

Whitepaper CRISPR-Assay Einstellung

Einziger Algorithmus zur Steuerung der Temperatur pro Zyklus für eine freundliche CRISPR-Assay-Einstellung

Die CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-verwandte Genom-Editing-Technologie hat sich in den letzten Jahren zur aufsehenerregendsten Innovation der Lifescience entwickelt. Mit diesen Systemen können Gene in lebenden Zellen und Organismen dauerhaft verändert werden und in Zukunft Korrekturen von Mutationen an genauen Stellen im menschlichen Genom ermöglichen, um genetische Krankheiten zu behandeln.

Während des gesamten Prozesses eines CRISPR-System-Assays und der nachgeschalteten Genom-Editierung ist die präzise Steuerung der Reaktionstemperatur ein entscheidendes Element für das erfolgreiche Ergebnis. Nicht nur die konstante Reaktionstemperatur sollte genau eingehalten werden, sondern auch die Abkühlungsrate. Zum Beispiel soll die Temperatur einer Reaktionsmischung auf 95°C erhitzt und dann mit einer Rate von 1°C/s auf 85°C abgekühlt werden, und anschließend weiter mit einer Rate von 0,3°C/s auf Raumtemperatur abgekühlt werden. Es bietet sich an, einen Thermocycler für die Temperierung des Assays zu verwenden.

Thermocycler sind so konstruiert, dass sie das Reaktionsgemisch auf eine bestimmte Temperatur aufheizen oder abkühlen und diese Temperatur für bestimmte Zeiträume konstant halten. Dies macht sie zum idealen Gerät für die

Temperaturkontrolle von Assays, die sorgfältig bedient werden müssen. Einige Thermocycler können speziell eingestellt werden, sodass sie mit einer langsameren Rate heizen oder kühlen, um den Anforderungen der oben genannten Aufgaben gerecht zu werden. Aufgrund der Tatsache, dass das Heizen oder Kühlen nicht mit einer konstanten Rate erfolgt (siehe Abbildung 1), ist es jedoch nicht einfach, die für die Aufgabe benötigten Raten genau zu definieren.

Nehmen Sie als Beispiel die Aufgabe zum Abkühlen von 85°C auf Raumtemperatur mit einer Abkühlrate von 0,3°C/sec. Indem Sie die Rate auf 0,3°C/sec einstellen, können Sie einfach einen 85°C-Schritt, gefolgt von einem 25°C-Schritt einrichten und laufen lassen. Die Abkühlungsrate Ihrer Reaktionsmischung kann am Anfang mehr als 0,3°C/sec und am Ende weniger als 0,3°C/sec betragen. Die andere Möglichkeit zur Steuerung des langsamen Rampings besteht darin, die Temperatureinstellung für einen bestimmten Schritt nach jedem Zyklus zu ändern.

Auf diese Weise können Sie zwar über die gesamte Dauer eine präzise Zeit- und Temperatursteuerungen erreichen, der Programmiervorgang kann jedoch etwas kompliziert sein. Sie müssen ein Programm konfigurieren, das zwei oder mehr Temperaturschritte enthält (so dass sich diese wiederholen oder zyklisch ablaufen) und dessen Temperatureinstellung nach jeder Wiederholung (Zyklus) ändern.

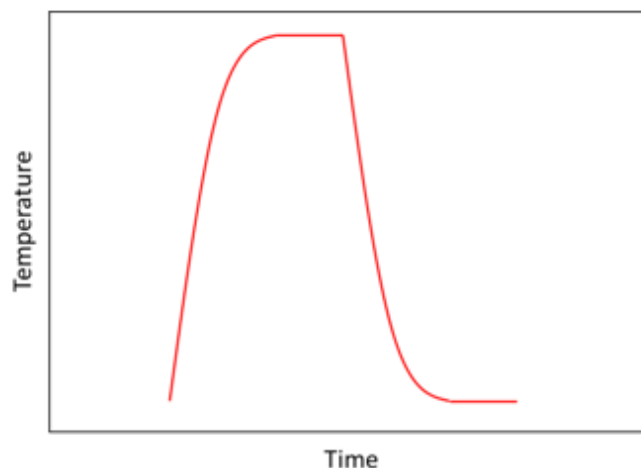


Figure 1. Typical ramping curve¹

Whitepaper CRISPR Assay Setting

Verwenden wir wieder das oben genannte Beispiel. Bei einer Reaktionsmischung von 85°C müssen Sie eine Einstellung von 84,7°C, 2 Sekunden und eine Einstellung von 84,1°C, 2 Sekunden vornehmen, außerdem eine Temperaturverringerung von -1,2°C/Zyklus und diese beiden Schritte 50 Mal wiederholen. Auf diese Weise erhalten Sie alle 2 Sekunden eine Abkühlung von genau -0,6°C. Wenn Sie einen sanfteren Temperaturwechsel wünschen, können Sie auch folgende Einstellung wählen: 84,7°C, 1

sek und 84,4°C, 1 sek, außerdem eine -0,6°C/Zyklus Temperaturabsenkung einstellen und diese beiden Schritte dann 100 Mal wiederholen. Die meisten Cycler haben eine Zykluszahlbegrenzung, so dass Sie eventuell weitere Temperaturschritte hinzufügen und die Zykluszahlen reduzieren müssen (siehe Tabelle 1). Sie müssen die Anzahl der Schritte, die Temperaturdifferenz zwischen jedem benachbarten Schritt, die Einstellung der Temperaturabsenkung pro Zyklus und die Zyklusnummern berücksichtigen.

Table 1

Repeat	Temperature	Hold Time
100 cycles, -0.6°C/cycle	84.7°C	1 sec
	84.4°C	1 sec

Repeat	Temperature	Hold Time
50 cycles, -1.2°C/cycle	84.7°C	1 sec
	84.4°C	1 sec
	84.1°C	1 sec
	83.8°C	1 sec

Der Thermocycler TurboCycler Lite von Blue-Ray Biotech bietet eine neue Option zur langsamen Temperatursteuerung.

Durch die Möglichkeit, einen einzelnen Temperaturschritt zu wiederholen, müssen Sie nur die Temperaturabnahme pro Zyklus einstellen, um die erforder-

liche Kühlrate zu erreichen, und diesen Schritt wiederholen, bis Sie die Endtemperatur erreichen. Wenn die benötigte Zykluszahl die Zykluszahlgrenze überschreitet (99 Zyklen bei TurboCycler Lite), fügen Sie einfach einen weiteren Wiederholungszyklus hinzu (siehe Tabelle 2).

Table 2

Repeat	Temperature	Hold time
99 cycles, -0.3°C/cycle	84.7°C	1 sec
99 cycles, -0.3°C/cycle	55°C	1 sec
2 cycles, -0.3°C/cycle	25.3°C	1 sec

Die verbesserte Temperatursteuerung macht den **TurboCycler Lite** zu einem idealen Gerät für CRISPR-bezogene Assays. Er ist außerdem mit einer Deckelheizung über den gesamten Temperaturbereich ausgestattet, was für die Verwendung als Inkubator für die Vorbehandlung von NGS-Proben und andere Experimente von Vorteil ist.

Schnell voranschreitende Entwicklungen in der Biotechnologie vereinfachen und beschleunigen die Arbeit in der Forschung. Als Mitglied der Life-Science-Community verspricht Blue-Ray Biotech, die innovativsten Laborgeräte zu entwickeln und den besten Service zu bieten, um Wissenschaftler bei der Erfüllung ihres Traums zu unterstützen.