

Новый стандарт в генетических и эпигенетических исследованиях

Пиросеквенирование сочетание секвенирования и количественного анализа



Принципиальная схема пиросеквенирования

Изучение количественных показателей открывает новые горизонты для генетических исследований

Благодаря развитию технологий секвенирования наше понимание о том, каким образом биологическая информация кодируется последовательностями нуклеотидов, значительно расширилось. Эти знания также принесли нам дополнительные вопросы: какое значение имеют незначительные изменения нуклеотидных последовательностей, особенно в некодирующих участках? Когда взаимодействие регуляторных элементов приводит к экспрессии генов? Как негенетическая (эпигенетическая) информация влияет на программирование развития и дифференцировку клеток? И наконец, какую пользу прикладным наукам могут принести ответы на эти вопросы? Появление новых знаний формируют новые направления в генетических исследованиях. Ученые обнаруживают новые слои биологической информации, хранящиеся и наследуемые благодаря генетическим и эпигенетическим модификациям ДНК. Подобные исследования требуют научного оборудования нового поколения, позволяющего обеспечить универсальность программ исследования и возможность получения количественной информации о нуклеотидной последовательности.

Пиросеквенирование с использованием продукции PyroMark® компании QIAGEN® отвечает всем этим требованиям

Объединяя детекцию и количественную оценку генетических изменений в одной мощной системе, приборы линии PyroMark® превосходят все другие секвенирующие системы при анализе целевых небольших фрагментов последовательностей ДНК. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению временных и денежных вложений при использовании PyroMark® в совершенно разнообразных областях применения (рис. 1).

Отличительными преимуществами Пиросеквенирования являются:

- количественная оценка аллелей, в том числе редко встречаемых
- обнаружение неизвестных вариаций нуклеотидных последовательностей
- возможность разностороннего исследования образцов при единичном запуске прибора
- встроенные контроли исследования, гарантирующие точность и достоверность результатов
- быстрое получение точной и однозначной информации о нуклеотидной последовательности
- интуитивное программное обеспечение, позволяющее проводить различные исследования с помощью созданных пользователем тестов

Рисунок 1. Преимущества использования Пиросеквенирования в различных областях исследования.



Эпигенетика

Превосходное исполнение количественной оценки уровня метилирования индивидуальных или множественных CpG сайтов



Ветеринарные исследования

Чувствительная детекция широкого спектра инфекционных патогенов и быстрое генотипирование, используемое для программ селекции



Популяционные исследования

Статистически достоверные количественные исследования генетической структуры популяции, даже в генетически нестабильных структурах (вирусах).



Генетика растений

Секвенирование и количественный анализ гомозиготности, гетерозиготности и генетические исследования полиплоидных организмов



Фармакогенетика

Секвенирование de novo и наличие встроенных внутренних контролей облегчают открытие и валидацию новых фармакогенетических маркеров



Криминалистика

Секвенирование и количественная оценка маркеров для криминалистики повышает идентифицирующую способность тестов, особенно при высокой степени деградации ДНК



Онкологические исследования

Универсальное программное обеспечение позволяет выполнять разнообразные тесты для выявления генетических и эпигенетических факторов онкологических заболеваний



Эволюционные исследования

Точное секвенирование для филогенетических исследований и высокая чувствительность детекции для отслеживания изменений признаков в селекционных экспериментах

Принципиальная схема пиросеквенирования

Качественные реагенты и чувствительная детекция позволяют проводить количественный анализ вариаций нуклеотидной последовательности

Шаг 1

Аmplификация фрагмента ДНК и биотинилирование цепи, которая послужит матрицей для Пиросеквенирования. Денатурация биотинилированного одноцепочечного ПЦР-ампликона, его изоляция и гибридизация с праймером для секвенирования.

Шаг 2

Инкубация праймера и одноцепочечной матрицы в присутствии ДНК-полимеразы, АТФ-сульфуриказы, люциферазы, апиразы, и субстратов: аденозин-5'-фосфосульфата (АПС) и люциферина.

Шаг 3

Добавление первого дезоксирибонуклеотид трифосфата (dNTP) в реакцию. ДНК-полимераза катализирует добавление dNTP к праймеру для секвенирования, если он комплементарен к последовательности матрицы ДНК. Каждое присоединение к цепи сопровождается выделением пирофосфата (PPi) в количестве, эквимолярном количеству встроившихся нуклеотидов.

Шаг 4

АТФ-сульфуриказа превращает пирофосфат в АТФ в присутствии аденозин-5'-фосфосульфата. Образовавшаяся АТФ запускает люциферазо-опосредованную реакцию окисления люциферина в оксилуциферин, в результате чего происходит образование видимого света в количестве, пропорциональном количеству АТФ. Свет детектируется CCD-камерой и отображается на пирограмме в виде пиков. Высота пиков пропорциональна количеству нуклеотидов, встроившихся в матрицу.

Шаг 5

В течение всей реакции фермент апираза деградирует невстроенные нуклеотиды и избыток АТФ. После завершения деградации нуклеотидов, не встроившихся в цепь ДНК, добавляется новый нуклеотид.

Шаг 6

Добавление нуклеотидов осуществляется последовательно. Следует отметить, что дезоксиаденозин-альфа-тио-фосфат используется в роли заместителя дезоксиаденозин-3-фосфата (дАТФ), так как он эффективно распознается ДНК-полимеразой, но не распознается люциферазой. В течение реакции комплементарная цепь ДНК достраивается, и последовательность нуклеотидов определяется согласно пикам на Пирограмме.

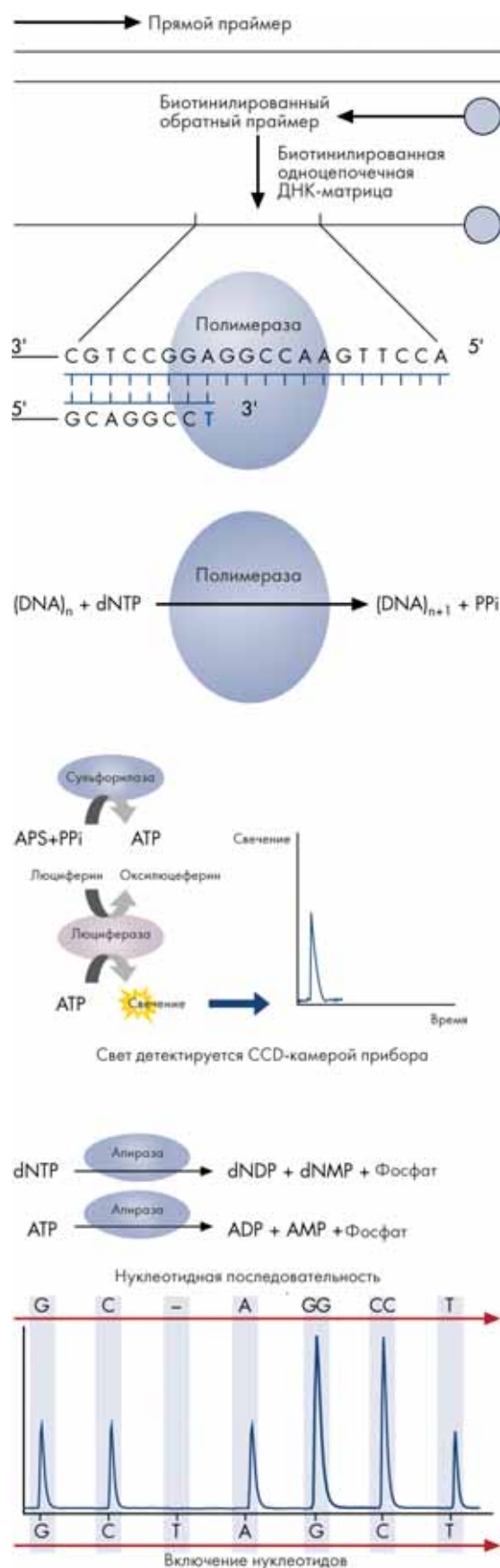


Рисунок 2. Последовательность реакций Пиросеквенирования.



Анализ метилирования ДНК

Стандартный метод анализа метилирования предоставляет только качественную или полуколичественную информацию, которая может привести к неправильным выводам относительно влияния эпигенетического метилирования ДНК на клеточный цикл и метаболизм. Без количественной оценки уровня метилирования невозможно отличить метилирование, имеющее физиологическое значение, от фонового незначимого метилирования.

Пиросеквенирование преодолевает эти ограничения и позволяет проводить высоковоспроизводимую количественную оценку частоты метилирования индивидуальных последовательностей CpG сайтов (Рисунки 3,4). Таким образом, используя метод Пиросеквенирования, можно детектировать и количественно оценивать даже малые изменения в уровнях метилирования. Другим ценным свойством является наличие внутренних контролей качества и возможность сравнивать результаты с ожидаемым уровнем метилирования. Встроенные контроли качества бисульфитной обработки исключают ручную оценку уровня неметилированной ДНК и предотвращают получение ложноположительных результатов детекции метилирования, что, в свою очередь, повышает достоверность результатов.

Эти свойства позволяют признать метод Пиросеквенирования в качестве «золотого стандарта» при анализе метилирования. Данная технология может использоваться для установления корреляции между степенью метилирования ДНК, типом опухоли и уровнем экспрессии генов, для оценки клеточного ответа при обработке деметилирующими агентами и определения изменений в статусе метилирования при опухолеобразовании, генетическом импринтинге и воздействии токсинов окружающей среды.

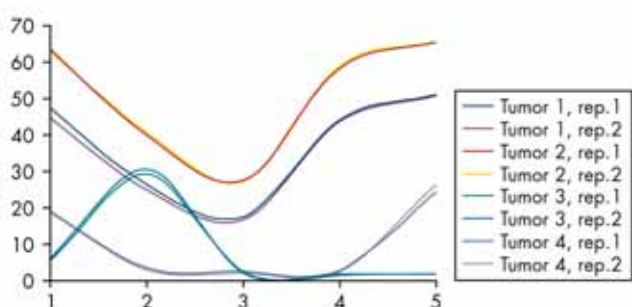


Рисунок 3. Исследование метилирования участков CpG в гене RASSF1A методом пиросеквенирования. Вариация уровня метилирования в 5 различных CpG сайтах в четырех образцах опухоли. Образцы реплицировались в различные дни (показана высокая воспроизводимость).

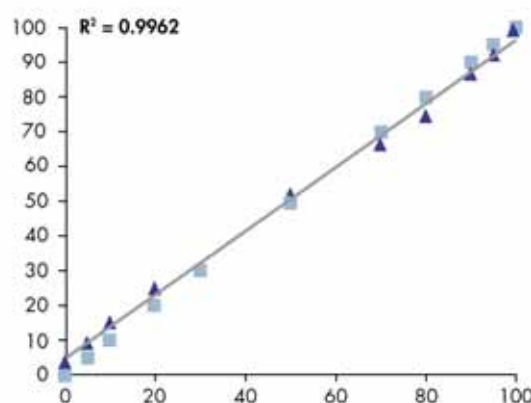


Рисунок 4. Линейная зависимость уровня метилирования, определенная методом пиросеквенирования. ПЦР продукты из различных смесей неметилированной геномной ДНК и метилированной ДНК (EpiTect Control DNAs) проанализированы методом пиросеквенирования. При исследовании получена высокая корреляция между предварительно известным процентом метилированной ДНК в смеси (■) и процентом метилирования, полученным при Пиросеквенировании (▲) ($r^2=0,9962$). График показывает количественную оценку метилирования единичного сайта CpG в гене p16.

Количественная эпигенетика



Значение качественных контролей, используемых при бисульфитной обработке

Для определения статуса метилирования последовательности ДНК методом Пиросеквенирования, первоначально ДНК инкубируют с бисульфитом натрия. В результате этого неметилированные остатки цитозина превращаются в остатки урацила, в то время как метилированные остатки цитозина остаются неизменными, что приводит к возникновению двух вариаций последовательностей ДНК, которые могут быть индивидуально распознаны. Внутренний контроль бисульфитной обработки включен в анализ. Остатки цитозина не следующие за гуанином, в исследуемой последовательности остаются неметилированными, и поэтому могут быть превращены в тимины после бисульфитной обработки и ПЦР (Таблица 1). Полное бисульфитное преобразование идентифицируется, если во всех образцах на этих позициях присутствует тимин, а не цитозин. Использование уникальной технологии защиты ДНК, реализуемой в наборах QIAGEN EpiTect Bisulfite Kits, способствует полной конверсии и минимальным потерям обработанной ДНК.

Таблица 1. Результаты секвенирования после бисульфитной обработки и ПЦР.

	Нуклеотидная последовательность ДНК	После бисульфитной обработки	После ПЦР амплификации
Неметилированная ДНК	A-C-G-T-C-G-T-C-A	A-U-G-T-U-G-T-U-A	A-T-G-T-T-G-T-T-A
Метилированная ДНК	A-C-G-T-C-G-T-C-A	A-C-G-T-C-G-T-U-A	A-C-G-T-C-G-T-T-A

Универсальный анализ сайтов метилирования

Используя технологию Пиросеквенирования, можно получить количественную информацию о статусе метилирования. В отличие от секвенирования по Сэнгеру, высота пика в итоговой пирамме показывает отношение цитозина к тимину в каждом анализируемом CpG сайте, что отражает реальные пропорции метилированной ДНК. В зависимости от направления секвенирования возможно 2 типа анализа: в прямом или обратном направлениях. Кроме того, следующие друг за другом CpG сайты анализируются независимо при одном запуске, позволяя детально оценивать последовательности сайтов метилирования, получая при этом подробную информацию о расположении метилированных позиций (Рисунок 5).

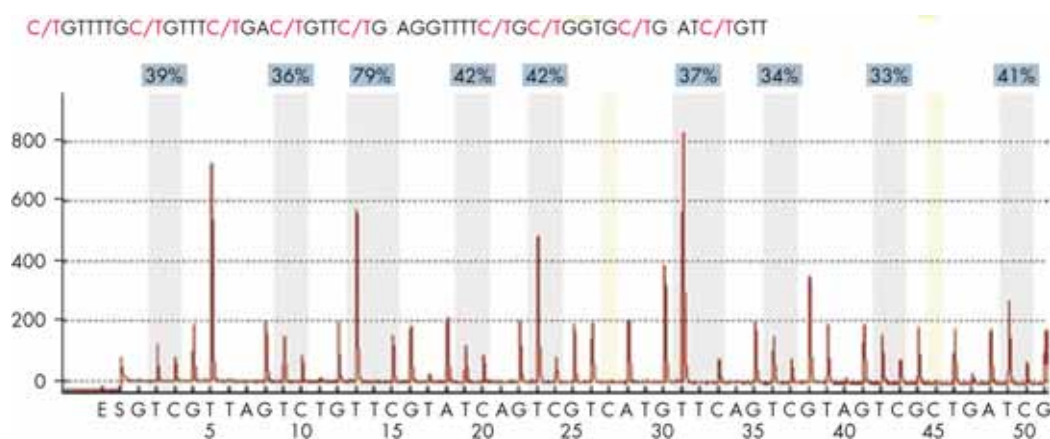


Рисунок 5. Исследование множества последовательных CpG сайтов.

Метилирование девяти независимых CpG сайтов (выделены серым), количественно оцененные методом Пиросеквенирования. Специфическая информация о фоновых позициях анализируемой последовательности представлена вместе с последовательностями метилированных сайтов. Подчеркнутые встроенные контроли качества (выделены желтым) содержат цитозины, превращенные в тимины, что в свою очередь, демонстрирует полную бисульфитную обработку ДНК.



Исследование инсерций – делеций и анализ единичных нуклеотидных замен (SNP)

Генетическое тестирование является важной составляющей при выполнении множества задач. Например, разработка эффективных терапевтических агентов требует информации о том, как генетический полиморфизм влияет на метаболизм; понимание вклада генетических факторов в развитие болезни предполагает выявление мутаций, связанных с заболеваниями; наконец, исследование криминалистических улик, связанных с ДНК – типированием, также полагается на точную детекцию изменений в последовательности ДНК.

В настоящее время для этих целей используется анализ множества типов мутаций; непрерывно проверяются новые маркеры в таких областях как эпидемиология, фармакогенетика и селекция. Для обнаружения этих генетических изменений используется множество различных методов исследований, поэтому достаточно сложно сравнивать результаты, полученные разными методами и разными исследователями. В идеале, одна технология могла бы быть адаптирована для всех целей, что необходимо для стандартизации результатов. Пиросеквенирование предполагает подобную универсальность. Благодаря универсальности расположения праймера в реакции пиросеквенирования, практически все идентифицируемые генетические маркеры могут быть исследованы. Аллели различных локусов могут быть точно охарактеризованы количественно. Также достаточно просто может быть установлена гетерозиготность (Рисунок 6 и 7). Кроме того, так как метод Пиросеквенирования позволяет получить информацию о нуклеотидных последовательностях, можно выявить разнообразные типы генетических изменений – инсерции и делеции, единичные нуклеотидные полиморфизмы, единичные тандемные повторы и вариабельные участки генов. При этом возможно одновременно исследовать несколько вариантов последовательностей при единичном запуске.

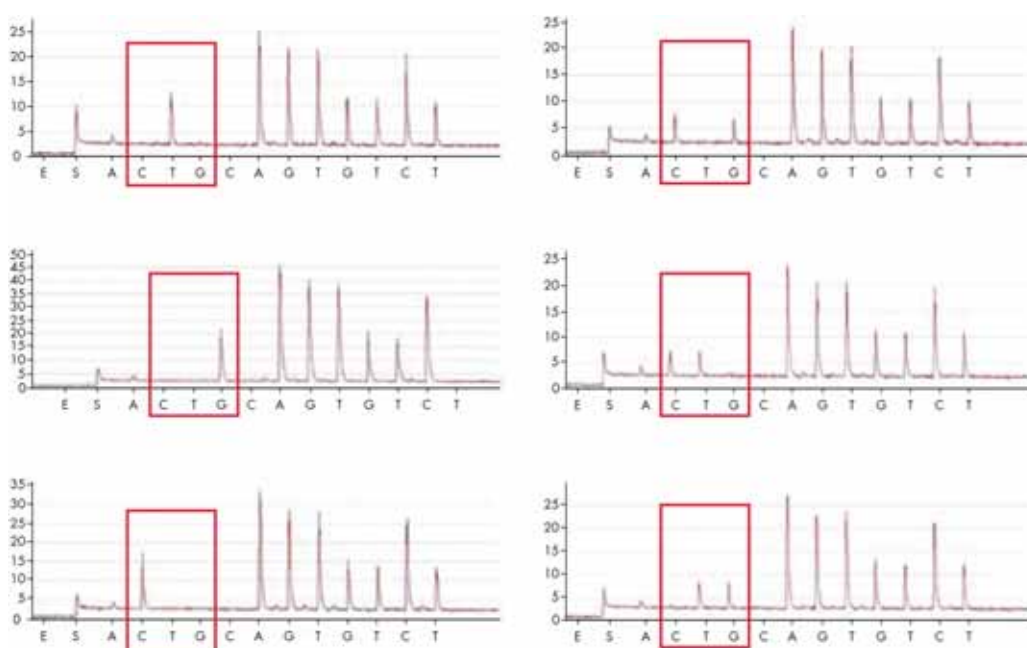


Рисунок 6. Анализ SNP трех аллелей.

Индикацию три- и тетра – аллельных SNP достаточно сложно сделать, используя обычные методы. Серия Пирогрaмм иллюстрирует легкость осуществления подобных исследований, используя пиросеквенирование трех – аллельной SNP. C, T и G последовательно подаются в реакцию пиросеквенирования, и только встроенные нуклеотиды приводят к сигналам в виде пиков. Результатом являются различные области пиков для гомозиготных образцов по каждой аллели (3 пирогрaммы слева) или два пика для гетерозиготных образцов (три пирогрaммы справа).

Чувствительное генетическое тестирование



Универсальность приложений системы

Независимо от того анализируются маркеры или мутации, подготовка образцов для Пиросеквенирования и далее процесс обработки информации о последовательности ДНК осуществляются быстро и просто, экономя время и средства. Преимущество системы Пиросеквенирования для генетического тестирования заключается в простоте получаемых данных. Поскольку результатом анализа являются нуклеотидные последовательности ДНК, пользователь может многократно исследовать мутации в пределах указанной области, а также типы генетических вариаций. Все это возможно сделать при единичном запуске прибора. Кроме того, наглядные данные исследования легко интерпретировать. Пиросеквенирование позволяет осуществлять секвенирование de novo. Пиросеквенирование переменных сайтов, которые соединены с контрольными последовательностями, является гарантированным способом подтверждения вновь идентифицированных маркеров. Высокая пропускная способность способствует быстрому обобщению накопленных данных, необходимых для образования референсной базы для этих маркеров. Это свойство делает Пиросеквенирование мощным и универсальным инструментом для создания фармакогенетических и криминалистических маркеров.

Анализируемая последовательность:

B3 CGTGGGTG[ATCTGCCC]TGCACTYGGGATA

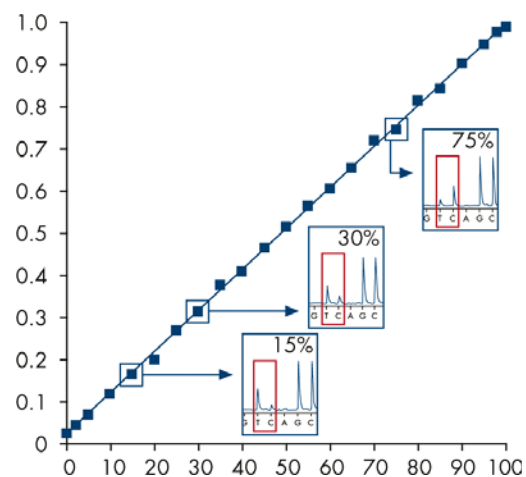
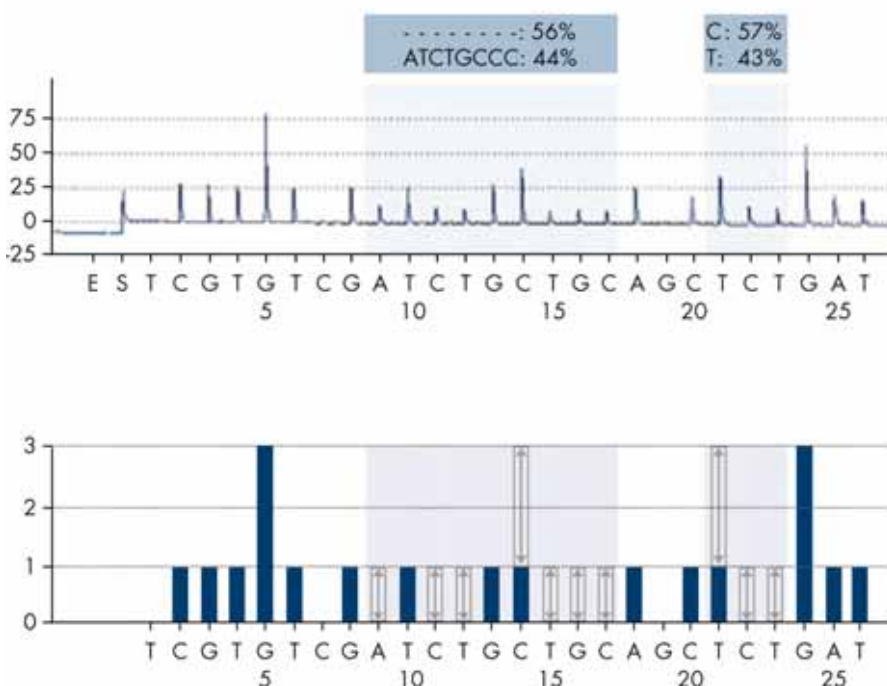


Рисунок 7. Количественный анализ мутаций. Высота пиков пириграммы пропорциональна частоте встречаемости аллели в образце. Это дает возможность получать точные пропорции содержания, например, мутаций в образцах крови.

Рисунок 8. Количественное исследование двух видов мутаций, в единичной реакции Пиросеквенирования. Пирогрamma последовательности ДНК демонстрирует мутацию типа инсерция – делеция (ATCTGCCC) и соматическую мутацию, связанную с единичной нуклеотидной заменой (С на Т). Варибельные места выделены синим цветом, а частоты аллелей приведены сверху анализируемых сайтов. Приведенная ниже гистограмма демонстрирует точное количество каждого из встроенных нуклеотидов. Темно-синяя полоса показывает положение консервативных нуклеотидов в аллелях, а стрелками показаны пустые полосы, изображающие количественные вариации.



Идентификация микроорганизмов и типирование резистентности к лекарствам

Информация о последовательности ДНК является очень важной при проведении генотипирования микроорганизмов. Использование классических методов определения переменных участков генома микроорганизмов является длительным по времени, требует видоспецифичных проб или проведение геля – электрофореза, а наличие неизвестных мутаций может влиять на гибридизацию и приводить к негативным результатам исследования. Пиросеквенирование является быстрым и точным альтернативным методом генотипирования микроорганизмов. Поскольку эта технология проводит секвенирование, синтезируя новые копии в образце ДНК, результаты получаются точные и однозначные, а пользователь может проверить нуклеотидную последовательность, окружающую переменные сайты, для удостоверения, что были проанализированы правильные участки ДНК.

Идентификация видов различных микроорганизмов в течение одного запуска прибора, используя одну пару праймеров

В отличие от технологии гибридизации, Пиросеквенирование позволяет идентифицировать большое количество видов микроорганизмов, используя единый праймер для секвенирования (Рисунок 9). Так ДНК, экстрагированная из нескольких видов микроорганизмов, может быть проанализирована при единичном запуске Пиросеквенирования. Программное обеспечение PyroMark IdentiFire SW 1.0 позволяет обобщить информацию о последовательностях в локальной базе данных, так как импортируемые выходные данные Пиросеквенирования быстро синхронизируются. Ряды данных сравниваются между собой, и процент соответствия каждого из них представляется в детальном отчете для идентификации.

Данные о нуклеотидной последовательности получаются в течение небольшого времени. Меньше чем за 1 час методом Пиросеквенирования можно идентифицировать различные фрагменты ДНК одновременно в 96 образцах (Рисунок 10). В зависимости от настроек исследования, нуклеотидные последовательности могут быть использованы для определения видов микроорганизмов, типов и штаммов или для детектирования генетических мутаций, которые могут привести к резистентности к антибиотикам и противовирусным препаратам.



- Staphylococcus aureus*
- Staphylococcus epidermis*
- Enterococcus faecalis*
- Staphylococcus constellatus*
- Paenibacillus* sp.
- Clostridium* sp.
- Pseudomonas stutzeri*
- Acinetobacter* sp.
- Acinetobacter* sp.
- Shigella boydii*
- Eikenella Corrodens*
- Propionibacterium* p.
- Arcanobacterium* b.
- Actinomyces odontolyticus* etc.

Рисунок 9. Использование пиросеквенирования для бактериальной идентификации. Праймеры для ПЦР подобраны к консервативным участкам, а праймер для секвенирования располагается непосредственно перед хорошо изученным идентифицирующим гипервариабельным местом (голубой цвет). Для определения всех перечисленных видов микроорганизмов (оставшиеся организмы не включены в выравнивание) достаточно иметь один набор праймеров: для проведения ПЦР и для секвенирования.

Точное генотипирование



Исследование резистентности к лекарствам

Используя Пиросеквенирование, можно одновременно исследовать множество образцов для определения мутаций, определяющих резистентность к широко используемым лекарственным средствам (Рисунок 11). Ввиду того, что Пиросеквенирование определяет реальную последовательность локуса, при проведении единичного исследования можно выявить сразу множество возможных мутаций, включая новые, ранее неизвестные мутации. Приборная база метода исследования делает технологию Пиросеквенирования способной детектировать вариации нуклеотидных последовательностей встречающихся с частотой меньше 5% для целого ряда исследований. Более того, гетерогенные вариации среди нескольких копий генов, отвечающих за различные виды резистентности, также могут быть точно подсчитаны. Сочетание минимальных временных затрат для получения результата, простоты интерпретации данных, аналитической гибкости и чувствительности детекции делает Пиросеквенирование дополнительным источником информирования или полной альтернативой культуральным или гибридным методам скрининга резистентности к лекарственным средствам.

Пополняемая библиотека видоспецифичных исследований

В настоящее время описано множество способов идентификации, в которых используются сигнатурные последовательности хорошо известных участков генов микроорганизмов. Кроме того, увеличивается количество тестов, специфически нацеленных на выявление патогенных видов и штаммов бактерий, вирусов и грибов.



Рисунок 10. Экономия времени благодаря пиросеквенированию. При использовании пиросеквенирования исследование мутаций в вирусной РНК, приводящих к появлению резистентности, можно осуществить в течение одного рабочего дня. Приведены временные затраты на исследование методом пиросеквенирования области длиной в 44 нуклеотида в 96 вирусных образцах.

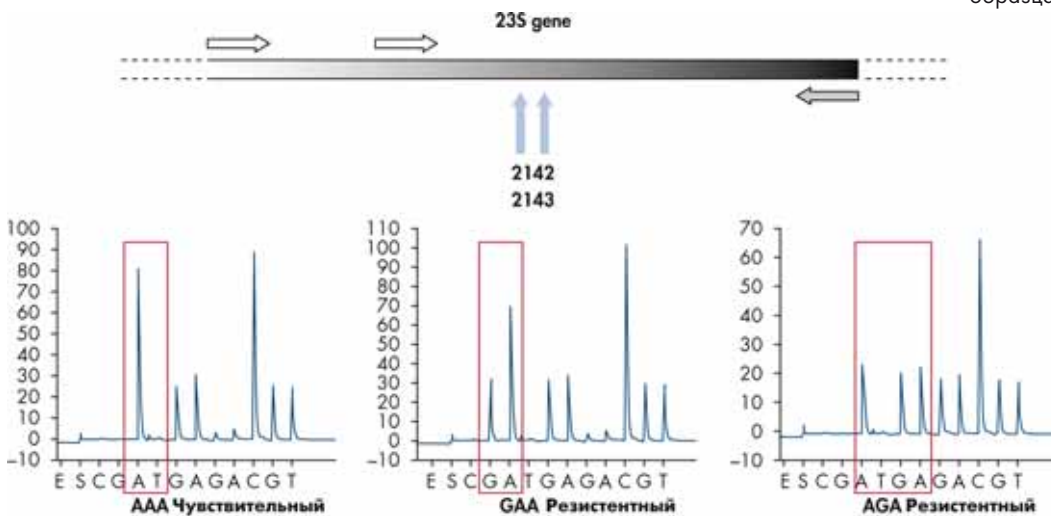


Рисунок 11. Исследование мутаций в генах 23S, приводящих к резистентности у *Helicobacter pylori*.

Программное обеспечение PyroMark



Интуитивное программное обеспечение, созданное для удовлетворения ваших потребностей

Специализированное и дополнительное программное обеспечение, сопровождающее системы PyroMark, обладает дружелюбным интерфейсом, дающим возможность создавать тесты, осуществлять запуски и проводить разнообразные анализы полученных результатов. Программное обеспечение гарантирует корректный выбор которые обеспечивают точный выбор параметров и режимов анализа для любых исследований, позволяя пользователю выполнять запуск процесса пиросеквенирования практически моментально (Рисунок 12). Программное обеспечение позволяет создавать гибкий формат отчетов и экспортировать полученные результаты.

Проведение исследований методом пиросеквенирования экономит время и деньги

Используя универсальное программное обеспечение PyroMark Design Software 2.0, Вы получаете совершенный алгоритм для полного контроля качества исследования, а также возможность переноса базы данных на любой прибор PyroMark. Используя программное обеспечение PyroMark Design Software 2.0 возможно проводить быструю обработку полученных данных и формирование базы данных. Программное обеспечение PyroMark Design Software 2.0 разрабатывалось в течение нескольких лет специалистами в области Пиросеквенирования и оптимизации ПЦР. С помощью программного обеспечения можно разрабатывать праймеры для ПЦР и секвенирования в целях генотипирования, определения количества аллелей и анализа уровня метилирования (Рис. 13) Кроме того, используя программное обеспечение PyroMark Design Software 2.0, можно определить последовательность, прошедшую бисульфитную обработку, а также выделить CpG сайты и цитозины, служащие контролем. (Рисунок 14).

Программное обеспечение для высококачественного анализа множества сайтов метилирования

При исследовании множества образцов, каждый из которых имеет несколько сайтов метилирования достаточно важным моментом является возможность проведения анализа нуклеотидных последовательностей, а также детализация исследуемых позиций. Кроме того, программное обеспечение обеспечивает значимую статистику результатов. Исследование CpG сайтов, используя PyroMark Q24 Software или PyroMark CpG SW 1.0 для PyroMark Q96 ID и PyroMark Q96 MD, обеспечивают это функционально. Стандартные вычисления включают оценку частоты метилирования, качества, оценку отклонений от ожидаемых сайтов метилирования. Результаты выводятся на экран в удобном для восприятия графическом или цифровом виде.



Рисунок 12. Исследование нуклеотидных последовательностей, с использованием программного обеспечения PyroMark Q 24 Software



Рисунок 13. Подбор праймеров для ПЦР и секвенирования, с использованием программного обеспечения PyroMark Assay Design Software



Рисунок 14. Прогнозирование бисульфитно конвертируемой последовательности, с использованием программного обеспечения PyroMark Assay Design Software.

Инструментарий PyroMark

PyroMark Q24 – небольшие габариты, большая функциональность

Прибор PyroMark Q24 позволяет одновременно секвенировать до 24 образцов. Программное обеспечение PyroMark Q24 Software поддерживает три типа тестов: количественную оценку аллелей, анализ метилирования и анализ нуклеотидных последовательностей. Таким образом, в течение нескольких минут вы можете охарактеризовать сайты метилирования ДНК, частоту аллельной встречаемости, детектировать редкие мутации, осуществить секвенирование *de novo*, протестировать маркеры, связанные со специфическими фенотипическими признаками, и исследовать мутации, вызывающие заболевания. Система PyroMark Q24 занимает минимум рабочего пространства, оптимизирует и ускоряет все этапы проведения анализа, от ПЦР до детекции нуклеотидной последовательности и количественной оценки, причем в течение рабочего дня можно проводить несколько последовательных запусков прибора. Более того, тесты, разработанные для PyroMark Q24, совместимы с другими приборами линии PyroMark большого размера, что дает возможность отработать методику исследования на небольшом приборе, а затем проводить исследования, используя больший поток образцов.

На экране прибора в режиме реального времени выводится информация о текущем процессе секвенирования. Полученные данные сразу же сохраняются на жестком диске прибора и флеш-карте. Это позволяет перемещать файлы запуска на любой компьютер с установленной копией программного обеспечения PyroMark Q24 Software для проведения анализа данных.

Кроме прибора для секвенирования и программного обеспечения, система PyroMark Q24 укомплектована вакуумной станцией пробоподготовки для получения одноцепочечной ДНК для проведения реакции Пиросеквенирования. Также система включает набор реагентов PyroMark Gold Q24 Reagents и различные тестовые наборы производства компании QIAGEN (Рисунок 15).

Система PyroMark Q24 является оптимальным решением для Вашей лаборатории, занимает небольшое рабочее пространство и позволяет решать разнообразные научно-исследовательские задачи (детекция и количественный анализ последовательности нуклеотидов при генетическом тестировании, а также эпигенетическом анализе степени метилирования). Уникальность системы PyroMark заключается в возможности сочетать надежные количественные результаты с секвенированием в течение нескольких минут. PyroMark Q24 полностью подходит для исследования и анализа редких мутаций и сайтов метилирования. Универсальная система PyroMark Q24 без проблем интегрируется в поток генетических и эпигенетических исследований.



Рисунок 15. Прибор PyroMark Q24 и вакуумная станция для пробоподготовки PyroMark Q24 Workstation - полная система для пиросеквенирования.

Инструментарий PyroMark



PyroMark ID – многофункциональность и высокая пропускная способность

Для задач, требующих большей выборки образцов, лучше всего подойдет прибор PyroMark Q96 ID. Примерами подобных исследований могут являться: идентификация микроорганизмов и типирование резистентности к лекарствам, большая выборка проб для сопоставлений уровня метилирования, филогенетические и эволюционные исследования, основанные на генетическом полиморфизме, анализ гаплотипа Y хромосомы и установление митохондриальной гетероплазмы при определении миопатических симптомов проявления болезни.

Прибор PyroMark Q96 ID обладает схожей функциональностью с PyroMark Q24. Обладая 96-луночным форматом исследования, специальным программным обеспечением для анализа метилирования и дизайна тестов, прибор PyroMark Q96 ID может выполнять любые исследовательские задачи, требующие точной информации о последовательности и количественной генетической вариации. Вдобавок, PyroMark Q96 ID взаимодействует непосредственно с PyroMark Identifire SW 1.0, используя алгоритм, оптимизированный для сопоставления информации, полученной при Пиросеквенировании, с результатами секвенирования в локальной базе данных.

К системе прилагаются аксессуары, обеспечивающие эффективную работу в 96-луночном формате. Станция для вакуумной пробоподготовки PyroMark Q96 Workstation исключает трудоемкую процедуру пипетирования, предоставляя возможность одновременного приготовления 96 образцов очищенной одноцепочечной ДНК для Пиросеквенирования (Рисунок 16).

Система PyroMark Q96 ID является идеальным решением для исследовательских задач или проведения испытаний, требующих высокой статистической достоверности, связанной с исследованием большого количества образцов.



Рисунок 16. Прибор PyroMark Q96 ID и вакуумная станция для пробоподготовки PyroMark Q96 Workstation - одновременная подготовка и анализ 96 образцов.

Инструментарий PyroMark

PyroMark Q96 MD – высочайшая пропускная способность, дополнительная чувствительность

Увеличение количества анализируемых образцов до сотен и тысяч может привести к большим финансовым затратам. Прибор PyroMark Q96, снабженный высокочувствительной детектирующей камерой, способен безошибочно секвенировать минимальное количество матрицы ДНК, при этом значительно снижается расход реагентов и, следовательно, уменьшаются затраты на исследование одного образца. Это свойство делает Пиросеквенирование экономически выгодной альтернативой любым другим высокопропускным секвенирующим или детектирующим системам.

Прибор также может быть доступен в полностью автоматизированном формате – PyroMark Q96 MD Automated. До 10 планшет могут храниться в интегрированном самоукладчике планшет, который посредством роботизированной руки перемещает их в реакционную камеру. Планшеты идентифицируются по штрих-коду, позволяя автоматически проследить образцы и полученные результаты. Можно просто загрузить желаемое количество 96-луночных планшет с образцами в автоматический модуль и запустить процесс (Рисунок 17).

Прибор PyroMark Q96 MD обладает схожими компонентами с системой PyroMark Q96 ID: программное обеспечение для количественного подсчета частоты аллельной встречаемости, генотипирования и анализа метилирования. Возможность детектирования и количественной оценки вариаций фактических последовательностей вместе с увеличенной чувствительностью и автоматическим режимом делают PyroMark Q96 MD прибором, полностью подходящим для высокопроизводительных проектов по секвенированию типов полиплоидных растений и разработки фармакогенетических маркеров, или в проектах, требующих чувствительного секвенирования, таких как анализ метилирования в образцах с малыми концентрациями ДНК.



Рисунок 17. Прибор PyroMark Q96 MD и вакуумная станция для пробоподготовки PyroMark Q96 Workstation - одновременная подготовка и анализ 960 образцов.

Готовые решения для всех этапов работы с системой PyroMark

Программное обеспечение для создания исследования PyroMark Assay Design Software

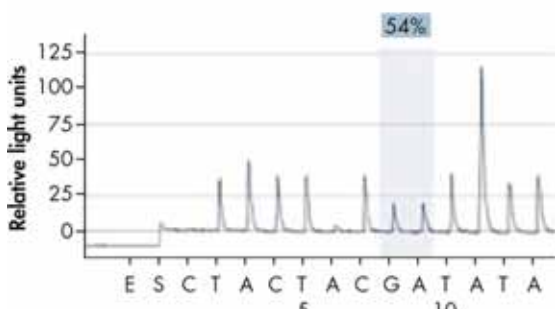
Набор для ПЦР PyroMark PCR Kit

Вакуумная станция прободготовки PyroMark Vacuum Workstation

Прибор PyroMark Instrument

Программное обеспечение PyroMark Software

B7 TACTCRTAAATACRACRCTTATATCTTAAAAAAAATTTAC



B6 TACTCRTAAATACRACRCTTATATCTTAAAAAAAATTTAC

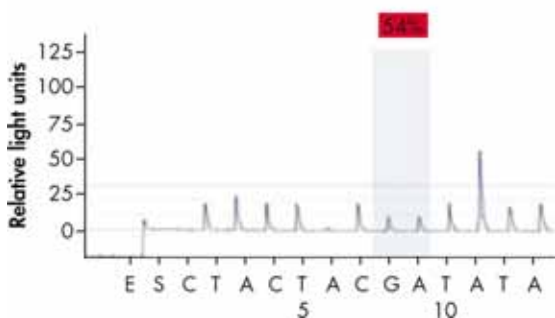


Рисунок 18. Улучшенные пики Пирограммы, полученные при использовании набора PyroMark PCR Kit. Демонстрация результатов пиросеквенирования, полученных при амплификации ДНК по стандартным протоколам ПРЦ (внизу) и используя набор PyroMark PCR Kit (наверху). Усиливаются не только пики, но и количественный подсчет аллелей осуществляется более достоверно. Также идентифицируются прошедшие внутренние контроли (синяя полоса) при процентном подсчете частоты на верхней Пирограмме и непрошедшие контроли (красная полоса) на нижней Пирограмме.

Наличие оптимизированного продукта для каждого этапа исследования

Компоненты продуктовой линейки PyroMark созданы для повышения эффективности и качества проведения исследований. Для каждого этапа исследования разработаны наборы реагентов, программное обеспечение и инструменты для прободготовки, оптимизированные для Пиросеквенирования.

Используя Программное обеспечение, разрабатывают схему эксперимента (вносят последовательности ПЦР-праймеров и праймеров для проведения секвенирования выбранного участка ДНК), далее амплифицированный фрагмент ДНК анализируют. Компания QIAGEN разработала набор PyroMark PCR kit, который содержит все реагенты для ПЦР и способствует получению высококачественных образцов биотинилированной ДНК, которые гарантируют оптимальные пики на Пирограмме (Рисунок 18).

Экстрагированные матрицы ДНК образцов одновременно обрабатываются при помощи вакуумной станции прободготовки PyroMark vacuum workstation. Биотинилированные ампликоны связываются с частицами сефарозы. Посредством нескольких серий шагов, в процессе которых осуществляется промывка вакуумных проб в тщательно приготовленных растворах, осуществляется денатурация и промывка ампликонов, в результате остаются одноцепочечные ДНК, связанные с сефарозными частицами. Затем образцы ДНК переносятся в специальные 24- и 96-луночные планшеты, содержащие праймеры для секвенирования. Далее проводят секвенирование.

После окончания процесса Пиросеквенирования, используя универсальные приложения PyroMark и дополнительное программное обеспечение, проводят анализ полученных последовательностей.

Независимо от того, какой формат системы PyroMark выбран для проведения научной работы в области генетических и эпигенетических исследований, вы получаете надежный и мощный инструмент, отвечающий стандартам качества компании QIAGEN.

Информация для заказа

Продукт	Описание	Каталожный номер
PyroMark Q24	Прибор для генетического анализа	9001671
PyroMark Q96 ID	Прибор для генетического анализа	9001672
PyroMark Q96 MD	Прибор для генетического анализа	9001673
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Вакуумная станция для пробоподготовки для PyroMark Q24	9001518
PyroMark Q96 Vacuum Workstation	Вакуумная станция для пробоподготовки для PyroMark Q96	9001529
PyroMark Q24 Plate (100)	Микропланшеты для PyroMark Q24	979201
PyroMark Q24 Plate Holder	Держатель для микропланшет Pyromark Q24	979205
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Картридж для прибора PyroMark Q24	979202
PyroMark Q24 Vacuum Prep Troughs (12)	Ванночки для вакуумной станции PyroMark Q24	979206
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Фильтры для вакуумной станции для пробоподготовки PyroMark Q24	979010
PyroMark Q96 HS 96 Dispensing Tip Holder	Держатель для дозирующего устройства PyroMark Q96	9019075
PyroMark Q96 HS Capillary Tip	Капиллярное дозирующее устройство PyroMark Q96	979104
PyroMark Q96 HS Capillary Tip Holder	Держатель для капиллярного дозирующего устройства PyroMark Q96	9019076
PyroMark Q96 HS Nucleotide Tip	Дозирующее устройство для нуклеотидов PyroMark Q96	979103
PyroMark Q96 HS Plates	Микропланшеты PyroMark Q96	979101
PyroMark Q96 HS Q96 Reagent Tip	Дозирующее устройство для реагентов PyroMark Q96	979102
PyroMark Q96 HS Sample Prep Thermoplate	Держатель для планшет PyroMark Q96	9019070
PyroMark Q96 Vacuum Prep Trough (5)	Ванночки для вакуумной станции PyroMark Q96	979011
PyroMark Q96 Cartridge	Картридж для прибора PyroMark Q96	979004
PyroMark Q96 Plate	Микропланшеты PyroMark Q96	979001
PyroMark Q96 Plate Low	Микропланшеты (низкие) PyroMark Q96	979002
PyroMark Q96 Sample Prep Thermoplate Low	Держатель для низких планшет PyroMark Q96	9019070
PyroMark Q96 Sample Prep Tool Cover	Крышки для пробоподготовки PyroMark Q96	979003
PyroMark Binding Buffer	Связывающий буфер	979006
PyroMark Denaturation Sol.	Денатурирующий буфер	979007
PyroMark Annealing Buffer	Буфер для отжига	979009
PyroMark Wash Buffer	Промывочный буфер	979008
PyroMark Control Oligo	Контрольный нуклеотид	979203
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24)	Набор реагентов PyroMark Gold Q24	970802
PyroMark Gold Q96 CDT Reagents	Набор реагентов PyroMark Gold Q96 CDT Reagents	972824
PyroMark Gold Q96 Reagents (5 x 96)	Набор реагентов PyroMark Gold Q96 Reagents	972804
PyroMark Gold Q96 Reagents (50 x 96)	Набор реагентов PyroMark Gold Q96 Reagents	972807
PyroMark Gold Q96 SQA Reagents	Набор реагентов PyroMark Gold Q96 SQA Reagents	972812
PyroMark Assay Design SW 2.0	Программное обеспечение для PyroMark	9019077
PyroMark CpG SW	Программное обеспечение для PyroMark	9019067
PyroMark IdentiFire SW 1.0	Программное обеспечение для PyroMark	9019087



ООО «ИнтерЛабСервис» —
официальный дистрибьютор продукции QIAGEN в России

Россия, 119021, г. Москва, Олсуфьевский пер, д. 8, стр. 1
тел.: (495) 664 2884, факс: (495) 664 2889
e-mail: qiagen@interlabservice.ru
www.interlabservice.ru