



АО БиохимМак

Официальный дистрибьютор

Bioptric Inc.

119192, Москва,

Ломоносовский пр., д. 29, корп. 1

+7 (495) 647-27-40

pcr@biochemmack.ru

Анализаторы

Qsep₁₀₀ и Qsep₁₀₀ Advance

Универсальные системы для капиллярного
гель-электрофореза с широким спектром применения



Компания BiOptic была основана в 2004 году для разработки и производства инновационных систем для разделения различных биологических образцов методом капиллярного гель-электрофореза.

В 2009 году компания начала разработку системы для капиллярного гель-электрофореза, не имеющей аналогов на рынке с быстро сменяемыми картриджами с гелем под различные задачи и для разделения различных групп биологических молекул.

Уже в 2011 году был запатентован первый прибор: Qsep₁₀₀[™]. В том же году на конференции Lab Automation в Палм Спрингс (Калифорния, США) состоялась его презентация.

За следующие годы портфолио компании пополнилось такими продуктами как Qsep₁[™], Gly-Q[™], Qsep₄₀₀[™] и термоциклера Qamp_{mini}[™], и наборы реагентов для него.

В настоящее время центральный офис компании располагается в Тайване и имеет представительства в более чем 35 странах.



Qamp_{mini}
Портативный
термоциклер



Qsep₁
Одноканальный
портативный
капиллярный
анализатор



Qsep₁₀₀
Одноканальный
капиллярный
анализатор



Qsep₁₀₀ Advance
Одноканальный
капиллярный
анализатор



Qsep₄₀₀
Четырёхканальный
капиллярный
анализатор

Разнообразное использование

Линейка анализаторов Qsep широко используется в исследованиях в области наук о жизни в академических институтах, в биотехнологической промышленности и клинических учреждениях. Кусепы используются для анализа различных образцов ДНК, РНК и белков.

В ДНК-анализе они предоставляют как качественные, так и количественные результаты размера фрагментов и концентрации ДНК. При анализе РНК платформа Qsep используется для оценки качества образцов для последующих аналитических приложений.

При анализе белков Кусепы обеспечивают исследователей критической информацией о весе молекул, чистоте и белковому профилю препаратов. Такие результаты используются в фармацевтической промышленности, обеспечивая исследователей продвинутыми достижениями в области науки и медицины.

Анализ

ДНК

- Геномной/плазмидной ДНК
- Библиотек для NGS
- Результатов мультиплексной ПЦР
- Результатов CRISPR
- Свободноциркулирующей ДНК (cfDNA)
- SNP
- RFLP
- Результатов молекулярной диагностики

РНК

- Контроль качества общей РНК
- Результаты фрагментного анализа
- Анализ РНК низкой концентрации

БЕЛОК

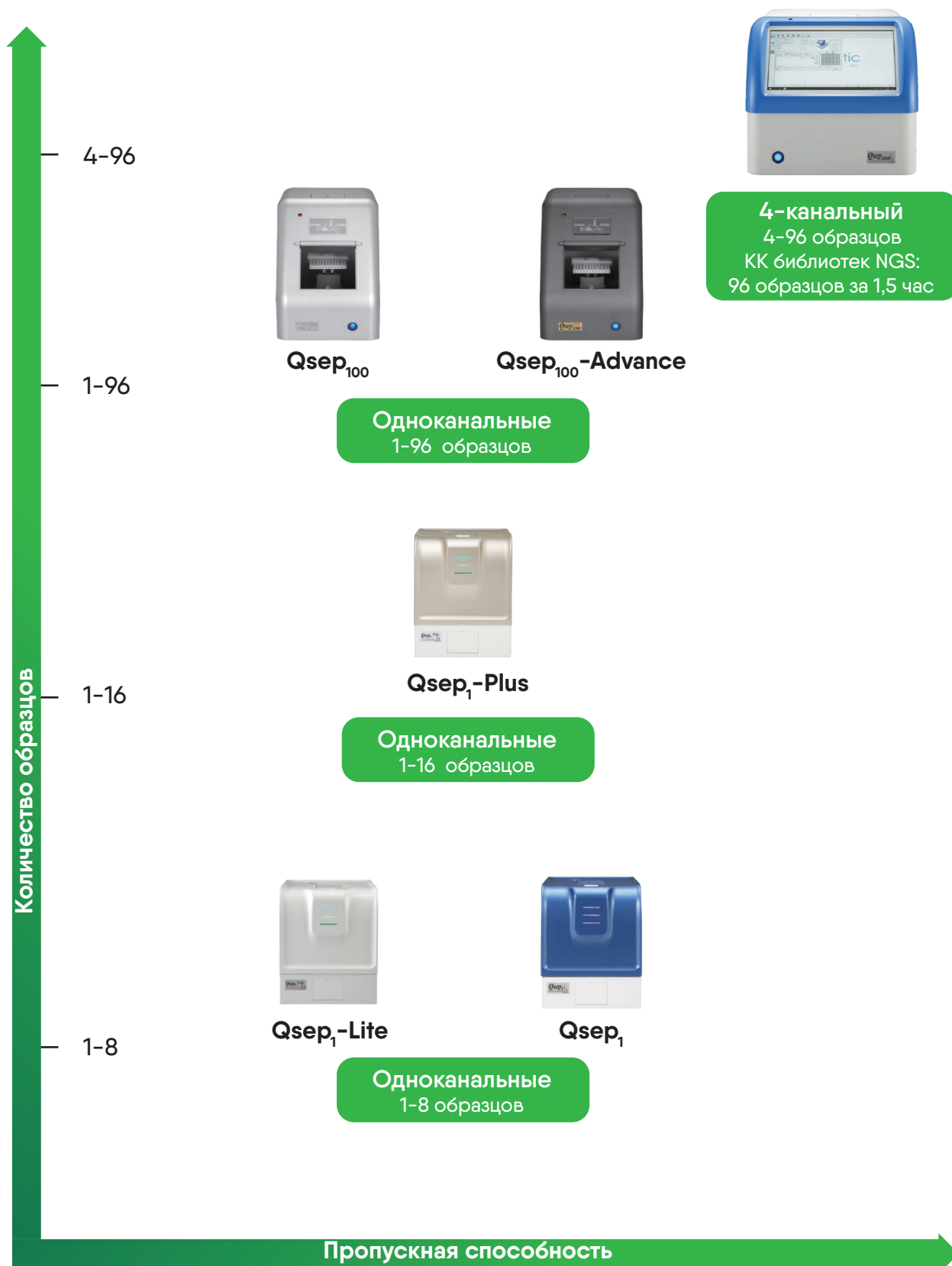
- Профилирование белковых препаратов
- Чистоты препаратов антител

Выбор оптимальной системы

BiOptic предлагает выбор в широком ассортименте капиллярных анализаторов, созданных для повышения качества оценки препаратов нуклеиновых кислот и белков. Анализируете ли Вы несколько или несколько сотен образцов в день, серия Qsep предлагает адаптируемые решения, удовлетворяющие Вашим запросам.

Ниже предлагаем Вашему вниманию схему для выбора подходящей модели Qsep.

Как выбрать нужный прибор Qsep?



Основные этапы работы с анализаторами Qsep

Анализаторы Qsep используют технологию капиллярного электрофореза в гелевом носителе специального состава, заменяющем традиционные молекулы геля. Этот инновационный подход создает в капилляре эффект сита, обеспечивая прецизионное разделение и анализ фрагментов биомолекул. Работая с Qsep, оператор может в индивидуальном порядке анализировать ДНК, РНК и белки, используя капилляры в картриджах (размера пишущей ручки), заполненные гелем, специально созданные для различных приложений. Работа прибора и поддержание базы данных разделения управляется единым программным обеспечением (ПО) Q-Analyzer. Полностью автоматизированная система, включающая картриджи для различных приложений и оптимизированное ПО, позволяет выполнить анализ в течение минут, учитывая простой процесс подготовки к работе.

Проведите анализ, выполнив три простые процедуры

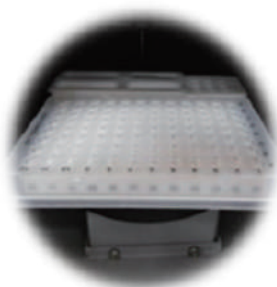
1

Вставьте картридж



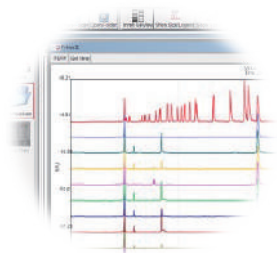
2

Загрузите образцы и буферы для анализа



3

Нажмите Пуск и получите результаты



Основные особенности систем Qsep

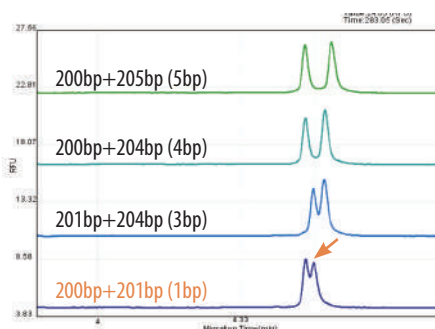
- Удобные в работе
- Высокочувствительные
- Обеспечивают высокое разрешение
- Используют предзаполненные картриджи, готовые к работе
- Экономичные
- Анализируют разнообразные образцы
- Используют небольшое количество образца
- Оптимальны для контроля качества библиотек NGS

Основные характеристики анализаторов серии Qsep

Высокое разрешение

Разрешение разделения фрагментов ДНК в анализаторах Qsep может достигать 1 пары оснований.

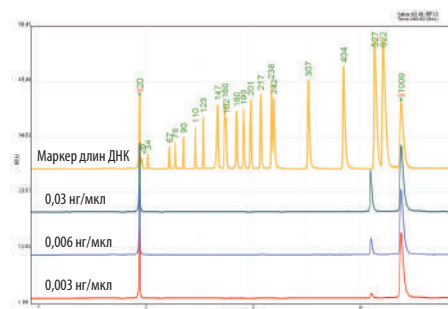
Анализаторы КуSEP, оснащенные картриджем S1, успешно разделяют фрагменты 200/205 пар оснований, 200/204 bp, 201/204 и 200/201 bp, отличающиеся по ветственно.



Высокая чувствительность

Анализаторы серии Qsep способны детектировать фрагменты в экстремально низкой концентрации, до пикограммового уровня.

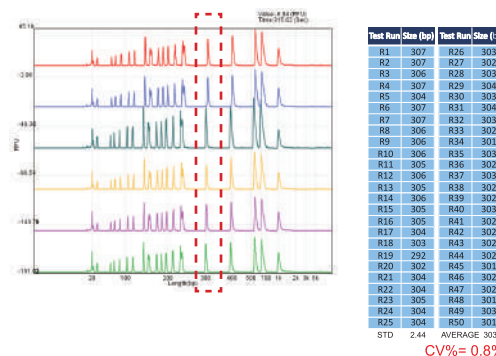
КуSepy работают в широком диапазоне концентраций от нг до пкг. Используя высокочувствительный картридж, можно достичь предела детекции 5 пкг/мкл. Исключительная чувствительность делает его использование особенно эффективным в анализе образцов низкой концентрации, включая бесклеточную ДНК.



Высокая воспроизводимость

Анализаторы серии КуSep обеспечивают результаты определения размера фрагментов с неизменной надежностью.

Результаты демонстрируют высокую воспроизводимость при выполнении повторных анализов с использованием маркеров длин. Так, результаты определения длины фрагмента 307 bp показывают впечатляющую воспроизводимость на уровне коэффициента вариации (CV) 0,8% в ходе 50 повторных экспериментов.



Серия анализаторов Qsep

Портативные системы капиллярного электрофореза Qsep₁ пригодны для использования в различных приложениях, включая исследовательские лаборатории, клинические учреждения и лаборатории контроля качества. Если ваша лаборатория анализирует небольшое количество образцов, серия Qsep₁ является идеальным решением, соединяя во фрагментном анализе эффективность и универсальность.

Основные особенности Qsep₁ Наилучшее использование Qsep₁

- Удобные в работе
- Использование разнообразных образцов
- Компактные портативные системы капиллярного электрофореза
- Возможность полевых исследований при использовании Qampmini (амплификатор размером с ладонь)
- Анализ нескольких образцов в день
- Небольшие клиники, университетские лаборатории, исследовательские институты
- Тестирование «на месте» («у постели больного – РОСТ»)
- Контроль качества для NGS

Ассортимент систем Qsep₁



Qsep₁-Lite

Каждому картриджу соответствует один метод



Qsep₁

Широкий диапазон приложений



Qsep₁-Plus

Расширенный диапазон приложений увеличенной пропускной способности

Назначение

Уровень
«для начинающих»

Профессиональная
портативная система

Портативная система
с расширенными возможностями

Объем

1-8 образцов

1-8 образцов

1-18 образцов

Чувствительность

Qsep₁₀₀ – автоматизированный полноразмерный биофрагментный анализатор и представляет собой классическую модель (появившуюся ранее остальных). Однокапиллярная конструкция позволяет анализировать от 1 до 96 образцов, не растрачивая лишние реагенты. Прибор может работать с образцами различной природы, пригоден для работы в лабораториях биотехнологических компаний и исследовательских центров с требованиями средней пропускной способности. Qsep₁₀₀ используется в различных приложениях, включая оценку качества ДНК и РНК, количественный анализ в процедурах NGS, быстрый скрининг продуктов ПЦР, определение молекулярного веса и профилирование белковых препаратов.

Основные особенности Qsep₁₀₀

- Удобство в управлении
- Использование разнообразных образцов: анализ 1–96 образцов в одной последовательности
- Универсальные алгоритмы анализа в различных приложениях

Наилучшее использование Qsep₁₀₀

- Анализ менее 200 образцов в день
- Биотехнологические компании
- Определение веса белков и оценка чистоты белковых препаратов
- Контроль качества в NGS
- Исследовательские и клинические лаборатории, сфокусированные на молекулярно-биологических приложениях

Ассортимент систем Qsep₁₀₀



Qsep₁₀₀

Идеален для анализа ДНК/РНК
Быстрый анализ:
2–7 мин/образец



Qsep₁₀₀ - Advance

Используется для анализа
белков.
ДНК и РНК

Объем

1–96 образцов

1–96 образцов

Чувствительность

Картриджи
серии S и РНК

Картриджи
серии N

**

Картриджи
серии Р
(совместимые
флуорофоры)

(alexa488)

Qsep₄₀₀ позиционируется в качестве прибора высокой производительности в Qsep-линейке биофрагментных анализаторов. Он характеризуется рабочей камерой для 4-канальных картриджей, что позволяет оператору одновременно анализировать 4 образца, сокращая таким образом, время анализа в 4 раза (например, 2-7 мин для 4 образцов).

Основные особенности Qsep400

- Удобство в управлении
- Гибкая пропускная способность: анализ 4-96 образцов
- Быстрая автоматизированная система: получение результатов для 4 образцов в течение 2-7 мин
- Интегрированный компьютер, управление с сенсорного экрана
- Идеален для контроля качества NGS-библиотек: 96 образцов за 1,5 часа

Наилучшее использование Qsep400

- Анализ более 96 образцов в день
- Клинические или исследовательские центры
- Запрос на высокую производительность
- Сервисные центры NGS
- Настраиваемый интерфейс (API) для взаимодействия между программами

Система Qsep₄₀₀



Портативная система капиллярного электрофореза профессионального уровня

Интегрированный компьютер и удобный в работе сенсорный экран

Широкий диапазон приложений



Характеристики	Qsep ₁ -Lite	Qsep ₁	Qsep ₁ -Plus	Qsep ₁₀₀	Qsep ₁₀₀ Advance	Qsep ₄₀₀
Напряжение разделения	1-8 кВ	1-8 кВ	1-8 кВ	1-15 кВ	1-15 кВ	1-15 кВ
Связь с компьютером	Кабель	Wi-Fi и кабель	Wi-Fi и кабель	USB	USB	USB
Источник питания	AC 100-240 В	AC 100-240 В	AC 100-240 В	AC 100-240 В	AC 100-240 В	AC 100-240 В
Потребляемая мощность	80 Вт	80 Вт	80 Вт	60 Вт	60 Вт	120 Вт
Вес	5,5 кг	5,5 кг	5,5 кг	15 кг	15 кг	26 кг
Размеры	24x21x30 см	24x21x30 см	24x21x30 см	38x30x40 см	38x30x40 см	54x40x36 см
Тип системы	1-канальная портативная	1-канальная портативная	1-канальная портативная	1-канальная стандартная	1-канальная стандартная	4-канальная
Автосэмплер	1-8 образцов	1-8 образцов	1-18 образцов	1-96 образцов	1-96 образцов	4-96 образцов
Минимальный объем образца	10 мкл, 20 мкл	2 мкл, 10 мкл, 20 мкл	2 мкл, 10 мкл (0,1 мл пробирки и 18+3-луночный планшет, 20 мкл	2 мкл, 10 мкл, 20 мкл	2 мкл, 10 мкл, 20 мкл	2 мкл, 10 мкл, 20 мкл

Технические характеристики картриджей (ч. 1)

Приложение	Картриджи для качественного анализа					
Наименование	Стандартный картридж (S2)	Картридж высокого разрешения (S1)	Картридж для быстрого разделения (F3)	Высокочувствительный картридж (N1)	Картридж для разделения килобазных фрагментов (S3)	Высокочувствительный картридж для разделения килобазных фрагментов (N3)
Кат. №	C105201 (2 шт.) C105801 (8 шт.) **C405101	C105202 (2 шт.) C105802 (8 шт.) **C405102	C105203 (2 шт.) C105803 (8 шт.) **C405103	C105105 (1 шт.) C105205 (2 шт.) **C405105	C105206 (2 шт.) C105806 (8 шт.) **C405106	C105153 (1 шт.) C105253 (2 шт.) **C405153
Диапазон разделения	20-5000 bp	20-5000 bp	20-5000 bp	20-5000 bp	20-60000 bp Диапазон детекции 10bp-165kb	20-60000 bp Диапазон детекции 10bp-165kb
Предел обнаружения (LOD)	*0,1 нг/мкл *2 пкг/мкл в воде	*0,1 нг/мкл *2 пкг/мкл в воде	*0,1 нг/мкл *2 пкг/мкл в воде	*5 нг/мкл *2 пкг/мкл в воде	*0,1 нг/мкл *2 пкг/мкл в воде	*20 нг/мкл *1 пкг/мкл в воде
Наилучшее разрешение	4-10 bp	1-4 bp	≥50 bp	4-10 bp	10-50 bp	10-50 bp
Время анализа/образец	2-3 мин	3-5 мин	1-2 мин	2-3 мин	9-21 мин 5 мин (для фрагментов короче 1 kb)	9-25 мин 3 мин (для фрагментов короче 1 kb)
Количество образцов/картридж	200 800 для 4-канального	200 800 для 4-канального	300 1200 для 4-канального	100 400 для 4-канального	200 800 для 4-канального	100
Потребление образца/анализ	<0,1 мкл	<0,1 мкл	<0,1 мкл	<0,1 мкл	<0,1 мкл	<0,1 мкл
Рекомендуемый объем образца	0,1 мл пробирка: 10 мкл; 0,2 мл: 20 мкл ***Микропробирки: 2 мкл					
Гарантированный срок хранения	6 мес.	6 мес.	4 мес.	4 мес.	6 мес.	4 мес.

LOD: 2 пкг/мкл при растворении в воде

*Определяли после анализа размерного стандарта ДНК (15-622 пар оснований, кат. №C109200)

**Кат. № для 4-канального картриджа.

***Кат. № для микропробирок 2-10 мкл – C104250

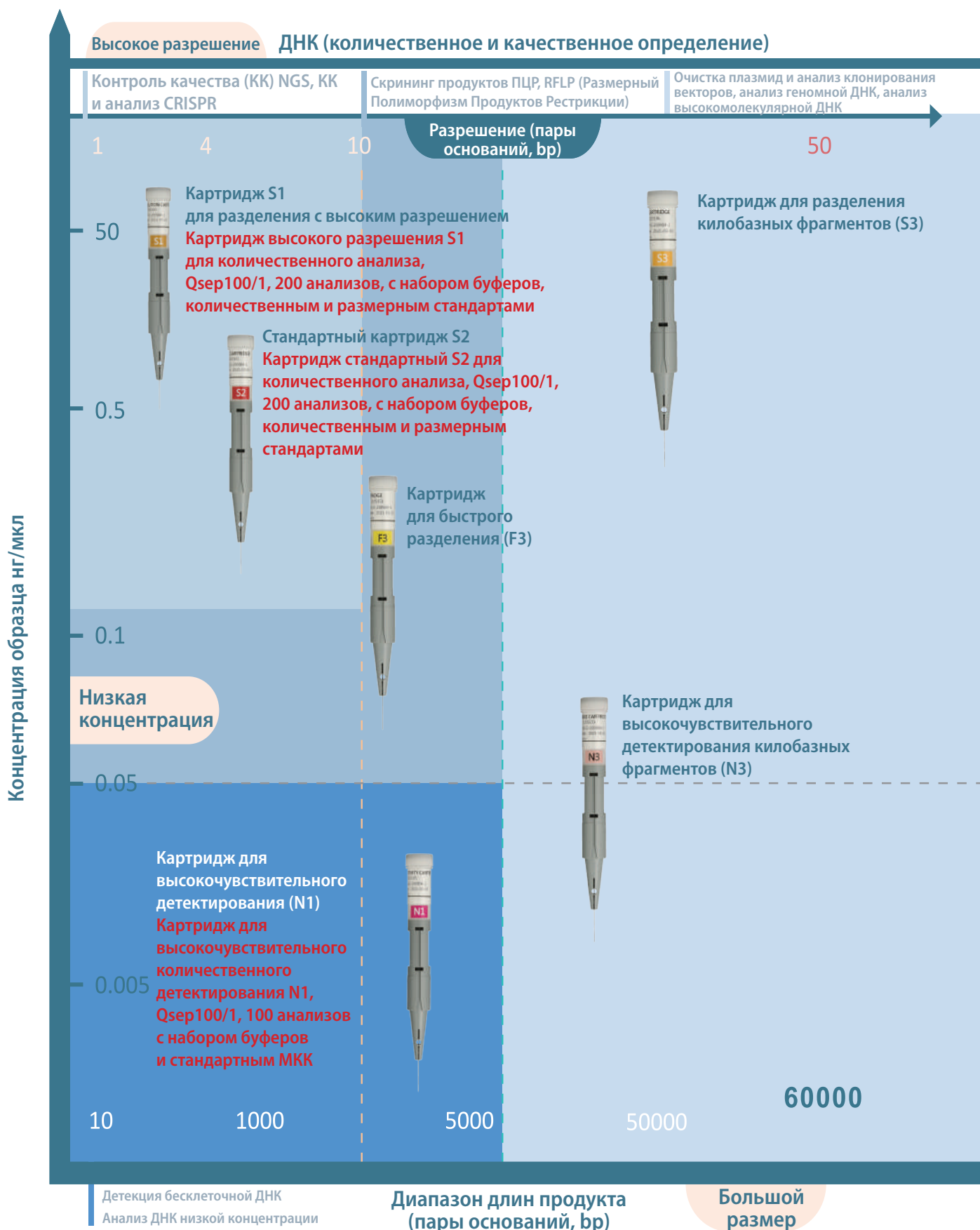
Технические характеристики картриджей (ч. 2)

Приложение	Картриджи для количественного анализа ДНК			Картриджи для анализа РНК		Картриджи для анализа белков
Наименование	Стандартный картридж (S2)	Картридж высокого разрешения (S1)	Высокочувствительный картридж (N1)	Картридж для РНК (R1)	Высокочувствительный картридж для РНК (NR1)	Картридж для разделения белков по MW (P2)
Кат. №	C105201-Q (2 шт.) **C405101	C105202-Q (2 шт.) **C405102	C105105 (1 шт.) C105205-Q (2 шт.)	C105110 (1 шт.) C105210 (2 шт.) C105810 (8 шт.) **C405110	C105111 (1 шт.) C105211 (2 шт.)	C105121 (1 шт.) C105221 (2 шт.) **C405121
Диапазон разделения	20-5000 bp	20-1500 bp	20-1500 bp	20-6000 нуклеотидов	20-6000 нуклеотидов	11-155 kDa Диапазон детекции 11-660kDa
Предел обнаружения (LOD)	*0,1 нг/мкл *2 пкг/мкл в воде	*0,1 нг/мкл *2 пкг/мкл в воде	*5 нг/мкл *1 пкг/мкл в воде	*5 нг/мкл *2 нг/мкл в воде	*1 нг/мкл *0,2 нг/мкл в воде	0,5 нг/мкл (BCA)
Наилучшее разрешение	4-10 bp	1-4 bp	4-10 bp	N/A	N/A	N/A
Время анализа/образец	2-3 мин	3-5 мин	2-3 мин	5-8 мин	5-8 мин	6 мин (BCA) 10 мин (IgG)
Количество образцов/картридж	200; 800 для 4-канального	200; 800 для 4-канального	100	100; 400 для 4-канального	100	100; 400 для 4-канального
Потребление образца/анализ	<0,1 мкл	<0,1 мкл	<0,1 мкл	<0,1 мкл	<0,1 мкл	<0,1 мкл
Рекомендуемый объем образца	0,1 мл пробирка: 10 мкл; 0,2 мл: 20 мкл ***Микропробирки: 2 мкл					
Гарантированный срок хранения	6 мес.	6 мес.	4 мес.	4 мес.	4 мес.	4 мес.

Различные картриджи

Размер/концентрация

#ДНК



Различные картриджи

Размер/концентрация

#РНК#Белки

РНК

Белок



Картридж для РНК (R1)

КК общей РНК

КК мРНК

КК CRISPR



Картридж для разделения белков по MW (ДДС-Na) (P2)

Диапазон размеров: 11-155 kDa

Замена электрофореза в денатурирующем ПААГ для оценки чистоты IgG



Картридж для высокочувствительного детектирования РНК NR1

Анализ РНК низкой концентрации

КК CRISPR

5 нг/мкл
(1 нг/мкл в воде)

1 нг/мкл
(0,2 нг/мкл в воде)

Правильный выбор картриджа для получения безупречных результатов

#ДНК

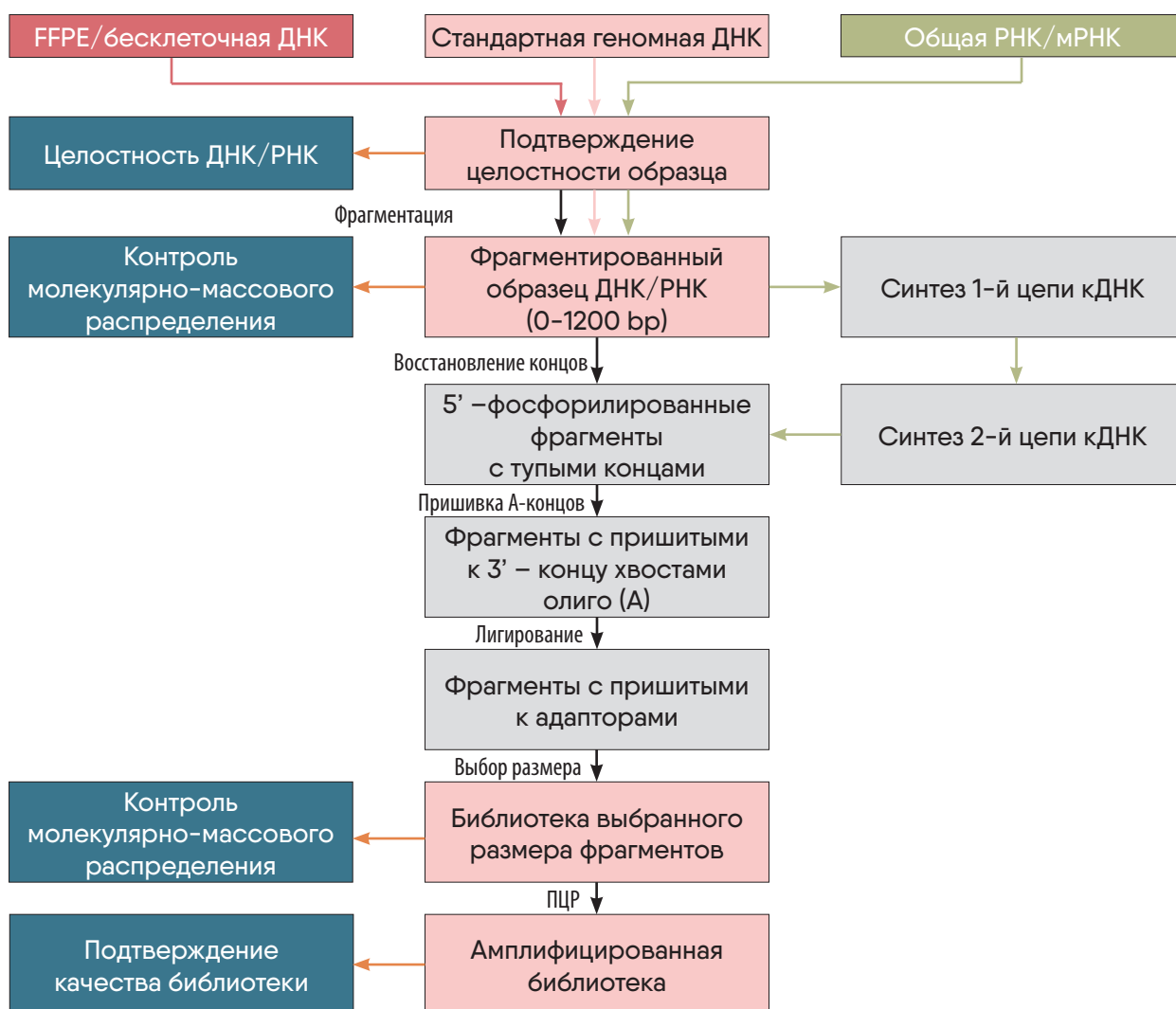
	Стандартный (S2)	Высокого разрешения (S1)	Для разделения килобазных фрагментов (S3)	Для быстрого разделения (F3)	Для высокочувствительного детектирования (N1)	Для высокочувствительного детектирования килобазных фрагментов (N3)
Скрининг продуктов ПЦР	✓	✓		✓		
RFLP	✓	✓		✓		
Очистка плазмид и анализ клонирования векторов			✓			✓
КК NGS	✓					
Анализ геномной ДНК			✓			✓
Анализ высокомолекулярной ДНК			✓			✓
Детекция бесклеточной ДНК					✓	
Анализ ДНК низкой концентрации					✓	✓
КК общей РНК						
КК мРНК						
Анализ РНК низкой концентрации						
Анализ и КК CRISPR	✓	✓				
Анализ белков						
Определение степени очистки белка						

#РНК#Белок

	Для РНК (R1)	Для высокочувствительного детектирования РНК (NR1)	Для разделения белков по MW
Скрининг продуктов ПЦР			
RFLP			
Очистка плазмид и анализ клонирования векторов			
КК NGS			
Анализ геномной ДНК			
Анализ высокомолекулярной ДНК			
Детекция бесклеточной ДНК			
Анализ ДНК низкой концентрации			
КК общей РНК	✓	✓	
КК мРНК	✓	✓	
Анализ РНК низкой концентрации		✓	
Анализ и КК CRISPR	✓	✓	
Анализ белков			✓
Определение степени очистки белка			✓

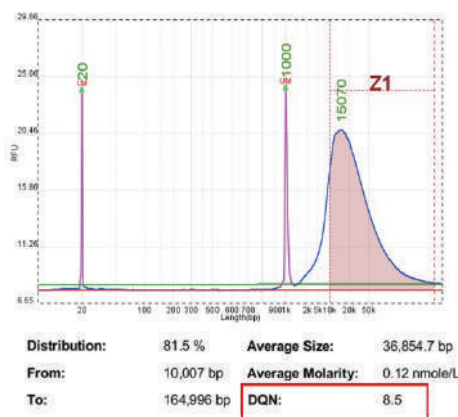
Секвенирование следующего поколения (NGS)

NGS широко используется в практике современных биологических и клинических исследований, биотехнологической промышленности. Поскольку эта область секвенирования быстро развивается, на рынок поступают разные коммерчески доступные модели секвенаторов NGS. Несмотря на то, что разные NGS-платформы используют различные принципы, этап подготовки образцов имеет важное значение для всех моделей, обеспечивая достоверные результаты анализа. В процедуре контроля качества образцов NGS существует несколько контрольных точек (см. след. рис.). Анализаторы Qsep позволяют оценить целостность образцов ДНК/РНК, молекулярно-массовое распределение и качество библиотек. Пользователям, заинтересованным в различной пропускной способности, BiOptic предлагает приборы различных типов. Можно анализировать от 1 до 96 образцов, повышая эффективность и снижая стоимость анализа.



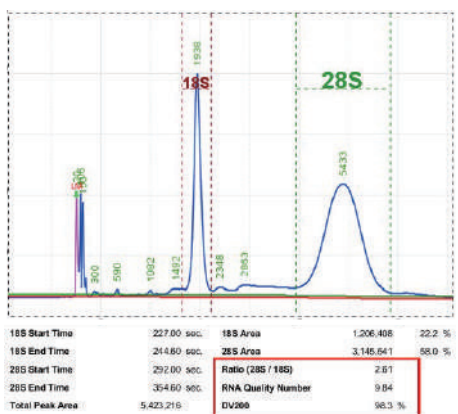
- Идеальная процедура КК: охватывает все этапы КК NGS – от контроля качества геномной ДНК и суммарной РНК до конечного этапа.
- Образец библиотеки. Все-в-одном: одновременное получение данных о размере и концентрации библиотеки в рамках одной аналитической последовательности (run).
- Гибкость: устраняет необходимость отбора образца, увеличивая эффективность процедуры.
- Надежный стандарт: снабжает этапы КК NGS стандартизованными средствами, например, индексами качества ДНК и РНК (DQN, RQN).

Этапы контроля качества в процедуре NGS с использованием анализаторов Qsep



Проверка целостности образца геномной ДНК (gDNA)

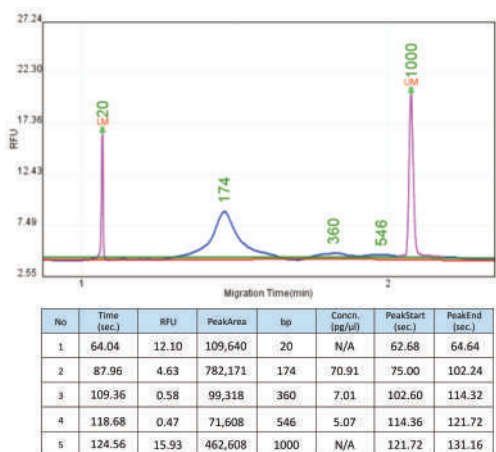
При использовании картриджей для высокочувствительного анализа и анализа высокомолекулярных (килобазных) фрагментов (S3 и N3) определение степени интактности (иначе – степени деградации геномной ДНК, гДНК) существенно упрощается. Программная функция определения индекса качества ДНК (DQN) рассчитывает степень деградации ДНК с использованием пороговых значений, задаваемых оператором, упрощает и формализует оценку интактности ДНК. Пример: Образец гДНК, проанализированный с использованием картриджа S3 и порогового значения 10Kb, имеет DQN 8,5 (максимально интактная ДНК имеет индекс DQN 10, максимально деградированная – близкий к 0).



Контроль качества общей РНК

Использование картриджей R1 и NR1 упрощает оценку качества общей РНК. ПО Q-Analyzer автоматически определяет расположение субъединиц рРНК, например, 18S/28S, после чего рассчитывает RQN, быстро оценивая пригодность РНК для дальнейшего использования. Дополнительно как показатель качества РНК, выделенной из парафиновых блоков определяется индекс DV200 (относительное количество цепей РНК, длина которых превышает 200 нуклеотидов).

*Картридж R1 использует для анализа 50 нг/мкл РНК

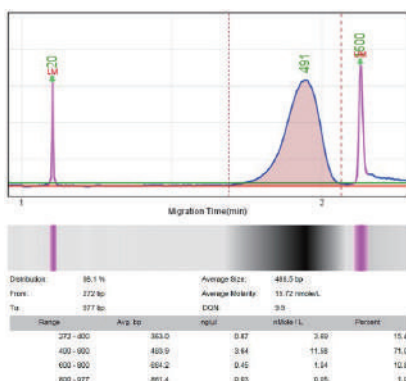


Контроль качества бесклеточной ДНК (cfDNA)

Системы Qsep, используя картридж для высокочувствительного детектирования (N1) за 2-3 мин определяет диапазон размеров и степень очистки cfDNA. ДНК детектируется даже в низкой концентрации (до 5 пкг/мкл), возможная контаминация гДНК легко обнаруживается. Пример: cfДНК в 0,5× буфере для разбавления анализировали в картридже N1.

Валидация фрагментированных образцов и образцов библиотек

Молекулярно-массовое распределение и концентрация – два важнейших параметра для определения качества фрагментированных или библиотечных образцов. Стандартный картридж (S2) для количественного анализа позволяет быстро получать достоверные результаты квалификации и количественной оценки за 2-3 минуты.



Контроль качества высокомолекулярной (НМВ) ДНК

Достижения быстро развивающейся биотехнологической промышленности делают возможным выделение все более и более длинных фрагментов ДНК высокой молекулярной массы, что благотворно сказывается на геномных исследованиях. Качество препаратов НМВ ДНК имеет высокую важность для последующих приложений, например, секвенирования «третьего» поколения. Появление картриджей для анализа килобазных фрагментов (S3, C105206) и картриджей для высокочувствительного анализа килобазных фрагментов (N3, C105253) для использования с анализаторами линейки Qsep знаменует собой появление новой платформы для анализа биомолекул, предлагающей быстрый и надежный, простой в производстве контроль качества НМВ ДНК.

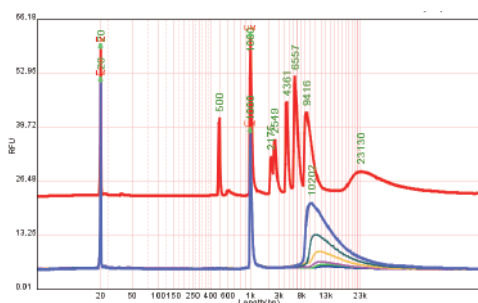
Особенности

- Широкий диапазон анализируемых размеров: до 60 Kbp
- Высокая чувствительность: предел детектирования (LOD) до 20 пкг/мкл
- Быстрый анализ: 4 образца/10 мин
- Высокая воспроизводимость: коэффициент вариации (CV) ≤ 2,0%
- Простой в управлении: запуск анализа всего в 3 этапа

Приложения

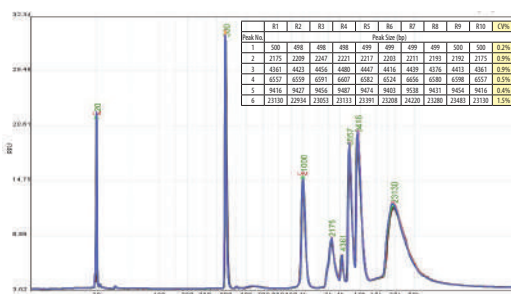
- КК плазмид
- КК гДНК
- КК библиотек секвенирования «третьего» поколения

Высокая чувствительность



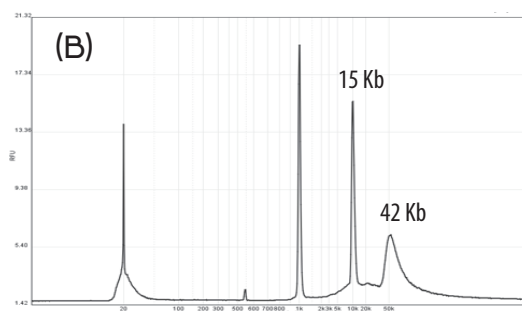
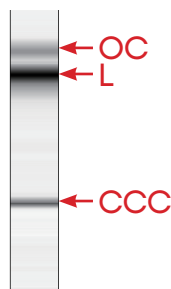
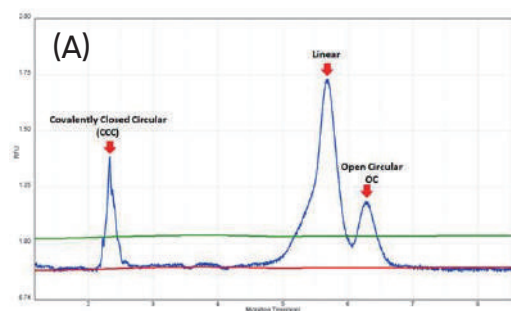
10Kb библиотеку разводили и анализировали с использованием картриджа для высокочувствительного детектирования килобазных фрагментов (N3) на анализаторе Qsep₁₀₀. Предел детекции (LOD) достигает 32,75 пкг/мкл.

Высокая воспроизводимость



Используя картридж S3 и систему Qsep₁₀₀, последовательно несколько раз анализировали размерный стандарт 500bp–23Kb (C109700). Результат демонстрирует высокую воспроизводимость (CV%) на уровне 2,0% для каждого пика.

Контроль качества плазмид

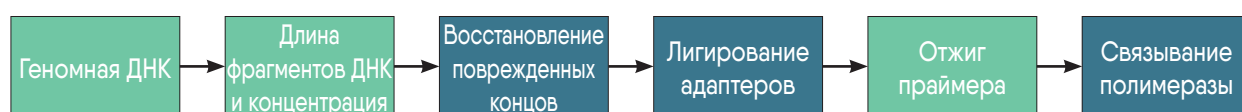


Электрофореграммы очищенной плазмидной ДНК. Анализ проводили на Qsep₁₀₀ и картридже S3. А) плазмидная ДНК демонстрирует 3 характеристические структуры: ковалентно замкнутая кольцевая (CCC), линейная (L) и открытая кольцевая (OC) формы плазмидной ДНК. В) Обработка плазмиды рестриктазой генерирует 2 фрагмента размером 15Kb и 42 Kb.

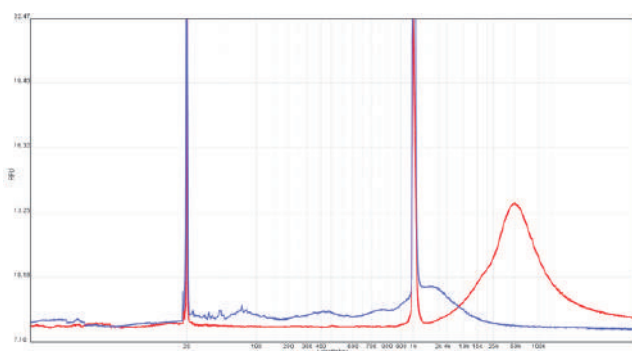
Контроль качества библиотек для секвенаторов «третьего» поколения

В настоящее время наиболее часто используются технологии секвенирования единичной молекулы в реальном времени (SMRT), представленные секвенаторами «третьего» поколения производства Pac Bioscience и Oxford Nanopore Technologies (Nanopore). Секвенирование «третьего» поколения поддерживает возможность генерировать длинные прочтения (≥ 10 kb), пригодные для высококачественной сборки генома. Однако, для обеспечения квалифицированного прочтения после секвенирования создание библиотек и контроль их качества имеет важное значение для всего процесса.

Платформы серии Qser способны разделять фрагменты до 60 Kb, являясь мощным инструментом контроля качества дизайна библиотек. Более того, Qser демонстрирует высокую чувствительность и воспроизводимость, давая возможность ученым получать надежные высококачественные результаты даже с ограниченным количеством образца на входе. Эта особенность имеет особое значение для секвенирования «третьего» поколения, когда доступность длинных ридов и качественных лабораторных конструкторов особенно необходимы для точного генетического анализа.



Блок-схема построения библиотеки для секвенирования «третьего» поколения: процесс состоит из нескольких этапов, основные точки контроля качества выделены зеленым цветом



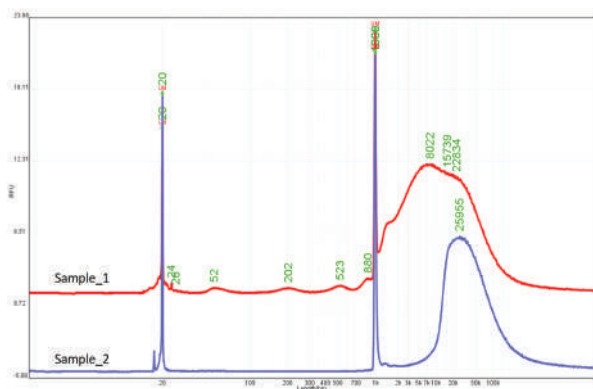
гДНК-1

Распределение 81,7%
От 1372 bp
До 164955 bp
Средний размер 52707,2 bp
Средняя молярность 0,06 pmol/л
DQN 9,9

гДНК-2

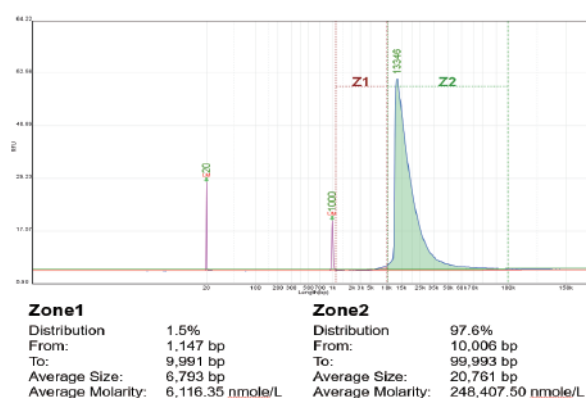
Распределение 43,2%
От 1341 bp
До 164829 bp
Средний размер 1277,2 bp
Средняя молярность 0,07 pmol/л
DQN 5,2

После экстракции два образца геномной ДНК анализировали в картридже S3 с использованием системы Qser₁₀₀. Первый образец (гДНК-1) характеризовался средним размером 52707 пар оснований и демонстрировал высокую степень интактности (индекс качества, DQN = 9,9). Вторым образцом (гДНК-2), по контрасту, демонстрирует частичную деградацию (DQN = 5,2).



Геномную ДНК фрагментировали с использованием Covaris® g-TUBE® для подготовки 10 Kb библиотеки.

Полученную ДНК анализировали на S3 и Qser₁₀₀ до (Sample_1) и после (Sample_2) очистки.



Zone1

Distribution 1.5%
From: 1.147 bp
To: 9.991 bp
Average Size: 6.793 bp
Average Molarity: 6.116.35 nmole/L

Zone2

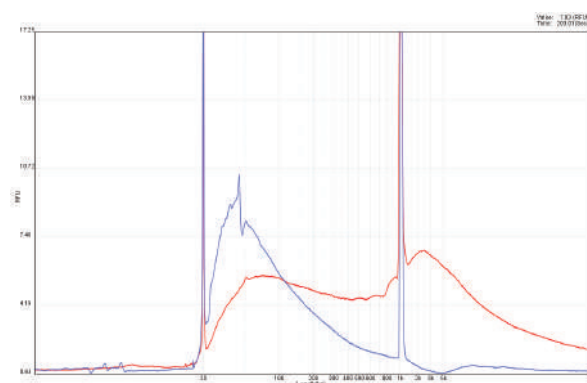
Distribution 97.6%
From: 10.006 bp
To: 99.993 bp
Average Size: 20.761 bp
Average Molarity: 248.407.50 nmole/L

Электрофореграмма ДНК-библиотеки, подготовленной для секвенирования SMRT набором SMRTbell 10Kb производства PacBio. Библиотека демонстрирует граничные условия анализа на Qser₁₀₀.

Анализ образцов, экстрагированных из парафиновых блоков (FFPE)

Использование образцов тканей, погруженных в расплавленный парафин, для исследования различных патологий, предоставляет неоценимые возможности для профилирования экспрессии генов и обнаружения различных болезней. Хранение парафиновых блоков при комнатной температуре экономически оправданно по сравнению с хранением замороженных образцов тканей при экстремально низких температурах из соображений удобства работы, затрат ручного труда и требований к лабораторному пространству. В данном исследовании парафиновые блоки служат источником ДНК, РНК и белков в архивных и хорошо задокументированных материалах. Качество образцов в тканях, залитых парафином, играет решающую роль в такого рода исследованиях, учитывая, что даже тщательно сохраняемые образцы тканей демонстрируют некоторую степень деградации ДНК и РНК, при том, что белки, как правило, инактивируются.

Оценку качества ДНК и РНК, извлеченных из парафиновых блоков, выполняли, используя системы Qsep, которые делают возможным четкую визуализацию степени интактности ДНК. Многие образцы нуклеиновых кислот демонстрировали детектируемый профиль, будучи разбавленными даже в 10 раз. Используя функцию Smeag, оператор может задать пороговое значение, что позволяет ПО автоматически генерировать значение, известное, как DQN (DNA Quality Number, «индекс качества ДНК»). Эта величина означает часть ДНК, удовлетворяющую заданному пороговому значению, и может изменяться в диапазоне от 0 до 10. Более высокое значение коррелирует с большим количеством высококачественной ДНК.



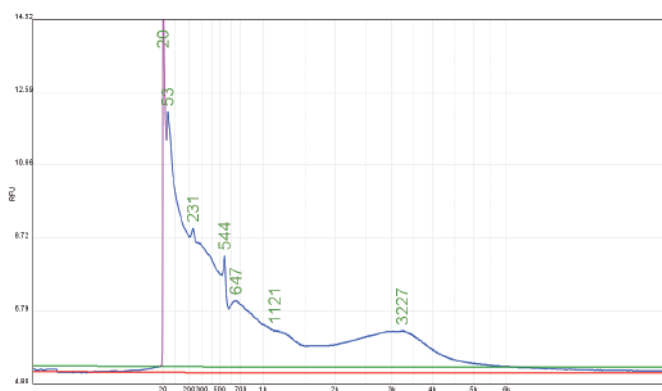
Образец1

Распределение 67,7%
От 200 bp
До 29067 bp
Средний размер 6195 bp
DQN 6,8

Образец2

Распределение 18,9%
От 200 bp
До 29992 bp
Средний размер 2592 bp
DQN 1,9

Два образца ДНК, экстрагированной из парафиновых блоков, анализировали с помощью картриджа S3 и системы Qsep₁₀₀. DQN образца 1 выше аналогичного показателя образца 2, демонстрируя большую степень интактности ДНК.



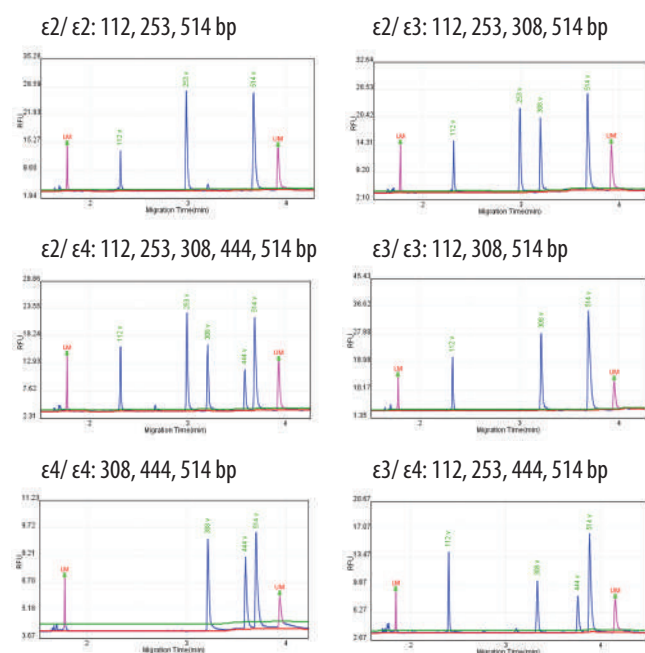
Общая площадь пика 100,0%
Площадь области 18S 1,6%
Площадь области 28S 0,5%
Соотношение (28S/18S) 0,32
RQN 1,17
DV200 56,5%

ПО Q-Analyzer автоматически рассчитывает параметр DV200, отражая относительное количество фрагментов длиной больше 200 нуклеотидов.

Анализ фрагментов ПЦР

ПЦР — часто используемая в лабораториях технология для амплификации за короткое время специфических фрагментов из небольшого количества биологического материала. Такие свойства ПЦР позволяют использовать ее в различных областях генетического анализа: идентификации, криминалистике, контроле качества в биоиндустрии и диагностике *in vitro*. Системы Qser полностью автоматизированы и обнаруживают фрагменты ДНК после амплификации. Они используют предварительно заполненные картриджи, существенно сокращающие время анализа и эффективно снижающие вероятность ошибок оператора в ходе работы. Кроме того, их использование обеспечивает точное определение размера фрагментов и воспроизводимые результаты. Кроме того, ПО Q-Analyzer автоматически составляет отчеты без вмешательства оператора, что упрощает процедуру ПЦР-анализа.

Генотипирование по ApoE

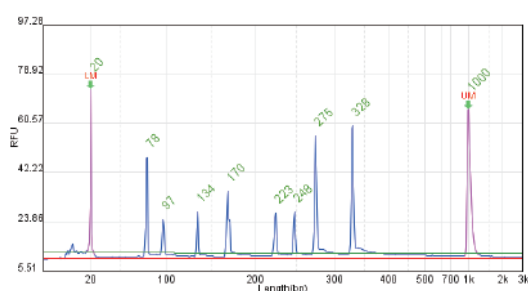


Набор для детекции аллелей ApoE (Qser-MDx APOE Genotyping Kit) использовали с картриджем S1 (кат. № C105202) для генотипирования по ApoE. Qser детектирует в геноме различные типы продуктов амплификации, определяя размер фрагментов в заданных оператором пределах. Функция автоматической идентификации пиков ПО Q-Analyzer детектирует и разделяет эти типы, позволяя обходиться без ручной интерпретации результатов электрофореза в агарозном геле.

Идентификация патогенов

Чем быстрее идентифицирован возбудитель, тем быстрее врач может назначить необходимую терапию. Рисунки ниже иллюстрируют использование Qser100 и картриджа S1 (кат. № C105202) для быстрой автоматической идентификации патогенов и создания отчета. Функция автоматической идентификации пиков ПО Q-Analyzer позволяет быстро анализировать данные, сокращая необходимость интерпретации результатов оператором вручную.

Детекция патогенов

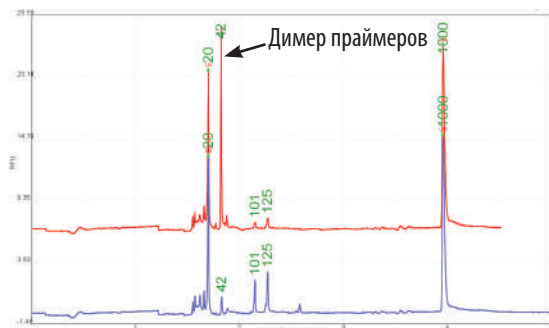


Отчет об идентификации пиков

No	Legend	Flag
1	Internal control	+
2	Staphylococcus aureus	+
3	Streptococcus pyogenes	+
4	Alcaligenes faecalis	+
5	Acinetobacter baumannii	+
6	Enterococcus faecium	+
7	Proteus vulgaris	+
8	Streptococcus agalactiae	+

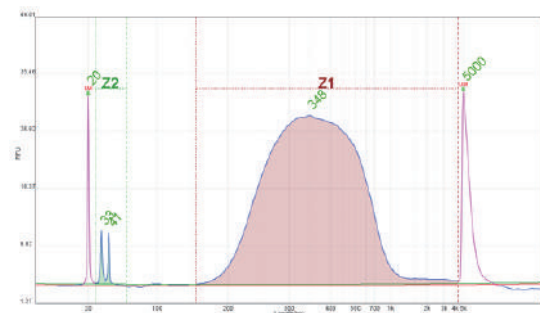
Проверка чистоты продуктов ПЦР

Использование картриджа S1 с системой Qsep100 позволяет оператору быстро идентифицировать димеры праймеров и оптимизировать процесс ПЦР. Q-Analyzer позволяет легко отличить по размеру ампликоны и димеры праймеров.



Генотипирование – димеры праймеров

Рисунок демонстрирует конструирование операторов праймеров для генотипирования, которые помимо ампликонов образуют димеры (обозначенные красным цветом). Образование димеров влияет на эффективность ПЦР. После оптимизации рабочего процесса количество димеров существенно сокращается (обозначено синим цветом, см. пик "42").

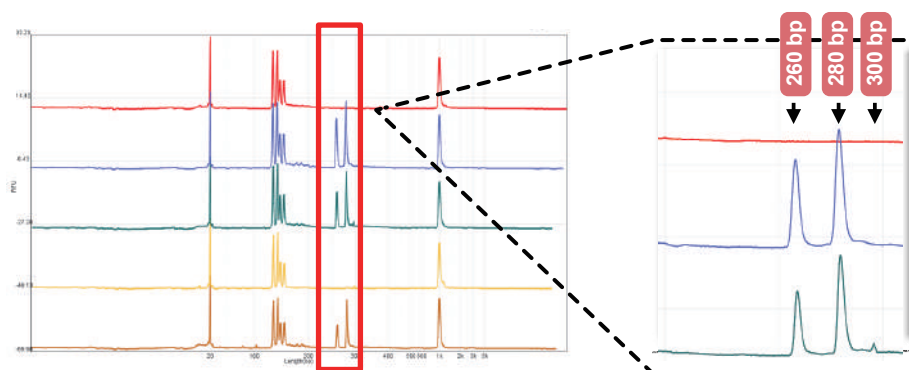


**Библиотека ДНК – остаточное количество
праймеров**

Рисунок демонстрирует присутствие остаточных праймеров в ходе подготовки библиотеки. Такие образцы могут значительно влиять на анализ NGS. Их рекомендуется удалять заранее или использовать альтернативные процедуры, чтобы уменьшить количество остаточных праймеров.

SSR/Микросателлиты

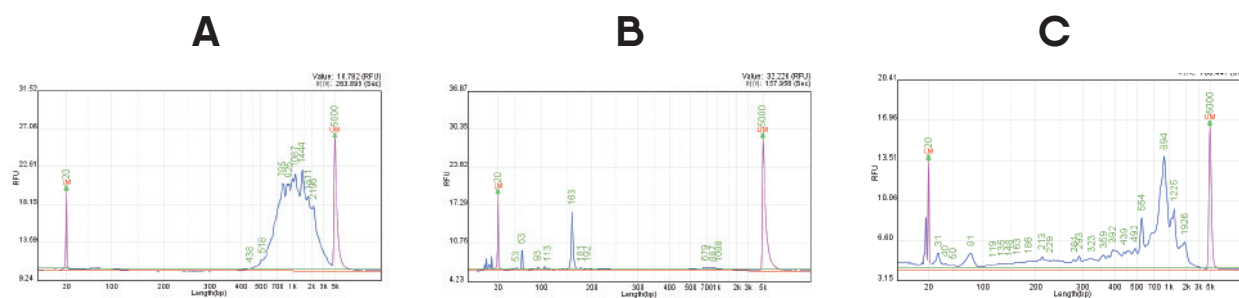
Внедрение в рабочий процесс систем Qsep, предлагающих высокоточный анализ с высокой пропускной способностью, значительно улучшает процедуру анализа библиотек микросателлитных маркеров SSR (STR). Рисунок демонстрирует идентификацию различных маркерных пиков генотипа человека. Различное количество зеленых и красных пиков показывает наличие генотипов, отличающихся от других. Идентификацию генотипов выполняли на системе Qsep₁₀₀ с использованием картриджа S1.



Контроль качества кДНК

Комплементарная ДНК (кДНК) – искусственно синтезированная ДНК, созданная транскрибированием мРНК ферментом обратной транскриптазой (ОТ = «ревертаза»), и служит отражением первичной структуры и генетической информации, закодированной в мРНК. Синтез кДНК – существенный начальный этап различных молекулярных приложений, широко используется в NGS, анализе экспрессии генов, идентификации патогенов и т.д. Следовательно, проверка высокого качества кДНК имеет критическое значение.

Платформа Qsep – удобное и показательное решение для оценки качества кДНК, поскольку позволяет легко оценить как интактность, так и степень очистки образца кДНК.



Проверка качества кДНК с использованием Qsep.

- (A) Удовлетворительное качество кДНК
- (B) Неудавшийся синтез кДНК
- (C) Размытый профиль («хвост» = smear) кДНК.

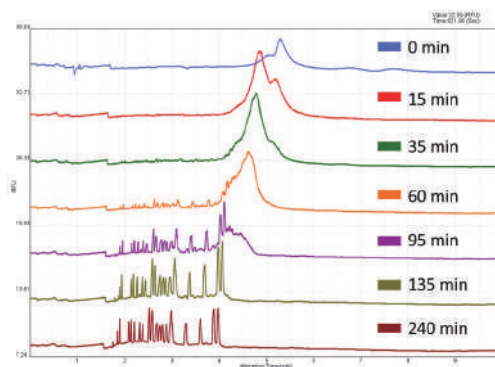
Анализ фрагментов рестрикции

Обработка ферментами рестрикции часто используется в молекулярно-биологическом анализе, поскольку позволяет расщеплять ДНК на более короткие фрагменты с использованием специальных ферментов, называемых рестриктазами. Эти ферменты распознают в последовательности ДНК специфические участки, которые называют сайтами рестрикции, и расщепляют крупную молекулу ДНК по этому сайту или рядом с ним.

Полученные фрагменты разделяют электрофорезом в геле в ходе выполнения так называемого анализа длин фрагментов рестрикции (RFLP). Сравнивая полученную картину с теоретическим шаблоном, построенным с учетом обнаруженных сайтов рестрикции, определяют, работает ли фермент, как предсказано.

Отличающиеся размеры фрагментов свидетельствуют о наличии мутаций в сайтах рестрикции. Мутации могут создавать или уничтожать сайты распознавания, препятствуя предсказанной работе фермента. Такая информация имеет значение в генетическом картировании, идентифицируя однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), позволяя проводить так называемый анализ «дактилоскопии» (fingerprinting) ДНК.

Qsep позволяет оценивать эффективность или обработку рестриктазами в реальном времени сравнением шаблонов, полученных через некоторые промежутки времени.



Плазмидная ДНК pBR322 в ходе ферментативной обработки рестриктазой Msp I

Контроль качества одноцепочечных олигонуклеотидов

Одноцепочечные олигонуклеотиды приобретают важное значение в терапевтических подходах персонализированной медицины (таргетной терапии).

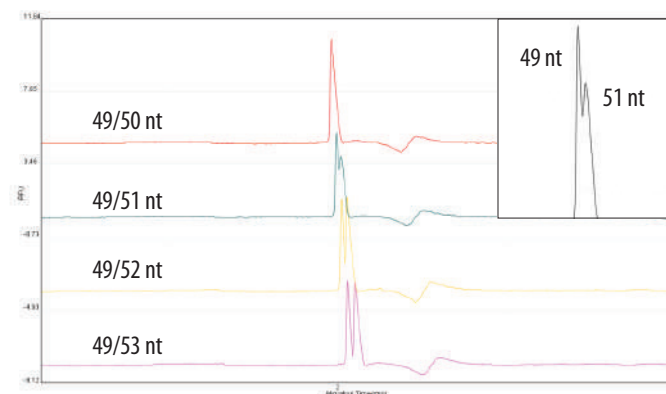
Платформа Qser представляет собой оптимальное решение для КК, поскольку обеспечивает высокочувствительный автоматизированный анализ с разрешением до 2 пар оснований и сохранением данных в цифровом формате. При этом системы помогают оператору оценивать результат работы и настраивать процедуру для оптимизации процесса в целом.

Тестирование чистоты препарата олигонуклеотидов



В производстве олигонуклеотидов очистка является значимым этапом, который осуществляется, чтобы удалить контаминацию из конечного продукта. Использование картриджа для высокочувствительного детектирования N1 (кат. № C105105) позволяет оператору подтвердить чистоту препарата.

Высокое разрешение – синтез олигонуклеотидов

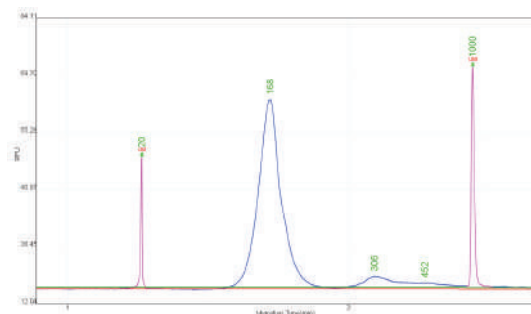


Используя картридж для детекции с высоким разрешением (S1, C105202), оператор может оценить результат синтеза. Разрешение в 2 пары оснований (на рис. – в 2 нуклеотида) верифицирует наличие/отсутствие побочных продуктов синтеза.

Контроль качества бесклеточной ДНК

Как известно, бесклеточная ДНК (cfDNA) циркулирует как в норме, так и при патологии, ее обнаруживают в различных биологических жидкостях: в плазме, сыворотке, спинно-мозговой жидкости (СМЖ) и слюне. Значимость ее обнаружения возрастает в неинвазивном пренатальном тестировании (NIPT) и жидкой биопсии в диагностике рака, когда важно обнаружить свободно циркулирующую ДНК (cfDNA). Эффективность клинических приложений сильно зависит от качества образцов cfDNA.

Для анализа cfDNA БиОптик предлагает картридж для высокочувствительного детектирования, N1, с использованием которого можно детектировать целевой продукт даже на пикограммовом уровне, решающий аргумент при анализе cfDNA, присутствующей в биологических жидкостях в низкой концентрации (в диапазоне 1–100 нг/мл плазмы, например). Qser позволяет с высокой надежностью определить размер и степень очистки препарата cfDNA за время анализа в пределах 2–3 мин.

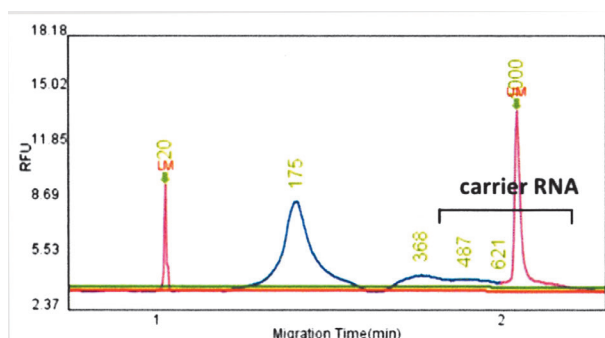


Препарат cfDNA после экстракции содержит РНК-носитель.

Контроль качества cfDNA: cfDNA, экстрагированную из 1 мл цельной крови с использованием автомата iCatcher (CatchGene), анализировали на Qser₁₀₀ и картридже N1.

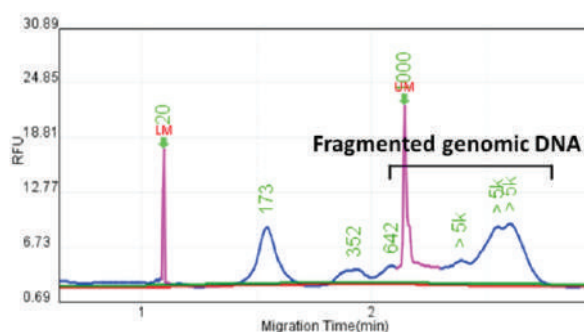
Оценка размера: размер cfDNA обычно лежит в диапазоне 160–200 bp.

Проверка чистоты препарата: верифицирует наличие РНК-носителя или геномной ДНК в препарате cfDNA.

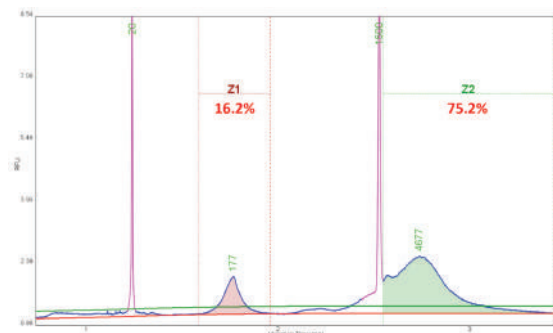


Сигнал РНК-носителя объединен с мультимерами, присутствующими в образце

Препарат cfDNA загрязнен геномной ДНК (гДНК).



Qser в состоянии определить не только загрязнение гДНК, но может также рассчитать процентное содержание cfDNA в образце. Это помогает оператору решить, удовлетворяет ли качество препарата cfDNA требованиям следующих экспериментов. Вот наглядный сценарий: cfDNA готова к NGS; однако, в ходе исследования обнаружено присутствие контаминации ~80% гДНК. Высокий процент контаминации гДНК несет риск процессу подготовки библиотеки NGS.



Zone1

Распределение: 16,2%
От: 120 bp
До: 241 bp
Средний размер: 175,0 bp

Zone2

Распределение: 75,2%
От: 1679 bp
До: 44966 bp
Средний размер: 6465,7 bp

Ключевые параметры

- Быстрый анализ: получение результатов за 2–3 мин.
- Высокая чувствительность: cfDNA можно охарактеризовать при концентрациях ~5 пкг/мкл.
- Выявление загрязнений: возможность идентифицировать загрязнение гДНК и остаточные количества РНК-носителя.

Контроль качества РНК

Учитывая широчайшую распространенность РНКаз, обеспечить интактность анализируемой РНК представляется непростой задачей. Дегградация полимерной молекулы ферментами РНКазами является основной причиной неудач экспериментов. Следовательно, оценка качества РНК становится основной задачей для постановки последующих экспериментов, особенно при проверке качества библиотек NGS.

Для оценки качества препарата общей РНК БиОптик рекомендует картридж R1 для анализа РНК. ПО Q-analyzer, составная часть анализаторов серии Qser, в качестве характеристики качества предлагает индекс качества РНК (RQN). Для вычисления RQN ПО просматривает всю электрофореграмму, обращая особое внимание на области с меньшими временами выхода и области предположительного размещения 28S и 18S для расчета соотношения и оценки степени дегградации РНК (снижение соотношения 2:1). Кроме того, для низкой концентрации РНК рекомендуются картриджи для высокочувствительного детектирования, NR1 (это также сокращает объем РНК для анализа).

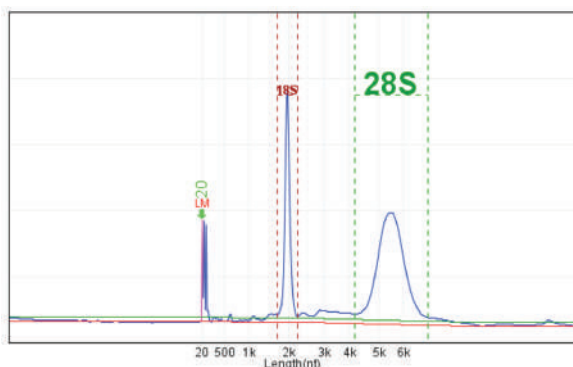
Особенности

- Два типа РНК-картриджей для различных концентраций образца
- Минимальный требуемый для анализа объем 2 мкл
- Автоматическое определение RQN и DV200

Приложения

- Оценка качества препарата общей РНК
- Алгоритм RQN определения качества РНК
- Оценка DV200 для анализа архивной РНК, выделенной из парафиновых блоков.

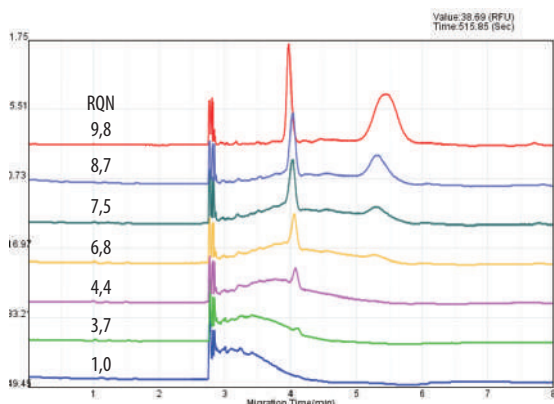
Автоматическое определение 18S/28S



В итоговой таблице автоматически идентифицируются пики 18S и 28S рРНК. Отображаются сопровождающие РНК-данные, включая соотношение 28S/18S и концентрация индивидуальных пиков относительно общей площади. Значение DV200 рассчитывается из процентного содержания фрагментов, длина которых превышает 200 нуклеотидов.

Общая площадь пика	100,0%
Площадь пика 18S	21,9%
Площадь пика 28S	57,2%
Соотношение (28S/18S)	2,01
RQN	9,84

Коэффициент качества РНК (RQN)

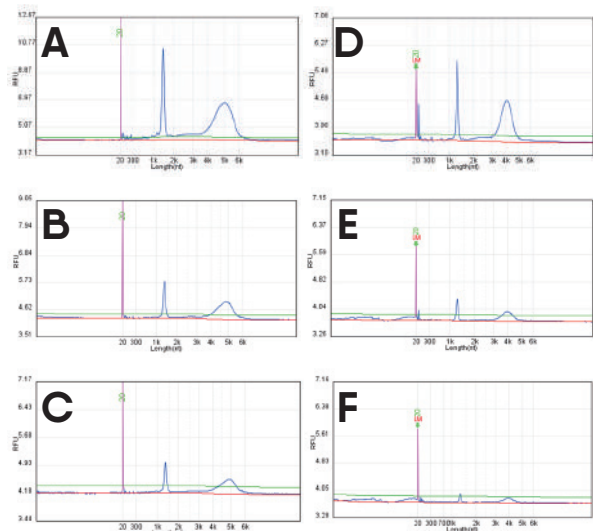


Качество и степень дегградации РНК в значительной степени влияет на последующие приложения, например, ПЦР в реальном времени. Серия биофрагментных анализаторов Qser в состоянии детектировать даже незначительные степени дегградации РНК. ПО помогает оператору оценить интактность РНК по RQN: например, RQN 10 свидетельствует о нативной РНК, в то время как RQN 1 говорит о полной дегградации РНК.

Картриджи для высокочувствительного детектирования РНК в экстремально низкой концентрации

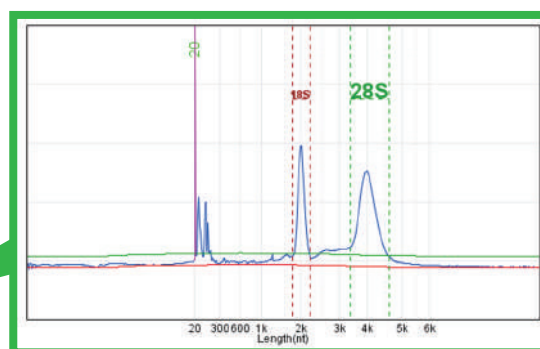
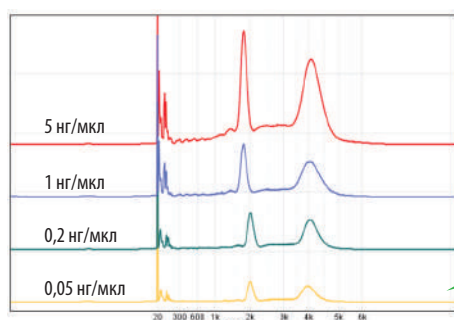
Высокочувствительный картридж для РНК, NR1

Картридж для РНК, R1



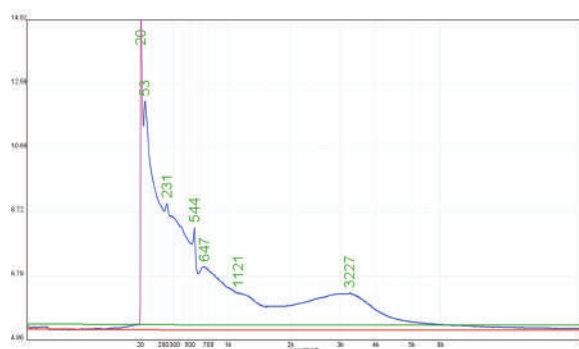
Рисунки слева иллюстрируют диапазоны детекции двух РНК-картриджей (А-С; D-F: 5, 1, 0,5 нг/мкл). Картридж NR1 способен детектировать РНК вплоть до концентрации 0,5 нг/мкл, а R1 – 1 нг/мкл. Такое решение позволяет разделить препараты по уровню концентрации РНК (см. таблицу ниже).

	NR1	R1
Концентрация РНК	1~20 нг/мкл	5~100 нг/мкл
Количество анализов	100	100
Срок годности	4 мес	4 мес



Картридж для высокочувствительного детектирования РНК (NR1) позволяет детектировать мизерные количества общей РНК (50 пкг/мкл, образец разведен в бидистилляте) при соотношении сигнала 18S к шуму 104,26.

Анализ РНК, выделенной из парафиновых блоков



Общая площадь пика	100,0%
Площадь пика 18S	1,6%
Площадь пика 28S	0,5%
Соотношение (28S/18S)	0,32
RQN	1,17
DV200	56,5%

В анализе РНК, выделенной из парафиновых блоков, DV200 является индикатором относительного количества фрагментов, длина которых больше 200 нуклеотидов. Прочие детали – см. подпись к рис. в разделе Анализ образцов, экстрагированных из парафиновых блоков (FFPE).

Анализ мРНК (контроль качества мРНК-вакцин)

Производство терапевтических средств и вакцин мРНК, как правило, начинается с транскрибирования РНК-полимеразой необходимой мРНК с плазмидной ДНК. От предотвращения деградации экзонуклеазами зрелая мРНК обычно требует наличия 5'-кэпа и 3'-хвоста поли (А). Для доставки мРНК обычно используются липидные наночастицы (LNP), способные инкапсулировать РНК, защищая ее таким образом от деградации и в то же время облегчая ее поступление в клетку посредством эндоцитоза. В клетке мРНК транслируется рибосомами в пептидные цепи, которые, в свою очередь, сворачиваются в белки.

На качество мРНК в ходе производственного процесса влияют различные факторы. При оценке качества мРНК учитываются следующие пять факторов:

- Точное воспроизведение первичной последовательности,
- Чистота,
- Концентрация,
- Степень деградации и
- Безопасность.

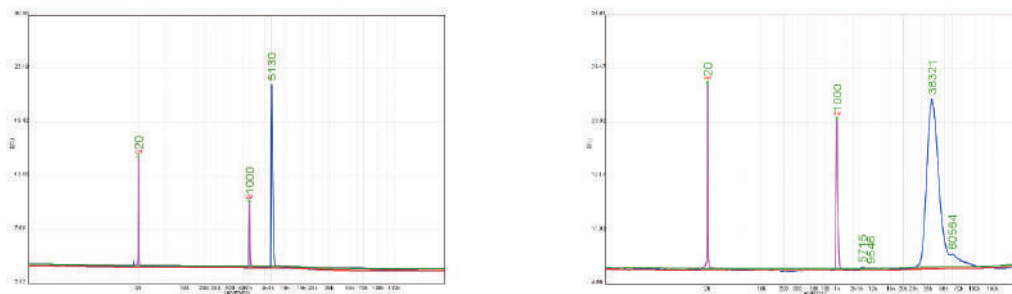
Эти критерии имеют решающую роль в общей оценке качества мРНК.

Контрольные точки анализа мРНК-вакцин с использованием Qsep



Обнаружение подходящей матрицы ДНК

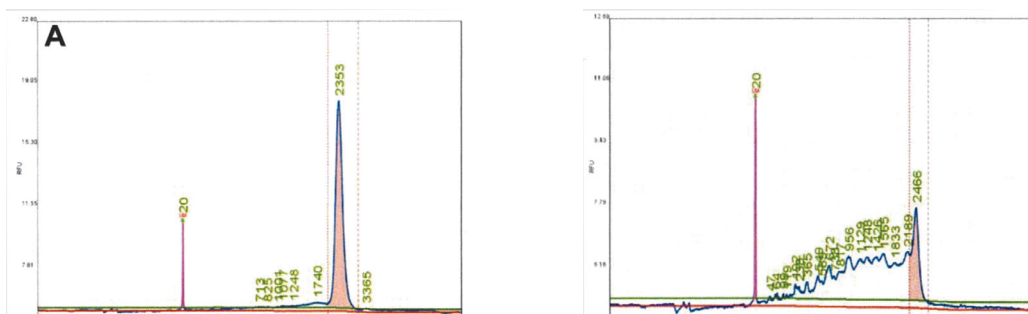
Чтобы получить мРНК хорошего качества (получения продукта правильного размера и чистоты) необходимо наличие такой же высококачественной матрицы ДНК для успешной инициации транскрипции с линейаризованной плазмиды или ампликонов. Высокие чувствительность и разрешение анализа капиллярным электрофорезом Qsep делает последние высокоэффективным инструментом оценки длины и чистоты препаратов матриц ДНК.



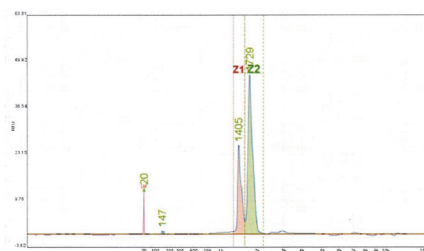
Qsep способен различать различные конфигурации плазмидной ДНК, на рисунке показаны движение в капилляре открытой кольцевой плазмиды и линейной ДНК.

Детекция РНК

1. Qsep обладает возможностью оценить интактность мРНК после транскрипции, используя площадь под пиком. Это измерение позволяет оценить степень деградации. Более того, Qsep можно использовать для оценки интактности мРНК после инкапсуляции в LNP.

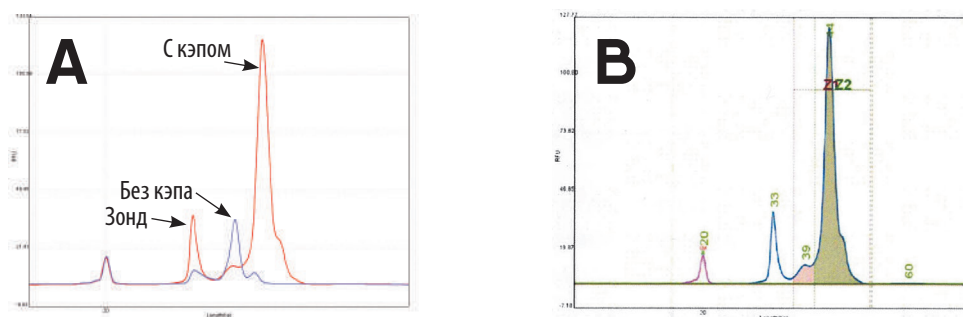


3. Для оценки качества молекул РНК важно проводить мониторинг циркуляризации. Кольцевая РНК с ковалентно сшитыми петлевыми структурами более стабильна, чем линейная РНК, поскольку устойчива к деградации экзонуклеазами. Qsep способен различать линейную и замкнутую формы РНК, делая возможной оценку качества и эффективности циркуляризации.



Различия подвижности кольцевой (красная заливка пика) и линейной (зеленая заливка пика) форм РНК.

 Эффективность кэпирования мРНК может оценить Qsep, как показано на рисунке ниже. Qsep детектирует мРНК с 5'-кэп-структурой и без нее за короткое время порядка 2 мин. Такой стандартизованный подход может существенно сократить время тестирования.

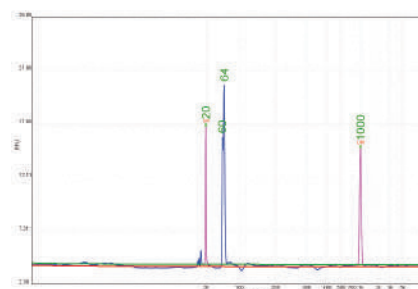


Оценка эффективности кэпирования.

(А) График разделения пиков мРНК с кэпом и без него (красным и синим цветом)

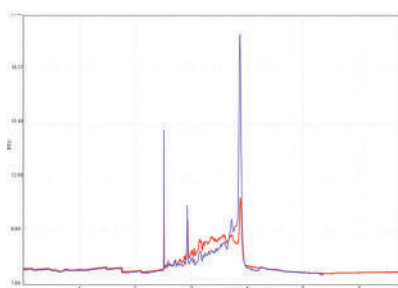
(В) Расчет эффективности кэпирования по площади под пиками (=94%, Zone 2).

 Qsep может подтвердить, соответствует ли длина poly(A) ожидаемой.



Хвост поли(А) ожидаемой длины ~65 нуклеотидов.

 Серия анализаторов Qsep предлагает возможность полностью автоматизированного анализа мРНК, инкапсулированной в LNP (липидные наночастицы). LNP служит в качестве основного переносчика РНК-вакцин, защищая нуклеиновую кислоту от деградации. С Qsep возможен эффективный мониторинг качества РНК.



Оценка качества мРНК, хранящейся при 37°C (синяя линия соответствует 5-дневному хранению, красная – 30 дням хранения).