iPLEX Gold	Показана связь ОНП в <i>FTO</i> , <i>SH2B1</i> и повышения индекса массы тела	Holzappel et al., 2012
Родные и сводные братья и сестры с избыточной массой тела (Индия)	<i>ADAM30</i> , <i>CXCR4</i> , <i>FOXA2</i> , <i>NOTCH2</i> , <i>PPARG</i> etc	25 локусов, ассоциированные с диабетом типа 2	2528 пар sibсов	Sequenom Mass Array	Связь <i>CXCR4</i> (rs932206) and <i>HHEX</i> (rs5015480) с повышением массы тела	Gupta et al., 2013

Болезнь Крона в популяции евреев-ашкенази	Полногеномный поиск	175 генных маркеров в финальном анализе	907 больных и 2345 лиц контрольной группы	Платформы Affymetrix and Illumina, а также Sequenom iPLEX	Выявлены 12 локусов сцепления с БК	Kenny et al., 2012
Болезнь Кавасаки (БК) в китайской популяции	Полногеномный поиск	74 ОНП в финальном анализе	458 больных и 812 – группа контроля	Affymetrix, Sequenom MassARRAY	Найдены 3 новых локуса, сцепленных с БК	Tsai et al., 2011
Подростки с идиопатическим сколиозом (ИС, Китай)	Область гена <i>LBS1</i>	3 биаллельных ОНП	513 больных, 440 – контрольная группа	MassArray system (Sequenom)	Подтверждена связь rs11190870, rs625039 and rs11598564 с ИС у подростков	Gao et al., 2013
Женщины с физиологической беременностью (Китай)	Ген рецептора мелатонина на <i>MTNR1B</i>	4 ОНП	1985 беременных женщин	ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer и система Sequenom	Подтверждена связь всех 4 ОНП со сниженной толерантностью к глюкозе.	Liao et al., 2012
Лица с близорукостью (Китай)	Локус <i>MYP6</i> (22q12)	25 ОНП из 4 генов-кандидатов,	658 лиц с миопией и 655 – контроль	MassARRAY iPLEX GOLD	ОНП rs2009066 <i>CRYBA4</i> связан с миопией	Ho et al., 2012
Транспортеры органических анионов (напр., статинов), Германия	Гены <i>SLCO1B1</i> , <i>SLCO1B3</i> , <i>SLCO2B1</i>	109 ОНП	143 образца печеночной ткани	MassARRAY Compact (Sequenom) или TaqMan-ПЦР	ОНП rs2306283 гена <i>SLCO1B1</i> связан с повышенной продукцией OATP1B1	Nies et al., 2013
Экспрессия IL-6 – связь с ОНП гена <i>PARK2</i> при лепре, вьетнамская популяция	Ген <i>PARK2</i>	31 ОНП	56 больных лепрой и контроль	SEQUENOM MassARRAY, (iPLEX) or Illumina (GoldenGate)	Синтез MCP-1/CCL2 и IL-6 зависит от <i>PARK2</i> -фактора предрасположенности к лепре	de Leseleuc et al., 2013
Больные с инсультом (Китай)	Ген параоксоназы	11 ОНП гена <i>PONI</i>	498 больных и 508-контроль	Sequenom MassARRAY, iPLEX Gold	Связь ОНП rs705381 с ишемическим инсультом	Zhang et al., 2013
Дети с малым весом при	21 ген, связанных с	37 ОНП	319 детей с нормальным весом и	MassARRAY и iPLEX, Sequenom	Для 27 ОНП из 14 генов показана	Han et al., 2013

рождении и с возрастом	ожирением		228- с низкой массой		связь с повышением индекса массы тела	
Больные с тиками (Китай),	Ген триптофангидроксилазы	2 ОНП гена <i>TPH2</i>	149 детей с тиками, 125 детей контрольной группы	Sequenom® Mass ARRAY iPLEX GOLD	ОНП rs4565946 и rs4570625 <i>TPH2</i> могут быть связаны с развитием тиков.	Zheng et al., 2013
Программа изучения сердечно-сосудистого риска (Финляндия)	Ген циклооксигеназы-2	19 ОНП гена <i>COX2</i>	2442 пробанда	Illumina Human 670 k BeadChip	Возможная связь 2 ОНП <i>COX-2</i> с эластичностью артерий	Lähteelä et al., 2012
Участники программы по влиянию загрязнений воздуха (Швейцария)	Полногеномный поиск	Уточняющее генотипирование 2 ОНП <i>CRISP2</i> , <i>PARK2</i>	3320 пробандов	Исходно Illumina, Human 610quad BeadChip, доп.- iPLEX Gold MassARRAY SEQUENOM	Связь ОНП в 2 генах со снижением внешнего дыхания	Curjuric et al., 2012

Приложения масс-спектрометрии ДНК в онкологии



Определение соматических мутаций, характерных для отдельных видов солидных и системных новообразований в последнее время начало входить в стандарты диагностики и лечения, особенно при лейкозах, лимфомах. Те или иные соматические мутации могут определять прогноз заболевания (риск быстрой прогрессии и развития рецидивов), а также вероятность ответа на специфическую антибластомную терапию (цитостатики, стероидные гормоны, ингибиторы онкогенных белков, рецепторов). Наибольшее внимание

специалистов по солидным опухолям сейчас привлечено к молекулярной диагностике рака бронхов и рака молочной железы, которые относятся к числу наиболее часто возникающих злокачественных новообразований. В частности, стандартная гистологическая диагностика рака бронхов теперь дополнена рядом молекулярных маркеров опухолевых клеток, от которых зависит ответ на специфическое лечение (Pao et al., 2009). Так, клетки аденокарциномы бронхов имеют разнообразные нарушения генома (соматические мутации), что позволяет дополнительно проводить генодиагностику в плане применения тех или иных видов терапии. Например, есть опухоли, чувствительные к

препаратам-ингибиторам тирозинкиназы EGFR (гефитинибу или эрлотинибу). При этом наблюдается хороший клинический эффект от их введения больным. Такие опухоли имеют характерные мутации в экзонах, кодирующих тирозинкиназный сегмент гена EGFR. Если же опухолевые клетки имеют другие мутации (например – гена KRAS), то эффекта от применения ингибиторов ТК не будет.

Для диагностики соматических мутаций ДНК в опухолевых клетках применяется весь арсенал молекулярно-биологических методов (см. введение). Обнаружение соматических мутаций в злокачественных клетках может проводиться разными способами, в частности, на гистологических препаратах (метод FISH), что, однако, требует хорошего качества препарата. Исследование нуклеиновых кислот, экстрагированных из опухоли, с помощью аллель-специфической ПЦР является эффективным методом диагностики точечных замен нуклеотидов. Однако генные мутации раковых клеток весьма разнообразны, и требуется анализ большого числа ПЦР-продуктов. Частично проблема решается с помощью различных гибридизационных методов (биочипов, или *microarrays*), которые дают прекрасные результаты при серийных исследованиях генной экспрессии. Однако здесь есть технические препятствия, не позволяющие достигать высокой точности индивидуальной диагностики.

Поэтому сейчас внедряются высокопроизводительные диагностические платформы, которые позволяют анализировать большой спектр соматических мутаций при различных видах злокачественных новообразований (Pao et al., 2009). Так, испытывались мультиплексные системы типа SNaPshot (Applied Biosystems) с применением капиллярного электрофореза для выявления мутаций в 58 различных локусах 13 онкогенов, а также мутации генов EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2, PIK3CA с детекцией 37 мутаций в 7 генах методом масс-спектрометрии (Sequenom MassARRAY). Для генетического анализа здесь пригодна не только нативная ткань, но и образцы ДНК, экстрагированные из парафиновых блоков.

Специальные исследования посвящены роли качества ДНК для оценки результатов масс-спектрометрии. Так, значительное внимание привлечено к возможности мутационного анализа ДНК в «музейных» образцах, фиксированных для гистологических исследований (Kotorashvili et al., 2012). Авторам удалось оптимизировать методику экстракции нуклеиновых кислот из тканей, фиксированных формалином и заключенных в парафиновые блоки с применением реагента TRIzol. Авторы оценивали выход и качество выделенных ДНК и РНК, в том числе экспрессию множеств микро-РНК и мРНК с применением технологии Illumina (гибридизация на микрочастицах с проточным анализом). Уровни метилирования ДНК определяли после обработки бисульфитом, после чего осуществляли ПЦР с применением специального набора праймеров подобранных с помощью электронных баз данных, включая R MassArray statistical package. Получение и анализ ПЦР-продуктов с целью оценки уровня метилирования проводили на системе MassArray EpiTYPER с применением нуклеотид-специфического специфического расщепления и последующей идентификации продуктов посредством масс-спектрометрии MALDI-TOF и прилагаемого ПО MassArray Statistical package (Thompson et al., 2009).

Таким образом, масс-спектрометрия сейчас начала широко применяться для оценки спектра соматических мутаций и эпигеномных модификаций. В одном из недавних исследований, проведенных в Институте Дана Фарбер (США), была создана диагностическая панель с целью проведения серийного скрининга больных онкологического профиля, показавшая хорошую клинико-диагностическую эффективность. В процессе работы было обследовано более 1000 образцов раковых тканей (17 типов злокачественных новообразований). В 30% случаев были выявлены известные, патогенетически значимые мутации, а также ранее не известные генные мутации. Клинические важные (с точки зрения специфического лечения) мутации EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) были найдены в 9% опухолей (Thomas et al., 2000). В дальнейшем эта диагностическая платформа была расширена для выявления 400 и более мутаций в >30 онкогенов и антионкогенов в сотнях клинических образцов, из которых в >35% случаев была обнаружена, по крайней мере, одна клинически значимая мутация (McConaill et al., 2009). В настоящее время фирма Sequenom предлагает специализированные диагностические панели для детекции соматических мутаций в тканях злокачественных опухолей, а именно, OncoCarta™, MelaCarta™ и LungCarta™. Некоторые из доступных из литературы исследований, касающихся анализа соматических мутаций и других генетических изменений в опухолевых тканях, приведены в таблице 3



Таблица 3 Примеры использования систем Sequenom для исследования ОНП и мутаций в онкологии

Объект исследования	Какие гены (SNP)	Число маркеров	Размер выборки	Система генотипирования	Результат	Ссылка
Опухолевые ткани рака толстого кишечника (РТК, многоцентр.) клеточные линии	19 онкогенов	238 соматических генных мутаций	239 образцов рака толстого кишечника 39 метастазов	OncoCarta, Sequenom	Метод выявляет мутации KRAS, PIK3CA, BRAF и других генов	Fumagalli et al., 2010
Больные раком толстого кишечника (РТК, Китай)	<i>ANGPT1, AMOT, DLL4, ENG</i>	7 ОНП	408 больных	Sequenom iPLEX	Связь ОНП rs1954727 в <i>ANGPT1</i> с длительностью жизни больных	Dai et al., 2012
Больные раком толстого кишечника (РТК, Китай)	ОНП в различных локусах	11 ОНП (кровь, ДНК)	229 больных и 269 – контроль	MassArray SNP	Ассоциация с РТК по 4 из 111 ОНП	Li et al., 2012
Больные	Гены	5 ОНП	81 пациент	MassArray	<i>ОНП</i>	Yoon et

рак пищевода (США-Канада)	репарации ДНК (кровь)			System, Sequenom	<i>XRCCI399Gln</i> связан с ответом на терапию	al., 2011
Больные назофарингеальной карциномой (Китай)	Гены <i>GABBR1</i> , <i>HLA-A</i> , <i>HCG9</i> (локусы 6p)	233 ОНП	360 больных НФК и 360 здоровых лиц	MassARRAY Sequenom	Риск НФК связан со снижением экспрессии <i>GABBR1</i> <i>NEDD9</i>	Li et al., 2011
Больные меланомой (Греция)	<i>SLC45A2</i> , <i>IRF4</i> , <i>CDK10</i> , <i>MC1R</i> , <i>MC1R</i> , <i>PIGU</i> , <i>PIGU</i> , <i>MTAP</i>	ДНК крови, 8 ОНП	284 больных и 284 - контроль	Sequenom iPLEX	ОНП в <i>CLPTM1L</i> <i>SCL45A2</i> и <i>MC1R</i> влияют на риск развития меланомы	Stefanaki et al. (2013)
Больные раком бронхов (Китай)	11 генов различных микроРНК	24 ОНП	100 больных и 100 – контрольная группа	Масс-спектрометрия Sequenom	ОНП <i>rs636832A > G AGO1</i> связан со сниженным риском развития рака бронхов	Kim et al., 2010
Больные глиомой (Швеция)	Гены <i>EGF</i> <i>VEGF</i> и их рецепторов	191 ОНП	725 больных и 1610 – контроль	Sequenom iPLEX	1 из гаплотипов <i>EGFR</i> связан с риском глиобластомы	Anderson et al., 2010
Больные хроническим лимфолейкозом (Германия)	<i>DAPK1</i> , экспрессия	4 ОНП гена <i>DAPK1</i> , Оценка метилирования ДНК	303 пациента с ХЛЛ	iPLEX Gold (Sequenom), MassARRAY, ПЦР в реальном времени	Связь ОНП <i>DAPK1</i> с локальным метилированием	Wei et al., 2013
Больные раком молочной железы (РМЖ, многоцентр)	Локус предрасположенности к РМЖ 6q22.33	ОНП <i>rs2180341</i> (6q22.33)	31428 случаев РМЖ, 34700 – контрольная группа	MassARRAY и iPLEX technology, Sequenom	Общее слабое влияние локуса 6q22.33 на риск РМЖ	Kirchhoff et al., 2012
Больные раком молочной железы (РМЖ, многоцентр.)	Гены <i>EGFR</i> , <i>HRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>PIK3CA</i> и др.	238 мутаций в 19 онкогенах	Образцы тканей РМЖ (39) и метастазов (72)	OncoCarta® Panel Assay v1.0 Sequenom Inc.	Дизрегуляция в генной экспрессии, особенно <i>HER3</i> , мутации других онкогенов	DaSilva et al., 2010
Больные раком	Полногеномное	185561 повторов	214 с рецидивам	Affymetrix, Genome-Wide	Корреляция и числа	Sapkota et al., 2013

молочной железы, лейкоциты крови (Канада)	генотипи рование числа генокопи й	генов	и РМЖ, 155 – без рецидивов	Human SNP Array 6.0, валидация- TaqMan, Sequenom iPLEX	повторов с риском развития метастазов	
Больные РМЖ с разными вариантами BRCA (семейные случаи)	Мультиг енный анализ метирир ования	10 генов	33 образца тканей РМЖ+ 47 образцов доп.серии	Affymetrix/Medl P, колич.ПЦР, пиросеквениро вание, MassARRAY Sequenom т	Интеграци я данных по экспрессии числу копий и ОНП	Flanagan et al., 2010
Больные РМЖ (Северная Европа)	Мутации гена p53	ОНП rs1860746 гена PRKAG2 (3- й интрон)	6,127 больных РМЖ и 5,197 - контроль	MassARRAY Sequenom, TaqMan (AppliedBiosyste ms)	Локус rs1860746 сможет регулирова ть связывание p53	Liu et al., 2009
Больные РМЖ – носители мутации гена BRCA2 *6174delT (европейская выборка)	Полноге номный поиск	592163 ОНП, отобрано 79 генов для этапа 2	899 больных и 804 здоровых контролей	Affymetrix, Sequenom iPLEX	Некоторые ОНП могут влиять на пенетрантн ость гена BRCA2	Gaudet et al., 2010
Больные раком яичников (РЯ, Австралия)	Полимор физм гена VEGF	4 ОНП	319 женщин с РЯ	Sequenom MassARRAY	ОНП rs833068 или rs2010963 связаны с выживаемо стью	Lose et al., 2010
Больные раком простаты (РП, популяция евреев)	Различн ые хромо сомные локусы	29 ОНП, ассоцирова нных с РП	ДНК крови, 798 больных РП	Mass ARRAY QGE iPLEX (Sequenom)	3 ОНП в области KLK2- KLK3 связаны с выживаемо стью при РП	Gallagher et al., 2010

Определение полиморфизмов в фармакогеномике



Фармакогенетика является перспективным направлением медицинских исследований, которое изучает влияние генетических факторов на лекарственные эффекты и, в частности - на риск серьезных побочных реакций, которые наблюдаются достаточно часто даже при использовании «обычных» лекарственных средств. Известно, что действие каждого

лекарственного препарата зависит от комплекса факторов ADME (абсорбции и распределения молекул препарата в тканях, его метаболизма и экскреции). Исследование вариантов генов, определяющих факторы ADME в отношении конкретных препаратов, является задачей фармакогеномики. Учет этих факторов, в том числе, и генетических особенностей конкретного пациента, важен для правильного выбора и своевременной коррекции лечения – одной из основ персонализированной медицины. В фармакогеномике наиболее часто изучают гены семейства цитохромов P450 (CYP450). Основное место продукции CYP – клетки печени. Среди функций CYP450 - метаболизм различных соединений (в том числе лекарственных препаратов), поступающих из кишечного тракта и находящихся в кровотоке (Середенин...). Химическая модификация этих соединений молекулы под влиянием этих цитохромов чаще всего приводит к их активации. Многие гены CYP450 генетически полиморфны, что ведет к различному уровню продукции белка-цитохрома. Это и определяет индивидуальные различия в ответе больных. В плане анализа генетического разнообразия системы CYP450 представляет интерес статья Falzoi et al. (2010).

Другое типичное исследование подобного рода состоит в определении известных полиморфных вариантов генов, контролирующих транспорт, метаболизм и экскрецию того или иного препарата («фармакогенов»), в плане модификации их терапевтических эффектов у данного пациента или группы обследуемых лиц. Такие исследования требуют генотипирования многих полиморфных участков в нескольких генах – мультиплексного анализа с высокой точностью и производительностью. Выявление клинически значимых вариантов фармакогенов возможно, например, с помощью гибридизации на биочипах (microarrays) высокой плотности, которые дают информацию о множестве ОНП в изучаемых фармакогенах. Если надо определить небольшое число генных вариантов, то достаточно провести мультиплексную ПЦР в реальном режиме времени.

Сочетание мультиплексной ПЦР с последующей масс-спектрометрической детекцией дает возможность диагностики. В рамках системы MALDI-TOF Sequenom предложена диагностическая панель iPLEX® ADME PGx для генотипирования и скрининга генетических вариантов, которые могут влиять на абсорбцию, распределение, метаболизм и экскрецию (ADME) различных препаратов и, что важно, других чужеродных веществ. В этой диагностической панели одновременно анализируются 192 клинически значимых фармакогенетических маркера в 36 генах с применением единого набора реагентов и программных продуктов для анализа данных, полученных в системе MassARRAY. Список маркеров для панели iPLEX ADME PGx характерен тем, что он покрывает более 99% генотипов, принятых за основу рабочей группой Pharma ADME. Эта группа, представляющий фарминдустрию и ученых, дает обоснованные рекомендации по тем варибельным генам, которые могут быть использованы для разработки и тестирования новых препаратов.

Эти 192 ключевых биомаркера ADME представляют собой фармакологически значимые замены (ОНП), вставки, делеции нуклеотидов и варианты копийности в геноме человека. Как видно из таблицы 4, список изучаемых фармакогенов содержит гены лекарственной резистентности, большую группу генов цитохрома P450 (CYP), контролирующих метаболизм препаратов, а также гены детоксикации различных биомолекул (GST, UGT) и лекарств, варианты генов, кодирующих транспортеры нейромедиаторов и др.

Таблица 4. Гены, входящие в состав iPLEX ADME

ABCB1	CYP2E1	SLC22A2
ABCC2	CYP3A4	SLC22A6
ABCG2	CYP3A5	SLCO1B1
COMT	DPYD	SLCO1B3
CYP1A1	GSTM1	SLCO2B1
CYP1A2	GSTP1	SULT1A1
CYP2A6	GSTT1	TPMT
CYP2B6	GSTT2	UGT1A1
CYP2C19	NAT1	UGT2B15
CYP2C8	NAT2	UGT2B17
CYP2C9	SLC15A2	UGT2B7
CYP2D6	SLC22A1	VKORC1

Таблица 5. Применение масс-спектрометрии для анализа фармакогенов в клинических условиях

Объект исследования	Какие гены (SNP)	Число маркеров	Размер выборки	Система генотипирования	Результат	Ссылка
Больные раком простаты (РП), леченные анти андрогенами (Тайвань)	CYP19A1, AKR1C3 и др. гены обмена стероидов	18 ОНП в 12 генах	645 пациентов	Sequenom iPLEX	Связь между AKR1C3 rs12529 и CAG-повторами гена AR и смертность ю от РП	Yu et al., 2012
Больные, леченные такролимусом после трансплантации почек (США)	Гены CYP3A4, CYP3A5, CYP2C19, NR1/2, ABCB1,	95 ОНП, в т.ч. 51 в NR1/2 и 40 в CYP3A4	527 пациентов	Скрининг: Affymetrix DMET™ Plus, валидация: MassARRAY® iPLEX Gold	Связь уровней такролимуса в крови с ОНП CYP3A5 rs776746 и другими ОНП этого гена	Birdwell et al., 2012
Больные раком молочной железы (РМЖ)	CYP2D6, CYP2C19	33 ОНП	492 больных	Affymetrix AmpliChip CYP450, MALDI-TOF (Sequenom)	Выявление генотипов CYP2D6, с целью персонализации	Schroth et al., 2010

					лечения	
Молодые пациенты с артериальной гипертензией (Тайвань)	Полногеномный поиск генов, связанных с повышением ACE	Валидация: 8 ОНП в ACE и 1 ОНП в ABO	1023 пациента	Биочипы Illumina Infinium II, Фаза 2: Sequenom MassARRAY	Связь между 2 ОНП гена ACE, 1 ОНП гена ABO и активностью ACE	Chung et al., 2010
Женщины и дети в регионах с высоким уровнем мышьяка	Эпигеномные исследования факторов чувствительности к мышьяку	8 ОНП в гене AS3MT (10q24),	230 человек разных возрастов	Эпигеном: Illumina HumanMethylation4 BeadChip ОНП в AS3MT: Sequenom	Связь гаплотипов AS3MT с метилированием соседних генов	Engstrom et al., 2013

Задачи и методы генетической систематики в микробиологии

Исследования внутри- и межвидового родства микроорганизмов были и являются одной из главных задач молекулярной биологии с первых лет ее развития. В литературе есть обзорные работы о современных подходах к решению задач классификации микроорганизмов, от классических подходов до современных методов протеомики и геномики (напр. Sauer and Kliem, 2010). Классические методы представляют собой достаточно длительные и трудоемкие методики анализа фенотипических характеристик (внешний вид микробных клеток, их метаболические свойства и др.). Эти стандартные методы идентификации микроорганизмов до сих пор успешно применяют в лабораториях. Так, наборы биохимических тестов позволяют успешно (но далеко не всегда) дифференцировать отдельные штаммы микробов. Иммунохимическая (антигенная) диагностика, чаще всего – иммуноферментный анализ – отличается высокой специфичностью, но и сравнительно высокой стоимостью.

Однако фенотип бактерий может значительно различаться в зависимости от условий культуры и других внешних факторов.

Поэтому анализ микробных генов как наиболее стабильных структур клетки, за последние десятилетия приобретает все большую популярность. Обычно для проведения генетической классификации микроорганизма(ов) проводится ПЦР конкретного фрагмента ДНК, выделенной из чистой бактериальной культуры (например – 18S РНК или специфических генов), после чего проводят секвенирование амплифицированного участка гена и сравнение с аналогичными фрагментами генома многих других организмов, опубликованными в общедоступных базах данных (процедура BLAST, сайт www.ncbi.nlm.nih.gov). В целях классификации иногда применяют и так называемый пульс-электрофорез. Эти методические подходы, особенно автоматизированное

секвенирование, имеют свои несомненные достоинства и недостатки, в частности – значительную трудоемкость и затратность.

В связи с этим в последнее время разработаны новые подходы к идентификации микроорганизмов. Одним из них является масс-спектрометрия в варианте MALDI-TOF, позволяющая дифференцировать значительные по длине фрагменты нуклеиновых кислот.

Так, этот метод применяется для секвенирования нуклеиновых кислот хорошо изученных генов, будучи хорошей альтернативой обычного секвенирования ДНК. МС сейчас стали применять в целях дифференциации бактерий на уровне отдельных видов и подвидов. Это важно, в первую очередь, для эпидемиологических исследований клинически актуальных микроорганизмов. Помимо «стандартных» генов, в МС-анализ иногда включают и области повторов в бактериальных геномах (так называемых VNTRs), которые также имеют видовые особенности у разных организмов. Для подобных исследований разработан так называемый метод iSeq, разработанный компанией Sequenom, основанный на анализе и сравнении участков РНК, полученных из конкретных участков генома. Регистрация этих молекул проводится с помощью линейного MALDI-масс-спектрометра по тому же принципу, как это делается при анализе масс пептидов. Интересно, что исследования РНК методом MALDI часто более эффективны, нежели детекция ДНК, ввиду большей сохранности структуры РНК при ионизации. В методике iSeq используются оба уровня праймер-опосредованной амплификации (экспоненциальная ПЦР и затем – линейная амплификация/транскрипция), что повышает аналитическую специфичность и чувствительность. Действительно, совпадение результатов секвенирования по классическому методу Сэнджера и iSeq составляет около 99% (Honisch et al., 2007).

Соответственно, выявление и идентификация продуктов ПЦР может быть основана и на методах ESI (электрораспыления пробы) с последующей масс-спектрометрией. В настоящее время для точной характеристики микроорганизмов применяют комбинированный подход, состоящий в мультилокусной ПЦР конкретных участков бактериального генома и последующем анализе нуклеотидного состава посредством масс-спектрометрии. Этот прием позволяет различать большое разнообразие клинически значимых микробов, а также выявлять специфические факторы вирулентности и чувствительности к антибиотикам (Ecker et al., 2009).

Таблица 6. Примеры использования систем Sequenom для исследования ОНП в микробиологии

Объект исследования	Какие гены (SNP)	Число маркеров	Размер выборки	Система генотипирования	Результат	Ссылка
Mycobacterium tuberculosis:	16 генов, опероны mce1, mce4,	12 SNP	112 клин. Штаммов	Sequenom MassARRAY	Связь с антиб.резистентностью	Pasricha et al., 2011
Вирус JC	Ген VP1	6 SNP	19 клин.образцов	SpectroCHIP, Maldi TOF – сравнение с методом Sanger	Секвенирование MALDI TOF в 2х эффективнее метода Sanger	Bayliss et al., 2009
Стрептококк группы А, серотип М3	Полногеномный анализ	288 биаллельных ОНП	95 штаммов	iPLEXTM Gold +MassArray	Возможность дифференцировать клоны по набору ОНП	Beres et al.,
<i>Yersinia pestis</i>	Полногеномный поиск, филогенетический анализ	933 ОНП	286 изолятов	Sequenom MassARRAY	Первичный очаг эпидемий – в районе Китая	Morelli et al., 2010

Поиск генетических критериев в промышленной селекции животных и рыб



По мере автоматизации генотипирования, в частности, с помощью масс-спектрометрии, оценка генетического сходства и различий по наборам ОНП стала широко внедряться и в сельском хозяйстве. Генетическая идентификация отдельных особей важна для установления родословных, контроля скрещивания, выявления места происхождения животных и в судебно-медицинских целях. В одном из таких исследований проводилось сравнение панели на 60 ОНП и диагностического набора из 20 микросателлитных маркеров с применением технологии Sequenom (Rohrer et al, 2007). В работе показано, что панель на базе ОНП была несколько эффективнее, чем микросателлитный анализ, при исключении отцовства и/или материнства и существенно превосходила его при идентификации отдельных животных. Тесты установления родителей проводятся на стандартизированной панели ОНП еще на ранней стадии развития плода. Это важно, поскольку любая задержка ответа приводит к значительным дополнительным расходам заказчиков. После внедрения более быстрых методик, такое скрининговое исследование занимает меньше недели. Малые сроки выполнения анализа, применение готовых реагентов и эффективная система генотипирования делает

iPLEX® Gold удобным методом для широкомасштабного скрининга (Табл. 7). Многие специализированные лаборатории сейчас применяют этот подход для рутинного скрининга больших партий овец, крупного рогатого скота, свиней, рыб и др., принося значительную экономическую выгоду фермерам и селекционным компаниям.

Таблица 7. Примеры использования масс-спектрометрии в селекции животных

Объект исследования	Какие гены (SNP)	Число маркеров	Размер выборки	Система генотипирования	Результат	Ссылка
Крупный рогатый скот (быки, США)	Рецессивные летальные аллели	Гаплотип JH1 (73 маркера)	5288 джерсийских быков	Illumina HiSeq 2000, валидация ОНП – Sequenom	Нонсенс-мутация в CWC15, влияющая на фертильность	Sonstegard et al., 2013
Домашние свиньи (Норвегия)	Совокупность РНК-транскриптов из печени	5 генов с наибольшей экспрессией	58 животных	Количественная экспрессия генов: MassARRAY, протокол iPLEX (Sequenom)	Определены гены, влияющие на синтез и обмен андростенона в печени	Moe et al., 2008
Скакковые лошади	Ген миостатина <i>MSTN</i>	6 ОНП гена <i>MSTN</i>	178 животных в 3 группах	Секвенирование: AB 3730x1, генотипирование: Sequenom iPlex	ОНП g.66493737 C/T связан со скоростью и выносливостью	Hill et al., 2010
Порода лососевых рыб Brook Charr (Канада)	Локусы количественных признаков	256 ОНП, 40 групп сцепления	Гибридные особи 10 семейств	Валидация ОНП: iPlex Gold и Sequenom MassARRAY	Связь 8 групп сцепления с гормональным фоном	Sauvage et al., 2012
Атлантический лосось (Канада)	Совокупность генных маркеров	388 ОНП и 8 микросателлитных участков	265 особей (1980-2000 гг.)	iPlex Gold, MassARRAY (Sequenom)	Генетические различия, связанные с нарушениями адаптивной регуляции	Bourret et al., 2011
Атлантический лосось (США, Канада, Швеция)	Совокупность генных маркеров	261 ОНП и 70 VNTR-маркеров	3 популяции по 16 особей	Генотипирование: Sequenom iPLEX Gold, MassARRAY	Генетические критерии контроля селекции рыб	Vasemagi et al., 2012

Систематизация и селекция сельскохозяйственных растений



Вопросы происхождения и родства отдельных видов и подвидов растений имеют большое значение для их уточненной классификации и оценки результатов сельскохозяйственной селекции. Для этого необходимо иметь достаточно большие наборы соответствующих генных маркеров. В частности, Jones et al. (2007) использовали различные методы детекции ОНП в 58 инбредных и 4 гибридных линиях кукурузы по 80 генным маркерам на предмет их информативности и воспроизводимости результатов, как в гибридных особях, так и в пулах геномных ДНК. Отрабатывали 2 различных методических подхода: детекцию ПЦР-продуктов посредством MALDI-TOF (Sequenom MassARRAY), и технику инвазивного расщепления на базе ПЦР (Invader). 64 ОНП совпадали при типировании обоими методами. Воспроизводимость результатов и специфичность в смешанных образцах ДНК были сходными при использовании обеих методик. Однако при низком содержании целевых генов технология Invader оказалось менее чувствительной. Таким образом, исследователям предоставляется выбор оптимального метода для поиска ОНП и других генетических маркеров.

В более поздних работах показана эффективность масс-спектрометрической детекции ОНП. Так, в работе Galeano et al. (2012) проводился поиск интронных вариантов генов бобов. На первом этапе авторы использовали скрининговый метод (SSCP) для анализа множества интронных ОНП в стандартной популяции растений и внесли новые варианты в геномную карту. Затем была проведена уточненная оценка генетического разнообразия по 93 генотипам и 173 известным генным маркерам с применением платформы MassARRAY. Таким образом, была показана эффективность подхода для решения задач генетического картирования и исследования генных ассоциаций. При этом были с высокой точностью определены уровни гетерозиготности в изученных популяциях.

Идентификация биологических образцов

Работа с коллекциями (банками) биологических материалов требует точной атрибуции биообразцов в каждом исследовании. Ошибки в регистрации проб могут возникать как в месте их взятия, так и в процессе транспортировки из одной лаборатории в другую. По опыту многих научных центров известно, что до 2% образцов, хранящихся в банках биоматериалов, обозначаются неправильно.

Атрибуция биологических образцов может проводиться разными методиками генотипирования, в том числе и с применением диагностической идентификационной панели iPLEX Pro Sample, которая содержит 44 ОНП и 3 маркера половой принадлежности (*AMEL*, *ARSD*, and *TGIF2L*) и 5 контролей

для количественной оценки копийности генов в исследуемых образцах ДНК (ген альбумина). Идентифицированные таким образом биообразцы могут затем служить для последующего мультиплексного ПЦР-анализа с помощью платформы MassARRAY® или систем секвенирования последнего поколения.

Такой подход дает следующие преимущества:

- Надежный скрининг ОНП с высокой степенью разрешения ($> 1.00 \times 10^{-18}$)
- Внутренние контроли с известным числом копий для установления числа интактных копий генов в образце (500-18,000)
- Метод удобен для различных образцов ДНК, включая клеточные линии и ткани, фиксированные формалином.
- Оптимальное содержание ДНК ≤ 10 нг ДНК на 1 образец

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методики масс-спектрометрии в последние десятилетия заняли прочное место в медико-биологических исследованиях. Основными направлениями долгое время был анализ малых биологических молекул. Однако, по мере разработки щадящих способов ионизации и испарения с поверхностей, появилась реальная технологическая основа для разделения более крупных полимерных молекул (типа пептидов и полинуклеотидов) по массе/заряду, их выявления и идентификации с помощью метода MALDI-TOF. Устройства и системы этого класса позволяют быстро и точно проводить крупномасштабные исследования по генотипированию соматических мутаций в онкологии, определению клинически значимого генного полиморфизма, полногеномного поиска генетических ассоциаций, филогенетике патогенных микроорганизмов. Особой, бурно развивающейся, областью применения масс-спектрометрии в генетике являются работы по селекции и анализу генетического разнообразия сельскохозяйственных животных, птиц и промысловых рыб. В данном обзоре минимальное внимание уделено вопросам использования систем Sequenom для задач эпигенетического анализа (главным образом – в онкологических исследованиях). Тем не менее очевидно, что высокопроизводительные масс-спектрометрические системы генетического назначения (например – iPlex GOLD в сочетании с MassARRAY) будут интенсивно внедряться и в этих областях медико-биологических исследований – там, где необходимо анализировать вариабельность наследственных признаков по большому числу генов и их вариантов в больших количествах образцов ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

Anderson U, Schwartzbaum J, Wiklund F, Sjöström S, Liu Y. A comprehensive study of the association between the EGFR and ERBB2 genes and glioma risk. *Acta Oncologica*, 2010; Early Online, 1–9

Bayliss J., Moser R, Bowden S, McLean CA. Characterisation of single nucleotide polymorphisms in the genome of JC polyomavirus using MALDI TOF mass spectrometry. *J. Virol. Methods* (2009), doi:10.1016/j.jviromet.2009.11.029

Beres SB, Carroll RK, Shea PR, Sitkiewicz I, Martinez-Gutierrez JC, Low DE, McGeer A, Willey BM, Green K, Tyrrell GJ, Goldman TD, Feldgarden M, Birren BW, Fofanov Y, Boos J, Wheaton WD, Honisch C, Musser JM. Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by comparative pathogenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 2;107(9):4371-4376.

Birdwell RA, Grady B, Choi L, Xu H, Bian A, Denny JC, Jiang M, Vranic G, Basford M, Cowan JD, Richardson DM, Robinson MP, Ikizler TA, Ritchie M, Stein CM, Haas DW. (2012). Use of a DNA Biobank Linked to Electronic Medical Records to Characterize Pharmacogenomic Predictors of Tacrolimus Dose Requirement in Kidney Transplant Recipients. *Pharmacogenet Genomics*; 22(1): 32–42. doi:10.1097/FPC.0b013e32834e1641

Børghlum AD, Demontis D, Grove J, Pallesen J, Hollegaard MV et al. Genome-wide study of association and interaction with maternal cytomegalovirus infection suggests new schizophrenia loci. *Molecular Psychiatry* (2013), 1–9

Bourret V, O'Reilly PT, Carr JW, Berg PR, Bernatchez L. Temporal change in genetic integrity suggests loss of local adaptation in a wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) population following introgression by farmed escapees. *Heredity* (2011), 1–11

Chung C-M, Wang RJ, Chen J-W, Fann CSJ, Leu H-B, Ho H-Y, Ting C-T, Lin T-H, Sheu S-H, Tsai W-C, Chen J-H, Jong Y-S, Lin S-J, Chen Y-T, Pan W-H (2010) A genome-wide association study identifies new loci for ACE activity: potential implications for response to ACE inhibitor. *Pharmacogenomics Journal*, 1-8.

Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V. et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. (2010) *Nature* 464 (7289):713-20.

Curjuric I, Imboden M, Nadif R, Kumar A, Schindler C, et al. (2012) Different genes interact with particulate matter and tobacco smoke exposure in affecting lung function decline in the general population. *PLoS ONE* 7(7): e40175. doi:10.1371/journal.pone.0040175

Dai J, Wan S, Zhou F, Myers RE, Guo X, et al. (2012) Genetic polymorphism in a VEGF-independent angiogenesis gene *ANGPT1* and overall survival of colorectal cancer patients after surgical resection. *PLoS ONE* 7(4): e34758. doi:10.1371/journal.pone.0034758

Da Silva L, Simpson PT, Smart CE, Cocciardi S, Waddell N. *HER3* and downstream pathways are involved in colonization of brain metastases from breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2010, 12:R46

Docherty SJ, Davis OS, Kovas Y, Meaburn EL, Dale PS, Petrill SA, Schalkwyk LC, Plomin R. A genome-wide association study identifies multiple loci associated with mathematics ability and disability. *Genes Brain Behav*. 2010 ;9(2):234-247.

Ecker, D. J. et al. Molecular genotyping of microbes by multilocus PCR and mass spectrometry: a new tool for hospital infection control and public health surveillance. (2009) *Meth Mol. Biol.* **551**, 71–87.

Engstrom KS, Hossain MB, Lauss M, Ahmed S, Raqib R, et al. (2013) Efficient arsenic metabolism — the *AS3MT* haplotype is associated with DNA methylation and expression of multiple genes around *AS3MT*. *PLoS ONE* 8(1): e53732. doi:10.1371/journal.pone.0053732

Falzoi M, Mossa A, Congeddu E, Saba L, Pani L. Multiplex genotyping of *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* and *CYP2C19* SNPs using MALDI-TOF mass spectrometry. *Pharmacogenomics*. 2010; 11(4):559-71.

Flanagan JM, Cocciardi S, Waddell N, Johnstone CN, Marsh A, Henderson S, Simpson P, da Silva L, Khanna K, Lakhani S, Boshoff C, Chenevix-Trench G. DNA methylome of familial breast cancer identifies distinct profiles defined by mutation status. *Am J Hum Genet*. 2010;86(3):420-433.

Fumagalli D, Gavin GP, Taniyama Y, Kim S-I, Choi H-J, Paik S., Pogue-Geile KL. A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes. *BMC Cancer* 2010, 10:101.

Galeano CH, Cortés AJ, Fernández AC, Soler Á, Franco-Herrera N, Makunde G, Vanderleyden J, Blair MW. Gene-based single nucleotide polymorphism markers for genetic and association mapping in common bean. *BMC Genet*. 2012; 13:48. doi: 10.1186/1471-2156-13-48.

Gallagher DJ, Vijai J, Cronin FV, Bhatia J, Vickers AJ et al. Susceptibility loci associated with prostate cancer progression and mortality. *Clin Cancer Res*; 16(10); 2819–2832.

- Gao W, Peng Y, Liang G, Liang A, Ye W, et al. (2013) Association between common variants near LBX1 and adolescent idiopathic scoliosis replicated in the Chinese Han population. *PLoS ONE* 8(1): e53234. doi:10.1371/journal.pone.0053234
- Gassner C, Meyer S, Frey BM, Vollmert C. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping - the alternative approach. *Transfus Med Rev.* 2013; 27(1):2-9.
- Gaudet MM, Kirchhoff T, Green T, Vijai J, Korn JM, et al. (2010) Common genetic variants and modification of penetrance of BRCA2-associated breast cancer. *PLoS Genet* 6(10): e1001183. doi:10.1371/journal.pgen.1001183
- Glover KA, Hansen MM, Lien S, Als TD, Hoyheim B, Skaala O. A comparison of SNP and STR loci for delineating population structure and performing individual genetic assignment. *BMC Genetics* 2010, 11:2 doi:10.1186/1471-2156-11-2
- Gupta V, Vinay DG, Sovio U, Rafiq S, Kranthi Kumar MV, et al. (2013) Association study of 25 type 2 diabetes related loci with measures of obesity in Indian sib pairs. *PLoS ONE* 8(1): e53944. doi:10.1371/journal.pone.0053944
- Han DY, Murphy R, Morgan AR, Lam WJ, Thompson JVD, Wall CR, Waldie KE, Mitchell EA, Ferguson LR. Reduced genetic influence on childhood obesity in small for gestational age children. *BMC Medical Genetics* 2013, 14:10
- He C, Kraft P, Chen C, Buring JE, Paré G, Hankinson SE, Chanock SJ, Ridker PM, Hunter DJ, Chasman DI. Genome-wide association studies identify novel loci associated with age at menarche and age at natural menopause. *Nat Genet.* 2009 ; 41(6): 724–728.
- Hill EW, Gu J, Eivers SS, Fonseca RG, McGivney BA, et al. (2010) A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLoS ONE* 5(1): e8645. doi:10.1371/journal.pone.0008645
- Ho DWH, Yap MKH, Ng PW, Fung WY, Yip SP (2012) Association of high myopia with crystallin beta A4 (CRYBA4) gene polymorphisms in the linkage-identified MYP6 locus. *PLoS ONE* 7(6): e40238. doi:10.1371/journal.pone.0040238
- Holzapfel C, Grallert H, Huth C, Wahl S, Fischer B, Doering A, Rueckert IM, Hinney A, Hebebrand J, Wichmann H-E, Hauner H, Illig T, Heid IM. Genes and lifestyle factors in obesity: results from 12 462 subjects from MONICA/KORA. *Int J Obesity* (2010) 1–8

Honisch C, Chen Y, Mortimer C, Arnold C, Schmidt O, van den Boom D, Cantor CR, Shah HN, Gharbia SE. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 ;104(25):10649-19654.

Jiang L, Wu Y, Xu X, Du L. Polymorphism analysis of the ABCA3 gene: association with neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants. *Chin Med J* 2012;125 (9):1594-1598

Jones ES, Sullivan H, Bhatramakki D, Smith JS. A comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic analysis of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*. 2007; 115:361-371.

Kenny EE, Pe'er I, Karban A, Ozelius L, Mitchell AA, et al. (2012) A genome-wide scan of Ashkenazi Jewish Crohn's disease suggests novel susceptibility loci. *PLoS Genet* 8(3): e1002559. doi:10.1371/journal.pgen.1002559

Kim JS, Choi YY, Jin G, Kang H-G, Choi J-E, Jeon H-S, Lee W-K. Association of a common AGO1 variant with lung cancer risk: A two-stage case-control study. *Mol Carcinogenesis*, 2011. 49, 913–921

Kirchhoff T, Gaudet MM, Antoniou AC, McGuffog L, Humphreys MK. et al. (2012) Breast cancer risk and 6q22.33: combined results from Breast Cancer Association Consortium and Consortium of Investigators on Modifiers of BRCA1/2. *PLoS ONE* 7(6): e35706. doi:10.1371/journal.pone.0035706

Kotorashvili A, Ramnauth A, Liu C, Lin J, Ye K, et al. (2012) Effective DNA/RNA co-extraction for analysis of microRNAs, mRNAs, and genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *PLoS ONE* 7(4): e34683. doi:10.1371/journal.pone.0034683

Leushner J, Chiu NH. Automated mass spectrometry: a revolutionary technology for clinical diagnostics. *Mol Diagn*. 2000; 5:341-348.

de Leseleuc L, Orlova M, Cobat A, Girard M, Huong NT, et al. (2013) PARK2 Mediates interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 production by human macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* 7(1): e2015. doi:10.1371/journal.pntd.0002015

Li Y, Fu L, Wong AMG, Fan Y-H, Li M-X, et al. (2011) Identification of genes with allelic imbalance on 6p associated with nasopharyngeal carcinoma in Southern Chinese. *PLoS ONE* 6(1): e14562. doi:10.1371/journal.pone.0014562

Li F, Yang XX, Hu N-Y, Du H-Y, Ma Q, Li M. (2012) Single-nucleotide polymorphism associations for colorectal cancer in Southern Chinese population. *Chin J Cancer Res* 24(1):29-35

Liao S, Liu Y, Tan Y, Gan L, Mei J, et al. (2012) Association of genetic variants of melatonin receptor 1B with gestational plasma glucose level and risk of glucose intolerance in pregnant Chinese women. *PLoS ONE* 7(7): e40113. doi:10.1371/journal.pone.0040113

Liu J, Desai KV, Li Y, Banu S, Lee YK et al. Germ-line variation at a functional p53 binding site increases susceptibility to breast cancer development. *HUGO J* (2009) 3:31–40

Lähteelä L., Kunnas T, Lyytikäinen LP, Mononen N, Taittonen L. No association of nineteen COX-2 gene variants to preclinical markers of atherosclerosis. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *BMC Medical Genetics* 2012, 13:32

Lose F, Nagle CM, O'Mara T, Batra J, Bolton KL. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and ovarian cancer survival. *Gynecologic Oncology* 2010 119, 479-483

MacConaill LE, Campbell CD, Kehoe SM, Bass AJ, Hatton C, Niu L, Davis M, Yao K, Hanna M, Mondal C, et al. Profiling critical cancer gene mutations in clinical tumor samples. *PLoS One*. 2009 Nov 18;4(11):e7887. doi: 10.1371/journal.pone.0007887.

Moe M, Lien S, Bendixen C., Hedegaard J, Hornshoj H, Berget I, Meuwissen THE, Grindflek E. Gene expression profiles in liver of pigs with extreme high and low levels of androstenone. *BMC Veterinary Research* 2008, 4:29 doi:10.1186/1746-6148-4-29.

Mohamed Hoesein FAA, Wauters E, Janssens W, Groen HJM, Smolonska J, Wijmenga C, Postma DS, Boezen HM, De Jong PA, Decramer M, Lammers J-W J, Lambrechts D, Zanen P. (2013) Variants in the 15q24/25 locus associate with lung function decline in active smokers. *PLoS ONE* 8(1): e53219. doi:10.1371/journal.pone.0053219

Morelli G, Song Y., Mazzoni CJ, Eppinger M, Roumagnac Ph, Wagner DM, Feldkamp M, Kusecek B, Vogler AJ, Li Y, Cui Y, Thomson NR, Jombart T, Leblois R., Lichtner P, Rahalison L, Petersen JM, Balloux F, Keim P, Wirth T, Ravel J, Yang R, Carniel E, Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity *Nature Genetics* (2010) 42, 1140 - 1143

Muddiman DC, Wunschel DS, Liu C, Pasa-Tolić L, Fox KF, Fox A, Anderson GA, Smith RD. Characterization of PCR products from bacilli using electrospray ionization FTICR mass spectrometry. *Anal Chem*. 1996;68(21):3705-3712.

Nies AT, Niemi M, Burk O, Winter S, Zanger UM, Stieger B, Schwab M, Schaeffeler E. Genetics is a major determinant of expression of the human hepatic uptake transporter OATP1B1, but not of OATP1B3 and OATP2B1. *Genome Medicine* 2013, **5**:1 doi:10.1186/gm405

Pao W, Kris MG, Iafrate AJ, Ladanyi M, Jänne PA, Wistuba II, Miake-Lye R, Herbst RS, Carbone DP, Johnson BE, Lynch ThJ. Integration of molecular profiling into the lung cancer clinic. *Clin Cancer Res* 2009; **15**(17) : 5317–5322

Pasricha R., Chandolia A., Ponnann P., Saini .N.K., Sharma S., Chopra M., Basil MV, Brahmachari V, Bose M. (2011) Single nucleotide polymorphism in the genes of mce1 and mce4 operons of *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of clinical isolates and standard reference strains. *BMC Microbiology*, **11**:41 doi:10.1186/1471-2180-11-41

Rohrer GA, Freking BA, Nonneman D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. *Anim Genet.* 2007 Jun;**38**(3):253-258.

Sapkota Y, Ghosh S, Lai R, Coe BP, Cass CE, et al. (2013) Germline DNA copy number aberrations identified as potential prognostic factors for breast cancer recurrence. *PLoS ONE* **8**(1): e53850. doi:10.1371/journal.pone.0053850

Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2010; **8**(1):74-82.

Sauvage C, Vagner M, Derome N, Audet C, Bernatchez L. Coding gene single nucleotide polymorphism mapping and quantitative trait loci detection for physiological reproductive traits in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. 2012 *Genes, Genomes, Genetics (G3)*, **2**: 379-392.

Schroth W, Hamann U, Fasching PA, Dauser S, Winter S, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H. (2010) CYP2D6 polymorphisms as a predictor of outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen: expanded polymorphism coverage improves risk stratification.

Shrestha S., Wiener HW, Aissani B, Song W, Shendre A., Wilson CM, Kaslow RA, Tang J. Interleukin-10 (IL-10) pathway: genetic variants and outcomes of HIV-1 infection in African American adolescents. *PLoS ONE* 2010 **5**(10): e13384. doi:10.1371/journal.pone.0013384

Sonstegard TS, Cole JB, VanRaden PM, Van Tassell CP, Null DJ, et al. (2013) Identification of a nonsense mutation in CWC15 associated with decreased reproductive efficiency in Jersey cattle. *PLoS ONE* 8(1): e54872. doi:10.1371/journal.pone.0054872

Stefanaki I, Panagiotou OA, Kodela E, Gogas H, Kypreou KP, et al. (2013) Replication and predictive value of SNPs associated with melanoma and pigmentation traits in a Southern European Case-Control Study. *PLoS ONE* 8(2): e55712. doi:10.1371/journal.pone.0055712

Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, Winckler W, Laframboise T, Lin WM, Wang M, Feng W, Zander T, MacConaill L, et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet.* 2007; 39(3):347-51.

Thompson RF, Suzuki M, Lau KW, Grealley JM (2009) A pipeline for the quantitative analysis of CG dinucleotide methylation using mass spectrometry. *Bioinformatics* 25: 2164–2170.

Tsai F-J, Lee Y-C, Chang J-S, Huang L-M, Huang F-Y, et al. (2011) Identification of novel susceptibility loci for Kawasaki disease in a Han Chinese population by a genome-wide association study. *PLoS ONE* 6(2): e16853. doi:10.1371/journal.pone.0016853

Qin Y, Sun M, You L, Wei D, Sun J, Liang X, Zhang B, Jiang H, Xu J, Chen Z-J. ESR1, HK3 and BRSK1 gene variants are associated with both age at natural menopause and premature ovarian failure. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2012, 7:5

Vasemagi A, Nilsson J, McGinnity P, Cross T, O'Reilly P, Glebe B, Peng B, Berg PR, Primmer CR. Screen for footprints of selection during domestication/captive breeding of Atlantic salmon. *Comparative and Functional Genomics*, Volume 2012, Article ID 628204, 14 pages. doi:10.1155/2012/628204

Wei Q-X, Claus R, Hielscher T, Mertens D, Raval A, et al. (2013) Germline allele-specific expression of DAPK1 in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE* 8(1): e55261. doi:10.1371/journal.pone.0055261

Yoon HH, Catalano PJ, Murphy KM, Skaar TC, Phillips S. et al. Genetic variation in DNA-repair pathways and response to radiochemotherapy in esophageal adenocarcinoma: a retrospective cohort study of the Eastern Cooperative Oncology Group. *BMC Cancer* 2011, 11:176 doi:10.1186/1471-2407-11-176

Yu C-C, Huang S-P, Lee Y-C, Huang C-Y, Liu C-C, et al. (2013) Molecular markers in sex hormone pathway genes associated with the efficacy of androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *PLoS ONE* 8(1): e54627. doi:10.1371/journal.pone.0054627

Zhang G, Li W., Li Z, Lv H, Ren Y, Ma R, Li X, Kang X, Shi Y, Sun Y. Association between paraoxonase gene and stroke in the Han Chinese population BMC Medical Genetics 2013, 14:16

Zheng P, Li E, Wang J, Cui X, Wang L. Involvement of tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms in susceptibility to tic disorder in Chinese Han population. Behavioral and Brain Functions 2013, 9:6
doi:10.1186/1744-9081-9-6

Официальный представитель Sequenom в России и странах СНГ



ООО «БиоГен-Аналитика»
115093 Москва, Партийный переулок, д. 1, к. 58, стр. 1
+7 (499) 704 62 44, +7 (495) 220 94 85, +7 (495) 660 97 80/81
84956614969@bga.su
www.bga.su