

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**О. В. Костюнина, О. А. Быкова, И. А. Лебедева, М. В. Новикова
О. В. Чепуштанова, И. В. Рогозинникова**

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ГЕНОТИПИРОВАНИЮ:
ЭВОЛЮЦИЯ МЕТОДОВ**

**Екатеринбург,
2026**

УДК 636.082.2

ББК 45.3

С56

Рецензенты:

Гетманцева Л.В., доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела (ВНИИПлем);

Шацких Е.В., доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зооинженерии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Уральский ГАУ).

- С56** Современные подходы к генотипированию: эволюция методов / Костюнина О. В., Быкова О. А., Лебедева И. А., Новикова М. В., Чепуштанова О. В., Рогозинникова И. В. Екатеринбург: Издательский дом «Ажур», 2026, 82 с.
ISBN 978-5-91256-827-5

В учебном пособии приведены данные по различным технологиям мультиплексного генотипирования SNP по принципу от «простого» к «сложному».

Предназначено для обучающихся по направлению подготовки «Зоотехния» (уровень бакалавриата и магистратуры). Пособие будет полезно для специалистов в области молекулярной генетики сельскохозяйственных животных, слушателей ФПК.

УДК 636.082.2

ББК 45.3

ISBN 978-5-91256-827-5

© Костюнина О. В., 2026.

© Быкова О. А., 2026.

© Лебедева И. А., 2026.

© Новикова М. В., 2026.

© Чепуштанова О. В., 2026.

© Рогозинникова И. В., 2026.

Введение

Единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNP) являются одним из наиболее распространенных генетических маркеров у млекопитающих, они кодоминантны и широко распространены в геноме (Campbell et al., 2015; Voss-Fels K., Snowdon, 2016; Onda et al., 2018), именно поэтому SNP используются для различных генетических исследований, включая изучение генетического разнообразия и структуры популяции, картирование локусов количественных признаков (QTL), полногеномные ассоциативные исследования (GWAS), маркер-зависимую селекцию (MAS) и геномную селекцию (Semagn et al., 2014). Быстрое, точное и мультиплексное типирование SNP имеет решающее значение для биологических и генетических исследований (Wang et al., 2019).

Для рутинных исследований, проводимых в рамках Молекулярно-генетической экспертизы племенного материала, осуществляемой согласно закону о племенном животноводстве и в соответствии с правилами реализации общего процесса "Формирование, ведение и использование базы данных о племенных животных и селекционных достижениях в области племенного животноводства" (ЕАЭС), нужны быстрые, надежные и недорогостоящие методы диагностики племенных животных по ряду ДНК-маркеров, например генетическим дефектам и LoF-мутациям. Соответственно имеется потребность в разработке эффективных методов генотипирования. Высокопроизводительные, простые, надежные и экономичные тест-системы позволяют с меньшими временными затратами и трудоемкостью выявлять носителей ценных генетических сочетаний по селекционно-значимым признакам.

Текущие технологии генотипирования на основе SNP позволили генетическим исследованиям перейти от в основном моноплексных анализов: простые повторы последовательностей (SSR), расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности (CAPS), конкурентная аллель-специфическая ПЦР (KASP) (LGC Genomics, Beverly,

MA) и другие к высокопроизводительному генотипированию с помощью панелей SNP высокой плотности (Bernardo et al., 2015; Semagn et al., 2014; Rasheed et al., 2016). Такие технологии, как анализы Illumina Infinium (Oliphant et al., 2002), генотипирование путем секвенирования (GBS) (Poland et al., 2012; Truong et al., 2012) и другие методы, позволили исследователям генотипировать сотни образцов с тысячами и миллионами SNP в одном анализе (Rasheed et al., 2016). Эти технологии не только увеличили скорость генотипирования и общий вывод данных, но также снизили стоимость образцов для генотипирования (Chan, 2009; Bernardo et al., 2015; Thomson, 2014; Rasheed et al., 2016). Как бы далеко ни продвинулись эти технологии, каждая из них имеет свои плюсы и недостатки. По мере того, как технологии генотипирования продолжают развиваться, растут и их пропускная способность и возможности мультиплексирования.

Целью данного обзора явился анализ литературных данных о существующих подходах и методах мультиплексного генотипирования SNP с использованием различных технологий.

Существует несколько методов мультиплексного генотипирования SNP (однонуклеотидных полиморфизмов), включая:

1. Мультиплексная ПЦР: Этот метод использует комбинацию праймеров и зондов для усиления и обнаружения нескольких SNP в одной реакции. Продукты амплификации затем анализируются с помощью гель-электрофореза или реал-тайм ПЦР.

2. TaqMan: Этот метод использует флуоресцентные зонды, которые связываются с интересующим SNP, позволяя обнаруживать SNP ПЦР.

3. Система Mass-ARRAY: Этот метод использует масс-спектрометрию для обнаружения SNP в мультиплексной реакции. Продукты амплификации анализируются с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF (матрично-усиленная лазерная десорбция/ионизация времени полета).

4. Микрочипы SNP: Этот метод использует микрочиповую технологию для обнаружения тысяч SNP одновременно. Образец ДНК гибридизуется с

микрочипом, и полученный сигнал анализируется с помощью специализированного программного обеспечения. В целом, мультиплексное генотипирование SNP представляет собой мощный инструмент для выявления генетических вариаций, связанных с сложными заболеваниями или признаками, а также для судебной экспертизы.

Мультиплексная РТ-ПЦР

ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР) имеет уникальные преимущества, поскольку позволяет в реальном времени кинетически обнаруживать накопление амплифицированного продукта посредством изменения интенсивности флуоресценции в условиях закрытой пробирки, устраняя необходимость в манипуляциях после амплификации и тем самым заметно снижая вероятность перекрестного загрязнения [Saunders, 2004]. Высокая воспроизводимость, возможность количественного определения и простота использования сделали РТ-ПЦР подходящей для широкого круга приложений, в том числе и для генотипирования. К плюсам РТ-ПЦР можно также отнести доступность оборудования, реактивов и расходных материалов отечественного производства. Одним из перспективных и востребованных направлений является разработка мультиплексных тест-систем на основе ПЦР. Мультиплексная полимеразная цепная реакция представляет собой одновременную амплификацию нескольких различных последовательностей ДНК с использованием нескольких праймеров в одной пробирке и одной программы амплификации для всех ампликонов (Davidson, 2019).

В настоящее время мультиплексная ПЦР с идентификацией генетических вариантов в режиме реального времени (РТ-ПЦР) востребована в большей степени в клинической диагностике. Разработан ряд подходов, позволяющих проводить быстрый скрининг, в том числе с использованием директ-ПЦР, по генотипированию возбудителей болезней, определению устойчивости к антибиотикам, идентификации генетических дефектов человека и многое другое. Однако, учитывая возрастающую потребность производителей племенной продукции в получении поголовья, свободного от генетических дефектов, а также являющегося носителями предпочтительных с позиции селекционных стратегий генетических вариаций, создание мультиплексных панелей ДНК-маркеров сельскохозяйственных животных в формате РТ-ПЦР, характеризующихся открытостью и реализуемых с

использованием реагентов отечественного производства, является актуальным.

Мультиплексная ПЦР в реальном времени характеризуется многочисленными преимуществами, в том числе экономией времени, устранением риска загрязнения (контаминации), снижением стоимости реагентов, увеличением производительности, сохранением ценного материала образца и надежными результатами (Barken et al., 2007).

Золотым стандартом ПЦР в режиме реального времени является TaqMan™ (Applied Biosystems) (Hui et al., 2008). Этот подход позволяет проводить генотипирование индивидуумов на предмет обнаружения SNP и состоит из двух специфичных для последовательности праймеров и двух зондов TaqMan, связывающих лиганд малой бороздки (MGB) с нефлуоресцентными гасителями (NFQ). Однако доступность ограниченного количества флуоресцентных меток, которые можно отслеживать одновременно, затрудняет использование нескольких зондов для мультиплексных анализов и позволяет обнаруживать только одну целевую последовательность на канал флуоресценции. Так, например, Lorenzini и коллеги (2020) разработали дуплексную ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan для распознавания аллелей по трем позициям гена *MC1R* и по одной позиции гена *NR6A1* *S. scrofa* для дифференциации кабана и домашних свиней. С использованием TaqMan максимальное количество генотипируемых SNP для шестиканального прибора может составить 3. Таким образом, мультиплексная флуоресцентная ПЦР ограничена доступностью флуоресцентных красителей и каналов, до пяти или шести аллелей в зависимости от конкретных амплификаторов могут быть обнаружены одновременно на современных платформах (Molenkamp et al., 2007). Сообщалось о мультиплексной РТ-ПЦР, но лишь немногие из этих описанных подходов могут обнаружить более четырех или пяти мишеней в одной реакции (El-Hajj et al., 2001). Поэтому, несмотря на уникальные преимущества обнаружения нуклеиновых кислот на основе ПЦР в реальном

времени, традиционная стратегия маркировки одним флуорофором одного зонда является ограничивающим фактором ее применения для мультиплексного генотипирования (Huang et al., 2011). Вместе с тем различными исследователями предлагаются возможные технические решения для расширения количества целей, которые могут быть генотипированы с использованием ПЦР в режиме реального времени, ниже мы более подробно остановимся на этих разработках.

Одним из подходов для мультиплицирования был предложен метод HRM (Seipp et al., 2009), который позволил успешно идентифицировать 4 мутации в одном канале. Генотипирование путем плавления ампликона с высоким разрешением (HRM) использует только два праймера и интеркалирующий ДНК-краситель, который выявляет как гетеродуплексы, так и гомодуплексы. Гетерозиготные генотипы имеют характерную форму кривой плавления и более широкую ширину, чем гомозиготные генотипы, которые распределяются на основе небольших различий температуры плавления (T_m), которые обычно составляют около $1,0^{\circ}\text{C}$, но могут быть меньше в зависимости от изменения основания и длины кривой плавления. При мультиплексном генотипировании множественные ампликоны, нацеленные на разные локусы, могут быть естественным образом разделены по T_m на основе их содержания гуанина-цитозина и последовательности. Если T_m различных локусов не разделены естественным образом, адекватное разделение часто может быть достигнуто путем модификации длины ампликонов или путем селективного добавления T_m -сдвигающих хвостов праймеров. Несмотря на то, что количество локусов, идентифицируемых с использованием температуры плавления ампликонов ограничено, данный метод не требует дорогостоящих реагентов и флуоресцентно-меченных зондов.

Одной из предложенных стратегий является многоцветное комбинаторное кодирование зондов (Multicolor Combinatorial Probe Coding, MCSPC), которое позволяет маркировать большое количество различных

зондов ограниченным числом флуорофоров разного цвета. МСПС был усовершенствован до мультиплексного формата с помощью системы Hemo-Tag Assisted Non-Dimer (HAND), позволяющей включать несколько пар праймеров в одну реакцию. Данный способ может использоваться для идентификации порядка 15 различных генетических вариантов (например, различные штаммы вирусов) при использовании четырехканального амплификатора, однако в меньшей степени пригоден для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов, поскольку дифференциация генотипов выполняется по интенсивности сигнала флуоресценции в конце цикла, где у гетерозиготных генотипов наблюдается более низкий сигнал, тогда как более высокий сигнал наблюдается для гомозиготной мутации (Huang et al., 2011). Это может быть сопряжено с определенными затруднениями при определении генотипа, повышенными требованиями к концентрации и качеству ДНК.

Fu и коллеги (Fu et al., 2012) предложили новый метод мультиплексной идентификации (Multiplex Probe Amplification, MPA), который позволяет обнаруживать до четырех мишеней в одном канале с использованием современных стандартных приборов. Принципы МРА заключаются в следующем: во-первых, зонды, меченные одними и теми же флуорофорами, можно различить, если они имеют разные температуры плавления. Дифференциальные температуры плавления устанавливаются произвольно путем подбора последовательностей различной длины, состава оснований и/или комплементарности олигонуклеотида, гибридизующегося с мишенью. Во-вторых, при наличии мишени ее соответствующий зонд расходуется во время амплификации ПЦР. Сравнение профилей плавления зондов после реакции показывает, какие зонды были израсходованы - это, в свою очередь, указывает на то, какие мишени присутствуют в образце. Зонд состоит из гибридизующего мишень олигонуклеотида (ТНО), меченного флуорофором на 5'-конце и гасителем на 3'-конце, и частично комплементарного олигонуклеотида (РСО) без метки. ТНО и РСО способны гибридизоваться друг с другом, образуя частично двухцепочечный зонд. По своей конструкции

каждый зонд имеет уникальные свойства плавления, которые характеризуются его температурой плавления (T_m).

Высокомультимплексная технология ПЦР в реальном времени TOCETM (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension) основана на использовании расщепления и удлинения меченого олигонуклеотида (Cho et al., 2013; Agee, 2016). С ее помощью можно обнаруживать единичные нуклеотидные замены. Ключевыми компонентами технологии TOCETM являются пары праймеров DPOTM, «кувшины» и «ловушки». DPOTM обеспечивает высокоспецифичную амплификацию целевой области. «Кувшин» представляет собой меченый олигонуклеотид, который специфически гибридизуется с целевой областью. «Ловушка» — это искусственный шаблон с двойной меткой. Технология TOCE позволяет идентифицировать несколько целевых аналитов одновременно в одном канале. Сигнал можно измерить в режиме реального времени и/или путем анализа по температуре плавления.

Kalendar и сотрудники (Kalendar et al., 2022) предложили модифицированный метод аллель-специфической количественной ПЦР (ASQ) для генотипирования SNP на основе FRET, который подходит как для симплексного, так и для мультимплексного применения и включает элементы, ранее использовавшиеся в различных подходах к генотипированию SNP. В предлагаемом методе флуорофоры и гаситель расположены в отдельных комплементарных олигонуклеотидах. ASQ основан на одновременном присутствии в ПЦР следующих двух компонентов: аллель-специфичной смеси (аллель-специфических и общих праймеров) и матрично-независимой детекторной смеси, содержащей два и более (до четырех) универсальных зондов (UP-1–4) и один универсальный олигонуклеотид-гаситель (Uni-Q). Сайт SNP расположен предпочтительно в предпоследнем основании в каждом аллель-специфическом праймере, что увеличивает специфичность реакции и различие аллелей. Предлагаемый метод ASQ является усовершенствованным, обеспечивает очень четкое и эффективное измерение испускаемой флуоресценции, с очень низким фоновым шумом сигнала и

простыми процедурами, удобными для индивидуальных модификаций. Важно отметить, что метод ASQ оценивается в два-десять раз дешевле, чем Amplifluor и KASP, и намного дешевле, чем все те методы, которые основаны на зондах с двойной меткой без универсальных компонентов, таких как TaqMan и Molecular Beacons.

Rudi и соавторы (2006) разработали метод мультиплексного генотипирования в режиме реального времени с помощью удлинения гасителя (multiplex-QEXT, Multiplex quencher extension), которое представляет собой новый метод одновременного обнаружения и количественного определения нескольких однонуклеотидных полиморфизмов. Принцип данного метода заключается в том, что 5'-меченые репортерные зонды удлиняются на 3'-конце с помощью меченого TAMRA™ дидезоксицитина, если присутствуют соответствующие аллели SNP. TAMRA может служить либо акцептором энергии флуоресценции, либо донором, в зависимости от 5'-флуоресцентного репортера. Удлинение приводит к усилению репортерной флуоресценции за счет резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), если TAMRA служит донором энергии, а если TAMRA является акцептором, то репортерная флуоресценция будет гаситься. Удлинение может быть определено по соответствующему изменению флуоресценции репортера. Авторы оценили данный метод, проанализировав четыре различных SNP в гене *Listeria monocytogenes* *inlA*. Использовали зонды, меченные флуорофорами 6-FAM, TET, VIC и Alexa Fluor 594. Ответы на флуорохромы 6-FAM, TET и VIC были обнаружены по тушению (уменьшение флуоресценции), а ответ на Alexa Fluor 594 был обнаружен с помощью FRET (увеличение флуоресценции).

В исследованиях Nicklas и Buel (2008) для генотипирования использовался анализ, определяющий различия в плавлении зонда с двумя разными аллелями SNP. Различия в плавлении выявляли с использованием FRET анализа. ПЦР проводили с использованием двух фланкирующих праймеров в присутствии двух зондов: один 5'-зонд с флуоресцентной меткой на 3'-конце, который покрывает SNP, называемый эталонным или сенсорным

зондом, и второй, 3'-расположенный зонд, называемый якорным зондом, помеченный на 5'-гасителем и на 3'-фосфатом для предотвращения элонгации. Эталонный/сенсорный зонд практически полностью соответствовал одному аллелю, за исключением одного нуклеотида. По мере проведения ПЦР дополнительная флуоресценция гасится, так как при связывании обоих зондов с продуктом ПЦР энергия возбужденного 3'-красителя передается гасителю и испускание света отсутствует. В фазе плавления флуоресценция усиливается. Определение того, какой аллель (аллели) присутствует, зависит от температуры плавления, при которой восстанавливается флуоресценция. В этом методе используется только один репортерный краситель на SNP, таким образом, в шестиканальном приборе шесть SNP могут быть мультиплексированы, что делает возможным простой анализ в одной пробирке.

Yu и сотрудники (2022) сообщили о стратегии мультиплексной асимметричной ПЦР-HRM для идентификации генотипов трех различных генов в трех каналах, количество идентифицируемых генотипов может быть увеличено в соответствии с количеством каналов в амплификаторе. Принцип данного метода заключен в различающихся концентрациях фланкирующих праймеров и зондах с двойной меткой. Мультиплексная асимметричная ПЦР была проведена для получения продуктов, содержащих полиморфные сайты. При этом зонды с двойной меткой гибридизовали с матрицей, гидролизировали полимеразой и регистрировали сигнал флуоресценции для каждого цикла. Когда 50 циклов ПЦР были закончены, негидролизованые в избытке зонды с двойной меткой гибридизовали с одноцепочечной ДНК, далее проводили анализ кривых плавления в каналах HEX, ROX и Cy5. Кривая плавления с одним пиком при более высокой температуре представляет собой гомозиготный генотип дикого типа, кривая плавления с одним пиком при более низкой температуре представляет собой генотип гомозиготного мутационного типа, а двойной пик указывает на гетерозиготу.

Vargas и сотрудники (2022) предложили мультиплексный суперселективный ПЦР-анализ для идентификации 8 различных соматических

мутаций на примере гена *EGFR*. Этот метод характеризуется высокой специфичностью, не зависит от локализации мутаций и может быть применим для идентификации делеций. Суперселективные праймеры благодаря своему уникальному дизайну позволяют одновременно идентифицировать и количественно определять унаследованные эталонные гены и редкие соматические мутации в рутинных мультиплексных ПЦР-анализах. Некоторые модификации данного метода с использованием высокоселективных кооперативных праймеров для мультиплексного обнаружения редких мутаций были описаны Kent и Christensen (2021). Суперселективные праймеры состоят из двух олигонуклеотидов, соединенных между собой «мостиковой» последовательностью. Относительно длинный 5'-сегмент последовательности (называемый «якорем») гибридизуется с фрагментами ДНК-мишени с высокой аффинностью, в то время как более короткий 3'-сегмент (называемый «ножкой») чувствителен к присутствию вариантов в его области связывания. «Якорь» и «ножка» соединены «мостиком», состоящим из последовательности нуклеиновой кислоты, которая не комплементарна промежуточной области ножка-якорь.

Huang и коллеги (2022) описали одноэтапный мультиплексный подход к генотипированию, называемый «MeltArray», который использует активность 5'-flap-эндонуклеазы (FEN) ДНК-полимеразы Taq для расщепления специфичных для мишеней «зондов-медиаторов» на «праймеры-медиаторы», которые служат эндогенными штрих-кодами во время ПЦР. Благодаря использованию молекулярных репортеров-маяков, служащих матрицами для удлинения нескольких праймеров-медиаторов, генерирующих серию флуоресцентных двухцепочечных ДНК разной длины, каждая последовательность-мишень в образце идентифицируется по уникальной комбинации флуоресценции и температуры плавления. Таким образом, общее количество мишеней, обнаруживаемых в одной реакции, представляет собой количество репортеров-маяков, умноженное на число различных праймеров-медиаторов, которые могут связываться с разными сайтами на петле каждого

репортера-маяка. Современные шестиканальные амплификаторы позволяют использовать шесть различных молекулярных маяков-репортеров с различными последовательностями петель. Это открывает возможность одновременной идентификации до 72 различных последовательностей-мишеней в одном ПЦР-анализе в закрытой пробирке.

SNaPshot

SNaPshot, также известный как минисеквенирование, представляет собой метод, основанный на удлинении праймера, разработанного для анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Используя этот метод, можно анализировать более 50 SNP, распределенных по геному, в одной мультиплексной реакции, что является его преимуществом по сравнению с традиционной реакцией секвенирования (Paneto and Careta, 2015). Для этого, во-первых, SNP первоначально амплифицируются с помощью обычной мультиплексной ПЦР с использованием специфических праймеров, фланкирующих их местоположение. Позже реакция SNaPshot выполняется с использованием аллель-специфичных праймеров, отжигающих одно основание перед SNP, который вы хотите проанализировать, и дополняется дидезоксинуклеотидами (ddNTP), меченными флуоресцентно. Затем SNP обнаруживаются с помощью капиллярного электрофореза. Этот метод позволяет одновременно обнаруживать несколько SNP в одном мультиплексном анализе. Реакция с наибольшим числом разработанных SNP позволяет анализировать 52 SNP в мультиплексном режиме (Borsting et al., 2008). В литературе описано несколько мультиплексных анализов SNaPshot (Magnin et al., 2011; Coutinho et al., 2014; Yang et al., 2014). Принцип SNaPshot показан на рисунке 1.

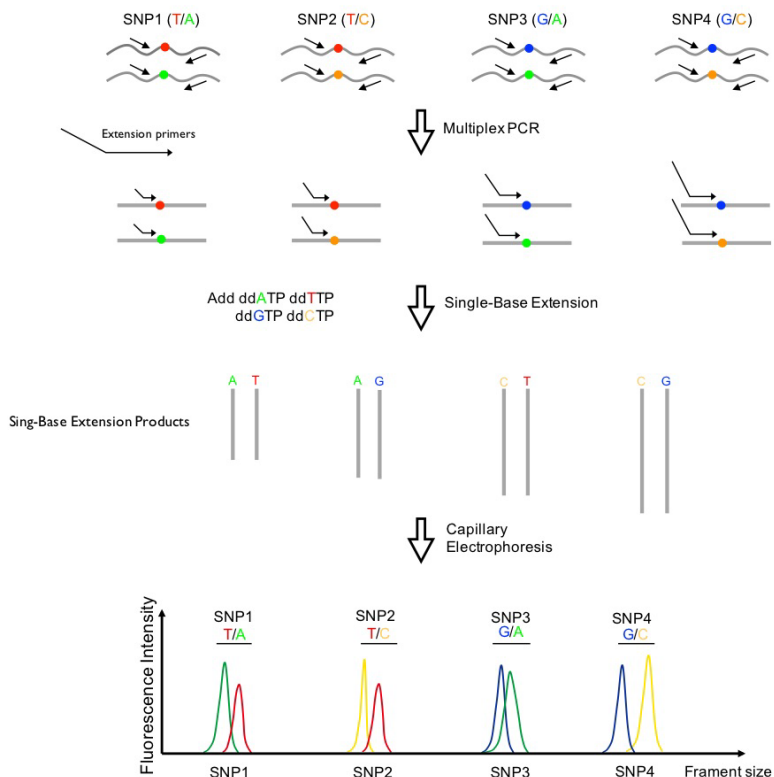


Рис. 1. Принцип метода мультиплексно генотипирования SNaPshot

При использовании технологии SNaPshot обязательна разработка и тестирование мультиплексных праймеров, как для обычной ПЦР, так и для реакции SNaPshot. Праймеры можно создавать вручную или с помощью специального программного обеспечения. Для этого существуют общие правила, которые необходимо соблюдать. Длина праймеров определяет специфичность и существенно влияет на их отжиг с матрицей. Слишком короткие праймеры приводят к низкой специфичности ПЦР, что приводит к неспецифической амплификации, а слишком длинные праймеры снижают эффективность связывания матрицы при нормальной температуре отжига из-за более высокой вероятности образования вторичных структур, таких как

шпильки. Длина праймера обычно составляет от 18 до 30 оснований, с идеальным содержанием GC 40–60 % и оптимальной температурой плавления от 52 до 60 °C для большинства реакций ПЦР. Длина ампликона должна составлять от 50 байт до 3 КБ. Однако в некоторых опубликованных статьях можно встретить и исключения из этих правил. Данный метод востребован при проведении судебно-медицинской экспертизы поскольку использует очень короткие ампликоны и может применяться для генотипирования образцов сильно деградированной ДНК.

Система панелей Multiplex SNaPshot, хотя и несколько дороже других доступных методов типизации, таких как KASP, имеет преимущества хорошей согласованности, высокой пропускной способности и высокой гибкости. SNaPshot — это легко интегрируемый вариант типирования SNP для различных целей

Мультиплексная лигазная цепная реакция (MLPA)

Schouten и соавторы (2002) предложили новый метод относительного количественного определения 40 различных последовательностей ДНК в простой в выполнении реакции, требующей всего 20 нг ДНК. Данный способ пригоден для обнаружения делеций и дупликаций экзонов в генах BRCA1, MSH2 и MLH1 человека, обнаружения трисомий, таких как синдром Дауна, характеристики хромосомных aberrаций в клеточных линиях и образцах опухолей, а также обнаружения SNP/мутаций. Принцип MLPA показан на рисунке 2.

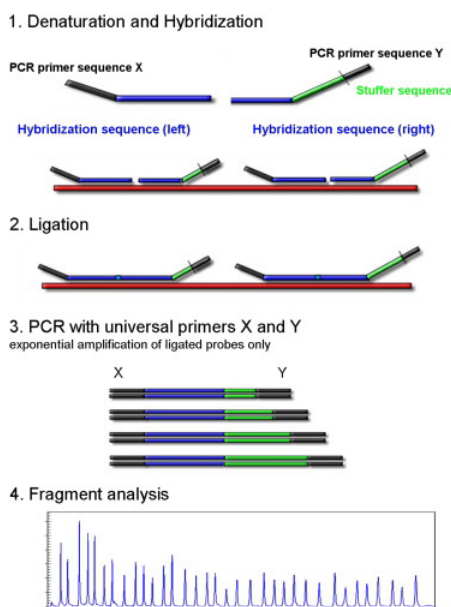


Рис. 2. Принцип метода MLPA

MLPA — это мультиплексный ПЦР-анализ, в котором используется до 40 зондов, каждый из которых специфичен для отдельной последовательности ДНК, для определения относительного числа копий каждой последовательности ДНК. Каждый набор зондов состоит из 5'- и 3'-полужондов, каждый из которых содержит уникальную последовательность,

специфичную для мишени, последовательность наполнителя, позволяющая дифференцировать длину самого зонда во время электрофореза, и универсальные последовательности праймеров, позволяющие проводить одновременную мультиплексную ПЦР-амплификацию всех зондов (Kozlowski et al., 2007). Реакция MLPA включает в себя четыре этапа:

- 1) геномная ДНК денатурируется и фрагментируется;
- 2) происходит гибридизация между зондом MLPA и денатурированной ДНК;
- 3) гибридизированный зонд может быть соединен лигазой;
- 4) ПЦР амплифицирует продукт лигирования. Продукцию ПЦР разделяют с помощью электрофореза или системы одноцепочечного конформационного полиморфизма на основе капиллярного электрофореза высокого разрешения (Stuppia et al., 2012).

Два полузонда способны распознавать смежные последовательности, специфичные для мишени, и только при наличии идеального совпадения без единого разрыва, после гибридизации, два полузонда могут быть лигированы и амплифицированы (Stuppia et al., 2012). ПЦР не амплифицирует целевые последовательности, но лигированный зонд является ключевым моментом в реакции MLPA. Таким образом, для амплификации используется одна пара ПЦР-праймеров, в то время как типичная мультиплексная ПЦР требует использования специфических ПЦР-праймеров для каждой целевой последовательности (Zhi, 2010). Каждый зонд MLPA состоит из двух парных олигонуклеотидов, каждый из которых содержит одну из последовательностей праймера ПЦР плюс последовательность, комплементарную целевой последовательности ДНК. Эти два олигонуклеотида-зонда гибридизуются непосредственно с соседними целевыми сайтами. Только когда два олигонуклеотида-зонда гибридизуются со своей мишенью, их можно лигировать в один зонд, содержащий как прямую, так и обратную последовательность праймера. Подробно структура зонда показана на рисунке 3. Эти лигированные зонды экспоненциально амплифицируются во время реакции ПЦР, в то время как отдельные олигонуклеотиды нелигированных

зондов этого не делают. Таким образом, количество продуктов лигирования одного зонда зависит от количества целевых последовательностей в образце. После ПЦР полученные продукты амплификации разделяют с помощью капиллярного электрофореза. Набор зондов MLPA спроектирован таким образом, что длина каждого из его продуктов амплификации уникальна. Длина увеличивается ступенчато, общий диапазон размеров лежит в пределах 120–500 нуклеотидов. Этот диапазон размеров обеспечивает оптимальное разделение фрагментов и низкий уровень фона при работе с гелями последовательного типа (Mrcholland).

Оборудование, необходимое для выполнения MLPA, — это устройство для капиллярного электрофореза и термоциклер. Реакции MLPA можно проводить как реакцию в одной пробирке, поскольку нелигированные олигонуклеотиды не нужно удалять.

Зонды MLPA® бывают двух типов:

Зонды, содержащие один синтетический и один зондовый олигонуклеотид, полученный из M-13. Зонды приводят к образованию продукта амплификации длиной от 130 до 481 нуклеотида.

Зонды, содержащие два синтетических олигонуклеотидных зонда. Зонды приводят к образованию продукта амплификации длиной от 94 до 130 нуклеотидов. Эти зонды не имеют последовательности заполнения.

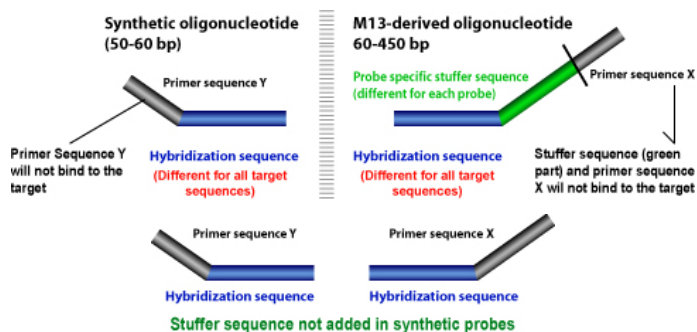


Рис. 3. Структура зонда для MLPA

Зонды MLPA® состоят из двух олигонуклеотидов, каждый из которых содержит последовательность праймера для ПЦР и последовательность, комплементарную мишени, известную как последовательность гибридизации.

Два зонда гибридизуются непосредственно рядом друг с другом. Когда зонды правильно гибридизуются с целевой последовательностью, они лигируются термостабильным ферментом лигазой. Праймеры для ПЦР экспоненциально амплифицируют лигированные зонды. Один из праймеров помечен флуоресцентным красителем для визуализации продукта амплификации зонда. Анализ обнаружения на основе MLPA® можно проводить в одной пробирке, поскольку нелигированные зонды не нужно удалять.

Электрофорез последовательного типа используется для разделения полученных продуктов ПЦР.

Длина каждого зонда MLPA® разработана таким образом, чтобы ее можно было легко идентифицировать, когда продукт амплификации ПЦР пропускают через гель. Разница в размерах достигается с помощью последовательности наполнения.

Этапы выполнения обнаружения на основе MLPA® с помощью синтетических зондов MLPA® показаны на рисунке 4.

Денатурация.

Образец геномной ДНК денатурируют при температуре 98°C.

Гибридизация и лигирование.

Смесь зондов MLPA® добавляют к денатурированной геномной ДНК. Оба олигонуклеотида гибридизуются с целевой последовательностью. Затем зонды лигируют термостабильной лигазой.

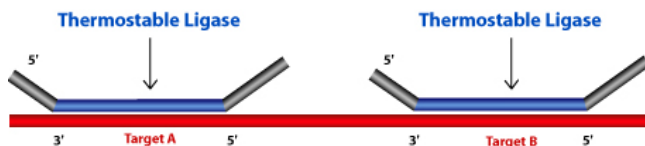


Рис. 4. Обнаружение на основе MLPA® с помощью синтетических зондов MLPA®

Амплификация.

Для амплификации всех лигированных зондов используется универсальная пара праймеров. Затем добавляют небольшое количество реакционной смеси, содержащей dNTP, Taq-полимеразу и один немеченый и один меченый праймер для ПЦР. Праймеры комплементарны универсальным последовательностям праймеров зондов MLPA®. Каждый зонд MLPA® имеет определенный размер, чтобы при анализе продуктов амплификации ПЦР на геле продукт каждого зонда можно было идентифицировать по его размеру. Для процедуры MLPA® требуется термочиклер и стандартное оборудование для секвенирования, позволяющее идентифицировать и количественно определять продукты амплификации.

Применение техники MLPA®

Определение количества копий гена: Число копий гена относится к количеству копий определенного гена в генотипе человека. Технику MLPA® можно использовать для установления числа копий до 40 последовательностей нуклеиновых кислот за одну реакцию. Изменения количества копий важно понимать. Они являются основной причиной увеличения или уменьшения экспрессии белка, кодируемого геном.

Методика MLPA® может использоваться для количественного обнаружения геномных делеций, дупликаций и точковых мутаций. MLPA® различает последовательности, которые отличаются даже одним нуклеотидом, и может использоваться для обнаружения известных мутаций. Лигируют только идеально подобранные зонды.

Анализ метилирования ДНК и профилирование мРНК. Известно, что aberrантное метилирование CpG-островков связано с инактивацией транскрипции генов-супрессоров опухолей при раке человека. MLPA® позволяет определять статус метилирования до 40 последовательностей за одну реакцию.

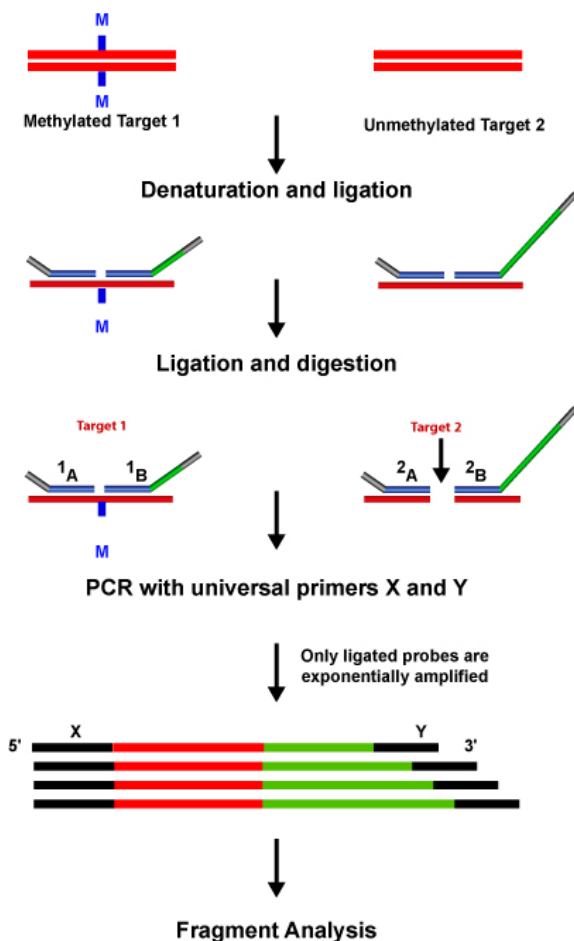


Рис. 5. Этапы MLPA

Параметры конструкции синтетических зондов MLPA® (Рис. 6).

Критерии длины: Длина последовательности гибридизации должна быть больше 21 основания, и две последовательности гибридизации должны быть расположены рядом друг с другом.

Длина ампликона: разработанные зонды должны иметь уникальную длину ампликона.

Критерии Tm: Tm датчиков должна составлять 72 +/- 5 °C.

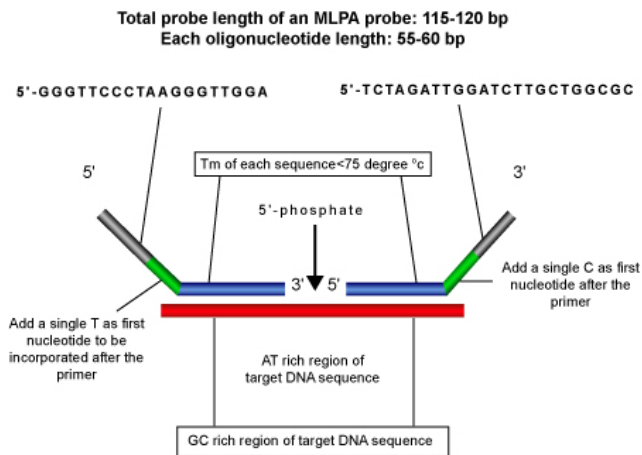


Рис. 6. Параметры конструкции синтетических зондов MLPA®

Избегайте гомологии: разработанные зонды должны быть уникальными. Гомологичных регионов следует избегать, выполняя поиск BLAST.

Вторичные структуры. Разработанные зонды следует проверить на наличие шпилек, самодимеров и пробегов. В идеале зонд должен иметь как можно меньше вторичных структур.

Уникальный сайт лигирования: во избежание ошибочного прайминга сайт лигирования и окружающие его нуклеотиды не должны быть гомологичны всем выбранным последовательностям.

Нуклеотид, следующий за праймером ПЦР: Первый нуклеотид, следующий за последовательностью праймера ПЦР, предпочтительно не должен быть аденином, поскольку это приводит к низкому размеру пика продукта амплификации зонда.

Специфичность зонда: для достижения максимальной специфичности оба олигонуклеотида должны иметь богатую АТ область вокруг места лигирования и прилегающую к ней область, богатую СG.

Преимущества техники MLPA ®

MLPA ® представляет собой разновидность полимеразной цепной реакции. Это облегчает амплификацию и обнаружение нескольких мишеней с

помощью одной пары праймеров. В стандартной реакции мультиплексной ПЦР каждому фрагменту требуется уникальная пара амплифицированных праймеров. Наличие этих праймеров в большом количестве приводит к различным проблемам, таким как димеризация и ложное праймирование. С помощью MLPA® амплифицируют не целевую ДНК, а только зонды. Таким образом, многие последовательности (до 40) можно амплифицировать и количественно оценить, используя всего лишь одну пару праймеров. По сравнению с другими методами реакция MLPA® быстрая, дешевая и очень простая в исполнении.

Kravchenko и соавторы (2015) были первыми, кто применил MLPA для детектирования SNP, и они разработали специальные левый и правый зонды SNP-сайтов для оптимизации условий, таких как состав, концентрация и температура реакции. Чтобы повысить специфичность гибридизации, они добавили несовпадающие основания вокруг целевых SNP-сайтов. При этом области гибридизации зондов подбирались по-разному, чтобы избежать таутомерии праймеров. Для аллелей дикого типа зонд MLPA предназначен для связывания с обратной цепью, в то время как для мутировавших аллелей зонд предназначен для связывания с прямой цепью. Это исследование показывает, что оптимизированный MLPA очень подходит для обнаружения мелкомасштабного SNP-генотипирования. Несмотря на то, что несколько исследований показали, что MLPA может быть использована для обнаружения SNP, применение MLPA в обнаружении SNP ограничено, вероятно, потому, что MLPA не может продемонстрировать превосходство над существующими более простыми и экономичными технологиями.

Мультиплексное генотипирование SNP с помощью аллель-специфической ПЦР на основе Stem-Loop и универсальных флуоресцентно-меченных праймеров

Wang и коллеги (2019) представили новый метод генотипирования SNP, который можно выполнить в одной пробирке с использованием обычного амплификатора, а детекцию результатов осуществить с использованием генетического анализатора. В основу данного метода положен метод аллель-специфической ПЦР по принципу «стебель-петля» и использование универсальных флуоресцентных праймеров для достижения мультиплексного генотипирования SNP (рис. 7).

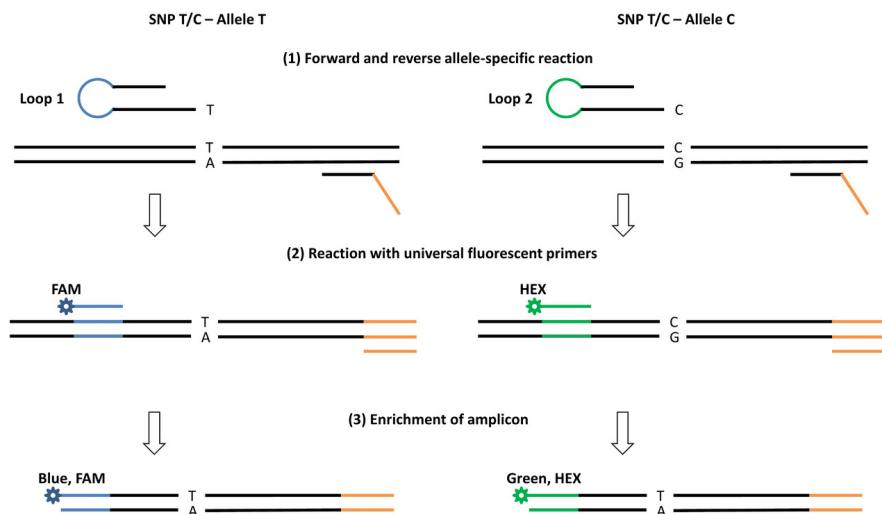


Рис. 7. Принцип анализа. Показаны этапы генотипирования T/C SNP. Сначала праймеры «стебель-петля» связываются с матрицей и выполняют аллель-специфическую реакцию. Затем универсальные флуоресцентные праймеры связываются с петлями праймеров «стебель-петля», чтобы продолжить реакцию ПЦР. После этого при обогащении ампликона флуоресцентные сигналы будут обнаруживаться генетическим анализатором

С использованием данного метода авторы успешно генотипировали в мультиплексном режиме 4 SNP. Для каждого SNP были разработаны аллель-специфичные праймеры с различной длиной, и два аллеля каждого SNP отличались двумя разными петлями и флуоресценцией. Продукты ПЦР-реакции каждого образца разделяли на секвенаторе ДНК ABI 3730XL. Изображения флуоресценции гомозиготных мышей C57BL/6 (BB) и Chr1daxin (WW), количественно оцененные с помощью GeneMapper, показаны на рис. 8. Синяя флуоресценция указывает на то, что SNP получен от мышей C57BL/6, тогда как зеленая флуоресценция получена от мышей chr1daxin. Размер продукта rs68317494 (121 п.н.) позволяет предположить, что этот SNP произошел из T-сайта C57BL/6, а 123 п.н. - из C-сайта Chr1daxin. Так же, как SNP rs71342945, rs74107267 и rs77085538 с 136/138, 147/149 и 160/162 п.о. соответственно.

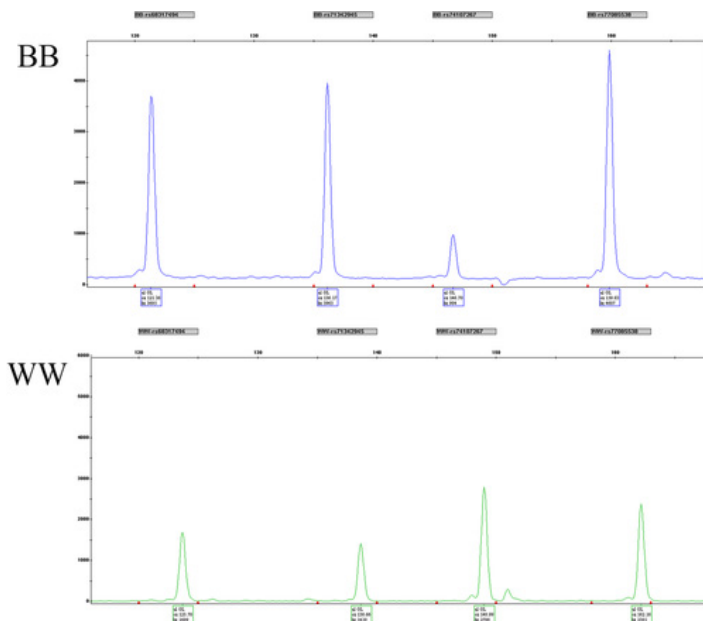


Рис. 8. Изображения флуоресценции гомозиготных мышей C57BL/6 (BB, синий) и Chr1daxin (WW, зеленый). Геномную ДНК BB и WW выявляли с помощью праймеров «стебель-петля» и универсальных флуоресцентных

праймеров. Продукты ПЦР анализировали на анализаторе 3730XL. Аллели с синими флуоресцентными сигналами происходят от C57BL/6, а аллели с зелеными флуоресцентными сигналами происходят от Chr1daxin. Данный метод показал очень хорошие результаты:

Во-первых, он очень специфичен и эффективен. Неспецифического сигнала или димера праймера не было, хотя все аллель-специфичные праймеры использовались в одной пробирке. Специфическая амплификация была вызвана конкуренцией между аллель-специфичными реакциями ПЦР. Во время отжига праймеры «стебель-петля» связываются с матрицей, в то время как несвязывающиеся праймеры самособираются в шпильку, чтобы предотвратить их связывание с другими праймерами или матрицами. Сообщалось о подобных методах с использованием линейных праймеров, хотя они должны вводить в праймеры несколько измененных сайтов (Nakamoto-Matsubara et al., 2014; Yaku et al., 2008) и неизбежно снижают специфичность. Во-вторых, одновременно можно обнаружить несколько SNP. Для многих биологических и генетических исследований необходимо протестировать большое количество образцов и SNP. Эта стратегия может удовлетворить потребности. Для каждого SNP требуется всего два универсальных флуоресцентных праймера вместо нового набора флуоресцентных зондов. Это не только значительно увеличивает производительность обнаружения SNP, но также экономит много средств, поскольку флуоресцентные праймеры являются наиболее дорогими реагентами, используемыми в методе генотипирования SNP (Tran et al., 2018; Gaedigk et al., 2015). Более того, традиционный метод использует агарозный электрофорез для обнаружения каждого участка аллели (Nakamoto-Matsubara et al., 2014; Yaku et al., 2008), что не только отнимает много времени, но и характеризуется определенными неудобствами. Данный метод генотипирования заключается в одновременном обнаружении нескольких сайтов SNP в одном образце с помощью PAGE, что делает экспериментальный процесс более удобным.

В-третьих, метод точен. Анализ четырех различных SNP полностью согласуется с результатами генотипирования методом PCR-LDR, и пока оба аллель-специфичных праймера «стебель-петля» использовались в одной пробирке, было отмечено отсутствие неспецифического сигнала.

У метода есть ограничение. Для аллель-специфической ПЦР 3'-конец прямого праймера фиксирован, поэтому выбор подходящих праймеров для амплификации геномной ДНК не является гибким. Для четырех выбранных SNP удалось получить эффективные результаты амплификации. Но некоторые специальные последовательности с непостоянным содержанием GC в геноме не могут быть так легко амплифицированы. Однако этот недостаток можно преодолеть путем разработки прямых аллель-специфичных праймеров в противоположном направлении или путем корректировки положения обратного аллель-специфического праймера или путем выбора более эффективного фермента Taq.

Мультиплексное генотипирование SNP с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF

Метод масс-спектрометрии предусматривает измерение отношения массы заряженных частиц вещества к их заряду. Существуют различные способы ионизации органических веществ в зависимости от природы и фазы вещества. Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionisation) позволяет ионизировать крупные биомолекулы без их деградации и заключается в облучении короткими лазерными импульсами образца, представляющего собой твердый раствор анализируемого соединения в органической матрице. Матрица выбирается таким образом, чтобы ее молекулы активно поглощали фотоны, эмитируемые УФ или ИК-лазером. Над поверхностью образца создается плотная высокотемпературная плазма, в которой наряду с молекулами и ионами матрицы оказываются и молекулы анализируемого соединения. Ионизация последних путем поглощения энергии фотонов или в результате ионно-молекулярных реакций приводит к образованию положительных и отрицательных ионов, которые выталкиваются высоким потенциалом из области ионизации и направляются в анализатор. В анализаторе заряженные частицы разделяются по времени пролета определенного расстояния (TOF, time of flight), при этом время пролета пропорционально соотношению массы частицы к ее заряду. В настоящее время методом MALDI-TOF успешно анализируют пептиды, белки, нуклеотиды, полисахариды, синтетические полимеры, гуминовые кислоты, органические комплексные соединения и другие биомолекулы с молекулярными массами до нескольких сотен тысяч дальтон (Cole, 2012). Степанов В.А. и Трифонова Е.А. (2013) осуществляли мультиплексное генотипирование SNP с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. Ими были определены аллельные частоты 56 SNP в 41 гене, продукты которых участвуют в регуляции иммунного ответа, в четырех исследованных российских популяциях человека (русские, коми, ханты и буряты).

Основные этапы эксперимента. Мультиплексное генотипирование проводили на масс-спектрометре MassARRAY Analyzer 4 (“Sequenom”, США). Процесс подготовки и анализа образцов состоял из ряда последовательных этапов:

мультиплексная ПЦР;
SAP-реакция;
iPLEX-реакция;
ионизация и анализ спектров.

После iPLEX-реакции образцы обессоливают, наносят на SpectroCHIP и анализируют с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Авторы выбранные SNP объединяли в два мультиплекса: первый включал 34 полиморфных варианта, второй – 24. К каждому маркеру подобрали по два ПЦР-праймера (прямой и обратный) и пролонгирующий праймер для iPLEX-реакции. В масс-спектрометрическом анализе продуктов мультиплексной ПЦР для успешной идентификации маркеров и аллелей необходимо, чтобы масса пролонгирующих праймеров различалась, по крайней мере, на 30 Да для различных SNP и на 5 Да между ампликонами альтернативных аллелей одного маркера.

Мультиплексная ПЦР. Цель данного этапа –наработка ампликонов, которые содержат исследуемые SNP.

SAP-реакция. SAP-реакция – дефосфорилирование не включенных в ампликоны дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs) щелочной фосфатазой (SAP). Данный этап необходим для удаления из продуктов амплификации не прореагировавших dNTPs. В продукты амплификации, полученные на первом этапе, добавляют SAP-смесь, состоящую из однократного SAP-буфера и 0.5 единиц на образец щелочной фосфатазы креветок. Далее ПЦР-планшеты центрифугируют и инкубируют при 37°C в течение 40–50 мин, а затем, для инактивации SAP, прогревают при 85°C в течение 5–20 мин.

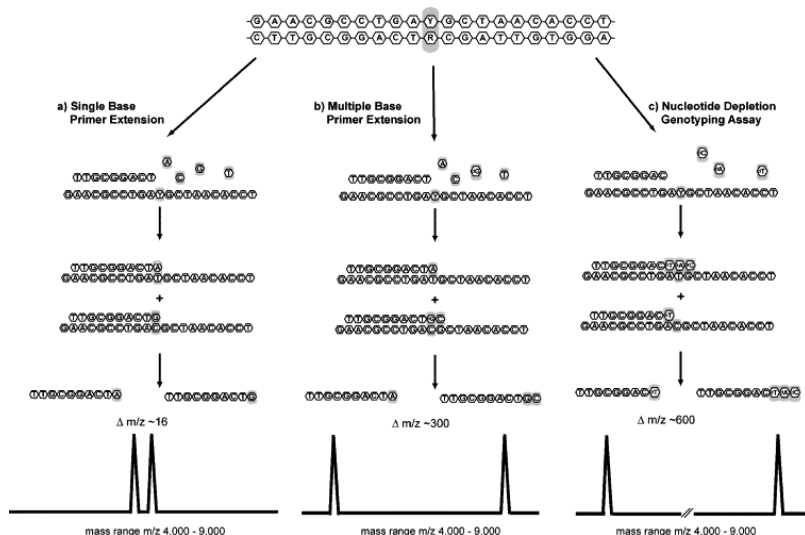


Рис. 9. Принцип генотипирования с использованием Maldi-ToF (Tost , Gut, 2005)

iPLEX-реакция. На этом этапе происходит мультиплексное удлинение пролонгирующих праймеров путем включения модифицированного дидезокситрифосфата (ddNTP) с модифицированной массой, комплементарного нуклеотида, находящегося в полиморфной позиции каждого из SNP. В результате образуется смесь коротких ПЦР-продуктов, соответствующих аллелям представленных в мультиплексе полиморфных маркеров. После SAP-реакции в образец добавляют раствор, содержащий десятикратный iPLEX-буфер, ДНК-полимеразу, четыре ddNTPs с измененной молекулярной массой, и смесь пролонгирующих праймеров. Необходимо отметить, что вследствие зависимости между детектируемой интенсивностью и массой анализируемого вещества в масс-спектрометрии MALDI-TOF, требуются различные концентрации пролонгирующих праймеров в реакционной смеси (концентрация праймеров с низкой молекулярной массой должна быть меньше концентрации праймеров с большей массой). Очистка ПЦР-продуктов (обессоливание образцов). Чтобы избежать повышенного

фоновому шуму в масс-спектрометрическом анализе, необходимо очистить реакционную смесь от солей, накопившихся при мультиплексной ПЦР и iPLEX-реакции. Для удаления ионов Na^+ , K^+ , и Mg^{2+} продукты реакции обрабатывают смолой.

Перед ионизацией образцов и анализом масс-спектров образцы необходимо перенести на спектро-чип. Спектро-чип представляет собой 96- или 384-луночный носитель с MALDI-матрицей для ионизации. Перенос образцов из ПЦР-планшетов на спектро-чип осуществляется в автоматическом режиме на рабочей станции Nano-dispenser RS1000. Спектро-чип помещается в рабочую камеру масс-спектрометра, где происходит последовательная ионизация образца в каждой из лунок чипа и разделение ионизированных частиц по массе. Процесс ионизации и получения масс-спектров 96-луночного спектро-чипа занимает примерно 20 минут. Анализ масс-спектров в реальном времени проводят с помощью программного обеспечения MassARRAY TYPER 4.0 ("Sequenom"). Этот же пакет программ используют для дальнейшего анализа и документирования результатов эксперимента.

Высокопроизводительное генотипирование с использованием Fluidigm

TaqMan представляет собой односложную реакцию: одна пробирка, один SNP. Его можно мультиплексировать до 3 или 4 SNP на реакцию с дополнительными флуоресцентными красителями, но, по словам Фиби Уайт, старшего директора по приложениям для генотипирования Applied Biosystems, дальнейшее мультиплексирование маловероятно, поскольку для этого потребуются новые химические процессы и более сложные считыватели.

Однако появились усовершенствования рабочего процесса. Applied Biosystems объявила о сотрудничестве с компанией BioTrove, расположенной в Вобурне, штат Массачусетс, США, для разработки интегрированной платформы для высокопроизводительного генотипирования на основе архитектуры BioTrove OpenAgra, которая способна проводить 3072 реакции ПЦР по 33 нл на одном предметном стекле.

Чип представляет собой динамический массив 48.48CS, установленный на пластиковом носителе с интерфейсом и защитными аккумуляторами, а также 48 входами для проб и 48 входами для анализа. Чип способен тестировать 48 образцов с помощью 48 анализов SNP. Они объединяются попарно, образуя 2304 реакционных камеры с конечным объемом 6,75 нл. Интегрированный жидкостный контур (IFC) представляет собой сеть жидкостных линий, клапанов NanoFlex™ и камер. Клапаны NanoFlex™ изготовлены из эластомерного материала, который прогибается под давлением, создавая герметичное уплотнение, и используются для регулирования потока жидкостей в IFC. Перед загрузкой чип заполняется с помощью контроллера NanoFlex™ 4-IFC, который создает давление в линиях управления и закрывает интерфейсные клапаны. Отдельные образцы вводятся пипеткой во входные отверстия для проб, а тесты TaqMan® для генотипирования вносятся во входные отверстия детектора. Затем чип помещается обратно в контроллер NanoFlex™ 4-IFC для загрузки и

смешивания. Во время этого процесса к жидкости во входных отверстиях для проб прилагается давление, и жидкость выталкивается в линии для проб. В то же время жидкость из входных отверстий для анализа выталкивается в линии для аналитической жидкости. Смешение двух жидкостей предотвращается закрытым интерфейсным клапаном (Wang et al., 2009).

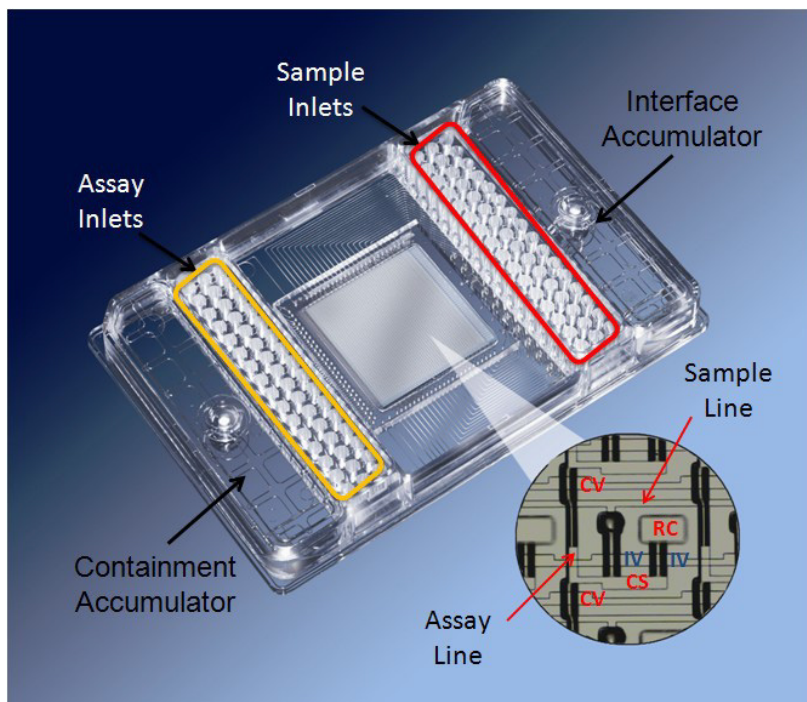


Рис. 10. Динамический массив 48,48CS

В этом чипе (рис. X) используется конструкция, известная как конструкция с переносной пробкой (CS), обеспечивающая точное дозирование объемов жидкости и эффективное смешивание отмеренных объемов. Первый раствор вводится в сегмент проточного канала, сообщаемого по текучей среде с реакционной камерой. Второй раствор (смесь проб) пропускается через сегмент так, что первый (анализируемый) раствор вытесняется в реакционную камеру, и в камеру поступает некоторый объем второго раствора. Затем

камеру изолируют, и реакции внутри нее можно инициировать с помощью термоциклирования. Процесс смешивания загрузки занимает около 45 минут. После завершения загрузки и смешивания чип помещается в автономный термоциклер ПЦР для ПЦР. Объемы, задействованные при проведении генотипирования на Dynamic Array, значительно снижают расход реагентов для генотипирования и трудозатраты.

После завершения ПЦР данные конечной точки флуоресцентного изображения собираются в системе BioMark™ для генетического анализа и анализируются с использованием программного обеспечения Fluidigm SNP Genotyping Analysis для получения генотипов. На рисунке 11 показано необработанное изображение чипа, работающего как во флуоресцентных каналах FAM (пики возбуждения и эмиссии при 495 и 520 нм соответственно), так и VIC (пики возбуждения и эмиссии при 538 и 554 нм соответственно). Показано компьютерное изображение генотипов для каждой из 2304 реакционных камер. Каждый столбец (вертикальное направление) представляет данные одного анализа, которые коррелируют с анализом генотипирования SNP, загруженным из каждого входного отверстия для анализа.

Плюсом данной системы генотипирования является ее открытость по отношению к исследуемым SNP, исследователь может сам подобрать желательные мутации и разработать дизайн праймеров. Существует три различных типа динамических массивов Fluidigm: динамический массив 48.48, который дает 2304 точки данных с 48 выборками и 48 маркерами, а также динамические массивы 96.96 и 192.24, которые дают 9216 и 4608 точек данных соответственно (Wang et al., 2009; Thomson). Эта система может сэкономить как ресурсы, так и время за счет сокращения объемов реакции до 7–10 нл и получения 2304–9216 точек данных в течение 2–4 часов (Thomson, 2014), в то время как для 384- и 96-луночных систем ПЦР требуется 5–20 мкл. объемов реакции на лунку, и для получения такого же количества точек данных с помощью систем ПЦР требуется 4–8 дней (Kim et al., 2017).

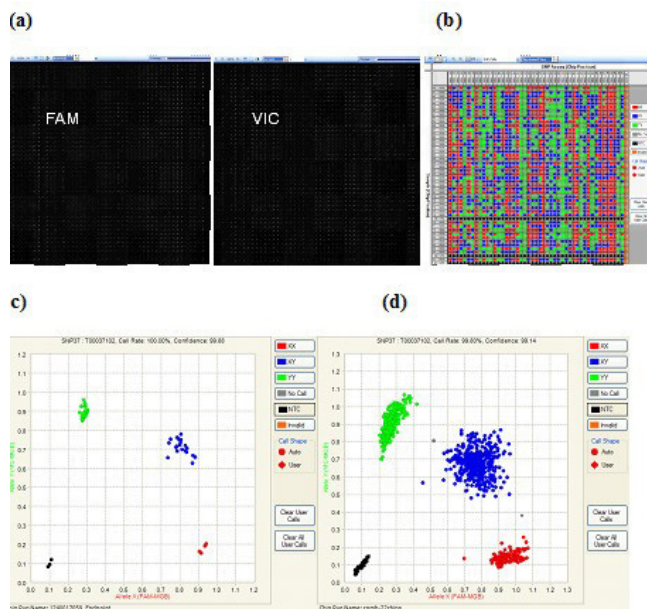


Рис. 11. Анализ данных генотипирования SNP. Программное обеспечение Fluidigm SNP Genotyping Analysis автоматически анализирует изображение конечной точки запуска генотирующего чипа и генерирует вызовы генотипирования для каждого образца. (а). Необработанный снимок чипа 48.48CS, работающего по флуоресцентным каналам FAM и VIC. (б). Программное обеспечение создало карту генотипов для каждой из 2304 реакционных камер. (с) График рассеивания, созданный программным обеспечением для 48 образцов в одном анализе SNP с автоматическим определением генотипа. Наблюдаются четыре разных цвета, 3 генотипа плюс отрицательный контроль (NTC, черные точки). (d) Диаграмма разброса генотипирования образцов из 22 серий чипов

Полногеномное генотипирование с использованием биочипов

Самый эффективный способ связать SNP с фенотипом — это так называемое полногеномное ассоциативное исследование, при котором на образец сканируются сотни тысяч или даже миллионы полиморфизмов. Инструментами являются микрочипы ДНК, и исследователи в основном поддерживают две конкурирующие технологии от Illumina из Сан-Диего и Affymetrix из Санта-Клары, Калифорния, США.

Несмотря на схожесть формата, размера и применения, эти два продукта существенно различаются. Во-первых, в массивах Illumina используются 50-мерные олигомеры, по одному на каждый SNP, по сравнению с 25-мерными Affymetrix, в которых на аллель приходится около 4–6 повторяющихся зондов. Кроме того, хотя анализ Infinum компании Illumina, работающий на чипе 1M-Duo, использует однобазовое расширение с маркированным основанием для генотипирования SNP, методы Affymetrix основаны исключительно на дифференциальной гибридизации (Perkel, 2008).

Но самое важное различие касается стратегий выбора SNP обеих платформ. Зонды Illumina почти полностью основаны на метках гаплотипов «tagSNP», идентифицированных Международным консорциумом HapMap. Однако только около половины зондов SNP в массиве Affymetrix являются tagSNP, остальные представляют собой «непредвзятые» SNP, выбранные для покрытия генома с учетом ограничений последовательности, налагаемых самим анализом. Протокол Affymetrix включает этап «уменьшения сложности», включающий отбор относительно небольших (200–1100 п.н.) рестрикционных фрагментов перед гибридизацией. Фактически можно отслеживать только SNP, расположенные в этих регионах, хотя компания заявляет, что анализ обеспечивает 90% геномного покрытия. Существуют чипы различной емкости, однако система генотипирования с использованием таких чипов требует наличие дорогостоящего оборудования – сканеры чипов, высококвалифицированного персонала. При необходимости разработки чипа под нужды заказчика дизайн разрабатывает фирма изготовитель чипов.

Ramos и коллеги (2009) осуществляли конструирование чипа porcine60K для свиней в формате Illumina. Они использовали образцы ДНК, полученные от четырех пород свиней, включая дюрок, пьетрен, ландрас, крупная белая и дикого кабана. Для каждой выборки был подготовлен единый пул ДНК, содержащий равные количества ДНК из всех образцов. Количество животных в пуле составляло 34, 23, 29, 36 и 36 для DU, PI, LR, LW и WB, соответственно. Образцы ДНК коммерческих пород были репрезентативными для мирового распространения пород (образцы были получены из США, Нидерландов и Дании), тогда как образцы кабана были собраны в основном в Европе, причем пять образцов были получены из Японии.

Для каждой группы в общей сложности 25 мкг ДНК из каждого пула, разделяли на пять аликвот по 5 мкг каждая, подвергали гидролизу каждым из трех рестрикционных ферментов Alu I, Hae III и Msp I (Fermentas GmbH, Санкт-Леон-Рот, Германия). По завершении гидролиза фрагменты фракционировали с помощью 10% неденатурирующего полиакриламидного геля. Из геля вырезали фрагменты определенного размера. Диапазоны размеров вырезанных фрагментов различались в разных библиотеках и включали фрагменты размером 160–200 п.н. (короткие Alu I), 200–240 п.н. (длинные Alu I), 160–200 п.н. (Hae III) и 100–200 п.н. (Msp I). Днк вырезали из геля и чистили, после этого количественно оценивали с помощью спектрофотометрии, и 300 нг очищенной ДНК использовали для создания RRL (библиотеки сокращенного представления) для секвенирования.

Все библиотеки были секвенированы на генетическом анализаторе 1G. Длина всех последовательностей, полученных в этом исследовании, составила 36 нуклеотидов. Кроме того, два объединенных образца, полученных из каждого из RRL Alu I, были приготовлены и секвенированы с использованием системы 454 FLX (Roche Applied Science) на платформе GS FLX.

Необработанные данные сиквенсов были отфильтрованы по различным критериям. Эталонный геном, по которому были выровнены последовательности длиной 36 п.н., включал все аутосомы свиньи и

Х-хромосому. Степень завершения сборки каждой хромосомы различалась, поскольку секвенирование генома свиньи на тот момент еще не было завершено. Последовательности были сопоставлены с собранным эталонным геномом, и первоначальное обнаружение SNP было выполнено с использованием MAQ (Li et al., 2008). Для обнаружения SNP рассматривались только прочтения, соответствующие одному уникальному местоположению генома. Поскольку MAQ называет SNP как любую разницу между прочтениями или между прочтениями и эталонным геномом, первоначальные выходные данные предсказания SNP MAQ велики и должны быть отфильтрованы. Для исключения менее надежных SNP из набора данных использовалось несколько критериев. Для MAQ были установлены пороговые значения для прогнозирования надежных SNP. В частности, минимальное качество карты MAQ для чтения, минимальное согласованное качество и минимальное качество карты наилучшего чтения сопоставления для каждой прогнозируемой позиции SNP использовались в качестве критериев для выбора надежных SNP путем установки пороговых значений для всех трех параметров на уровне 10 (SNP с любыми значениями). Менее 10 были исключены. Минорный аллель каждого SNP должен был быть представлен как минимум в трех прочтениях и чтобы общее количество прочтений на каждый SNP было ниже 120 (SNP с более высокой глубиной чтения были отброшены). Окончательный набор SNP включал идентифицированные de novo SNP, прошедшие все фильтры.

В дополнение к идентифицированным de novo SNP, окончательный набор данных SNP свиней также включал ранее идентифицированные SNP, которые были доступны из различных общедоступных источников, включая SNP, обнаруженные в пилотном исследовании, проведенном в Университете Вагенингена с использованием Dra I RRL (Amaral et al., 2009), SNP, полученные из 7K свиного чипа SNP Illuminium Custom Infinium Bead, SNP, идентифицированные с помощью высокопроизводительного пиросеквенирования (Wiedmann et al., 2008), SNP, обнаруженные посредством

секвенирования по Сэнгеру в INRA, и общедоступные SNP из dbSNP, включая коллекцию свиных SNP, полученных из нескольких источников, собранных Университетом Кембриджа.

Информация о 44 236 SNP, полученных из библиотеки Нае III, с информацией о фланкирующих последовательностях была доступна для проверки процедуры вызова SNP. Эти маркеры были отсортированы по предсказанному местоположению в геноме, и каждая сороковая последовательность была обработана с использованием программного обеспечения Sequenom Assay Design. Исходя из результатов, группы были разработаны так, чтобы иметь 32 мультиплексированных SNP на лунку. Критическими особенностями, которые необходимо было протестировать, были положение SNP в считанной последовательности GA, средний показатель качества мажорного основания, количество идентифицированных аллелей, а также положение в геноме. Девять аналитических групп (288 отдельных SNP) были выбраны для представления SNP во всех тестируемых категориях. 128 хряков, которые были использованы в RRL, были индивидуально генотипированы, чтобы позволить определить истинные частоты аллелей SNP в обнаруженной популяции.

Окончательный набор SNP свиней, включающий 549282 идентифицированных *de novo* и общедоступных SNP, был отправлен в компанию Illumina для расчетной оценки. Помимо оценки дизайна Illumina и типа анализа Infinium, учитывались другие параметры, такие как предполагаемый MAF SNP, расстояние между SNP вдоль каждой хромосомы, охват всего генома (количество SNP, выбранных для каждой хромосомы), наличие других SNP в пределах 40 п.о. от каждого целевого SNP и доступной информации о скорости конверсии SNP. Из списка были исключены все запатентованные SNP. По завершении процесса отбора список SNP вручную проверялся на наличие больших промежутков (>250 КБ) между SNP. Выявленные большие пробелы были визуально проверены, и размер пробелов уменьшился путем ручного выбора SNP для уменьшения размера разрыва.

Поскольку доступная последовательность генома свиньи (сборка 7) покрывала только 70% генома, 70% SNP, выбранных для включения в анализ, происходили из тех, положение которых в сборке генома 7 было известно. Чтобы обеспечить полный охват генома свиньи, оставшиеся 30% SNP были выбраны из списка SNP, которые не удалось картировать в 7-й сборке генома свиньи.

Чтобы оценить эффективность Illumina iSelect BeadChip, который стал коммерчески доступен как PorcineSNP60, панель из 64232 маркеров, прошедших информационную проверку, была использована для генотипирования всех 158 особей, которые были включены в исходную версию. Маркеры оценивали по интенсивности сигнала, устойчивому образованию кластеров и разделению кластеров. 62121 локус, прошедший проверку, составил панель PorcineSNP60.

Генотипирование SNP с использованием секвенирования нового поколения

Благодаря секвенированию нового поколения в последние годы количество данных эталонных последовательностей геномов и данных SNP различных организмов быстро увеличивается. Поэтому существует постоянно растущая потребность в генотипировании SNP для различных целей (Chen et al., 2016). Традиционные методы, такие как Taqman, Sequenom и SNaPshot (Syvanen, 2001), являются гибкими в контексте использования ограниченного числа локусов SNP для сотен образцов, но нужны более эффективные и экономичные методы для высокопроизводительного генотипирования SNP. Генотипирование SNP на биочипе представляет собой высокопроизводительный метод, который ограничивается определенными локусами SNP и не является гибким. Секвенирование нового поколения может обеспечить низкую стоимость и высокую производительность генотипирования. Этот метод позволяет одновременно секвенировать сотни образцов для получения тысяч или даже миллионов точных последовательностей для анализа генетических вариантов (Liu et al., 2012; Campbell et al., 2015). Таким образом, секвенирование следующего поколения является новым высокопроизводительным методом, который способен обнаруживать и генотипировать большое количество SNP за один проход (Boland et al., 2013; Abecasis et al., 2010).

Различные стратегии включают секвенирование следующего поколения для идентификации SNP и мутаций путем повторного секвенирования. Современные подходы включают короткую ПЦП (Sjoblom et al., 2006), длинную ПЦП (Craig et al., 2008), мультиплексную ПЦП (Meuzelaar et al., 2007), гибридный захват (Gnirke et al., 2009; Albert et al., 2007) и молекулярные инверсионные зонды (Porreca et al., 2007). Эти стратегии также подходят для генотипирования SNP известных локусов. Среди них мультиплексная ПЦП является желательным выбором для генотипирования большого набора SNP, поскольку она менее трудозатратна и экономически эффективна, достаточно

гибка в разработке и требует меньшего количества матричной ДНК (Campbell et al., 2015). Однако по-прежнему остаются две основные проблемы при проведении мультиплексной ПЦР в сочетании с секвенированием нового поколения. Первая проблема заключается в сложности обеспечения равномерного количества ампликонов в одной реакции ПЦР, которая содержит десятки пар праймеров. Различные праймеры имеют плохую однородность в мультиплексной ПЦР из-за систематической ошибки амплификации (Varley et al., 2008), а мультиплексная ПЦР обычно ограничивается одновременной амплификацией 10-20 локусов из-за образования димеров праймеров и событий неправильного прайминга. Чтобы уменьшить конкуренцию праймеров, исследователи использовали эмульсионную ПЦР для разделения каждой пары праймеров, при этом 90,2% всех ампликонов попадали в 25-кратный диапазон численности (Nguyen-Dumont et al., 2013). Вторая проблема — это единообразие продукции разных образцов (Sjoblom et al., 2006). Поскольку продукты мультиплексной ПЦР из тысяч образцов необходимо смешивать перед их секвенированием, различия между образцами могут вызвать ошибку покрытия последовательности и снизить эффективность секвенирования.

Chen и коллеги (2016) представили новый трехраундный метод мультиплексной ПЦР в сочетании с секвенированием нового поколения, который позволяет одновременно амплифицировать множество локусов и точно генотипировать SNP. Схема данного метода показана на рисунке 12.

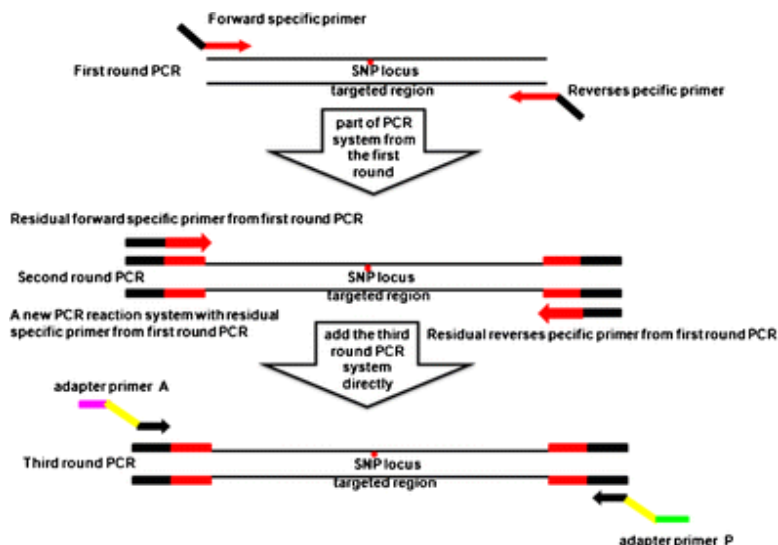


Рис. 12. Схема трехраундового метода ПЦР с последующим секвенированием NGS

Этот метод обогащает целевые области в первых двух раундах реакции ПЦР и максимально использует остаточные праймеры, чтобы уменьшить несоответствие в амплификации между различными локусами. В реакции ПЦР третьего раунда уникальные праймеры-адаптеры добавляются к концам целевых областей каждого образца, чтобы различать информацию SNP между разными образцами в последующей реакции секвенирования. Они амплифицировали 37 локусов из 757 геномных ДНК человека и секвенировали ампликоны за один проход на платформе Ion torrent PGM. Этот метод показал желаемые результаты с точки зрения охвата и единообразия локусов SNP после трех раундов амплификации и продемонстрировал, что трехраундовый метод ПЦР является мультиплексным, специфичным и единообразным, имеет огромный потенциал для генотипирования SNP с использованием секвенирования следующего поколения.

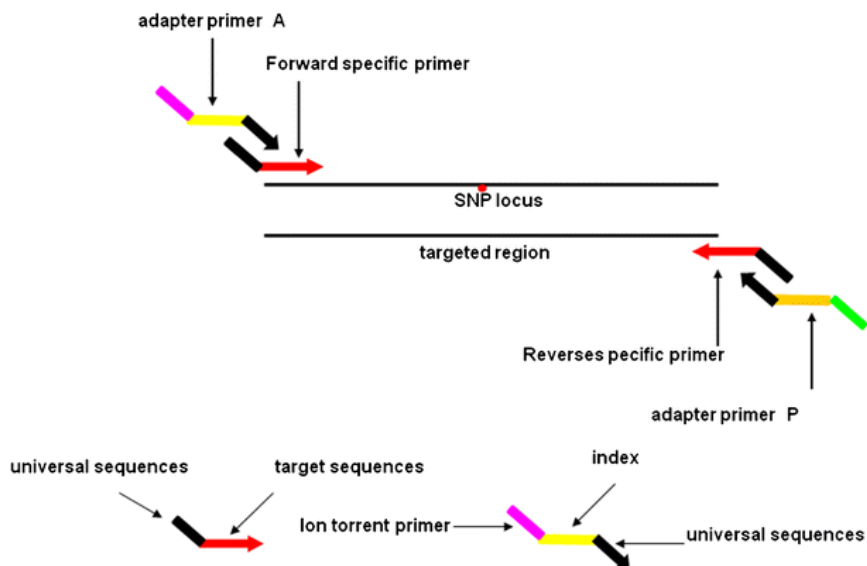


Рис. 13. Схематический обзор особенностей конструкции капсулей. Каждый конкретный праймер состоит из универсальных фланкирующих последовательностей длиной 18 пар оснований (черные), уникальных целевых плеч длиной 19-20 пар оснований (красные). Специфический праймер предназначен для обогащения мишеней, содержащих локус SNP. Адаптерный праймер включает в себя ионный торрент-праймер А на 30 пар оснований (розовый), который представляет собой праймер для секвенирования, или ионный торрент-праймер на 23 пар оснований Р (зеленый), фиксированный в шарике, уникальный индекс 10-12 пар оснований (желтый) и универсальные последовательности (черные). Адаптерные праймеры добавляют ионно-торрентный праймер к конкретным праймерам, чтобы можно было напрямую помещать продукты ПЦР в последующую эмульсионную ПЦР (Chen et al., 2016).

Таким образом, трехраундная ПЦР способствует повышению однородности ампликонов. В первом раунде ПЦР используются низкие концентрации специфических праймеров и выполняются несколько циклов.

Специфические праймеры отжигаются с целевыми областями и амплифицируются целевая последовательность. Во втором раунде ПЦР часть продуктов первого раунда добавляется в новую реакционную систему ПЦР без добавления праймеров, чтобы полностью израсходовать свободные остаточные праймеры из первого раунда, что приводит к равномерному количеству продукта в системе мультиплексной реакции. В третьем раунде ПЦР целевые ампликоны каждого образца амплифицируются вместе одновременно с адаптерными праймерами. Многие целевые локусы можно исследовать в одной пробирке на образец. Для объединения и секвенирования нескольких образцов каждый образец выполняется отдельно и имеет разные адаптерные праймеры с уникальными индексными последовательностями для указания идентичности образца.

Мультиплексное ПЦР-целевое секвенирование ампликонов (MTA-Seq)

В последнее время для выяснения генетического разнообразия широко используются несколько экономичных и экономичных методов генотипирования SNP посредством высокопроизводительного секвенирования, таких как секвенирование ДНК, связанное с сайтами рестрикции, и генотипирование путем секвенирования (Davey et al., 2011; Onda, Mochida, 2016). Однако, поскольку эти методы не нацелены на конкретные полиморфизмы, ожидается, что частота обычно называемых сайтов SNP будет снижаться вместе с увеличением размера популяции (Marchini, Howie, 2010; Rutkoski et al., 2013; Fu, 2014; Fu et al., 2016), и, следовательно, они могут не подойти для панелей генотипирования.

Мультиплексное ПЦР-целевое секвенирование ампликонов (MTA-Seq) (Onda et al., 2018) - простой, индивидуальный метод целевого повторного секвенирования, названный «мультиплексная ПЦР, нацеленная на секвенирование ампликонов (MTA-seq)», позволяющий легко создавать настраиваемые панели целевых SNP-маркеров у различных организмов, облегчая широкий спектр высокопроизводительных генетических приложений, таких как генетическое картирование, популяционный анализ, геномная селекция и других. Секвенирование ампликонов на основе мультиплексной ПЦР является идеальным подходом к анализу полиморфной панели из нескольких сотен целевых SNP-маркеров в масштабе популяции и использованию широкого спектра генетических приложений, таких как филогенетический анализ, анализ структуры популяции и картирование QTL (Brachi et al., 2011; Andrews et al., 2016). В настоящее время доступны коммерческие наборы для секвенирования ампликонов, в том числе TruSeq Custom Amplicon, разработанный Illumina (Csernák et al., 2016), и пользовательские панели ДНК Ion AmpliSeq, продаваемые Thermo Fisher Scientific (Millat et al., 2014; Glotov et al., 2015). Более того, целевое секвенирование ампликонов эффективно позволяет генотипировать

небольшие количества ДНК, полученные из образцов, таких как высушенный гербарий и ископаемые образцы (Gugerli et al., 2005; Délye et al., 2013; Beck and Semple, 2015). Таким образом, панели маркеров SNP, оптимизированные для мультиплексного секвенирования ампликонов, полезны в различных областях исследований, включая эволюционную, экологическую, сельскохозяйственную и популяционную генетику (Savolainen et al., 2013; Tiffin and Ross-Ibarra, 2014 ; Kumar et al., 2015). Разработанный Onda и соавторами (2018) способ позволил генотипировать 400 SNP. На рисунке X представлена схема MTA-Seq.

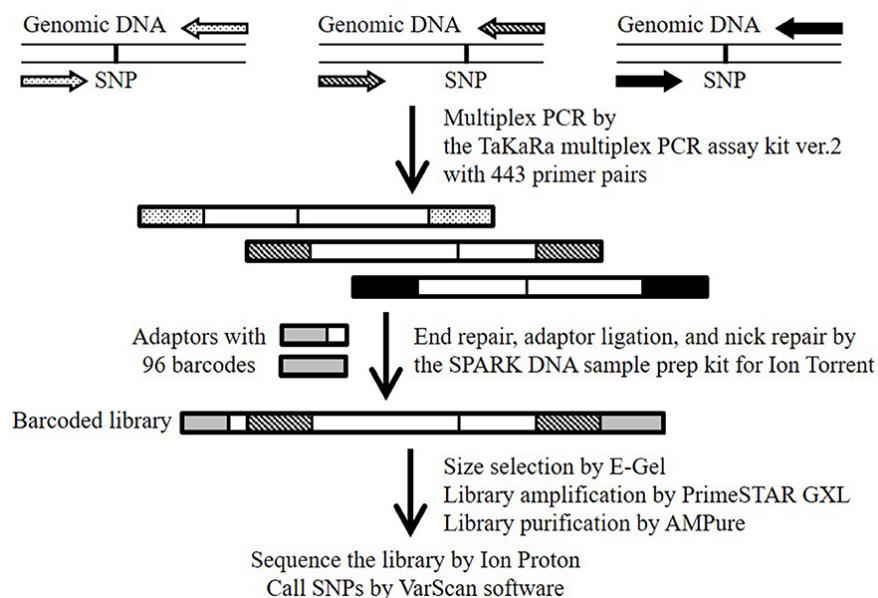


Рис. 14. Схематический обзор рабочего процесса MTA-seq. Пары праймеров (443) были созданы для получения ампликонов, несущих один известный SNP. Высокомультиметная ПЦР проводилась с использованием набора для мультиплексной ПЦР-амплификации TaKaRa v.2. Ампликоны были восстановлены по концам, лигированы с помощью адаптера и восстановлены по разрывам с помощью набора для подготовки образцов ДНК SPARK для Ion Torrent. Для идентификации отдельных образцов был использован комплект

адаптеров штрих-кода Ion Xpress 1-96 с добавлением индексных адаптеров. Библиотеку со штрих-кодом секвенировали на секвенаторе Ion Proton. SNP вызывались с помощью команды «mpileup2cns» программного обеспечения VarScan.

Таргетное SNP-секвенирование Target SNP-seq

Zhang и коллеги (2021) разработали новый метод target SNP-seq, который сочетает в себе преимущества мультиплексной ПЦР-амплификации и высокопроизводительного секвенирования. По сравнению с KASP, микрочипами, GBS и другими методами генотипирования SNP, целевой SNP-seq характеризуется гибкостью как для SNP, так и для образцов, обеспечивает высокую точность, особенно при генотипировании полногеномных идеальных SNP с высоким полиморфизмом и консервативными фланкирующими последовательностями, а также является экономически эффективным. Для генотипирования сотен локусов SNP требуется 3 дня и 7 долларов за образец ДНК. С помощью таргетного SNP-секвенирования были установлены отпечатки ДНК 261 сорта огурца с 163 идеальными SNP из 4 612 350 SNP на основе 182 наборов данных повторного секвенирования огурцов. Целевой SNP-seq предоставляет новый способ выявления основных локусов SNP из всего генома для дактилоскопии ДНК сортов сельскохозяйственных культур. Высокая эффективность и низкая стоимость целевого SNP-seq более конкурентоспособны, чем нынешние методы генотипирования SNP, и он имеет отличные перспективы применения в генетических исследованиях, а также в продвижении процессов селекции в ближайшем будущем.

Генотипирование посредством target SNP-seq включает несколько этапов. Создание библиотеки таргетного SNP-seq состоит из двух раундов ПЦР (рис. 15). Первый раунд ПЦР заключался в захвате целевого локуса SNP и амплификации последовательности длиной 200–280 п.н. в образцах ДНК посредством мультиплексной ПЦР. Второй раунд ПЦР направлен на различение каждого образца ДНК путем добавления уникального адаптера штрих-кода. Полученную библиотеку ДНК секвенируют.

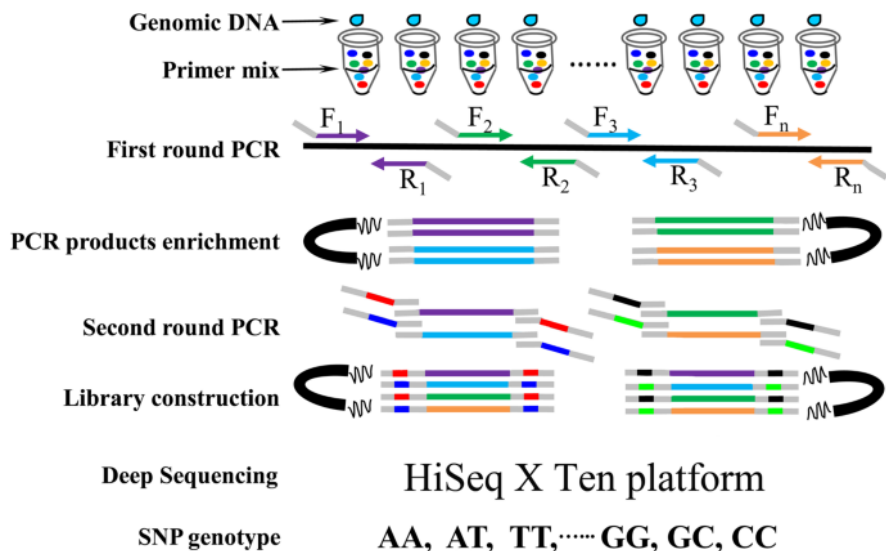


Рис. 15. Процедура проведения таргетного SNP-секвенирования. Создание библиотеки целевого SNP-seq включает два раунда ПЦР. Первый раунд ПЦР заключается в захвате целевого локуса SNP посредством мультиплексной ПЦР. Целью второго раунда ПЦР является добавление уникального адаптера штрих-кода для каждого образца ДНК. Затем созданная библиотека секвенируется.

Генотипирование методом мультиплексного секвенирования (GMS)

Основные проблемы с GBS включают следующее: случайный характер процесса, анализ данных является биоинформатически сложным, обнаруженные маркеры преимущественно доминирующие, а результаты содержат большое количество недостающих данных, что требует вменения (Thomson, 2014). Ruff и коллеги (2020) разработали метод, который должен был отвечать определенным требованиям: мог генетически характеризовать образцы, нацеливаясь на определенные локусы, быть легко настраиваемым, иметь высокую плотность, высокую производительность и давать результаты, которые легко интерпретировать. Для удовлетворения потребности в более целенаправленном подходе идеальным был бы метод, основанный на ПЦР. Эта необходимость подчеркивается тем, что многочисленные организации недавно разработали методы генотипирования, основанные на ПЦР, включая партнерство Illumina с ThermoFisher с их технологией AmpliSeq и Integrated DNA Technologies с их rhAMPSeq. Кроме того, в различных публикациях подробно описаны дополнительные методы генотипирования, основанные на ПЦР. Целевое секвенирование ампликонов (TAS) (Bybee et al., 2011) — это метод генотипирования, в котором используется двухэтапный протокол ПЦР, в котором для генотипирования мультиплексируются 6 пар праймеров. Эти ампликоны секвенировали на платформе Roche 454 NGS (Roche, Базель, Швейцария), а данные анализировали с помощью BarcodeCruncher и программного обеспечения для анализа данных последовательностей генома (Roche). Тысячегенное генотипирование путем секвенирования (GT-seq) (Campbell et al., 2015) также представляет собой двухэтапный протокол ПЦР, который мультиплексирует 192 маркера SNP. Библиотеки GT-seq секвенировали на Illumina HiSeq 1500, а данные анализировали с помощью специального сценария Perl. Генотипирование путем мультиплексного секвенирования ампликонов пшеницы (GBMAS) (Liu, 2015; Bernardo et al., 2015) снова представляет собой двухэтапный протокол ПЦР, который мультиплексирует 33 маркера SNP. Библиотеки GBMAS были секвенированы

на Ion Proton, а анализ данных проводился с использованием специальных сценариев Perl вместе с программным обеспечением FLEXBAR (Dodt et al., 2012) и BLAT (Kent, 2002). Для генотипирования SNP с помощью NGS (Chen et al., 2016) использовали протокол с тремя этапами ПЦР (трехраундовая мультиплексная ПЦР) для получения эквивалентного количества продукта ПЦР из каждой пары праймеров из каждого образца, в котором мультиплексировали 37 маркеров. Анализ данных проводился с использованием специальных сценариев Perl, программного обеспечения FASTX-Toolkit (Gordon, Hannon, 2010), samtools (Li et al., 2009) и BWA (Li, Durbin, 2009). В протоколе целевого секвенирования ампликонов мультиплексной ПЦР (MTA-Seq) (Onda et al., 2018) использовался один раунд ПЦР для создания 443 ампликонов с целевыми SNP. Эти ампликоны подвергались редакции концов для лигирования адаптера с последующей реакцией восстановления разрыва, и полученные библиотеки секвенировали на платформе Ion Proton NGS. Данные последовательностей были картированы с использованием программы Torrent Mapping Alignment Program, а SNP были определены с помощью программного обеспечения VarScan [Koboldt et al., 2009]. Эти опубликованные методы соответствуют некоторым или большинству идеальных характеристик генотипирования на основе ПЦР, но им не хватает по крайней мере одной из этих областей, а именно глубины маркера.

Ruff и коллеги (2020) представили технологию генотипирования на основе ПЦР, которая обеспечивает высокую степень мультиплексирования SNP маркеров и высокую производительность, легко настраивается для различных исследований, генерирует библиотеки, которые можно секвенировать на платформах Illumina или Ion Torrent NGS и генерирует данные, которые легко интерпретировать. Протокол генотипирования с помощью мультиплексного секвенирования (GMS) использует 1656 маркеров SNP пшеницы и 207 синтетических маркеров SNP ячменя (Bayer et al., 2017) в 6 пулах праймеров с ~370 парами праймеров на пул.

Использование гидрогелей для мультиплексирования

В последние годы геометрически кодированные микрочастицы гидрогеля стали высокоэффективными инструментами для мультиплексного генотипирования SNP (Choi et al., 2022; Moon et al., 2022). Геометрическое кодирование частиц гидрогеля обеспечивает исключительную способность мультиплексирования ($>10^6$) и может быть легко декодировано с использованием простых оптических изображений и компьютерных алгоритмов (Jung et al., 2016). Кроме того, включение микрочастиц гидрогеля играет решающую роль в повышении чувствительности детекции, что объясняется несколькими факторами, связанными с уникальными свойствами систем на основе гидрогеля, в том числе:

- 1) низкостерические препятствия в пористой трехмерной структуре частиц, что способствует эффективной гибридизации зонд-мишень
- 2) богатая водой среда, которая поддерживает правильную конформацию и функциональное взаимодействие биомолекул, тем самым повышая аффинность
- 3) усиление сигнала в объеме частиц пиколитрового масштаба за счет увеличения концентрации захваченных целевых молекул (Ahmad et al., 2016; Battista et al., 2017; Le Goff et al., 2015).

Следовательно, были разработаны различные подходы к идентификации SNP с использованием закодированных микрочастиц гидрогеля. Например, Zang и коллеги первым применил многофункциональные закодированные частицы гидрогеля в мультиплексном анализе генотипирования SNP, включив аллель-специфические зонды в две отдельные области частиц и используя процесс щелочной дегибридизации (Zang et al., 2011). Кроме того, Мун и др. недавно представили высокоспецифичный процесс обнаружения SNP, используя универсальные несоответствия в зондах ДНК для повышения специфичности во время реакции гибридизации между зондами и мишенями (Moon et al., 2022).

Несмотря на эффективные возможности кодируемых микрочастиц гидрогеля в мультиплексном анализе SNP, сохраняются определенные ограничения при генотипировании SNP в двухцепочечной ДНК (дцДНК) с большим количеством пар оснований. Хотя микрочастицы гидрогеля имеют нанопористую внутреннюю структуру, которая обеспечивает диффузию и реакцию различных биомакромолекул, таких как микроРНК, ДНК и белков внутри частиц (Jung et al., 2017), эта нанопористая структура создает проблемы для обнаружения мишеней ДНК большого размера (Jung et al., 2017) более 1000 п.н. из-за ограниченной диффузии внутри полимерной сетки (Choi et al., 2012; Pregibon and Doyle, 2009). Более того, незначительное различие в температуре плавления, возникающее в результате изменения одного нуклеотида в геноме, в сочетании с быстрой регибридизацией комплементарных целевых цепей большого размера, усложняет задачу достижения специфического и чувствительного генотипирования SNP.

Mun и коллеги (2023) представили платформу мультиплексного генотипирования SNP на основе гидрогеля, специально разработанную для геномной ДНК. Эта платформа объединяет методы реакции обнаружения лигирования (LDR) и амплификации по катящемуся кольцу (RCA) в мультиплексной сенсорной системе на основе гидрогеля, что обеспечивает адаптируемое и чувствительное генотипирование SNP для геномной ДНК. Для повышения специфичности анализа белок MutS и полиэтиленгликоль вводятся в протокол, синергически уменьшая неспецифическое лигирование и реакции RCA. При значительном улучшении специфичности более чем в 10 раз три типа SNP в искусственно сконструированной двухцепочечной ДНК (дцДНК) длиной около 1000 п.н. успешно генотипируются с двузначной пикомолярной чувствительностью. Кроме того, продемонстрирована практическая применимость разработанного процесса идентификации происхождения сырья путем генотипирования трех типов SNP в составе геномной ДНК, полученной из двух близкородственных видов растений, содержащих около 3,5 гигабаз. Примечательно то, что это исследование

знаменует собой первое достижение в области мультиплексного генотипирования SNP в геномной ДНК без ПЦР с использованием одного флуорофора.

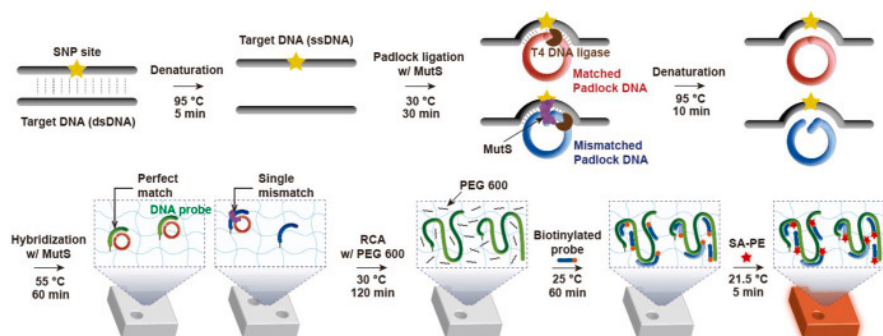


Рис. 16. Общая схема, иллюстрирующая процедуры анализа реакции обнаружения лигирования (LDR)/амплификации по катящемуся кольцу (RCA) на основе гидрогеля. Этот процесс состоит из трех этапов; 1) селективное лигирование с помощью белка MutS идеально подобранной ДНК висячего замка, 2) реакция RCA в гидрогеле после гибридизации кольцевой ДНК висячего замка с ДНК-зондом и 3) флуоресцентное мечение с гибридизацией биотинилированных репортерных зондов с последующим связыванием SA-PE. (Moon et al., 2023).

Для обеспечения точного генотипирования нескольких SNP в больших молекулах дцДНК, был реализован двухэтапный подход, сочетающий методы LDR и RCA в анализе на основе закодированных микрочастиц гидрогеля, как показано на рис.16. Первоначально анализ SNP включал термическую денатурацию дцДНК, содержащей сайт SNP, что приводило к образованию одноцепочечной ДНК. Впоследствии были представлены два различных типа молекул ДНК по типу «висячего замка», каждая из которых имеет идеально совпадающие плечи с целевыми последовательностями ДНК, но с разницей в один нуклеотид либо на 3'-, либо на 5'-конце. Эти молекулы ДНК по типу

«висячего замка» обрабатывали ДНК-лигазой T4. Когда целевая ДНК и ДНК «висячего замка» идеально совпадали, ДНК «висячего замка» подвергалась циркуляризации посредством лигирования, опосредованного ДНК-лигазой T4. И наоборот, если существовало несоответствие между целевой ДНК и ДНК «висячего замка», ДНК «висячего замка» оставалась нелигированной и, следовательно, нециркулирующей. После процесса лигирования молекулы ДНК «висячего замка» были отделены от целевой ДНК посредством стадии термической обработки, которая совпала с дезактивацией ДНК-лигазы T4. Для захвата кольцевой ДНК «висячего замка» использовались графически закодированные микрочастицы гидрогеля, которые были функционализированы с помощью ДНК-зондов внутри их сшитых внутренних структур. После гибридизации проводилась RCA внутри микрочастиц гидрогеля для амплификации сигнала, с использованием захваченной кольцевой ДНК в качестве матрицы и ДНК-зонда в качестве праймера. На этапе RCA мы использовали ДНК-полимеразу phi29, которая является хорошо известной ДНК-полимеразой, обычно используемой для реакций RCA. На этом этапе ДНК-полимераза phi29 связывается с гибридизованными участками кольцевой ДНК «висячего замка» и ДНК-зонда внутри микрочастиц гидрогеля. Впоследствии это облегчает производство конкатемеров с повторяющимися универсальными последовательностями ДНК, которые изначально присутствуют в каждом типе ДНК «висячего замка». С целью маркировки амплифицированной ДНК зондом используется биотинилированный репортерный зонд, комплементарный повторяющимся последовательностям ДНК в конкатемере, и стрептавидин- фикоэритрин (SA-PE), флуоресцентный краситель, который легко связывается с биотином в мягких условиях. Преимущество процесса RCA на основе гидрогеля заключается в достижении высокого сигнала анализа и чувствительном генотипировании SNP. Это стало возможным благодаря способности маркировать несколько флуорофоров одним зондом ДНК, иммобилизованным внутри микрочастиц гидрогеля (Al Sulaiman et al., 2022; Chapin and Doyle, 2011).

Моон и коллеги (2023) стратегически разделили этапы LDR и RCA, принимая во внимание структуру матрицы гидрогеля и размер геномной ДНК. Нанопористая полимерная сеть внутри микрочастиц гидрогеля позволяет захватывать широкий спектр целевых молекул, включая белки и микроРНК, внутри частиц. Эта особенность полезна для достижения высокой чувствительности при обнаружении таких молекул. Однако из-за нанометрового размера пор структуры гидрогеля, который значительно меньше размера геномной ДНК (например, более 30 мкм в длину для женьшеня), геномная ДНК не может эффективно проникать в частицы для реакции лигирования. Чтобы решить эту проблему, была разработана молекула ДНК «висячего замка» небольшого размера (длиной около 20 нм), которая первоначально подвергалась лигированию. Впоследствии было обеспечено протекание реакции RCA с помощью праймеров (т.е. зондов), иммобилизованных в микрочастицах гидрогеля, за счет облегчения проникновения лигированной ДНК «висячего замка» в структуру геля.

Жидкие чипы на основе технологии GBTS

В последнее время все чаще используют системы генотипирования с помощью системы целевого секвенирования (GBTS) с технологией захвата в растворе (жидкий чип). Guo и коллеги (2022) разработали такой чип для генотипирования овец. Все маркеры были из 40 тыс. захваченных регионов, включая гены, расположенные в выборочных регионах, специфичные для породы области, локусы количественных признаков (QTL) и потенциальные функциональные SNP в геноме овцы. Результаты показали, что в общей сложности 210 тысяч высококачественных SNP были идентифицированы в 40 тысячах регионов, что указывает на высокий коэффициент охвата (99,7%) для целевых геномных регионов.

GBTS можно проводить с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции ПЦР (GenoPlexs) и обычной ПЦР (GenoBaits), в зависимости от количества маркеров. Принцип жидкого чипа основан на создании зондов вблизи целевых SNP и гибридизации с целевыми областями генома. После элюирования, амплификации и создания библиотеки выполняется глубокое секвенирование нового поколения для генотипирования SNP на всех захваченных сайтах. Захват сайтов с высокой плотностью SNP в окружающих их регионах может предоставить набор соседних SNP, также называемых множественными SNP (mSNP), которые более подходят для анализа гаплотипов и вменения генотипа. Исследования на кукурузе показали, что mSNP могут значительно повысить эффективность обнаружения сигналов GWAS по сравнению с SNP (Guo et al., 2019, 2021). Кроме того, жидкие чипы на основе GBTS обладают преимуществами гибкого дизайна, возможности добавления сайтов в любой момент и низкой цены, что делает возможным крупномасштабное генотипирование различных объектов с меньшими затратами.

При разработке панели SNP для овец авторы идентифицировали участки в регионах доместикации и селекции, и выбрали 1% регионов с наибольшим количеством расхождений в каждом сравнении. Затем выполняли отбор

участков в регионах, связанных с базой данных QTL для конкретных пород и животных.

Для двух типов регионов-кандидатов, указанных выше, мы подсчитали общее количество SNP в пределах 100 п.н. выше и ниже всех tagSNP в этих регионах (включая его самого). Это значение было определено как SDFR (Плотность SNP во фланговой области). После этого сайты с плотностью SNP от 3 до 7 сохранялись в качестве SNP-кандидатов. Для каждого региона-кандидата были выбраны SNP из регионов с самым высоким SDFR в качестве кандидатов для каждого фрагмента размером 50 КБ.

Многие SNP, обнаруженные в исследованиях GWAS, связаны с некоторыми экономическими характеристиками, включая рост, воспроизводство, характеристики молока, внешний вид и т. д. Расположенные на SNP могут помочь повысить точность исследований GWAS и GS. Всего 209 SNP из 48 исследований были непосредственно добавлены в набор данных SNP-кандидатов в панель.

Были также выбраны 26 SNP в специфичной для самцов области Y-хромосомы овцы, позволяющие идентифицировать и проверить пол тестируемых образцов. Также авторы выявили консервативные локусы для двух штаммов *Brucella melitensis* (*Brucella melitensis* str. M1981 и *Brucella melitensis* str. RM57), включая молекулярный маркер VirB12 для выявления бруцеллеза у овец. Были рассчитаны значения SDFR SNP на GGP Ovine HD (Zhou, 2019) с частотой минорных аллелей (MAF) $> 0,05$, а затем отсеяны все сайты со значениями SDFR от 3 до 7 в качестве источника заполнения. Интервал между соседними сайтами основной цепи с расстоянием более 100 КБ был заполнен SNP со значениями SDFR от 3 до 7 на GGP Ovine HD.

Жидкий чип основан на технологии GBTS, которая основана на захвате цели с помощью дополнительной комбинации зондов и целевых последовательностей. Чтобы обеспечить эффективность захвата, GenoBaits Probe Designer (Jianan Zhang, Mobreeding Biotech.) использовался для создания двух зондов с перекрытием от 60% до 70%, оба из которых должны покрывать

целевые сайты SNP. Длина разработанного зонда составляет 110 п.н., содержание GC составляет от 30% до 70%, за исключением зондов с неспецифической амплификацией, без простых повторов последовательности или пробелов.

Геномную ДНК экстрагировали стандартным фенол-хлороформным методом из цельной крови. Библиотеки были созданы с использованием набора для подготовки библиотеки GenoBaits DNA-seq (MolBreeding Biotechnology Co., Шицзячжуан, Хэбэй, Китай) в соответствии с протоколом производителя. Затем зонды и буфер для гибридизации смешивали и гибридизовали при 65°C в течение 16 часов. В раствор помещали Dynabeads MyOne Streptavidin C1 и связывающий буфер для обогащения целевых фрагментов ДНК, но удаления нецелевых. Целевые фрагменты амплифицировали с помощью библиотечного праймера для амплификации и ДНК-полимеразы. После были проведены два раунда очистки с использованием Beckman AMPure Beads. Секвенирование проводили с помощью PE150 на платформе MGISEQ-2000 (MGI, Шэньчжэнь, Китай).

Производительность чипа оценивалась путем генотипирования 317 особей. Авторы наблюдали высокую скорость улавливания благодаря конструкции зонда и строгой фильтрации. Захваченные фрагменты были повторно секвенированы с большой глубиной, при этом целевые сайты можно было секвенировать на глубине 70X, что привело к высокой точности генотипирования. Кроме того, можно было обнаружить не только целевые сайты, но и варианты вокруг них, включая SNP и инделы. Также этот чип мог обнаруживать более 200 тыс. SNP и другие варианты с помощью 40 тыс. зондов, даже новые варианты или варианты с очень низкой частотой, что было за пределами возможностей Illumina Ovine 50K BeadChip. Цена этого чипа сопоставима с Illumina Ovine 50K BeadChip. Другими словами, сочетая преимущества повторного секвенирования и чипов, новый чип может получить гораздо больше вариантов, чем Illumina Ovine 50K BeadChip по сопоставимой цене, что очень выгодно для GWAS и других исследований.

Заключение

В данном пособии рассмотрены наиболее часто используемые методы и подходы к мультиплексному генотипированию мутаций. С появлением и развитием генетических технологий увеличивается емкость генотипируемых панелей, позволяющих получать обширные массивы генетической информации (полногеномные решения). В то же время интерес продолжают представлять гибкие решения, предназначенные для генотипирования ограниченного числа локусов, например, в клинической диагностике, криминалистике.

Контрольные вопросы

1. Сравнительная характеристика методов генотипирования. В чем заключаются принципиальные различия между методами высокопроизводительного генотипирования на основе биочипов (SNP BeadChip) и таргетного секвенирования (NGS)? Укажите преимущества и ограничения каждого подхода для целей геномной селекции крупного рогатого скота.

2. Метод MeltArray. Опишите принцип работы метода MeltArray. За счет каких технических решений в нем достигается возможность детекции до 72 генетических вариантов в одной реакции, тогда как классическая ПЦР в реальном времени (TaqMan) ограничена 3-6 мишенями?

3. Технология MALDI-TOF (MassARRAY). Объясните, как масс-спектрометрия используется для генотипирования SNP. Какие этапы включает подготовка образца (ПЦР, SAP-реакция, iPLEX) и почему этот метод считается «золотым стандартом» для валидации маркеров, найденных в GWAS?

4. Метод MLPA. Для решения каких задач в животноводстве наиболее эффективно применение мультиплексной лигазной цепной реакции (MLPA)? В чем заключается ключевое преимущество MLPA перед стандартной мультиплексной ПЦР (амплифицируется не сама ДНК, а зонды)?

5. Стратегия выбора SNP-чипа. На коммерческой молочной ферме необходимо провести геномное тестирование 500 ремонтных телок для ранней выбраковки, а на племенной станции — 10 быков-производителей для расчета точных геномных оценок (GEBV). Какую плотность SNP-чипов (Low Density, Medium Density, High Density) вы порекомендуете для каждой задачи и почему?

6. Технология «жидких чипов» (GBTS). Дайте определение технологии GBTS (Genotyping by Target Sequencing). Чем «жидкий чип» принципиально отличается от твердотельного чипа Illumina с точки зрения возможности обнаружения новых генетических вариантов (de novo SNPs) и гибкости дизайна панели?

Дополнительная литература

1. Agee S. High-Multiplex Real-Time PCR Design. *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 2016; 36(7): P. 20–21. <https://doi.org/10.1089/gen.36.07.12>.
2. Ahmad M; Rai SM; Mahmood A Hydrogel Microparticles as an Emerging Tool in Pharmaceutical Field: a Review. *Adv. Polym. Technol* 2015, 35 (2), 121–128. Battista et al., 2017 E. Battista, F. Causa, P.A. Netti Gels, 3 (2) (2017), p. 20
3. Al Sulaiman D, Juthani N, Doyle PS. Quantitative and Multiplex Detection of Extracellular Vesicle-Derived MicroRNA via Rolling Circle Amplification within Encoded Hydrogel Microparticles. *Adv Healthc Mater*. 2022 May;11(10):e2102332. doi: 10.1002/adhm.202102332.
4. Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, Nazareth L, Wheeler D, Song X, Richmond TA, Middle CM, Rodesch MJ, Packard CJ, Weinstock GM, Gibbs RA. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nat Methods*. 2007;4(11):903–5.
5. Amaral AJ, Megens HJ, Kerstens HH, Heuven HC, Dibbits B, Crooijmans RP, den Dunnen JT, Groenen MA. Application of massive parallel sequencing to whole genome SNP discovery in the porcine genome. *BMC Genomics*. 2009 Aug 12;10:374. doi: 10.1186/1471-2164-10-374.
6. Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., and Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet*. 17, 81–92. doi: 10.1038/nrg.2015.28
7. Barken K.B., Haagensen J.A., Tolker-Nielsen T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clin Chim Acta*. 2007; 384: P.1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.07.004>.
8. Bayer MM, Rapazote-Flores P, Ganai M, Hedley PE, Macaulay M, Plieske J, et al. Development and Evaluation of a Barley 50k iSelect SNP Array. *Front Plant Sci*. 2017;8(October):1–10.

9. Beck, J. B., and Semple, J. C. (2015). Next-generation sampling: pairing genomics with herbarium specimens provides species-level signal in *Solidago* (Asteraceae). *Appl. Plant Sci.* 3:1500014. doi: 10.3732/apps.1500014
10. Bernardo A, Wang S, Amand PS, Bai G. Using next generation sequencing for multiplexed trait-linked markers in wheat. *PLoS One* [Internet]. 2015. [cited 2018 Jul 11];10(12).
11. Boland JF, Chung CC, Roberson D, Mitchell J, Zhang X, Im KM, He J, Chanock SJ, Yeager M, Dean M. The new sequencer on the block: comparison of Life Technology's Proton sequencer to an Illumina HiSeq for whole-exome sequencing. *Hum Genet.* 2013;132(10):1153–63.
12. Borsting C, Sanchez JJ, Hansen HE et al (2008) Performance of the SNPforID 52 SNP-plex assay in paternity testing. *Forensic Sci Int Genet* 2:292–300
13. Brachi, B., Morris, G. P., and Borevitz, J. O. (2011). Genome-wide association studies in plants: the missing heritability is in the field. *Genome Biol.* 12:232. doi: 10.1186/gb-2011-12-10-232
14. Bybee SM, Bracken-Grissom H, Haynes BD, Hermansen RA, Byers RL, Clement MJ, et al. Targeted amplicon sequencing (TAS): A scalable next-gen approach to multilocus, multitaxa phylogenetics. *Genome Biol Evol* [Internet]. 2011. [cited 2018 Jul 16];3(1):1312–23.
15. Campbell N.R., Harmon S.A., Narum S.R. Genotyping-in-Thousands by sequencing (GT-seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing. *Mol Ecol Resour.* 2015; 15(4): P.855–867. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12357>
16. Chan E. Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols In: Komar A, editor. *Single Nucleotide Polymorphisms* [Internet]. 2nd ed New York: Humana Press; 2009. [cited 2018 Jul 6]. p. 95–111.,
17. Chapin SC, Doyle PS. Ultrasensitive multiplexed microRNA quantification on encoded gel microparticles using rolling circle amplification. *Anal Chem.* 2011 Sep 15;83(18):7179-85. doi: 10.1021/ac201618k.

18. Chen, K., Zhou, Yx., Li, K. et al. A novel three-round multiplex PCR for SNP genotyping with next generation sequencing. *Anal Bioanal Chem* 408, 4371–4377 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9536-6>
19. Choi NW, Kim J, Chapin SC, Duong T, Donohue E, Pandey P, Broom W, Hill WA, Doyle PS. Multiplexed detection of mRNA using porosity-tuned hydrogel microparticles. *Anal Chem.* 2012 Nov 6;84(21):9370-8. doi: 10.1021/ac302128u.
20. Choi W, Park E, Bae S, Choi KH, Han S, Son KH, Lee DY, Cho IJ, Seong H, Hwang KS, Nam JM, Choi J, Lee H, Choi N. Multiplex SNP Genotyping Using SWITCH: Sequence-Specific Nanoparticle with Interpretative Toehold-Mediated Sequence Decoding in Hydrogel. *Small.* 2022 Feb;18(8):e2105538. doi: 10.1002/smll.202105538.
21. Cole R.B. 2012. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications* (2nd Edition). John Wiley & Sons.
22. Coutinho A, Valverde G, Fehren-Schmitz L et al (2014) AmericaPlex26: a SNaPshot multiplex system for genotyping the main human mitochondrial founder lineages of the Americas. *PLoS One* 26:e93292
23. Craig DW, Pearson JV, Szelinger S, Sekar A, Redman M, Corneveaux JJ, Pawlowski TL, Laub T, Nunn G, Stephan DA, Homer N, Huentelman MJ. Identification of genetic variants using bar-coded multiplexed sequencing. *Nat Methods.* 2008;5(10):887–93.
24. Csernák, E., Molnár, J., Tusnády, G. E., and Tóth, E. (2016). Application of targeted next-generation sequencing, TruSeq custom amplicon assay for molecular pathology diagnostics on formalin-fixed and paraffin-embedded samples. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 25, 460–466. doi: 10.1097/PAI.0000000000000325
25. Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., and Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping

- using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 12, 499–510. doi: 10.1038/nrg3012
26. Davidson I. Biotic concerns in generating molecular diagnosis matrixes for 4 avian viruses with emphasis on Marek's disease virus. *J Virol Methods.* 2019; 274: 113708. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113708>.
 27. Délye, C., Deulvot, C., and Chauvel, B. (2013). DNA analysis of herbarium specimens of the grass weed *Alopecurus myosuroides* reveals herbicide resistance pre-dated herbicides. *PLoS ONE* 8:e75117. doi: 10.1371/journal.pone.0075117
 28. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons / H.H. El-Hajj, S.A. Marras, S. Tyagi et al. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: P.4131–4137. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4131-4137.2001>
 29. Dodt M, Roehr J, Ahmed R, Dieterich C. FLEXBAR—Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing Platforms. *Biology (Basel)* [Internet]. 2012. December 14 [cited 2019 Dec 4];1(3):895–905. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-7737/1/3/895>
 30. Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses / C.H. Cho, B. Chulten, C.K. Lee et al. *J Clin Virol.* 2013; 57(4): P.338–342. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.04.014>.
 31. Fu G., Miles A., Alphey L. Multiplex Detection and SNP Genotyping in a Single Fluorescence Channel. *PLoS ONE* 2012; 7(1): e30340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030340>
 32. Fu, Y. B. (2014). Genetic diversity analysis of highly incomplete SNP genotype data with imputations: an empirical assessment. *G3* 4, 891–900. doi: 10.1534/g3.114.010942
 33. Fu, Y. B., Peterson, G. W., and Dong, Y. (2016). Increasing genome sampling and improving SNP genotyping for genotyping-by-sequencing with new

combinations of restriction enzymes. *G3* 6, 845–856. doi: 10.1534/g3.115.025775

34. Gaedigk, A., Freeman, N., Hartshorne, T., Riffel, A. K., Irwin, D., Bishop, J. R., Stein, M. A., Newcorn, J. H., Jaime, L. K. M., Cherner, M., Leeder, J. S., Sci. Rep. 2015, 5, 9257.
35. Genomes Project C, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467(7319):1061–73.
36. Glotov, A. S., Kazakov, S. V., Zhukova, E. A., Alexandrov, A. V., Glotov, O. S., Pakin, V. S., et al. (2015). Targeted next-generation sequencing (NGS) of nine candidate genes with custom AmpliSeq in patients and a cardiomyopathy risk group. *Clin. Chim. Acta* 446, 132–140. doi: 10.1016/j.cca.2015.04.014
37. Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol*. 2009;27(2):182–9.
38. Gordon A, Hannon GJ. FASTX-Toolkit [Internet]. 2010 [cited 2019 Dec 9]. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html
39. Gugerli, F., Parducci, L., and Petit, R. J. (2005). Ancient plant DNA: review and prospects. *New Phytol*. 166, 409–418. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01360.x
40. Guo Y., Fengting Bai, Jintao Wang, Shaoyin Fu, Yu Zhang, Xiaoyi Liu, Zhuangbiao Zhang, Junjie Shao, Ran Li, Fei Wang, Lei Zhang, Huiling Zheng, Xihong Wang, Yongbin Liu, Yu Jiang, Design and characterization of a high-resolution multiple-SNP capture array by target sequencing for sheep, *Journal of Animal Science*, Volume 101, 2023, skac383, <https://doi.org/10.1093/jas/skac383>
41. Guo, Z., H. Wang, J. Tao, Y. Ren, C. Xu, K. Wu, C. Zou, J. Zhang, and Y. Xu. 2019. Development of multiple SNP marker panels affordable to breeders

- through genotyping by target sequencing (GBTS) in maize. *Mol. Breed.* 39:37. doi:10.1007/s11032-019-0940-4
42. Guo, Z., Q. Yang, F. Huang, H. Zheng, Z. Sang, Y. Xu, C. Zhang, K. Wu, J. Tao, B. M. Prasanna, et al. . 2021. Development of high-resolution multiple-SNP arrays for genetic analyses and molecular breeding through genotyping by target sequencing and liquid chip. *Plant Commun.* 2:100230. doi:10.1016/j.xplc.2021.100230
 43. Highly multiplex PCR assays by coupling the 5'-flap endonuclease activity of Taq DNA polymerase and molecular beacon reporters / Q. Huang, D. Chen, C. Du et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022; 119(9): e2110672119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110672119>.
 44. <https://support.mrcholland.com/kb/articles/what-is-mlpa-and-how-does-it-work>. Режим доступа: 27.08.2023
 45. Hui L., DelMonte T., Ranade K. Genotyping Using the TaqMan Assay. *Current Protocols in Human Genetics.* 2008; 56: 2.10.1-2.10.8. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0210s56>
 46. Jung IY, Kim JS, Choi BR, Lee K, Lee H. Hydrogel Based Biosensors for In Vitro Diagnostics of Biochemicals, Proteins, and Genes. *Adv Healthc Mater.* 2017 Jun;6(12). doi: 10.1002/adhm.201601475.
 47. Jung S, Kim J, Lee DJ, Oh EH, Lim H, Kim KP, Choi N, Kim TS, Kim SK. Extensible Multiplex Real-time PCR of MicroRNA Using Microparticles. *Sci Rep.* 2016 Mar 11;6:22975. doi: 10.1038/srep22975.
 48. Kent J.O., Christensen M. Highly selective Cooperative Primers for multiplex detection of rare mutations. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.07.23.453558>
 49. Kent WJ. BLAT-The BLAST-Like Alignment Tool Resource 656 *Genome Research.* *Genome Res* [Internet]. 2002;12(4):656–64. Available from: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.229202>. Article published online www.genome.org

50. Kim H, Yoon JB, Lee J (2017a) Development of fluidigm SNP type genotyping assays for marker-assisted breeding of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Hortic Sci Technol* 35:465–479. <https://doi.org/10.12972/kjhst.20170050>
51. Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER, et al. VarScan: Variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics*. 2009;25(17):2283–5. 10.1093/bioinformatics/btp373
52. Kozlowski P, Lin M, Meikle L, Kwiatkowski DJ. Robust method for distinguishing heterozygous from homozygous transgenic alleles by multiplex ligation-dependent probe assay. *BioTechniques* 42(5), 584–588 (2007).
53. Kravchenko SA, Chernushyn SY, Kucherenko AM, Soloviov OO, Livshits LA. Development of MLPA approach for SNP detection in MTHFR, F5 and F2 genes. *Biopolym. Cell* 31(4), 309–315 (2015).
54. Kumar, S., Rajendran, K., Kumar, J., Hamwieh, A., and Baum, M. (2015). Current knowledge in lentil genomics and its application for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 6:78. doi: 10.3389/fpls.2015.00078
55. Le Goff GC, Srinivas RL, Hill WA, Doyle PS. Hydrogel microparticles for biosensing. *Eur Polym J.* 2015 Nov;72:386–412. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.02.022.
56. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754–60. 10.1093/bioinformatics/btp324
57. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma Appl NOTE*. 2009;25(16):2078–9.
58. Li H, Ruan J, Durbin R (2008) Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res* 18(11): 1851–1858.

59. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:251364.
60. Liu S. Genotyping by Multiplexing Amplicon Sequencing. 2015. [cited 2017 Jul 5]; (July):10–3. Available from: <http://schnablelab.plantgenomics.iastate.edu/docs/resources/protocols/pdf/GBMAS-20150706.pdf>
61. Magnin S, Viel E, Baraquin A et al (2011) A multiplex SNaPshot assay as a rapid method for detecting KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancers. *J Mol Diagn* 13:485–492
62. Marchini, J., and Howie, B. (2010). Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* 11, 499–511. doi: 10.1038/nrg2796
63. Matching STR and SNP genotyping to discriminate between wild boar, domestic pigs and their recent hybrids for forensic purposes / R. Lorenzini, R. Fanelli, F. Tancredi et al. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 3188. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59644-6>.
64. Meuzelaar LS, Lancaster O, Pasche JP, Kopal G, Brookes AJ. MegaPlex PCR: a strategy for multiplex amplification. *Nat Methods.* 2007;4(10):835–8.
65. Millat, G., Chanavat, V., and Rousson, R. (2014). Evaluation of a new NGS method based on a custom AmpliSeq library and Ion Torrent PGM sequencing for the fast detection of genetic variations in cardiomyopathies. *Clin. Chim. Acta.* 433, 266–271. doi: 10.1016/j.cca.2014.03.032
66. Modified "Allele-Specific qPCR" Method for SNP Genotyping Based on FRET / R. Kalendar, A. Baidyussen, D. Serikbay et al. *Front Plant Sci.* 2022;12: 747886. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.747886>.
67. Moon HJ, Mun SJ, Lee JH, Roh YH, Lim YJ, Bong KW. Encoded hydrogel microparticles with universal mismatch-incorporated DNA probes for highly specific multiplex detection of SNPs. *Talanta.* 2022 Aug 1;245:123480. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123480.

68. Multicolor Combinatorial Probe Coding for Real-Time PCR / Q. Huang, L. Zheng, Y. Zhu et al. *PLoS ONE*. 2011; 6(1): e16033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016033>
69. Multiplex amplicon genotyping by high-resolution melting / M.T. Seipp, J.D. Durtschi, K.V. Voelkerding, C.T. Wittwer. *J Biomol Tech*. 2009; 20(3): P.160-164.
70. Multiplex PCR Targeted Amplicon Sequencing (MTA-Seq): Simple, Flexible, and Versatile SNP Genotyping by Highly Multiplexed PCR Amplicon Sequencing / Y. Onda, K. Takahagi, M. Shimizu et al. *Front Plant Sci*. 2018; 9: P.201. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00201>.
71. Multiplex real-time single nucleotide polymorphism detection and quantification by quencher extension / K. Rudi, M. Zimonja, S.E. Hannevik, S.M. Drømtorp. *Biotechniques*. 2006; 40(3): P.323-329. <https://doi.org/10.2144/000112118>
72. Multiplex SuperSelective PCR Assays for the Detection and Quantitation of Rare Somatic Mutations in Liquid Biopsies / D.Y. Vargas, S. Tyagi, S.A.E. Marras et al. *J Mol Diagn*. 2022; 24(3): P.189 -204. doi: 10.1016/j.jmoldx.2021.11.006.
73. Mun SJ, Jang W, Park HS, Lim YJ, Yang TJ, Bong KW. Multiplex genotyping of SNPs in genomic DNA via hydrogel-based assay mediated with MutS and polyethylene glycol. *Biosens Bioelectron*. 2023 Sep 9;241:115670. doi: 10.1016/j.bios.2023.115670.
74. Nakamoto-Matsubara, R., Sakata-Yanagimoto, M., Enami, T., Yoshida, K., Yanagimoto, S., Shiozawa, Y., Nanmoku, T., Satomi, K., Muto, H., Obara, N., Kato, T., Kurita, N., Yokoyama, Y., Izutsu, K., Ota, Y., Sanada, M., Shimizu, S., Komeno, T., Sato, Y., Ito, T., Kitabayashi, I., Takeuchi, K., Nakamura, N., Ogawa, S., Chiba, S., *PLoS One* 2014, 9, e109714.
75. Nguyen-Dumont T, Pope BJ, Hammet F, Southey MC, Park DJ. A high-plex PCR approach for massively parallel sequencing. *BioTech*. 2013;55(2):69–74.

76. Nicklas J.A., Buel E. A real-time multiplex SNP melting assay to discriminate individuals. *J Forensic Sci.* 2008; 53(6): P.1316-1324. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00877.x>.
77. Oliphant A, Barker DL, Stuelpnagel JR, Chee MS. BeadArray technology: Enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Biotechniques* [Internet]. 2002. June [cited 2018 Jul 11];32(6 SUPPL):S56–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12083399>
78. Onda Y, Takahagi K, Shimizu M, Inoue K, Mochida K. Multiplex PCR Targeted Amplicon Sequencing (MTA-Seq): Simple, Flexible, and Versatile SNP Genotyping by Highly Multiplexed PCR Amplicon Sequencing. *Front Plant Sci.* 2018 Mar 23;9:201. doi: 10.3389/fpls.2018.00201.
79. Onda, Y., and Mochida, K. (2016). Exploring genetic diversity in plants using high-throughput sequencing techniques. *Curr. Genomics* 17, 356–365. doi: 10.2174/1389202917666160331202742
80. Paneto G.G., Careta F.P. Designing Primers for SNaPshot Technique PCR Primer Design, 2015, Volume 1275 ISBN : 978-1-4939-2364-9
81. Perkel, J. SNP genotyping: six technologies that keyed a revolution. *Nat Methods* 5, 447–453 (2008). <https://doi.org/10.1038/nmeth0508-447>.
82. Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink JL. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS One.* 2012;7(2).
83. Porreca GJ, Zhang K, Li JB, Xie B, Austin D, Vassallo SL, LeProust EM, Peck BJ, Emig CJ, Dahl F, Gao Y, Church GM, Shendure J. Multiplex amplification of large sets of human exons. *Nat Methods.* 2007;4(11):931–6.
84. Pregibon DC, Doyle PS. Optimization of encoded hydrogel particles for nucleic acid quantification. *Anal Chem.* 2009 Jun 15;81(12):4873-81. doi: 10.1021/ac9005292.
85. Ramos AM, Crooijmans RP, Affara NA, Amaral AJ, Archibald AL, Beever JE, Bendixen C, Churcher C, Clark R, Dehais P, Hansen MS, Hedegaard J, Hu

- ZL, Kerstens HH, Law AS, Megens HJ, Milan D, Nonneman DJ, Rohrer GA, Rothschild MF, Smith TP, Schnabel RD, Van Tassell CP, Taylor JF, Wiedmann RT, Schook LB, Groenen MA. Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PLoS One*. 2009 Aug 5;4(8):e6524. doi: 10.1371/journal.pone.0006524.
86. Rasheed A, Wen W, Gao F, Zhai S, Jin H, Liu J, et al. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. *Theor Appl Genet*. 2016;129(10):1843–60. 10.1007/s00122-016-2743-x
 87. Ruff TM, Marston EJ, Eagle JD, Sthapit SR, Hooker MA, Skinner DZ, See DR. Genotyping by multiplexed sequencing (GMS): A customizable platform for genomic selection. *PLoS One*. 2020 May 1;15(5):e0229207. doi: 10.1371/journal.pone.0229207
 88. Rutkoski, J. E., Poland, J., Jannink, J. L., and Sorrells, M. E. (2013). Imputation of unordered markers and the impact on genomic selection accuracy. *G3* 3, 427–439. doi: 10.1534/g3.112.005363
 89. Saunders N.A. Real-time PCR. *Methods Mol Biol*. 2004; 266: P.191–211. <https://doi.org/10.1385/1-59259-763-7:191>.
 90. Savolainen, O., Lascoux, M., and Merilä, J. (2013). Ecological genomics of local adaptation. *Nat. Rev. Genet.* 14, 807–820. doi: 10.1038/nrg3522
 91. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57. doi: 10.1093/nar/gnf056.
 92. Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol Breed* [Internet]. 2014. [cited 2018 Jul 6];33(1):1–14. Available from: <http://www.lgcgenomics.com>

93. Simultaneous detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche LightCycler480: Application in viral molecular diagnostics / Molenkamp R., van der Ham A., Schinkel J., Beld M. *J Virol Methods*. 2007; 141: P.205–211. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.12.007>.
94. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement / K. Semagn, R. Babu, S. Hearne, M. Olsen. *Mol Breed*. 2014; 33: P.1–14. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>
95. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006;314(5797):268–74.
96. Stepanov, V.A., Trifonova, E.A. Multiplex SNP genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry: Frequencies of 56 immune response gene SNPs in human populations. *Mol Biol* 47, 852–862 (2013). <https://doi.org/10.1134/S0026893313060149>
97. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 13(3), 3245–3276 (2012).
98. Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet*. 2001;2(12):930–42.
99. Thomson MJ (2014) High-throughput SNP genotyping to accelerate crop improvement. *Plant Breeding Biotech* 2:195-212. doi:10.9787/PBB.2014.2.3.195
100. Tiffin, P., and Ross-Ibarra, J. (2014). Advances and limits of using population genetics to understand local adaptation. *Trends Ecol. Evol.* 29, 673–680. doi: 10.1016/j.tree.2014.10.004

101. Tost J, Gut IG. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem.* 2005 Apr;38(4):335-50. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.12.005.
102. Tran, T., Kostecki, R., Catton, M., Druce, J., *J. Clin. Microbiol.* 2018, 56.
103. Truong HT, Ramos AM, Yalcin F, De Ruiter M, Van Der Poel HHJ. Sequence-Based Genotyping for Marker Discovery and Co-Dominant Scoring in Germplasm and Populations. *PLoS One* [Internet]. 2012. [cited 2019 Mar 18];7(5):37565 Available from: www.plosone.org
104. Varley KE, Mitra RD. Nested Patch PCR enables highly multiplexed mutation discovery in candidate genes. *Genome Res.* 2008;18(11):1844–50.
105. Voss-Fels K., Snowdon R.J. Understanding and utilizing crop genome diversity via high-resolution genotyping. *Plant Biotechnol J.* 2016; 14(4): P.1086–1094. <https://doi.org/10.1111/pbi.12456>
106. Wang M, Xu F, Chen K, Li X, Li K, Zhou Y, Xiao J. A multiplex SNP genotyping by allele-specific PCR based on stem-loop and universal fluorescent primers of Chr1daxin mice. *Electrophoresis.* 2019 Jun;40(11):1600-1605. doi: 10.1002/elps.201900052.
107. Wang, J., Lin, M., Crenshaw, A. et al. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. *BMC Genomics* 10, 561 (2009). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-561>
108. Wiedmann RT, Smith TP, Nonneman DJ (2008) SNP discovery in swine by reduced representation and high throughput pyrosequencing. *BMC Genet* 9: 81.
109. Yaku, H., Yukimasa, T., Nakano, S. i., Sugimoto, N., Oka, H., *Electrophoresis* 2008, 29, 4130–4140.
110. Yang L, Sun H, Chen D et al (2014) Application of multiplex SNaPshot assay in measurement of PLAC4 RNA-SNP allelic ratio for noninvasive prenatal detection of trisomy 21. *Prenat Diagn* 34:139–144

111. Yu W., Yao J., Zhang Z. Simultaneous Detection of Three Genotypes of Gene Methylene Tetrahydrofolate Reductase and Methionine Synthase Reductase Based on Multiplex Asymmetric Real-Time PCR-HRM Biosensing. *Analytical Chemistry* 2022; 94(38): P. 13052-13060. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02096>
112. Zhang H, DeConinck AJ, Slimmer SC, Doyle PS, Lewis JA, Nuzzo RG. Genotyping by alkaline dehybridization using graphically encoded particles. *Chemistry*. 2011 Mar 1;17(10):2867-73. doi: 10.1002/chem.201002848.
113. Zhang, J., Yang, J., Zhang, L. et al. A new SNP genotyping technology Target SNP-seq and its application in genetic analysis of cucumber varieties. *Sci Rep* 10, 5623 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62518-6>
114. Zhi J. MAPD: a probe design suite for multiplex ligation-dependent probe amplification assays. *BMC Res. Notes* 3, 137–137 (2010).
115. Zhou, D. 2019. Design of an HD SNP chip for sheep named GGP OvineHD. Master, Northwest A & F University.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ASQ - аллель-специфической количественной ПЦР
- CAPS - расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности
- FRET –
- GBS - генотипирование путем секвенирования
- GWAS - полногеномные ассоциативные исследования
- HAND - Homo-Tag Assisted Non-Dimer
- HRM - плавления ампликона с высоким разрешением
- KASP - конкурентная аллель-специфическая ПЦР
- LoF-мутация –
- MAS - маркер-зависимая селекция
- MCPC - многоцветное комбинаторное кодирование зондов
- MGB - лиганд малой бороздки
- MLPA - Мультиплексная лигазная цепная реакция
- MPA - Multiplex Probe Amplification
- multiplex-QEXT, Multiplex quencher extension - мультиплексного генотипирования в режиме реального времени с помощью удлинения гасителя
- NFQ - нефлуоресцентными гасителями
- SNaPshot – минисеквенирование
- SNP - единичный нуклеотидный полиморфизм
- SSR - простые повторы последовательностей
- T_m - температура плавления
- TOCE - Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension
- PT-ПЦР

Оглавление

Введение	2
Мультиплексная РТ-ПЦР	6
SNaPshot	15
Мультиплексная лигазная цепная реакция (MLPA).....	18
Мультиплексное генотипирование SNP с помощью аллель-специфической ПЦР на основе Stem-Loop и универсальных флуоресцентно-меченных праймеров.....	26
Мультиплексное генотипирования SNP с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF	30
Высокопроизводительное генотипирование с использованием Fluidigm.....	34
Полногеномное генотипирование с использованием биочипов	38
Генотипирование SNP с использованием секвенирования нового поколения	43
Мультиплексное ПЦР-целевое секвенирование ампликонов (MTA-Seq)	48
Таргетное SNP-секвенирование Target SNP-seq	51
Генотипирование методом мультиплексного секвенирования (GMS)	53
Использование гидрогелей для мультиплексирования	55
Жидкие чипы на основе технологии GBTS.....	60
Заключение	63
Контрольные вопросы	64
Дополнительная литература.....	65
Список сокращений	79

Учебное издание

Костюнина Ольга Васильевна
Быкова Ольга Александровна
Лебедева Ирина Анатольевна
Новикова Мария Владимировна
Чепуштанова Ольга Викторовна
Рогозинникова Ирина Викторовна

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ГЕНОТИПИРОВАНИЮ:
ЭВОЛЮЦИЯ МЕТОДОВ
УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ**

Отпечатано в типографии ООО «Издательский дом «Ажур».
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать плоская. Тираж 500 экз.
Подписано в печать 29.09.2026.
Гарнитура «Times New Roman». Усл. п. л. 4,8. № заказа 29/09-2.
г. Екатеринбург, ул. Восточная, 54, тел. (343) 350-78-28, 350-78-49.