

Мультиплексная система для SNP генотипирования SNaPshot® Multiplex System

Одна система - множество применений

Характеристики мультиплексной системы SNaPshot® Multiplex System:

- Подходит для целого ряда методик - анализа SNP и анализа статуса метилирования ДНК, фингерпринтинга, количественного анализа частот аллелей, подтверждения данных NGS и многих других задач
- Универсальное решение для любой задачи по генотипированию
- Возможность мультиплексирования (с детекцией до 10 SNP в одной пробирке)
- Чувствительное детектирование частот аллелей (возможность детектировать 5% минорного аллеля в образце)
- Совместима со всеми секвенаторами Applied Biosystems
- Автоматический анализ данных с помощью специального модуля в программном обеспечении GeneMapper® Software

Мультиплексная система SNaPshot® Multiplex System основана на методе достройки праймеров, который был разработан для анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) (Рис. 1). Благодаря мультиплексированию, в ходе одной реакции можно проанализировать вплоть до 10 SNP, вне зависимости от их расположения на хромосоме и от расстояния между соседними SNP-локусами. Такой анализ выгоден с точки зрения экономии, поскольку исследователи могут использовать немеченные, подходящие для своего эксперимента праймеры. Готовый микс с реактивами Multiplex Ready Reaction Mix (входит в систему) обеспечит получение

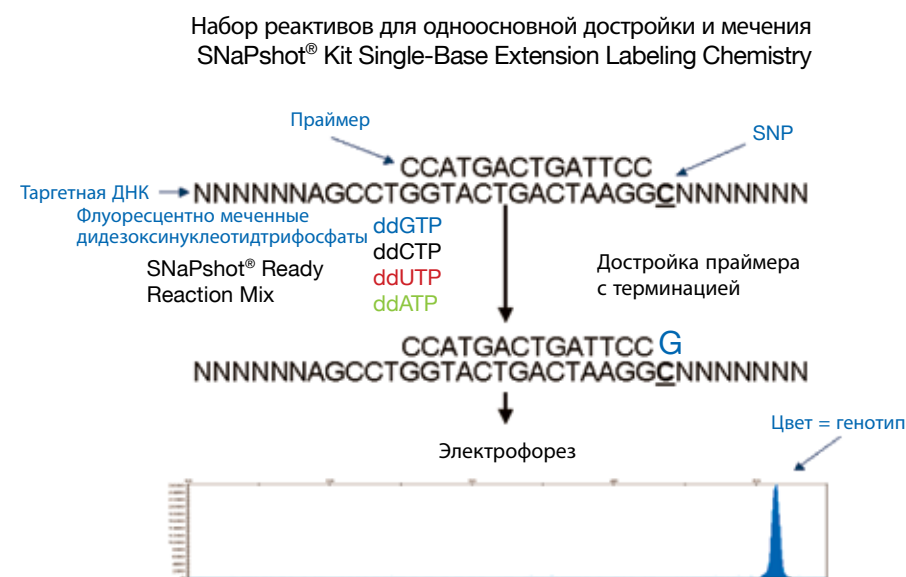


Рис. 1. Мечение с помощью SNaPshot® основано на однонуклеотидной достройке и терминации цепи ДНК. Набор SNaPshot® Multiplex Kit позволяет исследовать несколько SNP, для которых известно место их положения, в процессе всего одной реакции. Действие химии из набора основано на достройке немеченого олигонуклеотидного праймера (или праймеров) одним из дидезоксинуклеотидов (ddNTP). Каждый праймер отжигается на комплементарной последовательности в присутствии флуоресцентно меченых ddNTP и ДНК-полимеразы. Полимераза достраивает праймер одним нуклеотидом, добавляя единственный ddNTP на его 3' конец. Далее идентификация цвета флуоресценции позволяет определить, какое именно основание было добавлено.

надежных и воспроизводимых результатов при работе с мультиплексными образцами. Всего за один день на одном генетическом анализаторе 3730xl Genetic Analyzer можно исследовать вплоть до 23,000 SNP генотипов (Таблица 1).

Анализ SNP

SNP были обнаружены во всех геномах; их можно использовать для целого ряда исследований, в том числе для изучения мутаций, связанных с различными видами рака, генетических заболеваний, исследований митохондриальной ДНК, восприимчивости к прионным заболеваниям у овец, потери гетерозиготности, оценки качества

при производстве кормов для животных, и даже для дифференциации медикаментозных и немедикаментозных форм конопли. В Таблице 2 приведены некоторые примеры того, как пользователи применяют SNaPshot® Multiplex System в ходе своих исследований (Таблице 2). Расширенный список публикаций, демонстрирующих применение SNaPshot® Multiplex System, доступен на www.lifetechnologies.com/snapshot.

Таблица 1. Пропускная способность генетических анализаторов Applied Biosystems при анализе SNP. Значения в таблице отображают количество SNP, которое может быть проанализировано в процессе 24-часовой работы прибора и анализе 10 SNP в каждом капилляре.

	310	3130	3130xl	3500	3500xL	3730	3730xl
Количество проанализированных SNP в день	480	3,840	15,360	3,840	11,520	21,120	42,240

Таблица 2. Публикации, в которых использовалась система SNaPshot® Multiplex System. Другие публикации можно найти на www.lifetechnologies.com/snapshot.

Тип исследования	Метод	Название	Журнал
Анализ SNP	Дифференциация медикаментозных и немедикаментозных форм конопли	Дифференциация медикаментозных и немедикаментозных форм конопли методом анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).	<i>Forensic Sci Int</i> 207:193 (2011)
	Мутация резистентности к антиретровирусным препаратам	Предварительный скрининг мутаций резистентности обратной транскриптазы ВИЧ-1 у пациентов с подтипом В с использованием нового мультиплексного анализа с достройкой праймеров.	<i>Curr HIV Res</i> 7:398 (2009)
	Маркеры <i>Arabidopsis</i>	Разработка высокоэффективного набора маркеров для <i>Arabidopsis</i> на основе SNP.	<i>Plant J</i> 36:122 (2003)
	Исследования качества свинины	Минисеквенирование SNaPshot и панель кандидатных генов для комплексного рутинного тестирования качественных характеристик свинины.	<i>Anim Biotechnol</i> 18:109 (2007)
	Типирование крови	Выявление генов, отвечающих за группу крови, с помощью мультиплексного метода SNaPshot.	<i>Transfusion</i> 49:2012 (2009)
	Метод для исследования деградированных образцов	Разработка мультиплексного метода исследования SNP с отдельным подходом для исследования образцов деградированной ДНК.	<i>Nat Protoc</i> 1:1370 (2006)
	Подтверждение гетероплазмии после анализа NGS.	Выявление гетероплазмии с помощью высокопроизводительного секвенирования полных митохондриальных геномов человека.	<i>Am J Hum Genet</i> 87:237 (2010)
	Определение видов комплекса <i>M.tuberculosis</i>	Определение и генотипирование видов комплекса <i>Mycobacterium tuberculosis</i> с помощью метода на основе минисеквенирования SNaPshot.	<i>J Clin Microbiol</i> 48:1758 (2010)
	Потеря гетерозиготности (LOH)	Мультиплексное генотипирование SNaPshot для выявления потери гетерозиготности в генах репарации ошибочно спаренных оснований MLH1 и MLH2 в нестабильных микросателлитных опухолях.	<i>Clin Chem</i> 54:1844 (2008)
	Митохондриальные варианты	Митохондриальные мутации при шизофрении, биполярном расстройстве и клинической депрессии.	<i>PLoS One</i> 4:e4913 (2009)
	Устойчивость к патогенам	Однонуклеотидные полиморфизмы и гаплотипы в регионе гена IL10, ассоциированного с выведением вируса гепатита С (HCV).	<i>Genes Immun</i> 6:347 (2005)
	Скрининг на восприимчивость к Скрейпи (подострой спонгиозной трансмиссивной энцефалопатии)	Метод достройки праймеров для выявления прионно-белковых генотипов в овцах.	<i>Mol Cell Probes</i> 18:33 (2004)
	Селективное разведение лошадей	Определение генотипа гнедого цвета шерсти у лошадей с помощью SNaPshot.	<i>BMC Res Notes</i> 2:255 (2009)
	Определение видов в изолятах <i>Lactobacillus casei</i>	Применение минисеквенирования методом SNaPshot для выявления видов внутри группы <i>Lactobacillus casei</i> .	<i>Mol Cell Probes</i> 25:153 (2011)
	Определение подвидов тигров	Разработка и проверка мультиплексного метода SNaPshot для определения видов и подвидов тигров в судебно-медицинских целях.	<i>Forensic Sci Int Genet</i> (2011) [Epub ahead of print]
	Контроль селективного отбора породистых коров и их продукции	SNPmplexViewer - на пути к экономичному контролю селективного отбора породистых коров и их продукции.	<i>BMC Res Notes</i> 4:146 (2011)
	Разведение пшеницы	Сайт-специфические вставки маркеров полиморфизма открывают новые перспективы для насыщения генома и разведения пшеницы с помощью маркерного метода.	<i>Plant Biotechnol J</i> 8:196 (2010)

Тип исследования	Метод	Название	Журнал
Количественная оценка SNP	Количественная оценка мутантов	Предполагаемые клетки-предшественники раковых клеток колоректального рака человека.	<i>Int J Clin Exp Pathol</i> 2:154 (2009)
	Количественный SNP анализ частот аллелей	Универсальный и надежный метод количественного SNP анализа частот аллелей в ДНК-пулах.	<i>Hum Genet</i> 110:471 (2002)
	Аллельные вариации экспрессии генов человека	Аллельные вариации экспрессии генов человека.	<i>Science</i> 297:1143 (2003)
		Изменение экспрессии большего числа генов человеческого мозга за счет цис-регуляторных последовательностей.	<i>Hum Genet</i> 113:149 (2003)
ВАС фингерпринтинг	Высокопроизводительный фингерпринтинг искусственных бактериальных хромосом	Высокопроизводительный фингерпринтинг искусственных бактериальных хромосом с применением набора для мечения SNaPshot и определения размера фрагментов рестрикции с помощью капиллярного электрофореза.	<i>Genomics</i> 82:378 (2003)
Метилирование ДНК	Оценка метилирования ДНК	Метод однонуклеотидной достройки для количественной сайт-специфической оценки соотношения metC/C в GC-богатых участках.	<i>Nucleic Acids Res</i> 33:e95 (2005)
	Оценка метилирования ДНК	Анализ метилирования CpG-богатых участков с предварительной однонуклеотидной достройкой праймеров, обрабатываемых N6-метокси-2,6-диаминопуринами методом капиллярного электрофореза.	<i>Anal Biochem</i> 380:13 (2008)

Метилирование ДНК

Анализ эпигенетических эффектов, в том числе, метилирования, является важной частью генетических исследований. Для определения характеристик метилирования ДНК, обычно, обрабатывают бисульфитом для дезаминирования неметилированных цитозинов (превращая их в урацилы), при этом метилированные цитозины остаются в прежнем виде. После этого проводят ПЦР амплификацию, в результате которой урацилы превращаются в тимины. Исследователи могут использовать мультиплексную систему SNaPshot для того, чтобы выявлять изменения в соотношении цитозина и тимина в обработанных и необработанных образцах, определяя, таким образом, степень метилирования ДНК.

ВАС фингерпринтинг

Фингерпринтинг геномных библиотек из больших инсерционных фрагментов, также известных как ВАС (бактериальные искусственно-хромосомные) клоны, дает возможность создавать полногеномные физические карты. Такие карты необходимы для геномного секвенирования, позиционного клонирования и исследования организационных взаимосвязей между генами и маркерами. Когда библиотеки ВАС переносят на карты, отражающие хромосомные последовательности ДНК, такие карты становятся максимально информативными и удобными для использования. Для эффективного мечения фрагментов ВАС часто используют набор SNaPshot® Multiplex Kit. Меченые фрагменты

можно разделять и определять на любом приборе Applied Biosystems® для капиллярного электрофореза. Параметры, полученные из программы GeneMapper® Software, передаются далее в соответствующие программы по редактированию и сборке контигов. Высококачественные результаты работы с SNaPshot® Multiplex Kit позволяют применять данное простое и экономичное решение для высокопроизводительного фингерпринтинга ВАС.

Комплексное решение

Life Technologies предлагает решения для получения всех необходимых Вам данных по анализу SNP. Ключевые компоненты:

Мультиплексная система SNaPshot® Multiplex System

В систему также включена готовая смесь для проведения реакций SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix, смесь с контрольными праймерами, контрольный образец и протокол.

Набор SNaPshot® Primer Focus® Kit

Разработан для ориентировочной оценки размера фрагментов, полученных с помощью тестируемых праймеров. Используется перед проведением мультиплексных реакций SNP-генотипирования для предотвращения включения в анализ праймеров, формирующих в результате реакции продукты с перекрывающимися сигналами, и позволяет задавать узкие локусные окна (бины) в программе GeneMapper® Software.

Размерный стандарт

The GeneScan™ 120 LIZ® Size Standard

Данный стандарт является размерным стандартом, меченным красителем LIZ. Этот стандарт был разработан для воспроизводимой оценки размеров малых фрагментов, которые получаются при использовании системы SNaPshot® Multiplex System. Он позволяет точно измерять размеры образцов длиной от 20 до 120 нуклеотидов. При использовании вместе с программным обеспечением GeneMapper® Software, стандарт GeneScan™ 120 LIZ® Size Standard позволяет исключить необходимость определения аллелей (размеров) вручную.

Стандартный матричный набор Matrix Standard Set DS-02

Данный набор применяют для создания "мультикомпонентных матриц", необходимых для детекции красителей (dR110, dR6G, dTAMRA™, dROX™ и LIZ®), что является необходимым условием для успешного SNP-анализа с использованием пяти красителей на всех генетических анализаторах Applied Biosystems®.

Программное обеспечение

GeneMapper® Software

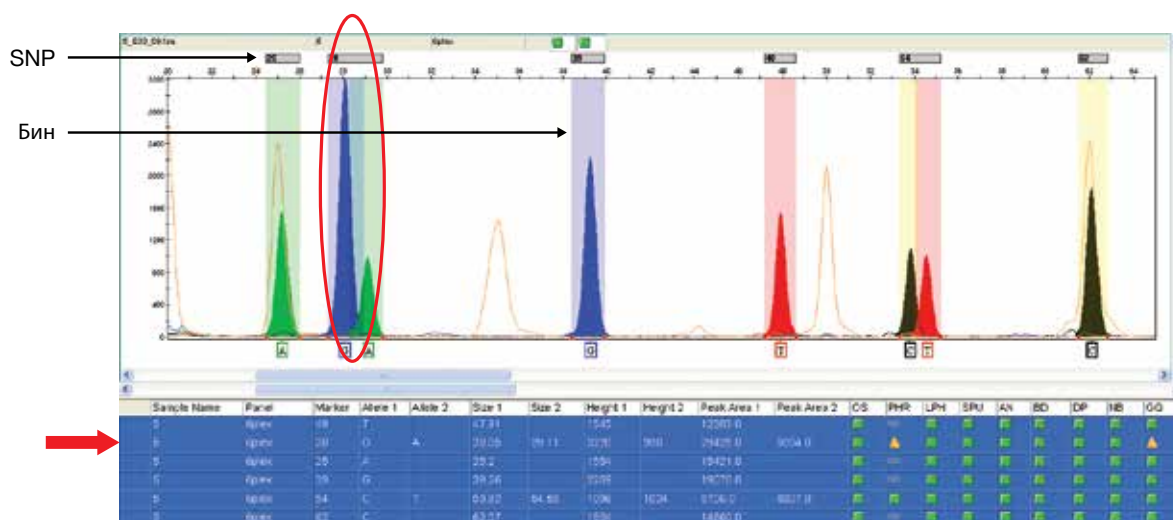
GeneMapper® Software применяют для целого ряда методик, в том числе для анализа SNP-генотипирования с использованием SNaPshot® Multiplex System.

Упрощенный анализ данных с помощью GeneMapper® Software

GeneMapper® Software – это гибкое программное обеспечение по анализу данных генотипирования, которое позволяет определять размеры фрагментов ДНК и точно выявлять аллели для всех капиллярно-электрофорезных систем генотипирования от Life Technologies®. Данную программу применяют для целого ряда методик, в том числе для анализа SNP-генотипирования

(Рис. 2). GeneMapper® Software помогает пользователям повысить эффективность обработки данных с помощью удаленного автоматического анализа и возможности управления с помощью командной строки; оно также подходит для многопользовательского управления через клиентский сервер. В программе используются параметры качества процесса (PQV) для автоматической идентификации, что снижает время по оценке данных

при высокопроизводительном генотипировании. Кроме того, характеристики, касающиеся защиты и регулирования данных, соответствуют требованиям 21 CFR 11. Для менее сложного анализа подходит также альтернативное бесплатное программное обеспечение Peak Scanner™ Software v2.0. Скачать его можно на www.lifetechnologies.com.



Фиг. 2. Пример результатов SNP-генотипирования, полученных с помощью программы GeneMapper. Вертикальные раскрашенные столбцы – бины, автоматически создаются программой на основе анализа образца или искусственного продукта элонгации, полученного с помощью набора SNaPshot® Primer Focus® Kit. Каждый бин определяет минимальные и максимальные возможные размеры для каждого аллеля. GeneMapper® Software идентифицирует каждый пик и определяет соответствующий ему аллель. В приведенном примере образец является гетерозиготным (G/A) по SNP 28. GeneMapper® Software создает отчет, в котором приводит результаты по генотипированию (в том числе данные по размеру, высоте и площади под кривой) и предоставляет данные по качеству образца (параметры качества процесса (PQV) в столбцах от OS до GG), что облегчает проверку данных для исследователя. Например, желтый треугольник в столбце с данными по относительной высоте пиков (PHR) означает, что отношение между двумя аллелями не попадает в рамки, заданные исходными параметрами анализа [50% для каждого аллеля]. Незаполненные пики (контуры пиков) являются пиками размерного стандарта GeneScan™ 120 LIZ® Size Standard.

Информация для заказа

Продукт	Количество	Номер по каталогу
Набор SNaPshot® Primer Focus® Kit	100 реакций	4329538
Набор SNaPshot® Multiplex Kit	100 реакций	4323159
Набор SNaPshot® Multiplex Kit	1000 реакций	4323161
Набор SNaPshot® Multiplex Kit	5000 реакций	4323163
Размерный стандарт GeneScan™ 120 LIZ® Size Standard	800 анализов	4324287
Стандартный матричный набор DS-02 Matrix Standard Set для набора красителей E5	8 анализов	4323014
Программное обеспечение GeneMapper® Software v4.1.1 или более поздняя версия	1	4366925 или 4475073
Программное обеспечение GeneMapper® Software v5, 30-дневная демо-версия (доступно для скачивания по ссылке http://resource.lifetechnologies.com/pages/WE28396/)	1	
Бесплатное программное обеспечение Peak Scanner™ Software v2.0 (доступно для скачивания по ссылке http://resource.lifetechnologies.com/pages/WE28396/)	1	