

Получена: 4 сентября 2016 / Принята: 11 октября 2016 / Опубликовано online: 31 октября 2016

УДК 616.12

## **РАЗРАБОТКА HALOPLEX ПАНЕЛИ И ПОДГОТОВКА ДНК-БИБЛИОТЕК ДЛЯ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЕРДЕЧНЫХ АРИТМИЙ**

**Айнур Ж. Ахметова<sup>1</sup>, Жаннур М. Абилова<sup>1</sup>,  
Махаббат С. Бекбосынова<sup>2</sup>, Katrin Panzitt<sup>3</sup>,  
Slave Trajanoski<sup>3</sup>, Christian Guelly<sup>3</sup>, Айнур Р. Акильжанова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, г. Астана, Казахстан;

<sup>2</sup> Национальный научный кардиохирургический центр, г. Астана, Казахстан;

<sup>3</sup> Центр медицинских исследований, Медицинский университет г. Грац, г. Грац, Австрия.

### **Резюме**

В данной статье подробно описана методика создания пользовательской HaloPlex кардиогенетической панели (Agilent Technologies) и метод подготовки ДНК-библиотек для таргетного секвенирования 96 генов ассоциированных с сердечными аритмиями. Онлайн программа SureDesign Online Design software (Agilent Technologies) была использована для создания HaloPlex кардиогенетической панели. Финальный дизайн панели был создан для платформы Illumina с помощью Human Genome version 19, GRCh 37. Программой было разработано 19958 ампликонов, 99,46% всех таргетных регионов были покрыты удачно. С использованием данной кардиогенетической панели были подготовлены ДНК-библиотеки для 48 образцов.

**Ключевые слова:** HaloPlex кардиогенетическая панель, таргетное секвенирование, сердечные аритмии.

### **Abstract**

## **DEVELOPMENT OF HALOPLEX PANEL AND PREPARATION OF DNA LIBRARIES FOR TARGETED SEQUENCING OF CARDIAC ARRHYTHMIAS**

**Ainur Akhmetova<sup>1</sup>, Zhannur Abilova<sup>1</sup>, Makhabbat Bekbosynova<sup>2</sup>,  
Katrin Panzitt<sup>3</sup>, Slave Trajanoski<sup>3</sup>, Christian Guelly<sup>3</sup>, Ainur Akilzhanova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan;

<sup>2</sup> National Research Cardiac Surgery Center, Astana, Kazakhstan;

<sup>3</sup> Center for Medical Research, Medical University of Graz, Graz, Austria

Method of preparation of custom HaloPlex cardiogenetic panel (Agilent Technologies) and method of preparation of DNA libraries for targeted sequencing of 96 genes associated with cardiac arrhythmias were described in details in this article. SureDesign Online Design software (Agilent Technologies) was used to create the HaloPlex panel. Final design was developed for Illumina platform using Human Genome version 19, GRCh 37. 19958 amplicons were generated by the program, 99,46% of all target regions were covered successfully. DNA libraries were prepared for 48 samples using the custom HaloPlex cardiogenetic panel.

**Keywords:** HaloPlex cardiogenetic panel, targeted sequencing, cardiac arrhythmias.

*Работа выполнена в рамках проекта «Интеграционный геномный и метаболомный анализ кардиометаболических нарушений в казахской популяции» по бюджетной программе МОН РК 3907/ГФ4 «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.*

Түйін

## HALOPLEX ПАНЕЛІН ӨЗІРЛЕУ ЖӘНЕ ЖҮРЕК АРИТМИЯЛАРЫН ТАРГЕТТІ СЕКВЕНИРЛЕУГЕ ДНҚ-КІТАПХАНАЛАРЫН ДАЙЫНДАУ

**Айнур Ж. Ахметова<sup>1</sup>, Жаннур М. Абилова<sup>1</sup>,  
Махаббат С. Бекбосынова<sup>2</sup>, Katrin Panzitt<sup>3</sup>, Slave Trajanoski<sup>3</sup>,  
Christian Guelly<sup>3</sup>, Айнур Р. Акильжанова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Астана, Қазақстан;

<sup>2</sup> Ұлттық ғылыми кардиохирургия орталығы, Астана, Қазақстан;

<sup>3</sup> Медициналық зерттеулер орталығы, Грац қаласының Медициналық университеті, Грац, Австрия

Мақалада жүрек аритмияларымен ассоциацияланған 96 генді таргетті секвенирлеуге арналған HaloPlex пайдаланушы кардиогенетикалық панелін (Agilent Technologies) әзірлеу әдістемесі және ДНҚ-кітапханаларын дайындау әдісі толықтай сипатталған. HaloPlex кардиогенетикалық панелін дайындауда SureDesign Online Design software (Agilent Technologies) онлайн бағдарламасы қолданылды. Панель дизайні Human Genome version 19, GRCh 37 көмегімен Illumina платформасына арнап дайындалды. Бағдарламамен 19958 ампликон әзірленді, барлық таргетті аймақтардың 99,46% сәтті үлестірілді. Аталған кардиогенетикалық панель көмегімен 48 үлгіге ДНҚ-кітапханалары дайындалды.

**Түйін сөздер:** HaloPlex кардиогенетикалық панелі, таргетті секвенирлеу, жүрек аритмиялары.

### Библиографическая ссылка:

Ахметова А.Ж., Абилова Ж.М., Бекбосынова М.С., Panzitt K., Trajanoski S., Guelly C., Акильжанова А.Р. Разработка HaloPlex панели и подготовка ДНК-библиотек для таргетного секвенирования сердечных аритмий // Наука и Здравоохранение. 2016. №5. С. 43-52.

Akhmetova A., Abilova Zh., Bekbosynova M., Panzitt K., Trajanoski S., Guelly C., Akilzhanova A. Development of HaloPlex panel and preparation of DNA libraries for targeted sequencing of cardiac arrhythmias. *Nauka i Zdravookhranenie* [Science & Healthcare]. 2016, 5, pp. 43-52.

Ахметова А.Ж., Абилова Ж.М., Бекбосынова М.С., Panzitt K., Trajanoski S., Guelly C., Акильжанова А.Р. HaloPlex панелін әзірлеу және жүрек аритмияларын таргетті секвенирлеуге ДНҚ-кітапханаларын дайындау // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2016. №5. Б. 43-52.

### Введение

Внезапная сердечная смерть (ВСС) является одной из наиболее острых нерешенных проблем современной кардиологии. В промышленно развитых странах частота случаев ВСС принимает угрожающие размеры. Она ежегодно уносит из жизни множество активных, трудоспособных людей, причем около 20% умерших от ВСС не имеют явного кардиологического заболевания [4, 5, 7, 10]. ВСС наступает в течение от нескольких минут до 24 часов с момента первого появления симптомов и происходит в результате остановки сердечной деятельности

на фоне внезапной асистолии или фибрилляции желудочков у людей, находящихся до этого в физиологически и психологически стабильном состоянии. Отсутствие выраженных симптомов болезни перед смертью не является показателем того, что данные лица были здоровы.

Причины внезапной сердечной смерти различаются в зависимости от возраста пациента. ВСС у детей представлена: I) синдромом внезапной смерти детей младенцев (СВСМ); II) ВСС у детей с известными сердечными заболеваниями (жизнеугрожающие нарушения ритма сердца,

*Работа выполнена в рамках проекта «Разработка и клиническая апробация HALOPLEX кардиогенетической панели для выявления генетической предрасположенности и диагностики сердечных аритмий» по бюджетной программе МОН РК 0072/ПЦФ-14 «Создание и развитие основ геномной медицины в Казахстане» на 2015-2017 гг.*

кардиомиопатии, врожденные пороки сердца, первичная легочная гипертензия, аритмогенная дисплазия правого желудочка и др); III) ВСС у считающихся здоровыми детей, когда жизнеугрожающее состояние является первым симптомом болезни. [4] Аритмиям принадлежит ведущая роль в патофизиологии ВСС.

Механизмами, лежащими в основе развития внезапной сердечной смерти, в подавляющем большинстве случаев являются желудочковая тахикардия (ЖТ) и фибрилляция желудочков (ФЖ) - 95%, а оставшиеся 5% приходятся на долю брадиаритмий и асистолии [2, 3, 6, 8, 13]. Желудочковые аритмии часто встречаются в молодом возрасте при структурно неизменном сердце [9, 11, 14, 15], и у пожилых людей, и их частота возрастает при наличии структурного заболевания сердца, встречаясь у 70–80% людей старше 60 лет [1].

Несмотря на наличие большого количества современных инструментальных методов оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы, их не использование для оценки риска внезапной смерти не всегда является информативным и, в сочетании со значительной стоимостью, ограничивает возможности массового применения. В связи с этим, актуальным является поиск биологических маркеров предрасположенности к внезапной смерти и, прежде всего генетических, позволяющих выявлять повышенный риск смертельного исхода задолго до его наступления и соответственно предпринять необходимые лечебно-профилактические мероприятия для его предупреждения. Одним из наиболее эффективных подходов к выявлению генетической компоненты мультифакторных заболеваний является изучение ассоциаций с полиморфизмами генов-кандидатов [12].

Размер полного генома человека составляет 3 200 000 000 пар оснований (3,2 млрд. пар оснований / Гб), ~ 1 % генома кодирует экзом (белок - кодирующие гены), что составляет около 30000 генов. 1-15 генов, как правило, достаточно для рутинного диагностического тестирования для покрытия

> 65% случаев всех случаев аритмий. Секвенирование нового поколения (NGS) произвело революцию в области генетики, позволяя лабораториям определить вариации последовательности геномов быстро и экономически эффективно. Для того, чтобы использовать мощности секвенирования следующего поколения для определения генетических аномалий, связанных с конкретными болезненными состояниями, очень важно выбрать целевые конкретные области генома.

Agilent HaloPlex панели – конструкции, которые сосредоточены на целевых наборах генов для конкретных приложений. В настоящее время Agilent предлагает две HaloPlex кардиогенетической панели – HaloPlex кардиомиопатия (HaloPlex Cardiomyopathy) HaloPlex аритмия (HaloPlex Arrhythmia). Панели HaloPlex кардиомиопатия и HaloPlex аритмия являются панелями генов для целевого обогащения целевых последовательностей для последующего секвенирования на платформах NGS, разработанные специально для наследственных форм кардиомиопатии и аритмии [16]. После тщательного анализа публикаций по кардиомиопатиям, а также информации, полученной от GeneReviews в NIH интернет-ресурсе, 34 гена, связанных с гипертрофической кардиомиопатией, дилатационной кардиомиопатией, и аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка были включены в данную панель. Панель Аритмия включает 21 ген, коррелирующих с синдромами удлиненного интервала QT, короткого интервала QT, синдрома Бругада и катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии. Есть существенное совпадение некоторых генов, связанных с различными типами кардиомиопатий, аритмий. Панели дают возможность просеквенировать все гены одновременно для клинических образцов в одном экономически эффективном запуске платформы NGS. Но, эти панели исследования не учитывают все гены, которые могут привести к нарушениям ритма сердца.

**Нашей целью** было разработать новую кардиогенетическую панель секвенирования

на основе изучения генов-кандидатов с помощью технологии HaloPlex (Agilent Technologies) для диагностики и исследований сердечных аритмий, включающую 96 генов.

#### Методы

#### 1. Дизайн HaloPlex кардиогенетической панели

Онлайн программа SureDesign Online design software (Agilent Technologies) была

использована для создания пользовательской HaloPlex кардиопанели для Таргетного секвенирования 96 генов ассоциированных с сердечными аритмиями с использованием метода Таргетного обогащения. Список аритмогенных синдромов и генов ассоциированных с развитием сердечных аритмий показан в Таблице 1.

Таблица 1.

#### Сердечные гены и аритмогенные синдромы.

Аритмогенные синдромы	Гены
Синдром удлиненного QT	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, ANK2, KCNJ2, CACNA1c, Cav3, SCN4b, AKAP9, KCNJ5, SNTA1
Синдром укороченного QT	KCNQ1, KCNH2, KCNJ2
Синдром Бругада (Brugada – BrS)	SCN5A, CACNB2, GPD1L, SCN1b, KCNE3, SCN3b, CACNA1c, MOG1, KCNE5, KCND3, HCN4
	KCNA5, KCNE2, KCNQ1, NPPA, NUP155, LMNA, SCN5A, KCNJ8, ABCC9, GJA5, KCNJ2
Идиопатическая желудочковая тахикардия	RyR2, CASQ2, KCNJ2
Катехолазависимая полиморфная желудочковая тахикардия – Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT)	PKP2, DSG2, DSC2, DSP, JUP, TMEM43, TGFB3, RyR2
Аритмогенная правожелудочковая кардиомиопатия (Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy – ARVC)	LMNA, LDB3, TNNT2, PLN, MYH7, MYBPC3, SCN5A, DES, SGCD, CSRP3, TCAP, ACTC, TNNC1, TNNI3, TTR, ILK, EMD, CRYAB, BAG3, CHRM2, SGCB, DSP, TPM1, NEBL, DSG2, TTN, EYA4, ABCC9, TMPO, PSEN1, PSEN2, ACTN2, TAZ, VCL, ANKRD1, FKTN, LAMP2, NEXN, TBX20, DTNA, MYPN, LAMA4, FHL2, LAMA2, DMD, RBM20, SERCA2A, MYH6

До создания дизайна панели новый аккаунт был зарегистрирован на веб-странице Agilent SureDesign

<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>.

Advanced wizard option был использован для разработки дизайна из multiple probe groups. В нашем случае нужно было включить в нашу HaloPlex кардиопанель три probe group. Две probe group уже были в составе двух предварительно разработанных панелей Agilent Technologies - HaloPlex Кардиомиопатия (HaloPlex Cardiomyopathy) и HaloPlex Аритмия (HaloPlex Arrhythmia). Данные панели включали в себя 34 и 21 ген отвечающих за наследуемые формы кардиомиопатии и аритмии, соответственно. Третья probe group, которая должна содержать в себе 41 генов ассоциированных с

различными аритмогенными синдромами на основе литературного обзора должна была сконструирована нами. Следующие шаги были выполнены для того, чтобы объединить все три probe group и разработать одну кардиопанель, которая состоит из 96 генов:

**ШАГ 1. Создание первого дизайна с одной probe group, который включает в себя 41 генов.** Дизайн (под названием 'CP\_241012\_opt') с одной probe group, который имеет 41 генов ассоциированных с сердечными аритмиями был произведен путем выбора соответствующей платформы секвенирования (Illumina) и длины рида (150 п.о). Все таргеты были вписаны в онлайн программу с использованием символов генов. Далее, выбрали всю базу данных аннотаций. Зонды или ампликоны были разработаны для

Работа выполнена в рамках проекта «Разработка и клиническая апробация HALOPLEX кардиогенетической панели для выявления генетической предрасположенности и диагностики сердечных аритмий» по бюджетной программе МОН РК 0072/ПЦФ-14 «Создание и развитие основ геномной медицины в Казахстане» на 2015-2017 гг.

экзомов. Таким образом, когда регионы (экзомеры) были определены онлайн программой, программа автоматически создала зонды или ампликоны, которые максимально покрывают данные регионы. Количество регионов (экзомов), покрытие и геномные позиции были просмотрены в Target Summary. Все наши таргетные регионы также были проверены при помощи UCSC Genome Browser. Новый probe group был назван как 'Probe group 1'. Таким образом, наш первый дизайн 'CP\_241012\_opt' с одной probe group 'Probe group 1', который состоит из 41 генов был создан.

Далее, скачали дизайн 'CP\_241012\_opt' из веб-страницы SureDesign. Скаченная папка состояла из общего отчета по дизайну в PDF и текстовых файлах, файла с таргетами. Также имелись 4 так называемых BED файла, где была показана информация по регионам или экзонам (какие регионы были определены программой), ампликонам (какие ампликоны были созданы для покрытия регионов), покрытым регионам (какие регионы были покрыты, не все регионы всегда покрываются так как существует ограничение по числу ампликонов, создаваемых Agilent Sure Design) и по всем отчетам. Таким образом, информация содержащая в 'CP\_241012\_opt' дизайне была оценена отдельно от программы с использованием UCSC Genome Browser для того, чтобы удостовериться, что зонды разработанные в дизайне подходят для наших экспериментов.

**ШАГ 2. Создание второго дизайна, который состоит из 55 генов путем объединения двух probe group из двух существующих панелей Agilent Technologies.** Второй дизайн (под названием 'ZMF96cardio\_1') с одной probe group, который имел 55 генов был подготовлен путем объединения двух probe group с использованием двух существующих панелей компании Agilent Technologies. В первую очередь, с помощью Advanced wizard option зонды были выбраны из probe group панели HaloPlex Кардиомиопатия (HaloPlex Cardiomyopathy), которая включает в себя 34 гена, затем выбраны из дизайна HaloPlex Аритмия (HaloPlex Arrhythmia), который

состоит из 21 гена. Новый разработанный probe group был назван 'Probe group 2'. В дальнейшем, дизайн 'ZMF96cardio\_1' был скачен из веб-страницы онлайн программы. Оценка всей необходимой информации в Отчете дизайнера была проведена тщательно таким же образом, как описано в Шаге 1. В итоге, наш второй дизайн 'ZMF96cardio\_1' с одной (смешанной) probe group 'Probe group 2', который состоит из 55 генов был конструирован.

**ШАГ 3. Создание окончательного (финального) дизайна, который состоит из 96 генов.** После того как две probe group 'Probe group 1' и 'Probe group 2', которые имеют 41 кардио генов и 55 кардио генов были разработаны, новый скомбинированный дизайн, который содержит в себе 96 кардио генов был подготовлен с помощью Advanced Wizard option для разработки дизайнера из нескольких probe group. Таким образом, три probe group были смешаны из разных дизайнов для создания объединенного дизайна под названием 'ZMF96cardio', который имеет 96 кардио генов ассоциированных с сердечными аритмиями.

## **2. Подготовка библиотек генов-кандидатов с использованием HaloPlex кардиопанели**

Библиотеки генов-кандидатов были подготовлены с помощью набора HaloPlex Custom Panel Tier 1 kit, Agilent Technologies (ILMFST, рn G9901C) согласно протоколу производителя «HaloPlex Target Enrichment System for Illumina Sequencing» (версия D.3., декабрь 2012) для 48 ДНК образцов: 23 пациента с атриовентрикулярной блокадой (14 женщин и 9 мужчин) и 25 пациентов с синдромом слабости синусового узла (14 женщин и 11 мужчин).

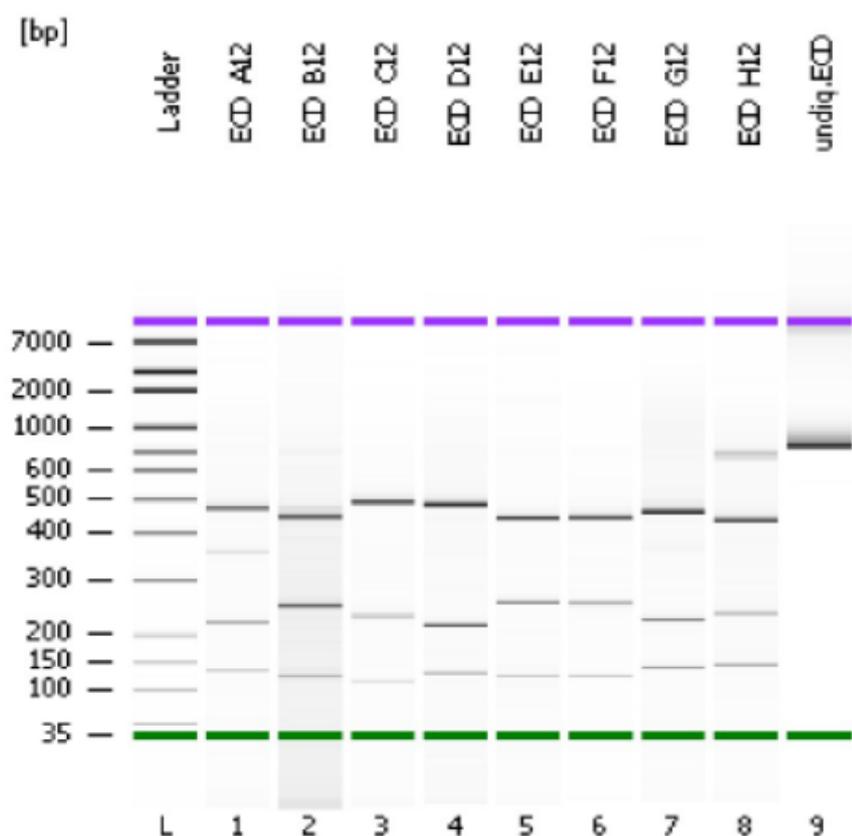
Протокол исследования, информированное согласие и все виды рекрутинга были рассмотрены на Локальном этическом комитете «Центра наук о жизни» (выписка из протокола №16 от 11.03.2015г. заседания Этической комиссии ЧУ «Центра наук о жизни», АОО «Назарбаев Университет»). Форма информированного согласия была прочитана и подписана каждым пациентом.

HaloPlex протокол оптимизирован для усвоения 225 ng геномной ДНК. В качестве контроля использовали обогащенную контрольную ДНК (Enrichment Control DNA, ECD), поставляемую вместе с набором. Количественный и качественный анализ всех 48 ДНК образцов был проведен с помощью флуориметра Qubit 2.0 и 2% агарозного геля, соответственно.

Протокол состоит из 10 этапов. Процедура обогащения образцов ДНК была проведена в зоне пре-амплификации, в то время как дальнейшие эксперименты с амплифицированными, обогащенными образцами ДНК были выполнены в пост-амплификационной рабочей зоне.

### ЭТАП 1. Фрагментация геномной ДНК рестрикционными ферментами.

На первом этапе, в 45 µl очищенной от нуклеаз воде растворили 225 ng каждого образца геномной ДНК (финальная концентрация ДНК – 5 ng/µl). После чего, образцы геномной ДНК были разрезаны на фрагменты (различной длины) с помощью 16 различных ферментов в 8 различных рестрикционных пробирках (реакциях) при 37°C в течении 30 минут. Обогащенная контрольная ДНК (Enrichment Control DNA, ECD) была использована в качестве контроля, результаты фрагментации были валидированы на биоанализаторе (Bioanalyzer 2100) (Рисунок 1).



**Рисунок 1. Валидация результатов фрагментации на 2100 Bioanalyzer.**  
L: ДНК маркер (DNA ladder), дорожка 1-8: фрагментированная обогащенная ДНК, пробирка 1-8, дорожка 9: не фрагментированная обогащенная контрольная ДНК

Результаты электрофореза на 2100 Bioanalyzer показали, что все образцы фрагментированной обогащенной ДНК (дорожка 1-8) имели 3 бэнда - 125 bp, 225 bp и 450 bp согласно протоколу. Обогащенная ДНК имеет геномную ДНК смешанную с ПЦР

продуктом, который состоит из всех рестрикционных сайтов для всех 16 ферментов, использованных в фрагментации. Поэтому не фрагментированная обогащенная контрольная ДНК (дорожка 9) показала бэнд ПЦР продукта 800 bp как и ожидалось.

*Работа выполнена в рамках проекта «Разработка и клиническая апробация HALOPLEX кардиогенетической панели для выявления генетической предрасположенности и диагностики сердечных аритмий» по бюджетной программе МОН РК 0072/ПЦФ-14 «Создание и развитие основ геномной медицины в Казахстане» на 2015-2017 гг.*

**ЭТАП 2. Гибридизация фрагментированных ДНК с HaloPlex зондами для таргетного обогащения и индексирование образцов.** Гибридизация коллекции фрагментов геномной ДНК с HaloPlex зондами (которые были разработаны для выборочной гибридизации с фрагментами таргетных регионов генома и для непосредственной циркуляризации таргетных ДНК фрагментов) была проведена в гибридизационном мастер миксе при 54°C в течении 3 часов. Гибридизационная смесь включала в себя 50 µl гибридизационного раствора и 20 µl HaloPlex зонда. На данном этапе библиотека зондов была гибридизирована к обеим концам таргетных фрагментов для создания кольцевых ДНК молекул. Также 48 разных индекс сиквенсов были добавлены к 48 образцам ДНК (к таргетным регионам) во время процесса гибридизации для дальнейшей идентификации образцов во время биоинформатического анализа. В итоге, мы получили биотинилированные циркуляризованные фрагменты таргетной ДНК, которые включали в себя баркод (индекс сиквенсы) и сиквенс специфические адаптеры.

**ЭТАП 3. Захват таргетных ДНК.** На этом этапе, циркуляризованные гибриды таргетная ДНК-HaloPlex зонды, содержащие биотин были захвачены на магнитных

стрептавидиновых шариках (HaloPlex Magnetic Beads). Сначала, HaloPlex магнитные шарики (HaloPlex Magnetic Beads) были ресуспендированы в 40 µl Capture solution и добавлены в 160 µl гибридизационную реакцию. Затем, связанные с шариками образцы промыли в 100 µl Wash Solution и инкубировали в термоциклере при 46°C в течении 10 минут для устранения ДНК фрагментов, которые не были гибридизированы к HaloPlex зонду. Также, было подготовлено 50 mM NaOH раствора из стоковой концентрации 10 N NaOH для использования на этапе 6.

**ЭТАП 4. Лигирование захваченных, циркуляризованных фрагментов.** На этой фазе, в реакцию захвата была добавлена ДНК-лигаза для соединения циркуляризованных гибридов таргетная ДНК-HaloPlex зонды. Пробирки с образцами были инкубированы в термоциклере при 55°C в течении 10 минут для лигации.

**ЭТАП 5. Подготовка ПЦР мастер микса.** На данном этапе приготовили ПЦР мастер микс для амплификации захваченных таргетных ДНК (Таблица 2).

В ПЦР реакцию была добавлена 2M уксусная кислота для нейтрализации NaOH раствора, который будет использован при элюции на следующем этапе.

Таблица 2.

**Подготовка ПЦР мастер микса.**

Реагент	Объем для 1 реакции, µl	Объем для 12 реакций (включая излишек), µl
5XHerculase II Reaction Buffer	10	130
dNTPs (100mM, 25 mM каждого dNTP)	0.4	5.2
*Primer Forward (25 µM)	1	13
*Primer Reverse (25 µM)	1	13
2 M уксусная кислота	0.5	6.5
Herculase II Fusion DNA Polymerase	1	13
Nuclease-free water	16.1	209.3
<b>Всего</b>	<b>30</b>	<b>390</b>

**ЭТАП 6. Промывка захваченных ДНК NaOH раствором.** На этом этапе, захваченные ДНК библиотеки промыли в 100 µl SSC Buffer для исключения не лигированных циркуляризованных гибридов HaloPlex зонд – таргетная ДНК. Затем, захваченные ДНК

библиотеки были элюированы 25 µl свежеприготовленным 50 mM NaOH раствором. Использование NaOH раствора с высоким качеством на данном этапе является очень важным для оптимальной промывки и восстановления ДНК.

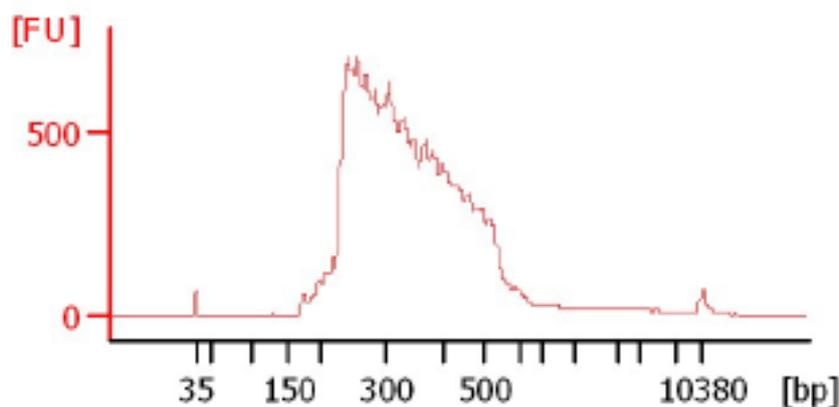
*Работа выполнена в рамках проекта «Разработка и клиническая апробация HALOPLEX кардиогенетической панели для выявления генетической предрасположенности и диагностики сердечных аритмий» по бюджетной программе МОН РК 0072/ПЦФ-14 «Создание и развитие основ геномной медицины в Казахстане» на 2015-2017 гг.*

**ЭТАП 7. ПЦР-амплификация захваченных таргетных библиотек.** На этом этапе, 20  $\mu$ l захваченных ДНК после промывки 50 mM NaOH раствором добавили в 30  $\mu$ l ПЦР мастер микс, приготовленный на этапе 5. ПЦР-амплификация захваченных таргетных ДНК библиотек была проведена при температуре отжига 60°C, количество циклов – 20.

**ЭТАП 8. Очистка амплифицированных таргетных библиотек.** На данном этапе, амплифицированные таргетные ДНК библиотеки были очищены с использованием AMPure XP шариков. Сначала, амплифицированные таргетные ДНК на шариках промыли 70% свежеприготовленным этанолом 4 раза для удаления маленьких

ДНК-фрагменты, такие как адаптеры, затем амплифицированные таргетные библиотеки элюировали 10 mM Tris-HCl раствором.

**ЭТАП 9. Валидация обогащения и определение количества обогащенных таргетных ДНК.** Оценка качества и количества полученных ДНК библиотек была проведена на Bioanalyzer 2100. Длина ампликонов была в диапазоне 175-625 bp, где большинство продуктов имели размер 225-525 bp, как и ожидалось (**Рисунок 2**). Диапазон размеров ампликонов 175-625 bp был включен для количественной оценки обогащенных таргетных ДНК. Средняя концентрация подготовленных ДНК библиотек составила 90 ng/ $\mu$ l.



**Рисунок 2.** ДНК библиотека с хорошим качеством (образец №1) на 2100 Bioanalyzer.

**ЭТАП 10. Объединение образцов с различными индексами для мультиплексного секвенирования.** На этом этапе, образцы с разными индексами и с эквивалентным количеством (концентрации ДНК библиотек, полученные с использованием Биоанализатора) были объединены вместе для проведения мультиплексного секвенирования на HiSeq 2000.

#### Результаты

Была создана HaloPlex кардиогенетическая панель для таргетного секвенирования 96 генов ассоциированных с аритмиями при помощи онлайн программы SureDesign Online Design software (Agilent Technologies). После подготовки дизайна HaloPlex кардиопанели, панель была скачена и все наши таргеты были просмотрены с использованием UCSC Genome Browser, где необходимо. Финальный дизайн был создан с помощью Генома

человека, версия 19 (Human Genome version 19, GRCh 37, February 2009) для платформы Illumina, длина ридов 150 bp. Общее число таргетов – 96 генов, ассоциированных с различными сердечными аритмиями. Размер таргетного региона составляет 463.767 kbp. Программой было создано 19958 ампликонов для того, чтобы покрыть все таргетные регионы. Таким образом, 99,46% всех таргетных регионов были покрыты удачно. Несмотря на то, что 0,54% всех таргетов не были покрыты и пропущены, процент покрытых таргетов довольно хороший (**Рисунок 3**).

Часть отчета дизайна нашей кардиопанели по покрытию таргетов показана на **Рисунке 4**.

Когда 'ZMF96cardio' дизайн был завершен и был оценен как правильный, панель была заказана с SureDesign аккаунта онлайн.

*Работа выполнена в рамках проекта «Разработка и клиническая апробация HALOPLEX кардиогенетической панели для выявления генетической предрасположенности и диагностики сердечных аритмий» по бюджетной программе МОН РК 0072/ПЦФ-14 «Создание и развитие основ геномной медицины в Казахстане» на 2015-2017 гг.*

**Design Information**

Design Name: ZMF96cardio  
 Design ID: 22408-1387190209  
 Species: H. sapiens (H. sapiens, hg19, GRCh37, February 2009)  
 Platform: Illumina  
 Read Length: 150 bp

**Probegroup Summary**

Number of Probegroups: 2  
 Probegroup 1 : CP\_241012\_opt  
 Probegroup 2 : ZMF96cardio\_1

**Target Summary**

Target Region Size : 463.767 kbp

**Amplicon Summary**

Total Amplicons: 19958  
 Total Target Bases Analyzable: 406.062 kbp  
 Total Sequenceable Design Size: 1.039 Mbp  
 Target Coverage: 99.46 %  
 Recommended Minimum Sequencing per Sample: 207.994 Mbp  
 Pricing: Illumina Tier 1 (Probe Region Size = 0 - 499 kbp; up to 20K probes)

Рисунок 3. Общая информация по дизайну

Design Details				
Target ID	Regions	Coverage	High Coverage (>= 90%)	Low Coverage (< 90%)
ABCC9	41	100 %	41	0
ACTC1	6	96.97 %	5	1
ACTN2	23	99.82 %	23	0
AKAP9	52	99.72 %	52	0
ANK2	58	99.93 %	58	0
ANKRD1	9	100 %	9	0
ATP2A2	22	100 %	22	0
BAG3	5	100 %	5	0
CACNA1C	53	99.95 %	53	0
CACNA2D1	42	100 %	42	0
CACNB2	20	99.78 %	20	0
CALR3	9	100 %	9	0
CASQ2	11	100 %	11	0

Рисунок 4. Отчет дизайна по покрытию таргетов на один ген.

Для подготовки библиотек генов-кандидатов, сначала ДНК образцы были поделены на фрагменты 16 различными рестрикторными ферментами и денатурированы. Затем, библиотека зондов была гибридизирована к обеим концам таргетных фрагментов для создания кольцевых ДНК молекул. 48 разных индекс сиквенсов были добавлены к 48 образцам. В дальнейшем, HaloPlex зонды были биотинилированы и таргетные фрагменты были захвачены магнитными стрептавидиновыми шариками. Кольцевые молекулы ДНК были соединены вместе в реакции лигации. Затем,

таргетные фрагменты были амплифицированы, в итоге создавая обогащенные и индексированные продукты амплификации, которые готовы для секвенирования.

**Выводы.** Была создана новая HaloPlex кардиогенетическая панель для таргетного секвенирования 96 генов ассоциированных с аритмиями. Подготовлено 48 ДНК-библиотек с использованием данной панели, все образцы были секвенированы на Illumina HiSeq 2000. В настоящее время проводится биоинформатический анализ полученных данных секвенирования.

*Работа выполнена в рамках проекта «Разработка и клиническая апробация HALOPLEX кардиогенетической панели для выявления генетической предрасположенности и диагностики сердечных аритмий» по бюджетной программе МОН РК 0072/ПЦФ-14 «Создание и развитие основ геномной медицины в Казахстане» на 2015-2017 гг.*

У авторов статьи нет конфликта интересов.

#### **Литература:**

1. Aronow W.S. Treatment of ventricular arrhythmias in older adults. *J Am Geriatr Soc* 1995;43:688–95.
2. Bauce B., Rampazzo A., Basso C., Bagattin A., Daliento L., Tiso N., Turrini P., Thiene G., Danieli G.A., Nava A. Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death: early diagnosis of asymptomatic carriers. *J Am Coll Cardiol* 2002, 40:341–349.
3. Chen Q., Kirsch G.E., Zhang D., Brugada R., Brugada J., Brugada P., Potenza D., Moya A., Borggrefe M., Breithardt G., Ortiz-Lopez R., Wang Z., Antzelevitch C., O'Brien R.E., Schulze-Bahr E., Keating M.T., Towbin J.A., Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998, 392:293–296.
4. Corrado B., Basso C., Thiene G. Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. *Cardiovasc. Res.* 50 (2001) 399–408.
5. Keating M.T., Sanguinetti M.C. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001, 104:569–580
6. Laitinen P.J., Brown K.M., Piippo K., Swan H., Devaney J.M., Brahmabhatt B., Donarum E.A., Marino M., Tiso N., Viitasalo M., Toivonen L., Stephan D.A., Kontula K. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001, 103:485–490.
7. Martin C.A., Huang C.L., Matthews G.D. Recent developments in the management of patients at risk for sudden cardiac death. *Postgrad Med.* 2011 Mar;123(2):84-94. doi: 10.3810/pgm.2011.03.2266.
8. Priori S.G., Napolitano C., Tiso N., Memmi M., Vignati G., Bloise R., Sorrentino V., Danieli G.A. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001, 103:196–200.
9. Priori S.G., Napolitano C., Memmi M., Colombi B., Drago F., Gasparini M., DeSimone L., Coltorti F., Bloise R., Keegan R., Cruz Filho F.E., Vignati G., Benatar A., DeLogu A. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002, 106:69–74.
10. Puranik R., Chow C.K., Duflou J.A., Kilborn M.J., McGuire M.A. Sudden death in the young. *Heart Rhythm* 2 (2005) 1277–1282.
11. Reid D.S., Tynan M., Braidwood L., Fitzgerald G.R. Bidirectional tachycardia in a child. A study using His bundle electrography. *Br Heart J* 1975, 37:339–344.
12. Roden D.M., American Heart Association. Cardiovascular genetics and genomics. Chichester: Wiley-Blackwell; 2009.
13. Splawski I., Shen J., Timothy K.W., Lehmann M.H., Priori S., Robinson J.L., Moss A.J., Schwartz P.J., Towbin J.A., Vincent G.M., Keating M.T. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000, 102:1178–1185.
14. Swan H., Piippo K., Viitasalo M., Heikkila P., Paavonen T., Kainulainen K., Kere J., Keto P., Kontula K., Toivonen L. Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42–q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J Am Coll Cardiol* 1999, 34:2035–2042.
15. Tiso N., Stephan D.A., Nava A., Bagattin A., Devaney J.M., Stanchi F., Larderet G., Brahmabhatt B., Brown K., Bauce B., Muriago M., Basso C., Thiene G., Danieli G.A., Rampazzo A. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet* 2001, 10:189–194.
16. <http://www.chem.agilent.com/library/datasheets/Public/HaloplexCardiomyopathyandArrhythmiaPanelsDataSheet59912525EN.pdf>

#### **Контактная информация:**

**Ахметова Айнура Жармухамбетовна** - MSc, научный сотрудник Лаборатории геномной и персонализированной медицины, ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев университет.

**Почтовый адрес:** 010000, г. Астана, Проспект Кабанбай батыра, 53, кабинет 3423.

**E-mail:** ainur.akhmetova2@nu.edu.kz

**Телефон:** +7 7172 70 93 18

*Работа выполнена в рамках проекта «Разработка и клиническая апробация HALOPLEX кардиогенетической панели для выявления генетической предрасположенности и диагностики сердечных аритмий» по бюджетной программе МОН РК 0072/ПЦФ-14 «Создание и развитие основ геномной медицины в Казахстане» на 2015-2017 гг.*