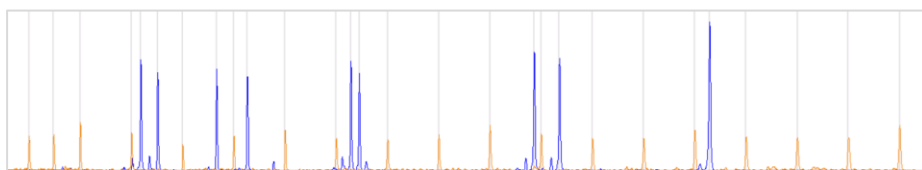


Что такое фрагментный анализ?

Фрагментный анализ — это метод, основанный на определении размера меченых фрагментов ДНК и/или интенсивности флуоресценции меченых фрагментов ДНК. Суть метода: анализируя длины фрагментов ДНК, можно определить генетический вариант образца. Например, количество коротких повторов на участке ДНК или наличие однонуклеотидной замены, или наличие инсерций и делеций. Генетические варианты ДНК определяют генетический профиль образца.



Полученные меченые фрагменты ДНК смешиваются с меченым «стандартом длин» и разделяются методом капиллярного электрофореза.

Природа фрагментов ДНК

Какие фрагменты ДНК попадают в анализ? Это флуоресцентно меченые фрагменты ДНК, по размерам и интенсивности сигнала которых можно составить уникальный профиль, или генотип образца. По таким ДНК профилям, в зависимости от задач, проводят видовую или индивидуальную идентификацию, различают здоровую и опухолевую ткань, определяют степень метилирования ДНК или наличие дополнительных копий хромосом в геноме и т.д.

От поставленной задачи зависит, какие регионы ДНК будут выбраны для фрагментного анализа. Например, для идентификации человека выбираются участки генома с микросателлитными последовательностями. Микросателлиты – это короткие tandemные повторы, где один и тот же мотив (например, ATGC) представлен в разном количестве повторов у разных людей. Поэтому длина ампликона (продукта ПЦР для выбранного участка) получается разной – это и есть основа индивидуальной идентификации. По совокупности данных по 20-30 микросателлитным локусам криминалисты получают индивидуальный профиль человека.

Измерение концентрации ДНК

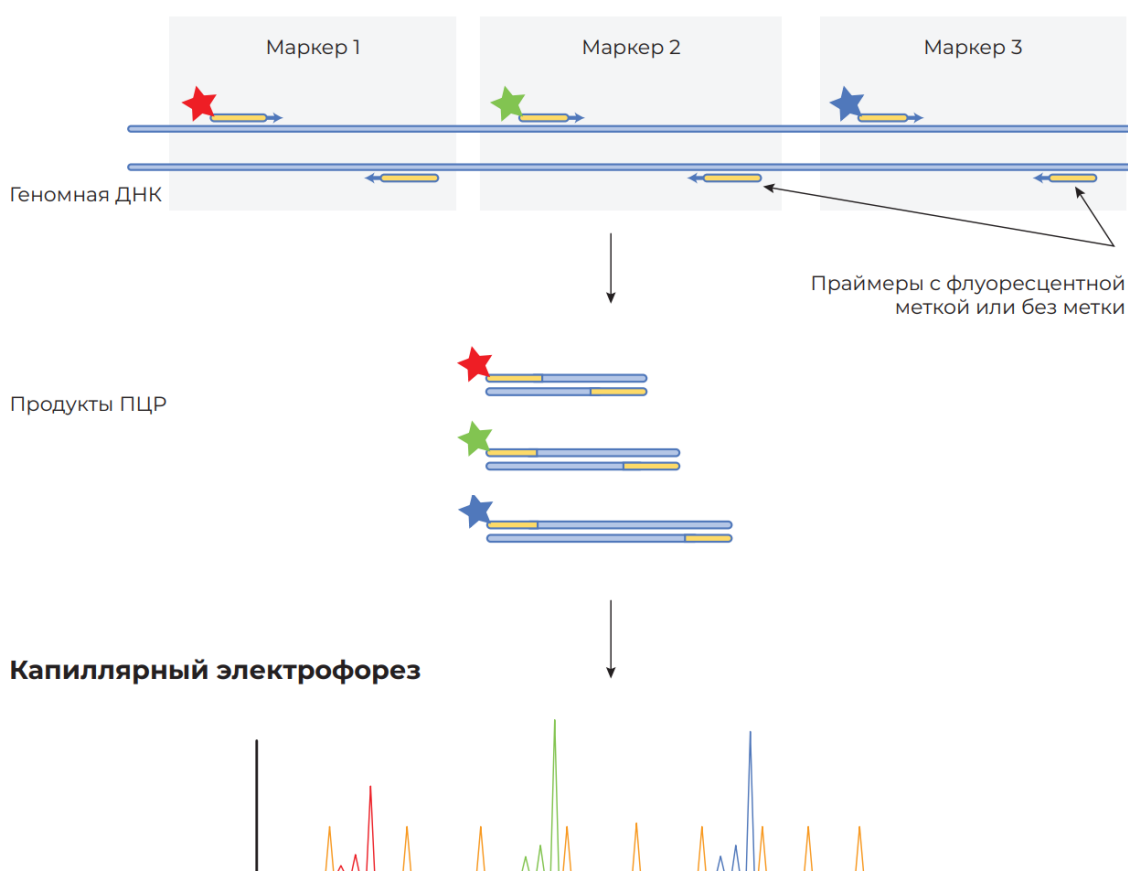
Для оптимального и воспроизводимого результата необходимо предварительно измерить концентрацию вносимой ДНК. Концентрацию можно измерить с помощью спектрофотометра, флуориметра или с помощью метода ПЦР в реальном времени (например, набором

RealQuantH3 производства ООО «НПФ Синтол» – для определения концентрации человеческой ДНК).

Мультиплексная ПЦР для получения фрагментов ДНК

Часто фрагменты ДНК для составления профиля образца получают с помощью мультиплексной ПЦР: в одной пробирке одновременно проходит ПЦР для разных пар праймеров, с которых нарабатываются копии интересующих участков геномной ДНК. Однако, существуют и другие подходы к получению фрагментов ДНК.

Мультиплексная ПЦР

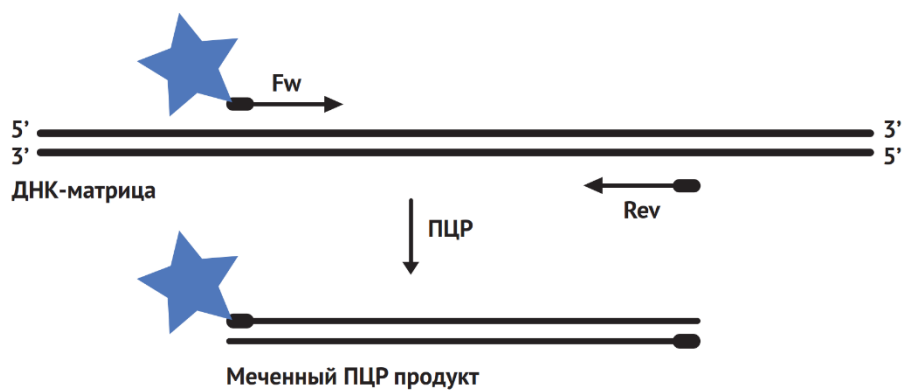


Определение длин фрагментов ДНК

Полученные меченые фрагменты ДНК смешиваются с меченым «стандартом длин» и разделяются методом капиллярного электрофореза. Размеры фрагментов стандарта длин известны. На основании полученных хроматограмм программное обеспечение вычисляет размер и, в некоторых случаях, относительное количество фрагментов ДНК в образцах.

Как метятся образцы

В большинстве случаев мечение фрагментов ДНК происходит в результате ПЦР с флуоресцентно мечеными праймерами.



Если в анализ берется несколько локусов (участков генома), то для локусов, продукты ПЦР которых могут пересечься по размерам, праймеры метят разными красителями.



В мультиплексах, где ампликоны не перекрываются по длинам — праймеры метят одним и тем же красителем.

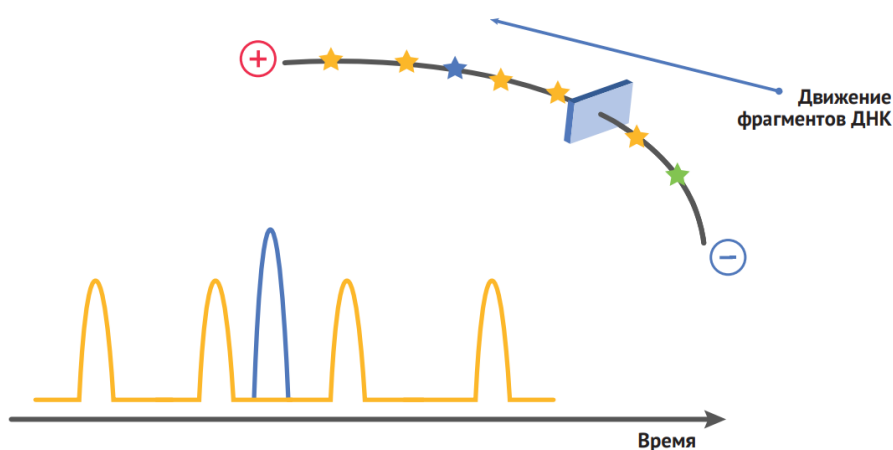
Как подбирают стандарт длин?

Стандарты длин (или маркеры молекулярных масс) представляют собой смесь фрагментов разной длины, меченных флуоресцентным красителем (например, каждый из 24 фрагментов стандарта «СД-450» несет метку Sy-660). Стандарт подбирают в соответствии с набором красителей, используемым в эксперименте, а также исходя из разброса ожидаемых длин фрагментов. Для точности определения длины фрагментов стандарт подбирают так, чтобы на электрофореграмме справа и слева от каждого анализируемого фрагмента было по два пика стандарта.



Как фрагменты разделяют по длине?

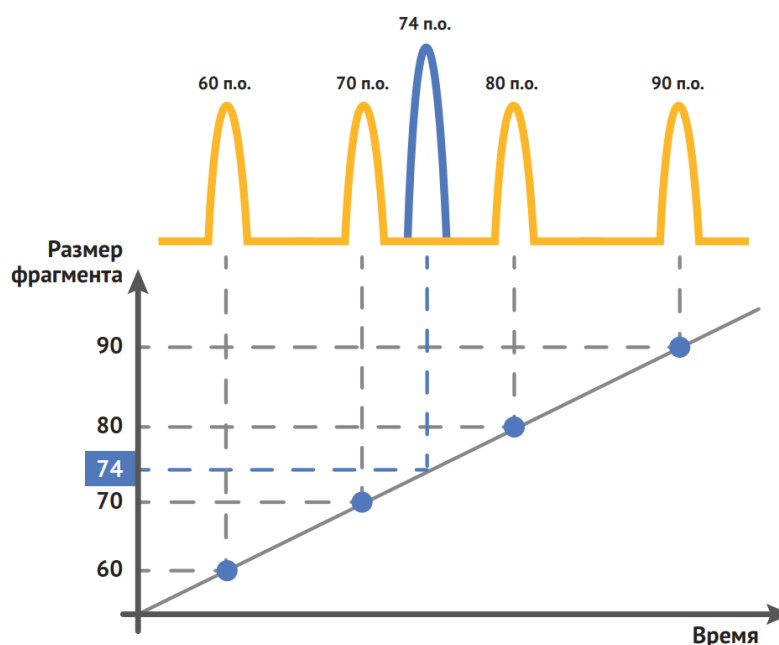
Флуоресцентно меченные фрагменты ДНК разделяют с помощью капиллярного электрофореза. Детектор снимает сигнал от образца после воздействия лазера. Детектируемый сигнал возможно отслеживать в виде выхода пиков на электрофореграмме в режиме реального времени.



Схематическое изображение движения по капилляру меченых фрагментов ДНК (синяя и зеленая метки) и фрагментов стандарта молекулярных масс (оранжевая метка).

Как определяют размер фрагментов

Фрагментный анализ позволяет измерять только относительные длины фрагментов. Размер фрагментов вычисляется на основе сравнения с подвижностью пиков стандарта длин.



Рассчитанный размер фрагментов может смещаться в зависимости от типа полимера, длины капилляра, природы стандарта длин и модели инструмента, а также последовательности анализируемых фрагментов. Для корректного сравнения данных используют аллельную лестницу или положительный контроль.

Аллельная лестница (аллельный лэддер) – синтетический «образец», входящий в состав ряда коммерческих наборов для микросателлитного анализа. В каждом локусе этого образца представлено максимально возможное количество аллелей одновременно. Как и положительный контроль, аллельная лестница служит для повышения точности определения длины фрагмента ДНК.

Информация для заказа

НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДНК ЧЕЛОВЕКА

Кат. номер	Название
DHM-200	Набор реагентов «Синдром Жильбера (Gilbert Syndrome)» для определения количества ТА-повторов в промоторной области гена UGT1A1 методом капиллярного электрофореза
DHM-201	Набор реагентов «Андрогеновый рецептор (AR)» для определения количества CAG-повторов в гене AR методом капиллярного электрофореза
DHM-202	Набор реагентов «Микросателлитная нестабильность MSI» для определения статуса микросателлитной нестабильности методами ПЦР и капиллярного электрофореза
DHM-205	Набор реагентов «Хорея (болезнь) Гентингтона (HTT)» для определения количества CAG-повторов в 1 экзоне гена HTT методом капиллярного электрофореза
HG-M31	Набор реагентов «Human ID» для идентификации личности по 31 STR-локусу
HG-M31d	Набор реагентов для идентификации личности по 31 локусу методом прямой амплификации «Human ID Direct»
HG-Y35	Набор реагентов для идентификации личности по 35 маркерам Y-хромосомы «Human Y»

НАБОРЫ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ

Кат. номер	Название
ГЭ-К-48	Набор реагентов «ГенЭксперт-Картофель» для ДНК-паспортизации сортов и сортообразцов картофеля на основе мультиплексного ПЦР-анализа 12 микросателлитных локусов (набор адаптирован к генетическим анализаторам "Нанофор 05")
ГЭ-В-48	Набор реагентов «ГенЭксперт-Виноград» для ДНК-паспортизации сортов винограда на основе мультиплексного ПЦР-анализа 9 микросателлитных локусов (набор адаптирован к генетическим анализаторам "Нанофор 05")
ГЭ-О-48	Набор реагентов «ГенЭксперт-Осетр» для ДНК-паспортизации и определения родства осетровых рыб. Основан на мультиплексной амплификации 7 STR-локусов (набор адаптирован к генетическим анализаторам "Нанофор 05")
VTM-116	Набор реагентов «Gene Profile Cattle» для проведения генотипирования крупного рогатого скота по 16 микросателлитным локусам
VTM-116L	Набор реагентов «Gene Profile Cattle L» для проведения генотипирования крупного рогатого скота по 16 микросателлитным локусам (лиофилизированный)
VTM-122	Набор реагентов «Gene Profile Cattle 2.0» для проведения генотипирования крупного рогатого скота по 21 микросателлитному локусу и локусу амелогенина
VTM-221	Набор реагентов «Gene Profile Pig +» для проведения генотипирования свиней по 21 микросателлитному локусу

VTM-221L	Набор реагентов «Gene Profile Pig + L» для проведения генотипирования свиней по 21 микросателлитному локусу (лиофилизированный)
VTM-313	Набор реагентов «Gene Profile Sheep» для проведения генотипирования овец по 12 микросателлитным локусам и локусу амелогенина
VTM-313L	Набор реагентов «Gene Profile Sheep L» для проведения генотипирования овец по 12 микросателлитным локусам и локусу амелогенина (лиофилизированный)
VTM-417	Набор реагентов «Gene Profile Horse» для генотипирования лошадей по 17 микросателлитным локусам
VTNP-25	Набор реагентов «Pig Screen» для обнаружения генетически детерминированных заболеваний свиней методом капиллярного электрофореза (RYR-синдром, DMD-стресс-синдром, RN-синдром, ISTS-синдром)

НАБОРЫ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РАСТЕНИЙ

Кат. номер	Название
РН-201	Набор реагентов «Устойчивость картофель-ФА» для выявления маркеров генов устойчивости картофеля к возбудителю фитофтороза на основе мультиплексной ПЦР с последующим анализом методом капиллярного электрофореза

Полный список наборов реагентов и расходных материалов ищите в нашем прайсе-листе на сайте www.syntol.ru



ООО «НПФ Синтол» | 127550, Москва, Тимирязевская, 42
т (495) 984-6993 многоканальный | syntol@syntol.ru