



Ускорение ваших геномных исследований с автоматизацией пробоподготовки на Biomek

Biomek i-Series для автоматизированного выделения РНК из тканей набором RNAdvance Tissue

Введение

В наборе Agencourt RNAdvance Tissue для выделения тотальной РНК (микроРНК и мРНК) применяется запатентованная технология обратимой твердофазной иммобилизации (SPRI) нуклеиновых кислот на парамагнитных частицах Agencourt компании Beckman Coulter. После лизиса ткани, РНК иммобилизуется на магнитных частицах, что способствует отделению РНК с помощью магнитного поля (рисунок 1). Такой способ выделения позволяет автоматизировать процесс применения набора, поскольку при этом не требуется ни вакуумной фильтрации, ни центрифугирования. Кроме того, протокол может выполняться как для 96-луточных планшетов, так и в формате одной пробирки, что обеспечивает гибкую схему рабочего процесса. В данном методическом пособии мы рассмотрим автоматизацию набора RNAdvance Tissue на платформе Biomek i5 Multichannel 96 Genomics Workstation.

Автоматизация Agencourt RNAdvance Tissue на платформе Biomek позволяет:

- стандартизировать рабочий процесс для получения более надежных результатов;
- снизить вероятность дорогостоящих ошибок;
- сократить время ручного труда и повысить производительность;
- наладить работу готовых методов в максимально короткий срок;
- получать компетентную поддержку по реагентике, автоматизации и методикам от одного производителя.

Решение: Biomek i5 Multichannel 96 Genomics Workstation

Система характеризуется надежностью и эффективностью, что позволяет быть уверенным в результатах и экономить его время по сравнению с работой вручную.

- 96-и канальный дозирующий модуль на 300 мкл или 1200 мкл с диапазоном дозирования 1-300 мкл и 1-1200 мкл соответственно.
- Технология Enhanced Selective Tip позволяет работать с любым количеством образцов.
- Встроенный гриппер с боковым захватом и вращением на 360°.
- 25 позиций на рабочем столе.
- Орбитальные шейкеры и элементы Пелтье для пробоподготовки.
- Дополнительный корпус.



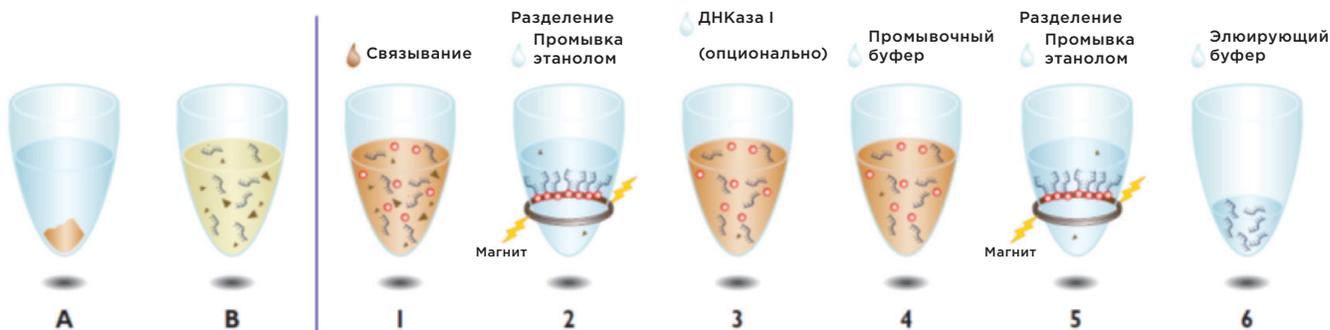


Рисунок 1. Рабочий процесс выделения РНК с Beckman Coulter Agencourt RNAdvance Tissue

Описание основного процесса	С обработкой ДНКазой	Без обработки ДНКазой
Подготовка реагентов и приборов*	15 мин	15 мин
Метод Agencourt RNAdvance Tissue	1 ч 36 мин	2 ч 16 мин
Всего	1 ч 51 мин	2 ч 31 мин

* Без учета времени оттаивания реагентов, препарирования, лизиса ткани и гомогенизации.

Таблица 1. Расчетное время рабочего цикла при применении набора Agencourt RNAdvance Tissue на станции Biomek i5 Multichannel 96 Genomics, 1–96 образцов

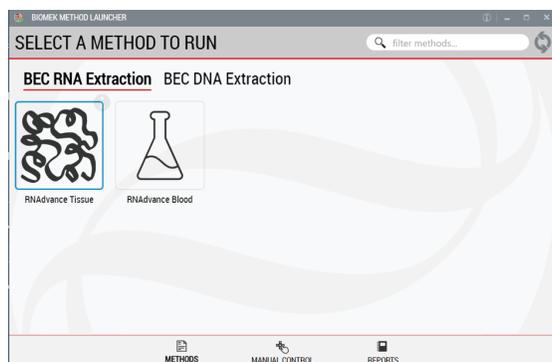


Рисунок 2. Программный модуль Biomek Method Launcher предлагает удобный интерфейс для запуска метода

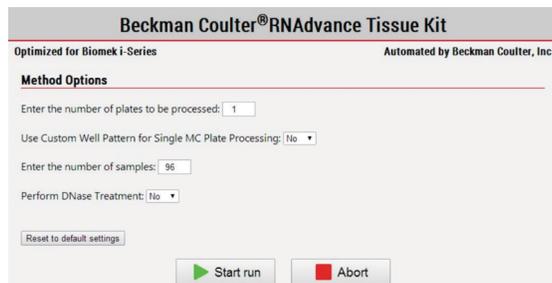


Рисунок 3. В программном модуле Biomek Method Options Selector указывается число образцов и варианты их обработки

Автоматизированный метод

Лабораторная станция Biomek i5 Multichannel 96 Genomics продемонстрировала способность выделять РНК из 96 образцов менее чем за 2 часа (таблица 1). Применение программного модуля Biomek Method Launcher упрощает реализацию метода и уменьшает количество ошибок при настройке метода.

1. Программный модуль Biomek Method Launcher (BML)

BML — это простой интерфейс для запуска методов. Он позволяет пользователям удаленно следить за ходом выполнения метода. Также предусмотрена опция ручного контроля, чтобы при необходимости скорректировать процесс.

2. Программный модуль Method Options Selector (MOS)

MOS позволяет выбирать варианты обработки планшеты и задавать число образцов, чтобы добиться максимальной гибкости, адаптации и простоты выполнения метода.

3. Программный модуль Guided Labware Setup (GLS)

GLS на основании данных, введенных в MOS рассчитывает необходимые количества пластика и реагентов и предоставляет оператору пошаговую инструкцию по расстановке рабочего стола.

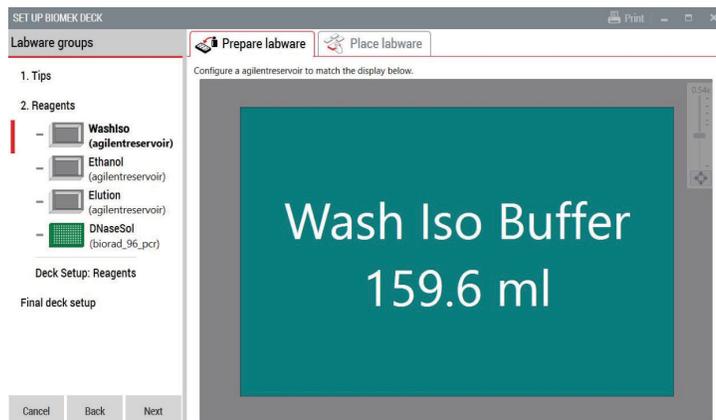


Рисунок 4. Программный модуль Guided Labware Setup отображает объемы реагентов и помогает пользователю определить правильную конфигурацию рабочего стола

План эксперимента

Было отделено примерно по 10 мг ткани замороженной мышиной почки (3 повторности), печени (2 повторности) и мозга (2 повторности). РНК выделялась с помощью как ручного, так и автоматизированного протокола с использованием набора RNAdvance Tissue. Количество и качество образцов РНК оценивали с применением спектрофотометра NanoDrop 2000 TM (Thermo Fisher Scientific), набора для анализа РНК Quant-iT™ RiboGreen® (Thermo Fisher Scientific), биоанализатора Agilent Bioanalyzer 2100 (набор Agilent RNA 6000 Nano) и метода количественной ПЦР в режиме реального времени (набор KAPA SYBR® Fast One-Step qRT-PCR Master Mix (2 шт.), фланкирующий транскрипт интрона актина В, реакция выполнялась в трех повторностях).

Результаты

Высокое качество РНК требуется во многих случаях ее последующего применения. Чтобы в полной мере определить различия РНК, выделяемой по ручному и автоматизированному протоколам, мы оценивали качество образцов РНК с применением множества методов.

Чтобы оценить чистоту нуклеиновой кислоты, прибор NanoDrop рассчитывает отношение показателя поглощения нуклеиновой кислоты к показателю поглощения загрязнителей. При выполнении как ручного, так и автоматизированного протокола обработки образцов были получены удовлетворительные отношения A260/A280 (1,8–2,2) и приемлемые отношения A260/A230 (> 1,7 в общем; таблица 2).

В анализе РНК с помощью набора Quant-iT RiboGreen для количественного определения РНК применяют РНК-специфичный краситель. Выход РНК в нашем автоматизированном методе был сопоставим с выходом при ручном выделении (таблица 2).

Числа целостности РНК (RIN), рассчитанные с помощью биоанализатора Agilent 2100 Bioanalyzer, учитывают не только отношение 28S и 18S рРНК, но и электрофоретический след РНК, обеспечивая надежную оценку качества РНК. Как ручной, так и автоматизированный методы продемонстрировали превосходные показатели RIN (рисунок 5). Для различных тканей показатель RIN был ниже при выполнении автоматизированного протокола обработки образцов (рисунок 5, почка: станд. откл. при ручной и автоматизированной обработке — 0,7 и 0,5 соответственно; мозг: станд. откл. при ручной и автоматизированной обработке — 0,9 и 0,1 соответственно). Показатели RIN варьировались в зависимости от типа ткани как для ручного, так и для автоматизированного протокола, что свидетельствует о необходимости применения тканеспецифичных протоколов лизиса и гомогенизации (рисунок 5).

Чтобы продемонстрировать пригодность выделенной РНК для последующего применения, мы провели количественную ПЦР в режиме реального времени. РНК, выделенная с помощью обоих методов, была амплифицирована в диапазоне C_t 15–20, что свидетельствует о ее превосходном качестве (рисунок 6).

Метод	Ткань	NanoDrop		RiboGreen	
		260/280	260/230	Конц. (нг/мкл)	Выход (нг)
Ручной	Почка	2,13	1,67	72,257	2890,29
Ручной	Почка	2,13	1,45	59,842	2393,70
Ручной	Почка	2,16	1,45	63,450	2537,96
Ручной	Печень	2,05	0,42	18,652	746,10
Ручной	Печень	2,04	0,56	102,726	4109,02
Ручной	Мозг	2,01	0,72	3,5350	141,40
Ручной	Мозг	1,93	0,84	29,803	1192,11
Автоматизированный	Почка	2,03	1,72	43,130	1725,20
Автоматизированный	Почка	2,09	1,69	38,925	1557,01
Автоматизированный	Почка	2,1	1,58	40,384	1615,36
Автоматизированный	Печень	2,17	1,86	62,386	2495,44
Автоматизированный	Печень	2,17	1,95	73,161	2926,45
Автоматизированный	Мозг	2,01	1,24	20,149	805,97
Автоматизированный	Мозг	1,98	1,35	14,329	573,17

Таблица 2. Концентрация, выход и чистота РНК по результатам, полученным с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 и набора для анализа РНК Quant-iT™ RiboGreen®.

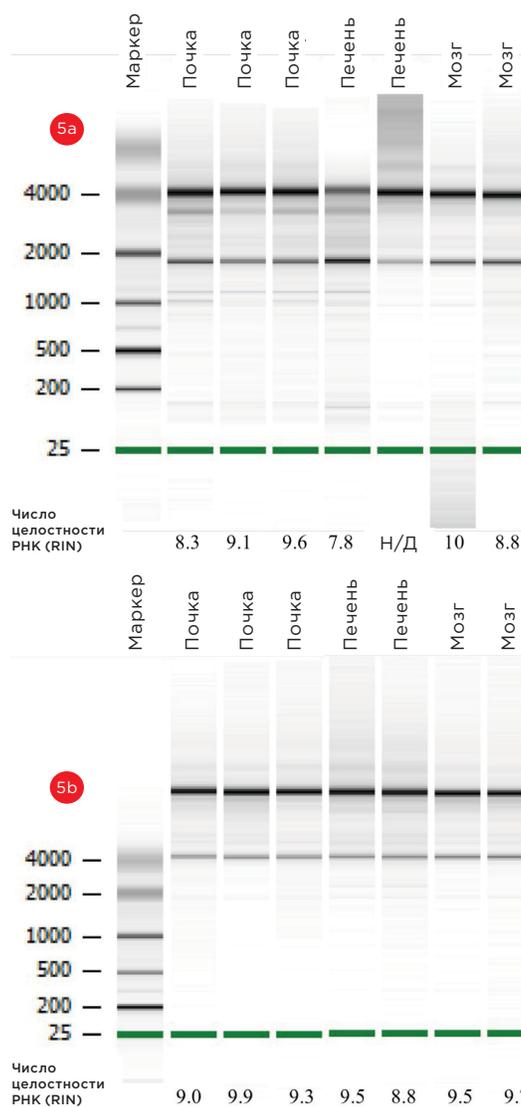


Рисунок 5. Образцы РНК мыши, полученные с помощью ручного (а) и автоматизированного (б) методов, были проанализированы на приборе Agilent Bioanalyzer 2100.

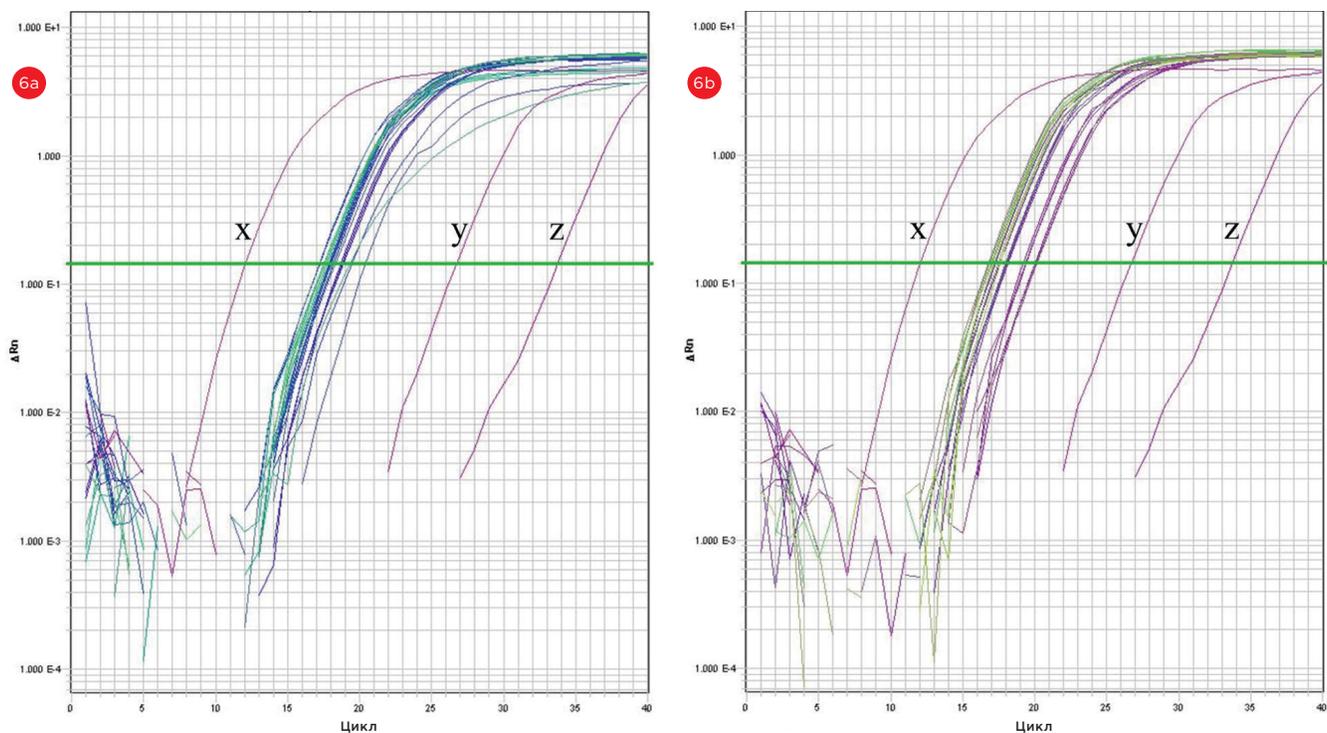


Рисунок 6. Графики амплификации количественной ПЦР в режиме реального времени (зависимость флуоресценции от числа циклов) для матриц РНК в случае ручного (а) и автоматизированного (б) методов. Концентрация матрицы РНК 50 нг/мкл; X: положительный контроль 200 нг/мкл; y: нет контроля обратной транскрипции; z: нет контроля матрицы

Заключение

Мы продемонстрировали автоматизацию применения набора Agencourt RNAdvance Tissue на лабораторной станции Biomek i5 Multichannel 96 Genomics. Качество и количество РНК, выделенной по автоматизированному протоколу, было сопоставимо с аналогичными показателями РНК, выделенной вручную. Автоматизация позволила быстро и эффективно выделить высококачественную РНК с незначительными различиями между разными типами тканей. Показатели выделения нуклеиновых кислот были одинаковыми не для всех типов тканей. По этой причине автоматизированный протокол, как и ручной, можно легко модифицировать, чтобы добиться оптимальных условий (например, лизис и гомогенизация) для конкретного типа ткани.

Автоматизированные лабораторные станции Biomek не предназначены и не утверждены для диагностики заболеваний или других состояний. Данные, представленные в настоящем документе, были получены в процессе разработки.

© 2017 г. Beckman Coulter, Inc. Все права защищены. Название Beckman Coulter, стилизованный логотип, а также знаки продукции и обслуживания Beckman Coulter, упомянутые в настоящем документе, являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками компании Beckman Coulter, Inc. в США и других странах.

ООО «Бекмен Культер», представительство Beckman Coulter Life Sciences ул. Станиславского, д. 21, стр. 3, Москва, Россия, 109004. тел.: +7 (495) 228 67 00, эл. почта: ls-russia@beckman.com mybeckman.ru

AAG-2687APP05.17RU