

Genomika a sekvenování 2022

Izolace nukleových kyselin

Reagencie pro molekulární biologii

Oligonukleotidy a sondy

Sekvenování

Přístrojová technika



LONZA

circulomics

SITools
BIOTECH

HansaBioMed
Life Sciences

metabion



Izolace nukleových kyselin

Klíčovým faktorem každé molekulárně biologické a genomické metody je kvalita vstupní DNA nebo RNA. Nečistoty ve vzorku nukleové kyseliny mohou působit jako inhibitory polymeráz, případně se mohou vázat na nukleovou kyselinu a tím výrazně zpomalit amplifikační reakci. U vzácnějších vzorků může být také nukleová kyselina přítomna ve velmi nízké koncentraci. Před samotnou PCR amplifikací je tedy většinou nezbytné nukleovou kyselinu izolovat a purifikovat, abychom se zbavili těchto nečistot a nukleovou kyselinu koncentrovali.

Obecně můžeme izolační metody rozdělit na manuální a automatické. V oblasti manuálních metod se

firma Promega zaměřuje především na tzv. centrifugační a vakuové izolace. Obě tyto techniky využívají separaci na minikolonkách obsahujících křemičitou membránu, která vlivem vnější síly (odstředivá síla v případě centrifugace a podtlaková síla v případě vakua) propustí pouze menší molekuly a větší molekuly, tedy molekuly DNA, zůstanou na kolonce, ze které se následně odmyjí elučním pufrem. Výhodou této techniky je rychlost, jednoduchost, a navíc není nutná precipitace ethanolem, který často inhibuje PCR. Automatické metody jsou pak založeny na vazbě nukleových kyselin na paramagnetické částice, které lze snadno oddělit z roztoku a promýt s minimálními ztrátami.

Izolace genomické DNA a RNA

Promega vyrábí celé spektrum kitů specializovaných na izolaci gDNA z různých typů vzorků. Zajímavý je např. ReliaPrep FFPE gDNA kit pro izolaci z para-finových bločků, který má velmi jednoduchý protokol a neobsahuje těkavá organická rozpouštědla. Stejně jako v případě genomické DNA se nabízí i množství

Název	Typ vzorku	Čas izolace	Výtěžek
ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System	Tkáně, buňkové stěry, myší orgány	20–30 min	30 µg
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Bílé krvinky, buněčné kultury, živočišné tkáně, rostlinná pletiva, kvasinky, G+ a G- bakterie	60 min	různé
Wizard® SV Genomic DNA Purification System	Buněčné kultury, živočišné tkáně, rostlinná pletiva, myší orgány	45 min	20 µg
Wizard® Magnetic 96 DNA Plant System	Pletivo z listů, pletivo ze semen	15 min	různé
Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food	Kukuřice, kukuřičná mouka, pšeničná mouka, sójové boby a další vzorky potravin	60 min	různé
ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System	FFPE řezy tkání	2,5 h	různé
ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System	200 µl krve nebo jiné tělní tekutiny	25 min	20 µg
ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System	Savčí buňky (10^2 – $5 \cdot 10^6$)	20–30 min	0,5–1,34 µg (15 µl)
ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System	Tkáně (0,25–25 mg)	20–30 min	30 µg (15 µl)
SV Total RNA Isolation System	Tkáně, buněčné kultury, bílé krvinky	60 min	0,3–5,3 µg z 1 mg tkáně
SV 96 Total RNA Isolation System	Tkáně, buněčné kultury, bílé krvinky	60 min	0,33–0,44 µg z 10^5 buněk
MagneSil® Total RNA mini-Isolation System	Buněčné kultury ($\leq 1 \cdot 10^3$ buněk), plná krev (≤ 5 µl)	30 min	2 µg z 10^5 buněk
PureYield™ RNA Midiprep System	Tkáně, kultivované buňky, bakterie, kvasinky, rostliny, krev	120 min	0,33–0,44 µg z 10^5 buněk
ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System	FFPE řezy tkání	90 min	různé

Tabulka 1 Přehled kitů pro manuální izolaci gDNA a RNA od firmy Promega

kitů pro izolaci RNA z různých typů vzorků. Kompletní přehled kitů pro izolaci DNA a RNA naleznete v tabulce 1.

Izolace plazmidové DNA

Jedním z nejpoužívanějších systémů, které Promega nabízí je **PureYield™ Plasmid Miniprep System**. Purifikace tímto systémem je velice rychlá a účinná. Již za 10 minut je možné izolovat až 30 µg čisté plazmidové DNA z 600 µl až 3 ml média. Systém obsahuje unikátní promývací roztok pro odstranění endotoxinů, což zvyšuje účinnost následného využití plazmidové DNA, zejména při transfekci do eukaryotických buněk, *in vitro* transkripci a při spřažené *in vitro* transkripci/translaci. K dispozici je také varianta Midiprep, kde je možné získat 200 µg DNA z 25–100 ml média, a také varianta Maxiprep, kde je garantovaný zisk 1 mg DNA z 250 ml média. Další možností je použít **Wizard® Plus SV Minipreps System**, u kterého jsou výtěžky podobné, protokol je zdouhavější (cca 45 minut), ale cena příznivější.

Izolace DNA fragmentů

Pro downstream aplikace jako je sekvenace je nezbytné purifikovat požadovaný PCR produkt od nežádoucích vedlejších produktů, popřípadě izolovat daný fragment přímo z agarózového gelu. Pro tyto účely byl vyvinut velmi oblíbený **Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System**. Tento systém je opět založený na separaci na křemičité membráně a izoluje fragmenty o velikosti 100 bp až 10 kb. Výhodou je opět vysoká rychlost izolace (čisté fragmenty je možné získat za

15 minut), a také jeho univerzální použití (dvě aplikace). K dispozici je také „high-throughput“ varianta **Wizard® SV 96 PCR Clean-Up System**, která umožňuje provádět izolaci v 96-jamkových destičkách. V případě, že chcete získat větší fragment, je možné použít **Wizard® DNA Clean-Up System**, který umožňuje izolovat i větší fragmenty o velikosti 200 bp až 50 kb.

Maxwell® RSC a Maxwell® RSC 48 – automatizovaná izolace nukleových kyselin

Maxwell® RSC a Maxwell® RSC 48 jsou kompaktní automatizované platformy pro purifikaci nukleových kyselin, které zpracovávají současně až 16 (Maxwell® RSC) nebo 48 vzorků (Maxwell® RSC 48). Předplněné kazety a optimalizované protokoly zajišťují výkonnou, konzistentní a spolehlivou purifikaci DNA a RNA za 25–60 minut z různých typů vzorků. Přístroj se ovládá pomocí dotykové obrazovky s intuitivním grafickým rozhraním. Integrovaný systém Vision s výrazným LED indikátorem snižuje potenciál chyby uživatele tím, že před začátkem izolace ověří správné umístění kazety, eluční zkumavky a dalšího příslušenství. Pokud se vyskytne nějaký problém, systém vás informuje. Čtečka čárových kódů pak usnadňuje sledování vzorků. Součástí obou variant je UV lampa, umožňující dekontaminaci vnitřních povrchů přístroje.

Obr. 1 Automatický izolátor nukleových kyselin Maxwell® RSC



A proč si vybrat právě přístroj Maxwell®, když trh nabízí celou řadu zdánlivě analogických přístrojů? Odpověď na tuto otázku je několik.

1. Spolehlivost

První Maxwell® jsme nainstalovali v roce 2008 ve FN Plzeň. I přes každodenní provoz v hemato-onkologické laboratoři je přístroj stále plně funkční, a to bez jediného servisního zákroku. Stejně jsou na tom i další nainstalované Maxwelly u našich zákazníků. Tato mimořádná spolehlivost je způsobena vlastní technologií přístroje. Stejně jako jiné izolátory používá i Maxwell® princip separace pomocí magnetických částic. Na rozdíl od ostatních přístrojů ale Maxwell® během izolace nemanipuluje s tekutou složkou a přesouvá samotné magnetické částice mezi jednotlivými promývacími roztoky pomocí pohyblivých magnetických tyček (obr. 2). Konstrukce přístroje je tudíž výrazně jednodušší a odolnější vůči poruchám, protože neobsahuje žádné pumpy ani komplikované systémy hadiček. Uvnitř přístroje navíc nevznikají žádné aerosoly, které mohou být potenciálním zdrojem křížové kontaminace.

2. Reference

Naše přístroje jsou umístěné v laboratořích s různým provozem a objemem vzorků. Najdete je na odděleních mnoha fakultních nemocnic (Ostrava, Plzeň, Olomouc, Brno, Praha), v soukromých diagnostických laboratořích i na akademických a univerzitních pracovištích. V případě zájmu rádi poskytneme kontakt na konkrétní referenční zákazníky s konkrétními typy vstupních vzorků.

3. Aplikační flexibilita

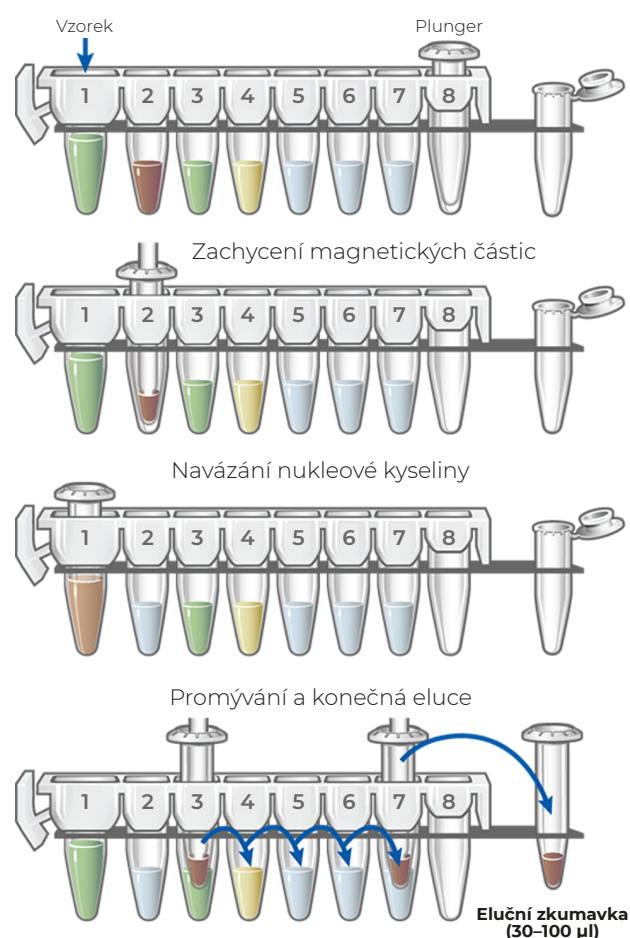
Maxwell® RSC je uzavřený systém a k dispozici je široké spektrum kitů určených pro konkrétní typy vzorků (krev, buňky, tělní tekutiny, tkáně, FFPE aj.). Tím však není omezeno použití pouze na tyto vzorky. K dispozici je celá řada aplikačních protokolů optimalizovaných i pro méně časté nestandardní vzorky. Současně Promega neustále vyvíjí nové kity. Nové protokoly jsou pak zdarma k dispozici samostatně či v pravidelných ročních aktualizacích. Níže uvádíme informace k několika nejnovějším kitům a souhrnnou tabulku všech dostupných kitů pro DNA i RNA.

Jednoduchá automatická purifikace ccfDNA

Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit se používá s přístroji Maxwell® RSC k izolaci cirkulující nebuněčné DNA (ccfDNA) nebo cirkulující nádorové DNA (ctDNA) z 0,2–1,0 ml vzorků plazmy. Maxwell® RSC může najednou zpracovat od 1 do 16 vzorků a Maxwell® RSC 48 od 1 do 48 vzorků, přibližně za 70 minut. Kit ob-

sahuje vše potřebné pro izolaci a nevyžaduje žádnou předpřípravu vzorku. Jednoduše přidejte vzorky plazmy do připravených kazet a stiskněte Start. Purifikovaná ccfDNA je vysoce kvalitní s minimální kontaminací genomovou DNA a je připravena k použití v následných aplikacích, jako je qPCR, NGS a digitální PCR.

- Izoluje ccfDNA až z 1 ml plazmy
- Konzistentní vysoké výtěžky amplifikovatelné ccfDNA
- Jednoduchý tříkrokový protokol bez preprocessingu



Obr. 2 Princip izolace nukleových kyselin pomocí izolátorů Maxwell®. Každá cartridge obsahuje několik zkumavek s promývacími roztoky. Do jamky 1 se nadává vzorek, v jamce 8 je umístěn plunger, který se nasune na magnetickou tyčku a brání kontaktu tyčky s roztokem. Magnetická tyčka s plungerem postupně přenáší magnetické částice s nukleovými kyselinami mezi roztoky. V poslední zkumavce se pak nukleové kyseliny uvolní z povrchu částic do roztoku pro další zpracování.

Automatická purifikace ccfDNA z velkého objemu plazmy

Maxwell® RSC ccfDNA LV Plasma Kit je modifikovanou verzí standardního ccfDNA kitu pro izolaci cirkulující DNA z velkého objemu plazmy. Protokol obsahuje jednoduchý preprocessing, kdy se nejprve magnetické částice inkubují s 2–8 ml plazmy. Následně se částice přepipetují do cartridge v přístroji a spustí se automatická purifikace. V závislosti na použitém přístroji lze zpracovat 1–48 vzorků najednou.

Izolace nukleových kyselin z FFPE bločků

Maxwell RSC DNA FFPE Kit a **Maxwell RSC RNA FFPE Kit** jsou určeny pro snadnou automatickou pu-

rifikaci nukleových kyselin z formaldehydem fixovaných parafinových řezů savčích tkání. Kity nepoužívají nebezpečná organická rozpouštědla jako je xylén a poskytuje tak bezpečnější postup pro extrakci DNA z FFPE bločků. Součástí protokolu je preprocessing, kdy se vzorek inkubuje s proteinázou K.

- Automatická DNA extrakce z FFPE bločků
- Eliminuje nutnost použití xylenu a jiných nebezpečných rozpouštědel
- Purifikovanou DNA lze ihned použít pro další aplikace

Kat. číslo	Název	Velikost balení
Izolace DNA		
AS1520	Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit	48 izolací
ASB1520	Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit Multi-Pack	144 izolací
AS1400	Maxwell® RSC Blood DNA Kit	48 izolací
ASB1400	Maxwell® RSC Blood DNA Kit Multi-Pack	144 izolací
AS1540	Maxwell® RSC Buffy Coat DNA Kit	48 izolací
AS1640	Maxwell® RSC Buccal Swab DNA Kit	48 izolací
AS1700	Maxwell® RSC Fecal Microbiome DNA Kit	48 izolací
AS1620	Maxwell® RSC Cultured Cells DNA Kit	48 izolací
AS1370	Maxwell® RSC Cell DNA Purification Kit	48 izolací
AS1450	Maxwell® RSC DNA FFPE Kit	48 izolací
ASB1450	Maxwell® RSC DNA FFPE Kit Multi-Pack	144 izolací
AS1720	Maxwell® FFPE Plus DNA Kit	48 izolací
AS1610	Maxwell® RSC Tissue DNA Kit	48 izolací
AS1490	Maxwell® RSC Plant DNA Kit	48 izolací
AS1600	Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit	48 izolací
AS1660	Maxwell® RSC PureFood Pathogen Kit	48 izolací
AS1630	Maxwell® RSC Stabilized Saliva DNA Kit	48 izolací
AS1480	Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit	48 izolací
AS1840	Maxwell® RSC ccfDNA LV Plasma Kit	48 izolací
AS1330	Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit	48 izolací
ASB1330	Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit Multi-Pack	144 izolací
Izolace RNA		
AS1380	Maxwell® RSC simplyRNA Blood Kit	48 izolací
ASB1380	Maxwell® RSC simplyRNA Blood Kit Multi-Pack	144 izolací
AS1390	Maxwell® RSC simplyRNA Cells Kit	48 izolací
AS1440	Maxwell® RSC RNA FFPE Kit	48 izolací
AS1500	Maxwell® RSC Plant RNA Kit	48 izolací
AS1340	Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit	48 izolací
AS1460	Maxwell® RSC miRNA from Tissue	48 izolací
AS1680	Maxwell® RSC miRNA from Plasma or Serum	48 izolací
AS1330	Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit	48 izolací
ASB1330	Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit Multi-Pack	144 izolací

Tabulka 2 Přehled kitů pro automatickou izolaci nukleových kyselin na platformách Maxwell®

Vysoce citlivý, cenově dostupný, zkušební fluorimetr

Po provedení izolace nukleové kyseliny, která byla podrobně probrána v předchozím článku je nutné změřit množství a kvalitu DNA/RNA. I pro tento krok máme řešení.

Quantus Fluorometer je kompaktní dvoukanálový fluorimetr navržený pro vysoce citlivou detekci a kvantifikaci nukleových kyselin. Je přednastavený pro použití s QuantiFluor detekčními systémy pro specifickou kvantifikaci dsDNA, RNA a ssDNA od firmy Promega a zároveň umožňuje nastavit vlastní metody pro další fluorescenční barviva. Přístroj disponuje dvěma fluorescenčními kanály s excitační vlnovou délkou 495 nm a 640 nm. Limit detekce dsDNA je 10 pg/μl a má tak 10× vyšší citlivost než konkurenční fluorimetr Quibit. Je tedy vhodný i pro měření velmi nízkých koncentrací DNA. Měření koncentrace je vhodné pro NGS a je kompatibilní s platformami Illumina (HiSeq/miSeq), Roche (454) a LifeTech (Ion Torrent a Ion Proton).

Ovládání fluorimetru je velmi jednoduché a intuitivní. Přístroj se kalibruje pomocí jednoduché dvoubodové kalibrace, kdy se změří jen blank a standard představující nejvyšší bod kalibrační křivky. Tato data jsou uložena pro budoucí měření a není nutné pro každou sadu vzorků měřit kalibrační závislost. Po změření ne-

známého vzorku přístroj automaticky vypočítá koncentraci. Lze ho ovládat samostatně nebo lze připojit k počítači pomocí USB rozhraní a ukládat veškerá data pomocí zdarma dostupného softwaru, který umožňuje i snadný export dat do Excelu. Quantus je dostupný samostatně nebo v rámci tzv. NGS Starter packu, což je výhodný balíček obsahující navíc i fluorescenční barvivo QuantiFluor One dsDNA System (kat. č. E4870) a 500 PCR zkumavek pro stanovení koncentrace vaší DNA.

- Jednoduchá citlivá kvantifikace DNA a RNA
- Jednoduché intuitivní ovládání
- Vhodné pro next-gen sekvenování
- Optimalizované pro barviva QuantiFluor, ale lze měřit i jiná barviva

Kat. č.	Název	Velikost balení
E6150	Quantus Fluorometer	1 kus
E5150	Quantus NGS Starter Package	1 kus
E2670	QuantiFluor dsDNA System	1 ml
E3190	QuantiFluor ssDNA System	1 ml
E3310	QuantiFluor RNA System	1 ml
E4870	QuantiFluor ONE dsDNA System	500 reakcí
E4871	QuantiFluor ONE dsDNA System	100 reakcí
E4891	QuantiFluor ONE dsDNA Dye	20 ml

Obr. 3 Zkušební fluorimetr Quantus od firmy Promega



Exozomy

Exozom je extracelulární vezikula (EV), která je široce rozšířena v buněčných systémech a je vylučována za účelem vykonávání specifických biologických funkcí. EV hrají významnou roli v mnoha fyziologických a patologických procesech. Exozomy často fungují jako „komunikační prostředky“, které přenášejí aktivní proteiny a genetický materiál mezi buňkami. Tato schopnost komunikovat s ostatními buňkami v těle může mít jak pozitivní, tak negativní důsledky. Vzhledem k tomu, že každá buňka v těle produkuje jedinečné exozomy s vlastními jedinečnými vlastnostmi a obsahem, mohou být tyto jedinečné a odlišné signály distribuovány po celém těle. Například exozomy produkované rakovinnými buňkami mohou podporovat šíření a rozvoj rakoviny. Na druhou stranu exozomy produkované z kmenových buněk mohou podporovat protizánětlivou a regenerační aktivitu stejně jako jejich původní buňka. To znamená, že EV usnadňují mezibuněčnou komunikaci v různých buněčných procesech, jako jsou imunitní reakce a koagulace. Důležitým průlomem byl objev nukleových kyselin, jako jsou mRNA a miRNA, v těchto vezikulech. Několik studií ukázalo, že mRNA a miRNA asociované s EV mohou být funkčně přeneseny do buněk příjemce. Fyziologický význam přítomnosti mRNA a miRNA v EV včetně imunologických a vaskularizačních funkcí byl také popsán. EV přenášejí funkční RNA a gDNA,

kteří mohou být využity jako nové terapeutické cíle nebo biomarkery komplexních onemocnění, včetně rakoviny.

Optimalizovaná řešení pro výzkum Exozomů

Estonská společnost HansaBioMed Life Sciences (HBM) nabízí široký výběr produktů zaměřených na extracelulární vezikuly a výzkum exozomů pro life science aplikace. Hlavní produktové řady jsou:

- Exozomy a mikrovezikuly
- Produkty pro izolaci a purifikaci exozomů
- Řešení pro filtraci a koncentraci EV
- Kity pro kvantifikaci a charakterizaci exozomů
- Kity pro izolaci exozomové RNA
- Kity pro izolaci EV-asociované genomové DNA
- Polyklonální a monoklonální protilátky proti specifickým exozomálním markerům (CD63, CD81, ALIX)
- Servisní služby a výroba produktů na zakázku.

Společnost HBM vyvinula optimalizovaná řešení pro účinnou izolaci vysoce kvalitní celkové RNA (miRNA a mRNA) z celkové nebo nádorově specifické subpopulace EV. Nabízí také možnosti pro izolaci cirkulující a EV-asociované genomové DNA. V klinických podmínkách umožňují naše řešení ultra senzitivní detekci mutací a molekul RNA souvisejících s nádorem, což v praxi vede k nové generaci screeningových, monitorovacích a „stagingových“ testů.



Obr. 4 Produkty společnosti Hansa BioMed

Kat. č.	Název	Popis	Velikost balení
HBM-RNA-B25	RNA Basic Kit	Celková extrakce RNA z exozomů izolovaných různými metodami (ultracentrifugace, chemické srážení, velikostní chromatografie aj.)	25 reakcí
HBM-EXS-DNA	SelectEV	Selektivní purifikace ccfDNA a DNA z EV z plazmy založená na patentované peptidové afinitní metodě.	24 reakcí
HBM-EXS-RNA	SoRTEV	Purifikace RNA z nádorových EV z plazmy. Imunoafinitní vazba na kuličky potažené patentovanými protilátkami proti povrchovým antigenům exozomů.	24 reakcí

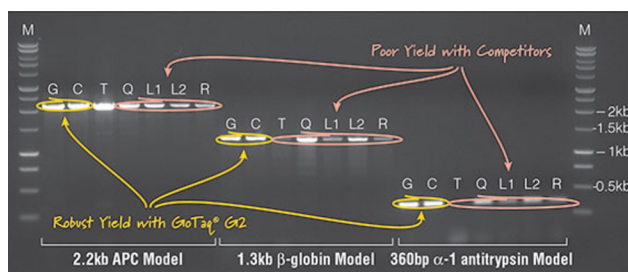
Molekulární biologie

V 80. letech objevil Cary Mullis, že některé DNA polymerázy mohou katalyzovat kontrolovatelnou syntézu DNA podle známého templátu, což vedlo k vývoji polymerázové řetězové reakci (PCR). Pomocí PCR lze jednoduše namnožit DNA nebo cDNA, abychom dostali dostatečné množství vstupního vzorku pro další analýzy. Díky své vynikající citlivosti, kdy pro analýzu stačí i velmi malé množství vstupní DNA, si PCR našla svoje místo v mnoha oborech, jako je *in vitro* diagnostika, forenzní vědy, testování genetické identity aj.

Spolehlivé DNA polymerázy od firmy Promega

Základem kvalitní PCR je kvalitní DNA polymeráza, která spolehlivě amplifikuje templátovou DNA. Proto společnost Promega vyvinula svoji vlastní rekombinantní GoTaq® G2 polymerázu. Jedná se o DNA polymerázu s 5' → 3' exonukleázovou aktivitou, která spolehlivě amplifikuje široké spektrum PCR templátů a poskytuje robustní výsledky. Je dostupná v několika variantách. Základní **GoTaq® G2 DNA Polymerase** je dodávána s pufrý obsahujícími fixní množství Mg^{2+} a 50 % glycerolu pro lepší amplifikaci a snadné nanášení na gel. Součástí balení je bezbarvý pufr pro fluorescenční detekci a zelený pufr, který obsahuje modré a žluté barvivo pro jednoduché sledování průběhu elektroforetické separace.

GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase je variantou, která obsahuje výše zmíněné pufrý bez přidání Mg^{2+} kationtů. V balení je samostatný roztok $MgCl_2$ a můžete si tak navolit optimální koncentraci hořčíku pro vaši aplikaci.



Obr. 5 Srovnání GoTaq® G2 s konkurenčními DNA polymerázami. Enzym poskytuje robustní amplifikaci různě velkých fragmentů s výtěžky vyššími než u konkurenčních enzymů.

Složení **GoTaq® G2 Hot Start Polymerase** bylo navrženo tak, aby se minimalizovala tvorba nespecifických produktů. Na polymerázu je navázána protilátka, která blokuje její aktivitu, dokud se při prvotní denaturaci nedosáhne teploty 94–95 °C. Poté se rozruší vazba s protilátkou a polymeráza je aktivována a při teplotě pod 70 °C je opět inhibována. Výsledkem je minimalizace vzniku vedlejších produktů, jako jsou např. dimery primerů, a v některých případech se může zvýšit výtěžnost PCR amplifikace. Stejně jako **Flexi** polymeráza je i **Hot Start** dodávána s bezbarvým a zeleným pufrem a samostatným roztokem $MgCl_2$ pro optimalizaci koncentrace Mg^{2+} kationtů.

GoTaq® MDx DNA Polymerase je hot start polymeráza vyráběna podle principů cGMP, což zajišťuje maximální kvalitu a konzistenci účinnosti mezi jednotlivými šaržemi. Během výroby jsou jednotlivé šarže purifikovány pomocí HPLC, kontrolovány na případnou kontaminaci nukleázami a DNA a je testována jejich výkonnost při amplifikaci. MDx polymerázu lze použít pro běžné experimenty, ale je vhodná i jako součást molekulárně diagnostických esejí bez nutnosti platit další poplatky. Dostupná je verze s glycerolem nebo bez glycerolu, což umožňuje další výrobní zpracování a lyofilizaci.

Kat. č.	Název	Velikost balení
M7841	GoTaq G2 DNA Polymerase	100 u
M7845	GoTaq G2 DNA Polymerase	5×100 u
M7848	GoTaq G2 DNA Polymerase	25×100 u
M7801	GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	100 u
M7805	GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	5×100 u
M7806	GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	25×100 u
M7808	GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	10 000 u
M7401	GoTaq G2 Hot Start Polymerase	100 u
M7405	GoTaq G2 Hot Start Polymerase	500 u
M7406	GoTaq G2 Hot Start Polymerase	2 500 u
M7408	GoTaq G2 Hot Start Polymerase	10 000 u
D6001	GoTaq MDx Hot Start Polymerase	100 u
D6005	GoTaq MDx Hot Start Polymerase	500 u
D6006	GoTaq MDx Hot Start Polymerase	2 500 u
D6008	GoTaq MDx Hot Start Polymerase	10 000 u

PCR a qPCR master mixy

GoTaq® G2 DNA Polymerázy popsané v předchozím článku jsou hojně využívané enzymy v oblasti PCR napříč širokým spektrem vědeckých týmů z různých oblastí. Velmi často je nutné si rutinní práci zjednodušit, zrychlit a standardizovat. Proto většina laboratoří používá při přípravě PCR tzv. „master mixy“. Master mixy obsahují mimo templátu a primerů veškerou chemii, která je potřeba k provedení PCR v jednom roztoku. Kromě již zmiňované GoTaq® G2 DNA Polymerázy je součástí master mixu také směs dNTP, MgCl₂ a reakční pufr, vše v optimálních koncentracích pro efektivní a rychlou amplifikaci širokého spektra DNA templátů.

Pro klasickou endpoint PCR nabízí Promega dva typy master mixů, a to v klasickém i v „hot start“ provedení: **GoTaq® G2 Colorless Master Mix** s bezbarvým pufrům pro fluorescenční detekci a **GoTaq® G2 Green Master Mix** s možností sledování elektroforetické separace (viz. článek „DNA polymerázy“). Je možné pořídit i tzv. **GoTaq® Long PCR Master Mix**, kde je použita speciální směs GoTaq® polymerázy s termostabilní „proofreading“ polymerázou pro kvalitní PCR dlouhých amplikonů. V předchozím odstavci byly popsány master mixy pro klasickou konvenční PCR, tedy PCR, při které dochází ke kvantifikaci amplikonu až po skončení reakce pomocí agarozové elektroforézy, o které se více dočtete v následujícím článku. V diagnostice, mikrobiologii, ale i klasické molekulární biologii se stále více používá tzv. kvantitativní PCR (qPCR), někdy nazývaná též real-time PCR, při níž je amplikon kvantifikován již v průběhu reakce. Existují dva přístupy qPCR. První přístup využívá tzv. interkalační fluorofory, tedy fluorescenční barviva, která se aktivují navázáním na dvouřetězcovou DNA (dsDNA). Díky tomu můžeme sledovat nárůst intenzity fluorescence po každém cyklu. Výhodou tohoto přístupu je především nižší pořizovací cena, protože je kromě master mixu potřeba pouze pár primerů. Promega má pro tento přístup k dispozici **GoTaq® qPCR Master Mix**, který využívá barvivo BRYT Green®, jenž poskytuje vyšší účinnost a zesílení fluorescence než známé konkurenční barvivo SYBR® Green I a navíc má minimální inhibiční vliv na amplifikační reakci. Součástí master mixu je dále GoTaq® Hot Start polymeráza, MgCl₂, směs dNTP, reakční pufr a také CXR referenční barvivo (analog ROX).

Druhým přístupem je využití duálně značených sond. Jsou to krátké jednořetězcové úseky DNA (ssDNA) komplementární s templátem, které mají na 5´-konci navázaný fluorofor a na 3´-konci tzv. zhášec. Ten absorbuje energii z fluoroforu a v normálním stavu tedy není pozorována žádná fluorescence. Během hybridizace nasedají sondy společně s primery na templátový řetězec DNA na základě komplementarity. Ná-

sledně 5´ → 3´ exonukleázová aktivita taq DNA polymerázy degraduje sondu a uvolňuje fluorofor, který se tak dostává mimo dosah zhášec a emituje fluorescenční záření. Velikou výhodou tohoto přístupu je specifita – kvantifikován je pouze templát, nikoli další potenciální nespecifické produkty PCR jako jsou např. dimery primerů. I v tomto případě nabízí Promega řešení, a to **GoTaq® Probe qPCR Master Mix**, který obsahuje všechny složky jako GoTaq® qPCR master mix s výjimkou BRYT Green® barviva. CXR referenční barvivo je součástí balení ale v samostatné zkumavce.

Kat. č.	Název	Velikost balení
M7822	GoTaq® G2 Green Master Mix	100 reakcí (á 50 µl)
M7823	GoTaq® G2 Green Master Mix	1 000 reakcí (á 50 µl)
M7832	GoTaq® G2 Colorless Master Mix	100 reakcí (á 50 µl)
M7833	GoTaq® G2 Colorless Master Mix	1 000 reakcí (á 50 µl)
M7422	GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix	100 reakcí (á 50 µl)
M7423	GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix	1 000 reakcí (á 50 µl)
M4021	GoTaq® Long PCR Master Mix	100 reakcí (á 50 µl)
A6001	GoTaq® qPCR Master Mix	200 reakcí (á 50 µl)
A6002	GoTaq® qPCR Master Mix	1 000 reakcí (á 50 µl)
A6101	GoTaq® Probe qPCR Master Mix	200 reakcí (á 20 µl)
A6102	GoTaq® Probe qPCR Master Mix	1 000 reakcí (á 20 µl)

Obr. 6
GoTaq qPCR
Master Mix



Reverzní transkriptázy a RT-PCR master mixy

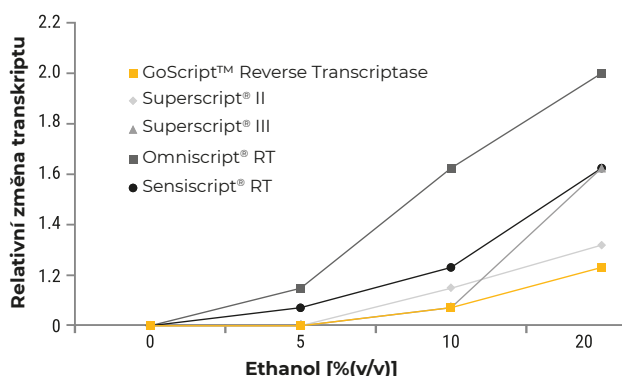
Kromě analýzy DNA je velmi důležitým molekulárně biologickým postupem také detekce a analýza RNA. Za tímto účelem byla vyvinuta metoda RT-PCR, která kombinuje PCR a reverzní transkripci. Při transkripci dochází nejprve k přepisu RNA do komplementární cDNA a následně k amplifikaci. RT-PCR hraje klíčovou roli při analýze genové exprese, při diagnostice genetických nemocí, či v dnešní době velmi oblíbené kvantifikaci virové RNA.

Důležitým enzymem při RT-PCR je reverzní transkriptáza, která katalyzuje přepis RNA do cDNA. Nejčastěji používanými reverzními transkriptázami (dále jen RT) jsou RT z Moloneyho myšího leukemického viru (M-MLV) a RT z ptačího myeloblastického viru (AMV), hlavně díky jejich schopnosti syntetizovat cDNA až do velikosti 5 kb. Obě mají svá pozitiva. **M-MLV reverzní transkriptáza** má minimální nebo žádnou nežádoucí aktivitu RNázy H, naopak **AMV RT** je ideální pro přepis RNA se sekundární strukturou. Promega nabízí oba zmíněné typy a navíc „RNase H-“ mutanta M-MLV RT. Nicméně nejzajímavější reverzní transkriptázou od Promegy je tzv. **GoScript™ Reverse Transcriptase**. Jedná se o rekombinantní M-MLV RT se speciálně navrženým pufrům, která je vysoce citlivá a spolehlivě transkribuje „low-copy“ i „high-copy“ geny a je rezistentní vůči inhibitorům. Díky tomu se stala nejlepší reverzní transkriptázou na trhu. Navíc si obdivuhodně dokáže poradit s jakoukoli sekundární strukturou a je možné s ní syntetizovat cDNA až do velikosti 9 kb.

GoScript™ Reverse Transcriptase je také použita v Promega RT kitech a master mixech. **GoScript™ Reverse Transcription System** obsahuje mimo RT a pufru také směs dNTP, MgCl₂, náhodné primery nutné pro syntézu prvního řetězce cDNA, primer pro reverzní transkripci polyadenylovaných RNA (mRNA), a také inhibitor RNázy RNasin®. Spojením GoScript™ Reverse Transcription systému s GoTaq® qPCR Master Mixem získáme **GoTaq® 2-Step RT-qPCR System** pro dvoukrokovou RT-qPCR, kde reverzní transkripce a PCR probíhají v oddělených zkumavkách. Výhodou oproti jednokrokové RT-qPCR je vyšší přesnost a menší náchylnost templátové RNA k degradaci. Naopak nevýhodou je nutnost přenést citlivou cDNA do „amplifikační“ zkumavky, takže hrozí riziko kontaminace. I v případě jednokrokové RT-qPCR nabízí Promega řešení v podobě **GoTaq® 1-Step RT-qPCR System**. Oba systémy se dodávají v „dye-based“ i „probe-based“ provedení.

Obr. 7 Srovnání odolnosti GoScript™ RT a konkurenčních enzymů vůči působení inhibitorů.

Kat. č.	Název	Velikost balení
A5003	GoScript™ Reverse Transcriptase	100 reakcí/ 16 000 u
A5004	GoScript™ Reverse Transcriptase	500 reakcí/ 80 000 u
M5101	AMV Reverse Transcriptase	300 u
M5108	AMV Reverse Transcriptase	1 000 u
M9004	AMV Reverse Transcriptase	600 u
M1701	M-MLV Reverse Transcriptase	10 000 u
M1705	M-MLV Reverse Transcriptase	50 000 u
M3681	M-MLV Reverse Transcriptase RNase H-, Point Mutant	2 500 u
M3682	M-MLV Reverse Transcriptase RNase H-, Point Mutant	10 000 u
M3683	M-MLV Reverse Transcriptase RNase H-, Point Mutant	50 000 u
A5000	GoScript™ Reverse Transcription System	50 reakcí
A5001	GoScript™ Reverse Transcription System	100 reakcí
A6020	GoTaq® 1-Step RT-qPCR System	200 reakcí
A6010	GoTaq® 2-Step RT-qPCR System	50×20 µl RT reakcí a 200×50 µl qPCR reakcí
A6120	GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System	200 reakcí
A6110	GoTaq® Probe 2-Step RT-qPCR System	50×20 µl RT reakcí a 200×50 µl qPCR reakcí



Moderní oligonukleotidy a sondy pro molekulární biologii

Kromě klasických oligonukleotidů a sond si v posledních letech našly své místo v molekulárně biologických laboratořích i speciální sondy, které řeší některé problémy, běžné pro klasické oligonukleotidy. Jedná se zejména o vyšší specifitu a stabilitu po vazbě na cílovou jednovláčkovou DNA a zvýšení teploty tání, což umožňuje použít kratší sondy s vyšší citlivostí.

Prvním typem takových sond jsou tzv. minor groove binding sondy (MGB), které mají na 3' konci MGB skupinu, která zvyšuje teplotu tání sondy a stabilizuje vzniklý duplex po vazbě sondy na cílovou DNA. Díky tomu lze zkrátit délku sondy, což zajišťuje účinnější zhášení fluorescence a zvýšenou citlivost zejména při detekci chybného párování jedné báze (single base mismatch) při zvýšené hybridizační teplotě.

Druhým typem speciálních sond jsou tzv. zip nucleic acid (ZNA). ZNA jsou oligonukleotidy konjugované s kladně nabitými sperminovými jednotkami. Připojením určitého počtu těchto jednotek na řetězec nukleové kyseliny dochází ke snížení elektrostatického odpuzování mezi jednotlivými řetězci nukleových kyselin (např. mezi primerem nebo sondou a templátovou DNA). Ve výsledku pak mají ZNA primery a sondy vyšší afinitu k cílové nukleové kyselině než nemodifikované oligonukleotidy. Celkový náboj ZNA lze snadno modulovat připojením specifického počtu sperminových jednotek. Počet připojených jednotek také lineárně zvyšuje teplotu tání. Lze tedy snadno předpovědět teplotu tání u vzniklých ZNA-DNA nebo ZNA-RNA komplexů a použít ZNA i pro analýzu křivky tání po PCR. ZNA primery a sondy jsou ideální pro PCR probíhající při nízké koncentraci Mg^{2+} , nízké koncentraci primerů a vyšších teplotách annealingu, což umožňuje lepší amplifikaci sekvencí bohatých na AT. Při reverzní transkripci zvyšují ZNA primery výtěžnost cDNA a tím i přesnost a citlivost celé analýzy.

Posledním typem jsou tzv. „locked nucleic acids“ (LNA). Jedná se o RNA nukleotidy, které obsahují navíc methylenový můstek mezi kyslíkem v pozici 2' a uhlíkem v pozici 4' pentózového kruhu. Tento můstek ribózu „zamyká“ v 3'-endo konformaci, čímž ji stabilizuje a poskytuje lepší vlastnosti oproti klasickým oligonukleotidům. Mezi hlavní výhody patří zejména vyšší hybridizační specifita, zvýšená teplota tání pro krátké a na AT bohaté sondy a primery (2–6 °C na jednu LNA) a vyšší stabilita a odolnost vůči působení exonukleáz. LNA jsou tak ideální pro klasické PCR aplikace, ale i tlumení genů nebo *in situ* hybridizaci.

Metabion – kvalitní oligonukleotidy za bezkonkurenční cenu

Ať už používáte při vašich experimentech klasickou endpoint PCR nebo qPCR, předpokladem kvalitních výsledků jsou i kvalitní primery a sondy. Německá firma Metabion se zabývá zakázkovou syntézou oligonukleotidů a fluorescenčních sond. V jejich portfoliu naleznete klasické DNA a RNA oligonukleotidy a sondy, ale i speciální typy jako jsou právě ZNA nebo LNA sondy. Metabion také nabízí syntézu oligonukleotidů pro next-gen sekvenování. Tyto oligonukleotidy mají maximální čistotu, a navíc jsou analyzovány pomocí ESI-TOF hmotnostní spektrometrie. Ať už máte zájem o klasické oligonukleotidy nebo speciální fluorescenční sondy, neváhejte nás kontaktovat a my Vám rádi poradíme s výběrem. Kompletní seznam dostupných oligonukleotidů je následující:

- DNA/RNA oligonukleotidy
- DNA/RNA qPCR sondy
- DNA/RNA mid/large scale oligonukleotidy
- NGS oligonukleotidy
- LNA primery a sondy
- ZNA primery a sondy



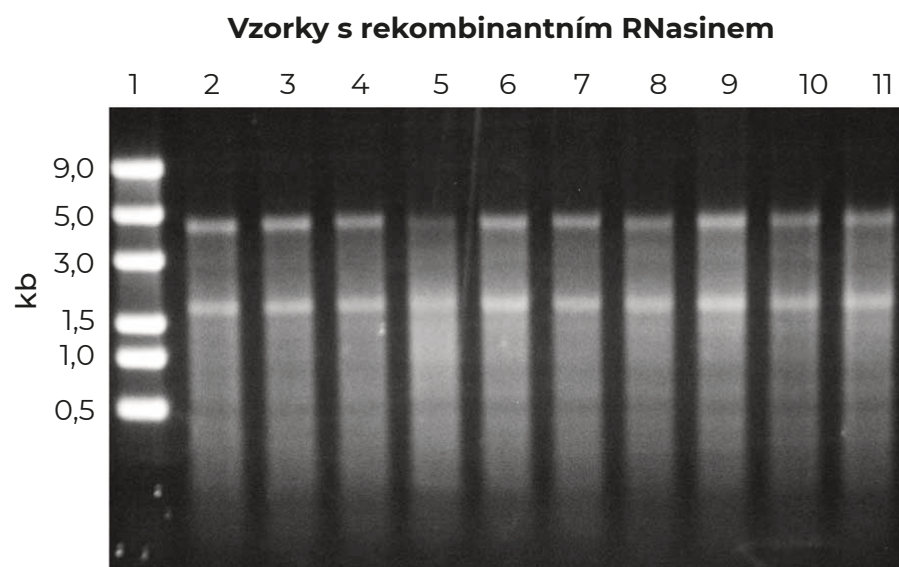
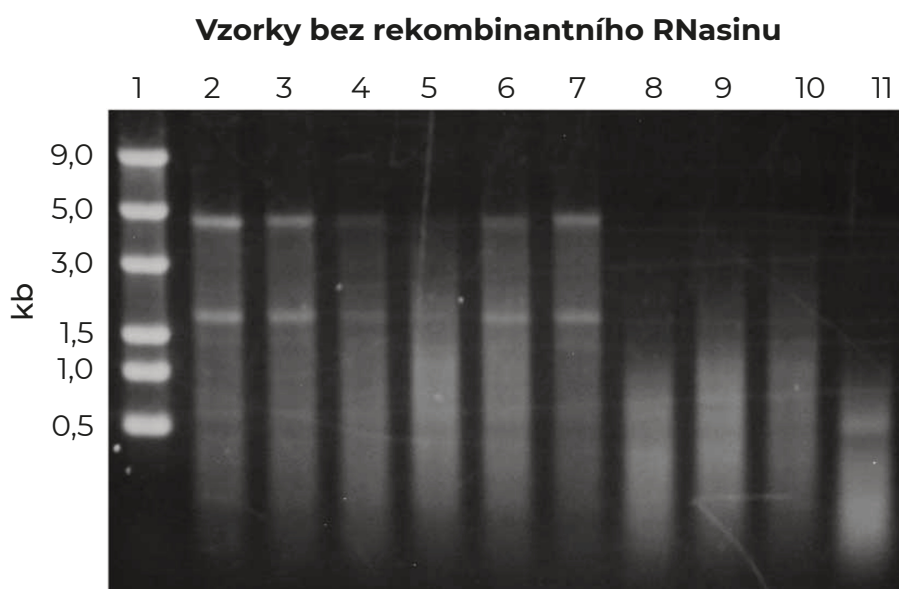
RNasin®

Práce s RNA je velmi delikátní záležitostí, která vyžaduje práci ve speciálně vyčleněných prostorech bez přítomnosti jinak všudypřítomných RNáz. Udržovat takové prostředí je ale velmi náročné, a i tak může někdy dojít ke kontaminaci a následnému znehodnocení a degradaci vašich vzorků. Jedním ze způsobů, jak vaše vzorky ochránit je přidavek inhibitoru RNáz RNasinu od firmy Promega. RNasin je protein, který se s vysokou afinitou váže na RNázy, inhibuje je a brání jim v degradaci RNA při manipulaci se vzorky. RNasin vám dodá jistotu, že váš čas a vzorky nepřijdou vniveč, ať už izolujete RNA, provádíte RT-PCR nebo třeba *in vitro* transkripci. RNasin byl za posledních 25 let citován ve více jak deseti tisících publikací a je

celosvětově nejpopulárnějším výrobkem v této kategorii. Standardní verzí RNasinu je **Recombinant RNasin®**. Novější verzí je pak **RNasin® Plus**, který je extra stabilní a lépe odolává oxidaci a vysokým teplotám (až 15 min. při 70 °C). RNasin® Plus je také ideální volbou pro dlouhodobé skladování vzorků RNA.

Kat. č.	Název	Velikost balení
N2511	Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	2 500 u
N2515	Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	10 000 u
N2611	RNasin Plus RNase Inhibitor	2 500 u
N2615	RNasin Plus RNase Inhibitor	10 000 u

Obr. 8 Srovnání dvou skupin vzorků, které byly přes noc inkubovány při 37 °C bez a za přítomnosti RNasinu. Běh č. 1 – DNA žebříček, běh č. 2 – RNA kontrola, běh č. 3–11 vzorky RNA. Z devíti testovaných vzorků vykazovalo sedm vzorků různý stupeň degradace. Vzorky s přídavkem RNasinu zůstaly neporušené.



Analýza nukleových kyselin

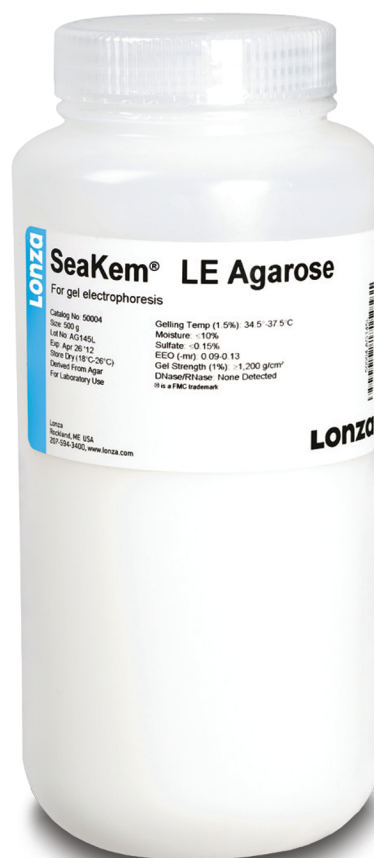
Elektroforéza patří mezi nejpoužívanější separační techniky pro izolaci a analýzu nukleových kyselin (dále se používají ultracentrifugační nebo chromatografické techniky). Výhody elektroforézy oproti jiným separačním metodám jsou zejména:

- Rychlost
- Nízká cena
- Účinná separace
- Je použitelná pro všechny (nabitě) biomakromolekuly (nejen NK)
- Možnost separace jak velmi nízkých, tak vysokých množství NK (až μg)
- Snadná detekce a izolace separovaných molekul, vhodná i pro další metody

Agaróza SeaKem LE – agaróza, které můžete důvěřovat

Agaróza SeaKEM LE je ideální volbou pro analýzu nukleových kyselin gelovou elektroforézou nebo blotováním (100 bp–23 kb). SeaKem LE je charakteristická vysokým rozlišením separovaných fragmentů nukleových kyselin a konzistencí jednotlivých šarží. Tato agaróza pro molekulární biologii je DNase a RNase free a vytvořené gely mají velmi nízké barevné pozadí při použití barviv jako je EthBr, SYBR® Green nebo GelStar™. Vzhledem k nízké endoelektroosmóze má DNA vysokou elektroforetickou mobilitu. Tato agaróza je také vhodná pro elektroforézu proteinů při aplikacích jako Ouchterlonyho a radiální imunodifuze (RID). Kromě SeaKem LE nabízí Lonza i další typy agaróz. Jejich přehled a použitelnost pro různé aplikace jsou uvedeny v Tabulce 3.

Kat. č.	Název	Velikost balení
50004	Agaróza SeaKem LE	500 g



Obr. 9 Seakem LE agaróza od společnosti Lonza

Aplikace	SeaKem LE	Sea-Plaques	NuSieve 3:1	MetaPhor	SeaKem GTG	Sea-Plaques GTG	NuSieve GTG	SeaKem Gold
Separace DNA/RNA ≤ 1 kb			✓	✓			✓	
Separace DNA/RNA ≥ 1 kb	✓	✓			✓	✓		✓
Separace DNA 20–800 bp (jemné rozlišení)				✓				
Rozlišení fragmentů PCR	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Southern blot	✓		✓					✓
Northern blot	✓		✓					✓
In-gel reakce						✓	✓	
DNA fingerprinting	✓							
DNA a RNA recovery		✓			✓	✓	✓	✓
Separace DNA 1–50 kb								✓

Tabulka 3 Přehled agaróz od firmy Lonza a jejich aplikací

Gelová elektroforéza již za 5 minut? Představujeme Flash Gel® System

Flash Gel System od firmy Lonza je zařízení pro rychlou gelovou elektroforézu, díky kterému nemusíte dopředu myslet na přípravu agarózových gelů. Flash gel totiž používá kazety, které obsahují předchystaný, obarvený agarózový gel a separační pufr. Stačí jednoduše vybalit kazetu, nadávkovat vzorek a separovat. S tímto produktem separujete DNA během 2–7 minut a RNA v čase do 8 minut. Systém umožňuje sledovat separaci v reálném čase a díky vysoké citlivosti lze pro analýzu použít 5–20× menší množství DNA. Systém se doporučuje i pro ověření a analýzu celkové RNA, rychlou kontrolu nativní RNA a kontrolu degradace RNA a čistoty mRNA.

Základní specifikace:

- Rozsah separace: 50–4 000 bp (optimálně 150–2 500 bp)
- Expirace: 5 měsíců od data výroby při pokojové teplotě, při skladování v lednici (2–8 °C) je možné používat 12 měsíců
- Objem jamky: Pro optimální výsledky do 5 µl
- Velikost gelu: 70 mm × 84 mm × 2 mm

Výhody:

- Výsledky za 5 minut a méně
- Možnost sledovat migraci DNA a RNA v reálném čase bez nutnosti použití UV transiluminátoru
- Mimořádná citlivost a rozlišení
- FlashGel kazety – obsahují hotový předbarvený agarózový gel i pufr
- FlashGel Dock – elektroforetický systém s integrovaným transiluminátorem pro kombinovanou separaci i detekci

Kat. číslo	Název	Velikost balení
57025	FlashGel Dock	
57023	FlashGel DNA Cassettes 1,2% agaróza, 12+1 jamek	9 ks
57031	FlashGel DNA Cassettes 2,2% agaróza, 12+1 jamka	9 ks
57028	FlashGel™ RNA Cassettes 1,2% agaróza, 16+1 jamka	9 ks
50462	FlashGel Loading Dye 5×	5×1 ml
50473	FlashGel DNA Marker, 100–4 000 bp	500 µl
50475	FlashGel Quant Ladder, 100–1 500 bp	250 µl
50577	FlashGel™ RNA Marker, 0,5–9 kb	50 µg



Obr. 10 FlashGel systém a DNA kazetka pro rychlou gelovou elektroforézu nukleových kyselin

DNA sekvenování

Sekvenování DNA je proces určování pořadí bází v molekule DNA a v současné době se využívá několik základních metod. Nejstarší stále používanou metodou je Sangerovo sekvenování založené na PCR s fluorescenčně značenými dideoxynukleotidy. Během replikace se dideoxynukleotidy náhodně inkorporují do nově vznikajících řetězců DNA, čímž dojde k ukončení řetězce. Získaná směs různě dlouhých fragmentů je pak analyzována pomocí kapilární elektroforézy a získá se sekvence sledovaného úseku DNA. Příkladem takového přístroje je např. **Spectrum Compact CE**. Mezi hlavní výhody Sangerova sekvenování patří zejména jednoduchost, přesnost a cena, pokud pracujete s omezeným počtem vzorků. Hlavní limitací je zejména malá propustnost vzorků a limit velikosti sekvenované DNA, který je cca 900–1 000 bp. I přes svoje limitace má Sangerovo sekvenování stále svoje místo v sekvenačních laboratořích a díky své vysoké přesnosti a spolehlivosti se jedná o zlatý standard. Využívá se např. pro potvrzení dat z NGS, detekci mutací známých genů nebo sekvenování mitochondriální DNA.

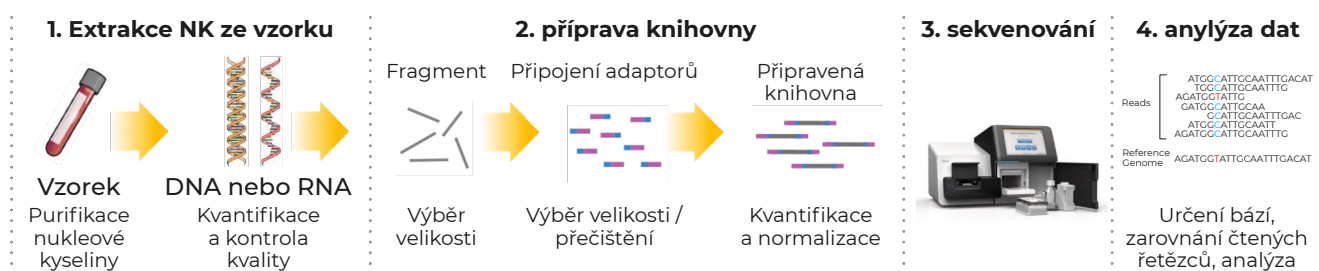
Novější metody, označované souhrnně jako next-gen sekvenování (NGS) nebo masivně paralelní sekvenování, jsou schopny simultánně analyzovat velké množství fragmentů a získaná data se pak vyhodnocují pomocí informatické analýzy. Hlavními výhodami NGS je zejména výrazně vyšší propustnost vzorků, možnost analyzovat velké množství vzorků v jednom běhu a fakt, že lze provádět analýzu více genů nebo celého genomu najednou. NGS techniky lze rozdělit do dvou základních skupin na tzv. short-read a long-read sekvenování. Short-read metody zahrnují přístroje Illumina a Ion Torrent, které jsou schopny analyzovat jen krátké fragmenty DNA velikosti do cca 400 bp. Delší sekvence se pak

získají právě paralelním sekvenováním mnoha fragmentů najednou a následným překryvem jednotlivých sekvencí. Díky tomu jsou short-read techniky méně náročné na kvalitu vstupní DNA z hlediska její fragmentace. Long-read platformy zahrnují přístroje od Pacific Bio a Oxford Nanopore, které jsou schopny analyzovat mnohem delší fragmenty DNA. Pacific Bio sekvenátory analyzují fragmenty větší než 10 kb, zatímco NanoPore sekvenátory mají v podstatě neomezenou délku čteného řetězce a jsou limitovány hlavně metodou izolace DNA. Na rozdíl od short-read technik jsou long-read metody náročnější na kvalitu vstupní DNA a je nutné použít šetrnější metody izolace, aby nedocházelo ke zbytečnému namáhání DNA a její fragmentaci. Příkladem takových izolačních kitů jsou např. **Nanobind** kity od Circulomics nebo **Wizard® HMW DNA Extraction Kit** od Promega.

Ačkoliv se jednotlivé přístroje liší principem samotného sekvenování, základní schéma přípravy vzorku je podobné. V prvním kroku je nutné izolovat DNA, která je následně kvantifikována a kontroluje se její kvalita. Pokud je koncentrace vstupní DNA příliš nízká nebo je DNA příliš degradovaná, může to negativně ovlivnit kvalitu získaných dat. Následně se izolovaná DNA fragmentuje na úseky požadované velikosti. V případě short-read platform je to na cca 400 bp fragmenty, u PacBio na 10 kb. Při sekvenaci na NanoPore se fragmentace většinou neprovádí. Následně se provede selekce velikosti fragmentů optimální velikosti (např. pomocí ProNex magnetických částic) nebo odstranění krátkých fragmentů, které mohou komplikovat long-read sekvenování (např. pomocí Short Read Eliminator kitů od Circulomics). V dalším kroku se pak připojí adaptory, provede se samotné sekvenování a získaná data se analyzují pomocí speciálního softwaru.

NGS v současnosti hraje významnou roli ve všech odvětvích genetického výzkumu. Ať už se jedná o *de novo* sekvenování nových druhů, celogenomové sekvenování, sekvenování vybraných genetických panelů v diagnostice nebo třeba RNA sekvenování, ve všech těchto aplikacích si NGS našlo svoje místo a pomáhá odhalovat nové poznatky.

Obr. 11 Obecný postup přípravy knihoven pro next-gen sekvenování



Spectrum Compact CE

Jak už název napovídá, **Spectrum Compact CE System** je kompaktní a cenově dostupná kapilární elektroforéza pro Sangerovo sekvenování a fragmentační analýzu. Jedná se o otevřenou platformu, která je kompatibilní s běžně používanými sekvenačními kity, jako je BigDye Terminator 3.1 a **ProDye**, a s čtyř až šestibarevnými STR kity. Dále lze využít například pro analýzu mikrosatelitů, SNP genotypování, ověření výsledků NGS, detekci mutací a mnoho dalších.

Přístroj disponuje šestibarevnou detekcí a sadou čtyř separačních kapilár o délce 36 cm. Kapacita přístroje je 32 vzorků a pojme čtyři osmizkumavkové stripy. K separaci přístroj využívá dva typy polymerů. Polymer4 je určen pro fragmentační analýzu a Polymer7 pro sekvenování. S určitým kompromisem lze ale oba typy analýz provádět na sekvenačním Polymeru7. Pro snadnou obsluhu přístroje jsou k dispozici jednoduše vyměnitelné předplněné cartridge s pufrů a polymerů. Dostupné je i běžné příslušenství jako jsou destičky, stripy zkumavek nebo septa. Spotřební materiál lze měnit jednotlivě (polymery, pufrů, kapiláry) a není součástí jedné integrované cartridge jako u konkurenčních přístrojů.

Stav veškerého spotřebního materiálu lze sledovat pomocí 2D čárových kódů. Pokud dojde k expiraci spotřebního materiálu, přístroj vás na to pouze upozorní, ale je možné nadále měřit. Pouze při spotřebování separačního polymeru vám Spectrum neumožní spustit analýzu.

Přístroj lze jednoduše ovládat pomocí integrovaného počítače s dotykovou obrazovkou, na kterém lze sledovat i průběh aktuálního běhu, stav spotřebního materiálu a výsledky hotových měření. Kromě toho lze Spectrum ovládat i z PC, které je připojené přímo k přístroji nebo do stejné lokální sítě. Samozřejmě je export dat ve formátu .fsa nebo .ab1 kompatibilní s běžně používanými analytickými softwary.

Základní specifikace přístroje:

- 4 separační kapiláry délky 36 cm
- 6 barevných kanálů pro detekci
- Kapacita 32 vzorků (4 osmizkumavkové stripy)
- Možnost individuální výměny spotřebního materiálu, měřit lze i s expirovaným materiálem
- Maximální délka čtení 900 bp, rozlišení 1 bp
- Doba běhu fragmentační analýzy 45 min, sekvenování 30 nebo 60 min (rychlý nebo standardní režim)

Obr. 12 Kapilární sekvenátor Spectrum Compact CE od firmy Promega



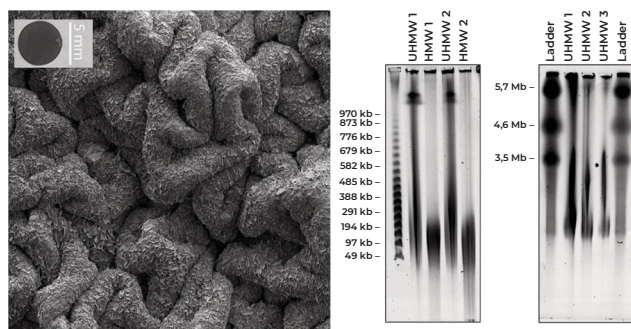
ProDye™ Terminator – nový kit pro Sangerovo sekvenování od Promegy

ProDye™ Terminator Sequencing System je novou vylepšenou a levnější metodou pro fluorescenční Sangerovo sekvenování, která používá master mix s proprietární termostabilní DNA polymerázou firmy Promega. ProDye obsahuje stejnou sadu fluorescenčních barviv jako BigDye Terminator 3.1 (dTMR, dCXR, dRSixG, dROneTen) a je tak plně kompatibilní se všemi běžnými genetickými analyzátoři od Promegy, Applied Biosystems i Thermo. Kit obsahuje 2,5× koncentrovaný master mix, 5× sekvenační pufr a k tomu značné množství nuclease-free vody pro dodatečné naředění. Reakce je možné provádět i s více zředěným master mixem, ale je nutné si optimalizovat objemy jednotlivých složek.

Kat. č.	Název	Velikost balení
CR4324	ProDye™ Terminator Sequencing System	24 reakcí
CR4302	ProDye™ Terminator Sequencing System	200 reakcí
CR4310	ProDye™ Terminator Sequencing System	1 000 reakcí

Circulomics – izolace a purifikace DNA pro long-read sekvenování

Circulomics je startup z amerického Bostonu, který vyvinul velmi efektivní kity na izolaci a přečištění HMW DNA pro long-read sekvenování na platformách Pacific Bio a Oxford NanoPore. Jejich portfolio tvoří hlavně dvě skupiny produktů – tzv. Short Read Eliminator (SRE) kity pro odstranění krátkých fragmentů DNA a NanoBind kity pro izolaci HMW a UHMW DNA.



Obr. 13 Vlevo snímek povrchu magnetického disku z elektronového mikroskopu. Vpravo DNA izolovaná pomocí Nanobind kity a následně separovaná pomocí agarózové gelové elektroforézy.

NanoBind Big DNA kity

NanoBind kity od Circulomics jsou určené pro šetrnou izolaci HMW DNA o velikosti 50 kb a více a UHMW DNA velikosti v jednotkách Mb z různých typů vzorků. Kromě klasické genomové DNA lze izolovat i RNA nebo plazmidy z větších objemů. Nanobind kity používají pro izolaci termoplastické disky, které jsou pokryté mikro a nanostrukturovanou křemičitou vrstvou (obr. 13). Ta zajišťuje velmi velký povrch s vysokou vazebnou kapacitou a snadnou eluci s minimálním poškozením. Získaná DNA má bezkonkurenční čistotu a izolace má velmi vysokou výtěžnost. V závislosti na vstupním množství vzorku lze získat 5–100+ µg HMW DNA. Celá izolace je velmi jednoduchá a rychlá a zahrnuje jen několik základních kroků – vazbu DNA na disk, promytí a eluci. Manuální extrakce zabere necelých 60 minut, případně lze použít i variantu pro „high-throughput“ izolace na automatických platformách KingFisher, která zabere jen 40 minut.

Posledním přídavkem do portfolia Circulomics je Nanobind UL Library Prep Kit, který je určený pouze pro platformy Oxford Nanopore. Jedná se o kit, který izoluje nejdelší DNA a díky optimalizovanému složení snižuje viskozitu izolované DNA a maximalizuje „throughput“ a množství získaných sekvenačních dat. S tímto kitem byl pokořen rekord délky čtené DNA 4,1 Mb. Kit je nutné použít v kombinaci s Nanobind kitem pro příslušný typ vzorku a Ultra-Long DNA Sequencing Kit (SQK-ULK001) od Oxford Nanopore.

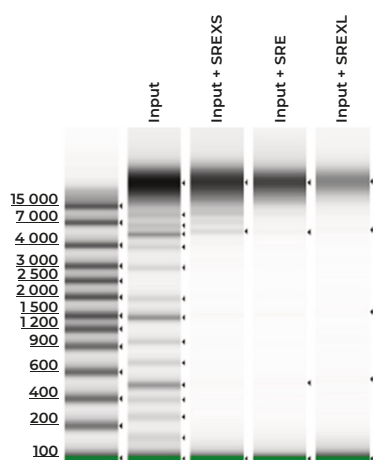
Kat. č.	Název	Vhodné pro	Velikost balení
SKU NB-9 00-001-01	Nanobind CBB Big DNA Kit	Buněčné kultury, bakterie, krev	20 izolací
SKU NB-9 00-801-01	Nanobind Plant Nuclei Big DNA Kit	DNA z rostlinných jader	20 izolací
SKU NB-9 00-701-01	Nanobind Tissue Big DNA Kit	Živočišné tkáně	20 izolací
SKU NB-8 00-001-01	Nanobind KF CBB Big DNA Kit 24	Buněčné kultury, bakterie, krev – KingFisher	24 izolací
SKU NB-8 00-001-02	Nanobind KF CBB Big DNA Kit 96	Buněčné kultury, bakterie, krev – KingFisher	96 izolací
SKU NB-9 00-601-01	Nanobind UL Library Prep Kit	Ultra-Long sekvenování – NanoPore	20 vzorků

Short Read Eliminator

Jak už bylo zmíněno, SRE kity slouží k odstranění nežádoucích krátkých fragmentů DNA a tím i k významnému zlepšení průměrné délky čtení N50 o 10–30 kb v závislosti na kvalitě vstupní DNA. Fragmenty jsou odstraněny pomocí selektivní precipitace, ke které potřebujete jen pipetu a centrifugu schopnou dosáhnout 10 000 g. Celá purifikace je velmi jednoduchá, zahrnuje jen několik pipetovacích kroků a centrifugací a zabere cca 60 minut. SRE kit je dostupný ve třech verzích, které se liší cutoffem velikosti odstraněné DNA a výtěžností (viz Tabulka 4).

Tabulka 4 Srovnání jednotlivých Short Read Eliminator kitů

Název	Rozsah deplece DNA	Koncentrace vstupní DNA	Zpětná výtěžnost DNA (recovery)	Vzorek
SRE XS	Progresivní: < 10 kb Téměř úplná: < 5 kb	25–150 ng/μl	50–90 %	Vhodné pro fragmentované vzorky
SRE Standard	Progresivní: < 25 kb Téměř úplná: < 10 kb	50–150 ng/μl	50–70 %	Vyžaduje kvalitní HMW DNA (> 48 kb)
SRE XL	Progresivní: < 40 kb Téměř úplná: < 10 kb	50–150 ng/μl	40–50 %	Vyžaduje kvalitní HMW DNA (> 48 kb)

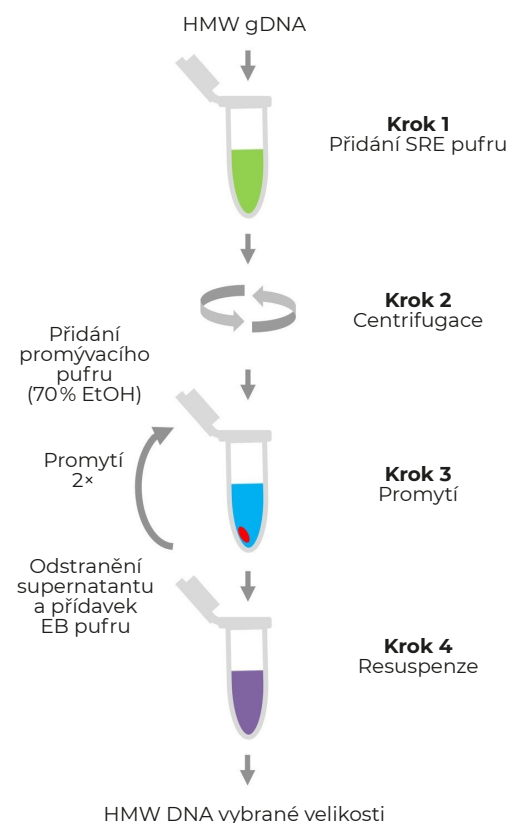


Obr. 14 Srovnání deplece krátkých fragmentů pomocí jednotlivých SRE kitů od Circulomics.

Wizard® HMW DNA Extraction Kit – Izolace HMW DNA pro sekvenování

Long-Read-Sequencing (Nanopore, PacBio, 10× Genomics) řeší náročné problémy v genomice. Potřebuje ale delší templátovou DNA, než jakou produkuje standardní izolační metody. Pomocí Wizard® HMW DNA kitu od Promegy můžete jednoduše izolovat dlouhé řetězce DNA o velikosti až 500 kb z živočišných, rostlinných i mikrobiálních vzorků. Celá izolace zabere jen 90 minut a nevyžaduje žádné speciální laboratorní vybavení. Purifikovaná DNA se osvědčila při Nanopore i PacBio sekvenování. Vysoké hodnoty N50 a mnoho dlouhých readů s maximem přes 400 kb ukazují, že tento kit si zaslouží šanci zařadit se do vašeho sekvenačního workflow.

Kat. č.	Název	Velikost balení
A2920	Wizard® HMW DNA Extraction Kit	50 izolací

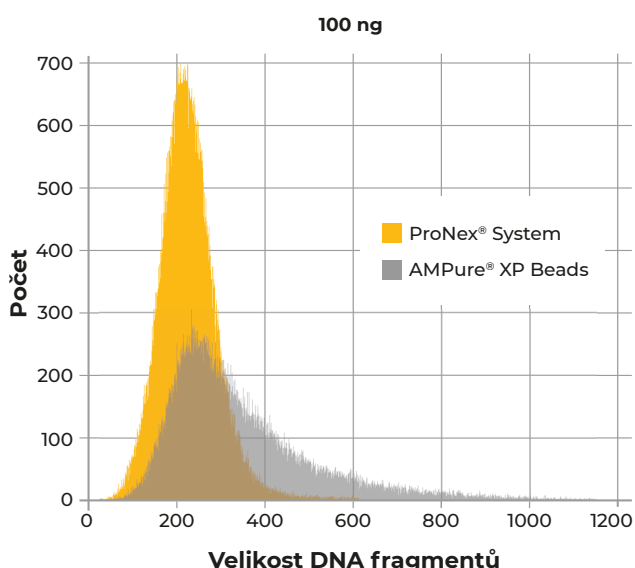


Obr. 15 Postup přečištění DNA pomocí SRE kitu od Circulomics. Během jedné hodiny lze jen s pomocí centrifugy zpracovat až 20 vzorků.

ProNex® Size-Selective Purification System

Systém pro selektivní purifikaci ProNex® umožňuje rychlé a účinné přečištění dsDNA pomocí magnetických částic a je ideální pro NGS, PCR i další molekulárně biologické aplikace. Systém ProNex® umožňuje vybrat požadovanou velikost purifikovaných fragmentů v rozsahu od 100 bp do 750 bp. Díky novému složení poskytuje významně lepší selektivitu, reprodukovatelnost a výtěžek ve srovnání s tradičními způsoby přečištění dsDNA. Oproti konkurenci má ProNex® systém nižší viskozitu a lepší magnetickou odezvu. Nižší viskozita snižuje ztráty DNA při pipetování, protože nedochází k ulpívání roztoku s izolovanou DNA na stěnách špiček. Lepší magnetická odezva zase zkracuje dobu izolace, protože částice jsou během promývání rychleji přitaženy k magnetickému stojánku. Systém ProNex® lze použít pro manuální i automatizovanou high-throughput purifikaci.

Kat. č.	Název	Velikost balení
NG2001	ProNex® Size-Selective Purification Systém	10 ml
NG2002	ProNex® Size-Selective Purification Systém	125 ml
NG2003	ProNex® Size-Selective Purification Systém	500 ml



Obr. 16 Srovnání distribuce velikosti fragmentů po přečištění vzorků pomocí ProNex® systému a AMPure® XP magnetických částic. Vstupní množství DNA bylo 100 ng.

RNA sekvenování

RNA sekvenování (RNA-seq) je technika, která využívá sekvenování nové generace (NGS) ke studiu neustále se měnícího transkriptomu. RNA-seq umožňuje sledovat mimo jiné alternativní sestřih genů, post-translační modifikace, fúzi genů, mutace, SNP nebo změny v genové expresi v závislosti na čase nebo treatmentu. Díky velkému rozvoji NGS se RNA-seq stalo nejčastěji používaným nástrojem pro studium diferenciální genové exprese (DGE). Díky svému všestrannému použití bez nutnosti druhově nebo transkripčně specifických sond postupně nahrazuje i dříve často používané mikročipové arraye. Základní kroky DGE se od svých počátku příliš nezměnily. Standardní protokoly začínají izolací celkové RNA následované mRNA enrichmentem nebo ribozomální deplecí a fragmentací izolované RNA. V dalších krocích je RNA transkribována do cDNA, připojí se adaptory pro sekvenování a výsledný produkt je amplifikován pomocí PCR. Ve finále jsou vybrány fragmenty o specifické velikosti a vzorek je sekvenován. Nejčastěji využívané jsou short-read sekvenátory (Illumina, Ion Torrent), které umožňují citlivé a robustní sekvenování krátkých fragmentů do velikosti 200 bp.

Alternativním postupem, který je vhodný zejména pro sledování alternativního sestřihu genů a izoforem, je long-read sekvenování na platformách PacBio a Oxford Nanopore. Ty nevyžadují některé kroky při přípravě vzorku, jako je fragmentace RNA nebo výběr velikosti cDNA. Odstraňují tak některá zkrácení běžná pro short-read sekvenátory. Limit velikosti sekvenované cDNA je také výrazně vyšší až 15 kb. Oxford Nanopore sekvenátory lze navíc použít i pro přímé long-read sekvenování RNA bez nutnosti cDNA syntézy a amplifikace. Takovými postupy lze dosáhnout čtecí délky v rozsahu 1–10 kb a mají velký potenciál pro sledování modifikací RNA a epitranskriptomiku. Long-read sekvenování má samozřejmě ale i své limity. Mezi hlavní nevýhody patří zejména nižší propustnost (throughput) a vyšší chybovost při čtení. Přístroje také vyžadují vyšší kvalitu vstupní RNA a tedy šetrnější postupy při izolaci a zpracování RNA. Obě metody tak mají svá pro i proti. Přestože short-read sekvenování aktuálně na poli RNA-seq dominuje, v budoucnu se kombinace obou technik díky své vzájemné komplementaritě bezpochyby stane součástí komplexních metod pro charakterizaci transkriptomu.

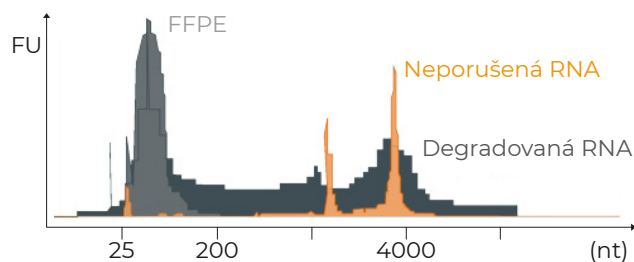
riboPOOLs – nejflexibilnější řešení pro ribozomální depleci

Jedním z důležitých kroků při sekvenování RNA je bezpochyby izolace RNA a následné odstranění kontaminující ribozomální rRNA. Ta většinou tvoří 80–90 % transkriptomu a její účinné odstranění je kritické pro získání kvalitních dat. Nejčastěji se používají dva základní přístupy pro eliminaci rRNA – mRNA obohacení pomocí magnetických částic s poly(dT) oligonukleotidy na povrchu a ribozomální deplece.

Příkladem prvního přístupu je **PolyATtract® mRNA Isolation Systems** od společnosti Promega. Ten využívá oligo(dT) primery, které hybridizují s poly(A) koncem mRNA, a na druhém konci mají připojený biotin. Přes ten se pak oligonukleotid s mRNA naváže na magnetické částice funkcionalizované streptavidinem. Pomocí magnetického stojánku se částice s mRNA vytáhnou z roztoku, důkladně promyjí a izolovaná mRNA se následně eluuje jednoduchým přidáním deionizované vody. Výhodou této metody je bezpochyby jednoduchost, cena a univerzální použití. Pro běžné studium rozdílů v genové expresi je dostačující. Pokud vás ale zajímají i jiné druhy RNA, které nemají poly(A) konec, je potřeba zvolit jiný přístup.

Kat. č.	Název	Velikost balení
Z5210	PolyATtract® mRNA Isolation Systems	3 izolace
Z5310	PolyATtract® mRNA Isolation Systems	15 izolací

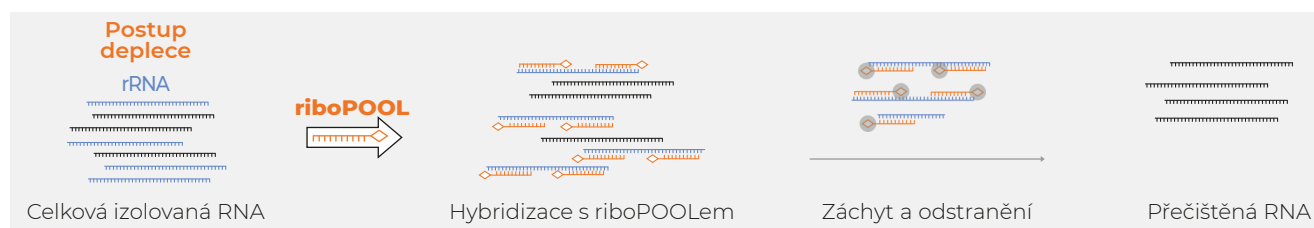
Ribozomální deplece využívá stejného separačního principu jako mRNA obohacení, ale cílí na rRNA. Biotinylované oligonukleotidy mají tentokrát sekvence, které specificky hybridizují s rRNA jednotlivých ribozomálních podjednotek. Po vazbě na rRNA se oligo-rRNA komplex zachytí na streptavidinové kolonce nebo magnetických částicích a ostatní RNA zůstane v roztoku. Výhodou tohoto přístupu je, že lze použít i pro analýzu RNA bez poly(A) konce, což zahrnuje nekódující RNA, histonovou RNA a prokaryotickou RNA, s uniformním pokrytím. Příkladem takového přístupu jsou **riboPOOLs**, komplexní pooly biotinylovaných oligonu-



Obr. 17 Data z přístroje Bioanalyzer ukazující poměr degradované a intaktní RNA izolované z FFPE vzorku.

kleotidů pro ribozomální depleci od německé firmy siTOOLS. Ribopooly jsou založeny na unikátní technologii nazvané Pack Hunter Approach (lov ve smečce), kdy jsou pro odstranění rRNA využívány komplexní pooly 60-350 oligonukleotidů, které pokrývají celé sekvence rRNA jednotlivých podjednotek. Díky vysokému počtu různých sekvencí lze výrazně snížit koncentraci jednotlivých oligonukleotidů ve směsi a minimalizovat tak nespecifickou vazbu, která je běžná při použití menšího počtu oligonukleotidů o vysoké koncentraci. Tento přístup zajišťuje robustní purifikaci s vysokou specifitou a účinností odstranění >95 %. Celá purifikace je i velmi rychlá a zabere pouhých 70 minut. Ribopooly jsou na konci výroby purifikovány pomocí HPLC, aby byla zajištěna maximální čistota.

Vzhledem k rozdílům ve struktuře rRNA mezi jednotlivými skupinami organismů není možné použít jeden kit univerzálně na všechny druhy. Nabídka kitů už je ale poměrně široká a neustále se rozšiřuje. Dostupné jsou jak druhově specifické kity pro běžně používané modelové organismy, tak i pro celé skupiny organismů. Druhově specifické pooly jsou navrženy tak, že cílí na konzervované i nekonzervované oblasti rRNA, a dosahují nejvyšší účinnosti deplece (až 99 %). Pan-riboPOOLy pro skupiny organismů jsou pak ideální volbou pro jednoduché multitranskriptomické studie, případně pokud pracujete s více druhy ze stejné fylogenetické skupiny (bakterie, houby, savci aj.). Ribopooly je možné i kombinovat a použít je pro analýzu smíšených vzorků (nakažená tkáň, krev, environmentální vzorky). Také je možné využít speciální kity pro analýzu degradovaných vzorků izolovaných z FFPE. Díky překrývajícím se oligonukleotidům, které pokrývají celou sekvenci rRNA, lze velmi účinně odstranit degradované fragmenty rRNA a vytěžit ze vzorku zbývající intaktní RNA. Kompletní seznam dostupných kitů je uveden v tabulce 5.



Obr. 18 Princip odstranění ribozomální RNA pomocí ribopoolů od firmy siTOOLS.

Tabulka 5 Přehled aktuálně dostupných riboPOOLů pro depleci ribozomální RNA

Pan-riboPOOLS	
Název	Vhodné pro
Pan-Prokaryote riboPOOL	Bakterie a Archea
Pan-Bacteria riboPOOL	Bakterie
Pan-Actinobacteria riboPOOL	Aktinobakterie, G+ a G- bakterie
Pan-Archaea riboPOOL	Archea
Pan-Plant riboPOOL	Rostliny
Pan-Bird riboPOOL	Ptáci
Pan-Mammal riboPOOL	Savci
Pan-Sponge riboPOOL	Houbovci
Pan-Fungi riboPOOL	Houby
Filamentous-Fungi riboPOOL	Vláknité houby
Seawater riboPOOL	
Blood Parasite riboPOOL	
Druhově specifické riboPOOLy	
Bakterie	Členovci (Arthropoda)
Bacillus subtilis	Aedes albopictus
Caulobacter crescentus	Apis mellifera
Clostridium perfringens	Argiope bruennichi
Escherichia coli	Drosophila melanogaster
Pseudomonas aeruginosa	Ixodes scapular
Salmonella enterica	Leptinotarsa decemlineata
Staphylococcus aureus	Plautia stali
Stenotrophomonas sp.	Ploštenci (Platyhelminthes)
Archea	Schmidtea mediterranea
Haloferax volcanii	Měkkýši (Mollusca)
Rostliny	Crassostrea gigas
Arabidopsis thaliana	Loripes orbiculatus and
Oryza sativa	Lucinoma aequizonata (Clamps)
Obratlovci	Řasy
Chinchilla lanigera	Chlamydomonas reinhardtii
Gallus gallus domesticus	Cyanidioschyzon merolae
Homo sapiens sapiens	Emiliana huxleyi
Mus musculus / R. norvegicus	Ostatní
Houbovci (Porifera)	human Globin mRNA
Amphimedon queenslandica	SARS-CoV-2 RNA
Houby	FFPE/degradované vzorky
Saccharomyces cerevisiae	human
Filamentous-Fungi	human-mouse-rat
Pichia pastoris	mouse-rat
Ustilago maydis	Cernohobitis elegans
Schizosaccharomyces pombe	Drosophila melanogaster
Bezelebeční (Cephalochordata)	
Danio rerio	

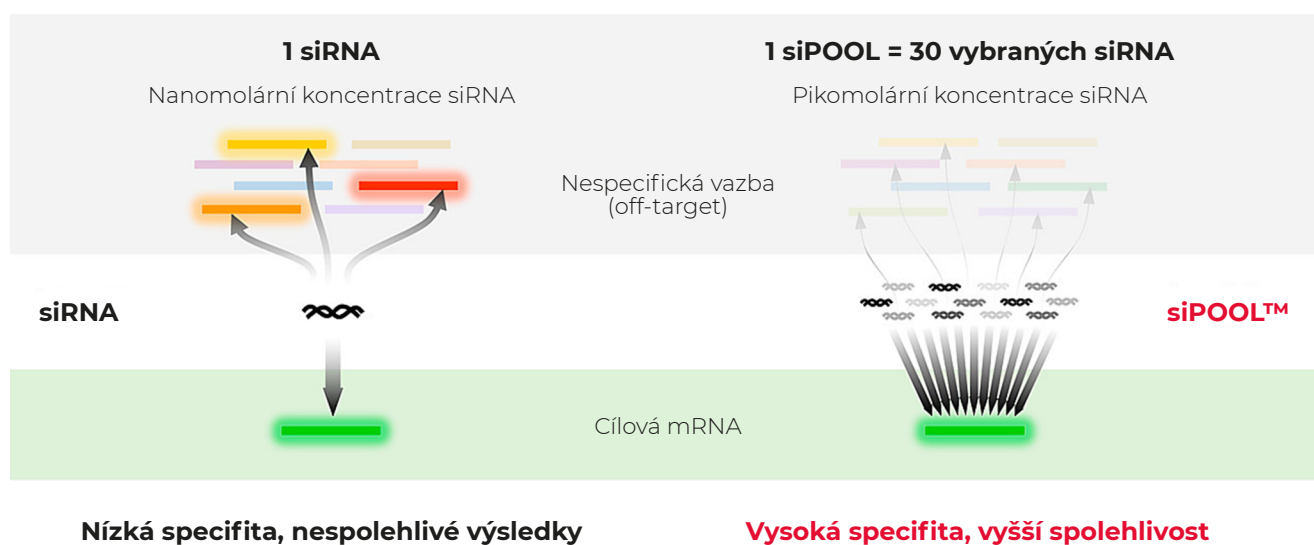
siPOOLs – komplexní pooly siRNA pro spolehlivé vyřazení genů

RNA interference (RNAi) je proces, při kterém interferují nekódující molekuly RNA (siRNA, miRNA) s cílovými úseky mRNA a v důsledku této vazby dochází k zabránění genové exprese. Jedná se o běžný jev v eukaryotických buňkách, který se experimentální biologové naučili využívat k cílenému vyřazování genů. RNAi má několik výhod. Jedná se o jednoduchou metodu, která může dosahovat vysoké účinnosti a lze snadno použít pro různé typy buněk. Během experimentů stačí jednoduše transfekovat siRNA do buněk pomocí běžných lipofekčních činidel (např. Fugene HD). Běžně používané reagenty pro RNAi většinou obsahují 1–4 různé sekvenční siRNA cílící na jeden gen v poměrně vysoké nM koncentraci. Pokud jsou jednotlivé siRNA v příliš vysoké koncentraci, může dojít k nespecifické vazbě a nežádoucím off-target efektům. Často také poskytují proměnlivou

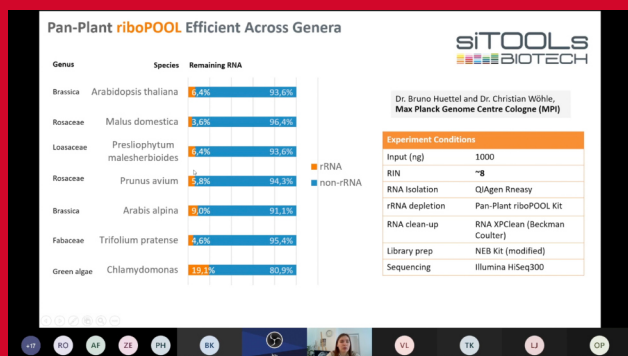
účinnost, což omezuje jejich použitelnost v experimentech.

Tyto off-target efekty řeší siPOOLy stejným „Pack Hunter“ přístupem, jako v případě riboPOOLů. Jedná se o komplexní pooly 30 siRNA, které jsou zředěny na takovou koncentraci, při které nedochází ke stimulaci fenotypů a opravdu jen k vyřazení cílového genu. Sekvence jednotlivých siRNA v poolu jsou optimalizovány pomocí speciálních algoritmů, aby maximálně pokrývaly sekvenční transkript a účinně hybridizovaly a jsou také filtrovány proti paralogům a umožňují velice účinné a specifické tlumení genů (Hannus et al., 2014). siPOOLy lze použít proti kódujícím RNA i dlouhým nekódujícím RNA, vybraným isoformám nebo blízké příbuzným genům a mohou být použity i v kombinaci ke studiu synergických interakcí genů (Welsbie et al., 2017). Pro objednání siPOOLu pro požadovaný transkript nám stačí jednoduše zaslat název genu a jeho ID v databázi NCBI a my Vás obratem budeme kontaktovat. Vyzkoušejte jednoduchý, robustní a účinný knockout genů německé kvality!

Obr. 19 Srovnání běžných siRNA s komplexními siPOOLy od firmy siTOOLS.



Seminář / webinář šitý na míru pro váš tým



Máte zájem o naše produkty, ale nemáte dostatek zkušeností pro jejich implementaci do praxe, nebo by vás zajímaly jen novinky z oboru? Přesně pro vás jsou určeny semináře / webináře na míru. Je možné zahrnout informace i o výrobcích našich dalších dodavatelů. Seminář připraví náš aplikační specialista, možné je domluvit i účast odborníků přímo z řad našich dovedů, kteří se podílejí na výrobě těchto produktů. Takovýchto seminářů jsme od roku 2020, kdy jsme ten-

to program spustili, uspořádali už desítky, jak na akademických institucích, tak v soukromých firmách.

- bezplatný online seminář jen pro vaši vědeckou skupinu
- obsah, který si zvolíte sami
- privátní atmosféra k projednání jednotlivých otázek a problémů
- poradenství při plánování nadcházejících experimentů

Sleva 10 % na nákup genomických produktů z našeho e-shopu

Všechny produkty z této brožury naleznete také na našich webových stránkách www.eastport.cz. Najdete tam také další zajímavé články a novinky, pravidelné semináře a akce, kontakty na naše aplikační specialisty, ale také více než 8000 produktů v našem e-shopu. Díky této brožuře navíc, získáváte 10 % slevu na první nákup genomických produktů z této brožury. Stačí ve vašem košíku zadat promo kód:

genomickabrozura

a sleva se vám automaticky započítá. Akce se nevztahuje na přístrojovou techniku. Pokud, nemáte možnost přímého nakupování přes náš e-shop, přečtete si článek vpravo, který vám popíše novou možnost nakupování u nás.

Ještě stále si o nabídky píšete e-mailem?

Někteří naši zákazníci se na nás obraceli s tím, že nemají možnost přímého objednávání zboží z našeho e-shopu. Přesně pro ně jsme vytvořili zcela novou možnost generování nabídek. Pokud už vás nebaví si o každou nabídku psát emailem, pak pro vás máme řešení! Jednoduše se přihlásíte do svého účtu a vložíte si zboží do košíku, přesně tak jako kdybyste ho nakupovali přes e-shop. Po výběru zboží přejdete do košíku a kliknete na tlačítko „**stáhnout obsah košíku jako nabídku do PDF**“ a je hotovo. Takto vytvořenou nabídku, můžete obratem zaslat třeba na vaše obchodní oddělení. Doufáme, že vám tato inovace usnadní nakupování u nás.



