



Система электрофореза на микрочипах для анализа ДНК / РНК MCE™ -202 MultiNA

Автоматическая система для анализа размера ДНК / РНК с оптимизированными наборами реагентов.

Позволяет проводить качественный (определение размера) и количественный анализ продуктов полимеразной цепной реакции, фрагментов рестрикции ДНК, синтетических олигонуклеотидов; определение уровня экспрессии генов, идентификацию и количественный анализ транскриптов, контроль качества синтезированной *in vitro* матричной РНК, контроль чистоты выделенной РНК и т.п.

Система электрофореза с микрочипом для анализа ДНК / РНК может быстро идентифицировать виды мяса.

Применение системы MCE™ -202 MultiNA позволяет существенно снизить стоимость одного анализа по сравнению со стоимостью традиционных анализов методом электрофореза в агарозном геле или методом капиллярного электрофореза.

Конструкция и материал микрочипа позволяют использовать его для нескольких тысяч анализов (~ 3600), при этом используется крайне незначительное количество расходных материалов. С использованием одного микрочипа полный цикл анализа ДНК составляет около 4 мин.

Для увеличения производительности в прибор может быть установлено до четырех микрочипов для параллельной работы. В этом случае время одного анализа сокращается до 75 секунд.

Оптимальная конфигурация капилляров микрочипа и специально подобранный состав буферного раствора обеспечивают превосходные характеристики электрофоретического разделения нуклеиновых кислот. Благодаря малой длине электрофоретического канала и его оптимальной форме достигается непревзойденная на сегодняшний день скорость электрофоретического разделения.

Флуориметрический детектор с фотоумножителем и источником возбуждения флуоресценции на основе светодиода обеспечивает примерно 10-кратное увеличение чувствительности по сравнению с традиционным окрашиванием бромистым этидием. Используемые флуоресцентные красители, такие как SYBRgreen II и SYBRgold, абсолютно безвредны для здоровья в отличие от традиционного бромистого этидия.

Оптимизированные наборы реагентов (четыре типа для анализа ДНК разного размера и один тип для анализа РНК), обеспечивают высокое разрешение и высокую чувствительность, например, для проверки мутаций при редактировании генома и определении генотипа.

Внутренние маркеры молекулярного веса уже включены в наборы реагентов и используются при каждом анализе. Одновременный электрофорез внутреннего маркера обеспечивает высокую надежность и воспроизводимость анализа.



Chip stage



Reagent holder

Sample stand and ladder



Благодаря автоматизированной системе пробоподготовки количество ручных операций сведено к минимуму. График анализа может включать до 120 проб, прибор может принимать до 108 проб (96 + 12 дополнительных). Скорость обработки анализа - 255 с при использовании одного микрочипа; 75 с при использовании четырех микрочипов; (время начальной и конечной промывки микрочипа не включено).

Технические характеристики

Штативы для образцов	96 пробирок для ПЦР (2 мл); 1х96-луночный планшет для ПЦР; 8 стрипов на 12 пробирок для ПЦР; 12 стрипов на 8 пробирок для ПЦР; (+12 дополнительных ячеек для установки пробирок с образцами)
Минимальный объем образца	5 мкл в режиме смешивания реагентов на микрочипе; 6 мкл при предварительном смешивании с реагентами
Микрочип	Кварцевый, электрофоретический канал длиной 23 мм, интегрированные платиновые электроды. Может быть одновременно установлено до 4 микрочипов
Предварительная обработка	Автоматический ввод образца в микрочип, автоматическое заполнение электрофоретического канала буферным раствором, автоматическая промывка микрочипа до и после измерения
Прикладываемое напряжение	До 1,5 кВ; максимальный ток 250 мкА
Время анализа	255 с при использовании одного микрочипа; 75 с при использовании четырех микрочипов; (Время, необходимое для начальной и конечной промывки микрочипа не включено)
Детектирование	Флуоресцентный детектор с источником возбуждения флуоресценции при помощи светодиода (470 нм)
Диапазон измерения размеров нуклеиновых кислот	25–500 нг (набор DNA-500); 100–1000 нг (набор DNA-1000); 100–2500 нг (набор DNA-2500); До 28S rRNA (~5,0 knt) (Набор RNA)
Разрешение	5 нг (25 – 100 нг); 5% (100 – 500 нг); 10% (500 – 1000 нг); 20% (1000 – 2500 нг)
Точность определения размера нуклеиновых кислот	± 5 нг (25 – 100 нг); ± 5% (100 – 500 нг); ± 15% (DNA-100, DNA-2500)
Максимально возможная концентрация соли в образце	Анализ ДНК: 10 мМ Tris-HCl + 125 мМ NaCl или KCl; Анализ РНК: 10 мМ Tris-HCl + 1 мМ EDTA
Предел обнаружения	Анализ ДНК: 0,2 нг/мкл (в 10 мМ Tris-HCl + 50 мМ KCl + 1,5 мМ MgCl ₂); Анализ РНК: 5 нг/мкл (общая РНК), 25 нг/мкл (матричная РНК в 10 мМ Tris-HCl + 1 мМ EDTA)
Диапазон измеряемых концентраций	Анализ ДНК: 0,5–50 нг/мкл (в 10 мМ Tris-HCl + 50 мМ KCl + 1,5 мМ MgCl ₂); Анализ РНК: 25–500 нг/мкл (общая РНК), 25–250 нг/мкл (матричная РНК в 10 мМ Tris-HCl + 1 мМ EDTA)
Точность определения концентрации	Анализ ДНК: ± 30% (в 10 мМ Tris-HCl + 50 мМ KCl + 1,5 мМ MgCl ₂)
Воспроизводимость определения концентрации	Анализ РНК: коэффициент вариации ~ 20%
Размеры	415 x 545 x 508 мм (Ш x Г x В)
Вес	43 кг



Работа системы электрофореза на многоразовых микрочипах MCE ® -202 MultiNA полностью отличается от техники электрофореза в агарозном геле, и от работы систем одноразовыми системами электрофореза с одноразовыми микрочипами.

Маркеры размера автоматически корректируют результаты электрофореза для автоматического предсказания и количественного определения размера. Пользователи могут выполнять автоматический или ручной повторный анализ своих данных.

Программное обеспечение

Программное обеспечение с дружелюбным интерфейсом и большим количеством функций максимально упрощает проведение исследования. Оператору достаточно загрузить образцы и реагенты в прибор, задать в программе желаемую последовательность анализа образцов и кликнуть по иконке «Старт» на экране компьютера. Все остальное, включая обработку электрофореграмм, прибор выполнит в автоматическом режиме. Каждый этап анализа наглядно отображается на экране компьютера. Результаты анализов могут быть легко экспортированы в формат .csv для последующей обработки при помощи стороннего программного обеспечения.

Средство просмотра позволяет параллельно отображать данные анализа за разное время и дату. Электрофореграмма разделения отображается в реальном времени анализа. Даже во время текущего анализа возможен просмотр уже полученных результатов анализа завершённых образцов.

Предоставляются расширенные функции эксплуатации и технического обслуживания, включая функции проверки производительности анализа.

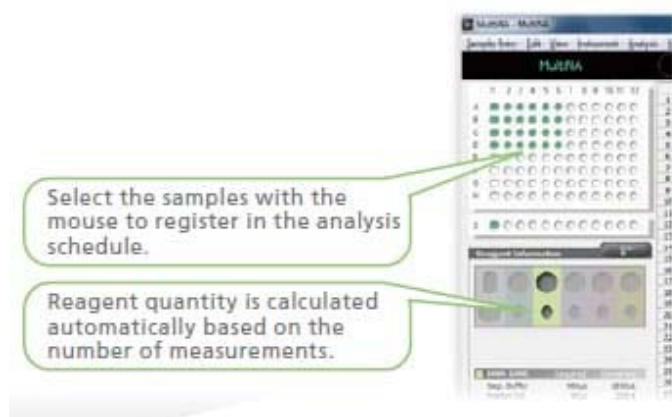
Постоянно доступны: список графика анализа и дисплей состояния чипа.

Начните анализ всего за три шага

Чрезвычайно простое управление. После создания алгоритма анализа просто загрузите образцы и реагенты и нажмите кнопку «Пуск».

Зарегистрируйте алгоритм анализа.

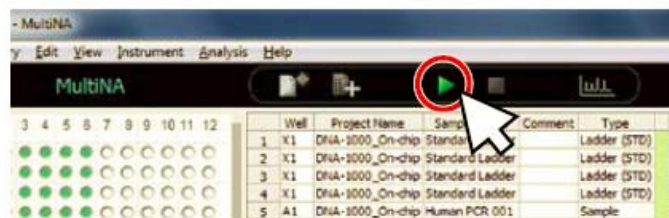
Единый алгоритм анализа позволяет проводить анализ с использованием нескольких наборов реагентов.



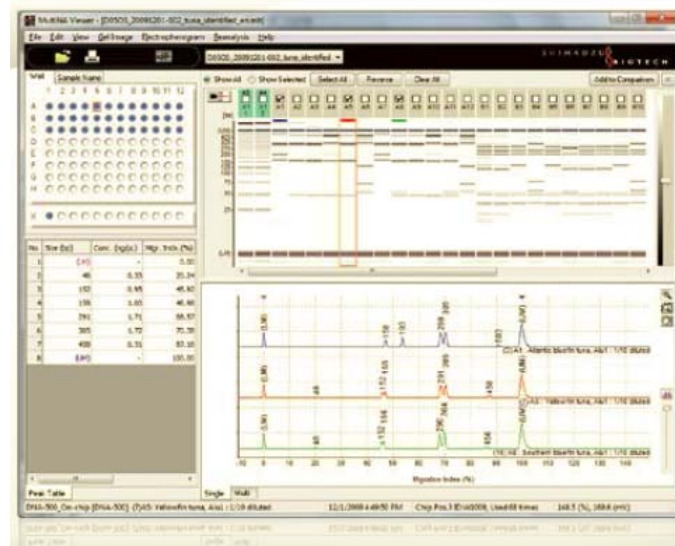
Загрузите образцы и реагенты.



Нажмите кнопку "Пуск".



Отображение результатов анализа





Проверка качества прямого секвенирования ПЦР

Прямое секвенирование ПЦР - это метод, при котором вместо клонирования продуктов амплификации, полученных в результате реакции ПЦР, они используются непосредственно в качестве матрицы для определения последовательности оснований. Это очень эффективный метод, поскольку он позволяет быстро получить информацию о базовой последовательности и снижает влияние ошибок захвата базы после клонирования.

Однако эти результаты могут сильно различаться в зависимости от ситуации амплификации после ПЦР. Чтобы увеличить этот показатель успеха, необходимо проверить чистоту (качество и количество) продуктов ПЦР до реакции секвенирования. Эта проверка традиционно проводилась с помощью электрофореза в агарозном геле.

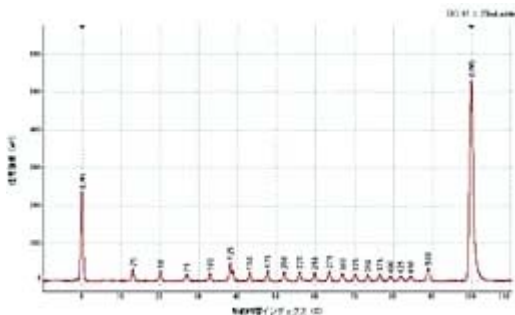
Бывают случаи, когда данные о последовательности, полученные при анализе последовательности, указывают на возможность наличия близкородственных субстратов для реакции, даже если оказывается, что существует только один целевой продукт ПЦР. Одна из возможных причин этого - ограниченная чувствительность электрофореза в агарозном геле. С помощью этого метода трудно выявить наличие следовых количеств побочных продуктов реакции ПЦР среди основных продуктов реакции.

С помощью MultiNA концентрацию можно рассчитать по площади пика на электрофореграмме. Этого значения достаточно для использования в последовательной реакции. Таким образом, MultiNA чрезвычайно полезен для проведения анализов чистоты продуктов ПЦР в качестве важного компонента процесса прямого секвенирования ПЦР.

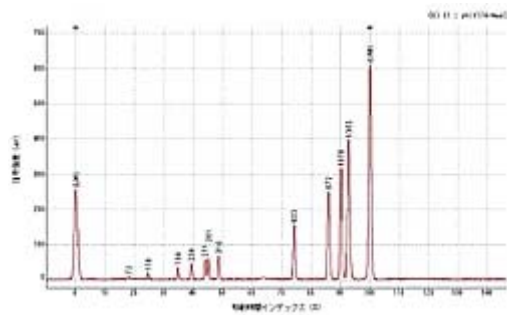
Анализ приложений с использованием MCE™ -202 MultiNA:

Технология микрочипов BioMEMS от Shimadzu обеспечивает высокоскоростной анализ, высокую производительность разделения и воспроизводимость. Разработанные буфер разделения, аналитический метод и технология автоматизации позволяют преодолеть небольшую эффективную длину разделения. Ниже показаны примеры, демонстрирующие улучшенные аналитические характеристики.

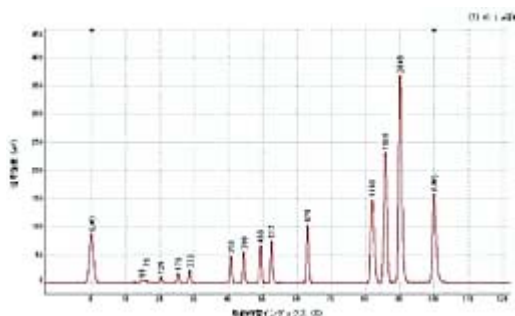
Анализ с использованием набора DNA-500/1000/2500/12000 Коррекция электрофоретического разделения и построение калибровочной кривой по размеру выполняются автоматически с помощью лестницы и 2 маркеров внутреннего стандарта (LM и UM на рисунке). * Красный: лестница ДНК.



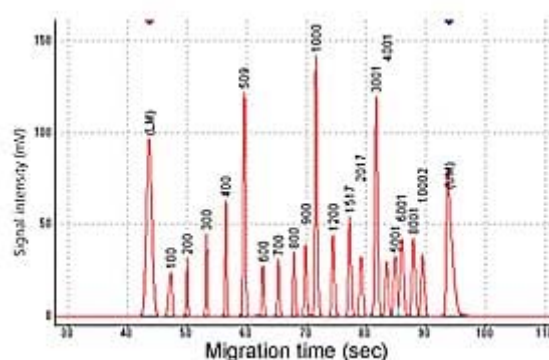
Пример лестничного анализа ДНК-500



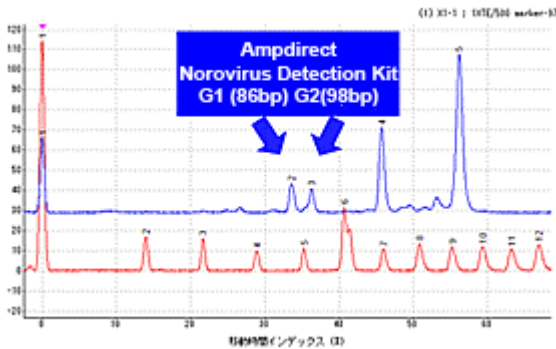
Пример лестничного анализа ДНК-1000



Пример лестничного анализа ДНК-2500



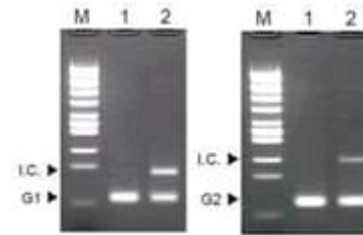
Пример лестничного анализа ДНК-12000



Анализ с использованием набора ДНК-500

Помимо проблем по приготовлению 4% агарозного геля, G1 и G2 не могут быть четко разделены. С MultiNA было достигнуто разделение базовой линии.

Красный: лестница ДНК 25 п.н. (Invitrogen)
Синий: набор для обнаружения норовирусов G1, G2 (Shimadzu)



Набор реактивов ДНК-12000

Анализ с использованием набора РНК

Образец: RNA6000 Ladder (Ambion) Конечная концентрация 25 нг / м 2

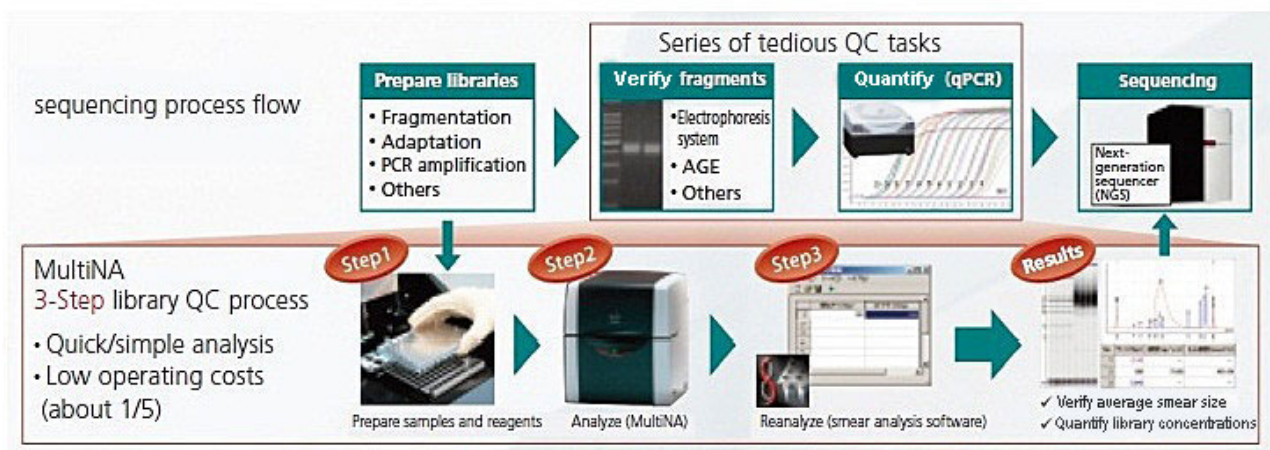
Контроль качества для секвенирования ДНК следующего поколения

Благодаря технологическому прогрессу в секвенаторах следующего поколения они используются для более широкого круга приложений, например для секвенирования de novo или для анализа мутаций, экзонов и экспрессий. Кроме того, можно выбрать модель на основе пропускной способности, необходимой для анализа и обработки данных, что быстро увеличило их использование. Однако для получения хороших результатов секвенирования, независимо от приложения или модели, необходимо проверить распределение размеров и концентрации в библиотеке NGS. Следовательно, контроль качества (КК) этой информации имеет важное значение при использовании систем NGS.

Необходимые процессы, от подготовки библиотеки до контроля качества, включали в себя ряд утомительных ручных операций. Ниже описывается пример анализа секвенирования РНК мыши, который решает эту проблему с помощью системы автоматического электрофореза MCE-202 MultiNA для контроля качества библиотеки NGS.

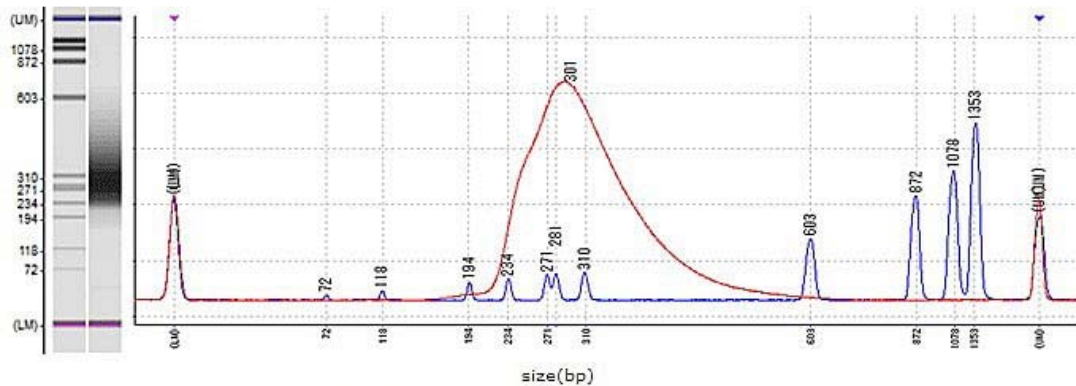
Последовательность процесса и диапазон приложений MultiNA

Во время процесса контроля качества библиотеки NGS программное обеспечение для анализа мазков MultiNA * можно использовать для расчета предполагаемого среднего размера библиотеки, концентраций и мольных концентраций.





Технологический процесс NGS и диапазон приложений MultiNA в библиотеке контроля качества



Left: Gel image Right: Electropherogram
Red: NGS library Blue : ϕ X174 DNA/HaeIII

Пример электрофореза библиотеки NGS

DNA-12000 reagent kit

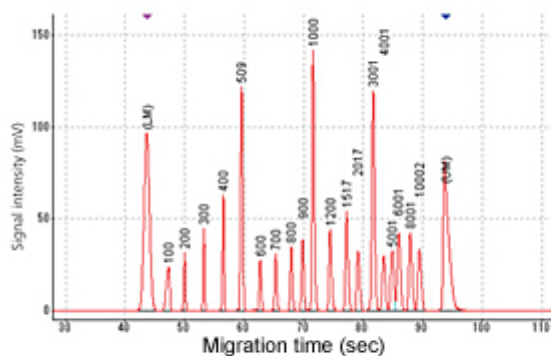
Подходит для исследования клонирования гена и экспрессии генов

MultiNA, который реализует более простой, быстрый и более чувствительный электрофорез, чем агарозный гель, позволяет проводить анализ размеров ДНК в широком диапазоне до 12 kbp.



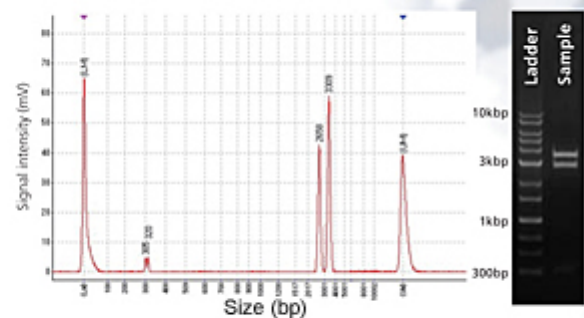
Применения:

- Контроль размеров ДНК плазмид which гигестированных энзимом рестриктором.
- Контроль размера и присутствия / отсутствия клонированного гена Plasmid DNA (insert check)
- Контроль размера и присутствия / отсутствия amplified long PCR product from a gene.



Example of recommended ladder analysis
2-LogDNA_Ladder (New England Biolabs)

MultiNA can clearly and easily analyze a wide range of DNA fragments, such as Restriction enzyme processing products.



Electrophoretic example of restriction enzyme processing plasmid by MultiNA and agarose gel (1 %)

Sample and gel picture: Osaka University Immunology Frontier Research Center, office of combined program on microbiology and immunology, Yoshiko Murakami, M.D., Ph.D.



Обзор

Описание	DNA-12000 Kit
P/N	292-36600-91
Состав	Буфер разделения на 1000 анализов, маркерный раствор на 1000 анализов, Емкость для буфера, виалы, инструкция
Температура хранения	Separation buffer: 0т 2 до 8 °C Marker solution: при -20 °C



Набор не содержит флуоресцентных красителей и ладдеров.

Скоропортящийся продукт. Необходимо использовать сразу после вскрытия.

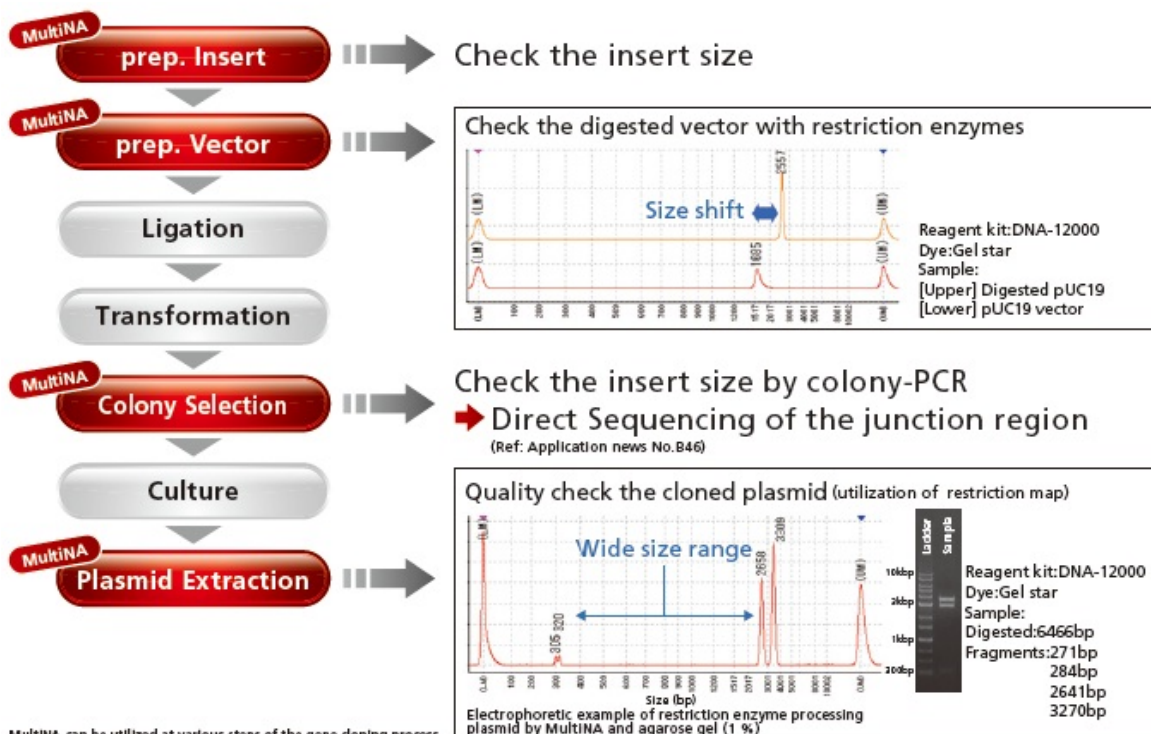
Спецификация

Size range	100 - 12,000 bp
Sizing resolution	10 % (100 - 1,000 bp), 20 % (1,000 - 12,000 bp)
Sizing accuracy	±15 %
Quantitative range	0.5 - 50 ng/μL
Quantitative accuracy	±40% (The quantitative accuracy was verified from 200 - 12000 bp.)
Maximum salt concentration	125mM KCl

Вышеприведенная спецификация была проверена при помощи стандартных образцов в условиях анализа установленных корпорацией Shimadzu.

Для использования совместно с DNA-12000 kit требуется ПО MCE-202 MultiNA software Ver. 1.10 или более поздняя версия ПО.

MultiNA: Применение для клонирования генов





Другие наборы реагентов для MultiNA

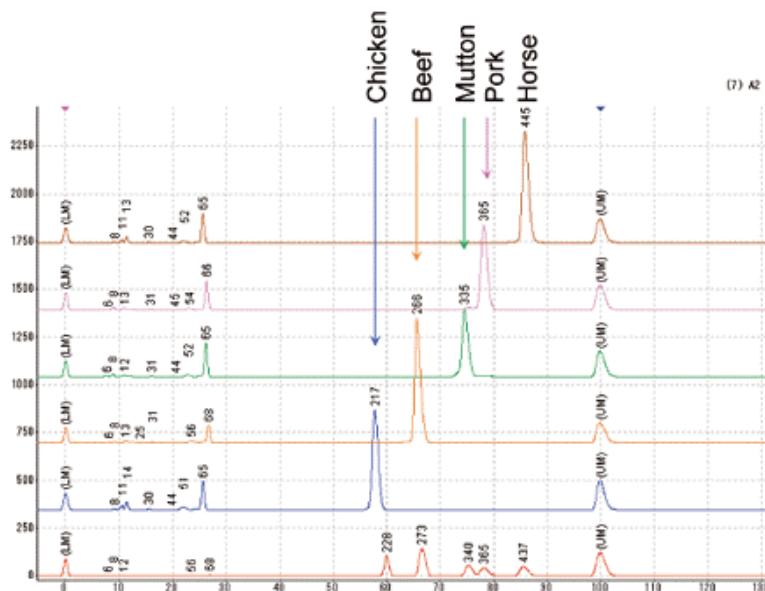
Описание	Диапазон разделения
DNA-500 Kit (1,000 analyses)	25 - 500 bp
DNA-1,000 Kit (1,000 analyses)	100 - 1,000 bp
DNA-2,500 Kit (1,000 analyses)	100 - 2,500 bp
RNA Kit (1,000 analyses)	Max. 28rRNA (5.0 knt)



Определение типа мяса с помощью системы анализа ДНК / РНК

Система электрофореза с микрочипом для анализа ДНК / РНК может быстро идентифицировать виды мяса. Были проанализированы курица, говядина, баранина, свинина и конина.

Для различения соответствующих видов мяса были четко разделены следующие фрагменты: 218 п.н., полученные из курицы, 268 п.н., полученные из говядины, 331 п.н., полученные из баранины, 359 п.н., полученные из свинины, и 430 п.н., полученные из конины.



Режим анализа : Премикс ДНК-500

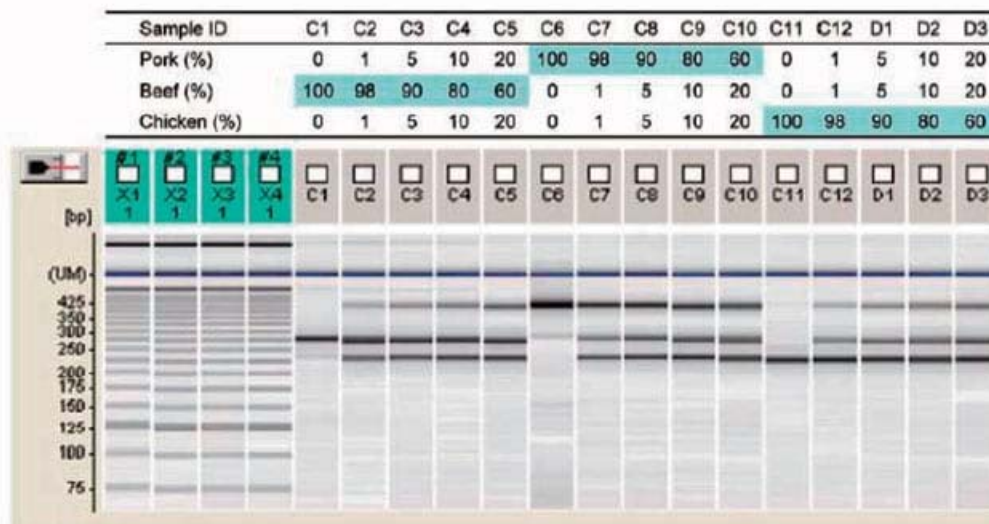


Fig. 2 Analytical Results of Multiplex PCR Products of Three Meats at Various Mixing Ratios

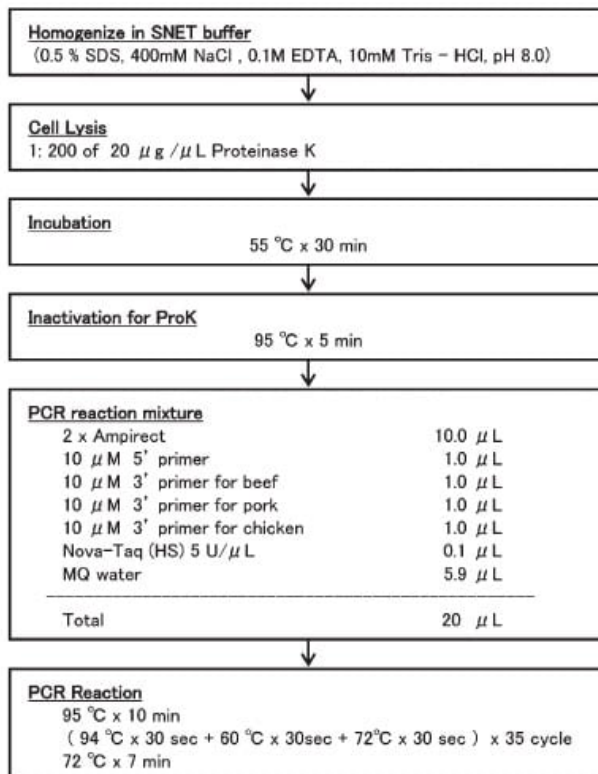
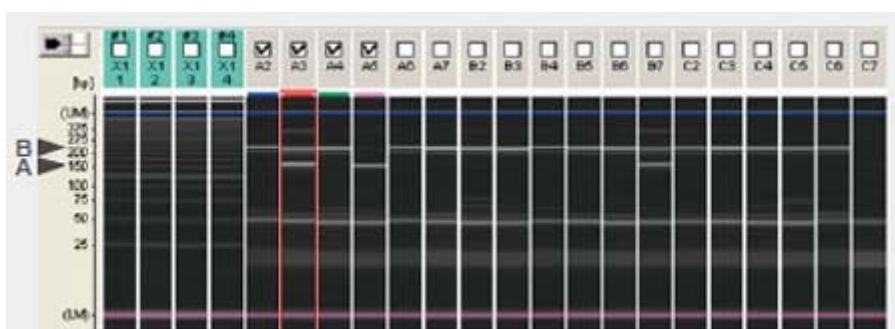


Fig. 3 Sample Preparation and Reaction Conditions

Примеры SNP-типирования лекарственно-устойчивого гена с помощью электрофореза и прямой ПЦР крови с использованием реагента для амплификации ДНК

Фармакогеномика (PGx) относится к изучению эффективности лекарств и прогнозированию побочных эффектов на основе генетической информации. Ожидается, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в последовательности генома найдут применение в качестве фармакогеномных биомаркеров. В настоящее время проводятся исследования для определения их эффективности в прогнозировании побочных эффектов лекарств, таких как противораковые агенты, и для разработки лекарств, адаптированных к индивидуальным пациентам. **Пример типирования SNP представлен ниже.**

Ген ABC11 принадлежит к семейству генов-переносчиков АТФ-связывающих кассет. Он локализуется на клеточной мембране. Известно, что это устойчивый к лекарствам ген, который выводит вещества из клетки за пределы клетки. Ниже показаны результаты оценки SNP для этого гена с помощью прямой ПЦР крови с использованием реагента для амплификации ДНК Ampdirect Plus и системы электрофореза MultiNA Microchip для анализа ДНК / РНК .



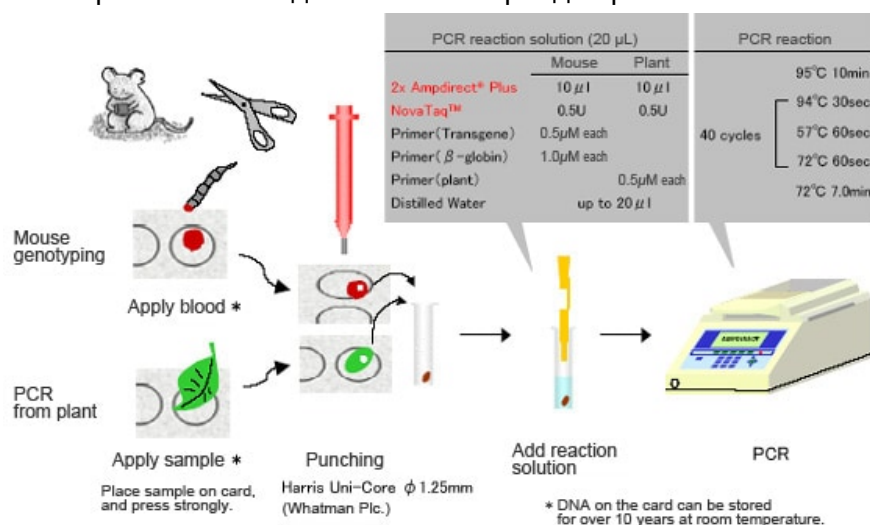
Типирование SNP гена ABC11 с использованием MultiNA (гелевое изображение)

В отличие от обычного метода ПЦР-ПДРФ, который исследует длины фрагментов ДНК, полученные в результате амплификации ПЦР с последующей реакцией расщепления, специфичной для последовательности, путем расщепления рестрикционными ферментами, этот метод позволяет типировать SNP с помощью одной реакции ПЦР и проводить анализ электрофореза в пробирке. Это удобный и экономичный метод типирования SNP, подходящий для анализа нескольких образцов.

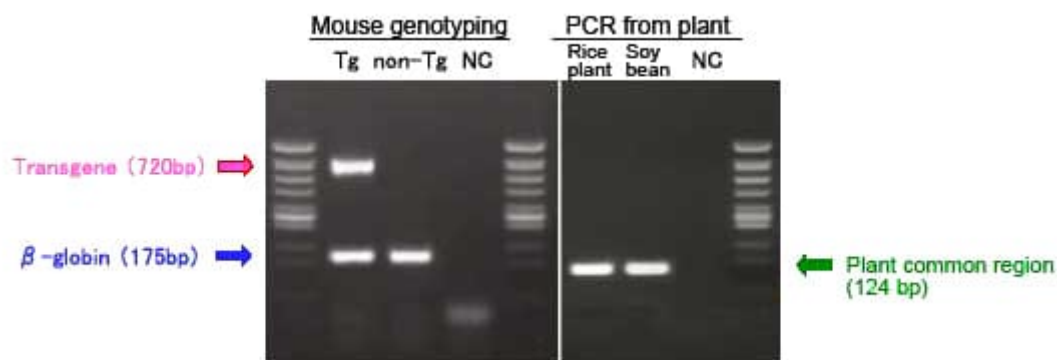
Генотипирование

Генотипирование мышей и растений с использованием карт FTA™

Простой ПЦР проводили с использованием комбинации Ampdirect® , чтобы устранить очистку ДНК и FTA® карты производства компании Whatman. Эта комбинация значительно снижает усилия, необходимые для генотипирования мышей с нокаутом и трансгенных мышей, а также для генотипирования растений, а также образец ДНК можно хранить на карте в течение длительного периода при комнатной температуре.



Тестовый поток



Кровь и ткани животных содержат большое количество веществ, подавляющих ферментативные реакции. Следовательно, для анализа ДНК с помощью ПЦР требуется очистка ДНК от образца.

Реагент для амплификации ДНК Ampdirect Plus (буфер для ПЦР) ограничивает действие ингибиторов ПЦР в образце, позволяя проводить ПЦР на таких образцах, как кровь, ткани животных / растений и SDS без очистки ДНК.

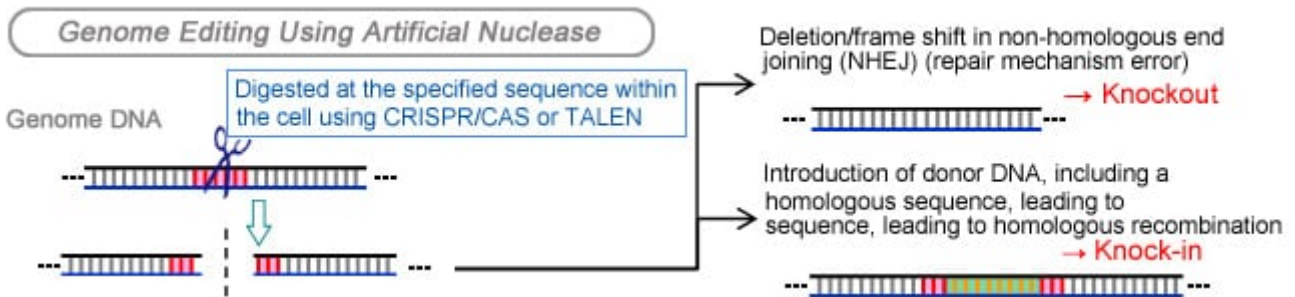
Генетический анализ нокаутных животных

Нокаутные животные определяются как животные, у которых последовательность, кодирующая целевой ген, была искусственно удалена. Их анализируют, чтобы сравнить их генетические функции с нормальной популяцией и создать модельных животных с заболеваниями, вызванными отсутствием генов.

Подтверждение генетического нокаута с помощью инструмента редактирования генома

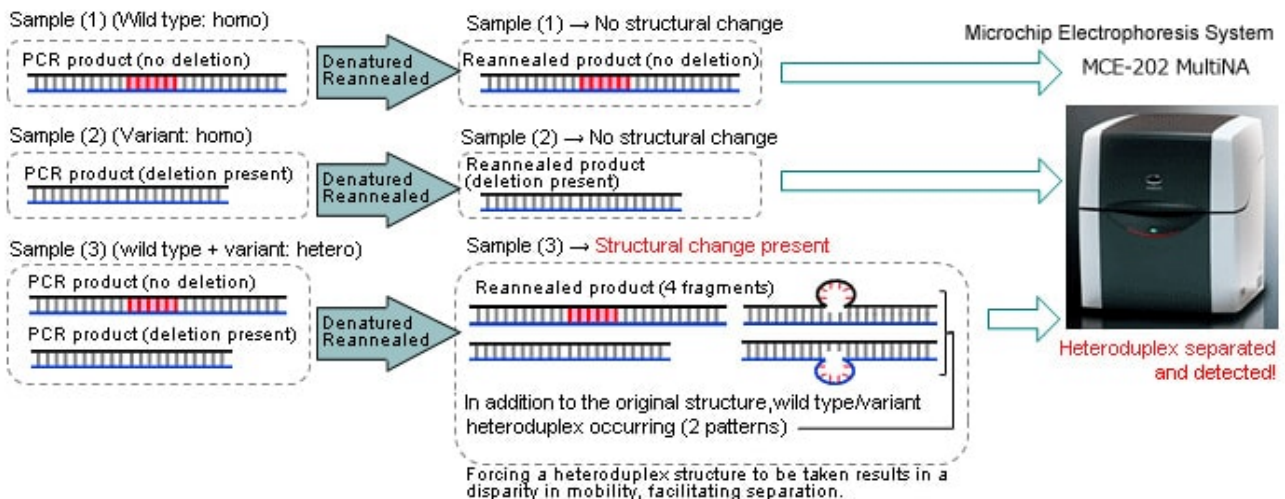
Появление инструментов редактирования генома, таких как CRISPR / CAS и TALEN, позволило удалять и вставлять последовательности с помощью метода, который намного проще, чем обычно используемые. Однако подтверждение после редактирования с помощью секвенирования ДНК было проблематичным и требовало как времени, так и денег.

Ниже приведен пример чрезвычайно простой процедуры с использованием системы электрофореза микрочипа MCE-202 MultiNA для анализа ДНК / РНК, который подтверждает наличие или отсутствие делеции или вставки, происходящей в целевом гене.



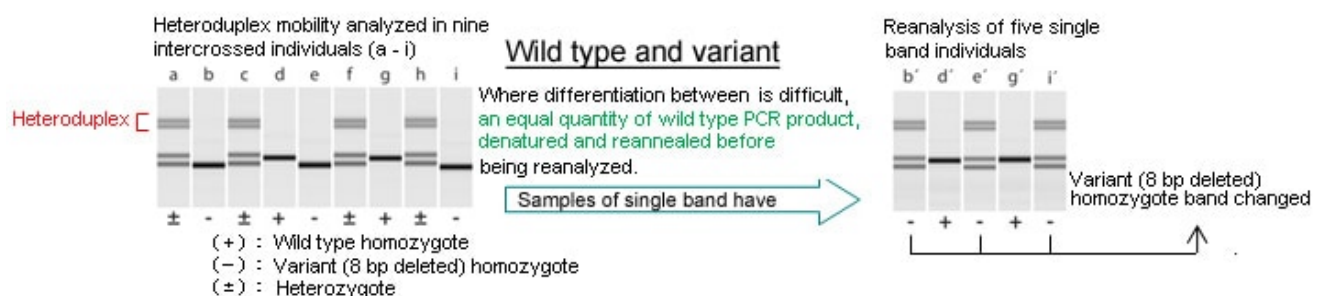
Принципы / методы анализа

После редактирования генома область, включающая удаленную точку, амплифицируется с помощью ПЦР. Как показано ниже, продукты ПЦР денатурируют, а затем повторно отжигают с образованием гетеродуплекса. Структурное изменение приводит к другому паттерну миграции, который измеряется MultiNA для подтверждения наличия делеции. Метод имеет дополнительное преимущество, позволяющее идентифицировать короткие делеции, по которым сложно определить разницу в длине фрагментов.



Пример анализа

Идентификация гомо / гетерозиготного варианта, введенного с помощью латтипов TALEN Medaka Oryzias (гетеровариант), была скрещена с вариантом, введенным TALEN (с делецией 8 п.н.), и ПЦР была проведена в области делеции полученной популяции, после чего подвижность гетеродуплекса была проанализирована с использованием MultiNA.



Генотипирование крыс по крови с помощью Ampdirect

Ampdirect противодействует ингибиторам ПЦР, таким как белок и сахара, облегчая прямую ПЦР из образцов, в том числе из неочищенного состояния, без необходимости уточнения ДНК-матрицы. Ниже мы представляем пример быстрого генотипирования крови крысы, нанесенной на карту FTA®, с использованием Ampdirect и MultiNA.

Пример анализа

SER (крысы со спонтанной эпилепсией) являются модельными животными для изучения эпилепсии человека, которая вызывает тяжелые абсансные припадки и тонические судороги. SER были разработаны в Институте лабораторных животных Высшей школы медицины Киотского университета путем гибридизации генов двух мутантных штаммов крыс с тремором и крысами, которые являются гомозиготными по мутациям тремора (tm) и zitter (zi).

Мутация tm представляет собой делецию генома (примерно 200 т.п.н.) в гене Aspa (аспартоацилазы), в то время как zi представляет собой делецию 8-пар оснований в гене Atrn.(аттрактин) ген. Штамм поддерживается спариванием гомозиготы zitter гомозиготы с тремором гетерозиготой. Эти недостатки должны быть обнаружены, чтобы выбрать родительских крыс для создания следующего поколения.

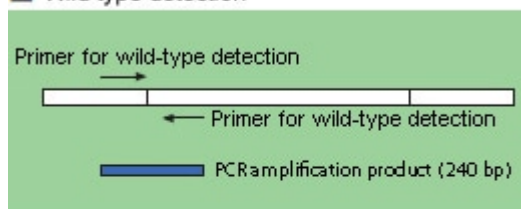
Из двух мутантных генов мутация tm представляет собой длинную делецию размером примерно 200 т.п.н., и проводится мультиплексная ПЦР с использованием двух пар праймеров для обнаружения наличия или отсутствия этого дефицита.

Одна пара предназначена для обнаружения дикого типа, при котором амплификация выполняется с использованием праймеров, которые отжигаются в этой области делеции, что приводит к продукту амплификации ПЦР только в том случае, если делеции не существует.

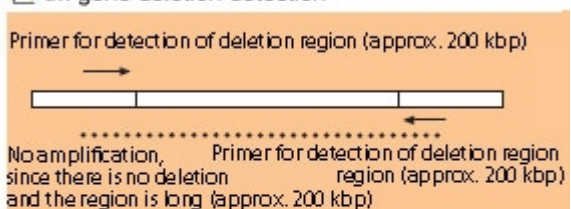
Другая пара для обнаружения делеции гена tm подвергается отжигу по области, содержащей делецию, в результате чего продукт амплификации ПЦР (приблизительно 240 п.н.) получается только в том случае, если существует делеция. Если удаления нет,

1) Rat without deletion

■ Wild type detection

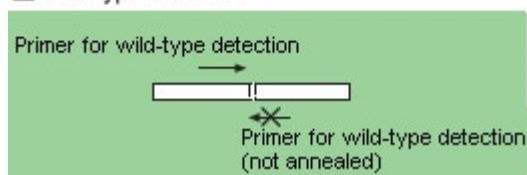


□ tm gene deletion detection

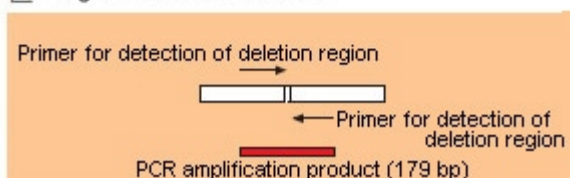


2) Rat with deletion

■ Wild type detection



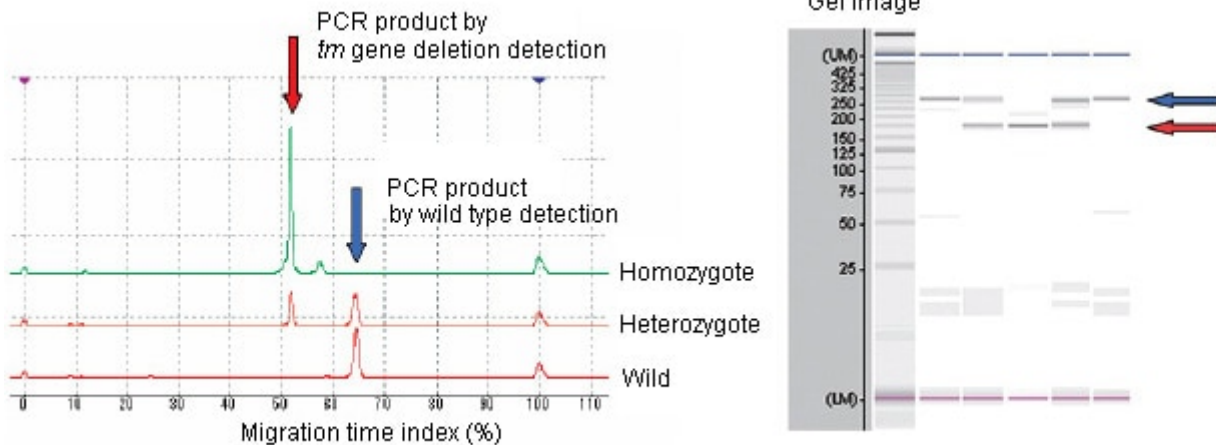
□ tm gene deletion detection



Это можно кратко изложить в таблице ниже.

	■ PCR amplification product by wild type detection	■ PCR amplification product by tm gene deletion detection
Wild	○ Detected	— Not detected
Homozygote	— Not detected	○ Detected
Heterozygote	○ Detected	○ Heterozygote

Анализ результатов с помощью MultiNA (используемый комплект: режим предварительного смешивания ДНК-500)



From left: ladder, homozygote, heterozygote, wild, heterozygote, homozygote

Подтверждение мутаций, созданных редактированием генома

Использование редактирования генома для создания мутантных штаммов требует сортировки мутаций в различных процессах. Однако остаются вопросы относительно стоимости и усилий, необходимых для подтверждения создания таких мутаций.

Ниже описывается процедура эффективного подтверждения созданных мутаций на основе анализа гетеродуплексной подвижности [HMA] с использованием системы электрофореза микроципа Shimadzu MCE-202 MultiNA для анализа ДНК / РНК.

Редактирование генома

Редактирование генома относится к технологии генетической модификации, в которой используются искусственные нуклеазы, предназначенные для разрушения нуклеиновой кислоты в определенном месте генома, для создания мутаций путем удаления, вставки или замены частей последовательности генома. В настоящее время основными искусственными нуклеазами, используемыми в качестве инструментов редактирования генома, являются нуклеазы типа «цинковые пальцы» [ZFNs], эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции [эффекторная нуклеаза TAL], и связанный с регулярными интервалами короткие палиндромные повторы, связанный с белком 9 [CRISPR / Cas9]. Среди них быстро растет популярность использования нуклеаз CRISPR / Cas9 третьего поколения из-за простоты конструирования целевых последовательностей.

Когда эти искусственные нуклеазы или векторы, которые их экспрессируют, вводятся внутрь клетки с помощью микроинъекции, электропорации или других методов, они разрушают геном в целевой последовательности, которую клетка впоследствии восстанавливает, в первую очередь одним из двух путей. Одним из них является негомологичное соединение концов [NHEJ], которое происходит независимо от клеточного цикла. Этот путь предварительно присоединяется к сломанному геному непосредственно в качестве временной меры, чтобы избежать разрыва генома. Однако этот процесс может вызвать удаление или вставку нескольких баз. Это случайное создание мутаций может быть использовано для намеренного индуцирования сдвига рамки считывания или разрушения гена [нокаут].

Другой путь - это гомологически направленная репарация [HDR], при которой нормальная сестринская хромосома используется в качестве шаблона для управления репарацией. Этот путь восстанавливает геномы до их исходного состояния и не приводит к типам мутаций, наблюдаемых при негомологичном соединении концов. Однако, вводя гомологичную двухцепочечную ДНК [или одноцепочечную ДНК] в клетку в качестве донора, геном включает последовательность от донора, что делает возможной вставку [нокаут] или модификацию гена.

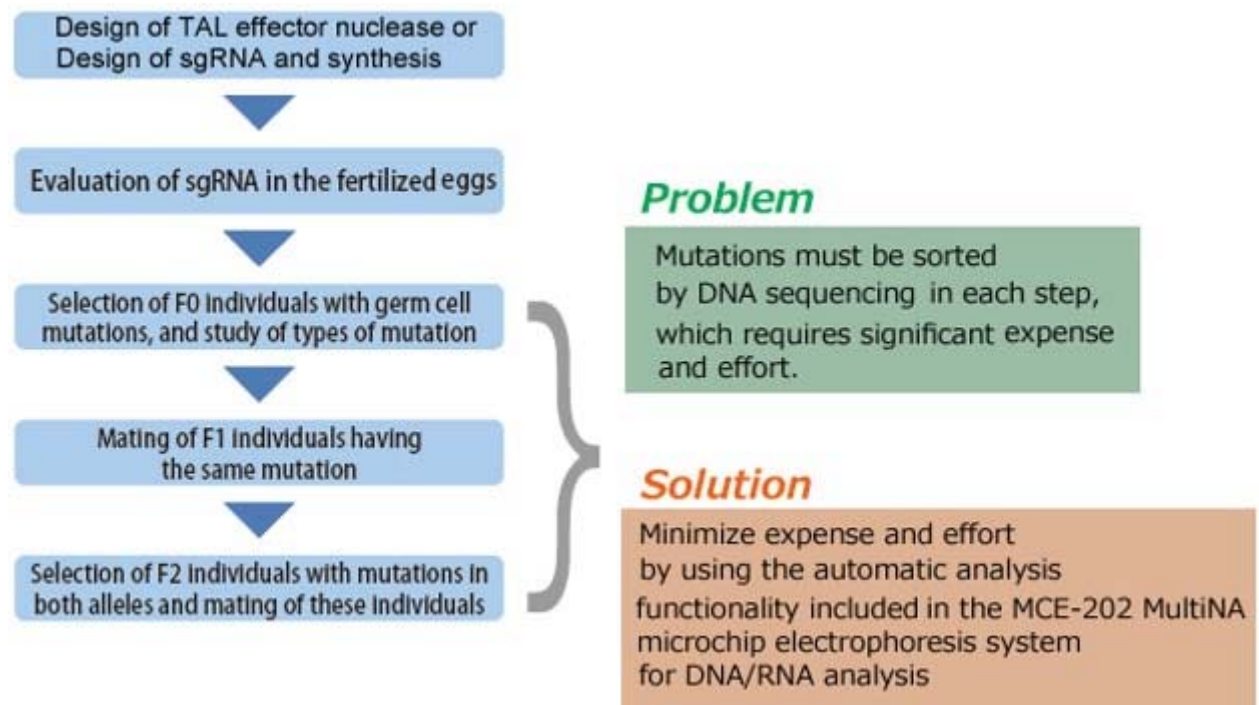
Методы генетической модификации, основанные на редактировании генома, предлагают значительно более высокую эффективность модификации, чем предыдущие методы, которые зависят от естественных случайных рекомбинаций.

Ранее генетическая модификация была возможна только у мышей и других животных, для которых можно было использовать эмбриональные стволовые клетки.

Редактирование генома, однако, также позволяет модифицировать гены других животных, для которых создание модификаций до сих пор считалось трудным, например, для рыб, амфибий, рептилий и крупных млекопитающих. Редактирование генома даже использовалось для генетической модификации насекомых и растений. Ожидается, что редактирование генома не только останется на уровне фундаментальных исследований, но и найдет применение не только в медицинских областях, таких как создание моделей геномных заболеваний человека или генная терапия, но также и для создания улучшенных разновидностей растений и животных.

Процесс создания мутаций и мутантных штаммов

В этом разделе описан процесс создания мутантного штамма с помощью редактирования генома. Несколько этапов процесса требуют значительных затрат и усилий, таких как оценка активности эффекторной нуклеазы TAL или CRISPR / Cas9 и сортировка лиц, несущих введенную мутацию-мишень, лиц с идентичными мутациями и лиц с идентичными мутациями в обоих аллели. Эти этапы сортировки можно выполнить более эффективно с помощью процесса НМА, описанного в следующем разделе.



Подтверждение мутации: использование анализа подвижности гетеродуплекса [НМА] с системой MultiNA

Мутации, создаваемые негомологичным соединением концов с целью выключения гена, приводят к небольшим делециям или вставкам от одного до нескольких десятков оснований. Подтверждение таких мутаций требует секвенирования ДНК мутировавшего участка; однако из-за затрат и усилий, которые обычно требуются для секвенирования ДНК, более эффективно сортировать образцы заранее. Благодаря удобству и эффективности сортировка была выполнена с использованием НМА, который можно использовать для сортировки на основе ПЦР вблизи мутации и электрофореза.

При электрофорезе двухцепочечной ДНК одинаковой длины подвижность полностью комплементарной гомодуплексной ДНК зависит от ее молекулярной массы. Однако с гетеродуплексной ДНК, в которой несоответствие происходит в некоторых областях, стерическая структура области, содержащей несоответствие, отличается от таковой гомодуплексной ДНК, что препятствует скорости миграции. Процесс НМА использует это явление для обнаружения мутаций. Гетеродуплексные соединения формируются путем применения ПЦР рядом с целевой последовательностью у человека с созданной мутацией, диссоциации продуктов амплификации путем тепловой денатурации и последующего повторного отжига продуктов. С помощью электрофореза можно определить наличие делеций или вставок на основании электрофоретических паттернов.

Пример использования анализа подвижности гетеродуплекса для сортировки людей с созданными мутациями

В этом разделе описывается использование системы **MultiNA** для получения особей F2 с помощью НМА для сортировки пар самцов и самок F1 с идентичными мутациями. Это включает в себя извлечение геномной ДНК от выведенной особи F1, а затем использование системы MultiNA для выполнения НМА. У особей F1 наблюдаются множественные полосы, как показано на рисунке. Исключая дикие разновидности, в показанном примере миграции есть четыре типа паттернов: А, В, С и D. Особи F2 могут быть получены путем скрещивания отсортированных самцов и самок F1 особей, которые имеют эти образцы образцов.

Поскольку индивидуумы F2 определяются как дикие, гетерозиготные мутантные или гомомутантные типы в соотношении 1: 2: 1, мутантный штамм может быть получен путем проведения НМА таким же образом и скрещивания отсортированных гомомутантов мужского и женского пола.



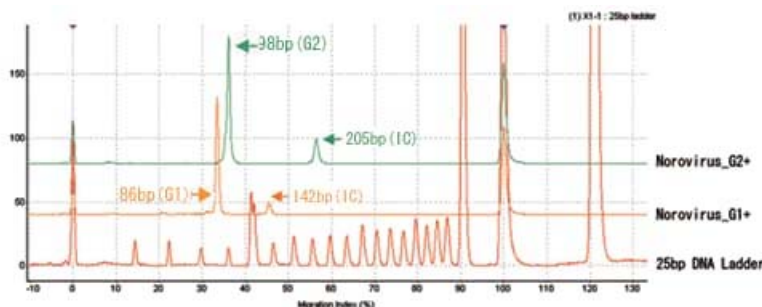
After extracting genomic DNA of F1 individuals, a male and female pair with the same mutation is selected by HMA using the MultiNA.

Обнаружение микроорганизмов и вирусов | Обнаружение генов норовирусов

Норовирус - основная причина острого вирусного гастроэнтерита. Заражение может быть вызвано устрицами и другими морепродуктами или контактом с фекалиями или рвотой инфицированного пациента. Ежегодно регистрируется ряд случаев заражения пищевыми продуктами.

Положительный на норовирус образец анализировали с использованием системы электрофореза на микрочипах для анализа ДНК / РНК. Были обнаружены гены размером 86 и 142 п.н., полученные из норовируса G1, и гены размером 98 и 205 п.н., полученные из норовируса G2.

* Норовирус имеет два генетических типа: G1 и G2.



Поиск биомаркеров

Анализ метилированной ДНК

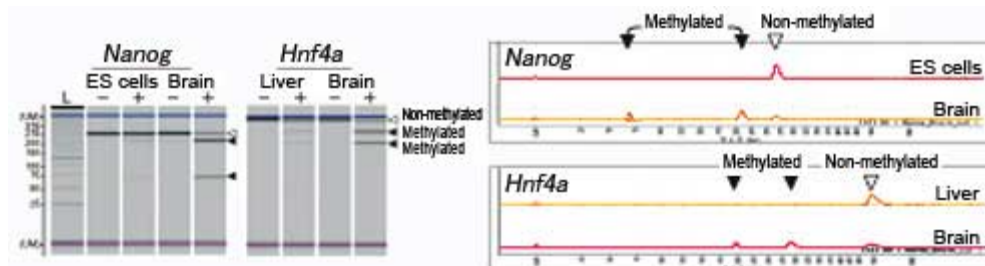
Анализ метилирования ДНК методом CORBA генов *Nanog* и *Hnf4a* в эмбриональных стволовых клетках, клетках мозга и клетках печени

Явление изменений функции генов, которые продолжают после деления клетки без изменений в последовательности оснований, известно как эпигенетика. Становится ясно, что эпигенетические аномалии генов участвуют в развитии рака и многих других заболеваний.

Метилированная ДНК - это один из типов контроля над эпигенетическими генами. Ожидается, что будет предоставлен биомаркер для скрининга ES- и iPS-клеток для диагностики заболеваний и регенеративной медицины.

Это пример анализа метилирования ДНК методом CORBA генов *Nanog* и *Hnf4a* в эмбриональных стволовых (ES) клетках, клетках мозга и клетках печени. Для этого анализа использовали систему электрофореза на микрочипах MultiNA для анализа ДНК / РНК.

* CORBA: анализ ограничения связанного бисульфита



Изображения геля и электрофореграммы клеток, демонстрирует низкое метилирование в ES-клетках, но высокое метилирование в головном мозге. Ген *Hnf4a*, участвующий в экспрессии специфичных для печени генов, демонстрирует низкое метилирование в печени, но высокое метилирование в головном мозге.

Анализ метилирования ДНК может быть выполнен с использованием нескольких аналитических методов, включая бисульфитное секвенирование. Однако метод CORBA предлагает низкую стоимость и высокую пропускную способность, что делает его эффективным для скрининга и отбора образцов для секвенирования.