

# ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА МУЛЬТИТАРГЕТНОЙ ОДНОНУКЛЕОТИДНОЙ ЭЛОНГАЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

А.А. Мусаелян<sup>1</sup>, И.В. Чистяков<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук, В.Д. Назаров<sup>1</sup>, С.В. Лапин<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук, М.В. Согоян<sup>1</sup>, С.Е. Хальчицкий<sup>2</sup>, кандидат биологических наук, В.Л. Эмануэль<sup>1</sup>, доктор медицинских наук, профессор, Т.В. Лобачевская<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук, А.Л. Акопов<sup>1</sup>, доктор медицинских наук, профессор

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Российская Федерация, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8;

<sup>2</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский детский ортопедический институт имени Г.И. Турнера» Минздрава России, Российская Федерация, 196603, Санкт-Петербург, Пушкин, ул. Парковая, д. 64–68

E-mail: nazarov19932@mail.ru

**Введение.** Молекулярное профилирование опухолевого материала необходимо для персонализированного подхода в лечении пациентов со злокачественными новообразованиями. Выявление соматических мутаций новообразований в генах EGFR и KRAS позволяет прогнозировать течение заболевания и индивидуализировать терапию. Одним из высокочувствительных методов для детекции точечных мутаций является мультитаргетная однонуклеотидная элонгация (МОЭ).

**Цель.** Оптимизировать метод МОЭ для детекции клинически значимых aberrаций в генах EGFR и KRAS в опухолевом материале.

**Материал и методы.** Генетический материал был выделен из 31 образца немелкоклеточного рака легкого, из которых 9 были фиксированы формалином и залиты парафином. Основные лабораторные характеристики МОЭ сравнивали с показателями полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, цифровой ПЦР и секвенированием по Сэнгеру.

**Результаты.** Создан протокол для верификации aberrаций в генах EGFR и KRAS. Определен порог чувствительности метода МОЭ, который составил 48 копий/мкл мутантного ДНК. Было показано, что лабораторные характеристики метода сопоставимы с ПЦР в реальном времени. МОЭ способен детектировать aberrации в опухолевом материале, фиксированным формалином и залитым парафином. По нашим данным, МОЭ превосходит прямое секвенирование по Сэнгеру по количеству выявленных точечных мутаций: соответственно 26 и 3%.

**Заключение.** МОЭ является высокочувствительным и сравнительно быстрым многопараметрическим методом генотипирования опухолевого материала.

**Ключевые слова:** мультитаргетная однонуклеотидная элонгация, соматические мутации, таргетная терапия, немелкоклеточный рак легкого

## OPTIMIZATION OF THE METHOD OF THE MULTI-TARGET SINGLE-BASE ELONGATION FOR THE DETECTION OF SOMATIC MUTATIONS IN MALIGNANCIES

A.A. Musaelyan<sup>1</sup>, I.V. Chistyakov<sup>1</sup>, V.D. Nazarov<sup>1</sup>, S.V. Lapin<sup>1</sup>, M.V. Sogoyan<sup>1</sup>,  
S.E. Khalchitsky<sup>2</sup>, W.L. Emanuel<sup>1</sup>, T.W. Lobachevskaya<sup>1</sup>, A.L. Akopov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Lva Tolstogo Str. 6–8, Saint Petersburg, 197022, Russian Federation;

<sup>2</sup>Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Parkovaya, 64–68, Pushkin, Saint Petersburg, 196603, Russian Federation  
E-mail: nazarov19932@mail.ru

**Background.** Genotyping of the tumor samples is necessary for a personalized approach in the treatment of patients with malignancies. The identification of somatic mutations in EGFR and KRAS genes can help to predict the course of the disease and to individualize the therapy. One of the methods for detecting somatic point mutations in EGFR and KRAS genes is the multi-target single-base elongation (MSE).

**Objective.** To optimize MSE for the detecting clinically significant aberrations in the EGFR and KRAS genes in the tumor samples.

**Material and methods.** DNA was isolated from 31 samples of non-small cell lung cancer, 9 of which were formalin-fixed and paraffin embedded (FFPE). Laboratory characteristics of the MSE were compared with such one of real-time PCR, digital PCR, and Sanger sequencing.

**Results.** Protocol for verification the aberrations in the *EGFR* and *KRAS* genes has been created. The sensitivity of MSE was determined (48 copies/ $\mu$ l of the mutant DNA). The laboratory characteristics of the method were shown to be comparable with such one of real-time PCR. MSE is able to detect aberrations in FFPE tissue samples. MSE can detect more point mutations in comparison with Sanger sequencing: 26 vs 3%, respectively.

**Conclusion.** MSE is a highly sensitive and relatively rapid multiparametric method of genotyping a tumor tissue.

**Key words:** multi-target single-base elongation, somatic mutations, targeted therapy, NSCLC

## ВВЕДЕНИЕ

Увеличение разнообразия терапевтических подходов лечения злокачественных новообразований, в частности внедрение новых таргетных препаратов, требует от молекулярно-генетического тестирования высокой чувствительности и точности. Ограничениями для молекулярного профилирования опухолевого материала служат процентное содержание опухолевых клеток в образце, внутриопухолевая генетическая гетерогенность некоторых злокачественных новообразований и низкое качество нуклеиновых кислот в фиксированном материале [1, 2]. Одним из методов генетического анализа, который максимально соответствует перечисленным критериям, является мультитаргетная однонуклеотидная элонгация (МОЭ) – высокочувствительная и специфичная методика определения точечных мутаций [3].

МОЭ является одним из вариантов метода Сэнгера. МОЭ состоит из последовательных этапов. Первым является мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР) участков ДНК, содержащих исследуемые точечные мутации. Следующий этап представляет собой отжиг немаркированного праймера на один нуклеотид выше места возможной абберации с дальнейшей элонгацией дидезоксинуклеотида, имеющей соответствующую флуоресцентную метку. Идентификация продукта однонуклеотидной достройки осуществляется капиллярным электрофорезом путем их разделения в зависимости от размера нуклеотидной последовательности [4].

Особенностью МОЭ является возможность создания собственных панелей. Это достигается путем добавления к комплементарной последовательности праймера нуклеотидных повторов, например, (GACT) $_n$ , T $_n$ . Такая особенность позволяет детектировать до 10 точечных мутаций в одной пробе, а также обнаруживать делеции и инсерции в «горячих точках» [5]. Данный метод имеет высокую чувствительность: МОЭ способен детектировать до 1% мутантной аллели [6].

МОЭ нашел широкое применение в молекулярной медицине. В частности, данный метод используется в диагностике инфекционных болезней: определение генотипа вируса гепатита В для прогноза и подбора оптимальной терапии, резистентности ВИЧ к антиретровирусной терапии [7, 8]. Детекция точечных аббераций позволяет использовать МОЭ в диагностике наследственных заболеваний, таких как дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, несиндромальная нейросенсорная тугоухость, а также для определения

групп крови [9–11]. Немаловажно значение метода МОЭ в судебно-медицинской экспертизе, например, для идентификации человека с помощью обнаружения однонуклеотидных полиморфизмов [12]. МОЭ активно применяется и в онкологии. Данный метод позволяет создавать диагностические панели для выявления необходимых соматических мутаций в горячих точках для каждого гена, в частности, предсказывающих чувствительность к применяемой таргетной терапии и важных для прогноза течения заболевания [13–15].

Цель данного исследования – оптимизация метода МОЭ для обнаружения ключевых точечных мутаций в генах *EGFR* и *KRAS* при немелкоклеточном раке легкого (НМКРЛ).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Была выделена ДНК из 31 образца биопсийного материала НМКРЛ: 22 – свежемороженые опухолевые образцы и 9 – блоки тканей, фиксированные формалином и залитые парафином. Всеми пациентами было подписано информированное согласие на взятие биологического материала для проведения исследования.

Экстракцию проводили с помощью набора QIAamp® DNA Mini Kit согласно протоколу производителя. Для определения концентрации и оценки контаминации элюированной ДНК с помощью соотношения A260/A280 использовали спектрофотометр BioDrop UV/VIS.

*Оптимизация метода мультитаргетной однонуклеотидной элонгации.* На 1-м этапе оптимизации генотипирования образцов НМКРЛ были созданы 3 генетические панели для детекции точечных мутаций, которые помогают предсказывать ответ на таргетную терапию и прогноз заболевания: в экзонах 18-21 гена *EGFR*, во 2 и в 3 экзонах гена *KRAS* (см. таблицу). Видоизмененная последовательность праймеров для используемого метода была синтезирована в соответствии с рядом ранее опубликованных работ [6, 16].

Следующим этапом было проведение ступенчатой ПЦР представленных в таблице экзонов. Данный метод выбран с целью дестабилизации образования димеров праймеров, блокирования неспецифического связывания праймеров с последовательностью ДНК, а также для увеличения выхода продукта реакции. ПЦР выполняли с использованием реактивов набора Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия) и праймеров для 18, 20, 21 экзонов гена *EGFR* и 2, 3 экзонов гена *KRAS*. Для определения наличия ПЦР-продукта ис-

пользовали 1,5% агарозный трис-борат-ЭДТА-гель с последующим окрашиванием SYBR Green I и визуализацией с помощью ультрафиолетового спектра трансиллюминатора.

Нужно отметить важность удаления нуклеотидов и не связавшихся праймеров после амплификации целевых участков генов *EGFR* и *KRAS*, так как они способны искажать результаты анализа. С этой целью была проведена оптимизация метода, которая заключалась в использовании одного из 2 методов: 1) выделение амплификата из агарозного геля; 2) ферментная очистка ПЦР-продукта. Выделение из геля проводили с помощью колоночного метода с использованием наборов Cleanup Mini (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Ферментная очистка 2,5 мкл ПЦР-продукта осуществлялась с помощью 0,7 мкл ExS-Pure mix (NimaGen's ExS-Pure™ Enzymatic PCR Cleanup Kit,

Нидерланды), содержащей щелочную фосфатазу креветки (rSAP) и экзонуклеазу 1, при следующих условиях: инкубирование при 37° в течение 1 ч с последующей инактивацией ферментов при 90° в течение 10 мин.

Следующим этапом данного метода является однонуклеотидная элонгация немаркированного праймера. Этот этап представляет собой денатурацию амплифицированного участка ДНК с дальнейшим отжигом праймера непосредственно перед местом возможной однонуклеотидной замены в одноцепочечной матрице и удлинение данного праймера на 3'-конце за счет комплементарного, связанного с флюоресцентным красителем дидезоксинуклеотида. Для рационализации данного этапа были изменены объем и соотношение смеси, предложенные производителем данной технологии (SNaPshot; Life Technologies/Applied Biosystem, США). Реакции выполняли в объеме 2,5 мкл, содержащем 1,25 мкл очищенного ПЦР-продукта, 0,5 мкл смеси немаркированных праймеров, представленных в таблице, и 0,75 мкл готовой реакционной смеси SNaPshotTMMultiplex. Данный этап осуществляли путем однократного нагревания до 96°С в течение 30 с, далее следовали 32 цикла амплификации с изменениями температуры: 96°С (10 с), 50°С (5 с) и 60°С (30 с).

Немаловажным звеном данного этапа является постреакционная очистка с помощью 1 мкл rSAP, которая убирает не связавшиеся флюоресцентно меченные ddNTP и тем самым предотвращает интерференцию последних. Данный этап происходит при следующих условиях: инкубация при 37°С в течение 1 ч 30 мин с дальнейшей инактивацией фермента при температуре 90°С в течение 15 мин. Заключительным этапом МОЭ является разделение продукта достройки по размеру последовательности фрагмента с помощью капиллярного электрофореза в анализаторе ABI3500 (Applied Biosystems; США)

Точечные aberrации, определяемые с помощью метода МОЭ

Point mutations, which is detected by MSE

Экзон	Кодон	Определяемые мутации	Праймеры, используемые при однонуклеотидной элонгации	Нуклеотидная замена	
<i>EGFR</i>					
18	G719	G719C G719S	(GACT) <sub>2</sub> TCAAAAAGATCAAAGTGCTG	c.2155G>T c.2155G>A	
		G719A	(GACT) <sub>3</sub> CAAAAAGATCAAAGTGCTGG	c.2156G>C	
20	T790	T790M	(GACT) <sub>8</sub> AAGGGCATGAGCTGC	c.2369C>T*	
21	L858	L858R	(GACT) <sub>4</sub> ACAGATCACAGATTTTGGGC	c.2573T>G	
	L861	L861Q	TTCTCTTCCGCACCCAGC	c.2582T>A**	
<i>KRAS</i>					
2	G12	G12C G12S G12R	(GACT) <sub>4</sub> CTCTGCCTACGCCAC	c.34G>T** c.34G>A** c.34G>C**	
		G12A G12D G12V	(GACT) <sub>2</sub> CTTGTTAGTTGGAGCTG	c.35G>C c.35G>A c.35G>T	
		G13C G13S G13R	(GACT) <sub>6</sub> TGGTAGTTGGAGCTGGT	c.37G>T c.37G>A c.37G>C	
	G13	G13A G13D	GACTGGTAGTTGGAGCTGGTG	c.38G>C c.38G>A	
		Q61	Q61K	(GACT) <sub>4</sub> ATTCTCGACACAGCAGGT	c.181C>A
			Q61L Q61R	(GACT) <sub>6</sub> ATTCTCGACACAGCAGGTC	c.182A>T c.182A>G
Q61H	(GACT) <sub>3</sub> CCTCATTCAGTACTCTCTC		c.183A>C** c.183A>T**		

**Примечание.** При наличии определенной гетерозиготной aberrации будут детектироваться 2 пика разного цвета, каждый из которых соответствует достраиваемому нуклеотиду в каждом аллеле; \* – точечная мутация T790M обнаруживается приблизительно в 50% случаев приобретенной резистентности к тирозинкиназным ингибиторам (ТКИ) EGFR 1-го поколения [17]; \*\* – для данных нуклеотидных замен использовались обратные немаркированные праймеры.  
**Note.** The presence of certain heterozygous aberration will be detected as two peaks with different colors, each of which corresponds to extension nucleotide in both alleles. \* The T790M point mutation is found in approximately 50% of the cases of acquired resistance to first-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) [17]. \*\* For these nucleotide substitutions used unlabeled reverse primers.

при стандартных условиях в соответствии с рекомендациями производителя.

Для внедрения в рутинную практику данного метода дальнейшим этапом разработки было проведение генотипирования всех биопсийных образцов, включенных в исследование, с использованием трех разработанных панелей.

На заключительном этапе оптимизации определяли чувствительность МОЭ и ее сравнение с наиболее распространенными методиками. Для определения порогового значения использован материал опухоли с известной мутацией в гене *EGFR* (L858R), содержащейся в низкой копийности. Данная точечная aberrация детектирована с помощью цифровой ПЦР [18]. Также метод применен для генотипирования частой мутации L858R во всех исследуемых образцах НМКРЛ.

Для определения 2-й по частоте мутации L858R использована TaqMan® проба (Thermo Fisher Scientific, США). ПЦР в реальном времени использована с учетом высокой чувствительности для сопоставления с результатами, полученными с помощью МОЭ, всех материалов биопсий, включенных в исследование.

Параллельно для сравнения используемых нами методик все образцы опухолей были генотипированы с помощью классического метода – автоматизированного секвенирования по Сэнгеру. Так, проведено прямое секвенирование 18-21 экзонов, кодирующих тирозинкиназный домен рецептора EGFR, и 2-3 экзонов гена *KRAS*.

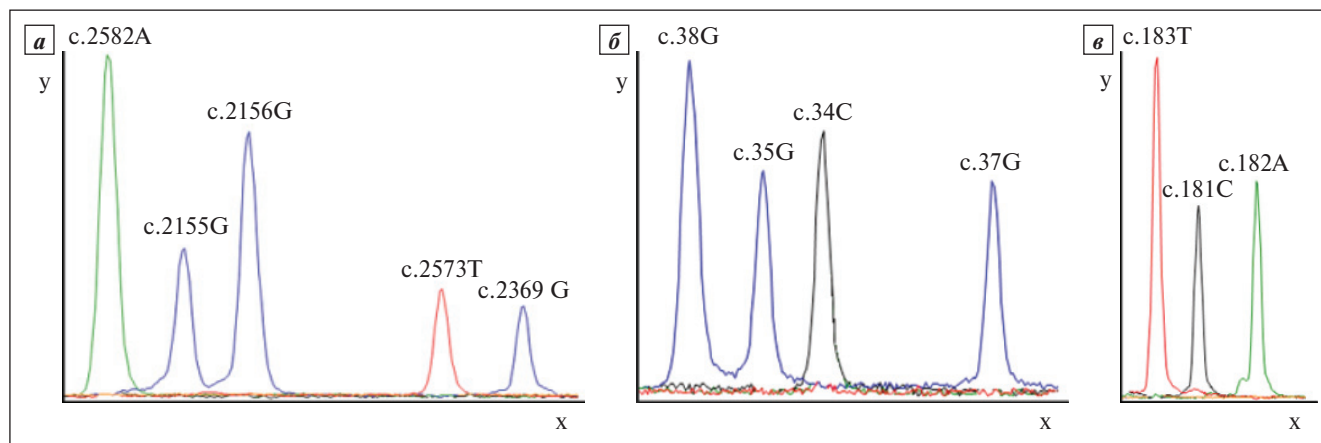
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Низкая эффективность стандартных схем лечения пациентов со злокачественными новообразованиями привела к созданию персонализированной медицины, где ключевую роль играет молекулярно-генетическое тестирование опухолевого материала.

В качестве шага к персонализированному подходу в терапии таких пациентов был оптимизирован высокопроизводительный метод МОЭ. Огромным преимуществом данного метода является возможность создания генетических панелей широкого профиля генетических aberrаций. Это не только позволяет повысить диагностический охват метода, но и снизить его стоимость. Нами были оптимизированы 3 генетические панели определения соматических мутаций в генах *EGFR* и *KRAS* НМКРЛ, выявление которых позволяет прогнозировать ответ на проводимую таргетную терапию и течение заболевания. Примеры получаемых электроферограмм приведены на рис. 1. Так, для гена *EGFR* в панель была включена не только распространенная мутация L858R, но и встречающиеся реже точечные aberrации, что позволило выявить в одном из опухолевых материалов мутацию G719S (рис. 2, б). Данная мутация определяет чувствительность опухоли к ряду таргетных препаратов.

Метод ступенчатой ПЦР в сравнении со стандартной ПЦР позволил предотвратить интерференцию сигналов при капиллярном электрофорезе вследствие высокой специфичности связывания праймеров. Также в связи с высоким выходом продукта амплификации удалось увеличить интенсивность флуоресценции на заключительном этапе МОЭ. Использование колоночного метода и модифицированного протокола ферментной очистки ПЦР-продукта препятствовало появлению высокого уровня фона при капиллярном электрофорезе.

Уменьшение объема и изменение соотношения смеси на этапе однонуклеотидной элонгации немаркированного праймера не отразились на выходе продукта реакции и ее специфичности и позволили значительно снизить стоимость метода МОЭ. На этапе постреакционной очистки увеличение доли rSAP и времени инкубирования свело к минимуму появле-

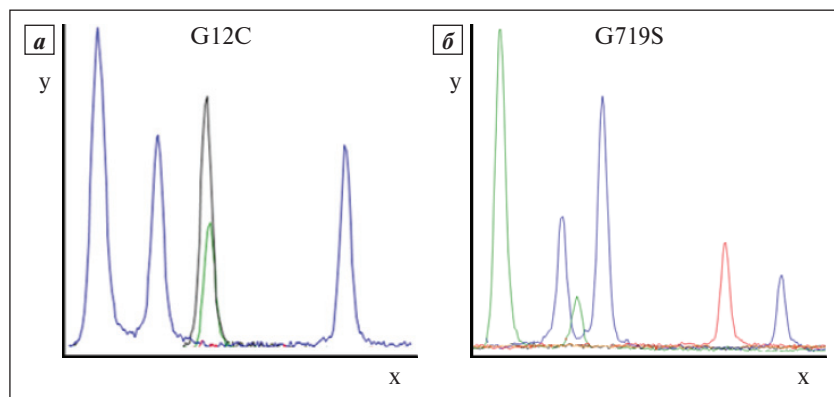


**Рис. 1.** Генетические панели обнаружения ключевых мутаций в гене *EGFR* (а), во 2 (б) и 3 (в) экзонах гена *KRAS*. Представлены аллели дикого типа. Здесь и на последующих рисунках: по оси абсцисс – размер фрагмента, по оси ординат – интенсивность флуоресценции

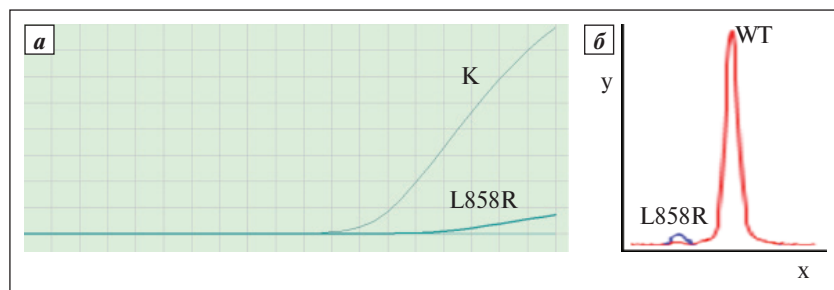
**Fig. 1.** Genetic panels for the detection of key mutations in the *EGFR* gene (a), in 2 (б) and 3 (v) exons of the *KRAS* gene. Note. The wild-type alleles are represented on these electrophoregrams

ние загрязненности продукта однонуклеотидной до-  
стройкой на электрофореграммах.

Использование МОЭ позволило обнаружить  
абerrации у 26% пациентов, включенных в исследо-  
вание. Иллюстрацией мутаций в генах *EGFR* и *KRAS*  
является рис. 2.



**Рис. 2.** Пример обнаружения мутаций в 2 использованных генетических панелях при НМКРЛ: в гене *KRAS* – G12C (а), в гене *EGFR* – G719S (б)  
**Fig. 2.** An example of the detection of mutations in two used genetic panels for NSCLC: in the *KRAS* gene- G12C (a), in the *EGFR* gene- G719S (b)



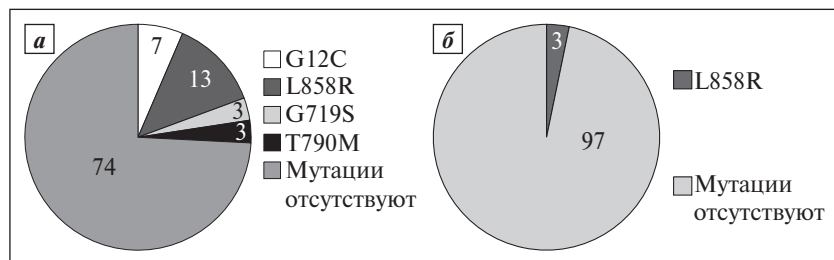
**Рис. 3.** Положительный паттерн мутации L858R в гене *EGFR* в низкой  
копийности. Детекция ПЦР в реальном времени (а), МОЭ (б).

**Примечание:** WT – аллель дикого типа; K – положительный контроль.

**Fig. 3.** Low-copy positive pattern of the L858R mutation in the *EGFR* gene.

Detection these aberration by real-time PCR (A.), MSE (B.).

**Note.** WT- wild-type allele. K+ -positive control.



**Рис. 4.** Сравнение метода МОЭ (а) и секвенирования по Сэнгеру (б). С  
помощью МОЭ точечные мутации обнаружены в 26%, при секвенирова-  
нии по Сэнгеру – в 3% всех образцов

**Fig. 4.** Comparison of methods MSE (A) and Sanger sequencing (B). Note:  
point mutations were found by MSE in 26% of all NSCLC samples included  
in the study, and Sanger sequencing detected these aberrations in 3% of all  
samples

По данным литературы, МОЭ способна детекти-  
ровать в образце до 1% мутантной ДНК [14]. В ис-  
следовании для определения пороговой concentra-  
ции aberrантной ДНК, позволяющей детектировать  
ее с помощью МОЭ, использовалась цифровая ПЦР.  
Так, показана способность данного метода опреде-  
лять до 48 копий в 1 мкл мутантной

ДНК в панели для детекции точеч-  
ных альтераций в 5 нуклеотидных по-  
зициях в гене *EGFR*. Стоит отметить,  
что слабый положительный сигнал  
детектирован и методом ПЦР-РВ  
(рис. 3).

Для подтверждения лаборатор-  
ных характеристик метода МОЭ  
все пациенты были дополнительно  
типированы на наличие мутации  
L858R с использованием методов  
ПЦР-РВ и цифровой ПЦР. Все 4 опу-  
холевых материала, в которых обнару-  
жены мутация L858R с помощью  
МОЭ, также оказались положитель-  
ными при использовании ПЦР-РВ  
и цифровой ПЦР. При использова-  
нии TaqMan®-пробы (Thermo Fisher  
Scientific, США) цифровая ПЦР по-  
зволила определить концентрации  
мутантного ДНК для каждого об-  
разца, которые составили 48, 73.7,  
284 и 1619 копий/мкл. У остальных  
пациентов мутации не обнаружено.  
Полученные данные еще раз под-  
черкивают высокую чувствитель-  
ность выявления точечных мутаций  
с помощью оптимизированного ме-  
тода МОЭ.

Несмотря на то, что секвениро-  
вание по Сэнгеру является «золотым  
стандартом» генотипирования, в  
контексте выявления соматических  
мутаций данный метод имеет значи-  
мый недостаток – это ограниченная  
его чувствительность. В нашей вы-  
борке прямое секвенирование по-  
зволило обнаружить точечные аб-  
errации лишь у 3% пациентов, в то  
время как при использовании МОЭ  
абerrации выявлены у 26% паци-  
ентов. Также следует отметить, что  
метод МОЭ способен обнаружить  
мутации в генетическом материале  
низкого качества фиксированного  
биологического материала [19]. Это  
позволяет использовать его в ком-  
плексе с гистологическим обследо-  
ванием срезов. Данные, полученные  
при сравнении МОЭ и автоматизи-  
рованного секвенирования по Сэн-  
геру, представлены на рис. 4.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами был оптимизирован протокол генотипирования соматических мутаций в генах *EGFR* и *KRAS*, а также созданы комплексные панели выявления точечных мутаций. Показаны высокая чувствительность МОЭ, а также сопоставимость этого метода с ПЦР-РВ и цифровым ПЦР. Данный метод представляется прекрасной альтернативой ру-

тинного выявления соматических мутаций в опухолевом материале.

\* \* \*

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* 2002. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64472-0).
- Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E. et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* 2012. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>.
- Dias-Santagata D., Akhavanfar S., David S.S., Vernovsky K., Kuhlmann G., Boisvert S.L. et al. Rapid targeted mutational analysis of human tumours: A clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol. Med.* 2010. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000070>.
- Lovly C.M., Dahlman K.B., Fohn L.E., Su Z., Dias-Santagata D., Hicks D.J. et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One.* 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035309>.
- Sequist L.V., Heist R.S., Shaw A.T., Fidias P., Rosovsky R., Temel J.S. et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol.* 2011. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr489>.
- Cernomaz A.T., Macovei I.I., Pavel I., Grigoriu C., Marinca M., Baty F. et al. Comparison of next generation sequencing, SNaPshot assay and real-time polymerase chain reaction for lung adenocarcinoma EGFR mutation assessment. *BMC Pulm Med.* 2016; 16. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0250-0>.
- Zhao Y., Zhang X.-Y., Guo J.-J., Zeng A.-Z., Hu J.-L., Huang W.-X. et al. Simultaneous Genotyping and Quantification of Hepatitis B Virus for Genotypes B and C by Real-Time PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 3690 LP-3697.
- Jakobsen M.R., Tolstrup M., Søgaard O.S., Jørgensen L.B., Gorry P.R., Laursen A. et al. Transmission of HIV-1 Drug-Resistant Variants: Prevalence and Effect on Treatment Outcome. *Clin Infect Dis.* 2010. <https://doi.org/10.1086/650001>.
- Li Q., Yang F., Liu R., Luo L., Yang Y., Zhang L. et al. Prevalence and molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency at the China-Myanmar border. *PLoS One.* 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134593>.
- Chen Y., Liu Y., Wang B., Mao J., Wang T., Ye K. et al. Development and validation of a fetal genotyping assay with potential for noninvasive prenatal diagnosis of hereditary hearing loss. *Prenat Diagn.* 2016. <https://doi.org/10.1002/pd.4962>.
- Palaccjomsuk P., Halter C., Isakova V., Tarnawski M., Farmer J., Reid M.E. et al. Detection of blood group genes using multiplex SNaPshot method. *Transfusion.* 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.02053.x>.
- Mehta B., Daniel R., Phillips C., McNevin D. Forensically relevant SNaPshot® assays for human DNA SNP analysis: a review. *Int J. Legal Med.* 2017. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1490-5>.
- van Oers J.M.M., Lurkin I., van Exsel A.J.A., Nijsen Y., van Rhijn B.W.G., van der Aa M.N.M. et al. A simple and fast method for the simultaneous detection of nine fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer and voided urine. *Clin. Cancer Res.* 2005. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1045>.
- Smith D.L., Lamy A., Beaudenon-Huibregtse S., Sesboué R., Laosinchai-Wolf W., Sabourin J.C. et al. A multiplex technology platform for the rapid analysis of clinically actionable genetic alterations and validation for BRAF p.V600E detection in 1549 cytologic and histologic specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 2014. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0002-0A>.
- Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Овчинникова Л.К., Дигаева М.А., Воронников И.К., Давыдов М.И. Биологические маркеры опухолей в клинике – достижения, проблемы, перспективы. *Российский биотерапевтический журнал.* 2009; 3. (Kushlinski N.E., Gershtein E.S., Ovchinnikova L.K., Digayeva M.A., Voronnikov I.K., Davydov M.I. The tumor biological markers in the clinic – achievements, problems, prospects. *Rossijskij bioterapevicheskij zhurnal Rossijskij bioterapevicheskij zhurnal.* 2009; 3 (in Russian))
- Su Z., Dias-Santagata D., Duke M., Hutchins K., Lin Y.L., Borger D.R. et al. A platform for rapid detection of multiple oncogenic mutations with relevance to targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *J. Mol. Diagnostics.* 2011; 13: 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.010>.
- Kawamura T., Kenmotsu H., Omori S., Nakashima K., Wakuda K., Ono A. et al. Clinical Factors Predicting Detection of T790M Mutation in Rebiopsy for EGFR-Mutant Non-small-cell Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer.* 2018; 19: 247–52. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.07.002>.
- Lavdovskaia E.D., Iyevleva A.G., Sokolenko A.P., Mitiushkina N.V., Preobrazhenskaya E.V., Tiurin V.I. et al. EGFR T790M Mutation in TKI-Naive Clinical Samples: Frequency, Tissue Mosaicism, Predictive Value and Awareness on Artifacts. *Oncol Res Treat.* 2018; 41. <https://doi.org/10.1159/000491441>.
- Perizzolo M., Winkfein B., Hui S., Krulicki W., Chan J.A., Demetrick D.J. IDH mutation detection in formalin-fixed paraffin-embedded gliomas using multiplex PCR and single-base extension. *Brain Pathol.* 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00579.x>.

Поступила 17 сентября 2018 г.

**Для цитирования:** Мусаелян А.А., Чистяков И.В., Назаров В.Д., Лапин С.В., Согоян М.В., Хальчицкий С.Е., Эмануэль В.Л., Лобачевская Т.В., Акопов А.Л. Оптимизация метода мультитаргетной однонуклеотидной элонгации для определения соматических мутаций при злокачественных новообразованиях. *Молекулярная медицина.* 2019; 17 (2): 44–49. <https://doi.org/10.29296/24999490-2019-02-06>

**For citation:** Musaelyan A.A., Chistyakov I.V., Nazarov V.D., Lapin S.V., Sogoyan M.V., Khalchitsky S.E., Emanuel W.L., Lobachevskaya T.W., Akopov A.L. Optimization of the method of the multi-target single-base elongation for the detection of somatic mutations in malignancies. *Molekulyarnaya meditsina.* 2019; 17 (2): 44–49 (in Russian). <https://doi.org/10.29296/24999490-2019-02-06>