

## БИОАНАГААХ

### Хорт хавдрыг нөхцөлдүүлэгч генийн мутацийг РНХ-проб ашиглан илрүүлэх дэвшилтэт арга, технологи

Бямбасүрэн Б.<sup>1</sup>, Дуламсүрэн О.<sup>2</sup>, Лхагвадорж Г.<sup>3</sup>, Амарсанаа Э.<sup>3</sup>,  
Хүрэлбаатар С.<sup>3</sup>, Шийрэвнямба А.<sup>1</sup>, Батсайхан Б.<sup>1</sup>, Занабазар Э.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль

<sup>2</sup>Эмгэг судлалын үндэсний төв

<sup>3</sup>Хавдар судлалын үндэсний төв

<sup>4</sup>Занааспекс ХХК

e-mail: enkhbatar@zanaspek.mn

e-mail: nyamdorj@mnumms.edu.mn

#### Abstract

#### The utilization of biotinylated RNA baits on captured sequencing of cancer marker genes functional regions

Byambasuren B.<sup>1</sup>, Dulamsuren O.<sup>2</sup>, Ikhagvadorj G.<sup>3</sup>, Amarsanaa E.<sup>3</sup>,  
Khurelbaatar S.<sup>3</sup>, Shiirevnyamba A.<sup>1</sup>, Batsaikhan B.<sup>1</sup>, Zanabazar E.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mongolian National University of Medical Science

<sup>2</sup>national pathology center

<sup>3</sup>national cancer center

<sup>4</sup>zanaspek ltd

E-mail: enkhbatar@zanaspek.mn

#### Background

Nucleic acid sequencing is a multi-step process taken place in medical research or diagnostic laboratories. Since the emerge of second generation sequencing technology generally referred as next generation sequencing (NGS), the mass parallel reads covering human genome or transcriptome is achieved by cost cut down over thousand folds. Though the technology made tremendous push forward to various applications, its data analysis time and effort still takes worrisome time and human effort, bringing the emerge of next-step demand: targeted mass sequencing of only desired part from human genome or transcriptome with lower material cost and labor. By targeted sequencing, both run cost and data analysis process can be further cut down, and the read results are more reliable on changes such as determining varied number of repeats, heterozygote alleles, deletions, chromosomal scale abnormality and more.

#### Objective

In this study, we explored the utilization of biotinylated RNA baits on captured sequencing of cancer marker genes functional regions.

#### Method

Targeted NGS was achieved by capturing desired genomic regions using preparatory nucleic acid probes. RNA bait capturing of desired genomic regions has shown to have high specificity and quality. The study was carried out with informed consent obtained from patients, with the approval №53 in 2018.03.15 by Medical Ethics committee, Ministry of Health, Mongolia.

#### Result

By preparing library of biotinylated RNA baits with 75000 unique sequences, we achieved mass parallel sequencing of human 410 cancer-marker-genes' exons and UTRs with average read depth ~760, and covered thousands of SNPs on 5 genomic DNA samples. Tissue samples derived from breast cancer and ovary cancer had SNP and deletion on 7 marker genes (BRCA1, BRCA2, ATM,

BRIP1, PTEN, TP53, RAD51C) not registered in database.

### Conclusion

Experiments showed RNA baits with up to 117 nucleotide length, produced from ssDNA oligonucleotide stock, can be utilized to capture desired regions of human genome, and bring the cost of captured mass sequencing to 1500 USD, with 93.14-93.33% of Q30 read quality.

**Keywords:** NGS, cancer marker gene, targeted sequencing, capturing, enrichment, RNA baits

Pp. 3-14. Tables 2, Pictures 11, References 22

### Оршил

Нуклейн хүчлийн дарааллыг уншуулах ажилбарыг 1977 оноос Зангерын аргачлалаар гүйцэтгэж байна [1]. Олон сая нуклейн хүчлийн утаслагийг шилэн ялтас дээр суулгаж, тэдгээрийн дарааллыг масс параллель буюу нэг дор их хэмжээгээр уншуулах аргазүйг туршиж эхлэн [2], 2005-2009 онуудын хооронд өргөн хэрэглээнд нэвтрүүлж эхэлсэн. Тэдгээр нь ялтас дээрх утаслагийн дохиог будагтай нуклеотидоор бүртгэх буюу sequencing by synthesis [2], нийлэгжиж буй утаслагаас чөлөөлөгдөх пирофосфат молекулыг бүртгэх буюу pyrosequencing [3], нийлэгжиж буй утаслагаас будагтай хоёр-нуклеотид пробоор бүртгэх буюу SOLiD [4] зэрэг аргууд юм. Нийтэд нь дараачийн үеийн технологи (NGS), өөрөөр 2-р эрин үеийн технологи гэнэ. Ямар нэг амьтан, ургамлаас гаралтай дээжнээс ялгаж авсан нийт 10-200 тэрбум хүртэл нуклеотид нуклейн хүчлийн дарааллыг давтагдсан байдлаар уншуулж үр дүнг цуглуулах боломжтой.

Массаар уншуулах дурдсан арга технологи дээр суурилсан лаборатори дахь платформ нь нэг удаагийн уншилтын дээд болон доод хязгаартай байдаг. Жишээлбэл зориулалтын төхөөрөмжийн хүчин чадлаас шалтгаалж 500-600 сая, 700-800 сая, 4-5 тэрбум нуклеотид зэрэг бага хэмжээний, 100-200 тэрбум, 500-700 тэрбум, 1-2 их наяд нуклеотид зэрэг үлэмж хэмжээний нэг удаагийн уншилтын хязгаартай байдаг. Иж бүрэн ажилбарын цаг зарцуулалт, цомог урвалж болон төхөөрөмжийн хэрэглээний өртөг өндөр тул ажлын зорилгоос хамаарч урьдчилан тооцооллыг хийх (нэг удаа уншуулах дээжийн тоо ширхэг) шаардлагатай болдог. Геномын тодорхой багахан хэсэг, жишээлбэл өөр өөр байрлал дээрх 100-10000 нуклеотид хэсгийг олон тооны дээж дээр, тус бүр олон давталттай, нэгэн зэрэг уншуулах, нэг бол бага хүчин чадалтай платформ шийдэл, эс бөгөөс өндөр хүчин чадалтай платформ шийдлийн аль нэгийг сонгоно.

Тус ажлаар OligoArray 2.0 төхөөрөмж дээр нийт 75000 хүртэл янзын дараалалтай, 2 төгсгөл дээрээ 32 болон 28 нуклеотид толгой ба сүүлтэй, нийт 176 нуклеотид хүртэл урт, өвөрмөцөөр холбогдох генийн 116 нуклеотид дараалалтай комплементар дан утаслаг ДНХ-г нийлэгжүүлж, цаашид байнга хэрэглэх сан болгож хадгалах, тус сан дээрээс РНХ пробыг нийлэгжүүлэн бэлтгэх, хүний геномын ДНХ материал дээр хорт хавдрын молекул биологийн шинжилгээнд авч үзэх боломжтой 410 хүртэл генийн экзоны хэсгийг гибридизацийн ажлаар сорчлон баяжуулах аргыг туршив. Ингэснээр цусны дээжнээс бэлтгэсэн геномын ДНХ материалаас шаардлагатай хэсгийг сорчлон ялгаж аваад дарааллыг нь уншуулах NGS дээр суурилсан ажилбарт хэрэглэхэд бэлтгэх аргачлалыг туршиж хөгжүүлэв.

ДНХ дарааллыг NGS хэрэглэн уншуулахад геномыг бүрэн хамарч уншуулах нь өндөр зардалтай болдог асуудалтай. Тиймээс ДНХ материалын хүссэн хэсгийг сорчлон, олон 10, 100, 1000 дахин өндөр давталттай, баталгаатай уншуулах, зардлыг танах үүднээс шаардлагатай хэсгүүдийг нуклейн хүчил пробоор татаж авч ялгаад, дахин олшруулж уншуулах шаардлага гардаг.

Цаашид тус аргазүйг геномд нуклейн хүчил нь интеграцид ордог болон ордоггүй халдварт өвчний үүсгэгчийн агууламжийг илрүүлэх, зүйлийг тодорхойлох, зүйлийн хэвшинж, омог, гарал үүслийг харьцуулах, хүний сонирхсон хэвшинжийг нөхцөлдүүлэгч генийн дарааллыг баталгаатай уншуулах, эмнэлгийн удамзүйн шинжилгээний ажилбарт хэвшүүлж хэрэглэх боломжтой. Туршилтын ажлын зорилго нь хүн, амьтан, ургамлын геном дээрээс уншуулах хэсгийг сорчлон ялгаж авах зориулалттай 120 нуклеотид урттай РНХ-проб материалыг бэлтгэх, ашиглах аргазүйг боловсруулах байв.

### Хэрэглэгдэхүүн, аргазүй

Хөх, өндгөвчний хавдрын удамшилтай бөгөөд

тухайн хавдартай хүний геномын ДНХ дээжийг Illumina Hiseq 2500 эсвэл Illumina Miseq эсвэл Illumina Hiseq 3000 төхөөрөмжөөр уншуулах бэлдэцийг зориулалтын цомгоор (NEBNext Library Preparation Kit) 250-300 хос утаслаг урттай, 500-1000 нанограм, дээж бүрт өвөрмөц баркод толгой болон сүүлтэй байхаар бэлтгэсэн (NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina, Index Primers Set 4). ДНХ бэлдэцийг биотинжуулсан PHX пробоор үйлчлүүлж, нийт 109 генийн экзон, 3' болон 5' UTR хэсгүүдийг сорчлон баяжуулах ажилбарыг гүйцэтгэсэн. Сорчлон баяжуулсан эцсийн бүтээгдэхүүн бүрээс хангалттай хэмжээтэй авч, NGS бэлдэц бэлтгэх цомгийн ПГУ-ын шатны урвалжаар дахин олшруулсан (NEBNext Library Preparation Kit). Эцсийн бэлдэцийг NGS төхөөрөмж дээр зохих ажилбарын дагуу, шилэн ялтас дээр (NGS flow cell) 8-16 зэрэгцээ дээжийн бэлдэцийг хольж уншуулсан. Нийт уншилт дотор зорьсон хэсгийн эзлэх хувь, хэсэг тус бүрийн уншилтын гүн буюу давталт, тэдгээрийн нуклеотид бүрийн уншилтын давталт, 2 талын 100 нуклеотид хэсгийн уншилтын давталтыг шалгасан.

Тус бүр 170 орчим нуклеотид урттай олигонуклеотидыг ~960000 толбо бүхий шилэн ялтас дээр (microdot), электрон пирофосфатаз аргаар ажилладаг OligoArray 2.0 төхөөрөмж дээр нийлэгжүүлсэн.

Олигонуклеотидын 2 зах дээрх нэг ижил дарааллыг нь ашиглан универсал праймераас хос утаслаг болгон олшруулж (2X Hotstart Polymerase Premix, Ringene Biotech), SPRI соронзон үрэл дээр суурилсан аргачлалаар цэвэрлэсэн (Size Selection Beads, Ringene Biotech).

Хос утаслаг болгосон материалаас PHX-проб утаслагийг транскрипцлан гаргаж авахад M-MLV урвуу-транскриптаз эсгэгтэй цомог (Ringene Biotech), бүтээгдэхүүнийг цэвэрлэхэд SPRI соронзон үрэлтэй цомог хэрэглэсэн (Ringene Biotech). Бүтээгдэхүүнийн чанарыг PHX болон ДНХ шатанд нь шалгаж баталгаажуулсан (Agilent, TapeStation 2.0). Эцсийн бүтээгдэхүүнийг мөн SPRI соронзон үрэл цомгоор цэвэрлэж хадгалсан (Ringene Biotech).

Хүний геномын ДНХ дээж дээрээс тодорхой хэсгийг сорчилж авах ажилбарыг Дээнхартын гибридизацийн буфер орчинд (10X SSPE, 10X Denhardt, 10mM EDTA, 0.2% SDS, 1 U/ul Rnase inhibitor эсгэг), нэгж бортогонд 250 мкл эзэлхүүнтэй, 65°C орчинд 24 цаг гүйцэтгэсэн. Ингэхдээ ПГУ хуванцарт 500-1000 нг ДНХ

бэлдэцийг шилжүүлж, 95°C / 5 мин байлгаад, 65°C / 5-10 минут орхиод, ижил хэмжээтэй PHX проб (тус бүр 500-1000 нг), мөн гибридизацийн буфер нэмээд сайтар хольсон. Гибридизацид орсон материалыг стрептавидинтэй үрлээр (M-280 Dynabeads, Thermo Fisher) зохих цэвэрлэх буфер орчинд цэвэрлэж авсан (0.1M NaOH, 0.05M NaCl, стрептавидин-биотин холболт үүсгэх буфер 10mM Tris HCl, 1mM EDTA, 2M NaCl, pH 7.5, саармагжуулах буфер 1M Tris HCl, pH 7.8, уусгах буфер 0.1 M NaOH).

2018.03.15-ны ЭМЯ-ны Анагаах ухааны ёс зүйн хорооны №53 тогтоолын дагуу судалгаанд оролцогчдод судалгааны талаар мэдээлэл өгч, таниулсан зөвшөөрлийн хуудсаар зөвшөөрөл авч гүйцэтгэв.

### Үр дүн

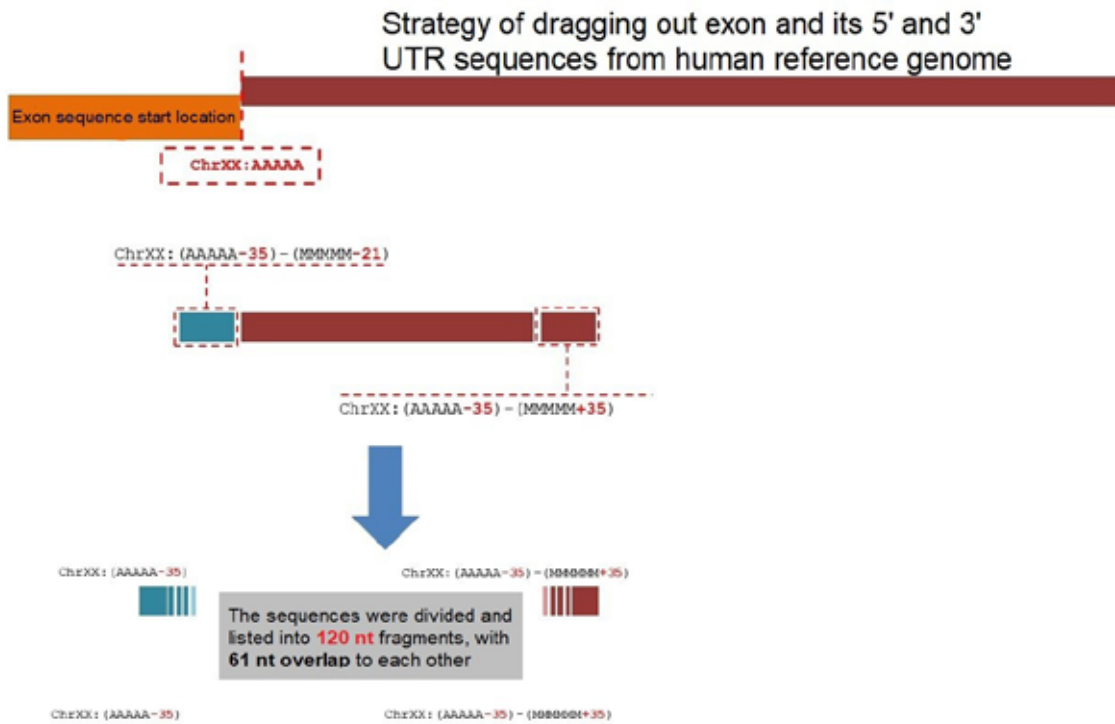
Генийн мутацийг илрүүлэх дэвшилтэт технологи 5 ажилбараас бүрдсэн ба ажилбар бүрийн үр дүнг Зураг 1-11-ээр үзүүлэв.

- Шилэн ялтас дээр дан утаслаг ДНХ-ийг нийлэгжүүлэх ажилбар
- Нийлэгжсэн ДНХ утаслагийг шилэн ялтаснаас чөлөөлж, хос утаслаг болгон тогтворжуулах ажилбар
- Хос утаслаг ДНХ материалаас биотинжуулсан PHX проб нийлэгжүүлэх, цэвэрлэх ажилбар
- PHX пробоор генийн хэсгүүдийг сорчлон баяжуулах, бэлдэцийг NGS төхөөрөмж дээр уншуулах ажилбар
- Уншилтын үр дүнг боловсруулах, дүн шинжилгээ хийх ажилбар тус тус болно.

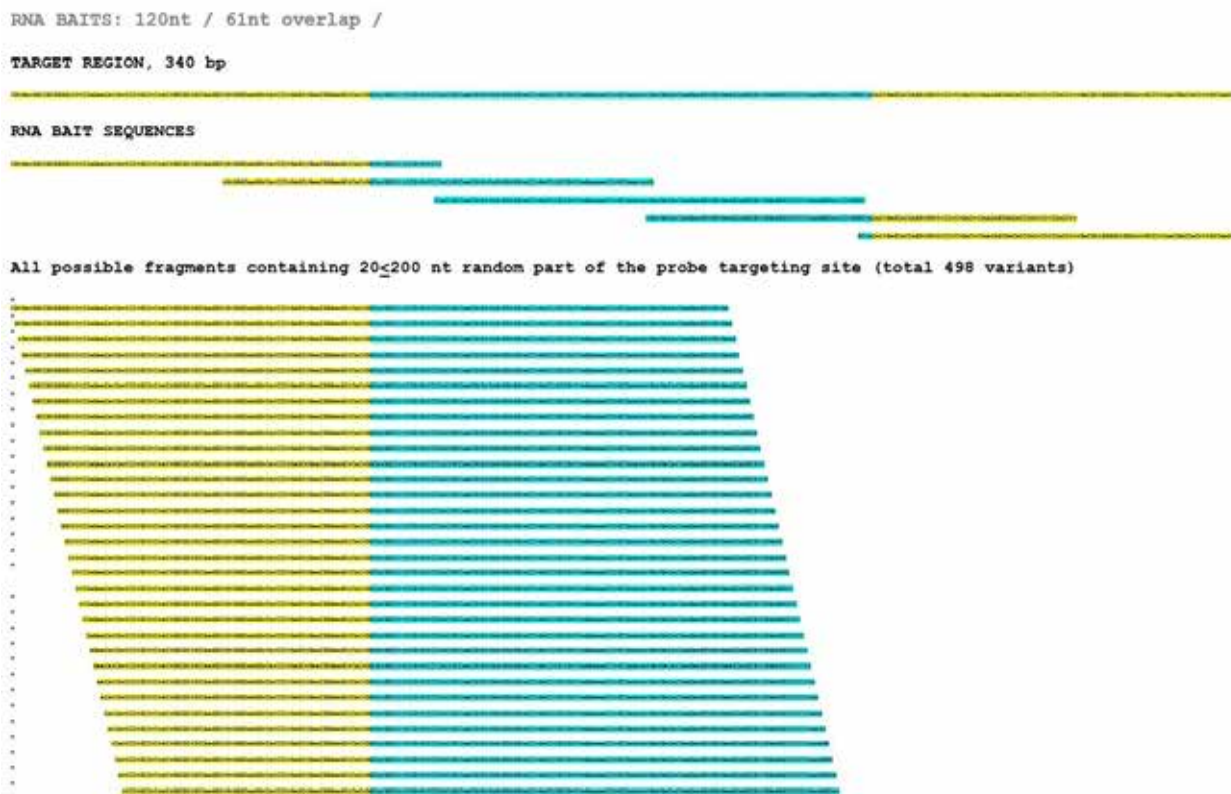
### Шилэн ялтас чип дээр дан утаслаг ДНХ-ийг нийлэгжүүлэх ажилбар

Хүний хорт хавдрын маркер гэж үзсэн нийт 109 ген тус бүрийн нуклеотидын бүрэн дарааллыг хүний геномын жишиг GRCh37-hg19 дараалал дээрээс шүүж авсан. Ген бүрийн дараалал дээрээс экзон ба түүний 2 талын 5' болон 3' төгсгөлийн UTR хэсэг, экзоны хоёр талын интрон дээрх 35 нуклеотид хэсэг бүрэн хамрагдсан байхаар, мөн дараалал бүр өөр хоорондоо 61 нуклеотид давхардаж байхаар шүүн жагсаасан (Зураг 1, 2).

Нийт 109 ген дээр 17902 PHX проб дарааллыг жагсаасан.

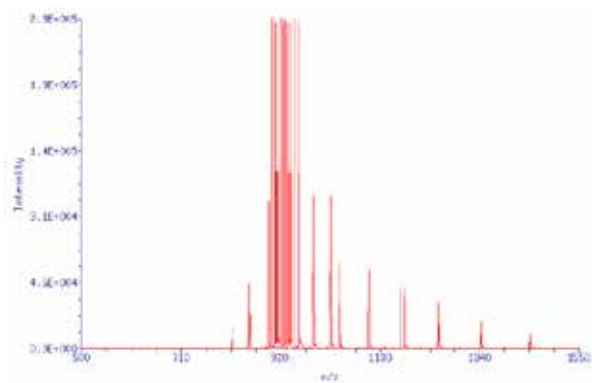


Picture 1. Planning and assorting specific target capturing probes. The fragment sequences were dragged out from human reference genome GRCh37-hg19. ChrXX:AAAAA – start and end nucleotide position on human genome. Each fragment with 120 nt length, overlapping the neighboring fragment by 61 nucleotides. Target area covers the exons and UTRs.



Picture 2. Example of 340 bp target covering probe designing. To efficiently capture the desired 340 bp target region from genomic DNA sample, needs 5 different RNA baits, each with 120 nt length, overlapping each other by 61 nt.

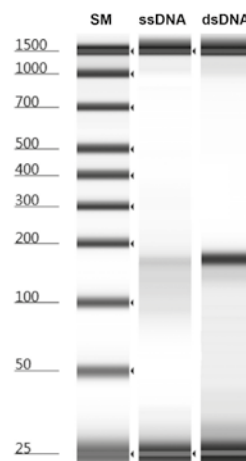
OligoArray 2.0 төхөөрөмж дээр ~75000 микро толбо дээр програмаар зааж оруулж, тус бүр 176 нуклеотид дарааллыг програм дээр таниулж, шилэн ялтас дээр нийлэгжүүлсэн. Бүтээгдэхүүнийг шилэн ялтас дээрээс чөлөөлж, цуглуулж аваад, хроматографийн төхөөрөмж дээр чанарын шалгалтыг гүйцэтгэж (Зураг 3), ssDNA/RNA Clean & Concentrator, эсвэл жишиг болсон агарозноос ДНХ ялгах цомог, эсвэл давсаар тунадасжуулах замаар цэвэрлэсэн. Чанарын шалгалтыг өндөр мэдрэмжтэй гель электрофорезын ажилбараар болоод нуклейн хүчлийн агууламж тодорхойлох төхөөрөмж дээр гүйцэтгэсэн (Зураг 4).



Picture 3. LC-MS analysis on LCMS-8060, Shimadzu, sample results, ultramere oligonucleotides synthesized on glass slide. Molecular weights were determined by comparing to 59kDa DAP (Dystrophin associated protein): 1 unit: 59 Da. Oligonucleotide with ~170 nt length weighs ~50-60 kDa, confirming its quality.

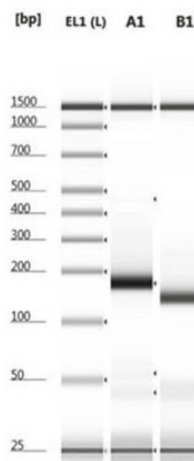
Нийлэгжсэн ДНХ утаслагийг шилэн ялтаснаас чөлөөлж, хос утаслаг болгон тогтворжуулах ажилбар

Олигонуклеотид нийлэгжүүлэх дээр өдгөө бүрэн шийдвэрлэгдээгүй байгаа асуудал бол утаслаг нийлэгжих амжилт нь түүний уртаас урвуу хамааралтай байдгаас шалтгаалж урт утаслагийн чанар хангалтгүй байх явдал юм [12]. Тиймээс хэт урт (ultramere) буюу 176 нуклеотид урт олигонуклеотид шилэн ялтас дээр бүрэн бус нийлэгжсэн байх боломжтой. Утаслагийг нөхөх, цаашлаад хос утаслаг болгох зорилгоор Pfu ДНХ полимеразтай ПГУ гүйцэтгэж, дурдсан аргаар цэвэрлэсэн. Бүтээгдэхүүнийн уртын хэмжээ болон гарцыг TapeStation 2.0 төхөөрөмж дээр шалгасан (Зураг 4).



Picture 4. Gel electrophoresis of the synthesized ~170 nt ultramere oligos (lane ssDNA, 2.0 ul loaded) and dsDNA library generated from the ssDNA (lane dsDNA, 0.2 ul loaded). SM – size marker.

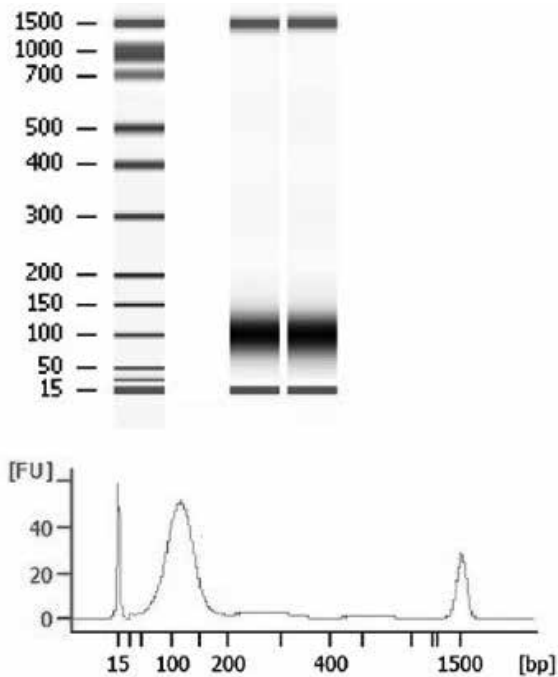
Баяжуулж, цэвэрлэж авсан хос утаслаг ДНХ-г “проб тогтвортой бэлтгэх сан” гэх бөгөөд олон тооны хуванцарт хувааж, хөлдүү байдлаар хадгалсан. Бүтээгдэхүүнээс 50 нг авч, (+) утаслагийн 3’ төгсгөл дээр байрласан GAATTC 6-нуклеотид дараалал дээр өвөрмөц EcoRI эсгэгээр хэрчих замаар хос утаслаг болгон баяжуулахад хэрэглэсэн сүүлийг авч хаясан. Илүүдэл (-) утаслаг дээрх 5-нуклеотидыг mung bean nuclease (түрэг ногоон буурцагны нуклеаз, New England Biolabs) хэрэглэн идүүлсэн. Хос утаслаг ДНХ хэрчмийн урт 28 орчим нуклеотидоор багассаныг шалгаж баталгаажуулсан (Зураг 5).



Picture 5. Gel electrophoresis on TapeStation 2.0. A1 (left) – Initial dsDNA library which was generated from ssDNA (Picture 4). B1 (right) – dsDNA library digested by EcoRI endonuclease. The shortened library lost its universal tail sequence, but has its T7 promoter containing head sequence. EL1(L) – size marker.

### Хосутаслаг ДНХ материалаас биотинжуулсан РНХ проб нийлэгжүүлэх, цэвэрлэх

Проб тогтвортой бэлтгэх санг биотинжуулсан урацил нуклеотидын агууламжтай, РНХ транскриптаз эсгэгтэй урвалаар оруулж, РНХ пробыг нийлэгжүүлж аваад, ssDNA/RNA Clean & Concentrator шүүлтүүрээр цэвэрлэж аваад, чанарын шалгалтыг гүйцэтгэв (Зураг 6). Биотинжуулсан РНХ пробын агууламжийг 30 нг/мкл байхаар тохируулсан. Урвалын эзэлхүүн 50 мкл байхаар, T7 промотер дээр өвөрмөц праймер 10мМ, Tris HCl (pH 8.0) 40 мМ, MgCl<sub>2</sub> 25 мМ, NaCl 25 мМ, spermidine 2 мМ, DTT 5мМ, ATP, CTP, GTP болон UTP тус бүр 0.4 мМ, биотин холбосон UTP 0.1 мМ (Generay), 0.5 ug T7 урвуу транскриптаз (Ringene Biotech), 20 нг ДНХ материал байхаар, 4-5 хуванцарт, ПГУ төхөөрөмж дээр 37оС орчинд 30 мин гүйцэтгээд, 0.2 мкг Dnase эсгэг нэмж 5 мин үргэлжлүүлээд, 65оС орчинд 10 мин туршид эсгэгийг идэвхгүйжүүлсэн.



Picture 6. Biotinylated RNA baits quality check on TapeStation 2.0. The ~120 nt length and the concentration of RNA baits were confirmed. Leftmost lane – size marker; middle lane – dsDNA library after EcoRI treatment; right lane – RNA baits transcribed from the dsDNA library.

РНХ пробоор генийн хэсгүүдийг сорчлон баяжуулах, бэлдэцийг NGS төхөөрөмж дээр уншуулах ажилбар

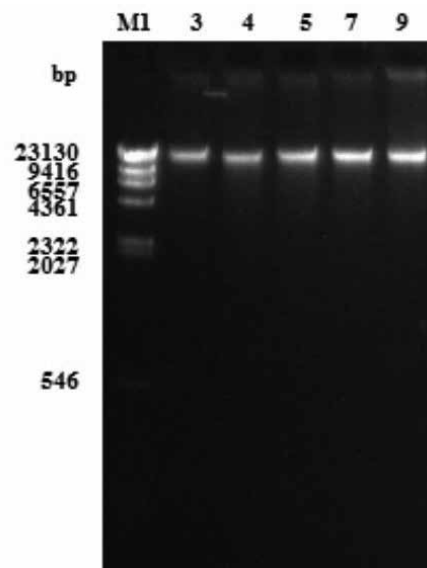
Геномын ДНХ дээжийг Illumina Hiseq 2500 төхөөрөмжөөр уншуулах бэлдэцийг NEBNext Library Preparation Kit (NEB цомгоор, 250-300

х. н. урттай, 500-1000 нг хэмжээтэй, дээж бүрт өвөрмөц баркод толгой болон сүүлтэй бэлтгэсэн (Зураг 7).



Picture 7. Structure of DNA library prepared for Illumina Hiseq platform. NGS library template DNA contains P5 and P7 functional sequences for the annealing on flow cell, sequencing S1 and S2 primers (single end sequencing, or pair end sequencing), index sequences for sorting out the reads from multiple resources, and 150-300 bp of read fragments. Final library DNAs were used the RNA bait capturing.

Судалгаанд зориулж цуснаас ялгаж авсан геномын ДНХ дээж нь бэлдэц бэлтгэх цомог дээр заасан чанарын шаардлагыг хангасан (цэвэршилт болон агууламжаар) эсэхийг TapeStation 2.0 төхөөрөмж дээр шалган баталгаажуулсан (Зураг 8).



Picture 8. Quality check on the genomic DNA samples used to NGS library preparation (#3, 4, 5, 6, 7), by agarose gel electrophoresis. M1 – DNA size marker.

ДНХ бэлдэцийг биотинжуулсан РНХ пробоор үйлчлүүлж, төлөвлөсөн 109 генийг сорчлон баяжуулсан. Эцсийн бүтээгдэхүүнийн хэмжээ асар бага байсан (0.1-0.3 нг/мкл).

Бүтээгдэхүүн тус бүрээс 10 нг авч, 50 мкл урвалын орчинд, NGS бэлдэц бэлтгэх цомгийн (NEBNext Library Preparation Kit) ПГУ шатны

урвацийг хэрэглэн, 10 давталттай (цикл) ПГУ тавьж олшруулсан. Бүтээгдэхүүнийг давсаар тунадасжуулах аргаар цэвэрлэсэн. Эцсийн ДНХ бэлдэц 2-7 нг/мкл агууламжтай байв. Бэлдэцийг зааврын дагуу, шилэн ялтас дээр 8-16 зэрэгцээ бэлдэц байхаар өөр бусад дээжийн бэлдэцтэй хольж Illumina HiSeq 2500 төхөөрөмж дээр уншуулсан. Уншилтын үр дүн дээр зохих биомэдээлэлзүйн програм хангамжийг хэрэглэж, чанарын үнэлгээ хийсэн:

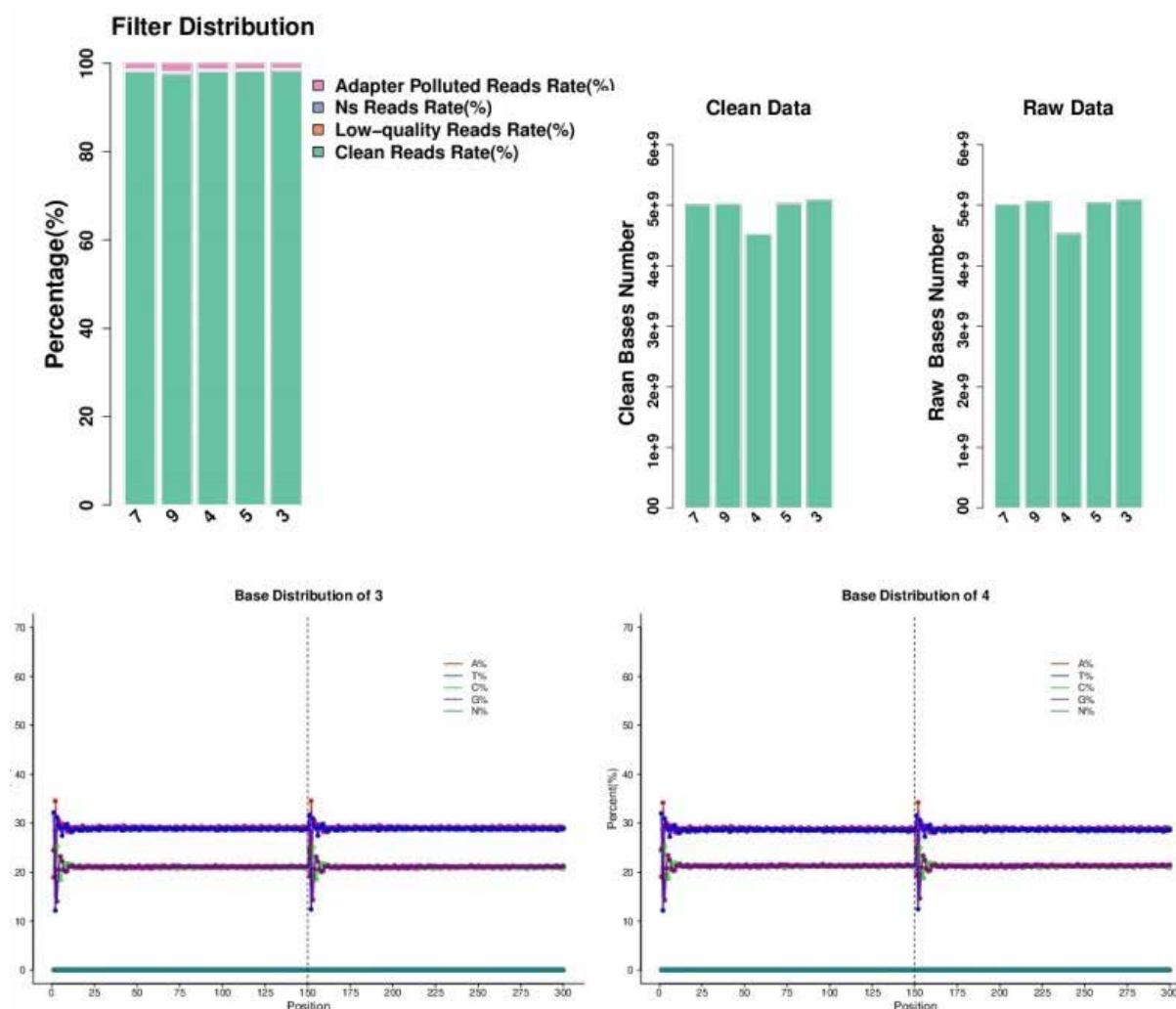
Геном дээрээс сорчлон баяжуулахаар төлөвлөсөн хэсгийн уншилт ба нийт уншилтын

харьцаа (target sequence read percentage).

Мөн сорчлон баяжуулахаар зорьсон хэсгийн дундаж болон хэсгийн нуклеотид бүрийн уншилтын давталт (depth of coverage).

Мөн сорчлон баяжуулахаар зорьсон хэсгийн 2 талын 100 нуклеотид хэсгийн уншилтын давталт (depth of coverage).

Урьдаар уншилтын үндсэн чанарын шалталтыг зохих програм хангамж, аргазүйгээр гүйцэтгэсэн (Зураг 9).



Picture 9. Main quality parameters from the reads, libraries of RNA bait captured target fragments (libraries from samples ## and #4). Sequencing was on Illumina HiSeq 2500. Upper-left graphic: the filter distribution of 5 samples mixed and loaded into flow cell. Adapter polluted reads percentage  $< 3\%$  shows the library quality is satisfying. Low quality reads: the percentage of missed or undetermined nucleotides  $< 0.003\%$  is quality fulfilling. Clean reads – total high quality reads. Upper-right graphic: clean data with total 4.53-5.05 bln nucleotide reads from samples (e9 – 109). Read with  $< 5$  depths were excluded. Raw data: confirmed sequence reads (e9 – 109).

Уншилтын үр дүнг жишиг GRCh37 - hg19 дараалалтай харьцуулсан. Сорчлон баяжуулалтын үр дүнгээр сонирхсон 109 генийн экзон, 5' болон 3' UTR хэсгүүдийн уншилт нь:

Чанарын шаардлага хангасан нийт уншилтын 9.94-14.09% эзэлж байв (Хүснэгт 1 дээрх дарааллын эзлэх хувь). Нэгтгэсэн үр дүнг Зураг 10 дээр харуулав.

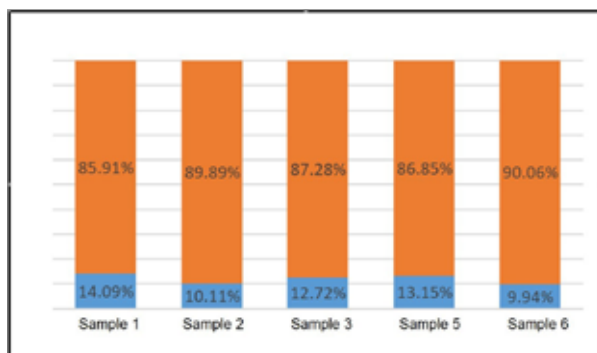
Нуклеотид бүрийн уншилтын давталт буюу гүн 26-1414 байв (Хүснэгт 1 дээрх дараалал дээрх нуклеотид). Уншигдсан дарааллын 99% нь 500-с гүн байв. Тэдгээр нь геномын бусад хэсэг буюу өвөрмөц бус хэсгийн уншилтынхаас 61-483 дахин гүн байв.

Экзон тус бүрийн уншилтын дундаж гүн 78.08-2098.43 байв. Нэгтгэсэн үр дүнг Хүснэгт 1 дээр жагсаав.

Сорчлон уншихаар төлөвлөсөн нийт 17,904 хэрчим бай дарааллаас 2,952-ын бай дараалал буюу 354,240 нуклеотид хэсэг нь огт уншигдаагүй буюу амжилтгүй болсон. Энэ нь анх нийлэгжүүлж гаргаж авсан олигонуклеотидын 16.49% нь нийлэгжээгүй эсвэл бүрэн бус нийлэгжсэн байх боломжтойг харуулж байв.

Уншилтаар сорчлон баяжуулсан хэсгийн хоёр талын 35 нуклеотид хэсгийн уншилтын гүн дунджаар 12-87 байв (Хүснэгт 1 дээрх экзон болон UTR хэсгийн байрлалын 2 захаас тус бүр 100 нуклеотид хэсэг). Нэгтгэсэн үр дүнг Зураг 11 дээр харуулав.

Уншилтын чанарын үзүүлэлт Q30 хэмжүүрээр 93.14-93.33% байв. Чанарын шаардлага хангасан нийт уншилт 46.0-51.7 тэрбум нуклеотид байв.

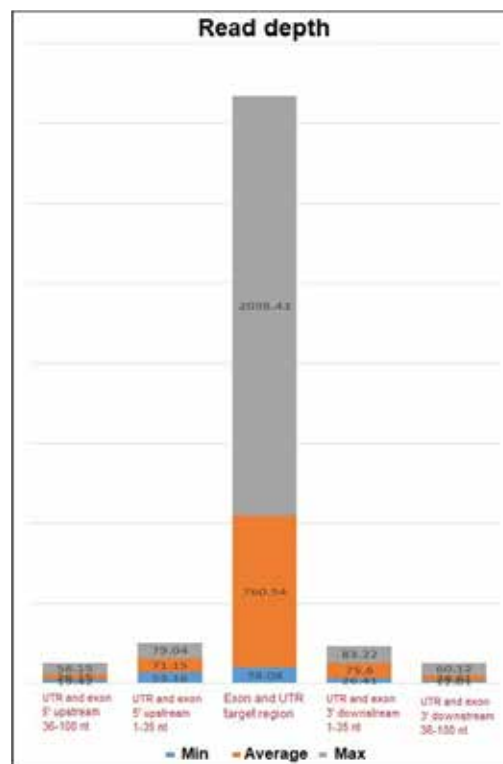


Picture 10. Percentage of target sequence reads.

Table 1. Read depths of each target gene's captured exon regions.

Gene	Exon Read Depth (Average by Nucleotide)	Gene	Exon Read Depth (Average by Nucleotide)	Gene	Exon Read Depth (Average by Nucleotide)
ABL1	485.68	FLT3	2001.46	POLE	372.11
AKT1	1459	GATA3	397.1	PTEN	253.98
ALK	195.07	GNA11	94.06	PTPN11	361.96
APC	424.55	GNAQ	382.14	RAD50	879.1
AR	354.09	GNAS	712.9	RAD51C	2098.43
ARID1A	1667.43	GREM1	2024.77	RAD51D	515.66
ASXL1	899.17	HNF1A	882.65	RASSF5	1588.03
ATM	1578.1	HRAS	1820.93	RB1	169.9
BAP1	405.78	IDH1	256.01	RET	355.04

Numbers show the percent of RNA bait target sequences in total qualified nucleotides (of total reads from Picture 9), 9.94-14.09% of total reads, 109 genes' exons, 5' and 3' UTRs, and 35 bp extra sequences. Based on the read depth, the RNA baits are calculated to have enriched their target sequences by ~15000-17000 fold compared to non-target sequences.



Picture 11. Read depth by target regions. Calculating read depth on different target functional regions are necessary for defining the specificity of RNA bait to their target sequences, and for their improvements.

Read depths of exons and UTRs as min 78.08, average 760.54 and max 2098.43 are 4.2-25 times higher compared to 1-35 and 36-100 outer sequences. Results show the RNA baits had specific binding to their target sequences.



BARD1	93.22	IDH2	1596.12	RUNX1	886.09
BRAF	1280.93	JAK2	829.07	SDHA	1813.07
BRCA1	1006.04	JAK3	1195.58	SDHB	1299.7
BRCA2	1709.08	KDR	400.97	SDHC	2058.43
BRIP1	462.21	KIT	270.08	SDHD	294.73
CBL	1355.44	KLF6	1760.04	SEMA3B	1051.51
CDH1	1190.67	KMT2D	2026.03	SETBP1	544.03
CDK12	158.04	KRAS	475.83	SF3B1	1429.6
CDK4	329.67	KREMEN1	658.01	SMAD4	353.17
CDKN1B	860.05	MAP2K1	272.11	SMARCA4	2035.3
CDKN2A	1904.33	MAP2K4	319.4	SMARCB1	1000.84
CHEK2	951.39	MEN1	154.14	SMO	1060.74
CSF1R	1867.89	MET	990.75	SPOP	486.41
CTNNB1	412.07	MITF	712.55	SRC	712.88
DNMT3A	353.84	MPL	478.96	STK11	97.77
EGFR	1667.59	MSH2	569.05	SUFU	100.84
EP300	572.83	MSH6	2016.55	TET2	153.81
EPCAM	78.08	NF1	1117.89	TIMP3	915.96
ERBB2	1812.61	NOTCH1	1999.06	TP53	1092.39
ERBB4	1216.6	NPM1	670.08	TP73	685.22
EZH2	81.29	NRAS	377.07	TSC1	914.11
FBXW7	673.15	PALB2	1773.95	TSC2	1419.99
FGFR1	499.12	PDGFRA	860.58	US2AF1	1376.05
FGFR2	590.74	PIK3CA	1854.4	VHL	160.02
FGFR3	775.64	PIK3R1	1624.16	WT1	
FH	732.32	PMS2	616.02		
FLCN	936.04	POLD1	1300.54		

**Уншилтын үр дүнг боловсруулах, дүн шинжилгээ**

Уншилтын үр дүнг төхөөрөмж дээрээс CFasta форматаар хүлээж аваад, NGS QC Toolkit програмаар FASTQ болгон хувиргасан. Уншилтыг задлан шинжлэх ажлыг Linux ажлын орчинд Galaxy иж бүрдэл систем дээр (usegalaxy.org), Bioconductor програм дээр гүйцэтгэсэн (www.bioconductor.org, www.r-project.org). Жишиг геномтой харьцуулж өөрчлөлт илрүүлэхэд GATK, Samtools, SOAPsnp, VarScan, MuTect, SomaticSniper, Strelka болон JointSNVMix програмуудыг хэрэглэсэн. Бид энэхүү судалгаагаар удамшлын гаралтай хөх, өндгөвчийн хорт хавдар үүсгэх эрсдэлтэй 7 генийн (BRCA1, BRCA2, ATM, BRIP1, PTEN, TP53, RAD51C) мутацийг жишиг дараалалтай харьцуулж үзсэн [13-22] (Хүснэгт 2, 3). Үүнд:

Хөх болон өндгөвчийн хавдрын удамшилтай гэсэн өгүүлэмжтэй, хавдартай 5 өвчтөний BRCA1, BRCA2, TP53 геномд 3 хэлбэрийн, 8 эмгэг шинж тэмдэг нөхцөлдүүлэгч нэг нуклеотидийн өөрчлөлт (SNP) илэрсэн. Тодруулбал хөхний

хавдартай 46 настай эмэгтэйн BRCA1 ген дээр p.Ser1634Gly, p.Pro871Leu, TP53 ген дээр p.Pro72Leu, нийт 3, 33 настай эмэгтэйн BRCA1 ген дээр p.Ser1634Gly, p.Pro871Leu өөрчлөлт, өндгөвчийн хавдартай 3 эмэгтэйн TP53 ген дээр p.Pro72Leu гэсэн эмгэг шинж тэмдэг нөхцөлдүүлэгч SNP илэрсэн.

Өндгөвчийн хавдартай нэг өвчтөн дээр PTEN генийн төгсгөл хэсэгт илэрсэн chr10:89729805 хэсэгт тимин цитозиноор солигдсон мутаци, мөн хөхний хавдартай нэг өвчтөнд BRIP1 генийн трансляцид ордоггүй 3' төгсгөл дээрх (UTR3) chr17:59757543 байрлалд аденин делеци болсон мутаци нь одоогийн мэдээллийн сан дахь бүртгэлийн дугааргүй 2 шинэ мутаци болохыг илрүүлэв.

Делецийн хувьд BRCA2 дээр rs139813105, ATM дээр rs369583811, BRIP1 дээр rs10601136, TP53 дээр rs200757381 болон rs141204613 гэсэн бүртгэлийн дугаартай мутаци илрэв.

Table 2. The number of mutations confirmed on inherited breast and ovary cancer samples

№	Sample	Deletion	SNP
1	DNA library #3 (Ovary cancer #1)	3	1
2	DNA library #4 (Ovary cancer #2)	0	2
3	DNA library #5 (Ovary cancer #3)	2	2
4	DNA library #7 (Breast cancer #1)	4	3
5	DNA library #9 (Breast cancer #2)	3	1
Total		10	9

Table 3. Types of confirmed mutations on inherited breast and ovary cancer samples

Gene	Of patient with breast cancer				Of patient with ovary cancer				
	Sample #7 (46 years old)		Sample #9 (33 years old)		Sample #3 (47 years old)		Sample #4 (50 years old)	Sample #5 (49 years old)	
	INDEL	SNP	INDEL	SNP	INDEL	SNP	SNP	INDEL	SNP
BRCA1 BC,OC		rs 1799966		rs 1799966					
		rs16941		rs16941					
BRCA2 BC,OC			rs 139813105					rs 139813105	
ATM BC,OC			rs 369583811					rs 369583811	
BRIP1 BC	rs 10601136								
	NA UTR3'								
PTEN BC,OC									NA UTR 3'
TP53 BC,OC	rs 200757381				rs 200757381				
	rs 141204613		rs 141204613		rs 141204613				
		rs 1042522				rs 1042522	rs 1042522		rs 1042522

\*BC- удамшдаг хөхний хавдартай холбоотой ген, OC- удамшдаг өндгөвчийн хавдартай холбоотой ген

### Хэлцэмж

Өдгөө хүн эмнэлгийн судалгаа оношлогоонд мутацийг олж илрүүлэх, генийн нийлэгжлийн хэмжээг тооцоолох, бие дэх биологийн бичил биетийн иж бүрдлийн болон орчны метагеномик судалгаанд зүйл бүрийн төрөл, омог, агууламжийг олж тооцоолох явцад NGS уншилтын үр дүн дээрх биомэдээлэлзүйн боловсруулалт дээр эргэлзээтэй үр дүнд гарах тохиолдол байдаг [5-7]. Эргэлзээ нь технологийн онцлогоос, мөн нуклейн хүчлийн дээжийн анхдагч хэмжээ болон чанараас шалтгаалдаг. Технологийн онцлог гэдэг нь дээжийн чанар хангалттай байвч нуклейн хүчлийн жишиг дараалалтай харьцуулсан өөрчлөлт нь баталгаагүй, тодорхой илрэхгүй байхыг хэлнэ (хувирамтгай давталттай, GC агууламж өндөртэй, A агууламж өндөртэй

дараалал). Чанар хангалтгүй байх гэдэг нь шинжлэх нуклейн хүчил хэт бага байх, урвалын өмнө баяжуулах арга хэмжээг авсанаас болж геномын хэсэг бүрийн агууламжийн харьцаа алдагдсан, дээж хоорондоо холилдсон, чанар хангалтгүй байх зэрэг болно. Тус ажлаар анхлан нийт 12 дээж дээр сорчлон NGS уншилтыг гүйцэтгэхээр төлөвлөсөн хэдий ч 7 дээжнээс бэлдэц бэлтгэх ажилбар амжилтгүй болсон. Энэ нь анх цэвэрлэж авсан геномын ДНХ дээжийн чанар, эсвэл бэлдэц бэлтгэх ажилбарыг гүйцэтгэх мэргэжлийн туршлага, ур чадвартай холбоотой гэж бид үзсэн.

Эргэлзээтэй уншилтыг баталгаатай гүйцэтгэхийн тулд өдгөө баримталж байгаа үндсэн стратеги нь уншилтын давталтыг хангалттай хэмжээгээр нэмэх юм. Давталтыг нэмэх 2 аргачлал байдаг нь нэгт, төхөөрөмжийн хүчин чадлыг нэмж,

нэгж уншилтын хэмжээг өсгөх, хоёрт, уншуулах хэсгүүдийг нийт материал дундаас урьдаар сорчлон баяжуулах. Уншилтын давталт өссөнөөр үндсэн Q үнэлгээ өснө. Сорчлон баяжуулах гэдэг нь шаардлагатай хэсэгт өвөрмөц проб хэрэглэж ялган авч бусад хэсгийг зайлуулах, эсвэл мультиплекс ПГУ болон түүнтэй ижил ажилбараар сорчлон олшруулж авах ажилбарыг хэлнэ. Проб хэрэглэх ажилбар нь шилж уншуулахаар зорьсон хэсгийн нуклейн хүчлийн материалын хэмжээг олон дахин баяжуулдаг. Мөн төхөөрөмж дээр нэг удаад уншуулах дээжийн тоог нэмэх, шаардлагагүй хэсгийн уншилтыг багасгадаг давуу талтай тул ажилбарын зардлыг танах бололцоо олгодог [8]. Ингэхдээ нуклейн хүчил материалыг бэлтгээд (ДНХ эсвэл РНХ), уншуулах дараалалтай 90-100% комплементар байх проб материалыг дээж дээр нэмнэ. Пробын дараалал нь ялгаж авах нуклейн хүчлийн дараалалд өвөрмөц байдаг. Проб өөрийн бай хэсэгтэй комплементар болсоны дараа тэдгээрийг дээжнээс өвөрмөцөөр цэвэрлэж авах хэрэгсэл болдог [9].

Проб ДНХ утаслаг бэлтгэх арга дундаас бид дан утаслаг, РНХ хэлбэртэй, нэмэлт өөрчлөлттэй нуклеотид агууламжтай байх аргазүйг туршсан [10]. Проб нь 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90, 100, 120 зэрэг нуклеотид урттай байж болох бөгөөд, уртын хэмжээ нь өвөрмөц чанартай шууд хамааралтай байдгийг харгалзаж, 117 нуклеотид урттай, биотинжуулсан РНХ пробыг бэлтгэн хэрэглэсэн. Проб утаслагийг бэлтгэхдээ эсгэгтэй урвалын орчинд өвөрмөц праймер хэрэглэн олшруулаад цэвэрлэж авах, эсвэл төхөөрөмж дээр химийн аргаар нийлэгжүүлээд, цэвэрлэж авах аргыг хэрэглэдэг. РНХ проб утаслаг нь ДНХ проб утаслагтай өвөрмөц чанараар ижил бөгөөд, ажилбарын эцэст тэдгээрийг РНХ-д өвөрмөц эсгэгээр задалж устгах боломжтой тул ажилбарыг хялбар, баталгаатай болгосон [11]. Тусгай нуклеотид гэдэг биотин, стрептавидин, тэдгээртэй ижил молекул холбож нийлэгжүүлсэн нуклеотидыг хэлнэ. Тусгай урацил нуклеотидын агууламжтай РНХ пробыг өөрөөр RNA bait гэж нэрлэдэг болсон. Бид туршилтын ажилд нийт урацил нуклеотидын 20% нь биотинжсон байхаар бэлтгэсэн. РНХ пробыг транскриптаз эсгэг хэрэглэн, шаардлагатай хэмжээгээр гаргаж авах ДНХ утаслаг санг бий болгож, РНХ утаслагийг ганц эсвэл олон зэрэгцээ урвалын орчинд бэлтгэх аргыг туршиж үзсэн нь цаашид тогтмол авч хэрэгжүүлэх ажил болох юм.

ДНХ утаслагийн санг бэлтгэхдээ шилэн ялтас буюу чип хавтан дээр 60-120 нуклеотид урттай, харилцан адилгүй дараалалтай олон сая тооны

олигонуклеотидыг бага хэмжээтэй, өндөр нягтшилтай нийлэгжүүлээд цэвэрлэж авдаг [11]. Бид өөр хоорондоо 61 нуклеотид давхардсан дараалалтай байхаар бэлтгэж туршсан.

Урт олигонуклеотидыг чип дээр нийлэгжүүлэх, өртөг өндөртэй ажилбарыг гүйцэтгэхдээ түүнээс гарах бүтээгдэхүүн дундаас хүссэн олигонуклеотидыг өвөрмөцөөр олшруулан хос утаслаг гаргаж авах нь нэн чухал ажил мөн. Үүнд, олон тооны генийн хэсгүүдэд өвөрмөц дарааллыг нийлэгжүүлсэн бол тэдгээрийн зарим нэгээс сорчилсон байдлаар РНХ-проб бэлтгэж цаашдын ажилбарт хэрэглэх шаардлага тулгарна. Үүний тулд чип ялтас дээр нийлэгжих олигонуклеотидын дараалал нь толгой ба сүүл хэсгээрээ дахин давтагдашгүй, нэгнээсээ ялгаатай байхаар төлөвлөх нь зөв шийдэл юм. Жишээлбэл олигонуклеотидын 4-нуклеотид баркод нь өөр хоорондоо давтагдахгүй тохиолдолд толгой эсвэл сүүл тус бүрээр  $(4 \times 3 \times 2 \times 1) = 24$  өөр дараалалтай хэрчмийг нийлэгжүүлж болно. Толгой бас сүүл аль алиныг харгалзан үзвэл  $24 \times 24 = 576$  давтагдашгүй утаслагийг нэг дор нийлэгжүүлэн гаргаж авах юм. Үүнтэй адил толгой болон сүүл хэсгийн дотор тал дээр 6, 6 нуклеотидыг индекс болгон хэрэглэх тохиолдолд  $720 \times 720 = 518,400$  давтагдашгүй хоршилтой утаслагийг хэрэглэнэ. Ирээдүйд тус аргазүйг сайжруулах нь зүйтэй гэж үзэж байна.

### Дүгнэлт

Тус ажилбараар дарааллыг нь уншуулах ДНХ-ийн шаардлагатай хэсгийг өндөр давтамжтай уншуулж, сонирхсон хэсгийн уншилтын үр дүнг 100-1000, түүнээс ч олон дахин өсгөх бололцоотой гэдгийг харуулав.

Цаашид хүн болон өөр амьтан, ургамлын зүйлийн геномын ДНХ эсвэл РНХ-ийн NGS бэлдэцээс (NGS library) шаардлагатай хэсгийг сорчлон баяжуулах ажилбарыг шаардлагын дагуу гүйцэтгэх боломжтой. Ингэхдээ чип шилэн ялтас дээр нийлэгжүүлэх анхдагч олигонуклеотид утаслагийг ген эсвэл багц шинжилгээнд зориулагдсан өөр өөрийн баркод дараалалтай байхаар нийлэгжүүлж хэрэглэнэ. Нэг генийн шаардлагатай хэсэгт өвөрмөц, эсвэл нэгээс дээш тооны багц генийн шаардлагатай хэсэгт өвөрмөц, эсвэл нэг болон түүнээс дээш тооны генийн олон хэсэгт өвөрмөц, биотинжуулсан РНХ пробыг бэлтгэх боломжтой юм. Нэг болон түүнээс дээш янзын хорт хавдрыг нөхцөлдүүлдэг генүүд байж болно. Ийм ажилбараар генийн нэр төрөл дээр дагнах, эсвэл судалгааны салбар дээр дагнах, эсвэл оношлогооны ажлын зорилгод нийцүүлэх уян хатан стратеги, аргазүйг боловсруулах

боломжтой. Геномын тодорхой хэсгийг хангалттай өндөр давталттай уншуулсанаар үр дүн баталгаатай болно.

### Талархал

Судалгааны ажил нь БСШУЯ, ШУТС-ийн санхүүжилтээр (төслийн нэр: Удамшлын гаралтай хөх ба өндгөвчийн өмөнг нөхцөлдүүлэгч генийн мутацийг илрүүлэх дэвшилтэт технологийг нэвтрүүлж, урьдчилан сэргийлэхэд ашиглах), АШУУИС-ийн Цөм лаборатори, ХСҮТ-ийн Эмэгтэйчүүдийн мэс заслын тасаг, Цээжний хөндийн мэс заслын тасаг болон Занааспекс молекул биологи бүтээгдэхүүн хөгжүүлэлтийн лаборатори дээр явагдсан инновацийн төслийн хүрээнд хийгдсэн болно.

### Номзүй

- Mardis ER. DNA sequencing technologies: 2006-2016, Nat Protoc. 2017;12(2):213-218.
- Kishore R Kumar, Mark J Cowley, Ryan L Davis. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies, Semin Thromb Hemost. 2019;45(7):661-673.
- Colleen T Harrington, Elaine I Lin, Matthew T Olson, James R Eshleman. Fundamentals of pyrosequencing, Arch Pathol Lab Med. 2013;137(9):1296-303.
- Lin Liu, Yinhu Li, Siliang Li, Ni Hu, Yimin He, Ray Pong, Danni Lin, Lihua Lu, Maggie Law. Comparison of next-generation sequencing systems, J Biomed Biotechnol. 2012;2012:251364.
- Zekun Yin, Haidong Lan, Guangming Tan, Mian Lu, Athanasios V Vasilakos, Weiguo Liu. Computing Platforms for Big Biological Data Analytics: Perspectives and Challenges, Comput Struct Biotechnol J. 2017;15:403-411.
- Jeffrey A Frelinger, Big Data, Big Opportunities, and Big Challenges, J Investig Dermatol Symp Proc. 2015 Nov;17(2):33-5.
- Francis Y L Chin, Henry C M Leung, S M Yiu. Sequence assembly using next generation sequencing data--challenges and solutions, Sci China Life Sci. 2014;57(11):1140-8.
- Iwanka Kozarewa, Javier Armisen, Andrew F Gardner, Barton E Slatko, C L Hendrickson. Overview of Target Enrichment Strategies, Curr Protoc Mol Biol. 2015;112:7.21.1-7.21.23.
- W Hennig. Molecular hybridization of DNA and RNA in situ, Int Rev Cytol. 1973;36:1-44.
- J G Wetmur. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization, Crit Rev Biochem Mol Biol. 1991;26(3-4):227-59.
- Lei Yan, Jie Zhou, Yue Zheng, Adam S Gamson, Benjamin T Roembke, Shizuka Nakayama, Herman O Sintim. Isothermal amplified detection of DNA and RNA, Mol Biosyst. 2014;10(5):970-1003.
- Emily M. LeProust, Bill J. Peck, Konstantin Spirin, Heather Brummel McCuen, Bridget Moore, Eugeni Namsaraev, and Marvin H. Caruthers. Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process, Nucleic Acids Res. 2010; 38(8): 2522-2540.
- Radha Munagala et al., Promising molecular targeted therapies in breast cancer, Indian J Pharmacol. 2001; 43(3) 236-245
- Haeyoung Kim, Doo Ho Choi. Distribution of BRCA1 and BRCA2 mutations in Asian patients with breast cancer, J Breast cancer 2013; 16(4): 357-365
- Scott D. Dufrence et al., BRCA1 and BRCA2 mutation screening using SmartCycler II high-resolution melting curve analysis, Arch Pathol Lab Med. Vol 130.2006 185-187.
- Wong- Brown MW et al., Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in patients with triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2015;150(1):71-80.
- Jaime Plat, FRCPATH, Adriana Ribe, Alberto Gallardo, Hereditary ovarian cancer. Human pathology 36, 2005;861-870
- Oktyabri D.Ishimura A, Tange, Terashima, Suzuki, DOT1L histone methyltransferase regulates the expression of BCAT1 and is involved in sphere formation and cell migration of breast cancer cell lines, Biochimie 123 (2016) 20-31
- Bond GL, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. Oncogene. 2007;26(9):1317-23.
- DNA sequencing: bench to bedside and beyond. Clyde A. Hutchinson. Nucleic Acids Res. 2007; 35(18): 6227-6237.
- Rebbeck T, Friebel T, Lynch H et al., Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. The prose study group. J.Clin.Oncol 2004;22:1055-62.
- Nancie Petrucelli, Mary B Daly and Gerald L Feldman. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. Genetics in Medicine. 2010 12, 245-259.S

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:  
Анагаахын шинжлэх ухааны доктор,*