



Система QX100™ Droplet Digital™ PCR

Качественный прорыв в количественной ПЦР

Система для цифровой ПЦР QX100 Droplet Digital PCR представляет собой третье поколение технологии ПЦР. Система Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) определяет количество копий ДНК-мишени в пробе с удивительной точностью и достоверностью. Область применения включает определение числа копий гена, детектирование редких последовательностей и мутаций, анализ экспрессии генов. Система QX100 ddPCR обладает разрешением начиная с одной копии ДНК-мишени для проведения ПЦР, что позволяет ускорить темпы научных изысканий и разработок новых стратегий исследований наследственных заболеваний, детекции рака и инфекционных заболеваний.

Система QX100 ddPCR позволяет:

- обнаружить сиквенсы редких мутаций;
- определить даже небольшие отличия в концентрации ДНК-мишеней;
- определить число копий гена без использования калибровочной кривой.



Система цифровой ПЦР Droplet Digital PCR



Образец делится на 20 000 капель, между которыми случайно распределены ДНК-мишень и фоновая ДНК.



После ПЦР каждая капля тестируется на наличие или отсутствие в ней флуоресцентного сигнала в соответствии с присутствием в ней целевой ДНК. Сигнал в каждой капле определяется независимо.

Подсчет количества капель, содержащих ДНК-мишени

Капли с положительным и отрицательным сигналом подсчитываются для каждого образца, и ПО подсчитывает концентрацию ДНК-мишени в виде числа копий в микролитре.



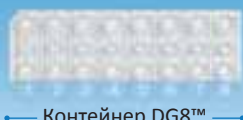
Простота и элегантность рабочего протокола

0

Подготовка образцов для капельной ПЦР

Для приготовления 8 образцов смешайте образцы ДНК, праймеры и пробы с реакционной ПЦР-смесью, специально разработанной для капельного ПЦР. Загрузите 20 мкл подготовленных образцов в отдельные ячейки восьмиканального одноразового картриджа.

Праймеры
и зонды
Специальная
смесь ddPCR
Образец ДНК



Контейнер DG8™

1

Создание капельных эмульсий

Одноразовый картридж с загруженными образцами и специальным минеральным маслом помещается в генератор капель QX100.

20 мкл образца распределяются по 20 тыс. капель объемом 1 нл каждая.



Расширенные возможности капельной ПЦР

Bio-Rad использует точность, достоверность и чувствительность капельной цифровой ПЦР в целом ряде методов, включающем определение числа копий гена (CNV) и детекции редких последовательностей ДНК.

Метод разделения ПЦР реакции на небольшие капли дает существенные преимущества при определении CNV и детекции редких последовательностей ДНК.

Для CNV большое количество повторов за счет разделения образца на много маленьких капель дает возможность определения даже большого числа копий гена с высокой точностью.

В случае определения редких последовательностей ДНК разделение на капли увеличивает чувствительность благодаря отделению ДНК-мишени от сигнала конкурирующей фоновой ДНК.

Вариация числа копий гена (CNV)

Варианты числа копий включают делеции, вставки, дупликации и комплексные амплификации. Подобно однонуклеотидным полиморфизмам (SNPs) они распределены по всему геному и могут быть причиной заболевания.

Анализ и каталогизация CNV являются важной научной задачей. Прогресс был достигнут в сфере идентификации CNV с использованием методов матричного и глубинного (deep) секвенирования, но при этом возможности подтверждения полученных результатов весьма ограничены. Система QX100 ddPCR, определяющая количество копий с высокой точностью и достоверностью, предлагает идеальное решение для подтверждения данных по CNV, обладает необходимой пропускной способностью и разумной ценой.



2

Проведение ПЦР

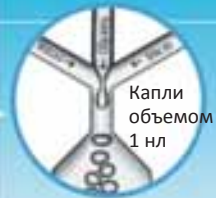
Перенесите пипеткой необходимое количество эмульгированного образца из картриджа в стандартную 96-луночную плашку для ПЦР. Проведите ПЦР до конечной точки (40 циклов) при помощи термоциклера.



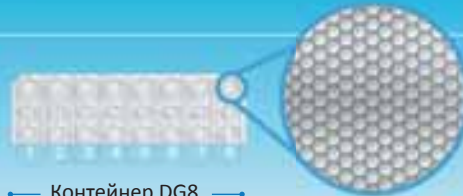
Генератор капель водно-масляной эмульсии QX100



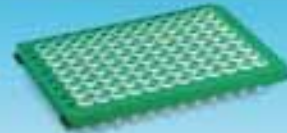
Термоциклер C1000 Touch™



Капли объемом 1 нл



Контейнер DG8

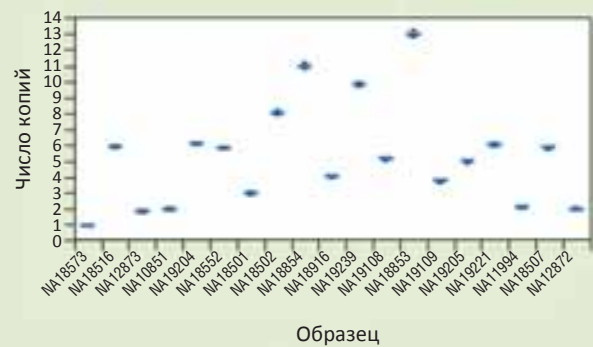


Данные по вариации числа копий генов

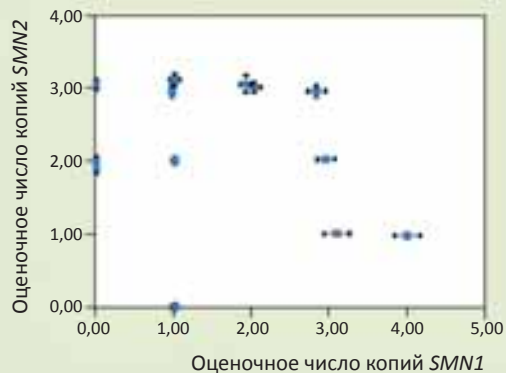
А. Анализ вариации числа копий *MRGPRX1*



С. Анализ вариации числа копий *CCL3L1*



В. Анализ вариации числа копий *SMN1* и *SMN2**



Расчет вариации числа копий гена. А: Для гена *MRGPRX1* число его копий от 1 до 6 было точно определено. В: оценочное число копий *SMN1* и *SMN2* отображается в двух измерениях, где каждая точка представляет отдельный образец. Анализ аллельной дискриминации 5'-нуклеазных систем для *SMN1* и *SMN2* позволяет исследователям подсчитывать число копий генов, отличающихся даже одним нуклеотидом. С: определение числа копий гена *CCL3L1* на 13 образцах демонстрирует точность и достоверность ddPCR. Данные показывают, что измерения числа копий объединяют в группу до 13 целых копий. Результаты подтверждают данные, полученные ранее методом NGS-секвенирования, показывающие наличие 5,7 копий для образца NA18507**. Образцы были получены из Coriell Institute.

* Воспроизводимость результатов (95% CI).

** Alkan C et al. (2009). Nat Gen 41, 1061-1067.

3

Идентификация сигнала в каплях

Перенесите ПЦР-плашку в детектор капель QX100 и запустите программу считывания флуоресцентного сигнала. Лунки анализируются последовательно. Устройство поштучной подачи капель производит забор образца из соответствующей лунки и переносит содержимое в камеру, откуда капли последовательно направляются в систему оптического распознавания сигнала по двум цветам, где определяется, какие капли содержат ДНК-мишень (+) и какие – не содержат (-).



4

Анализ результатов

Программное обеспечение ddPCR определяет «положительные» и «отрицательные» капли в каждом образце и представляет данные в цифровом и графическом формате. По доле «положительных» капель в образце определяется концентрация ДНК-мишени. При получении результатов для полной 96-луночной плашки программное обеспечение должно проанализировать ~1,4 млн капель.



Детектирование редких генетических изменений

Детектирование редких генетических изменений включает детектирование однонуклеотидных мутаций, изменение числа копий гена, делецию или вставку нуклеотидов. Технология детектирования редких генетических изменений стала важным методом в диагностике раковых заболеваний.

Изменение числа копий

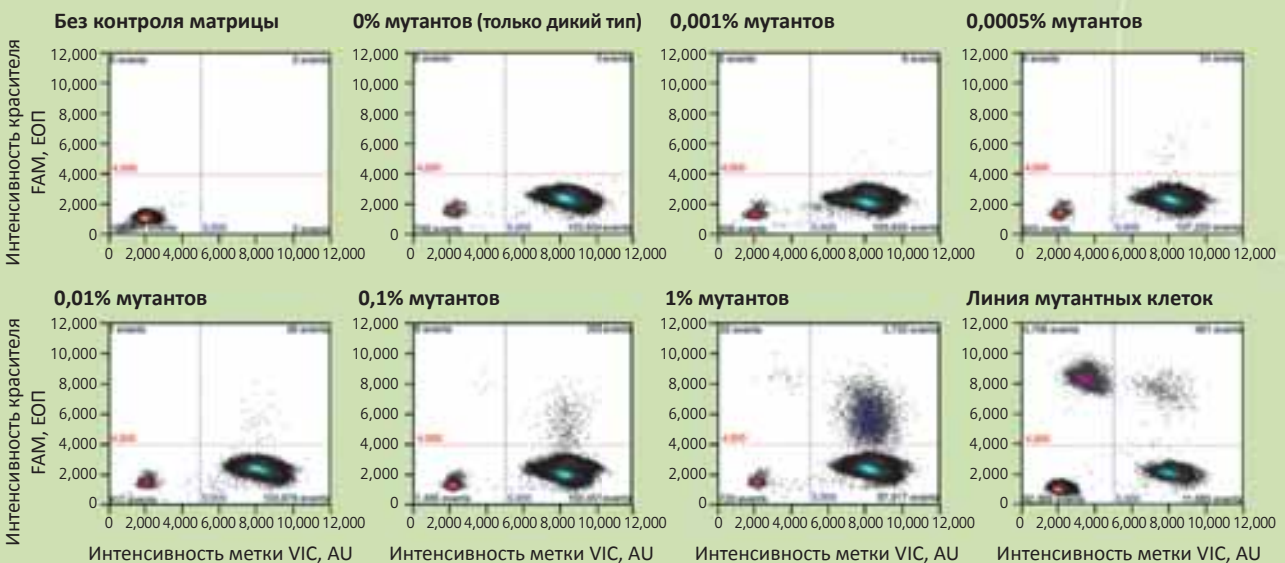
Система Droplet Digital PCR предлагает практическое решение для точной оценки числа копий ДНК. Она может детектировать амплификации даже в высокогетерогенных матрицах, в которых пораженной является только часть клеток.

Данная точность позволяет производить детектирование изменения числа соматических копий гена, что является отличительной особенностью множества видов раковых заболеваний.

Детектирование мутаций

Детектирование точечных мутаций требует высокой степени чувствительности, которую обеспечивает система ddPCR, позволяя производить детектирование 0,001% мутантов. Измерение предельно малых уровней содержания мутантов может позволить производить более чувствительную и менее инвазивную диагностику.

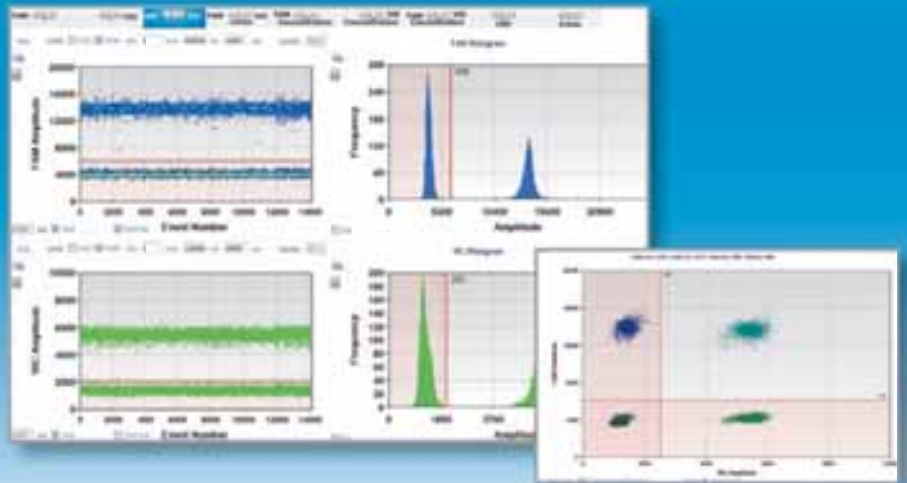
Данные детектирования мутаций



Дуплексная ПЦР, использующая пробы TaqMan, нацелена на определение мутации BRAF V600E. Данные показывают, что система ddPCR детектирует 0,001% содержания мутантов. AU (absorbance units) – единицы поглощения.

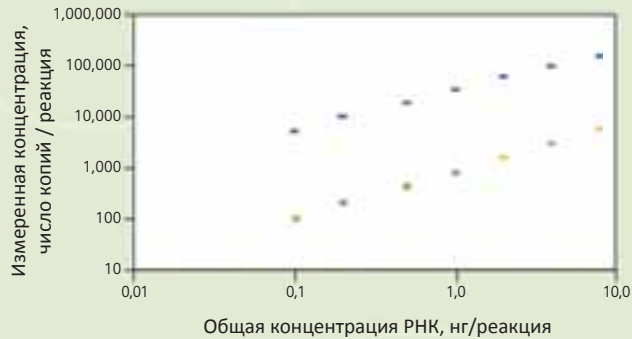
5

Удобная демонстрация данных
Програмное обеспечение ddPCR позволяет представить полученные результаты просто, наглядно и несколькими способами. Концентрация рассчитывается числом копий на микролитр.



Данные экспрессии генов

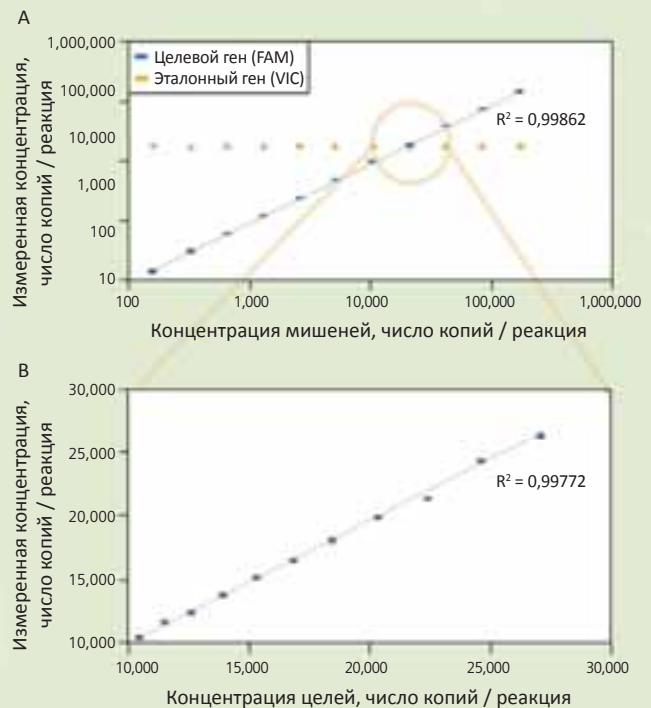
Система Droplet Digital PCR позволяет проводить анализ экспрессии генов с точностью $\pm 10\%$.



Данные показывают титр двух матричных РНК.

β -актин (■);
ANP32B (■).

Данные измерений



Динамический диапазон. А: Результаты определения концентрации в серии двойных разведений – от 150 до 150 000 копий на реакцию; В: результаты измерения концентрации для 1.1-кратного титрования демонстрируют точность $\pm 10\%$ с погрешностью 95% CI. Планки погрешностей составляют 95% от пуассоновских доверительных интервалов (CI). Референтный ген (■) имел постоянную концентрацию 19 000 копий/реакцию.

Спецификации

Генератор капель водно-масляной эмульсии QX100

Начальный объем образца	20 мкл
Емкость	8 образцов/картридж
Капель на образец	20 000
Размеры (Ш × Г × В)	28 × 36 × 13 см (11 × 14 × 5")
Вес	4,5 кг (10 фунтов)

Датчик капель QX100

Выход	32 лунки/ч
Подсветка образца	Светоизлучающие диоды
Детектирование образца	Фотоэлектронные умножители
Каналы детектирования	FAM, VIC (HEX)
Размеры (Ш × Г × В)	66 × 52 × 29 см (26 × 20 × 11")
Вес	26 кг (57 фунтов)
Линейный динамический диапазон	5 порядков возрастания
Точность	±10%
Капель на 96-луночную планшету	1,4 млн

Информация для заказа

Номер по каталогу	Описание
186-3001	Система QX100 Droplet Digital PCR включает генератор капель водно-масляной эмульсии, датчик капель, ноутбук, программное обеспечение, расходные материалы

Аксессуары для системы QX100 Droplet Digital PCR

186-3004	Масло для датчика капель, 2 бутылки по 1 л
186-3005	Масло для генератора капель водно-масляной эмульсии, 10 бутылей по 7 мл
186-3006	Картриджи и прокладки для генератора капель водно-масляной эмульсии, включает 5 комплектов контейнеров DG8 по 24 шт. в упаковке, 5 комплектов прокладок DG8 по 24 шт. в упаковке
186-3008	Картриджи DG8 для генератора капель водно-масляной эмульсии QX100, 1 комплект из 24 контейнеров
186-3009	Прокладки DG8 для генератора капель водно-масляной эмульсии QX100, 1 комплект из 24 прокладок
186-3010	Реакционная смесь ddPCR для проб, 5 пробирок по 1 мл, 2 уп.
186-3052	Буферный раствор, 1 бутылка 10 мл
185-1196	Термоциклер C1000 Touch с реакционным модулем на 96 лунок, включает основание термоциклера C1000, реакционный модуль для быстрого перемешивания с 96 ячейками, флеш-диск USB
186-1096	Термоциклер T100, включает термоциклер с 96 ячейками, шнур питания, штатив для пробирок

Alkan C. et al. (2009). Personalized copy number and segmental duplication maps using next-generation sequencing. *Nat Genet* 41, 1061–1067.

FAM и VIC являются торговыми марками компании Applied Biosystems Corporation.

TaqMan является торговой маркой компании Molecular Probes, Inc.

Уведомление относительно термоциклеров Bio-Rad и систем ПЦР в режиме реального времени: приобретение настоящего прибора предоставляет ограниченный непередаваемый иммунитет от привлечения к суду за собственные внутренние исследования и разработки покупателя, за применение в диагностике *in vitro* в медицине, а также за использование в соответствующих областях применения согласно патенту США № 5 475 610 (только формулы изобретения 1, 44, 158, 160–163 и 167) либо соответствующие формулы изобретения его аналогов, созданных за пределами США и принадлежащих компании Applied Biosystems Corporation. Никакое право не предоставляется в явной форме, подразумеваемым образом, либо в силу лишения права возражения согласно любому прочему притязанию формулы изобретения, например, притязания в отношении прибора, реагентов, комплектов или методов, таких как методы нуклеаз 5. Дополнительную информацию о приобретении лицензий можно получить, связавшись с директором по лицензированию компании Applied Biosystems по адресу: 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

На термоциклеры реального времени Bio-Rad распространяется действие одного или нескольких следующих патентов США или их зарубежных аналогов, принадлежащих компании Eppendorf AG: Патенты США № 6 767 512 и 7 074 367.

ДИА.М
современная лаборатория

Москва
ул. Космонавта Волкова, 10
тел./факс: (495) 745-0508
e-mail: info@dia-m.ru

Новосибирск
пр. Ак. Лаврентьева, 6/1
тел./факс: (383) 328-0048
e-mail: nsk@dia-m.ru

Казань
Оренбургский тракт, 20
тел./факс: (843) 277-6040
e-mail: kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
ул. Семашко, 114
тел./факс: (988) 569-0812
e-mail: rnd@dia-m.ru

