



СОВРЕМЕННОЕ ПРИБОРНОЕ ОСНАЩЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ И ЦИФРОВОЙ ПЦР

Магданов Э.Г., Чемерис Д.А., Чемерис А.В.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН, Уфа, chemeris@anrb.ru

Резюме

Рассмотрены некоторые особенности устройства и функционирования ДНК-термоциклеров, работающих в режиме реального времени. Представленный список моделей данных приборов, производимых многочисленными фирмами, свидетельствует о широком разнообразии подобных ДНК-термоциклеров, способных удовлетворить различные запросы исследователей, как по техническим параметрам, так и по цене. Кратко описаны способы регистрации результатов при проведении ПЦР в реальном времени. Более подробно рассмотрена весьма перспективная технология цифровой ПЦР, приборное оснащение для которой пока представлено фактически единичными моделями. Высказано предположение, что подобная техника будет быстро совершенствоваться и становиться все более популярной вплоть до того, что заменит в некоторых случаях нынешнюю ПЦР в реальном времени.

Ключевые слова: ПЦР, ПЦР в реальном времени, количественная ПЦР, цифровая ПЦР, ДНК-термоциклер, ДНК-термоциклер с оптическим модулем, ДНК-амплификатор

ПЦР в режиме реального времени

В настоящее время практически ни одна работа в молекулярной биологии, где объектами исследований являются нуклеиновые кислоты, не обходится без этапов их амплификации или высокочувствительной детекции. Методы амплификации фрагментов молекул ДНК или РНК проникли и во множество других медико-биологических дисциплин. Что касается диагностики, то и она сейчас преимущественно рассчитана на амплификацию, главным образом, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) специфичных фрагментов ДНК или РНК, которые могут принадлежать организмам всех уровней сложности, начиная от вирусов и заканчивая человеком. Помимо ПЦР существует еще немало других методов выявления специфичных фрагментов нуклеиновых кислот (не только уступающих, но и превосходящих ПЦР по эффективности размножения нуклеиновых кислот¹), однако в силу ряда причин не получивших столь широкого развития как ПЦР, которая действительно по праву занимает среди них всех особое место. Для этого есть, по крайней мере, два важных обстоятельства. Во-первых, ПЦР характеризуется экспоненциальным накоплением целевых продуктов реакции, позволяя в отдельных случаях детектировать

даже единичные копии молекул-мишеней. Во-вторых, ПЦР достаточно проста по исполнению. Справедливости ради, следует заметить, что имеются и весьма сложные вариации данного метода.

Так, ПЦР, появившаяся в середине 80-х годов [Saiki et al., 1985], очень быстро, по крайней мере, по масштабу применения стала фактически методом №1 в медико-биологических исследованиях и в ДНК-диагностике. Новое развитие эта реакция получила в начале 90-х гг. после ее перевода в более передовой для многих приложений режим реального времени [Holland et al., 1991; Higuchi et al., 1992; 1993; Lee et al., 1993]. Надо сказать, что ввиду широкого использования в фундаментальных исследованиях и многомиллиардного интенсивно расширяющегося диагностического бизнеса все время существования ПЦР ее сопровождает постоянный бум по разработке все новых и новых вариантов данной реакции и по конструированию приборов для ее проведения.

Если в первые годы развития ПЦР задача экспериментатора состояла только в качественном обнаружении специфичных последовательностей нуклеиновых кислот, то в дальнейшем задачи расширились – все больше и больше требовалась достаточно точная количественная оценка присутствующих в анализируемом образце копий той или иной последовательности. Так, получение достоверной информации об исходном количестве молекул определенной мРНК, например, позволяет судить об уровне транскрипционной активности и дает экспериментатору сведения, которые трудно

¹ Прочие реакции амплификации нуклеиновых кислот, в том числе, протекающие в изотермических условиях, станут предметом рассмотрения в другой нашей статье в одном из ближайших номеров данного журнала.

переоценить, поскольку они крайне важны для понимания функционирования какого-то одного конкретного гена или даже целого генного ансамбля. Разработанные в 80-е годы количественные или точнее полуколичественные методы определения числа исходных копий ДНК, путем сравнения яркости свечения полос в геле после электрофореза продуктов реакций анализируемого и контрольного образцов (рис. 1), считая, что она (яркость) пропорциональна количеству получившихся ПЦР-ампликонов в этих образцах и реакции в них идут одинаково, были, мягко говоря, не совсем точными. Все-таки, реакции амплификации в разных пробирках идут, по тем или иным причинам, с разной эффективностью и выходят на «плато» не в одно и то же время (не в одном и том же цикле), а анализ продуктов реакции, проводимый уже после ПЦР, в так называемой конечной точке, не дает возможности контроля за ходом реакции и её оптимизации.



Рис.1. Типичная картина разделения ПЦР-ампликонов в геле, окрашенном бромистым этидием, плохо пригодная для количественной оценки исходного числа копий мишеней

Появление ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в корне изменило ситуацию. Она дала экспериментатору возможность визуального наблюдения за ходом накопления целевых продуктов реакции в пробирках от цикла к циклу (в реальном времени) на экране монитора – в виде кривых флуоресценции (рис. 2), сопровождаемых дальнейшим математическим анализом.

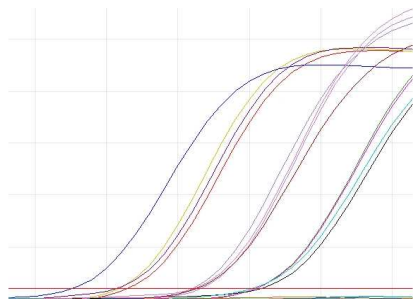


Рис.2. Типичные кривые флуоресценции, генерируемые для разных образцов в ПЦР-РВ, позволяющие путем сравнения с реперными молекулами рассчитывать исходное число копий мишеней

Таким образом, сейчас уже нет никакого смысла с целью подсчета числа стартовых копий-мишеней пытаться провести обычную ПЦР в ее количественном / полуколичественном вариантах с анализом по конечной точке. Подчеркнем здесь слово «обычную», поскольку вернемся к этому вопросу далее при рассмотрении регистрируемых количеств ампликонов в ПЦР.

Для целей ДНК-диагностики серьезным недостатком обычного варианта ПЦР по конечной точке, включающего электрофоретическое разделение продуктов реакции, являлась необходимость последующего открытия пробирок и манипуляции с их содержимым вне пробирки. В результате этого могло произойти загрязнение воздуха лаборатории ампликонами, представленными миллиардами или даже триллионами копий молекул ДНК, что может повлечь за собой получение в ходе последующих анализов ложнопозитивных результатов, возникающих из-за того, что новые реакционные смеси могут быть изначально воздушно-капельным путем случайно загрязнены продуктами ПЦР, образовавшимися в ходе предыдущих положительных реакций и циркулирующих в воздушной среде.

В настоящее время, несмотря на высокую стоимость приборов, все большее число диагностических лабораторий переходит на метод ПЦР-РВ и, видимо, через несколько лет ПЦР в реальном времени просто вытеснит (для целей ДНК-диагностики) обычную ПЦР по конечной точке. Этому способствует и заметное снижение цен на эти приборы в результате острой конкуренции фирм-производителей, выпускающих с каждым годом все больше и больше моделей ДНК-амплификаторов, работающих в режиме реального времени. Практически все основные производители обычных ДНК-термоциклеров разработали свои собственные модели для работы в режиме реального времени, в том числе, с использованием оптических блоков, просто монтируемых на существующий базовый прибор, работающий по конечной точке. В таком разнообразии выпускаемых приборов экспериментатору подчас бывает непросто разобраться и выбрать для себя наиболее подходящий. Данная статья призвана до некоторой степени облегчить выбор модели ДНК-амплификатора, максимально отвечающей стоящим перед конкретной лабораторией целям и задачам. По этой причине нами рассматриваются только коммерчески реализуемые в настоящее время приборы. Упоминание некоторых снятых с производства ДНК-термоциклеров с оптическим модулем делается только для краткого освещения истории вопроса и отражения значительного прогресса в данной области. Другой причиной остается возможность приобретения подержанных ДНК-термоциклеров, в том числе старых моделей, например, через специализированные web-сайты - www.labx.com, <http://www.pegasusscientific.com> и др.

Прежде чем перейти к описанию особенностей приборов, считаем необходимым кратко коснуться основных принципов детекции ампликонов в режиме реального времени и напомнить читателям, что ПЦР в своем классическом исполнении является температурорегулируемой реакцией, что предполагает циклическую трех/двух-ступенчатую смену температур в диапазоне от 96 до 50°C или около того.

Все подходы к детекции результатов ПЦР-РВ можно условно разделить на низко- и высокоспецифичные.² К первой группе относятся способы детекции накопления ампликонов с помощью различных интеркалирующих красителей, характеризующихся увеличенной флуоресценцией в комплексе с двуцепочечной ДНК. Наиболее широко применяемым таким красителем является SYBR Green I. Реже применяются красители EVA Green, LCGreen, Syto9 и др. Все ДНК-термоциклеры, работающие в режиме реального времени, рассчитаны на использование интеркалирующих красителей, но при этом модели могут отличаться длинами волн возбуждения данных флуорохромов.

Причиной низкой специфичности ПЦР-РВ с интеркалирующими красителями является то, что накопление любой двуцепочечной ДНК в реакционной смеси, включая неспецифические продукты, будет приводить к увеличению флуоресценции раствора и, следовательно, остается вероятность регистрации ложнопозитивного результата или, по крайней мере, его искажения. Немного выше специфичность вариантов ПЦР-РВ, в которых только один из праймеров несет флуоресцентный краситель, который после появления образовавшихся с участием данного праймера двуцепочечных ампликонов, в зависимости от различных привходящих обстоятельств как-то меняет интенсивность своего свечения. Высокоспецифичные варианты ПЦР-РВ обеспечиваются наличием в реакционной смеси дополнительного олигонуклеотида, служащего гибридационным (отжигаются на участке ампликона между прямым и обратным праймерами) зондом, несущим, как правило, на разных концах краситель и тушител флуоресценции этого красителя. Таким образом, в случае если используемые праймеры отожгутся на «нецелевых» местах и это приведет к наработке неспецифического продукта, то его последовательность не будет иметь участок, комплементарный гибридационному зонду и соответственно «нецелевые» ампликоны не будут регистрироваться как целевые. При этом для такого варианта ПЦР-РВ можно одновременно использовать несколько видов красителей и гасителей их

флуоресценции, а их выбор с не перекрывающимися (или с незначительным перекрытием) спектрами излучения позволяет осуществлять мультиплексную ПЦР, тогда как с интеркалирующими красителями этого сделать невозможно.

Одной из важных характеристик ДНК-термоциклеров является возможность регистрации излучения красителя-акцептора после переноса резонансной энергии флуоресценции к нему от красителя-донора, известного как FRET-эффект (Fluorescent или Forster Resonance Energy Transfer - FRET). В основе данного эффекта, известного еще со второй половины 40-х гг. прошедшего столетия [Forster, 1946], лежат резонансные диполь-дипольные взаимодействия молекул, и необходимым условием его проявления является перекрытие спектров испускания и возбуждения донорного и акцепторного флуорохромов, входящих в состав, соответственно, прямого и обратного праймеров, отжигающихся на мишени в непосредственной близости друг от друга, обеспечивая перенос энергии флуоресценции [Чемерис и др, 2005; Chemeris et al., 2007]. Такой вариант ПЦР-РВ является высокоспецифичным, поскольку благодаря расположению праймеров встык (или почти встык или даже с небольшим перекрытием в один/два нуклеотида), можно считать, что число нуклеотидов, которые определяют количество возможных комбинаций, увеличивается в два раза и, например, для двух праймеров по 20 звеньев оно становится равным 40. Поскольку для подобного случая число комбинаций рассчитывается по формуле x^y , где x – число типов азотистых оснований, а y – длина участка анализируемой нуклеотидной последовательности, берущейся в анализ, то $x = 4$ по числу азотистых оснований, а $y = 40$ нуклеотидам для данного примера, и четыре в сороковой степени дадут септиллион (10^{24}) комбинаций. Тем самым обеспечивается высокая специфичность такого варианта ПЦР в реальном времени, поскольку случаи фальш-праймирования, вызванные отжигом на других местах, расположенных вплотную, сразу двух праймеров, «связанных» между собой эффектом переноса энергии (или гашения флуоресценции), практически невозможны. Что касается вероятного отжига праймеров самих на себя с образованием гетеродимеров, между которыми возможен резонансный перенос энергии флуоресценции, то это должно быть с одной стороны полностью исключено еще на этапах подбора праймеров и отработки метода с конкретной парой праймеров, а с другой - может быть легко обнаружено на стадии плавления образовавшихся ампликонов, где наличие пика с меньшей температурой плавления, чем целевой продукт, будет свидетельствовать об имеющей место неспецифике.

² Всевозможным способам регистрации целевых ампликонов в ходе ПЦР в реальном времени будет посвящена отдельная статья, которая выйдет в одном из последующих номеров данного журнала.



Настольный геномный секвенатор нового поколения Ion Torrent (PGM)

Секвенатор второго поколения PGM™ (Ion torrent) — это новая настольная система для генетических исследований на основе полупроводниковой платформы и метода детекции иона водорода в процессе секвенирования. Секвенатор PGM™ применяется для секвенирования или ресеквенирования бактериальных геномов, вирусов, целевого ресеквенирования больших геномов.



Скорость работы системы зависит от используемых расходных материалов и для ее увеличения не требуется проводить обновление оборудования, достаточно лишь использовать более новую версию полупроводниковых микрочипов для секвенирования, производительность которых растет каждый год по экспоненциальному закону.

В зависимости от задач можно использовать микрочипы со скоростью прочтения 10 млн., 100 млн. или 1 млрд. нуклеотидов за 2 часа работы прибора. И с каждым годом возможности системы будут только расти, позволяя решать всё более масштабные задачи.

Приложения

- Полное повторное секвенирование геномов (поиск SNP, структурных перестроек и вариаций, полногеномное генотипирование).
- Направленное повторное секвенирование отдельных крупных фрагментов геномов.
- De novo секвенирование небольших геномов (вирусы, микроорганизмы).
- Целевое секвенирование фрагментов больших геномов.
- Анализ РНК.
- Предварительная оценка, контроль качества библиотек.

119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40 МГУ им. М. В. Ломоносова
Телефон (495) 933-2736; факс: (495) 930-0084, mail@helicon.ru, www.helicon.ru

Представительство в НОВОСИБИРСКЕ: 630128 г. Новосибирск, ул. Демакова, 23, оф. 201, тел.: (383) 214-60-82, факс: (383) 217-43-89, e-mail: novosibirsk@helicon.ru
Представительство в САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ: 195220 г. Санкт-Петербург, ул. Гжатская, 27 А, оф. 245, тел./факс: (812) 248-91-30, e-mail: spb@helicon.ru

Причиной растущей популярности использования FRET-эффекта в молекулярной биологии и смежных областях науки является то, что возможный высокий фон флуоресценции красителя-донора не мешает регистрации излучения красителя-акцептора, поскольку их частоты испускания разные, к тому же излучение последнего возможно только в связанном состоянии с красителем-донором. Применительно к ДНК, это означает, что фрагмент, их несущий, должен составлять единое целое, а расстояние между красителями, для эффективного переноса энергии желательно, чтобы не превышало 5-7 нм, при этом свечение красителя-донора в составе не вошедшего в реакцию праймера отсекается за счет использования соответствующих фильтров.

ДНК-термоциклеры по типу реакционных блоков, камер, ячеек, другим особенностям можно разделить

на несколько групп. Чаще всего в термоциклерах используются твердотельные металлические термоблоки из алюминия или позолоченного серебра. В них нагрев и охлаждение производится элементами Пельтье, в первых же моделях нагрев осуществлялся с помощью резистивных нагревателей, а охлаждение - проточной водой. Скорости смены температур для различных моделей таких термоциклеров, производимых разными фирмами, обычно варьируют от 1 до 6°C в секунду, причем охлаждение происходит значительно медленнее, чем нагрев. Возможность создания в термоблоке градиента температур, имеющаяся у некоторых моделей, является полезной опцией, поскольку упрощает (ускоряет) экспериментальный подбор оптимальных температур отжига праймеров, а в ряде случаев и температуры элонгации.

Альтернативой ДНК-термоциклерам с твердотельным термоблоком служат приборы, где по существу происходит просто смена воздуха в полый реакционный камере. Для них типичны более быстрые скорости смены температур в диапазоне от 8 до 15°C/сек. Реакционными сосудами в настоящее время чаще всего служат или полипропиленовые пробирки объемом 0,2 мл или микротитраторные планшеты на 96 или 384 лунки. В некоторых моделях применяются стеклянные капилляры или более сложные устройства. Так, реакционный сосуд ДНК-термоциклера модели SmartCycler фирмы Cepheid (США) заслуживает того, чтобы быть отдельно упомянутым.

Из рис. 4, на котором приведены данные реакционные сосуды, видно, что они кардинально отличаются от обычных конических пробирок и, вне всякого сомнения, заметно их дороже. Однако ПЦР-РВ представляет собой процесс, подсчет общей стоимости осуществления которого, безусловно, включает траты на расходные материалы, но главным все же является достижение достоверных результатов и тут, как говорится, - кто-то «за ценой может и не постоять».

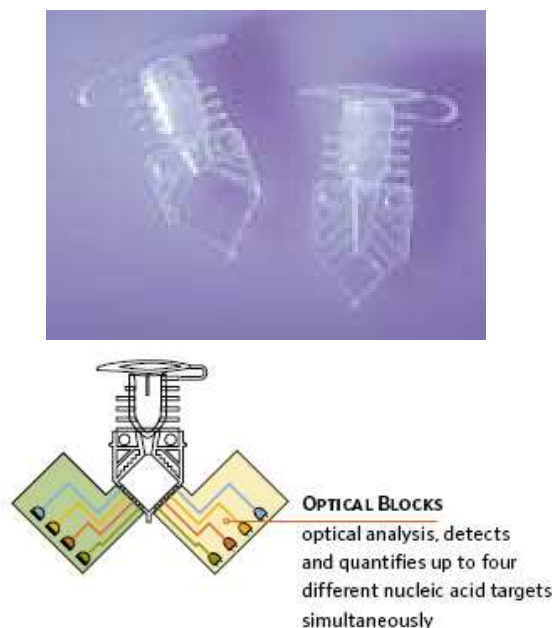


Рис. 4. Реакционные сосуды для ДНК-термоциклера модели SmartCycler фирмы Cepheid (США)

Но при этом, немаловажное значение для общей скорости проведения всей процедуры амплификации с помощью ПЦР, включая подготовительные стадии, имеет все же стандартная форма как пробирок, так и реакционного блока, в частности, на 96 лунок, ввиду

возможности использования с таковым резко ускоряющих работу автоматических пипетирующих станций-роботов, тогда как реакционный блок роторного типа ДНК-термоциклера Rotor-Gene, например, непригоден даже для применения многоканальных пипеток.

Необходимо, заметить, что для ряда ДНК-термоциклеров существует возможность замены в базовом модуле реакционных блоков под стоящие перед экспериментаторами задачи. Например, вместо термоблока на 96 пробирок может быть смонтирован 384-луночный термоблок. Вместо полипропиленовых пробирок в заменяемом другом термоблоке могут использоваться стеклянные капилляры и наоборот.

Особенностью всех ДНК-термоциклеров с оптическим модулем является возможность по завершении амплификации провести плавление образовавшихся ампликонов с целью подтверждения наработки целевых продуктов, зная при этом температуру плавления целевого ампликона. Однако некоторые модели позволяют выявить более тонкие различия в температурах плавления между различными продуктами с целью обнаружения, например, однонуклеотидного полиморфизма. Такие ДНК-термоциклеры обычно в названии модели содержат аббревиатуру HRM – High Resolution Melting.



У различных ДНК-термоциклеров по-разному устроена оптическая система. Так, для передачи световых потоков используется или геометрическая оптика (линзы, зеркала) или оптоволоконные технологии. В одних приборах для возбуждения флуорохромов используется лазерный источник света, в других применяются галогеновые лампы или светодиоды, а регистрация свечения производится с помощью или ФЭУ, или ПЗС-матриц или фотодиодов, при этом данные типы источников и детекторов света имеют свои преимущества и недостатки, но для обычных пользователей при выборе моделей, как правило, большее значение имеют вопросы емкости реакционного блока, количества регистрирующих каналов, скорости смены температур, наличие задаваемого градиента температур.


На этом мы завершаем краткое рассмотрение основных особенностей ДНК-термоциклеров с оптическими модулями. Заинтересованного читателя можем отослать к книге Д.В.Ребрикова и соавт. [2009], где в главе 3, посвященной описанию оборудования для ПЦР в реальном времени, подробно рассмотрены различные аспекты распределения температур в твердотельном реакционном блоке, а также некоторые другие моменты.

Таблица


Внешний вид и характеристики ДНК-термоциклеров с оптическим блоком

ДНК-технология, Россия, Москва <http://www.dna-technology.ru>


Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШХГхВ, мм вес
ДТ-322 	Элементы Пельтье 3°C / сек 2,5°C / сек	32 пробирки по 0,2 мл	2	светодиод	ПЗС-матрица	Есть	350 x 350 x 220 11 кг
ДТ-96 	Элементы Пельтье 3,3°C / сек 2,1°C / сек	96 пробирок по 0,2 мл (опционально 384-луночный планшет)	4 (5-й канал опционально)	светодиод	ПЗС-матрица	Есть	210 x 540 x 540 27 кг

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
DTlite 	Элементы Пельтье 5°C / сек 2,5°C / сек (для 48 блока) 3,5°C / сек 2°C / сек (для 192 блока)	48 (8x6) пробирок по 0,2 мл 192 (16x12) пробирок	4 – 5 470-750 нм	светодиод	ПЗС-матрица	Есть 105°C	210 x 480 x 210 17 кг


ИАП РАН / МГТУ им. Баумана / ЗАО Синтол, Россия, Санкт-Петербург, Москва <http://www.syntol.ru>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
АНК-16, АНК-32 	Элементы Пельтье 3°C / сек 2,5°C / сек	16 или 32 пробирки по 0,2 мл	4-5 Возможно увеличение числа каналов до 6 Возможна детекция FRET-эффекта	Галогеновая лампа	ФЭУ 9 порядков	Регулируемый нагрев от 95 до 110°C	340 x 400 x 420 26 кг

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
АНК-32-М 	Элементы Пельтье 5°C / сек 3,5°C / сек	16 или 32 пробирки по 0,2 мл	5 Возможно увеличение числа каналов до 8 Возможна детекция FRET-эффекта	Галогеновая лампа	ФЭУ 9 порядков	Регулируемый нагрев от 95 до 110°C	340 x 400 x 420 26 кг
АНК-64 	Элементы Пельтье 1,5°C / сек 1,5°C / сек	64 пробирки по 0,2 мл	5 Возможно увеличение числа каналов до 6 Возможна детекция FRET-эффекта	Галогеновая лампа	ФЭУ 9 порядков	Регулируемый нагрев от 95 до 110°C	440 x 380 x 420 28 кг



<p>АНК-4³</p> 	<p>Воздушное 3,5°C / сек 3,5°C / сек</p>	<p>4 пробирки по 0,2 мл</p>	<p>4</p>	<p>4 светодиод а</p>	<p>ФЭУ 9 порядков</p>	<p>Регулируемый нагрев от 95 до 110°C</p>	<p>320 x 259 x 220 5,5 кг</p>
--	--	---------------------------------	----------	------------------------------	---------------------------	---	-----------------------------------

Люмекс, Россия, Санкт-Петербург <http://www.lumex.ru>


<p>Модель</p>	<p>Принцип и скорости нагрева/ охлаждения</p>	<p>Формат термоблока</p>	<p>Число каналов измерения флуоресценции</p>	<p>Источник излучения</p>	<p>Детектор</p>	<p>Нагрев крышки термоблока</p>	<p>Габариты ШxГxВ, мм вес</p>
<p>Ариадна</p> 	<p>Элементы Пельтье 12°C / сек 10°C / сек</p>	<p>кремниевый чип на 48 реакторов алюминиевый чип на 30 реакторов</p>	<p>2</p>	<p>светодиод</p>	<p>ПЗС- матрица</p>	<p>Нет данных</p>	<p>Нет данных</p>

³ Возможно питание прибора через адаптер от автомобильной сети 12В


Agilent's Stratagene, США <http://www.agilent.com>



Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор, Диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
<p>MX3000P</p> 	<p>Элементы Пельтье 2,5°C / сек 2,5°C / сек</p>	<p>96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл</p>	<p>4 (фильтры по выбору пользователя)</p>	<p>кварцевая вольфрамовая галогеновая лампа</p>	<p>ФЭУ 7 порядков</p>	<p>есть</p>	<p>356 x 508 x 457 20,4 кг</p>
<p>MX3005P</p> 	<p>Элементы Пельтье 2,5°C / сек 2,5°C / сек</p>	<p>96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл</p>	<p>5 (возможна установка фильтров для FRET-эффекта)</p>	<p>кварцевая вольфрамовая галогеновая лампа</p>	<p>ФЭУ 10 порядков</p>	<p>есть</p>	<p>356 x 508 x 457 20,4 кг</p>

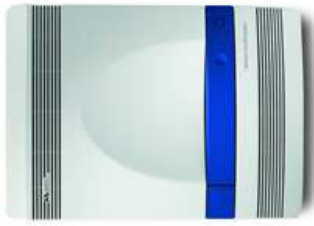
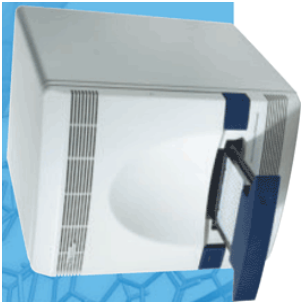
Analytik Jena AG, Германия <http://www.analytik-jena.de>

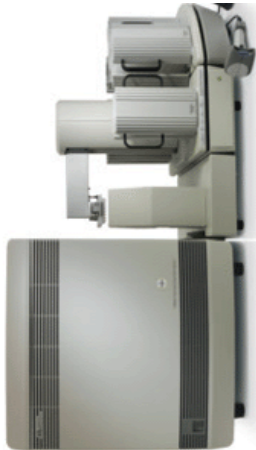

Модель							
qTOWER	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
	Воздушное 12°C / сек 8°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл	5 фильтров + 4 комбинации фильтров для FRET-эффекта	3 светодиода (голубой, белый, красный)	ПЗС-матрица	Регулируемый нагрев от 30 до 99°C	280 x 380 x 430 15,6 кг


Applied Biosystems, США <http://www.appliedbiosystems.com>

Модель							
StepOne	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
	Элементы Пельтье 2,2°C / сек 1,6°C / сек	48 луночные планшеты или пробирки по 0,1 мл	1 фильтр возбуждения, 4 фильтра эмиссии	3 светодиода	фотодиод	Есть	246 x 427 x 512 23,6 кг


Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор Динамический диапазон	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШxГxВ, мм вес
<p>StepOnePlus</p> 	<p>Элементы Пельтье 2,2°C / сек 1,6°C / сек</p>	<p>96 луночные планшеты или пробирки по 0,1 мл (6 независимых модулей на 16 образцов)</p>	<p>1 фильтр возбуждения, 4 фильтра эмиссии</p>	<p>3 светодиода</p>	<p>фотодиод</p>	<p>Есть</p>	<p>246 x 512 x 512 24 кг</p>
<p>7300</p> 	<p>Элементы Пельтье 1,1°C / сек</p>	<p>96 луночные планшеты или пробирки по 0,2 мл</p>	<p>1 фильтр возбуждения, 4 фильтра эмиссии</p>	<p>Галогеновая лампа</p>	<p>ПЗС 9 порядков</p>	<p>Есть</p>	<p>340 x 490 x 450 29 кг</p>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор Динамический диапазон	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШxГxВ, мм вес
7500 	Элементы Пельтье 2,5°C / сек	96 луночные планшеты или пробирки по 0,2 мл	5 фильтров возбуждения, 5 фильтров эмиссии	Галогеновая лампа	ПЗС 9 порядков	Есть	340 x 490 x 450 34 кг
7500 Fast Dx 	Элементы Пельтье 5,5°C / сек	96 луночные планшеты или пробирки по 0,2 мл	5 фильтров возбуждения, 5 фильтров эмиссии	Галогеновая лампа	ПЗС 9 порядков	Есть	340 x 450 x 490 34 кг



Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор Динамический диапазон	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
7900HT 	Элементы Пельтье Быстрый режим – +/- 3.0°C/сек Стандартный режим – +/-1.6°C/сек	96 или 384 луночные планшеты		488 нм аргонный лазер с длительным сроком службы	ПЗС 9 порядков	Есть	1250 x 840 x 640 (с блоком автоматизации) 114 кг (с блоком автоматизации)
ViiA7 	Нет данных	4 за одну минуту взаимозаменяемых блока для 96 или 384 луночных планшетов	6 500-720 нм	450-670 нм	9 порядков	Есть	533 x 635 x 645 60,7 кг



Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
OpenArray 	Элементы Пельтье 4°C / сек 2°C / сек	Чип с 3072 сквозными отверстиями, вмещающими по 33 нл	3 фильтра возбуждения, 4 фильтра эмиссии 510 – 620 нм	3 светодиода 480 нм, 520 нм, 570 нм	ПЗС-матрица 6 порядков	Нет данных	630 x 770 x 725 78 кг

Beijing Junyi-Dongfang Electrophoresis Equipment Co., LTD, КНР <http://www.bj-ok.com>



Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
FTC-2000 	Элементы Пельтье 2,5°C / сек	96 пробирок по 0,2 мл (FTC-2000A) 64 пробирки по 0,2 мл (FTC-2000B) 32 пробирки по 0,2 мл (FTC-2000C) Градиент температур	4 500-700 нм	Галогеновая лампа, светодиод 4 фильтра - 450-640 нм	ФЭУ 10 порядков	Есть (105°C)	540×390×330 25 кг

Bioer Technology, КНР http://www.bioer.com.cn/bioer/bioer_en


Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор Динамический диапазон	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШxГxВ, мм вес
Line-gene I 	Элементы Пельтье 4°C / сек 4°C / сек	33 по 0,2 мл градиент температур	3 520-670 нм	Светодиод голубой	ФЭУ	Есть (105°C)	456 x 514 x 245 23 кг
Line-gene II 	Элементы Пельтье 4°C / сек 4°C / сек	66 по 0,2 мл градиент температур	3 520-670 нм	Светодиод голубой	ФЭУ	Есть (105°C)	520 x 550 x 270 27 кг

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор Динамический диапазон	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
<p>Line-gene K</p> 	<p>Элементы Пельтье 4°C / сек 4°C / сек</p>	<p>48 по 0,2 мл Градиент температур</p>	<p>2 или 4 525-612 нм</p>	<p>Светодиоды 470-571 нм</p>	<p>ФЭУ 10 порядков</p>	<p>От 80 до 110°C</p>	<p>450 x 520 x 320 25 кг</p>
<p>Line-gene 9600</p> 	<p>Элементы Пельтье 4°C / сек 4°C / сек</p>	<p>96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл Градиент температур</p>	<p>4, 6 или 8 500-800 нм</p>	<p>Светодиоды 300-800 нм</p>	<p>2 ФЭУ</p>	<p>От 30 до 110°C</p>	<p>395 x 430 x 352 28 кг</p>


BioGene Limited, Англия <http://www.biogene.com>

Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШxГxВ, мм вес
<p>SynChron</p>  <p>Защищенный патентом интегрированный температурный контроль каждой пробирки до 10°C / сек (есть информация о 20°C/сек)</p>	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл	Нет информации	3 светодиода (голубой, белый, красный)	ПЗС-матрица	Регулируемый нагрев от 30 до 99°C	370 x 530 x 430 25 кг
<p>InSyte</p>  <p>Защищенный патентом интегрированный температурный контроль каждой пробирки до 15°C / сек</p>	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл	520-720- нм	Твердотельный лазер 473 нм	Многоканальный ФЭУ	Регулируемый нагрев от 30 до 99°C	440 x 460 x 600 45 кг


Biometra, Германия <http://www.biometra.de>

Модель							Габариты ШхГхВ, мм	вес
T-Optical	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	280 x 380 x 430	15,6 кг
	Элементы Пельтье 6°C / сек 4,5°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл (опционально градиент температур)	6 фильтров + 4 комбинации фильтров для FRET-эффекта	3 светодиода (голубой, белый, красный)	ПЗС-матрица	Регулируемый нагрев от 30 до 99°C		

Biomeer, Южная Корея <http://eng.biomeer.com>

Модель							Габариты ШхГхВ, мм	вес
Exicycler	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	470 x 355 x 540	30 кг
	Элементы Пельтье 2,5°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл градиент температур	5 фильтров 520-670 нм	Short arc лампа 490-640 нм	2 ПЗС-матрицы	Есть 90-120 °C		

Bio-Rad Laboratories, США <http://www.bio-rad.com>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор, Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
<p>MiniOpticon</p> 	<p>Элементы Пельтье 2,5°C / сек</p>	<p>48 пробирок по 0,2 мл градиент температур</p>	<p>2 523-700 нм</p>	<p>48 светодиодов 470-500 нм</p>	<p>2 фотодиода 7 порядков</p>	<p>есть</p>	<p>180 x 320 x 330 6,8 кг</p>
<p>DNA Engine Opticon 2</p> 	<p>Элементы Пельтье 3°C / сек</p>	<p>96 пробирок по 0,2 мл градиент температур</p>	<p>2 523-700 нм</p>	<p>96 светодиодов 470-505 нм</p>	<p>2 ФЭУ</p>	<p>есть</p>	<p>340 x 470 x 600 29,0 кг</p>



Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор, Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
<p>Chromo4</p> 	<p>Элементы Пельтье 3°C / сек</p>	<p>96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл градиент температур</p>	<p>5 515-730 нм (возможна установка фильтров для FRET-эффекта)</p>	<p>4 светодиода 450-650 нм</p>	<p>4 фотодиода</p>	<p>есть</p>	<p>240 x 350 x 370 12,6 кг</p>
<p>iCycler iQ</p> 	<p>Элементы Пельтье 3,3°C / сек 2,0°C / сек</p>	<p>96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл градиент температур</p>	<p>4 515-700 нм</p>	<p>вольфрамовая галогеновая лампа 475-645 нм</p>	<p>ПЗС</p>	<p>есть</p>	<p>290 x 580 x 390 17,6 кг</p>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор, Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
iQ5	Элементы Пельтье 3,3°C / сек 2,0°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл градиент температур	5 515-700 нм	вольфрамовая галогеновая лампа 475-645 нм	ПЗС-матрица (12 бит)	есть	290 x 580 x 390 17,6 кг
MuQ	Элементы Пельтье 3,3°C / сек 2,0°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл градиент температур	1 515-545 нм	вольфрамовая галогеновая лампа 475-495 нм	ПЗС-матрица	есть	290 x 580 x 390 17,6 кг

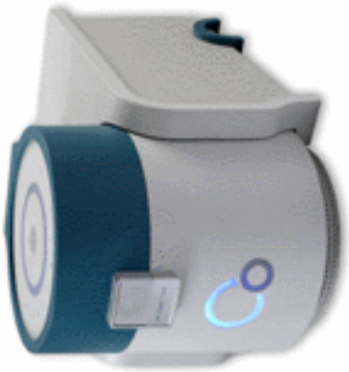


Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор, Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
MyiQ 2	Элементы Пельтье 3,3°C / сек 2,0°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл градиент температур	2 515-585 нм	вольфрамовая галогеновая лампа 475-545 нм	ПЗС-матрица	есть	290 x 580 x 390 17,6 кг
CFX96	Элементы Пельтье 5°C / сек 3,3°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл (в модели CFX384 – 384-луночный планшет) градиент температур	5 515-713 нм	6 светодиодов 450-684 нм	6 фотодиодов 9 порядков	Есть До 105°C	330 x 460 x 360 21,4 кг





Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор, Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
<p>CFX96 Touch</p> 	<p>Элементы Пельтье 5°C / сек 3,3°C / сек</p>	<p>96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл градиент температур CFX384 Touch – 384-луночный планшет) градиент температур</p>	<p>6 515-730 нм</p>	<p>6 светодиодов 450-684 нм</p>	<p>6 фотодиодов порядков</p>	<p>Есть До 105°C</p>	<p>330 x 460 x 360 21,4 кг</p>
<p>CFX Automation System</p> 							<p>Автоматизация подачи до 20 планшет для CFX384 и до 15 планшет для CFX96 моделей ДНК-термоциклеров</p>



CapitalBio Corporation, КНР <http://www.capitalbio.com/>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
CapitalBio RT-Cycler 636 	Воздушное 3°C / сек	Роторного типа на 36 пробирок по 0,2 мл	4	светодиод	нет данных	не требуется	500×300×350 15 кг


Сепheid, США <http://www.sepheid.com>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор; Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
<p>SmartCycler II System</p> 	<p>Воздушное (керамический нагреватель / охлаждающий вентилятор)</p> <p>10°C / сек 2,5°C / сек</p>	<p>16 специальных пробирок объемом 25 мкл</p> <p>До 96 путем объединения до 6 ДНК-термоциклеров</p>	4	Светодиод	Фотодиод широкий диапазон концентраций	От 30 до 110°C	305×305×255 33,5 кг (в комплекте с компьютером и принадлежностями)
<p>GeneXpert</p> 	<p>Воздушное (керамический нагреватель / охлаждающий вентилятор)</p> <p>10°C / сек 2,5°C / сек</p>	<p>Специальные картриджи</p> <p>Есть модели с 4 и 16 модулями</p>	6	4 светодиода	4 фотодиода	Нет данных	Нет данных


Corbett Life Science, Австралия <http://www.corbettlifescience.com> см. продукцию фирмы Qiagen <http://www.qiagen.com>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока; материал термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор; Диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШxГxВ, мм вес
<p>Rotor Gene 3000</p> 	<p>Воздушное 5°C / сек</p>	<p>Роторного типа на 36 по 0,2 мл или 72 по 0,1 мл пробирки</p>	<p>4</p>	<p>4 светодиода 470-625 нм</p>	<p>ПЗС-матрица</p>	<p>Не требуется</p>	<p>380 x 480 x 315 17 кг</p>
<p>Rotor Gene 6000 HRM</p> 	<p>Воздушное >15°C / сек >20°C / сек</p>	<p>Роторного типа на 72 пробирки по 0,2 мл</p>	<p>Для разных моделей: 2, 4, 5 и 6</p>	<p>2 x 48 светодиодов</p>	<p>ПЗС-матрица 9 порядков</p>	<p>Не требуется</p>	<p>370 x 420 x 275 14 кг</p>



Erpendorf, Германия <http://www.erpendorf.com>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШxГ xB, мм вес
Mastercycler ep realplex 	Элементы Пельтье; для блока из серебра - 6°C / сек 4,5°C / сек для блока из алюминия - 4°C / сек 3°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл градиент температур	2 (для модели realplex ²) 4 (для модели realplex ⁴)	96 светодиодов (470 нм)	ФЭУ 2хФЭУ для модели realplex ⁴ 9 порядков	105°C	260 x 410 x 326 24 кг


Esco Technologies, Inc., США <http://www.escoglobal.com>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШxГ xB, мм вес
Swift Spectrum 48 	Элементы Пельтье 4°C / сек 4°C / сек	48 по 0,2 мл Градиент температур	4	Светодиоды с оптоволоконной подводкой	ФЭУ	От 80 до 110°C	450 x 520 x 320 25 кг


Finzymes Oy, Финляндия <http://www.finnyzymes.com>



Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор; Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
PikoReal 96 HRM 	Элементы Пельтье >5°C / сек 4,5°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл (невозмозаменяемый с 24-луночным планшетом)	5	5 светодиодов	ПЗС-матрица 10 порядков	От 30 до 110°C	300×230×310 10 кг
PikoReal 24 HRM 	Элементы Пельтье >5°C / сек 4,5°C / сек	24-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл (невозмозаменяемый с 96-луночным планшетом)	5	5 светодиодов	ПЗС-матрица 10 порядков	От 30 до 110°C	300×230×310 10 кг


Fluidigm Corporation, США <http://www.fluidigm.com>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШxГxВ, мм вес
<p>BioMark™ HD System</p> 	<p>Элементы Пельтье 2°C / сек 1°C / сек</p>	<p>специальные чипы «48,48» и «96,96» на 48 и 96 образцов соответственно и по 2304 и 9216 реакционных нанолитровых ячеек в каждом</p>	<p>3 (2 свободных дополнительных канала)</p>	<p>галогеновая лампа</p>	<p>ПЗС-матрица 9 мегапикселей</p>	<p>Нет данных</p>	<p>Нет данных</p>

Idaho Technology, Inc., США <http://www.idahotech.com>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока; материал термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор: Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШxГxВ, мм вес
LightScanner 32 HRM 	Воздушное 5,5°С / сек в среднем	32 в круговую расположенных капилляра по 10 мкл	3 530 нм, 640 нм, 705 нм Для HRM – только 500 нм	Светодиод 470 нм	ПЗС-матрица 9 порядков	Нет данных	304 x 406 x 406 11,3 кг


Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока; материал термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор: Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
R.A.P.I.D. LT 	Воздушное 5,5°C / сек в среднем	32 в круговую расположенных капилляра по 10 мкл	3 530 нм, 640 нм, 705 нм	Светодиод 470 нм	ПЗС-матрица 9 порядков	Нет данных	304 x 406 x 406 11,3 кг
RAZOR EX 	Амплификация занимает в среднем не более 30 мин	Специальные картриджи с 12 ячейками с сухими реагентами для детекции конкретных инфекций	3 530 нм, 640 нм, 705 нм Для HRM – только 530 нм	Светодиод 470 нм	Нет данных	Нет данных	254 x 114 x 190 4,9 кг

JB AIDS (Joint Biological Agent Identification and Diagnostic System)		ВЕС 18 кг
	Амплификация 30 образцов занимает в среднем не более 30 мин	Сведения засекречены


Шумина, США <http://www.illumina.com>



Модель								Габариты ШхГхВ, мм вес
Есо HRM	Принцип и скорости нагрева/ охлаждения Элементы Пельтье. Серебряный блок. 5,5°C / сек в среднем	Формат термоблока; материал термоблока Специальный 48-ми луночный планшет с адгезивной пленкой для образцов объемом от 5 до 20 мкл, комплектуются специальной док-станцией; серебро	Число каналов измерения флуоресценции 4	Источник излучения 2 x 48 светодиодов	Детектор: Динамический диапазон чувствительности ПЗС-матрица 9 порядков Тепловое разрешение 0,1 °C	Нагрев крышки термоблока Нет данных	345 x 310 x 320 13,6 кг	

Qiagen, Германия <http://www.qiagen.com>

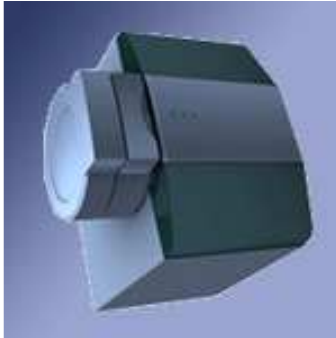
Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока; материал термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор; Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
Rotor Gene Q HRM 	Воздушное >15°C / сек >20°C / сек	Роторы с 36/72 лунками для пробирок 0,2 мл/стрипов по 0,1 мл; Ротор для роторного планшета Gene-disk 72 или Gene-disk 100	Для разных моделей: 2, 4, 5 и 6	2 x 48 светодиодов	ФЭУ Тепловое разрешение 0,02 °С	Не требуется	370 x 420 x 275 12 кг

Roche, США <http://www.roche.com>


Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
LightCycler II 	Воздушное 12°C / сек 8°C / сек	Карусель на 32 специальных капилляра	5 фильтров + 4 комбинации фильтров для FRET-эффекта	3 светодиода (голубой, белый, красный)	ПЗС-матрица	Регулируемый нагрев от 30 до 99°C	280 x 285 x 505 22 кг

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
LC 480 HRM 	Элементы Пельтье 96-лун. блок: 4.4°C / сек 384-лун. блок: 4.8°C / сек 96-лун. блок: 2.2°C / сек 384-лун. блок: 2.5°C / сек Материал - серебро	96 (384) луночный планшет	6 фильтров, FRET + 4 комбинации фильтров для FRET-эффекта	Ксеноновая лампа 430-630 нм	ПЗС-матрица (монохромная охлаждаемая)	есть	574 x 588 x 497 55.6 кг
LC 1536 	Элементы Пельтье 4.8°C / сек 2.5°C / сек Материал - серебро	1536 луночный планшет (0.5-2 мкл)	2	Ксеноновая лампа 430-630 нм	ПЗС-матрица (монохромная охлаждаемая)	есть	574 x 588 x 497 55.6 кг


Shanghai Huguo Science Instrument Co.,Ltd, КНР <http://www.shhuguo.com>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
Real time PCR 	Воздушное до 10°C / сек	Карусель на 32 капилляра	3 530-710 нм	Светодиод 470 нм	фотогибрид	Не требуется	400×340×370 20 кг


Takara, Япония <http://www.takara-bio.com>

Модель	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес
Dice TP800 	Элементы Пельтье 3°C / сек 2°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл	2 (еще 2 опционально)	Галогеновая лампа	CMOS камера	есть	290×517×397 23,5 кг

Teclne, Англия

Модель								Габариты ШхГхВ, мм вес
Quantica	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор; Динамический диапазон чувствительности	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес	
	Элементы Пельтье до 2,6°C / сек	96-луночный планшет или пробирки по 0,2 мл опционально градиент температур	4	светодиод	ФЭУ 9 порядков	До 110°C от комнатной через 10°C интервалы	410 x 510 x 530 25 кг	

Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd, КНР <http://www.medtl.com>

Модель								Габариты ШхГхВ, мм вес
TL998	Принцип и скорости нагрева/охлаждения	Формат термоблока	Число каналов измерения флуоресценции	Источник излучения	Детектор	Нагрев крышки термоблока	Габариты ШхГхВ, мм вес	
	Элементы Пельтье 3°C / сек 2°C / сек	36 или 48 по 0.2 мл	2 1 (сменный)	Светодиоды	ФЭУ	есть	500×400×350 26 кг	

Изложив технические характеристики различных моделей ДНК-термоциклеров, работающих в режиме реального времени, хотим заметить, что мы не ставили перед собой задачи по какому-то ранжированию данных приборов, а их производители приведены нами в алфавитном порядке, начиная с кириллицы. Так, ограничившись лишь кратким обзором основных параметров ДНК-термоциклеров с оптическим модулем, мы предоставляем читателям и потенциальным покупателям, исходя из стоящих перед ними задач, самим осуществить свой выбор, посетив, в том числе, приведенные нами web-страницы производителей данных приборов. При этом желая сделать это считаем своим долгом предупредить, что далеко не для всех моделей там имеется четкая и ясная информация и иногда таковую нам приходилось собирать буквально по крупицам. На вполне законный вопрос – «зачем же тогда мы публикуем данную статью, если не даем конкретных рекомендаций?» можем сказать в свое оправдание, что ассортимент такой техники уже довольно широк и даже для какой-либо одной задачи с успехом могут подойти сразу несколько моделей от разных производителей. К тому же подобного свода в одном месте сведений практически обо всех ныне производимых ДНК-термоциклерах, работающих в реальном времени, нигде видеть не приходилось, хотя все равно не беремся утверждать, что здесь нами собрана исчерпывающая информация по этому вопросу.

Как можно видеть из приведенных в таблице сведений (табл.), на мировом рынке в настоящее время представлено более шестидесяти моделей ДНК-термоциклеров, работающих в режиме реального времени. Более точный подсчет практически невозможен ввиду того, что какие-то модели уже сняты с производства, но побывавшие в употреблении приборы еще можно купить. С другой стороны, незначительные отличия между приборами дают ли право считать их отдельными моделями? В частности, фирма Eppendorf производит как бы один ДНК-термоциклер Mastercycler ep realplex, но в 4 модификациях: с 2-мя или 4-мя каналами детекции; с алюминиевым или серебряным реакционным блоком. Фактически одна базовая модель термоциклера Rotor-Gene 6000 производилась с 2, 4, 5 или 6 каналами детекции, причем некоторые дополнительно оснащались системой плавления высокого разрешения. Аналогичная ситуация с фактически теми же термоциклерами, выпускаемыми ныне фирмой Qiagen под другим брэндом – Rotor-Gene Q. Большое разнообразие вариаций модельного ряда характерно и для некоторых термоциклеров фирмы

Applied Biosystems. Необходимо отметить появление довольно большого разнообразия ДНК-термоциклеров для работы в режиме реального времени, произведенных в Китае.

За пределами нашего рассмотрения сознательно остались такие параметры ДНК-термоциклеров, как точность поддержания температуры, неравномерность температуры в термоблоке, поскольку эти характеристики довольно близки для разных типов приборов, а также потребляемая мощность, которая все же не является определяющей при выборе модели.

Для некоторых ДНК-термоциклеров самими производителями приводятся данные о завершении амплификации, например, за 40 минут, что на самом деле сильно зависит от стоящих задач и, соответственно, каждый раз выбираемых экспериментатором конкретных параметров термоциклирования и посему такой параметр как время реакции очень разнится и также не попал в поле нашего зрения. В рекламных буклетах ряда моделей ДНК-термоциклеров с оптическим модулем, а также на соответствующих web-страницах некоторых фирм содержится очень скудная информация, где отсутствуют сведения, например, об их размерах, весе и пр., и поэтому в отдельных графах нашей таблицы стоит «нет данных».

Современные ДНК-термоциклеры с оптическим модулем значительно отличаются по своим характеристикам и производительности. По внешнему виду различия между ними еще более заметны, поскольку нет более-менее единого экстерьера как, например, для центрифуг, и, глядя на изображения этих приборов, зачастую нельзя угадать их предназначение. ДНК-термоциклеры с оптическим модулем весьма сильно различаются и по цене. Однако приводить данную информацию мы сознательно не стали даже для тех приборов, для которых таковую думаем, что знаем. По ряду причин. Во-первых, если поискать, то для некоторых приборов она и так указана на web-сайтах производителей, которые мы приводим. Во-вторых, для некоторых моделей в силу разных обстоятельств она может довольно быстро поменяться. В-третьих, в прайс-листах многих торговых фирм напротив каталожного номера того или иного ДНК-термоциклера вместо конкретной стоимости часто рекомендуется ее запрашивать. Можем тоже самое порекомендовать и мы. Но чтобы у несведущего читателя все же появилось некоторое представление на сей счет, пожалуй, надо привести хотя бы некий диапазон стоимости данных приборов, варьирующий в России от 0,5 до 5 млн. руб. При этом особняком стоят реал-тайм

ДНК-термоциклеры, рассчитанные, в том числе и на проведение цифровой ПЦР (о которой будет подробно говориться ниже), стоящие уже в районе 10 млн.руб. и выше. Единственное, что можем себе позволить указать точно, так это стоимость нового ДНК-термоциклера модели Eco HRM фирмы Shimina, который они сами позиционируют как самый дешевый в настоящее время, и на специальной страничке своего сайта <http://www.ecoqpcr.com/products/ecoqpcr.ilmn?sciid=IMC1> смело сообщают его стоимость, составляющую всего 13900 долларов США. Однако следует заметить, что это их внутренняя (в самих США) стоимость данного прибора и при его поставке в Россию она увеличится очень значительно.



Рис. 5. Интегрированная система GeneXpert (одно-, четырех- и шестнадцатимодульная) фирмы Cepheid, осуществляющая весь процесс экстракции, амплификации и детекции нуклеиновых кислот в реальном времени в одноразовых картриджах (три процедуры в одном)

Отдельного упоминания также требует первая и пока единственная в мире интегрированная система экстракции нуклеиновых кислот, их амплификации и детекции результатов амплификации в режиме реального времени модели GeneXpert фирмы Cepheid (США). Другой особенностью этой системы является то, что она может поставляться в трех компоновках: в виде единичного модуля, а также счетверенного комплекта и даже двурядного шестнадцатиричного (рис. 5), стоимости которых надо полагать все же не напрямую кратны единичному.

Но все же шестнадцатимодульный GeneXpert не самый крупногабаритный ДНК-термоциклер за всю историю существования таких приборов. Самым массивным был недавно снятый с производства ДНК-термоциклер английской фирмы ABgene модели H₂OBIT (правда, работающий не в реальном времени,

а по конечной точке), весящий целых 700 кг, из которых более трети приходилось на долю циркулирующих внутри 280 литров воды (рис. 6).



Рис. 6. ДНК-термоциклер H₂OBIT английской фирмы ABgene

Одной из особенностей этого гиганта было роботизированное перемещение специальной трехсекционной алюминиевой корзинки, вмещающей 24 планшета или с 96 или с 384 либо с 1536 лунками, между тремя встроенными водяными банями, поддерживающими каждая свою температуру, что резко ускоряло смену температур в реакционных сосудах и превышало аналогичные показатели для термоциклеров на основе элементов Пельтье. Допускались и другие емкости для амплификации, при этом объемы реакционных смесей могли варьировать от 2 мкл до 1 мл.

Другой крайностью (имеется ввиду по габаритам) можно считать портативные ДНК-термоциклеры с оптическим модулем, рассчитанные главным образом на полевую диагностику. Так, модель RAZOR EX фирмы Idaho Technology, Inc. «защита» на детекцию в полевых условиях нескольких инфекций, для обнаружения которых все реагенты находятся в специальном двенадцатичасном устройстве, напоминающем патронташ, в сухом виде и для начала термоциклирования требуется лишь добавление водного экстракта анализируемого образца. Весит этот прибор меньше 5 кг. Данная фирма сотрудничает с военным ведомством США (о чем они сами сообщают на своем сайте) и, возможно, поэтому представленные там сведения далеко не полные. А информация о другом их ДНК-термоциклере для работы в полевых условиях модели JBAIDS (Joint Biological Agent Identification and Diagnostic System), в

режиме реального времени идентифицирующем целый ряд наиболее опасных инфекций, так и вовсе засекречена.

Чтобы у читателей не сложилось впечатление, что авторы знакомы с такой техникой только понаслышке, следует сказать, что в нашем Институте имеется несколько интенсивно используемых ДНК-термоциклеров, работающих в режиме реального времени. Так, уже много лет эксплуатируется ДНК-амплификатор iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, США), позже приобретены ДНК-термоциклеры моделей iQ5 (Bio-Rad Laboratories, США) и Rotor-Gene 6000HRM (Corbett Research, Австралия), недавно куплен ДНК-термоциклер CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), имеются два отечественных прибора АНК-32, совсем

недавно был поставлен ДНК-термоциклер с оптическим модулем модели StepOnePlus (Applied Biosystems, США). Не исключаем, что в будущем нами будут приобретены и некоторые другие модели подобных приборов, поскольку ПЦР-РВ занимает важное место в арсенале молекулярно-биологических методов, применяемых сотрудниками ИБГ УНЦ РАН. К тому же в ряде лабораторий Института ведется активная работа по разработке новых высокочувствительных методов амплификации нуклеиновых кислот в реальном времени и их испытание на разных популярных реал-тайм ДНК-термоциклерах, значительно отличающихся по своим характеристикам, представляется весьма важным.



ВСЕ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Компания ХЕЛИКОН

Комплексное оснащение лабораторий

Оборудование	Реактивы	Пластик
<p>для:</p> <ul style="list-style-type: none">▶ ПЦР▶ Пробоподготовки▶ Центрифугирования▶ Анализа нуклеотидных последовательностей▶ Клонирования▶ Иммуно-ферментного анализа▶ Общелабораторное оборудование   	<p>для:</p> <ul style="list-style-type: none">▶ Электрофореза▶ Клонирования▶ Трансфекции▶ Культуральных работ▶ Вторичной детекции▶ Рестрикции и модификации нуклеиновых кислот▶ Выделения и очистки нуклеиновых кислот  	<p>для:</p> <ul style="list-style-type: none">▶ ПЦР▶ ИФА▶ Культуральных работ   

Компания Хеликон – крупнейший поставщик в сфере комплексного оснащения лабораторий биотехнологического профиля. Широкий выбор оборудования, лабораторного пластика и реактивов производства Eppendorf, Bio-Rad, Applied Biosystems, Fluidigm, Affymetrix, Invitrogen, Fermentas, SSI и других производителей со складов в Москве, Санкт-Петербурге и Новосибирске.

119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40 МГУ им. М. В. Ломоносова
Телефон (495) 933-2736; факс: (495) 930-0084, mail@helicon.ru, www.helicon.ru

Представительство в **НОВОСИБИРСКЕ**: 630128 г. Новосибирск, ул. Демакова, 23, оф. 201, тел.: (383) 214-60-82, факс: (383) 217-43-89, e-mail: novosibirsk@helicon.ru
Представительство в **САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ**: 195220 г. Санкт-Петербург, ул. Гжатская, 27 А, оф. 245, тел./факс: (812) 248-91-30, e-mail: spb@helicon.ru

Цифровая ПЦР

Интересной альтернативой методу ПЦР-РВ для количественной оценки исходного числа копий анализируемых нуклеотидных последовательностей является метод цифровой ПЦР (цПЦР), активно развиваемый в последнее время рядом фирм. Причем нельзя исключать того обстоятельства, что в будущем метод цПЦР для многих задач количественного характера, включая подсчет вариаций числа копий протяженных участков генома – так называемых CNV (Copy Number Variations) - заменит ПЦР-РВ [Weaver et al., 2010]. Прототипом современных вариантов цПЦР является работа американских авторов [Vogelstein, Kinzler, 1999], в которой ими был описан способ проведения ПЦР, тогда названный ими Dig-PCR («Dig» сокр. от Digital). Не вдаваясь в детали их эксперимента, надо отметить, что главным отличием их способа от классического варианта ПЦР было то, что ими в 96-луночный полипропиленовый планшет (в каждую лунку) было добавлено сверхмалое количество ДНК (\approx по 1,5 пг или $\approx 1/2$ генома человека) с таким расчетом, что теоретически не во все лунки могла попасть искомая последовательность. После завершения 60 циклов ПЦР, а также еще после 10 - 15 циклов ассиметричной амплификации, была оценена флуоресценция в лунках. Флуоресценция наблюдалась не во всех лунках, но при этом число светящихся лунок соответствовало числу копий искомой мишени изначально присутствовавших в анализируемом образце. По теории вероятности в каждую лунку (далеко не во все!) должно было попасть не более одной копии искомой последовательности при условии, что только малая часть лунок после амплификации приобрела флуоресцентный сигнал. Справедливости ради следует заметить, что авторы ставили перед собой совсем другую задачу, но в заключении упомянули о таком приложении разработанного ими метода как количественная ПЦР. Главным отличием подобной количественной цПЦР от количественной ПЦР-РВ является то, что ведется фактически качественный анализ присутствия в каждой лунке ампликонов в конечной точке по типу «да» / «нет» и при этом различия в выходе на плато процессов амплификации для амплифицируемых в разных лунках образцов никак не влияют на расчет количества исходных ампликонов. Фактически лунка с сигналом обозначается компьютерной «1», а лунка без сигнала – «0», то есть налицо бинарная запись результатов амплификации, ввиду чего данный вариант ПЦР и был назван цифровым. Таким образом, ПЦР по конечной точке также способна давать исследователю количественную информацию, только это уже будет не обычная

ПЦР (см. выше), а цифровая ПЦР. Причем цПЦР способна давать даже более точную оценку исходного числа искомых последовательностей-мишеней, не зависящую от эффективности процесса амплификации разных образцов и целого ряда сопутствующих моментов, и поему данная технология становится все более популярной.

Считаем важным здесь немного подробнее остановиться на принципиальной возможности амплифицирования в методе цПЦР единичных копий молекул-мишеней до детектируемого уровня. На самом деле амплификация единичных молекул с помощью ПЦР и доведение их количества до регистрируемого уровня - дело далеко не простое, хотя бытует представление, что это довольно легко. Действительно амплификация единичных молекул ДНК с достижением количества, достаточного для детекции, возможна, но этот, если так можно выразиться, «высший пилотаж» далеко не всем под силу. Тем более рядовым лаборантам, занимающимся ДНК-диагностикой на местах. Причиной тому служит то, что обычная детекция каких-либо фрагментов ДНК требует наличия очень большого числа молекул - сотен миллиардов или даже триллионов. Чтобы с помощью ПЦР так размножить единичную молекулу теоретически необходимо провести всего около 40 циклов, однако ввиду не 100%-ной эффективности данной реакции, к тому же прогрессивно снижающейся с каждым циклом, требуется проведение заметно большего числа циклов (свыше 60, что и было проделано в цитируемой выше работе - Vogelstein, Kinzler, 1999), вдобавок еще необходимы и определенные ухищрения.

Дабы не быть голословными, приведем конкретные цифровые данные о проводимых с помощью ПЦР амплификациях. Так, одна копия человеческого генома весит приблизительно 3 пикограмма. Если в реакцию будет взято около 30 нг ДНК, то копий человеческого генома в этом весовом количестве окажется порядка 10 тысяч. Следовательно, однокопийный ген, представленный в человеческом геноме единожды, будет изначально в реакционной смеси присутствовать в количестве 10^4 копий. Чтобы увидеть после электрофореза полоску ДНК, этому гену соответствующую, нужно чтобы в результате ПЦР ампликона стало около 10^{11} - 10^{12} молекул. Близкие значения требуются и для детекции результатов амплификации ДНК в ПЦР в реальном времени. Следовательно, в этом конкретном примере нужно чтобы размножение 10 тысяч исходных копий произошло всего в 10^7 - 10^8 раз и, поскольку реальная эффективность амплификации не бывает 100%, то для этого

потребуется лишь 25 - 30 циклов. И это некий стандарт для ДНК-диагностики в настоящее время. Поэтому в отдельных случаях, преследующих цель добиться увеличения чувствительности вплоть до уверенной детекции единичных копий (и одновременно повышения специфичности реакции), вместо обычно используемой в ПЦР пары праймеров, используют две пары праймеров, являющихся по отношению друг к другу внешними и внутренними [Mullis, Faloona, 1987], и такой способ называется nested PCR или «вложенной» ПЦР⁴. Причем проведение подобной ПЦР, как правило, рассчитано на остановку реакции через некоторое (довольно большое) количество циклов и добавление второй пары праймеров, являющихся внутренними по отношению к первым, хотя, справедливости ради следует заметить, что предлагаются и несколько иные варианты вложенной ПЦР без открытия пробирок и добавления новых праймеров [Yourno, 1992]. Однако для цПЦР и особенно для новых модификаций данного метода использование вложенных праймеров несколько проблематично. При этом все же современные варианты метода цПЦР, рассчитанного на амплификацию единичных копий, успешно работают, и даже число циклов может быть относительно небольшим (25 - 30, например). За счет чего, спрашивается? Для ответа на этот вопрос необходимо вернуться к количеству молекул, достаточному для их регистрации тем или иным способом и принять во внимание, что удастся обнаружить не просто 10^{11} - 10^{12} копий некоего фрагмента ДНК, а выявить их нахождение в некоем объеме жидкости или геля. Так, фактически в настоящее время с помощью современной техники удастся зафиксировать около триллиона молекул в 10 мкл. Но если мы захотим увидеть это же количество, например в 10 мл, то для сохранения аналогичной детектируемой концентрации нужно, чтобы ампликонов было на те же три порядка больше – то есть уже квадриллион. Конечно, для более разбавленных растворов в некоторых случаях можно прибегнуть к длительному процессу накопления флуоресцентного сигнала, но для цПЦР есть другой выход. Резкое масштабирование ПЦР «вниз» и использование реакционных объемов порядка 1 нл приводит к эффекту создания нужной

концентрации целевых ампликонов после малого числа циклов и соответственно достаточно амплификации искомого фрагмента ДНК в меньшее число раз. Например, за те же 25 - 30 циклов произойдет амплификация единичной копии в 10^7 - 10^8 раз, что будет вполне достаточно для детекции продукта ПЦР в нанолитровом объеме реакционной смеси. Конечно работать с такими объемами непросто и поэтому на помощь исследователям пришла микро- / нанофлюидная техника.

Нынешние варианты цПЦР проводятся преимущественно в микрофлюидных или, точнее нанофлюидных термоциклерах, где объем реакционной смеси измеряется уже несколькими нанолитрами. Так, американская фирма Fluidigm Corporation (поставки оборудования которой в Россию недавно начаты московской фирмой Хеликон) выпускает прибор BioMark HD, в котором благодаря различным заменяемым чипам (рис. 7) помимо ПЦР-РВ реализована возможность проведения цПЦР.

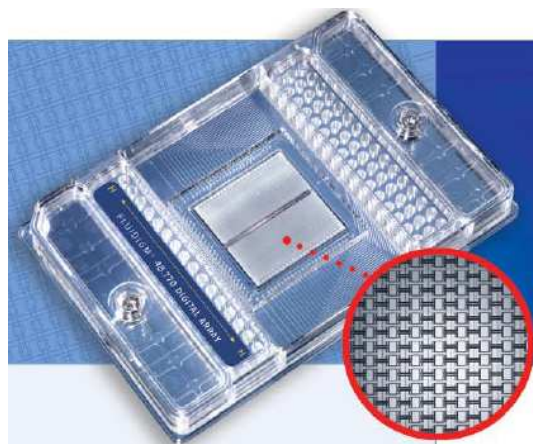


Рис. 7. 36960-ти ячеечный чип 48.770 Digital Array IFC для цПЦР для анализа 48 образцов в 770 реакционных камерах по 0,85 нл каждая

Для цПЦР предлагается 2 варианта, рассчитанных на одновременное проведение 9180 реакций для 12 образцов (12.765 Digital Array IFC чип) в 6 нл резервуарах или проведение 39960 реакций уже для 48 образцов с индивидуальными объемами каждой ячейки по 0,85 нл (48.770 Digital Array IFC чип).

Несколько меньшей производительностью характеризуется другая цифровая ДНК-термоциклер модели OpenArray Real-Time PCR Platform, разработанный ранее небольшой американской фирмой Biotrove, Inc., относительно недавно слившейся с одним из лидеров в ПЦР-технологиях - хорошо известной американской фирмой Applied

⁴ К сожалению, в русскоязычной литературе почти что укоренилось неправильное обозначение такой ПЦР, как «гнездовой» (от английского слова nest - гнездо), хотя существует специальный математический термин «nested», переводимый как «вложенный», при этом гораздо лучше объясняющий происходящий процесс при такой ПЦР.

Biosystems. Отличительной особенностью данного прибора является использование для реакции амплификации специального чипа в виде пластины с отверстиями. Такой чип-пластина (рис. 8) толщиной 300 мкм, содержит 3072 сквозных отверстия диаметром 300 мкм, вмещающих по 33 нл, удерживающихся там за счет капиллярных сил, чему способствуют местами гидрофильные, местами гидрофобные зоны.

В ДНК-термоциклере OpenArray в режиме цПЦР можно одновременно анализировать от 1 образца (64 отверстия) до 48 образцов, распределенных по отверстиям в чипах (до 3072 отверстий, кратным 64), а поскольку одновременно термоциклируется до 3 таких чипов, то число образцов и отверстий для них возрастает до 144 и 9216 соответственно.

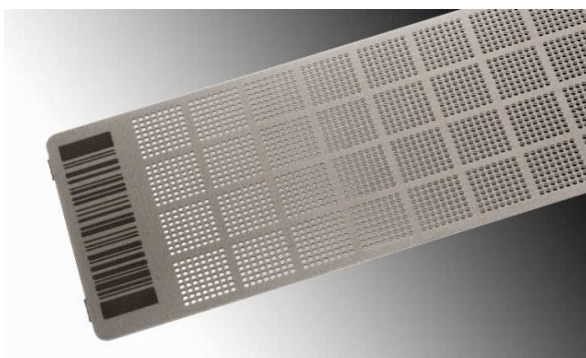


Рис. 8. Чип ДНК-термоциклера модели OpenArray, содержащий 3072 сквозных отверстия (48 кластеров по 64 отверстия), вмещающих по 33 нл

Как можно видеть из вышеприведенных цифр, ДНК-термоциклеры, рассчитанные на проведение ПЦР в 96-ти или даже в 384-ти луночных планшетах, очень сильно уступают по производительности нанофлюидным ДНК-термоциклерам.

Недавно другой американской фирмой QuantaLife, Inc. предложена новая технология количественной (цифровой) ПЦР амплификации, названная ими Droplet Digital PCR или сокращенно ddPCR. По-русски видимо можно ее назвать как цкПЦР - цифровая капельная ПЦР. На web-сайте данной фирмы (<http://www.quantalife.com>) приведено описание технологии цкПЦР, из которой видна последовательность действий по ее осуществлению. Так, с помощью специального модуля (Droplet Generator cartridge), генерирующего водно-масляную эмульсию, всего 20 мкл водного раствора, содержащего все компоненты ПЦР, а также анализируемую ДНК или РНК, за 1 минуту дробятся на 20 тысяч капелек, служащих независимыми реакционными сосудами, объемом 1 нл каждый. Далее они

распределяются по лунокам обычного 96-ти луночного планшета и в любом подходящем ДНК-термоциклере проводится ПЦР, по завершению которой содержимое лунок планшета со скоростью 1000 капелек в секунду пропускают сквозь регистрирующий флуоресцентные сигналы модуль, принцип работы которого аналогичен принципу работы проточного цитофлуориметра. То есть через 20 секунд будет получен результат в виде регистрации пиков свечения, запись которых приведена на рис. 9.

Пока емкость картриджа описываемой системы цкПЦР составляет всего 8 образцов и каналов детекции свечения флуорохромов имеется всего 2 (для красителей FAM и VIC или для совпадающих с ними длинами волн возбуждения и испускания).

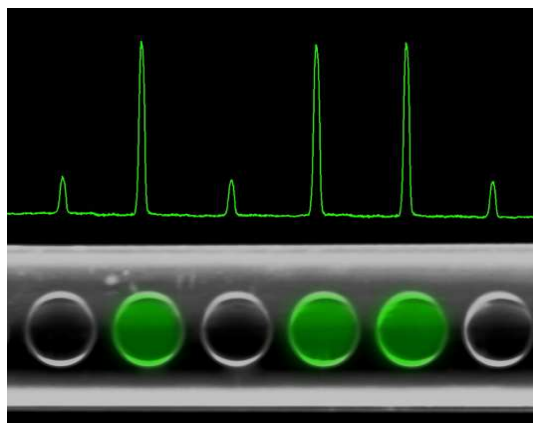



Рис. 9. Типичная картина регистрации результатов цкПЦР⁵, позволяющая подсчитать абсолютное число исходных копий мишени в анализируемом образце

Авторы метода цкПЦР утверждают, что данная технология позволяет выявить совсем небольшие различия в числе генов. Например, у одного организма неких генов в геноме 5 копий, а у другого – 6 и это будет обнаружено. Также они уверяют, что на уровне мРНК легко выявляются 10%-ные различия в эффективности транскрипции любых генов. И на самом деле цифровая ПЦР в своих различных вариантах дает возможность экспериментатору работать с абсолютными цифрами, не прибегая к реперным молекулам.

⁵ Данный рисунок взят с web-сайта <http://www.quantalife.com/about/media-resources>, где фирмой QuantaLife, Inc. для популяризации своего метода предлагается всем желающим скачивать представленные там разные графические файлы по данной технологии.

ООО "ИзоГель"




Готовые гели для электрофоретического анализа ДНК
Обладают повышенным разрешением, эквивалентным разрешению 2, 4 или 8 % агарозных гелей. Предназначены для учёта результатов ПЦР в диагностических лабораториях, разделения и очистки фрагментов ДНК, рестрикционного анализа, очистки синтетических олигонуклеотидов и т.п.

Препараты, повышающие разрешение агарозных гелей
Повышают прочность, прозрачность и разрешающую способность агарозных гелей. Снижают расход агарозы.

Камеры для горизонтального электрофореза
Отличаются улучшенным охлаждением рабочего столика.

Миниатюрные источники питания
Обеспечивают напряжение от 100 до 220 вольт.

142290, г. Пушкино, Московская обл., ул. Институтская, д.3



+7(4967)739-330 +7(910)400-22-38 <http://isogel.genseq.ru/> genseq@mail.ru

Хотя так называемая RainStorm технология, разработанная американской фирмой RainDance Technologies, Inc., непосредственно на проведение цПЦР не рассчитана, обойти ее здесь вниманием будет неправильно, поскольку она применяется в полногеномном секвенировании благодаря созданию огромных количеств независимых реакторов в виде эмульсии для ПЦР. Так, прибор модели RDT 1000 (рис. 10) генерирует за 1 час более 10 миллионов капель пиколитрового объема со скоростью 3000 капель в секунду.



Рис. 10. Внешний вид RDT 1000

Такие эмульсионные капли генерируются с помощью одноразового чипа (рис. 11), исключающего вероятность перекрестной контаминации. Наиболее часто используемые объемы генерируемых капель находятся в диапазоне от 5 до 25 пкл, причем их разброс по размеру не превышает 10%. Данное нанофлюидное устройство позволяет также генерировать капли от субпиколитрового объема (сотен фемтолитров) до 100 нанолитров. Подобранные условия (фторуглеродное масло, сурфактанты) обеспечивают очень высокую стабильность эмульсии.



Рис. 11. Одноразовый нанофлюидный чип для генерации эмульсии для ПЦР

Проведенный здесь анализ приборного оснащения количественной ПЦР свидетельствует о широком ассортименте таких приборов, работающих в режиме реального времени и способных удовлетворить различные запросы исследователей, как по техническим параметрам, так и по цене. Оборудование для цифровой ПЦР пока представлено фактически единичными моделями, но, вне всякого сомнения, подобная техника будет быстро совершенствоваться и становиться все более популярной вплоть до того, что заменит для некоторых приложений нынешнюю ПЦР в реальном времени [Bhat et al., 2009; McCaughan, Dear, 2010; Zhang, Xing, 2010]. При этом хотим заметить, что стандартная ПЦР по конечной точке с последующим разделением продуктов с помощью электрофореза в соответствующих гелях, по крайней мере, для тех случаев, когда необходим анализ ампликонов по размеру никогда не сдаст своих позиций, однако приборов для такой ПЦР выпускается так много и они настолько разнообразны, что рассмотреть их в рамках даже очень большой статьи, скорее всего, не представляется возможным.

"Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., ГК №№ П385, П2458, 02.740.11.0290."

Цитированная литература

1. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР в реальном времени / М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 223 С.
2. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Романенкова М.Л., Матниязов Р.Т., Гималов Ф.Р., Малеев Г.В., Вахитов В.А. ПЦР, ЛЦР и ГЦР - цепные реакции нуклеиновых кислот в режиме реального времени // Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол. 2005. Т. 1, №2. С. 5-14.
3. Bhat S., Herrmann J., Armishaw P., Corbisier P., Emslie K.R. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DANN copy number // Anal. Bioanal. Chem. 2009. V.394. P.457-467.
4. Chemeris A.V., Nikonov Yu.M., Romanenkova M.L., Chemeris D.A., Garafutdinov R.R., Magazova

- R.A., Maleev G.V., Vakhitov V.A., Vasilov R.G. Novel methods of amplifying DNA or RNA with real-time PCR // United States Patent Application Publication No 2007/0117125 A1, May, 24 2007.
5. Forster T. Energiewanderung und fluoreszenz // Naturwissenschaften. 1946. V. 33. P. 166-175.
6. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences // Biotechnology. 1992. V. 10. P.413-417.
7. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. V. 11. P.1026-1030.
8. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 7276-7280.
9. Lee L.G., Connell C.R., Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 3761-3766.
10. McCaughan F., Dear P.H. Single-molecules genomics // J.Pathol. 2010. V.220. P.297-306.
11. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction // Meth. Enzymol. 1987. V.155. P.335-350.
12. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. 1985. V. 230. P. 1350-1354.
13. Vogelstein B., Kinzler K.W. Digital PCR // Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 1999. V. 96. P. 9236-9241.
14. Weaver S., Dube S., Mir A., Qin J., Sun G., Ramakrishnan R., Jones R.C., Livak K.J. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution // Methods. 2010. V.50. P.271-276.
15. Yourno J. A method for nested PCR with single closed reaction tubes // PCR Methods Appl. 1992. V. 2. P.60-65.
16. Zhang C., Xing D. Single-molecules DNA amplification and analysis using microfluidics // Chem/ Rev. 2010. V.110. P.4910-4947.

Поступила в редакцию 26 апреля 2011 г.

STATE-OF-ART INSTRUMENTATION FOR QUANTITATIVE AND DIGITAL PCR

Magdanov E.G., Chemeris D.A., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, chemeris@anrb.ru

Resume

Some features of structure and functioning of real-time DNA thermocycler are described. Submitted list of models of these devices produced by numerous vendors, shows a wide variety of such DNA thermocyclers capable of satisfying various demands of researchers, both on technical parameters and price. The methods of registration of results in a real-time PCR are briefly described. In more detail discussed a very promising technology for digital PCR instrumentation for which actually is represented by only several models. It is suggested that this technology will quickly evolve and become more popular to the extent that in some cases will replace the current real-time PCR.

Keywords: PCR, real time PCR, quantitative PCR, digital PCR, DNA thermocycler, DNA thermocycler with optical module