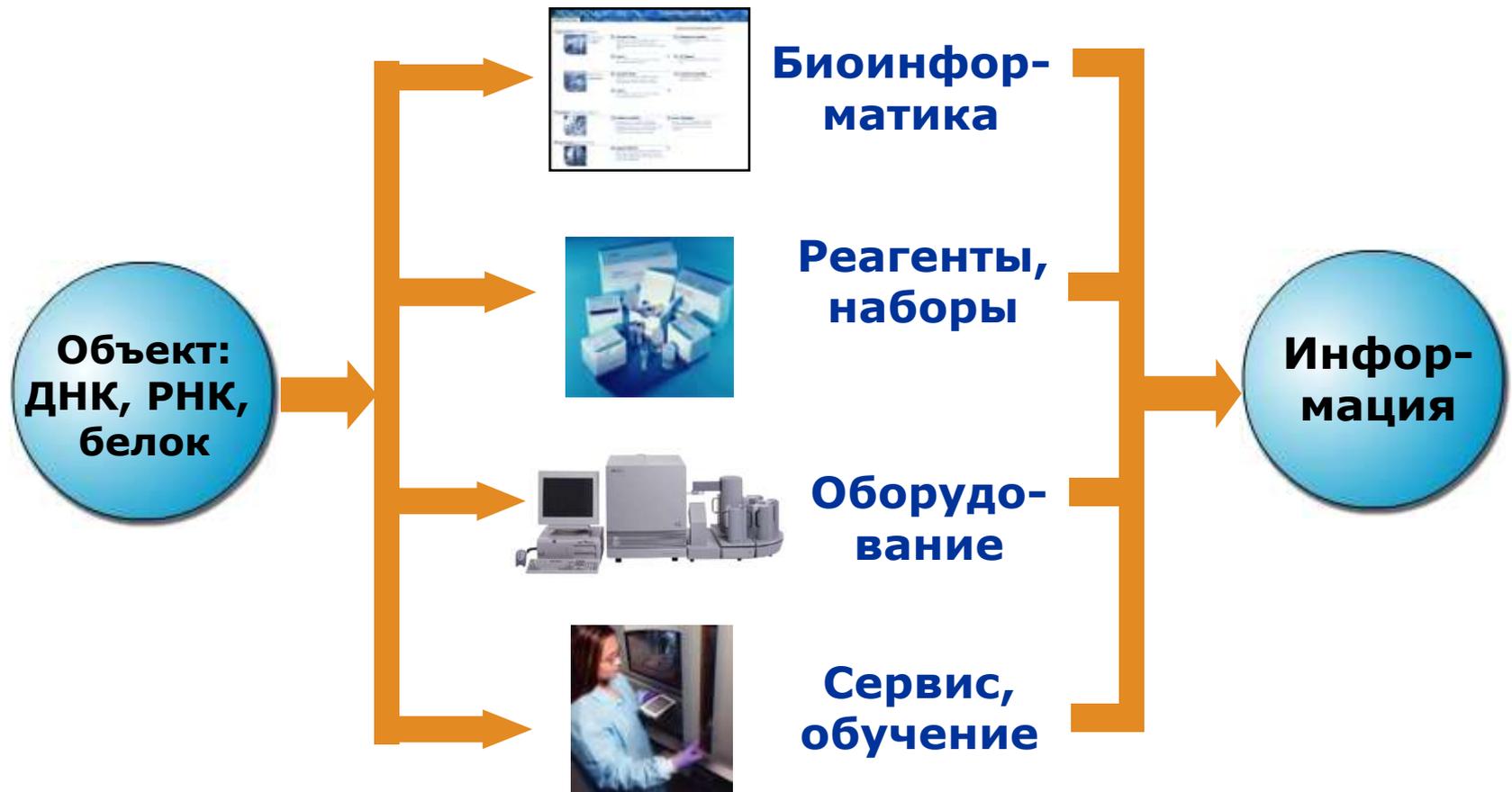


**Современные решения
Applied Biosystems для генотипирования,
микробиологического и вирусного
контроля**

Андреев С.Ю., к.х.н.

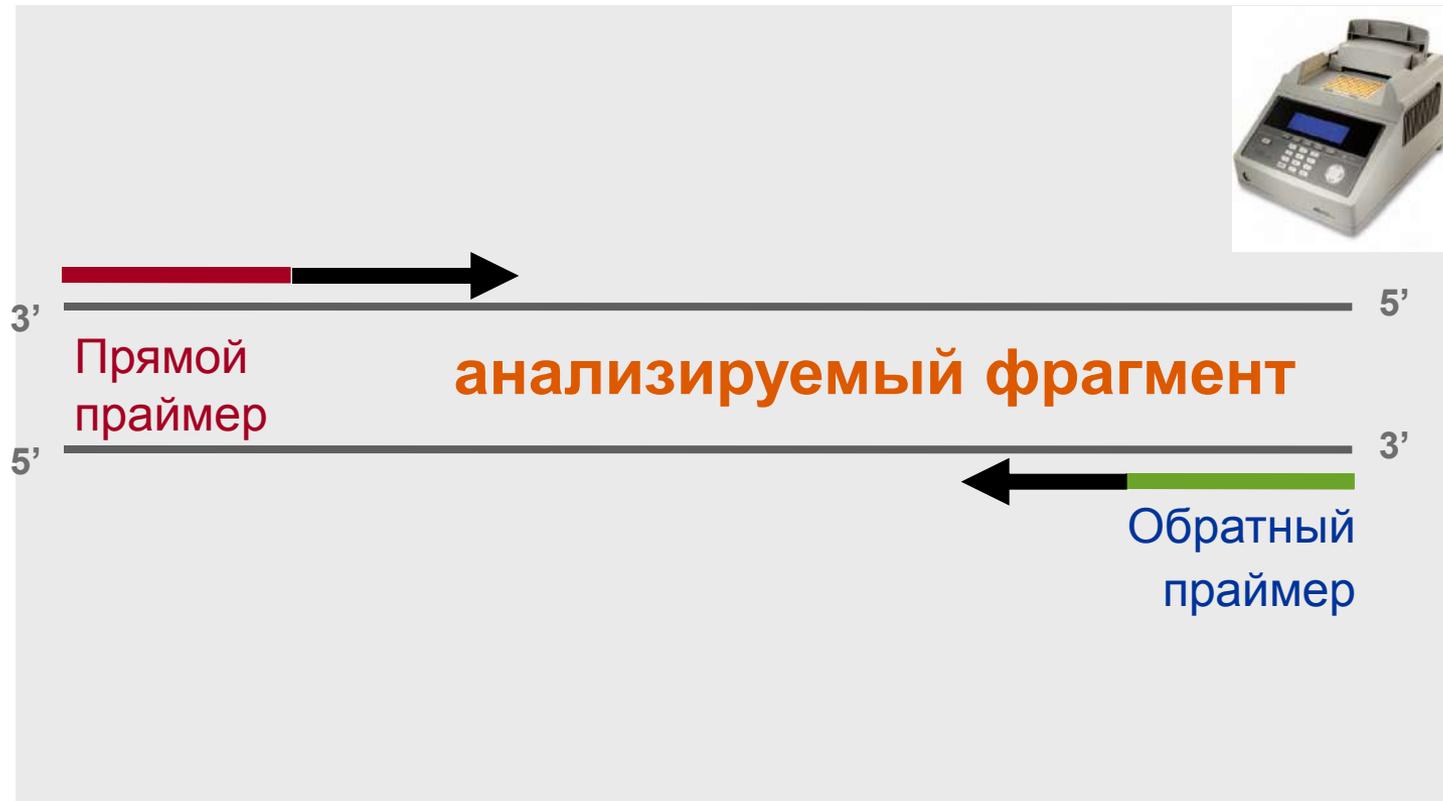
Московское представительство
Корпорации Applied Biosystems

Интегрированные решения Applied Biosystems



Анализ ДНК методом ПЦР: полимеразная цепная реакция

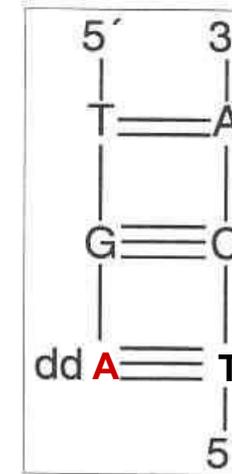
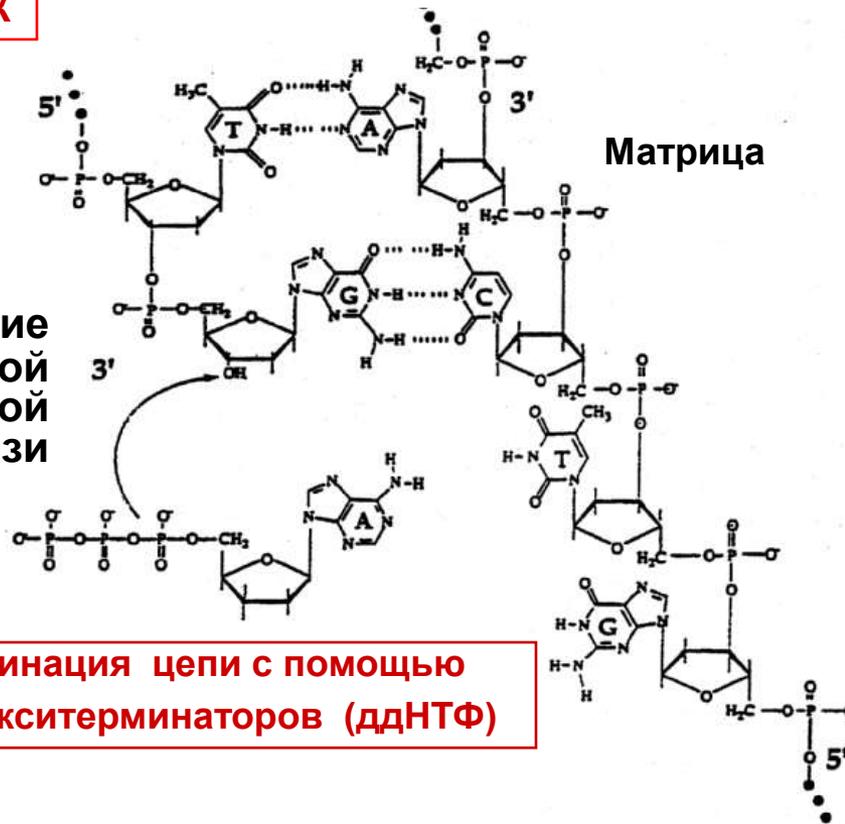
термоциклер



Секвенирование ДНК ферментативным методом по Сэнгеру

Синтез ДНК

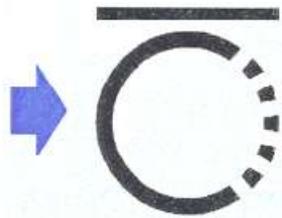
Образование ДНК-полимеразой фосфодиэфирной связи



Терминация цепи с помощью дидезокситерминаторов (ддНТФ)

Многоцветная флуоресценция при секвенировании

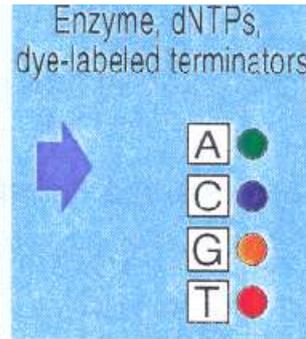
Денатурация



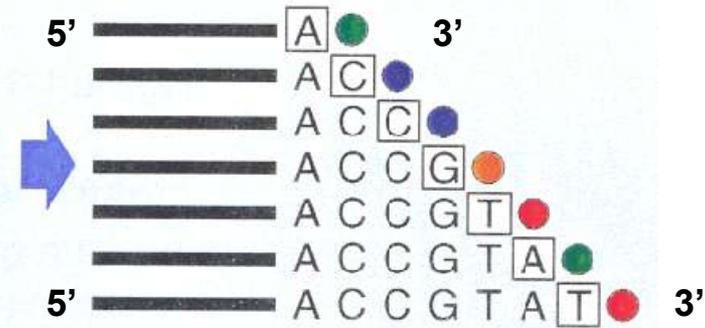
Отжиг



Элонгация

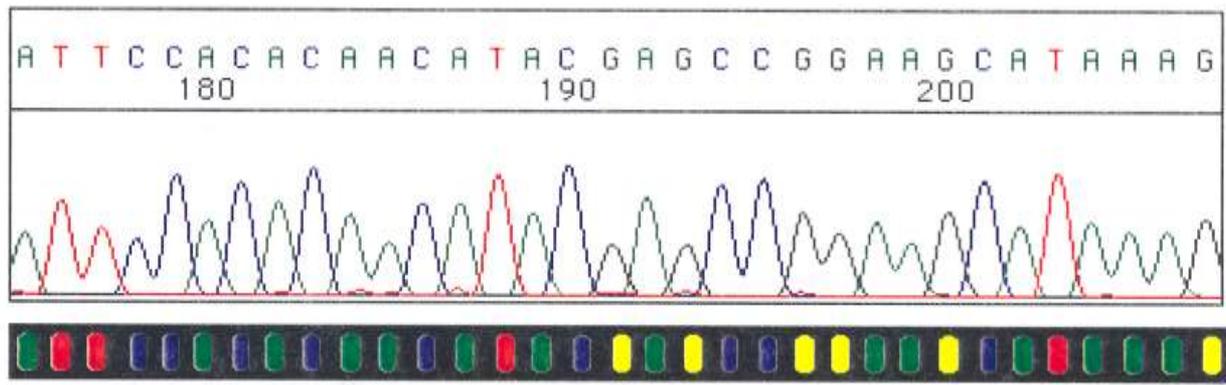


Продукты



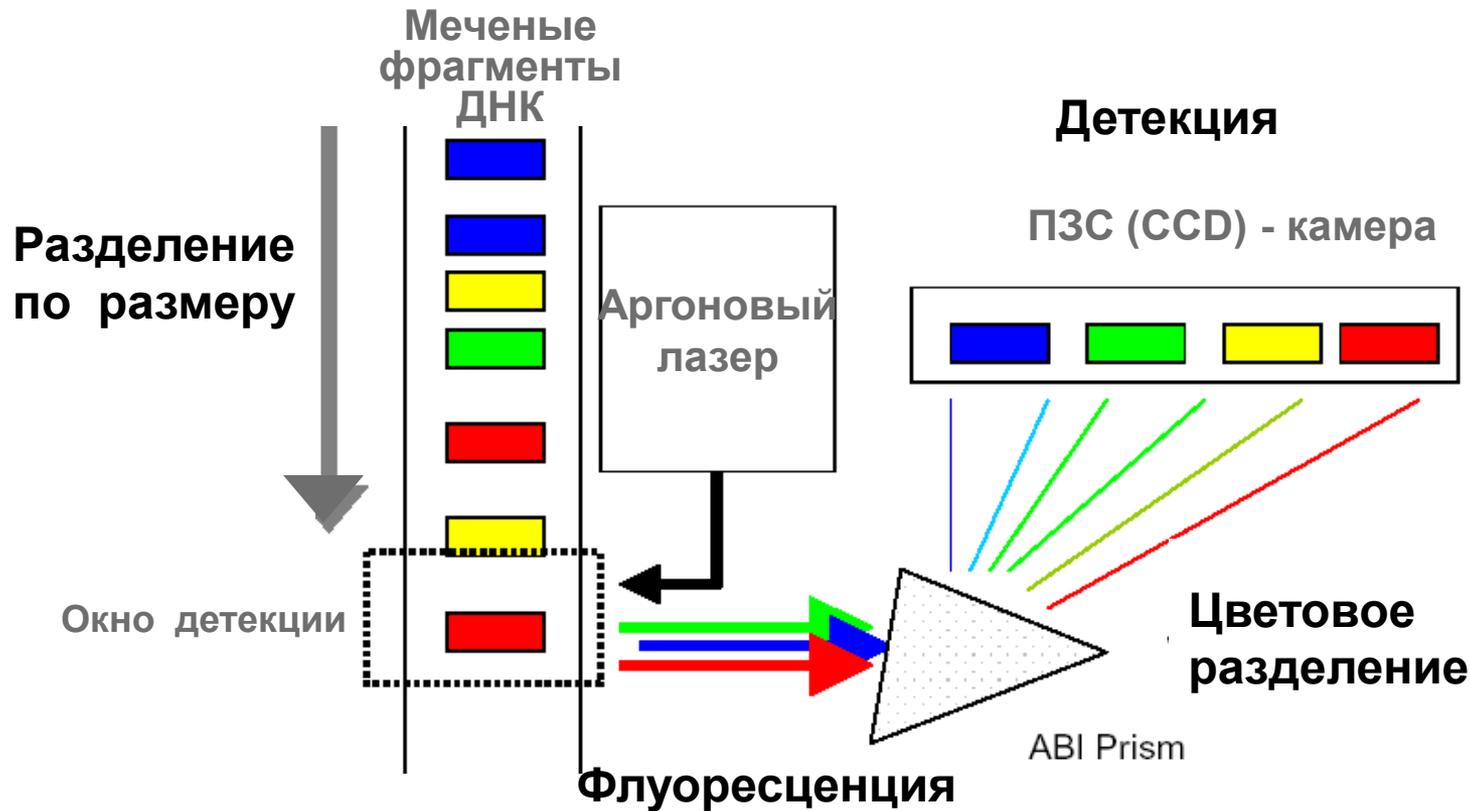
Полный набор фрагментов

Использование четырех флуоресцентных красителей для идентификации нуклеотидов

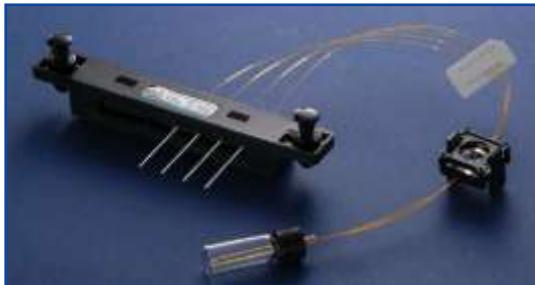


Электрофоретическое разделение

Схема разделения и детекции



Разделение фрагментов капиллярным электрофорезом с текучим полимером



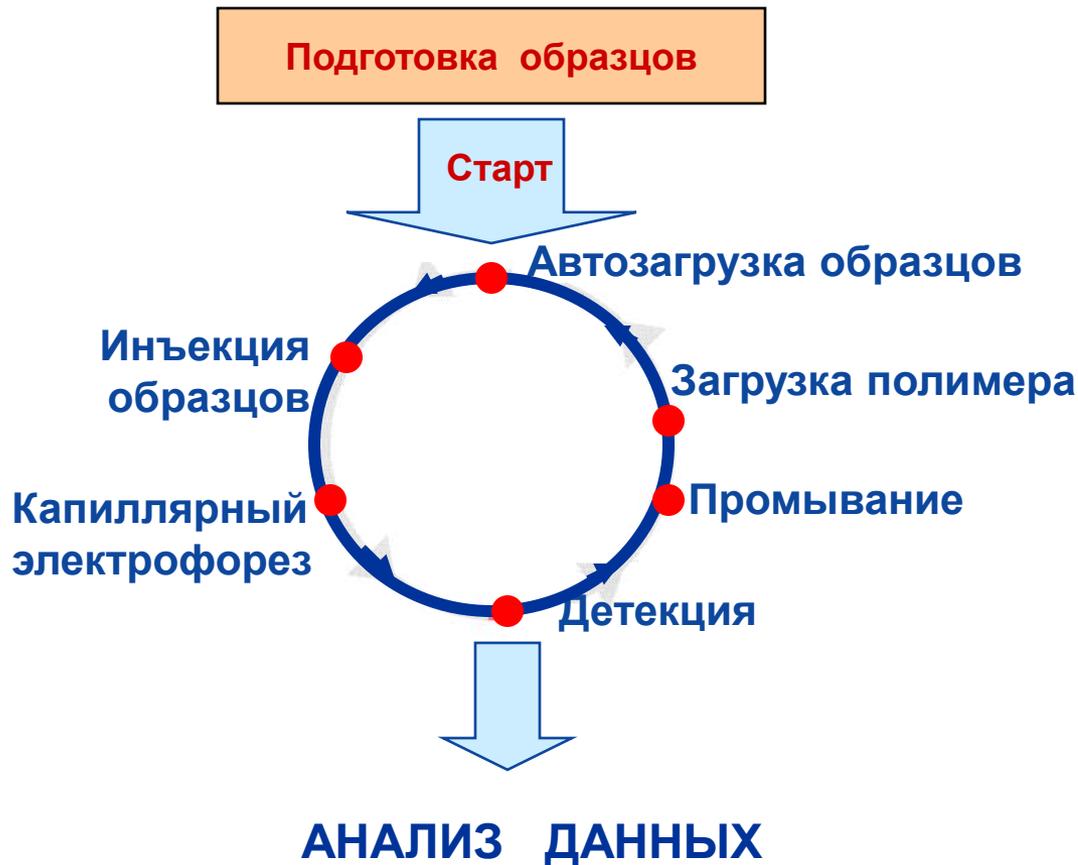
- Текучий полимер без поперечных сшивок и связи с поверхностью
- Длина и концентрация молекул полимера определяют характеристики разделения
- Температура 60 °C исключает вторичную структуру ДНК

В итоге: Высокая скорость разделения

Сокращение времени анализа: ФА ~ в 5 раз; секвенирования ~ в 2 раза

Воспроизводимость результатов

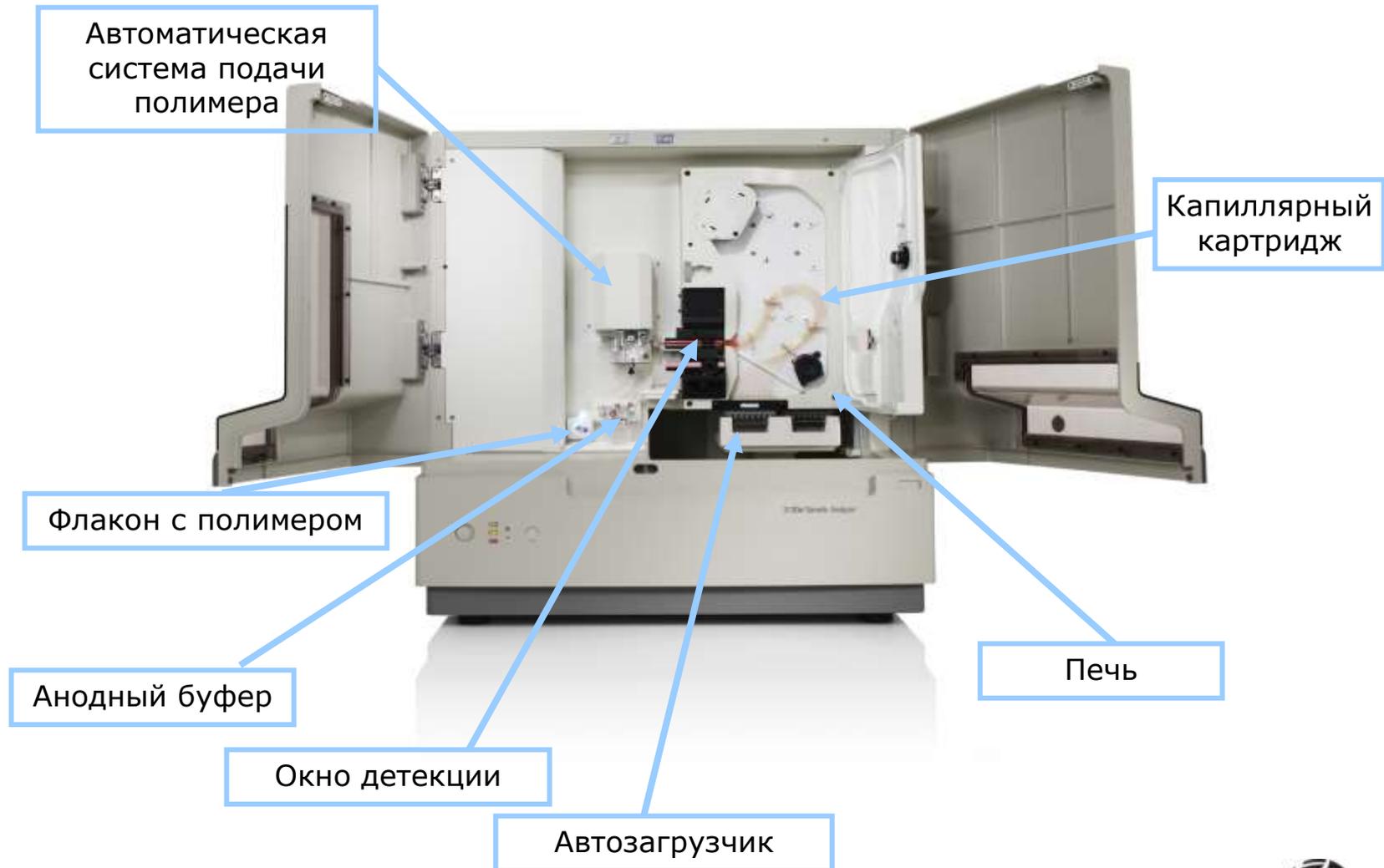
Автоматическое секвенирование ДНК



**Полная автоматизация
Без полимеризации геля**



Генетический анализатор 3130



Генетические анализаторы 3130/3130xl

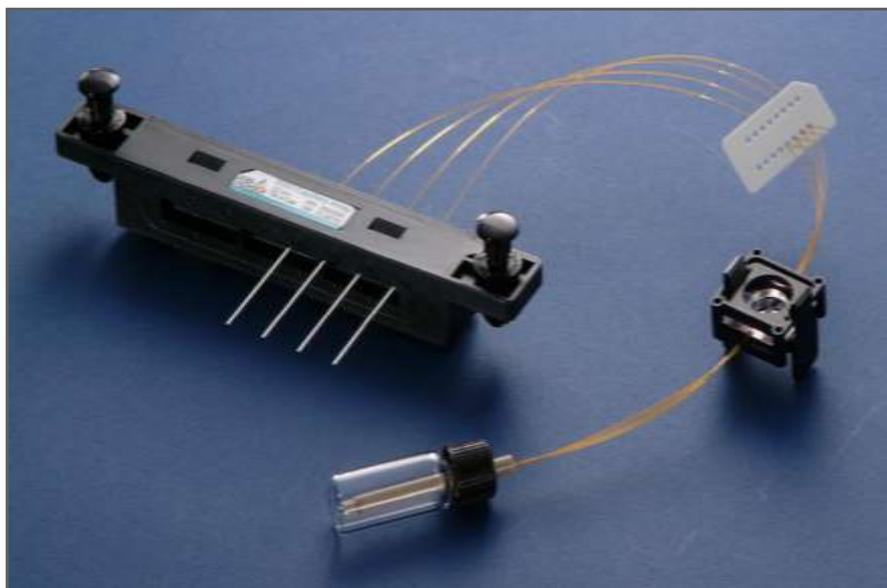


Полимеры

- 3130 **POP-7™** (№ 4352759) - универсальный
- 3130 **POP-4™** (№ 4352755) – STR -анализ
- 3130 **POP-6™** (№ 4352757) - секвенирование
- **CAP** (№ 4340379) – неденатурирующий, SSCP



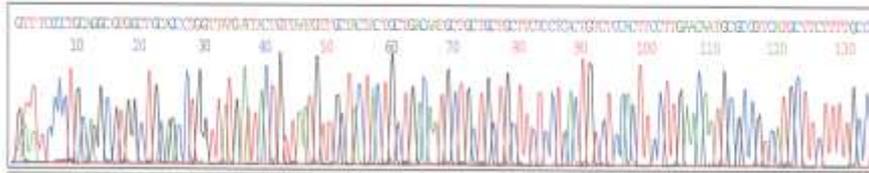
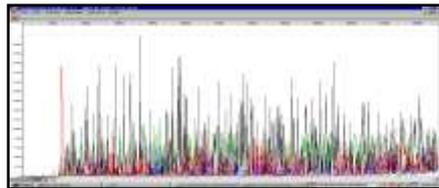
Капилляры



Различная длина капилляров:

- **22 см** - SNPs
- **36 см** – STR-анализ
- **50 см** - секвенирование
- **80 см** – сиквенс протяженных матриц

Программное обеспечение для определения нуклеотидных последовательностей

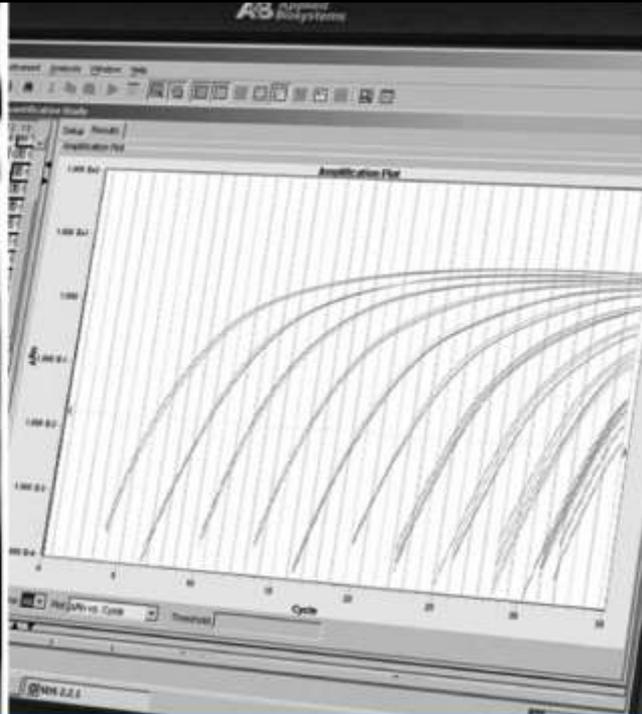


Автоматическая идентификация

Sequence	Base Change	Position	Reference
ATGCTG		10	ATGCTG
ATGCTG		11	ATGCTG
ATGCTG		12	ATGCTG
ATGCTG		13	ATGCTG
ATGCTG		14	ATGCTG
ATGCTG		15	ATGCTG
ATGCTG		16	ATGCTG
ATGCTG		17	ATGCTG
ATGCTG		18	ATGCTG
ATGCTG		19	ATGCTG
ATGCTG		20	ATGCTG
ATGCTG		21	ATGCTG
ATGCTG		22	ATGCTG
ATGCTG		23	ATGCTG
ATGCTG		24	ATGCTG
ATGCTG		25	ATGCTG
ATGCTG		26	ATGCTG
ATGCTG		27	ATGCTG
ATGCTG		28	ATGCTG
ATGCTG		29	ATGCTG
ATGCTG		30	ATGCTG
ATGCTG		31	ATGCTG
ATGCTG		32	ATGCTG
ATGCTG		33	ATGCTG
ATGCTG		34	ATGCTG
ATGCTG		35	ATGCTG
ATGCTG		36	ATGCTG
ATGCTG		37	ATGCTG
ATGCTG		38	ATGCTG
ATGCTG		39	ATGCTG
ATGCTG		40	ATGCTG
ATGCTG		41	ATGCTG
ATGCTG		42	ATGCTG
ATGCTG		43	ATGCTG
ATGCTG		44	ATGCTG
ATGCTG		45	ATGCTG
ATGCTG		46	ATGCTG
ATGCTG		47	ATGCTG
ATGCTG		48	ATGCTG
ATGCTG		49	ATGCTG
ATGCTG		50	ATGCTG
ATGCTG		51	ATGCTG
ATGCTG		52	ATGCTG
ATGCTG		53	ATGCTG
ATGCTG		54	ATGCTG
ATGCTG		55	ATGCTG
ATGCTG		56	ATGCTG
ATGCTG		57	ATGCTG
ATGCTG		58	ATGCTG
ATGCTG		59	ATGCTG
ATGCTG		60	ATGCTG
ATGCTG		61	ATGCTG
ATGCTG		62	ATGCTG
ATGCTG		63	ATGCTG
ATGCTG		64	ATGCTG
ATGCTG		65	ATGCTG
ATGCTG		66	ATGCTG
ATGCTG		67	ATGCTG
ATGCTG		68	ATGCTG
ATGCTG		69	ATGCTG
ATGCTG		70	ATGCTG
ATGCTG		71	ATGCTG
ATGCTG		72	ATGCTG
ATGCTG		73	ATGCTG
ATGCTG		74	ATGCTG
ATGCTG		75	ATGCTG
ATGCTG		76	ATGCTG
ATGCTG		77	ATGCTG
ATGCTG		78	ATGCTG
ATGCTG		79	ATGCTG
ATGCTG		80	ATGCTG
ATGCTG		81	ATGCTG
ATGCTG		82	ATGCTG
ATGCTG		83	ATGCTG
ATGCTG		84	ATGCTG
ATGCTG		85	ATGCTG
ATGCTG		86	ATGCTG
ATGCTG		87	ATGCTG
ATGCTG		88	ATGCTG
ATGCTG		89	ATGCTG
ATGCTG		90	ATGCTG
ATGCTG		91	ATGCTG
ATGCTG		92	ATGCTG
ATGCTG		93	ATGCTG
ATGCTG		94	ATGCTG
ATGCTG		95	ATGCTG
ATGCTG		96	ATGCTG
ATGCTG		97	ATGCTG
ATGCTG		98	ATGCTG
ATGCTG		99	ATGCTG
ATGCTG		100	ATGCTG
ATGCTG		101	ATGCTG
ATGCTG		102	ATGCTG
ATGCTG		103	ATGCTG
ATGCTG		104	ATGCTG
ATGCTG		105	ATGCTG
ATGCTG		106	ATGCTG
ATGCTG		107	ATGCTG
ATGCTG		108	ATGCTG
ATGCTG		109	ATGCTG
ATGCTG		110	ATGCTG
ATGCTG		111	ATGCTG
ATGCTG		112	ATGCTG
ATGCTG		113	ATGCTG
ATGCTG		114	ATGCTG
ATGCTG		115	ATGCTG
ATGCTG		116	ATGCTG
ATGCTG		117	ATGCTG
ATGCTG		118	ATGCTG
ATGCTG		119	ATGCTG
ATGCTG		120	ATGCTG
ATGCTG		121	ATGCTG
ATGCTG		122	ATGCTG
ATGCTG		123	ATGCTG
ATGCTG		124	ATGCTG
ATGCTG		125	ATGCTG
ATGCTG		126	ATGCTG
ATGCTG		127	ATGCTG
ATGCTG		128	ATGCTG
ATGCTG		129	ATGCTG
ATGCTG		130	ATGCTG

Создание и использование баз данных





AB Applied Biosystems

**MicroSeq[®] -
система генетической
идентификации
микроорганизмов**

Ограничения существующих методов идентификации микроорганизмов

- медленно
- неточно
- субъективно



Требования к идентификации микроорганизмов

- **Быстрые результаты**
 - Стандартное культивирование занимает несколько дней для получения результатов
 - В идеале: несколько часов, непосредственно из чистой культуры
- **Точность и специфичность**
 - Дифференциация тысяч видов
- **Применимо для всех типов микроорганизмов**
 - Культивируемые и трудно культивируемые виды (замена фенотипических методов для слаборастущих или не ферментируемых микроорганизмов)
- **Предварительная информация** о микроорганизме не требуется
 - Замена классических методов, например, для Грамм «+» или «-» микроорганизмов

MicroSeq[®] - самая совершенная система генетической идентификации микроорганизмов

Microbe in



ID out

Принцип идентификации MicroSeq®

- Первый шаг:
 - Определение нуклеотидной последовательности гена рибосомной РНК (рДНК) неизвестного микроорганизма

- Второй шаг:
 - Сравнение полученной последовательности с последовательностями известных микроорганизмов в базе данных

Почему выбран ген рибосомной РНК?

- Универсальность
 - Ген 16S рРНК присутствует у **всех бактерий**
 - Ген LSU присутствует у **всех низших грибов**

- Особенности структуры гена
 - **Консервативные участки** идентичны у всех микро-организмов и используются для отжига праймеров при ПЦР
 - **Различающиеся участки** используются для идентификации

MicroSeq[®] - полное решение для идентификации бактерий и низших грибов

- Пробоподготовка – быстрое выделение с PMU
- Наборы реагентов для ПЦР и секвенирования
Наборы: Бакт.- полный 16S ген; Бакт.-500; Грибы - D2
Международные права на использование ПЦР
- Программное обеспечение
Возможности сборки, редактирования последовательностей,
построения филогенетического дерева. Демо-версия на 30 дней
- Базы данных – верифицированные последовательности
- Оборудование и его сервисная поддержка

Последовательность действий



или

Образец из чистой культуры или колонии



Выделение ДНК с помощью PrepMan Ultra < 30 мин



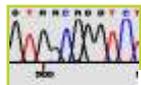
Аmplификация (ПЦР-комплект в наборе) < 2 час



Подготовка к секвенированию (Сек.-комплект) < 2 час



Секвенирование Электрофорез ~ 2 час



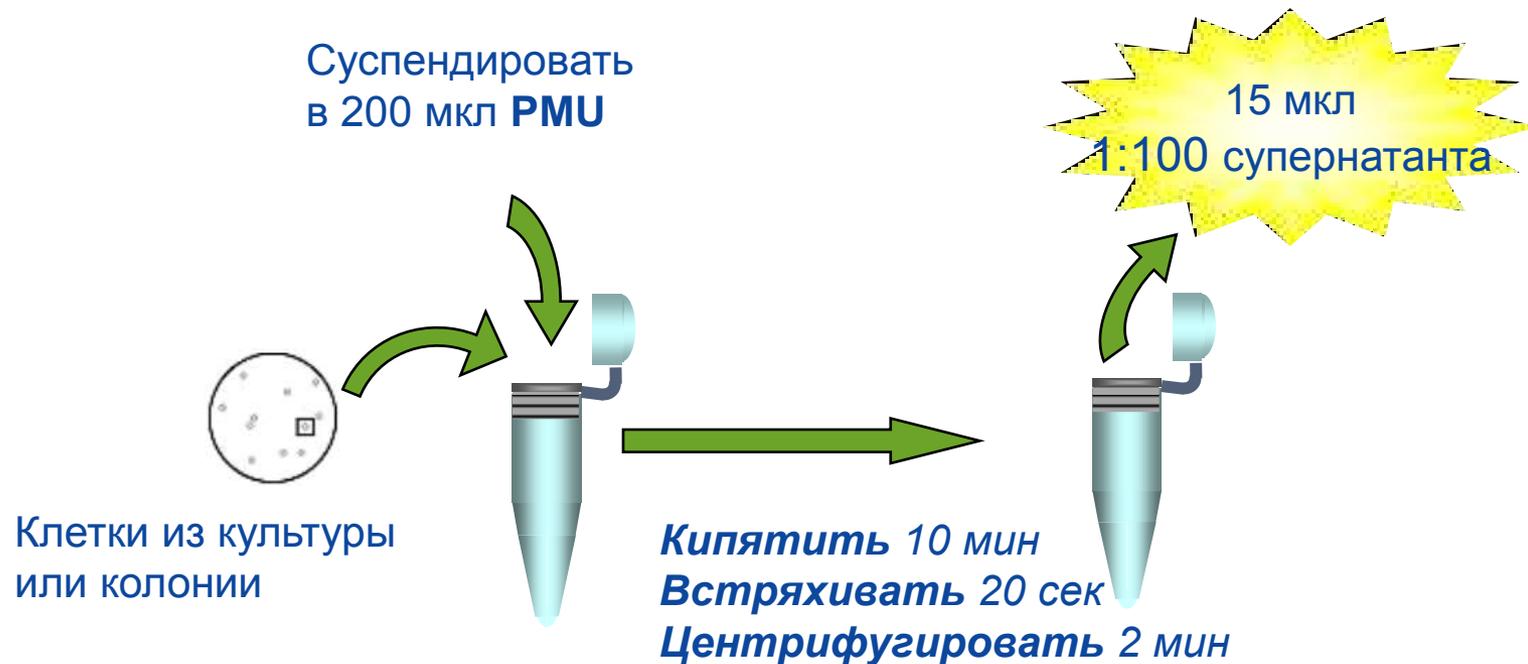
Секвенирование Анализ MicroSeq® < 10 мин



Отчет

Реагент для выделения ДНК - PrepMan™ Ultra

- **PMU** - Новый универсальный раствор, разработанный Applied Biosystems



Набор для идентификации бактерий MicroSeq® 500 16S

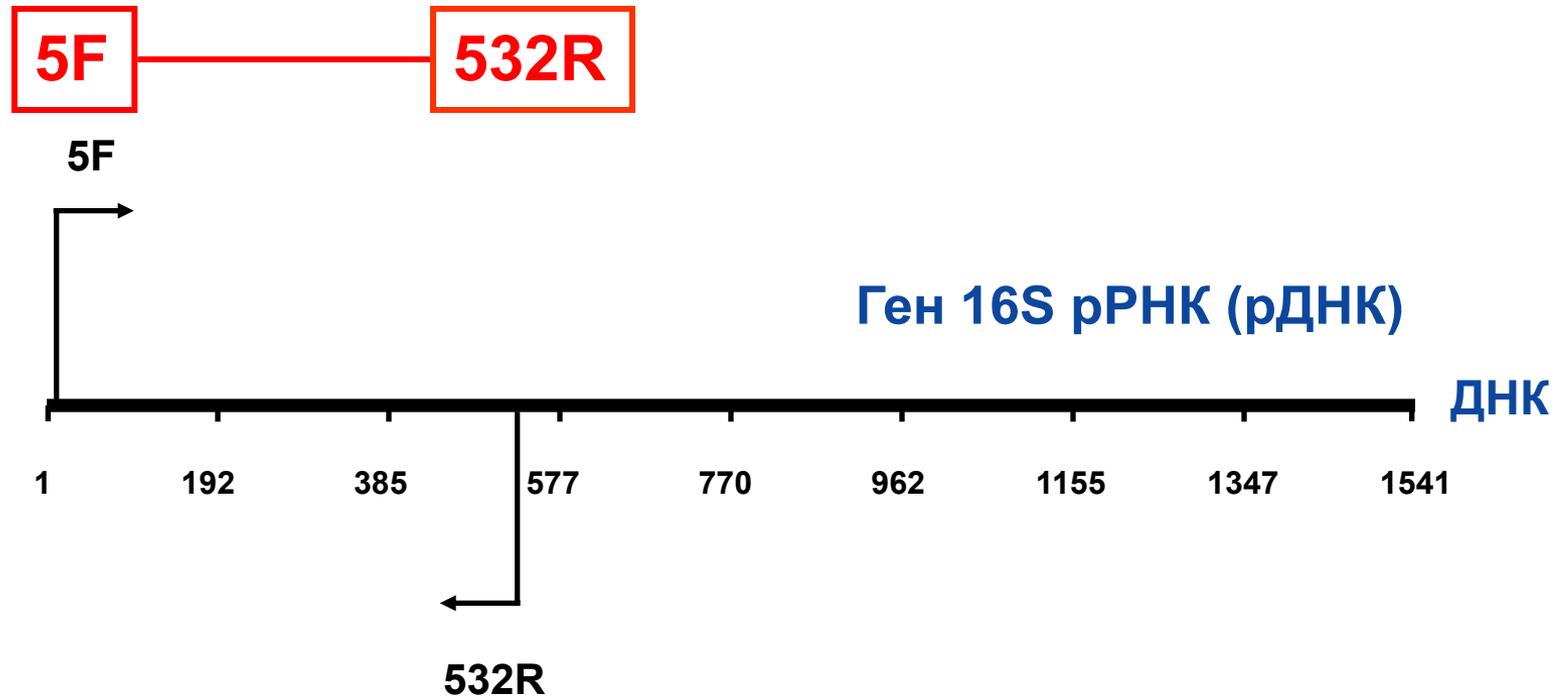
Комплект для амплификации

Комплект для подготовки
к секвенированию



- **Набор на 50 определений**
- **Универсальная рабочая смесь для ПЦР (MasterMix)**
Единая амплификация (Ампликон 500 пн)
- **Положительный и отрицательный контроли**
Геномная ДНК *E. coli*

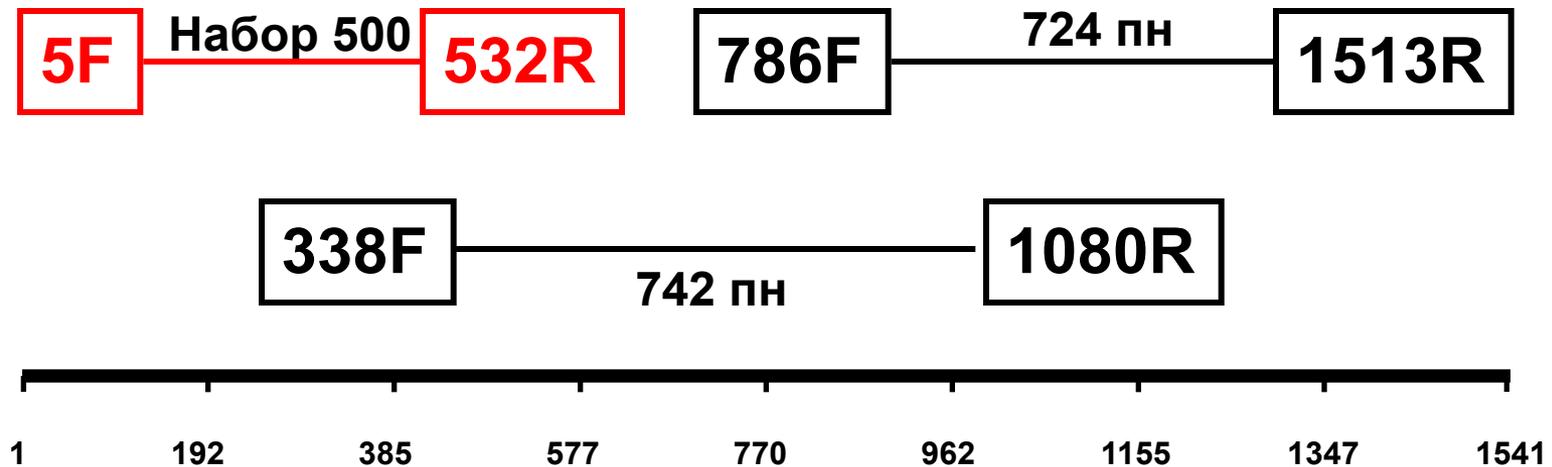
Набор MicroSeq®500 для рутинной идентификации



**ПЦР одновременно 2х реакций:
прямой и обратной последовательностей**

Набор MicroSeq® на полный ген

для случаев, когда по первым 500пн идентифицировать не удалось



ПЦР 3х реакций: по 2 праймера (прямой и обратный)

Производительность анализаторов для наборов MicroSeq 500 и D2



Генетический анализатор 3130xl
16 капилляров
96 образцов /24 часа

Генетический анализатор 3130
4 капилляра
24 образца/24 часа

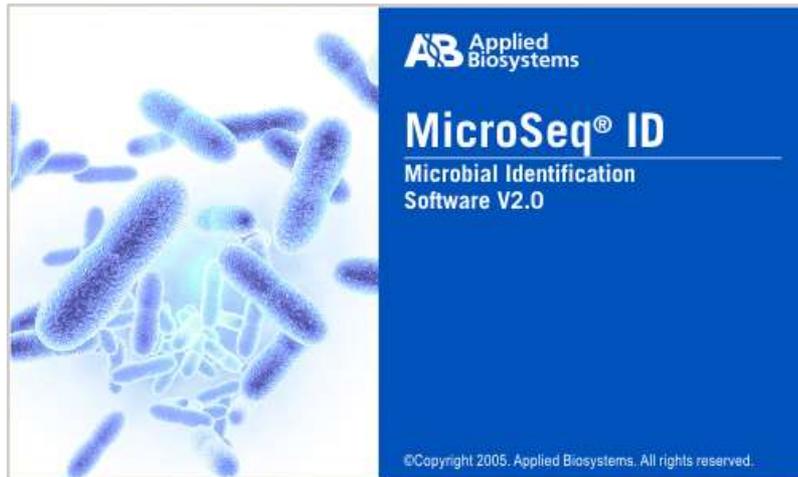


Генетический анализатор 310
1 капилляр
6 образцов/24 часа

Анализ результатов секвенирования



MicroSeq® - программа по идентификации микроорганизмов.



- включает программное обеспечение и 3 валидированных библиотеки

Демо-версия программного обеспечения MicroSeq ID Demo Software

- № 4347538
- действительна в течение 30 дней после установки
- Предоставляет возможность анализа:
 - данных на CD
 - собственных данных, полученных с помощью наборов MicroSeq

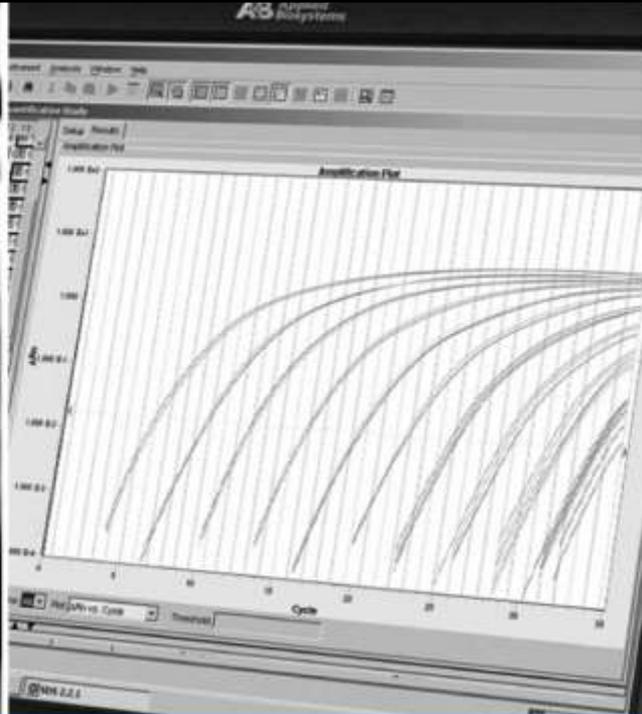


MicroSeq[®] - надежная система идентификации



	Точность*	Воспроизводимость*	Время	Кол-во видов по базе	
				Бактерии	Грибы
MicroSeq [®]	100%	100%	8 ч	>1700	>1260
RiboPrinter	81%	97%	8 ч	700	-
Sherlock [®]	50%	81%	1 день	2000	-
MicroLog [™]	65%	62%	1-3 дн	1200	900
Vitek [®] 2	33%	89%	2-3 дн	800	-

* European Pharmaceutical Review 2003, Alexander et al; Issue 2, p 43-49



AB Applied Biosystems

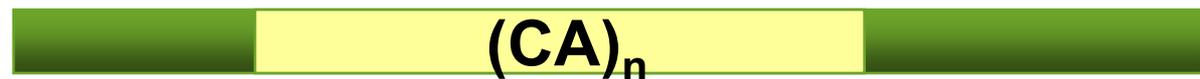
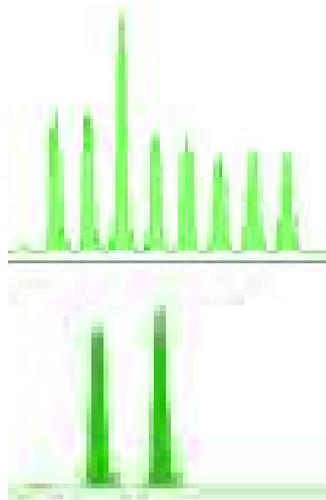
**StockMarks® – наборы для
генотипирования животных**

Короткие тандемные повторы Short Tandem Repeats - STRs

Образцы отличаются длиной ампликона

- повторы представляют переменную часть
- фланкирующие участки - постоянную

D16S539



Аллель 1



Аллель 2

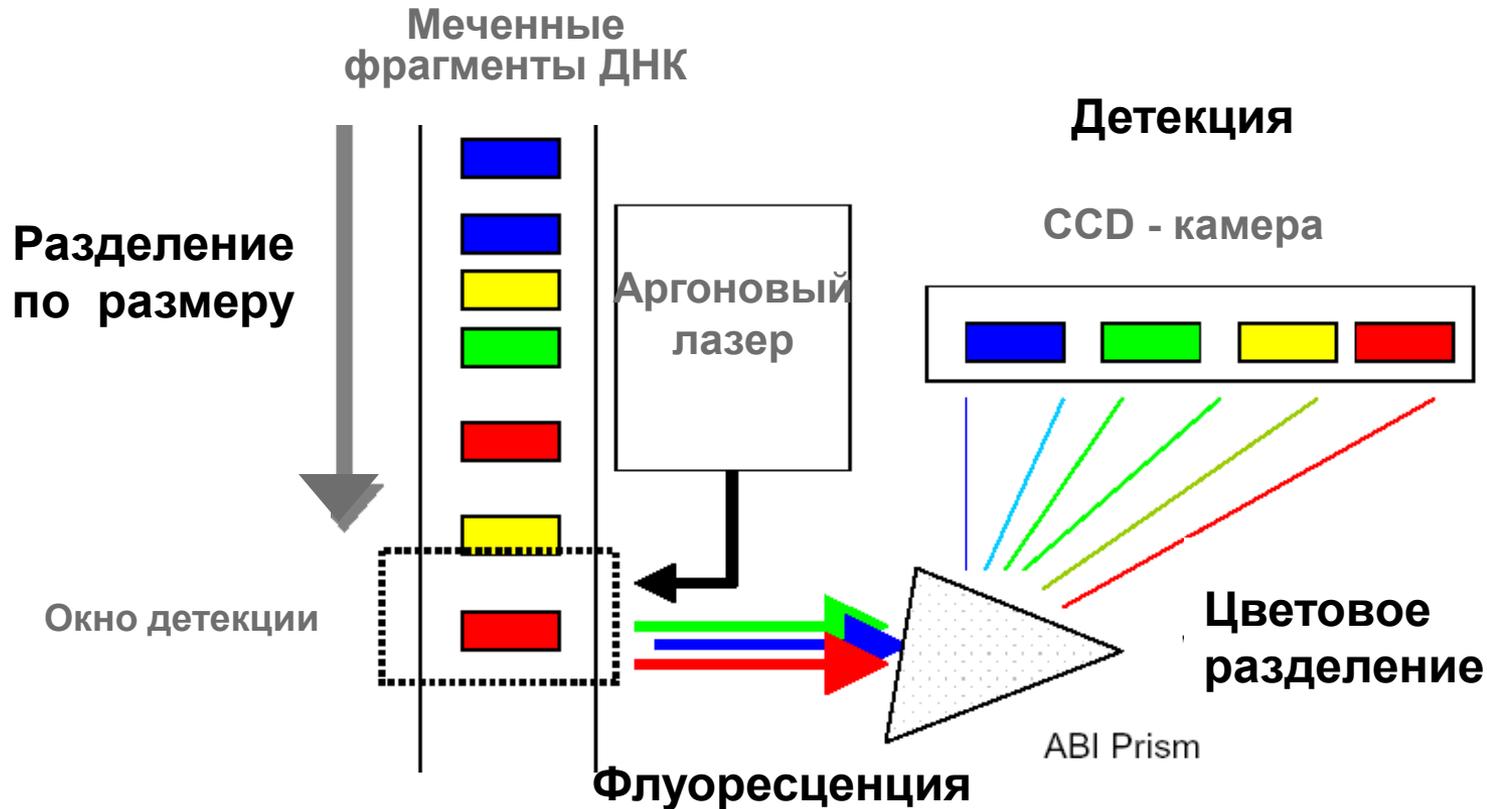


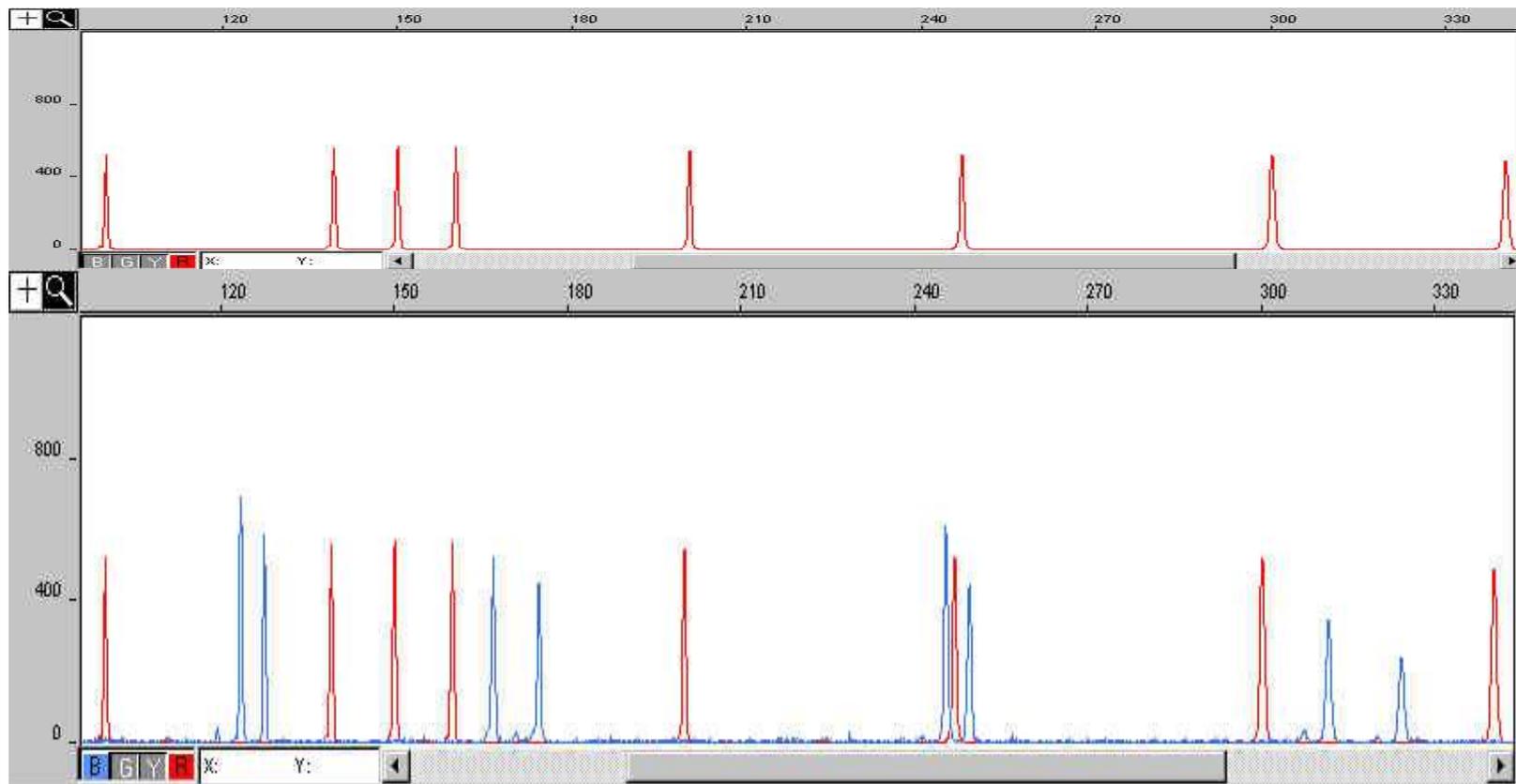
Аллель 3



★ Флуоресцентная метка

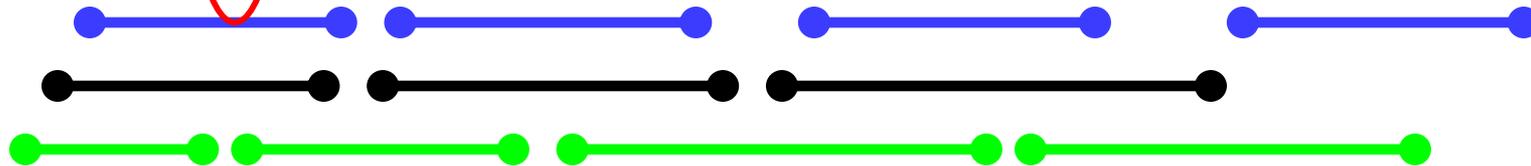
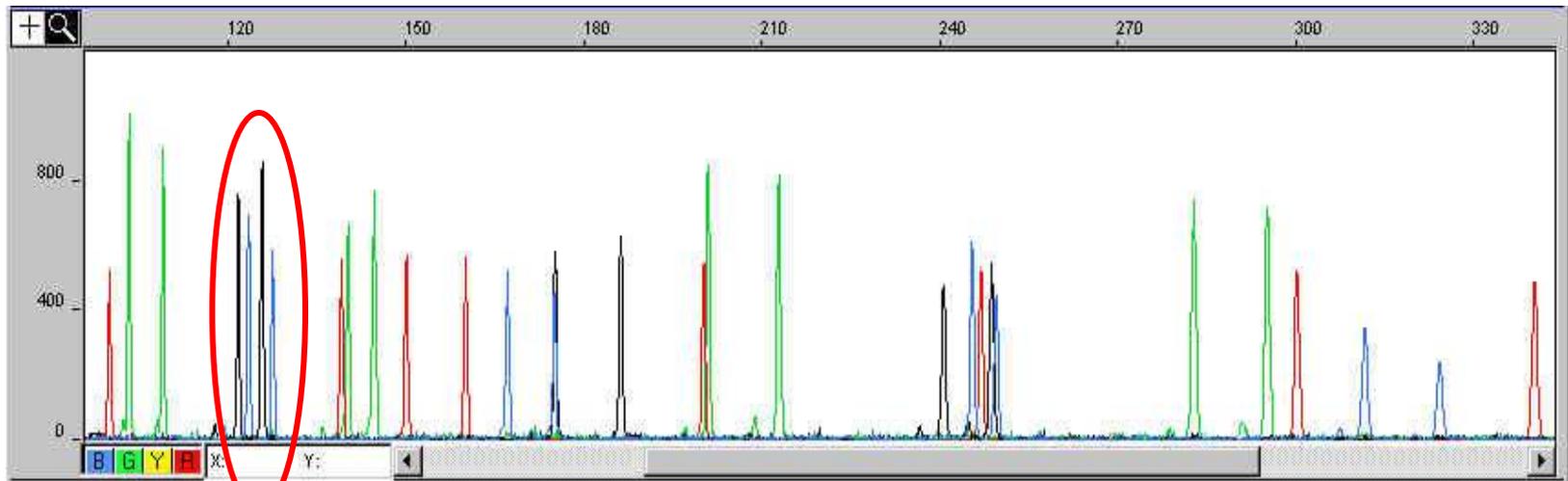
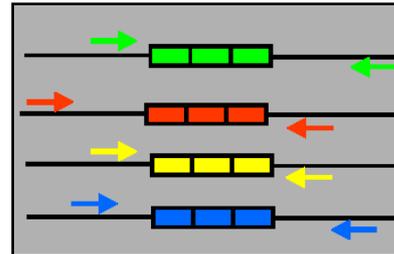
Генетический анализатор: схема разделения и детекции





Если диапазоны длин аллелей не перекрываются,
возможно использование одной метки

Мультиплексность

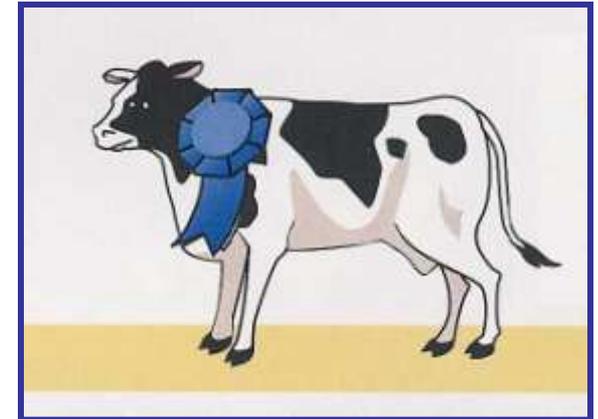


Если диапазоны длин аллелей перекрываются, то необходимо использовать различные метки

Для чего нужно генотипирование животных?

- **Селекция чистопородных особей**
 - Требуется для регистрации породы
 - Доказательство происхождения чистопородной особи
 - Контроль результатов искусственного осеменения

- **Качество контроля продуктов питания**
 - Доказательство происхождения: оперативный контроль «от фермы до супермаркета»
 - Криминалистические случаи



Генетические маркеры позвоночных

Вид	Гаплоидный набор хромосом	Количество известных кодирующих генов	Количество микросателлитов
Человек	23	>30 000	~ 8 000
Корова	30	400 – 500	1 236
Лошадь	32	138	564
Собака	39		~ 400

Маркеры 1 типа гены Близки	Маркеры 2 типа некодирующая ДНК Полиморфны
--	--

Рекомендация International Society of Animal Genetics (ISAG):



Для генотипирования лошадей 13 STR-локусов



Для генотипирования крупного рогатого скота 11 STR-локусов

Каждый локус имеет от 7 до 20 аллелей.



Для генотипирования собак 10 STR-локусов

ISAG + AKC (American Kennel Club)

Наборы для генотипирования животных “Stockmarks”

Наборы для генотипирования:	Характеристики наборов
<p>Крупного рогатого скота</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - 11 маркеров - 4 красителя - на 100 определений
<p>Лошадей</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - 17 маркеров - 5 красителей - на 100 определений
<p>Собак</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - 10 маркеров - 4 красителя - на 100 определений

Наборы StockMarks для генотипирования лошадей

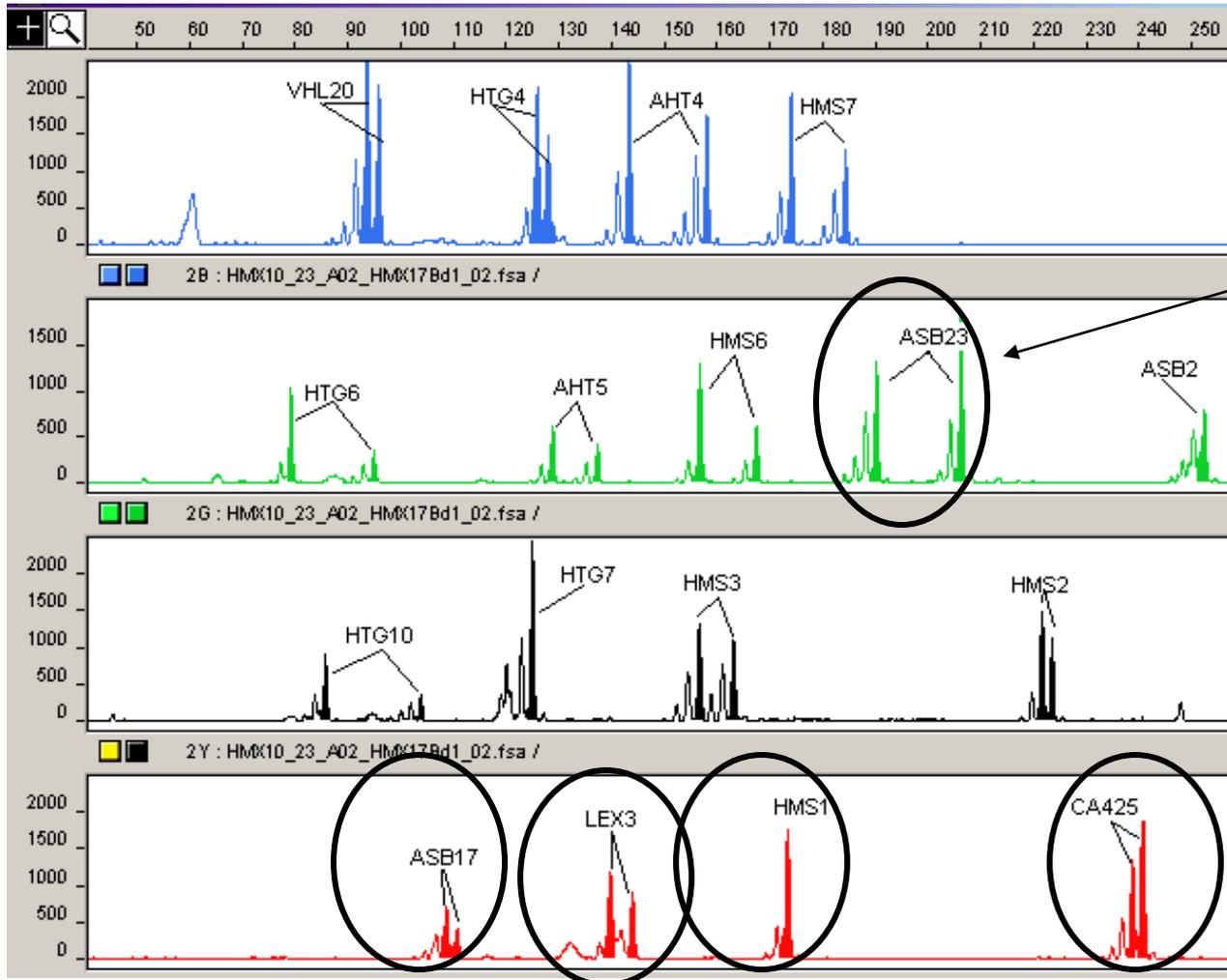


◆ Набор с 17 маркерами

Наиболее информативный набор

- ✓ 12 Маркеров рекомендованы ISAG + 5 дополнительных маркеров:
 - ❖ ASB17, ASB23, CA425, HMS1, LEX3
 - ❖ 5 маркеров предложены др. обществами селекционеров
- ✓ Единая амплификация.
- ✓ Предварительно смешанные праймеры.
Оптимизированная интенсивность сигнала.
- ✓ Использование 5 красителей
- ✓ Международное право на использование метода

Результаты генетического анализа

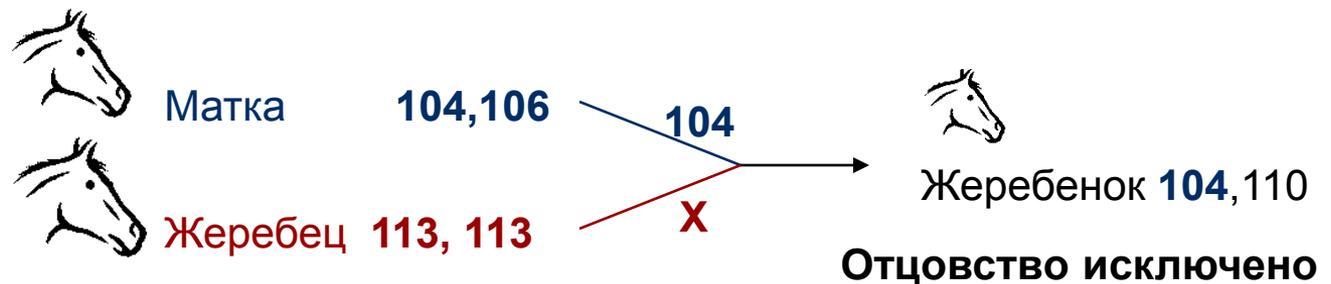
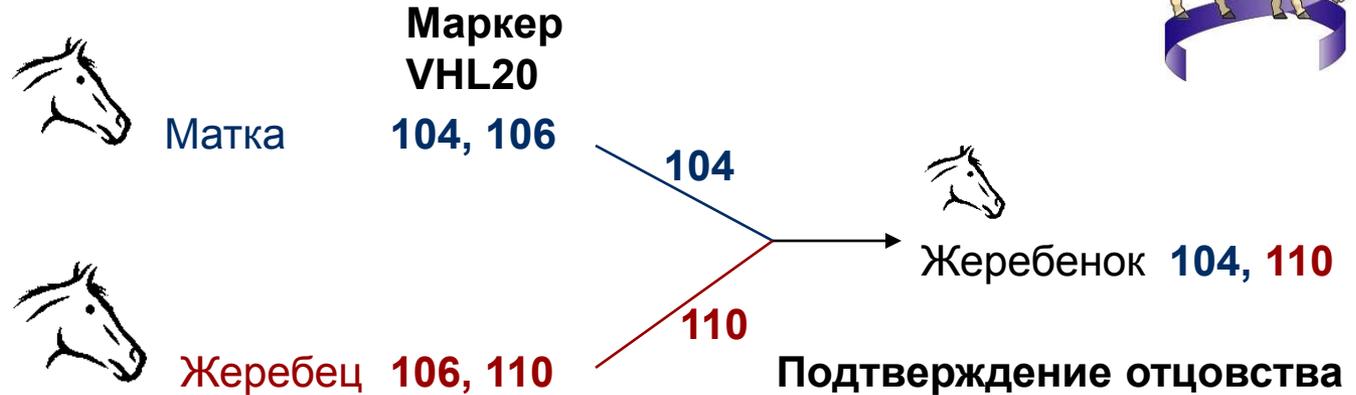


**Новые
маркеры**

Результат генотипирования



Локус	Лаб №QU286
VHL20	104, 104
HTG4	126, 130
AHT4	144, 144
HMS7	170, 178
HTG6	85, 85
AHT5	137, 137
HMS6	157, 161
ASB23	188, 190
ASB2	234, 242
HTG10	NR
HTG7	125, 125
HMS3	165, 167
HMS2	222, 235
ASB17	119, 119
LEX3	155, 157
HMS1	181, 181
CA425	239, 239



Как это работает?

Приготовление образца

PrepMan™ Ultra Reagent



ПЦР амплификация

STR-Multiplex



Электрофоретическое разделение

310, 377, 3100, 3130



Анализ данных

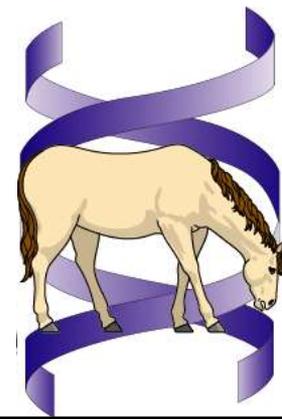
GeneScan/Genotyper or GeneMapper



StockMarks® для идентификации лошадей

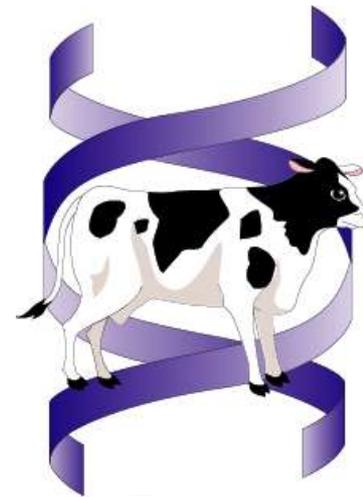
◆ Одновременная амплификация 17-микросателлитных локусов

- ✧ Амплификация в одной пробирке
- ✧ Набор на 100 реакций
- ✧ Label License conveys PCR service rights
- ✧ Набор красителей DS-33 (G5)
- ✧ ISAG-рекомендованные маркёры + 5 дополнительных
 - ❖ ASB17, ASB23, CA425, HMS1, LEX3
 - ❖ Локусы, одобренные другими ассоциациями по разведению лошадей



StockMarks® для идентификации коров

- ◆ Одновременная амплификация 11 микросателлитных локусов
 - ☆ Набор на 100 реакций
 - ☆ ISAG-рекомендованные локусы
 - ☆ Label License conveys PCR service rights
 - ☆ Номер по каталогу 4330663 / 4307480

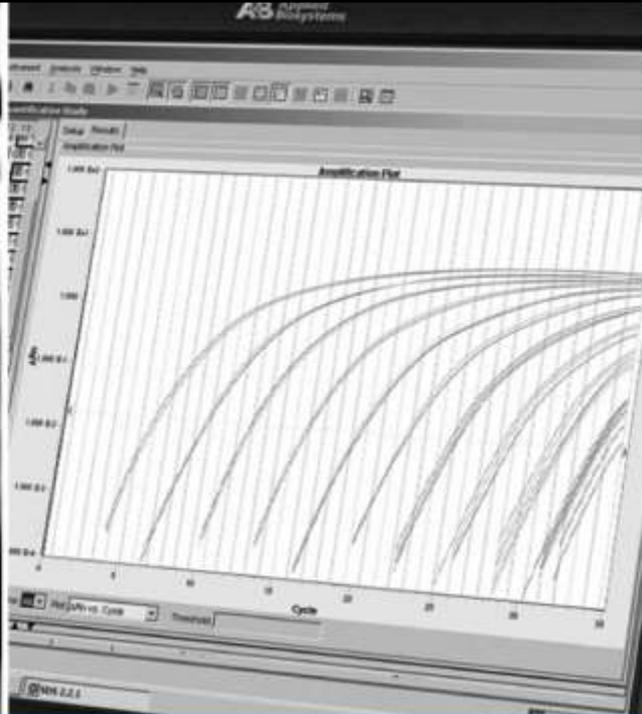


StockMarks® для идентификации собак

◆ Одновременная амплификация 10 микросателлитных локусов

- ☆ Набор на 100 реакций
- ☆ Набор красителей DS-32 (Dye Set F)
- ☆ АКС (American kennel club) стандартные маркеры
- ☆ Label License conveys PCR service rights
- ☆ Номер по каталогу 4307481 (now 4307481C)



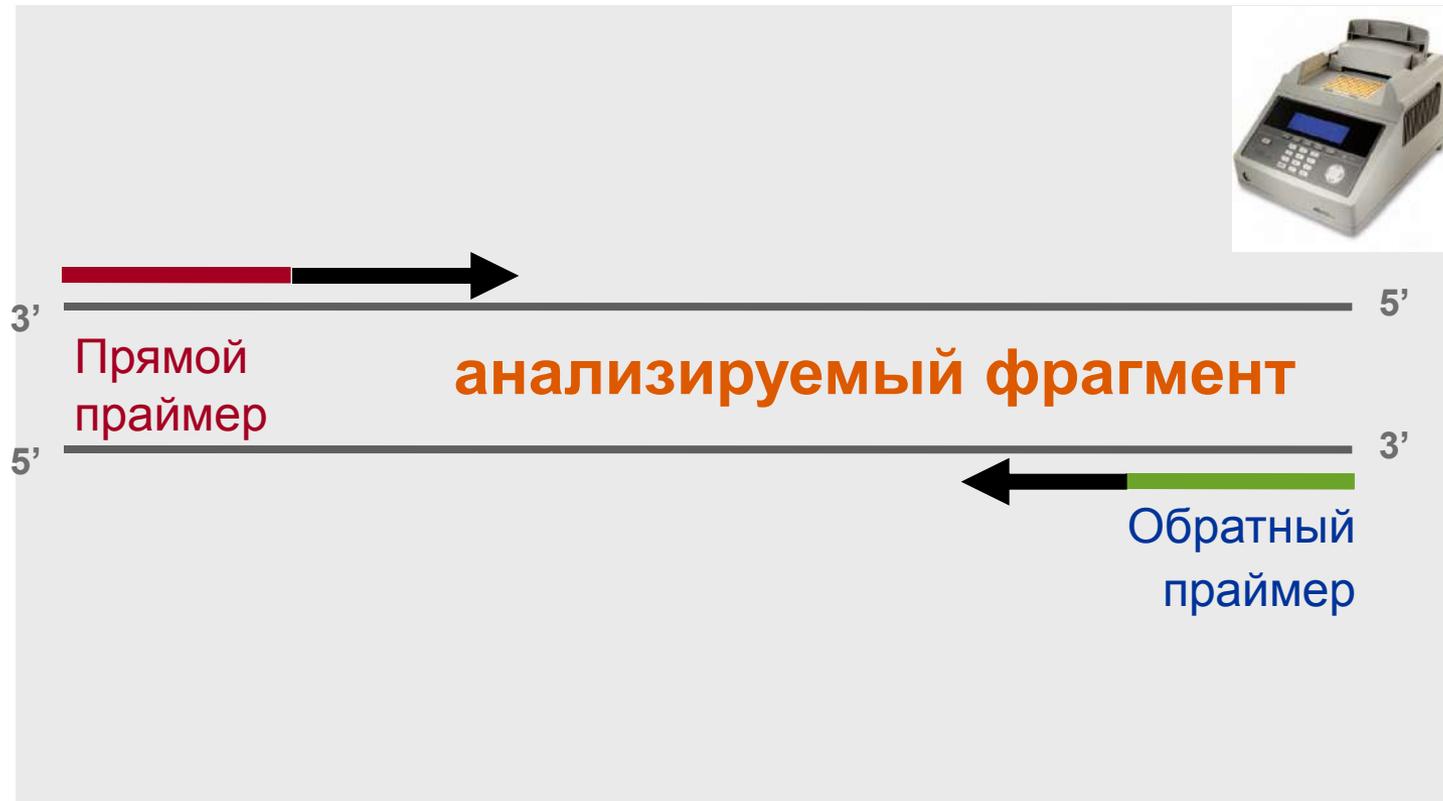


AB Applied Biosystems

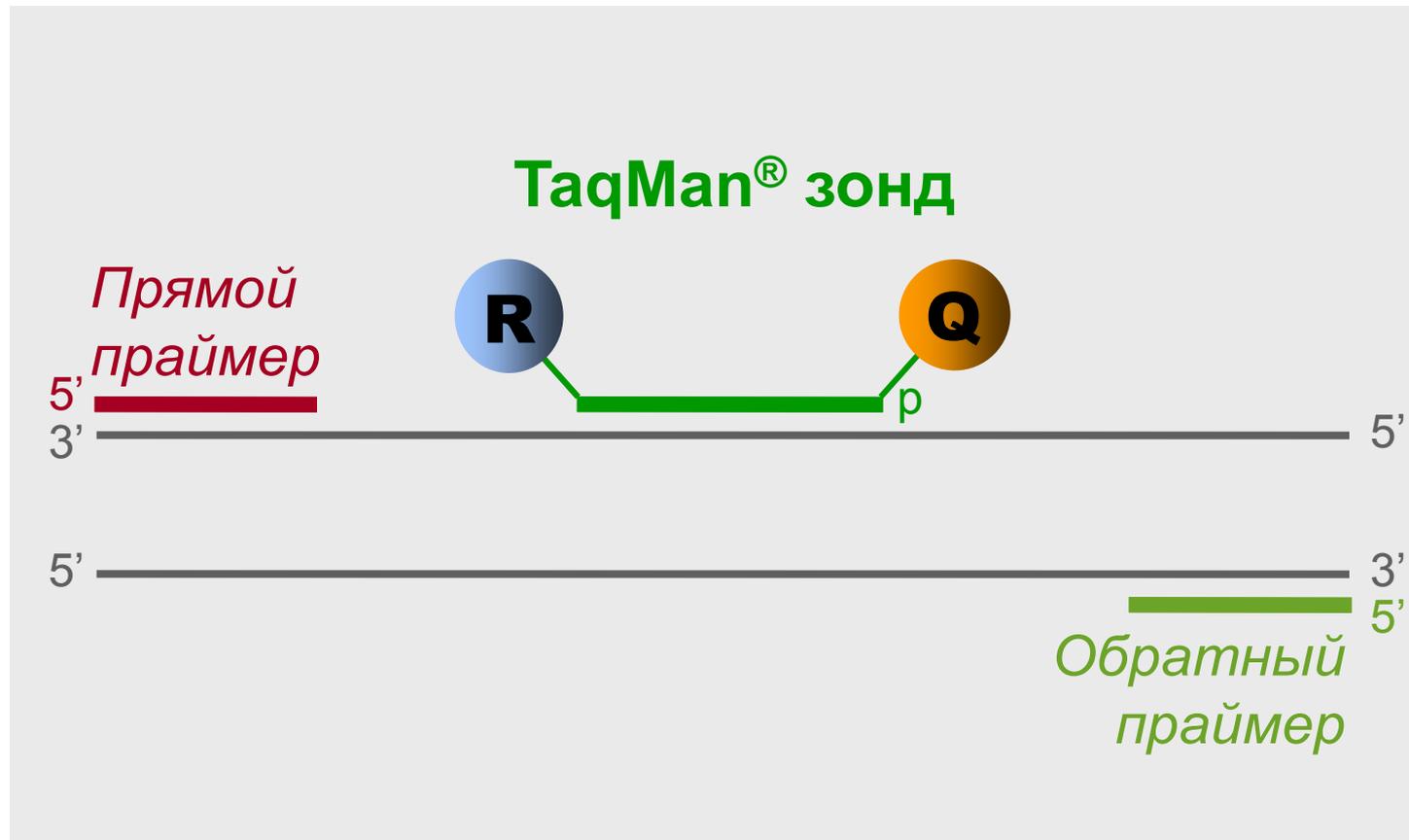
Идентификация патогенных микроорганизмов методом ПЦР в реальном времени

ПЦР: полимеразная цепная реакция:

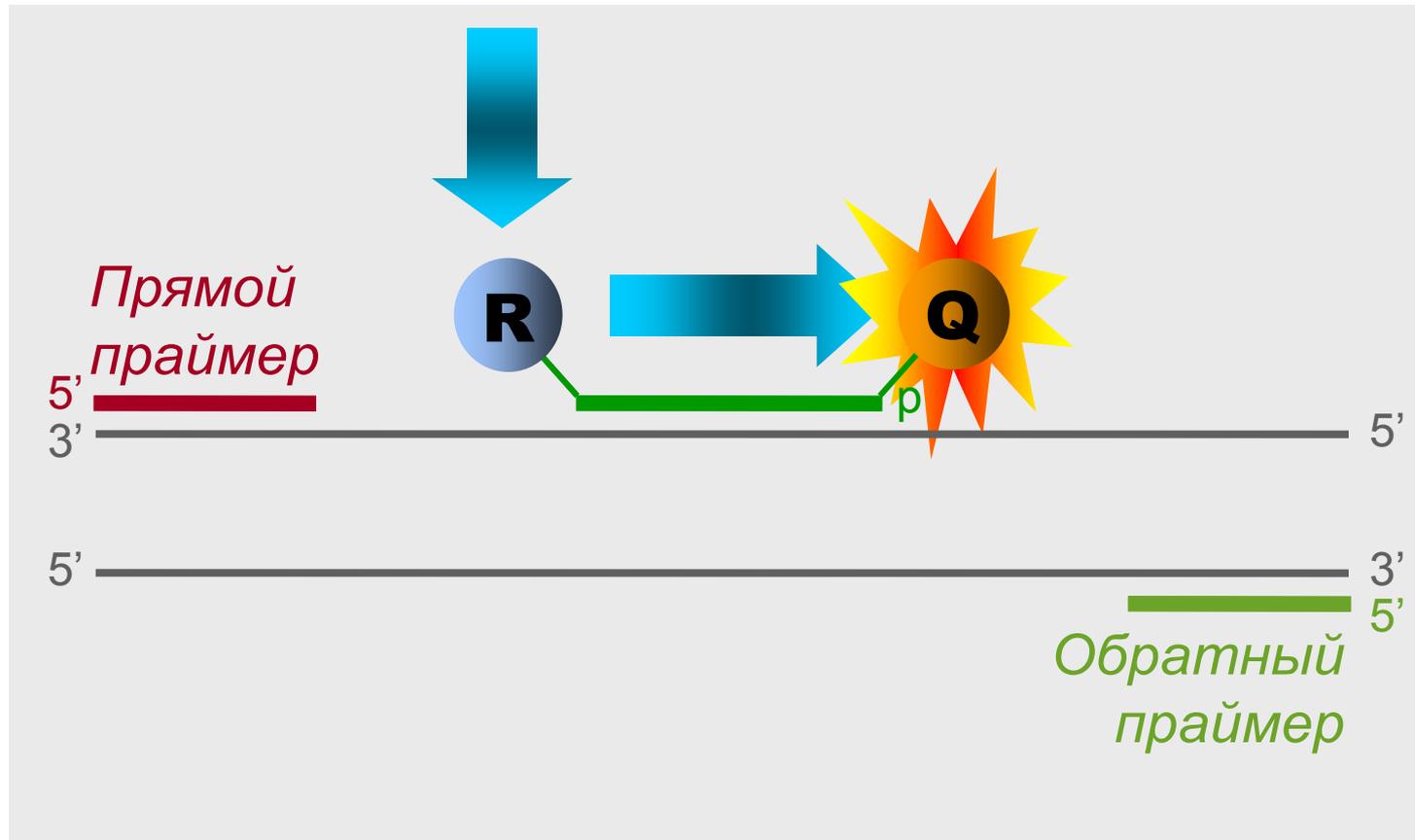
термоциклер



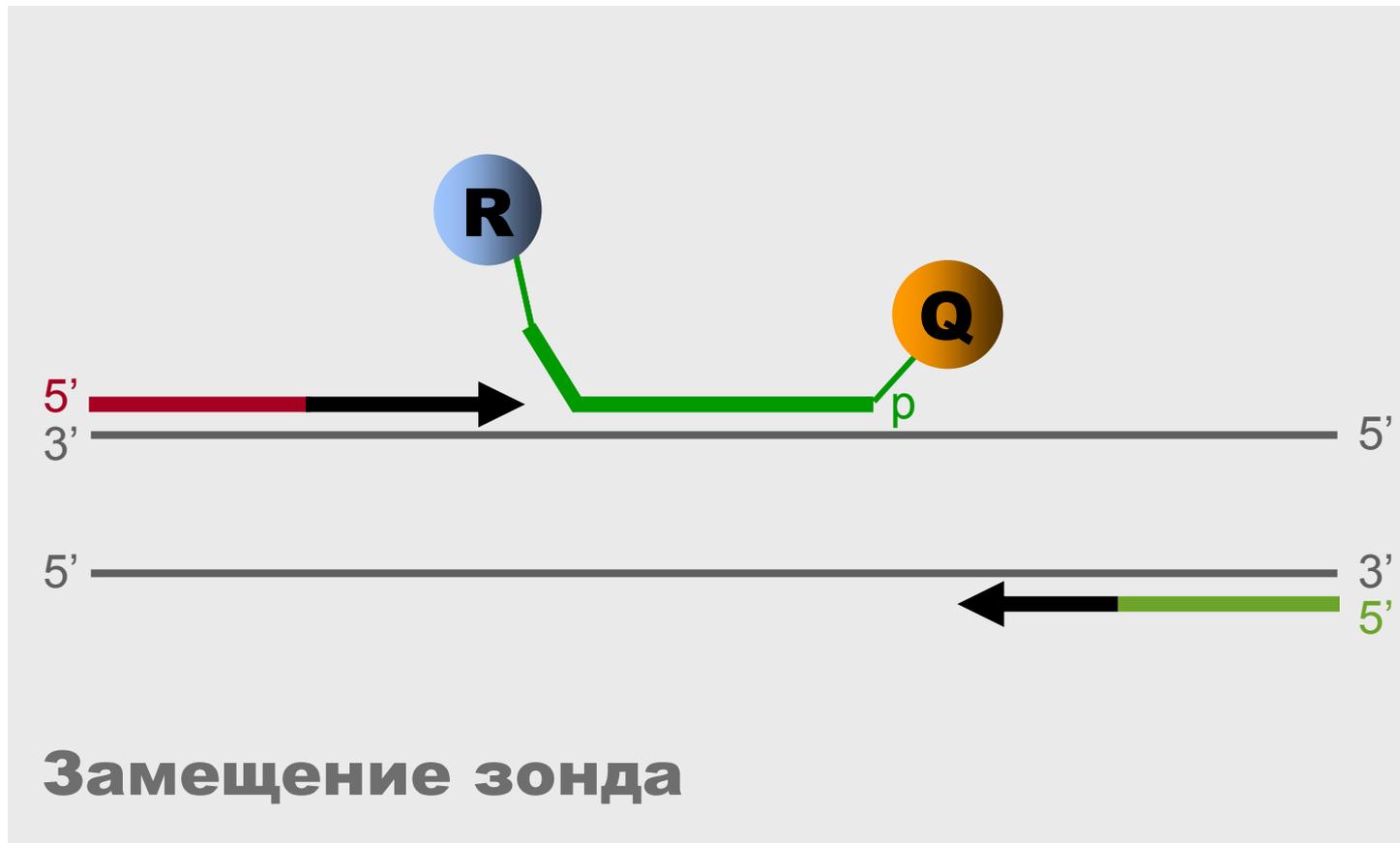
5' нуклеазный анализ



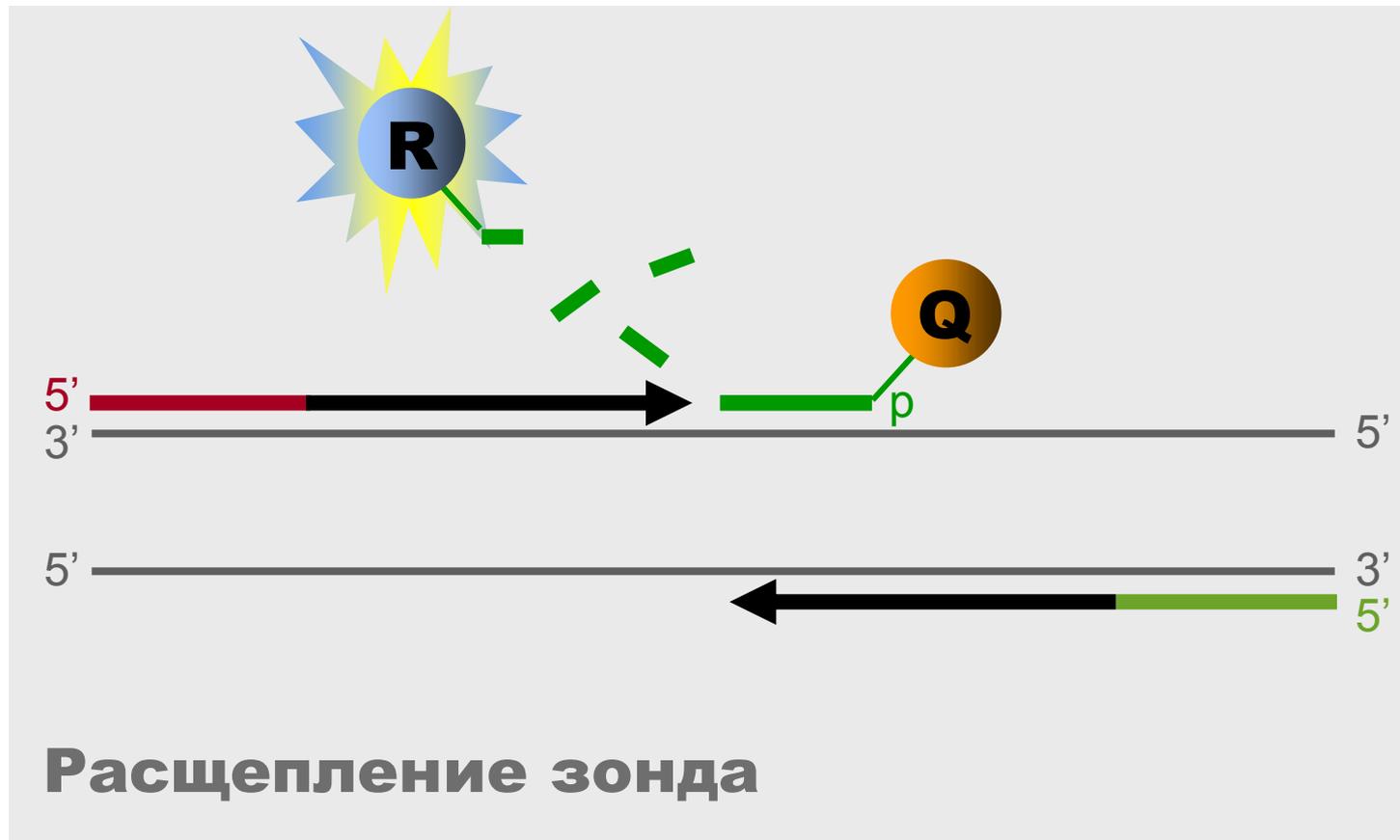
5' нуклеазный анализ



5' нуклеазный анализ



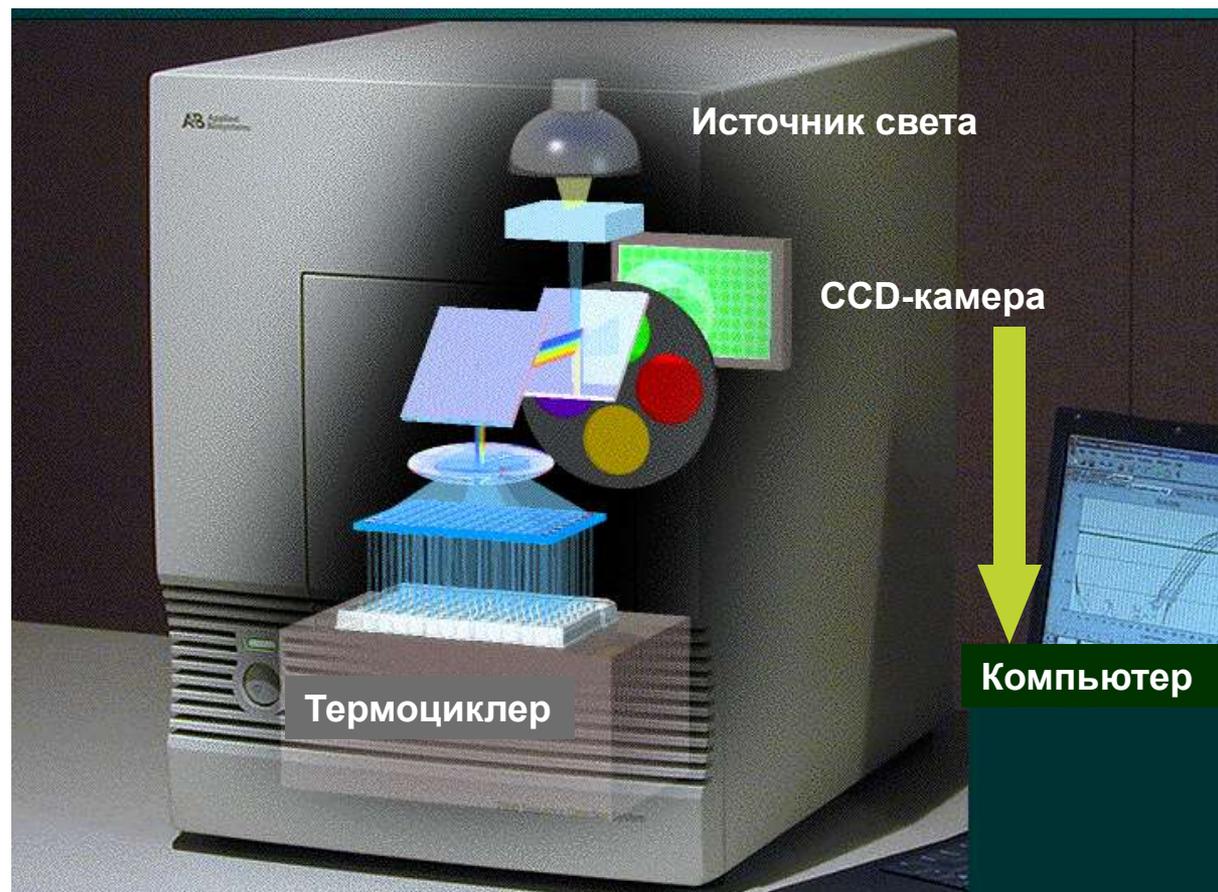
5' нуклеазный анализ



5' нуклеазный анализ

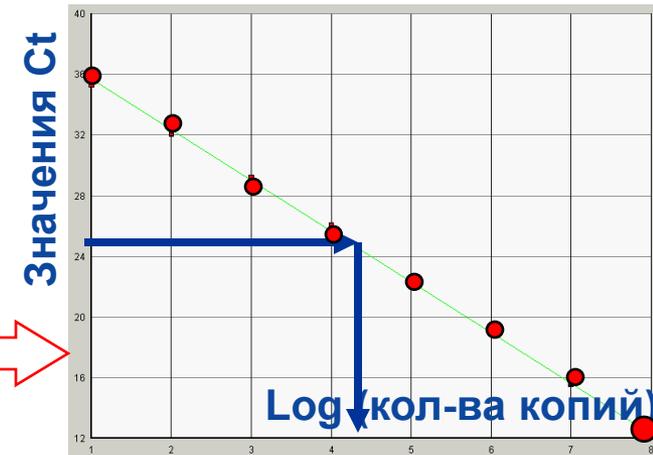
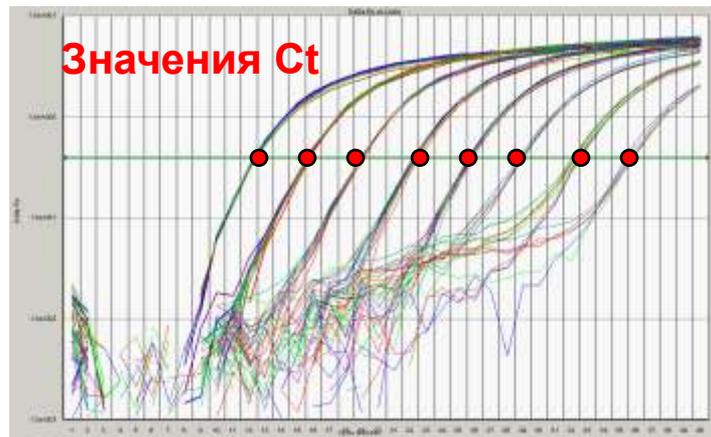


СХЕМА ПРИБОРА



Количественная оценка ДНК по калибровочной кривой

Зависимость порогового цикла C_t от количества копий ДНК



1. Построение калибровочной кривой
2. Определение количества НК в образце

ПЦР в реальном времени

Объединено в единый прибор:



Модели: 7500

7500 Fast

7300

7900HT

7900 Fast

StepOne



AB наборы для детекции патогенов в продуктах питания методом Real Time PCR

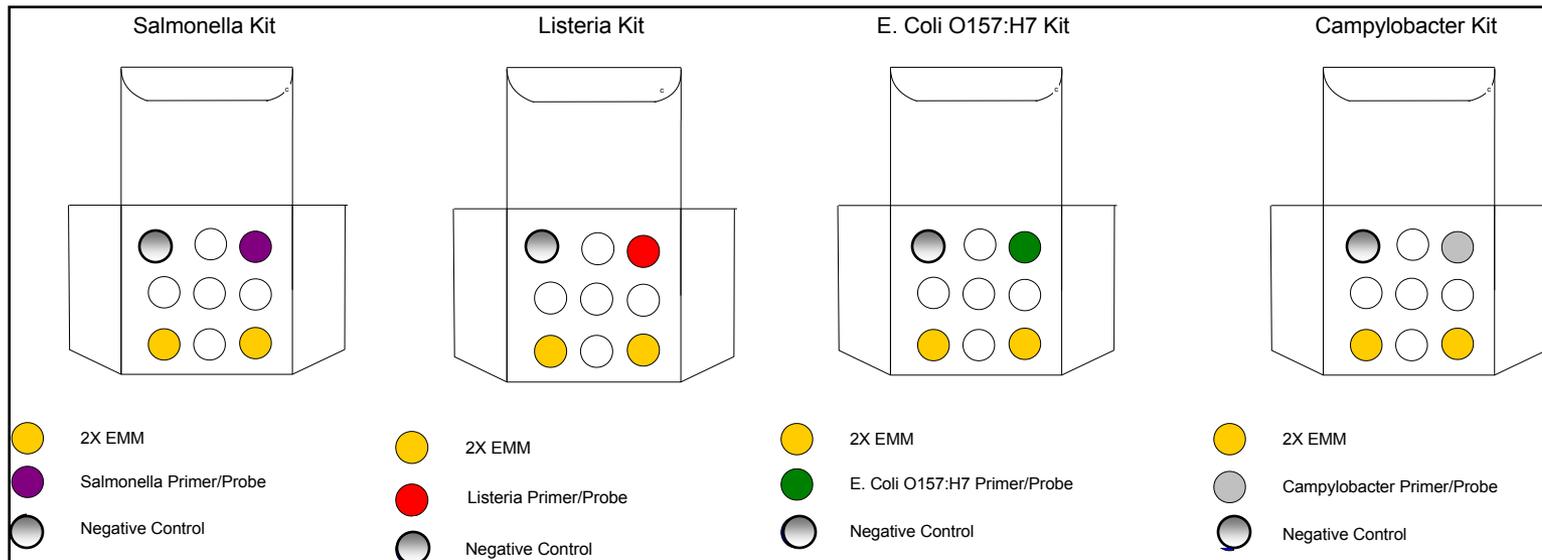
- **Food pathogen kits**

- Salmonella enterica (hlyA gene)
- Listeria monocytogenes (hlyA gene)
- Campylobacter jejuni & coli (ccoN gene)
- Escherichia coli 0157:H7(eaeA gene)
- Staphilococcus aureus
- Pseudomonas aurginosa
- Enterobacter sakazakii
- **100 tests\набор**
- **RapidFinder™: Red/Green software for 7300/7500**



Описание наборов

- В наборе используются только MGB пробы
 - Целевая последовательность: **FAM™ dye**
 - Внутренний положительный контроль (IPC): **VIC® dye**
- Одна программа PCR для всех наборов
- Просто в использовании: цветные крышки
 - 2x Environmental Master Mix (AmpliTaq Gold® Polymerase LD): желтый
 - Негативный контроль (Molecular biology grade water): белый
 - 10x Target Assay Mix + IPC (Internal Positive Control): для каждого организма свой



Мониторинг вируса птичьего гриппа

Выделение РНК

MagMax™ NA Isolation Kits

Анализ

TaqMan® Real-time PCR Kits
and Systems

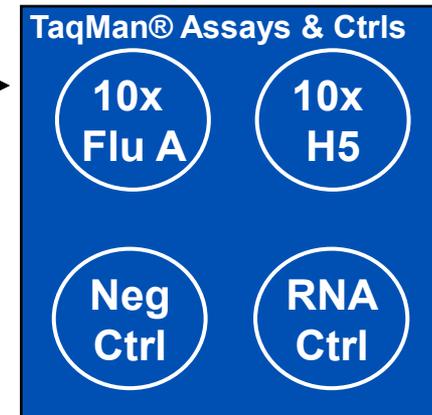
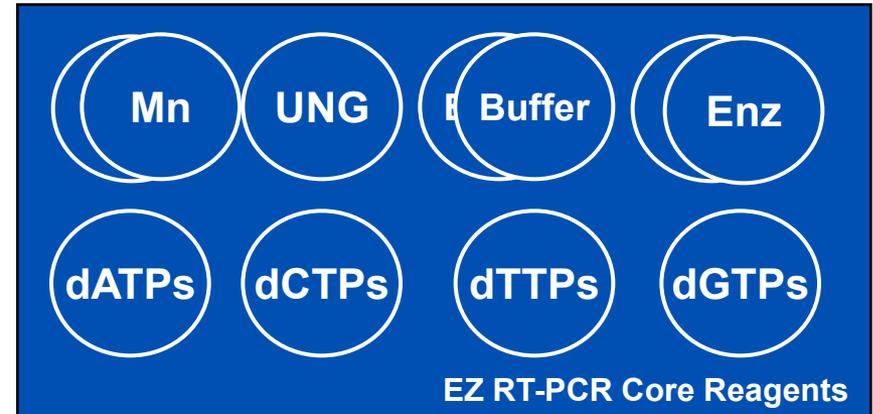
Характеристика

NA-Star™ NI Resistance Kit

Сиквенирование

AB Genetic Analyzers and
Sequencing Kits

Набор для детекции вируса птичьего гриппа TaqMan® Kit 1.0



Потдвержден для 35 известных изолятов, включая все H5N1

Influenza A Subtype H5

2006

A/goshawk/Germany/R60/06(H5N1)
A/whooper swan /Germany/R65/06(H5N1)
A/x/Romania/2910/06(H5N1)
A/x/Romania/2912/06(H5N1)
A/x/Romania/3076/06(H5N1)
A/x/Romania/3077/06(H5N1)
A/x/Romania/3258/06(H5N1)
A/x/Romania/3282/06(H5N1)
A/x/Romania/3293/06(H5N1)
A/turkey/Turkey/R11/06(H5N1)
A/x/Turkey/R12/06

2005

A/chicken/Vietnam/P41/05(H5N1)
A/chicken/Vietnam/P78/05(H5N1)
A/chicken/Vietnam/P22/05(H5N1)
A/duck/Vietnam/TG24-01/05(H5N1)
A/duck/Vietnam/TG36-H2-01/05(H5N1)
A/duck/Vietnam/AG40-O2/05(H5N1)
A/chicken/GXLA/1204/05(H5N1)
A/chicken/Indonesia/R60/05(H5N1)
A/falco cherrug/Saudi Arabia/R324/05(H5N1)

Набор для детекции вируса птичьего гриппа TaqMan® Kit 2.0

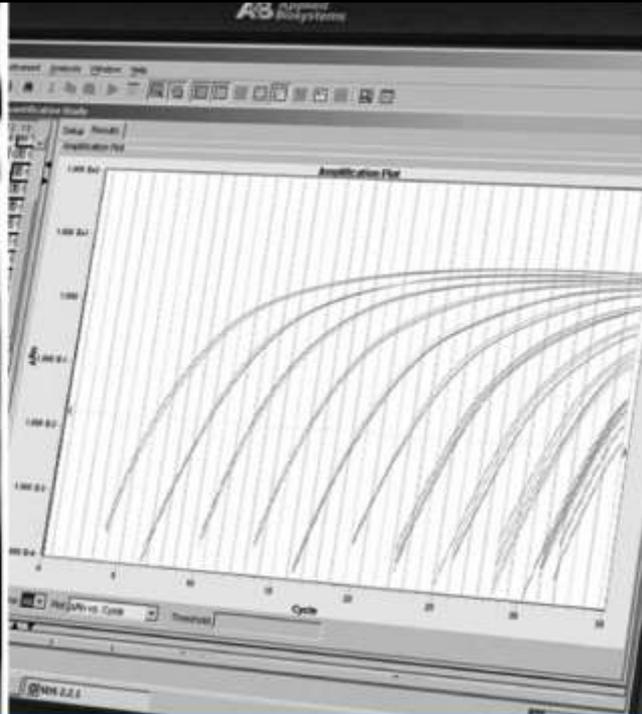


- **Стрипы с лиофилизированными реактивами**
- **4 набора (A, H5, N1, H7)**
- **Assay A цена 1162\$/96 rxn**
 - 12\$/rxn
 - Если позитивный то тестируется на H5, N1 and H7
- **Assays H5, N1 и H7**
 - 1395\$/96 rxn
 - 14.5\$/rxn

AgPath-ID наборы:



- MagMax™ для выделения РНК
- Для быстрой детекции вирусной РНК в образцах (One-Step RT-PCR):
 - AgPath-ID™ ALV Reagents (Avian Leukosis Virus)
 - AgPath-ID™ BVDV Reagents (Bovine viral Diarrhea Virus)
- Для других РНК содержащих вирусов (с праймерами пользователя):
 - AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit



AB Applied Biosystems

По всем вопросам обращаться в ООО «Химмед»

Адрес: 115230, г.Москва, Каширское шоссе, д.9, к.3

Тел.: (495) 728-4192, 742-8265/66, (499) 613-2964,

Факс: (495) 742-8341

E-mail : mail@chimmed.ru

www.chimmed.ru