

Практическая школа по секвенированию и генотипированию ДНК

Раздел 1.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ДНК

Теория	Отечественные разработки в области секвенирования ДНК Обзор существующих решений от компании «Синтол»
Теория	Введение в капиллярный электрофорез Принцип метода. Устройство прибора Нанофор 05. Медицинские приложения секвенирования и фрагментного анализа ДНК
Практика	Выделение ДНК Пробоподготовка и выделение ДНК из букального эпителия на автоматической станции «Колибри»
Практика	Измерение концентрации ДНК Измерение концентрации ДНК на приборе «QUBIX» с использованием наборов «СинКвант HS ДНК», «СинКвант BR ДНК» и на приборе ДТпрайм II с использованием набора «RealQuant H3 R»
Практика	ПЦР Подготовка реакционной смеси для амплификации клинически значимого региона генома человека. Запуск программы термоциклирования на приборе ДТклассик

Раздел 2.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК МЕТОДОМ СЕНГЕРА

Теория	Введение в химию реакции секвенирования Принцип секвенирования ДНК методом Сенгера. Сходства и отличия ПЦР и реакции секвенирования по Сенгеру. Рабочий процесс (метод Сенгера) при секвенировании плазмидной и геномной ДНК. <ul style="list-style-type: none">Выделение ДНК наборами «М-Сорб» и «М-Сорб-Автомат» на станции выделения нуклеиновых кислот «COLIBRI».Очистки ПЦР продукта: ExoSAP, колонки, из агарозного геля, на магнитных частицах (наборы «Colgen» и «SynMag»). Как выбрать правильный способ очистки?Оценка количества и качества ПЦР продукта. Оценка концентрации ПЦР продуктов набором «СинКвант HS ДНК» с помощью флуориметра QUBIX.Постановка реакции секвенирования. Выбор праймера для секвенирования. Состав реакции секвенирования и условия термоциклирования – работа с набором для секвенирования «GenSeq». Контроли реакции секвенирования/ Troubleshooting.Обзор методов очистки продукта реакции секвенирования, плюсы и минусы (набор «SeqMag»).
--------	---

	<ul style="list-style-type: none"> ■ Подготовка образца к загрузке в прибор. <p>Рекомендации по хранению реагентов и продуктов реакции секвенирования</p>
Практика	<p>Очистка продуктов ПЦР Очистка продуктов ПЦР с помощью набора «SynMag» на магнитных частицах</p>
Практика	<p>Измерение концентрации продуктов ПЦР Измерение концентрации продуктов ПЦР на приборе «QUBIX» с использованием наборов «СинКвант HS ДНК», «СинКвант ВР ДНК»</p>
Практика	<p>Реакция секвенирования Подготовка реакционной смеси для секвенирования по методу Сенгера с использованием набора «GenSeq». Запуск программы секвенирования на приборе ДТкласик</p>
Теория, практика	<p>Программное обеспечение для анализа данных Обзор программы для анализа данных секвенирования Mutation Surveyor® software. Обзор наиболее частых проблем секвенирования ДНК по Сенгеру. Демонстрация данных. Работа с программным обеспечением в группах</p>
Практика	<p>Очистка продуктов реакции секвенирования Очистка реакции секвенирования с помощью набора «SeqMag»</p>
Теория	<p>Управляющая программа «Нанофор 05» Обзор программы «Нанофор 05». Задание калибровок прибора. Программы – помощники (обслуживание прибора). Способы задания эксперимента (секвенирование, фрагментный анализ). Мониторинг текущего состояния прибора. Просмотр сырых данных в реальном времени</p>
Практика	<p>Запуск анализа на генетическом анализаторе Нанофор 05 Загрузка очищенных продуктов реакции секвенирования в прибор Нанофор 05. Создание проекта анализа. Запуск капиллярного электрофореза</p>

Раздел 3.

ФРАГМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДНК

Практика	Анализ результатов секвенирование ДНК Анализ полученных данных. Самостоятельная работа с программной для анализа данных
Теория	Введение в химию фрагментного анализа ДНК, принципы анализа данных Что такое фрагментный анализ? Типы фрагментного анализа, рабочий процесс ФА. Получение меченых фрагментов. Принцип ФА. Стандарты молекулярных масс. Принцип мультиплексирования меченых фрагментов в одном капилляре. Панели, маркеры, бины. Относительная подвижность фрагментов, определение, следствия. Оптимизация условий ПЦР. Оптимизация условий капиллярного электрофореза, решение проблем (количество образца, формамид, электрокинетическая инъекция, механизм образования pull-up пиков и спайков при проведении ФА)
Практика	ПЦР для фрагментного анализа ДНК Постановка ПЦР на наборе реагентов «Синдром Жильбера (Gilbert Syndrome)» для определения количества ТА-повторов в промоторной области гена <i>UGT1A1</i> методом капиллярного электрофореза Постановка ПЦР на наборе реагентов «MSI» для выявления состояния микросателлитной нестабильности методом капиллярного электрофореза
Практика	Запуск анализа на генетическом анализаторе Нанофор 05 Подготовка проб для анализа: приготовление премикса размерного стандарта и DI-FA формамида, объединение аликовт продуктов ПЦР и премикса в загрузочном планшете. Денатурация образцов. Загрузка проб в прибор Нанофор 05. Создание проекта анализа. Запуск капиллярного электрофореза
Теория, практика	Программное обеспечение для анализа данных Обзор программы для анализа данных фрагментного анализа ДНК GeneMarker® software. Приложения фрагментного анализа ДНК. Демонстрация данных. Работа с программным обеспечением в группах
Практика	Анализ результатов фрагментного анализа ДНК Анализ полученных данных. Самостоятельная работа с программной для анализа данных

Раздел 4.

МАССОВОЕ ПАРАЛЛЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКИХ ЗАДАЧАХ

Теория	Запуск цикла секвенирования таргетной панели генов, ассоциированных с развитием опухолей молочных желез и яичников на платформе «Нанофор СПС» Обзор принципа секвенирования путем синтеза на примере платформы «Нанофор СПС» Цели таргетного секвенирования: ампликонные панели vs. гибридизационный захват; клинические/исследовательские задачи. Артефакты и источники ошибок: праймер-димеры, off-target, индексная перекрёстная контаминация, дубликаты ПЦР. Метаданные (интервалы исследуемых регионов, референсный геном) Структура данных: BCL → FASTQ, индексные файлы, sample sheet.
--------	--

ПОДГОТОВКА ОКРУЖЕНИЯ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ДАННЫХ

Теория, практика	Организация проекта, получение референса и индексация Оценка качества выходных данных «Нанофор СПС» Trimming адаптеров, обрезка по качеству и минимальной длине Выравнивание и подготовка BAM Постобработка и индексация Маркировка дупликатов Оценка покрытия таргетных регионов
------------------	---

Раздел 5.

ПОИСК, ФИЛЬТРАЦИЯ И АННОТАЦИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ВАРИАНТОВ

Теория, практика	Типы вариантов: однонуклеотидные варианты, индели Фильтрация и нормализация файлов с вариантами Аннотация и интерпретация вариантов Визуализация в геномном браузере Критерии патогенности наследственных вариантов
------------------	---

Подведение итогов Школы
