



Optimización de experimentos para ddPCR

Sócrates Avilés Vázquez

Especialista de Aplicaciones LSG

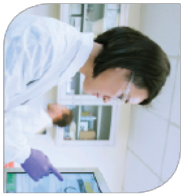
Bio-Rad México/Latinoamérica





Objetivo

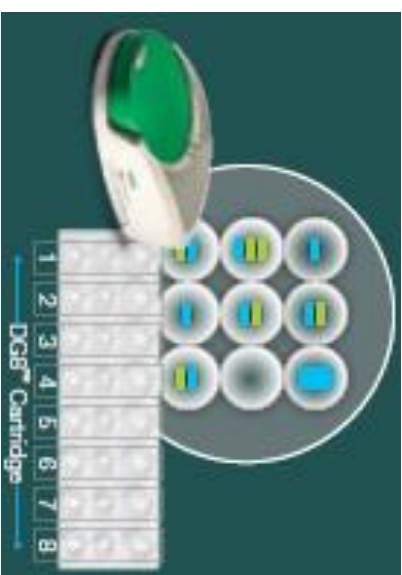
- Identificar los factores clave que determinan un experimento exitoso en ddPCR.



Flujo de trabajo



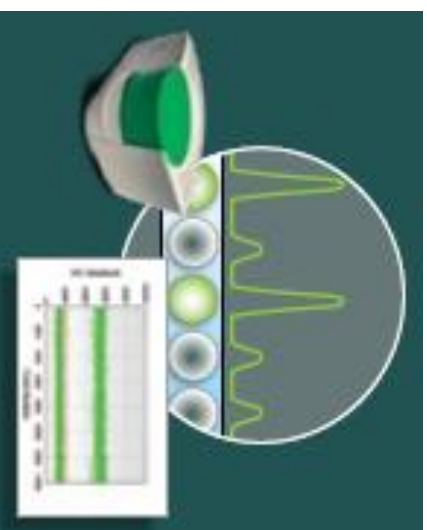
1. Preparación de la reacción



2. Formación de gotas



3. PCR en presencia de sondas o Eva Green

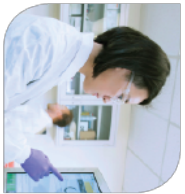


4. Lectura y análisis de datos



Consideraciones para ensayos de ddPCR

- Selección de la secuencia de interés
- Diseño de primers
- Diseño de sonda
- Preparación de la muestra
- Optimización de protocolo térmico



Selección de la secuencia de interés

- Longitud de producto entre 60 – 200 pb
- Evitar regiones con estructuras secundarias
- Evitar regiones con más de 4 repeticiones de una base
- Contenido de GC 50-60%



Diseño de sondas

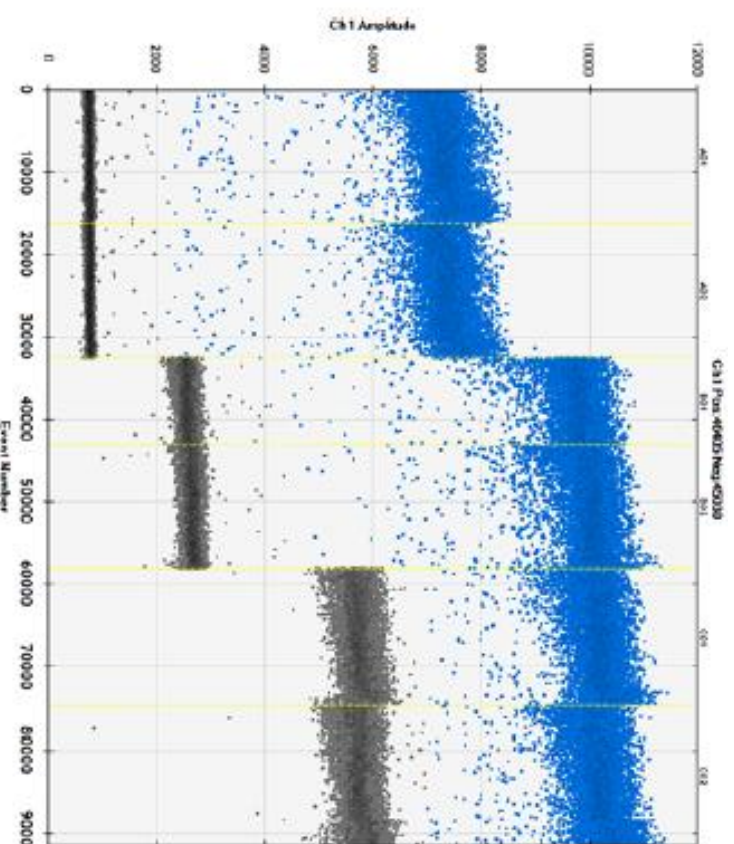
- Tamaño menor a 30 nucleótidos
- T_m 3-5°C mayor al de los primers
- Evitar G en el extremo 5'
- Contenido GC 30 – 80 %
- Se recomienda el uso de quencher “Black Hole” o no fluorescentes. Se pueden utilizar sondas ZEN (doble quencher) o MGB
- Fluoróforos compatibles con QX200: FAM, HEX y VIC



Diseño de sondas

- Las sondas deben estar acopladas a FAM o HEX/VIC
- Se sugiere el blanco con FAM; y la referencia con HEX/VIC
- El uso de Black hole quenchers son recomendados; Son mejores los double-quenched ZEN/IBFQ; No es recomendable el uso de TAMRA
- La concentración sugerida es 900nM primer / 250nM sonda
- SNP – 450nM cada primer / 250nM sonda

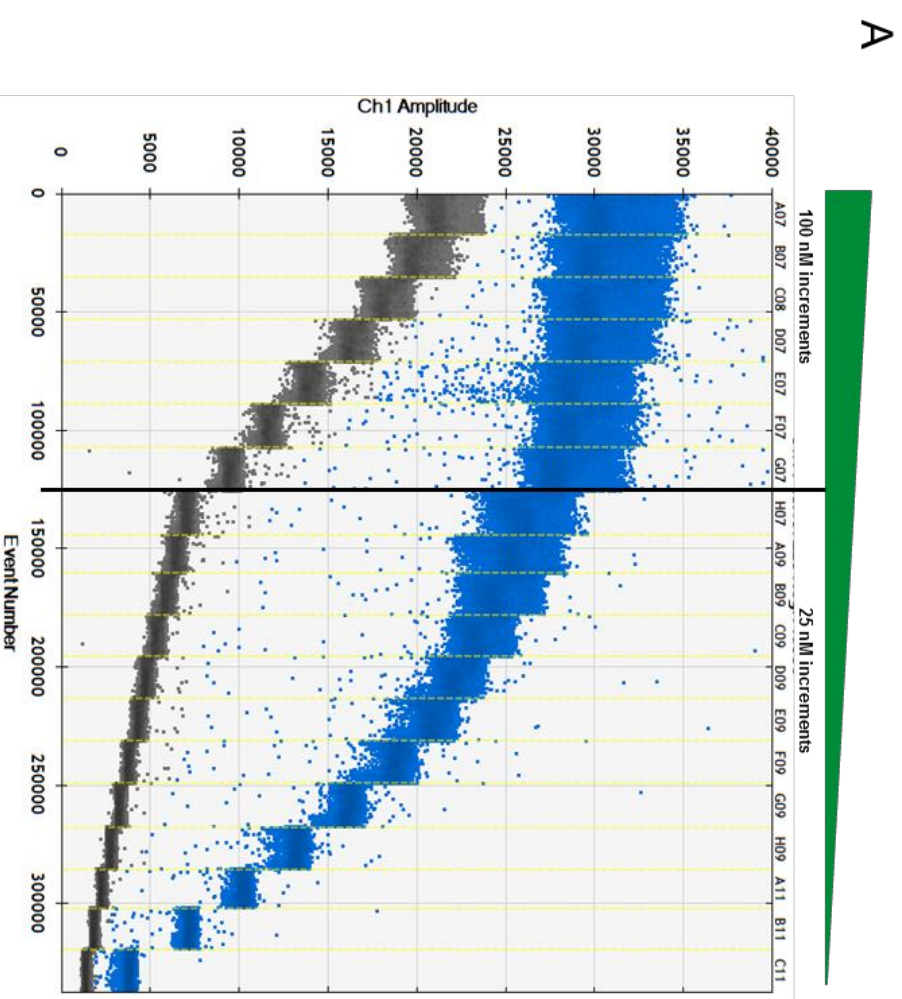
ZEN / Iowa Black Iowa Black BHQ1





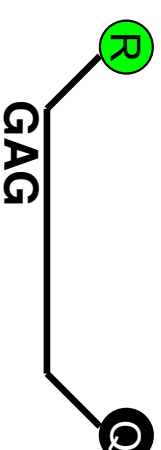
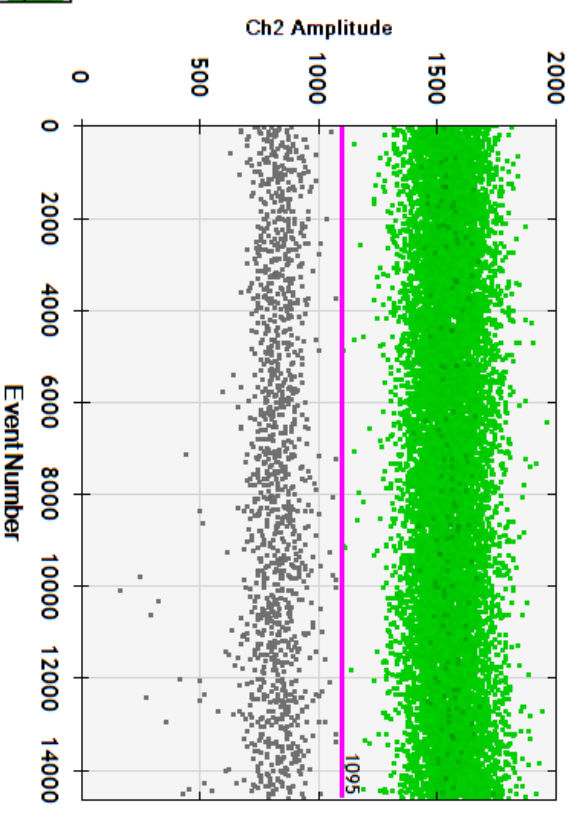
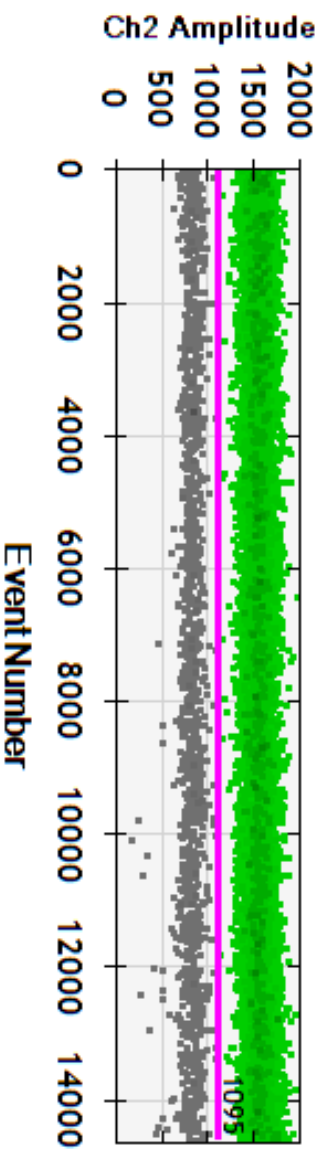
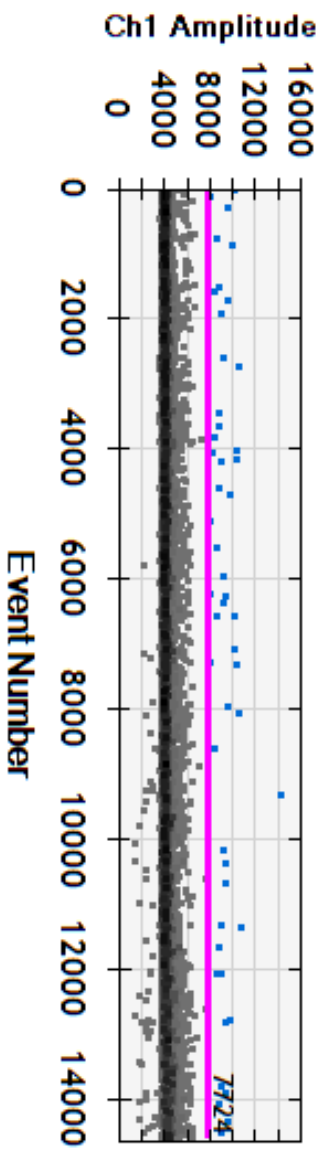
Química de Evagreen

- 100nM de cada primer
- La concentración de primer modifica la fluorescencia de fondo.
- Amplicones largos tendrán amplitudes de fluorescencia altas.





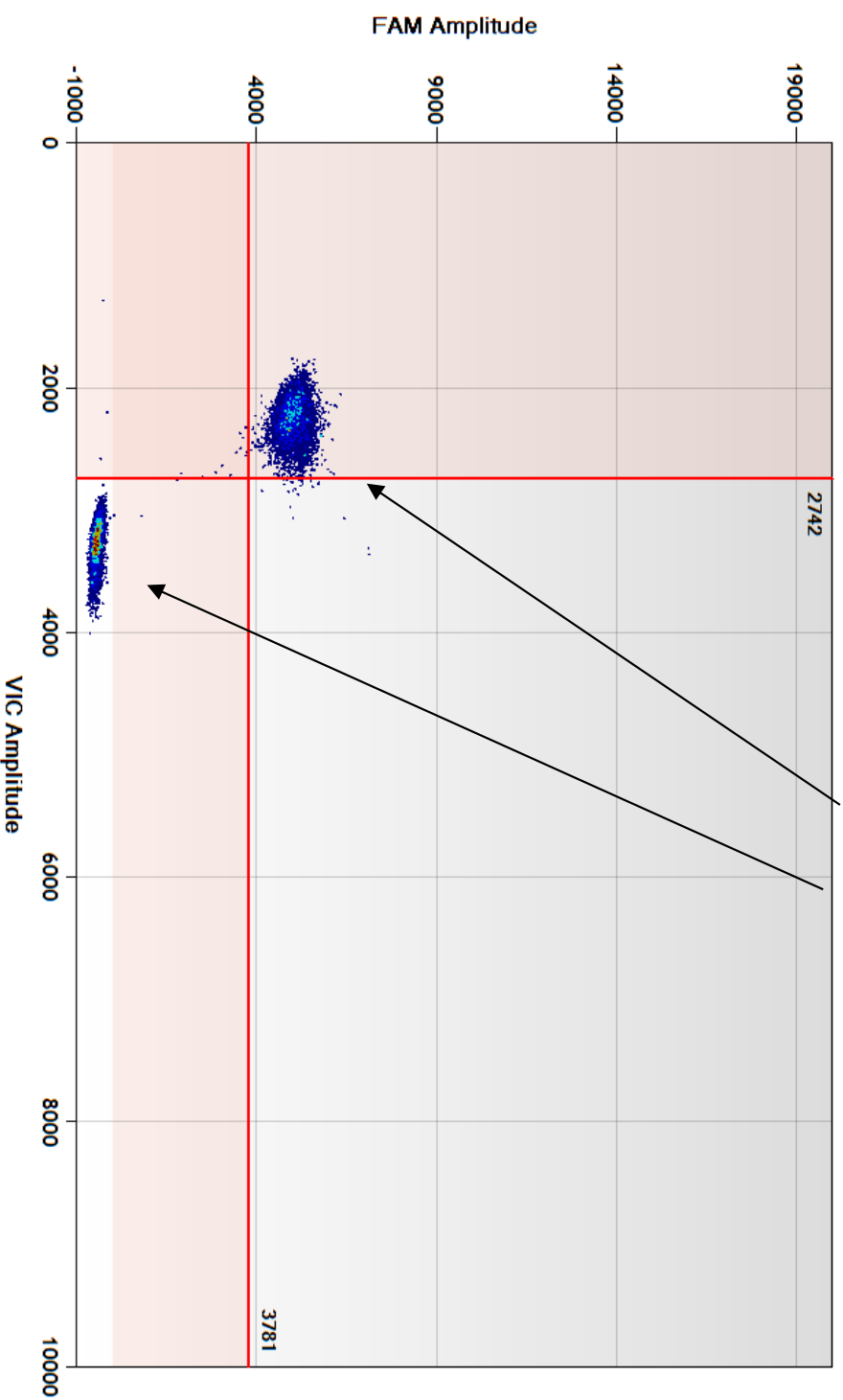
Diseño de la sonda





Efecto de utilizar TAMRA como quencher

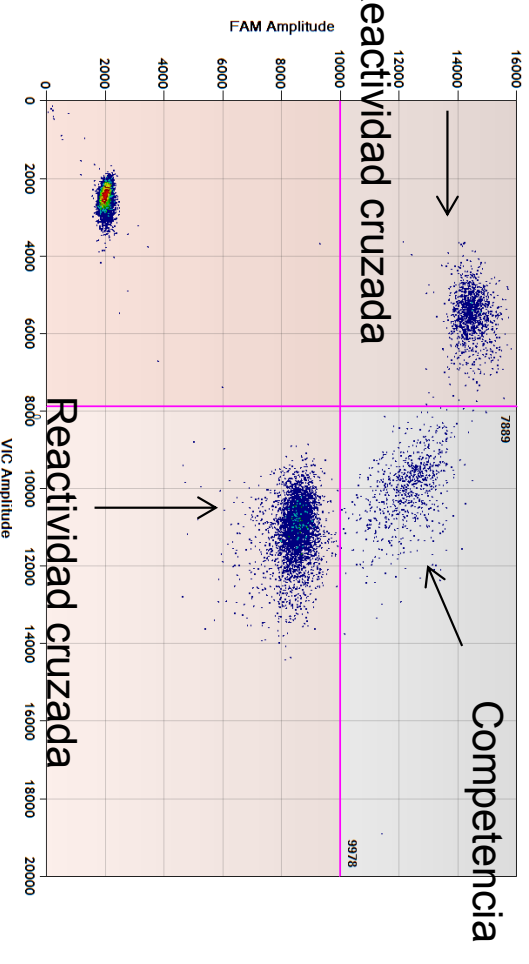
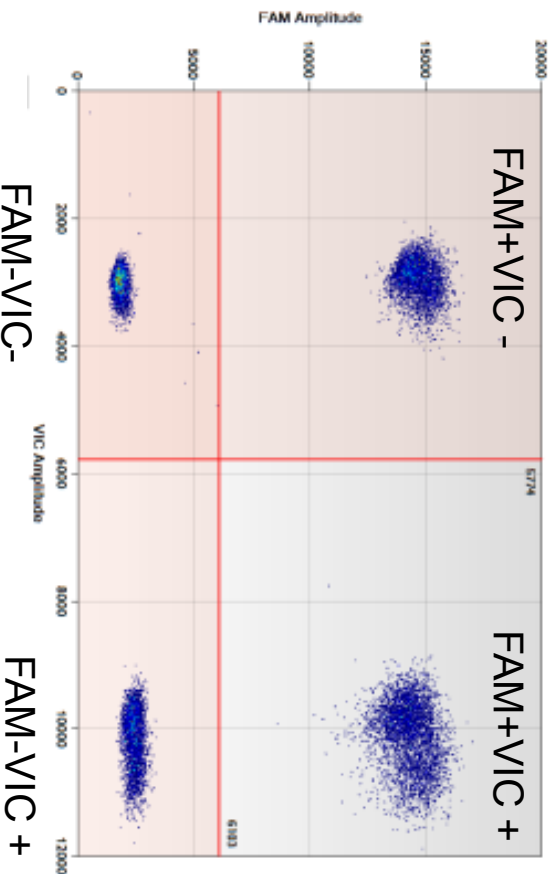
Desplazamiento de las gotas FAM +
con respecto a las negativas

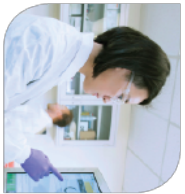




Reactividad cruzada entre sondas

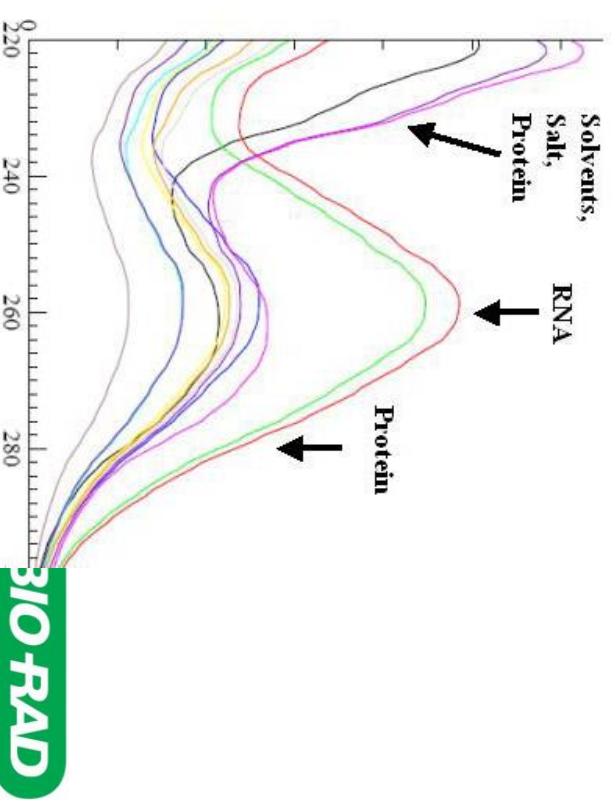
- Común en el diseño de sondas para SNPs
- Causa gotas doble positivas y disminución en la separación entre clusters
- Ensayo duplex esperado
- Ensayo duplex con reactividad cruzada y competencia entre sondas





Preparación de la muestra – Calidad

- No se recomienda el uso de lisados crudos
- Evaluación de la calidad e integridad del ácido nucleico
 - Espectrofotometría y Electroforesis
- Evitar grandes cantidades de inhibidores
 - Dilución 1:10 de la muestra

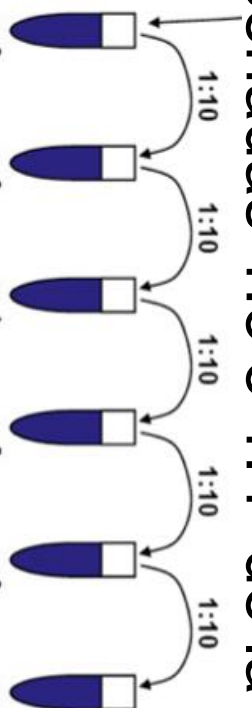




Preparación de la muestra – Cantidad

- El rango dinámico de la ddPCR es 1 – 100,000 copias por 20 μ L de reacción
- Si es sabido que la muestra tiene gran cantidad de la secuencia de interés = hacer diluciones
- Si se desconoce el número de copias del gen blanco por genoma:

– Diluciones seriadas 1:3 o 1:4 de la muestra





Determinación del número de copias por genoma

- Busque el tamaño del genoma de la muestra de interés
(<http://www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.php>)

- Determine la masa del genoma con la siguiente fórmula:

$$- m = n (1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp})$$

$$- m = \text{masa del genoma (g)}, n = \text{tamaño del genoma (pb)}$$

- Ejemplo:

– Genoma humano

$$- m = 3 \times 10^9 (1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp})$$

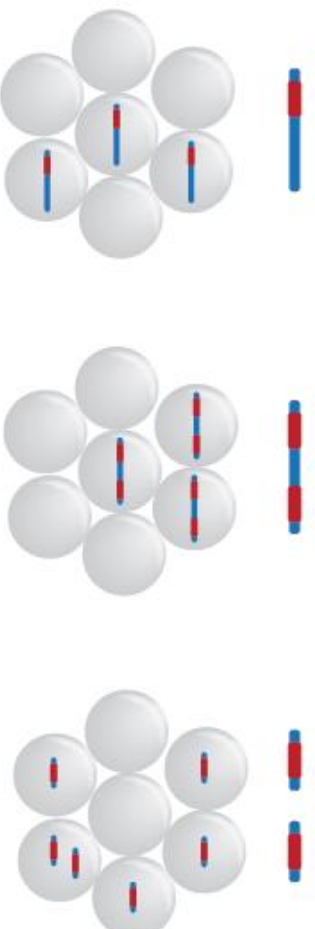
$$- m = 3.3 \times 10^{-12} \text{ g} = 3.3 \text{ pg}$$

15



Cantidad de DNA por muestra

- Se recomienda correr un máximo de 50ng/uL de DNA digerido o fragmentado (1ug/20uL de reacción)
- Si la muestra es DNA intacto y en concentración > 3 ng/uL (60ng/20uL de reacción): digerir
- Si realizará determinación de número de copias: digerir
- Si el DNA ya se encuentra fragmentado (muestras embebidas en parafina, alimentos procesados): no se requiere digestión





Digestion de DNA

Digestión de DNA recomendada para:

- Cantidades mayores a 66ng de DNA
- Experimentos de CNV
- FFPE samples
- Se debe de considerar que la enzima no corte el amplicón

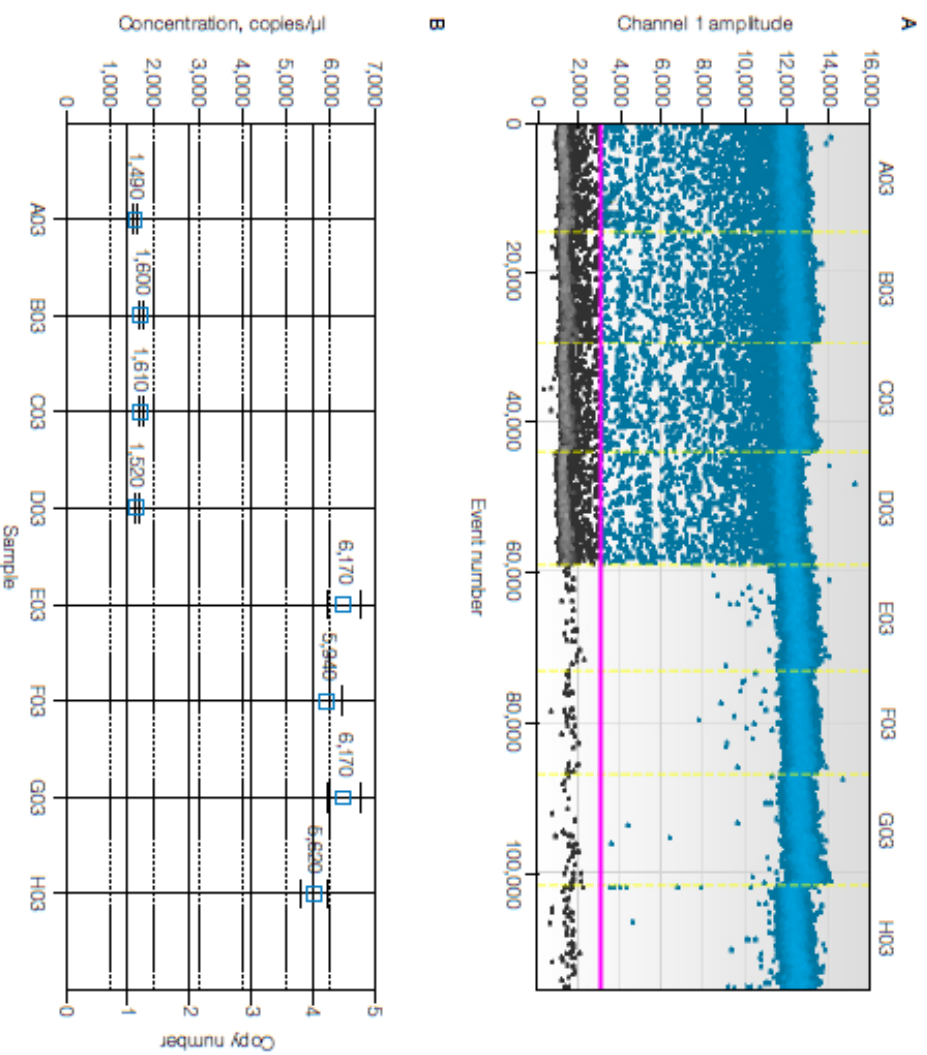
Protocolo de digestion de DNA en ddPCR

- Agregar de 2 – 5 unidades por 20 ul de reacción (0.2ul de un stock de 10,000 U/ml)
- No se requiere incubación extra o paso de limpieza
- Las enzimas recomendadas para ddPCR son:
 - HaellI, MseI, AluI, HindIII, CviQ, BamHI, BsaJI, DdeI, EcoRI, SacI, Sau3AI, SmaI, XbaI



Digestión con enzimas de restricción

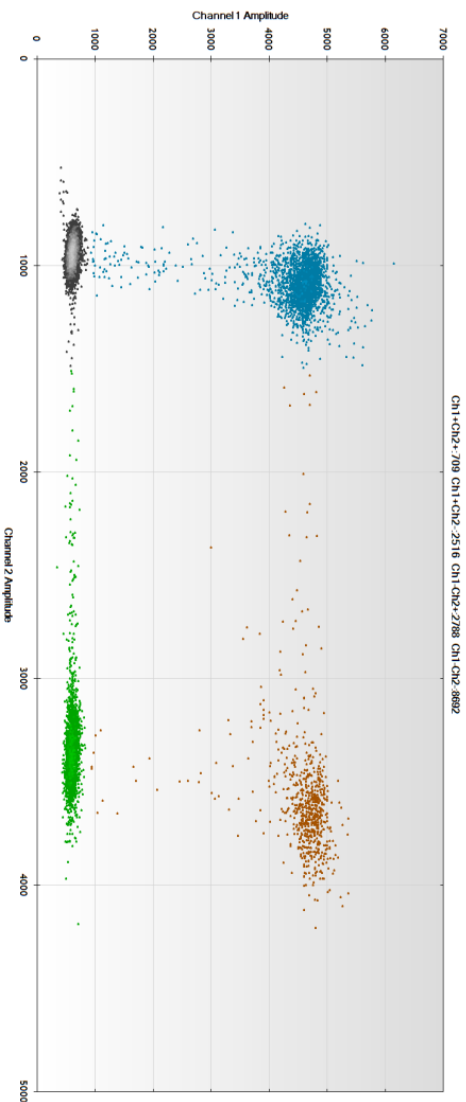
- La eliminación de estructuras secundarias permite una amplificación eficiente y una cuantificación exacta, especialmente cuando se trata de plásmidos





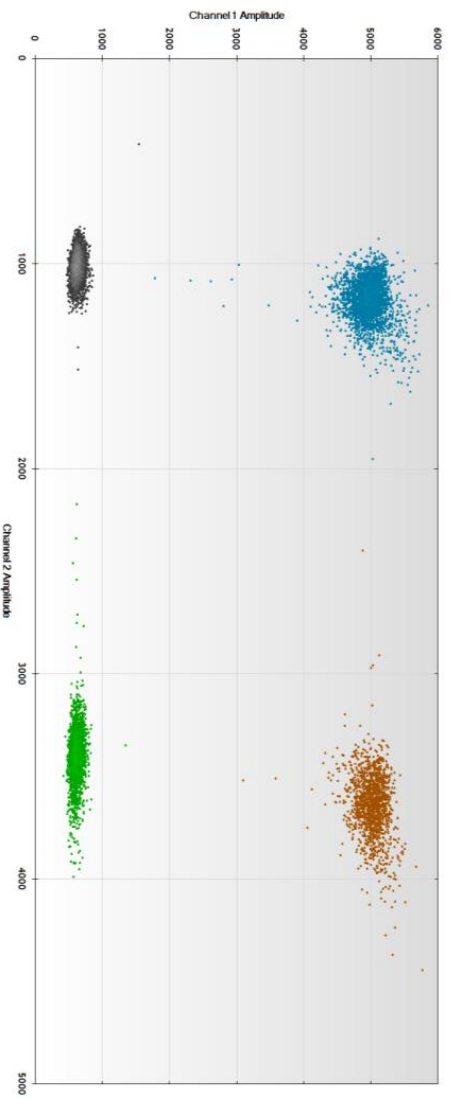
Digestión para ensayos de CNV

- La digestión para experimentos de CNV separa los repetidos en tandem
- Mejora la cuantificación y precisión



CNV = 1.73

No digestion



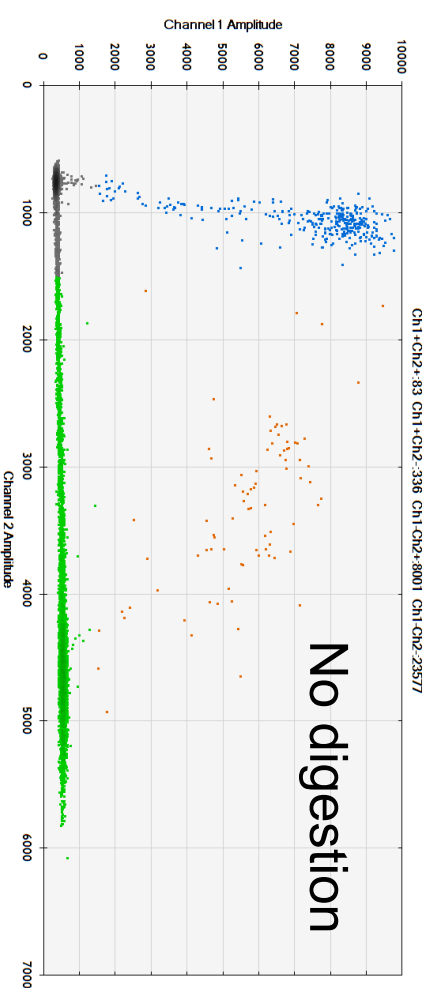
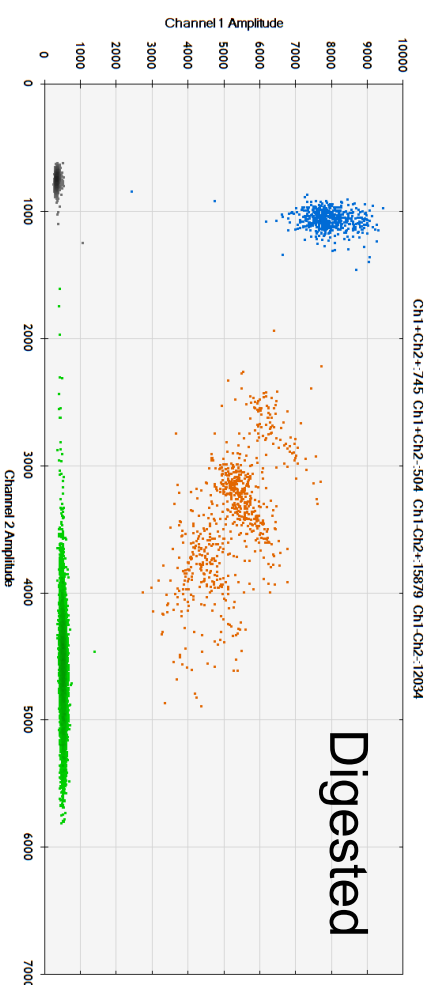
CNV = 2

Msel digest



Digestión en ensayos de detección de mutaciones raras

- La digestión en ensayos de RMD pueden mejorar la lluvia.

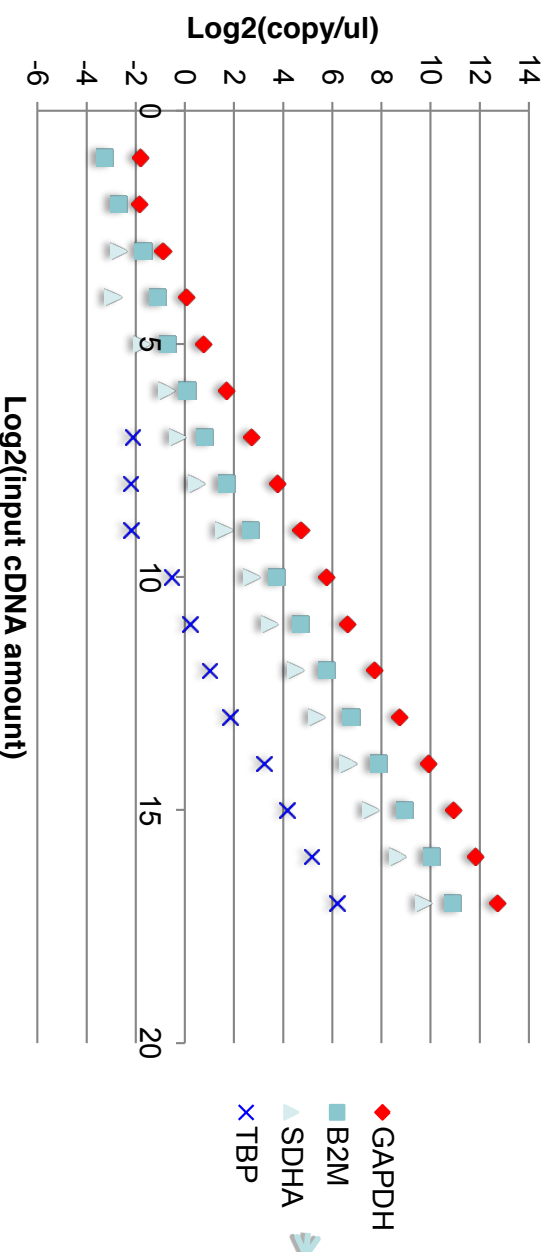




Preparación de la muestra – Gene Expression

- El cDNA puede ser generado por primers específicos o random
- La cantidad de RNA depende de la abundancia del transcrito del gen de interés
- Cuando se desconoce la abundancia de un transcrito en una muestra de RNA no degradado: evalúe cantidades de cDNA desde 1ng y/o 0.1ng de RNA total

ddPCR counts vs input cDNA amount

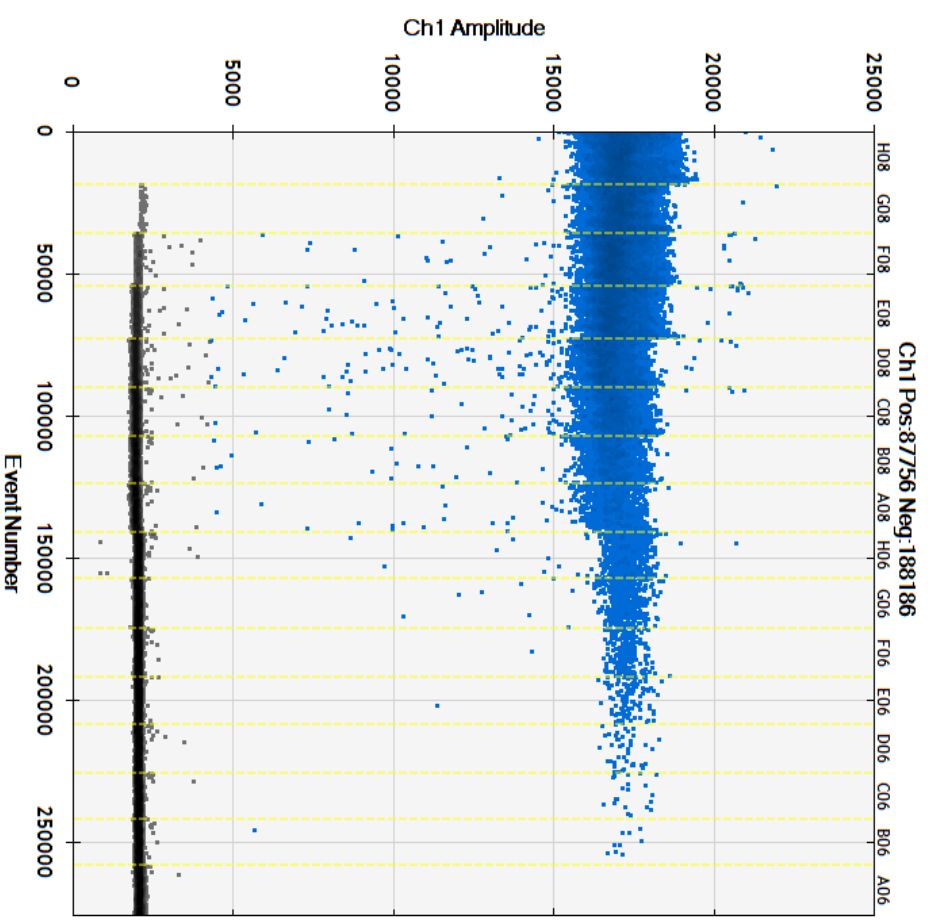
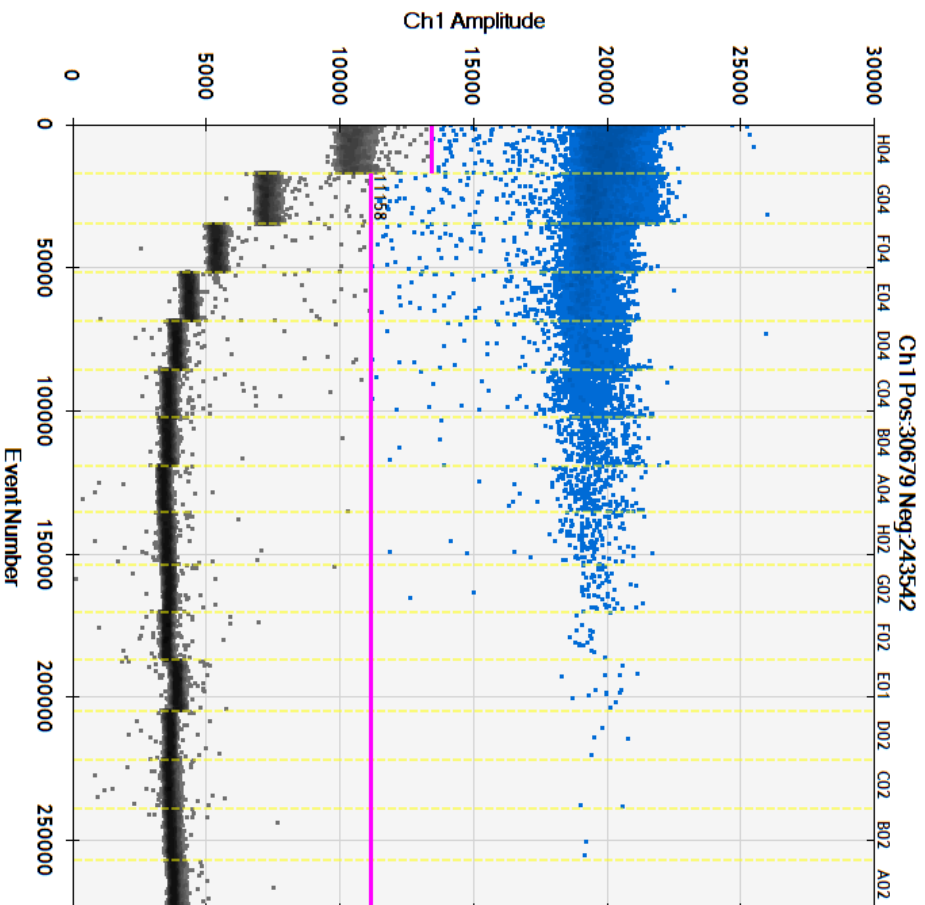




Cantidad de RNA (cDNA) con Eva Green

Gen de baja abundancia 50ng – 6pg

Gen de alta abundancia 3 ng – 0.2pg





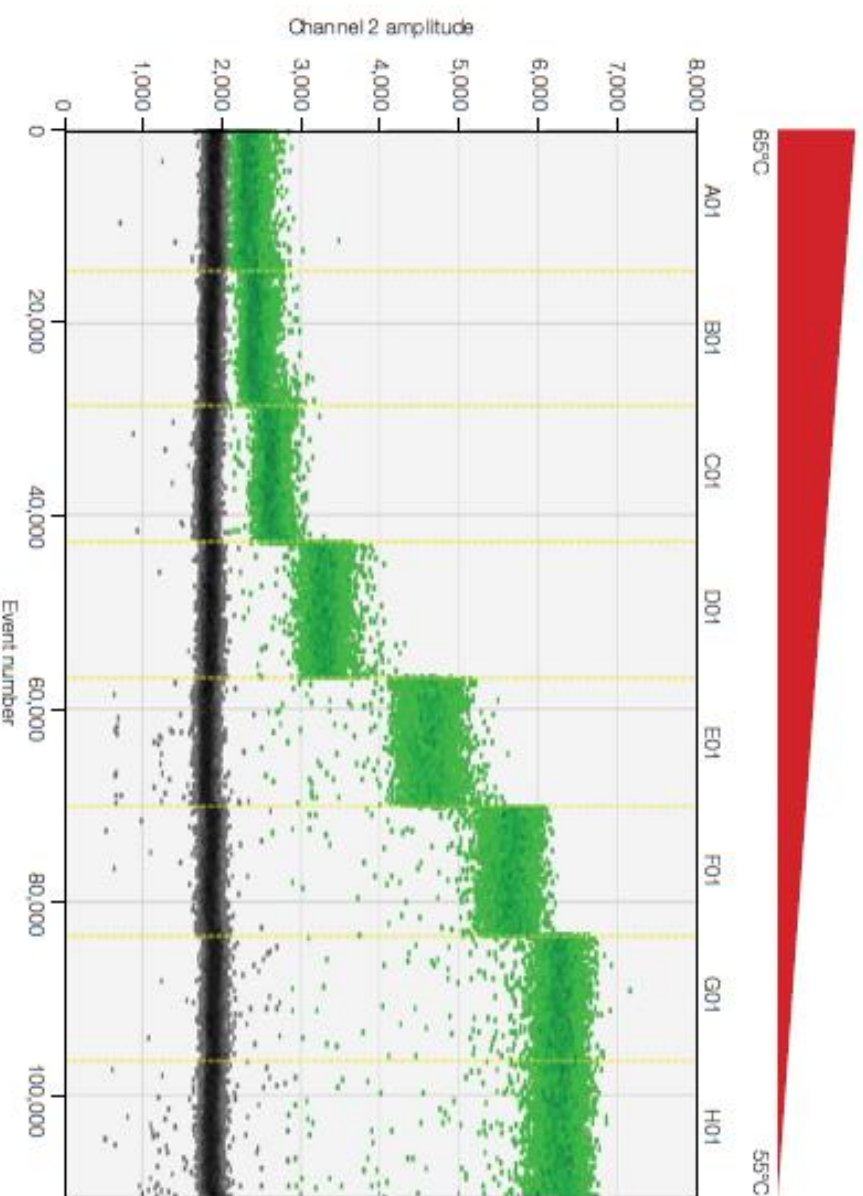
Temperatura de alineamiento

- Uno de los parámetros más críticos en la optimización de ensayos.
- La T_m está influenciada por:
 - Longitud de los primers
 - Secuencia
 - Concentración de iones
 - Concentración de oligo
- Baja temperatura -> Productos inespecíficos
- Alta temperatura -> Baja eficiencia
- La forma más fácil de optimizarla es el gradiente



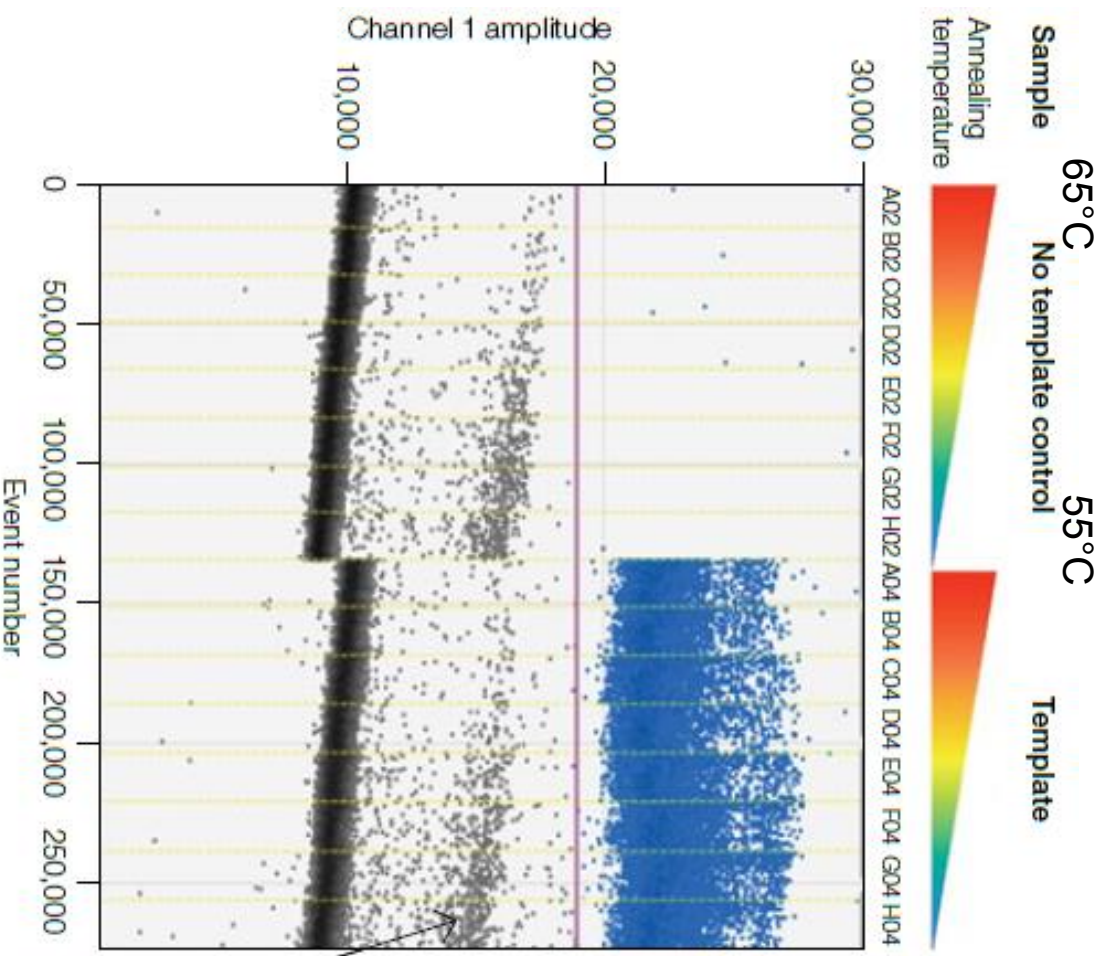
Gradiente térmico (sonda)

- Uso de gradiente térmico para encontrar la temperatura de alineamiento óptima
- El objetivo es obtener la mayor separación entre gotas positivas y negativas.





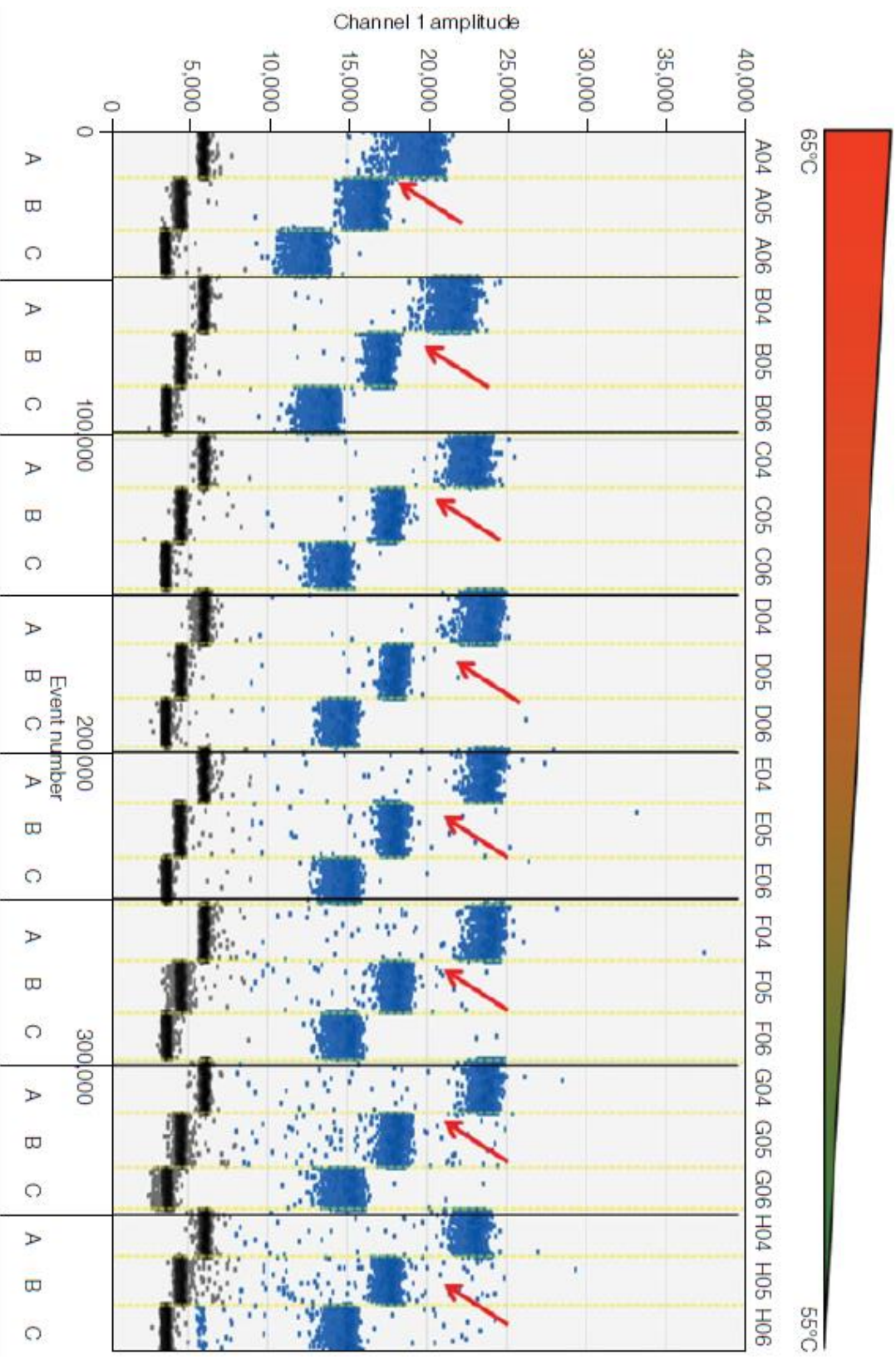
Gradiente térmico (EvaGreen)



←
Dímeros de primer



Gradiente térmico – longitud de amplicon

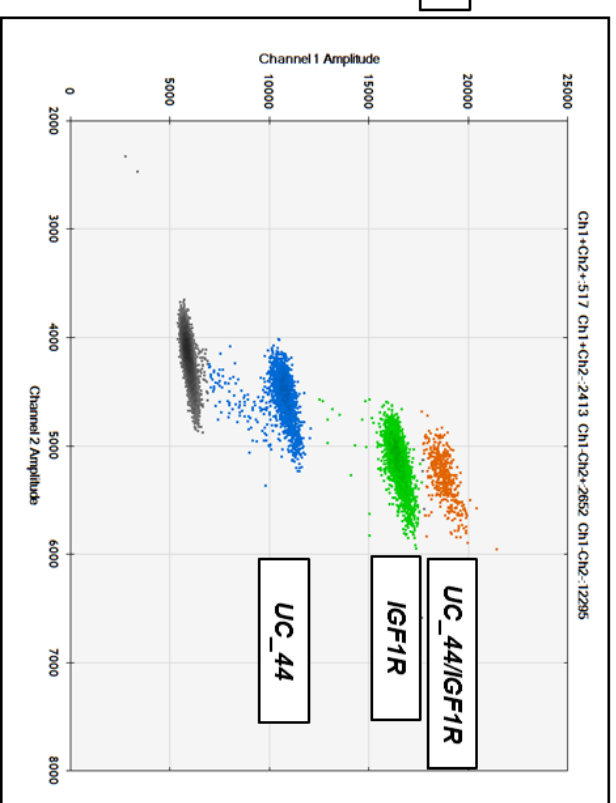
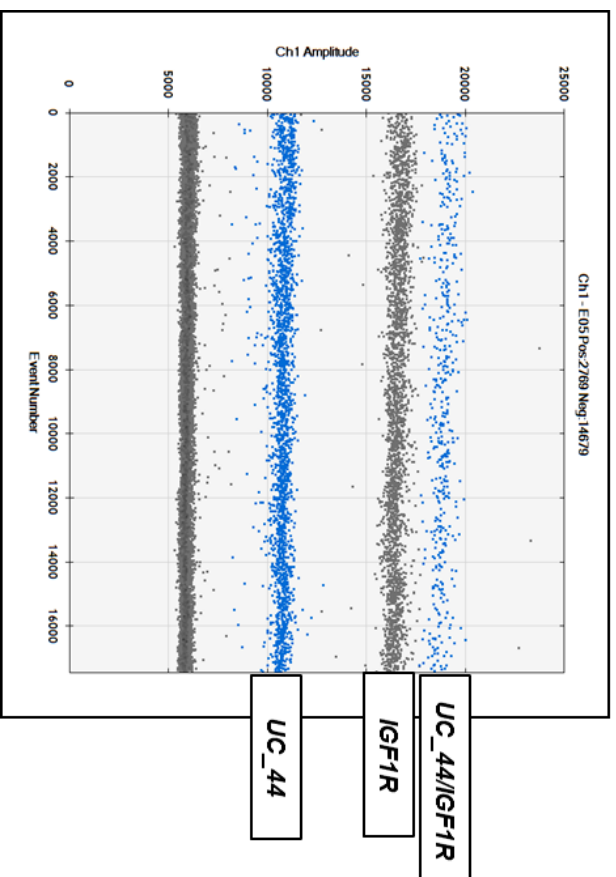


A = 200 pb B = 99 pb C = 62 pb



Multiplexing with EvaGreen

Multiplexing with EvaGreen by varying annealing temperature



UC_44 @ 59° C annealing temp
IGF1R @ 63° C annealing temp
(Experiment run @ 63° C)



Detección de variantes de splicing por EvaGreen

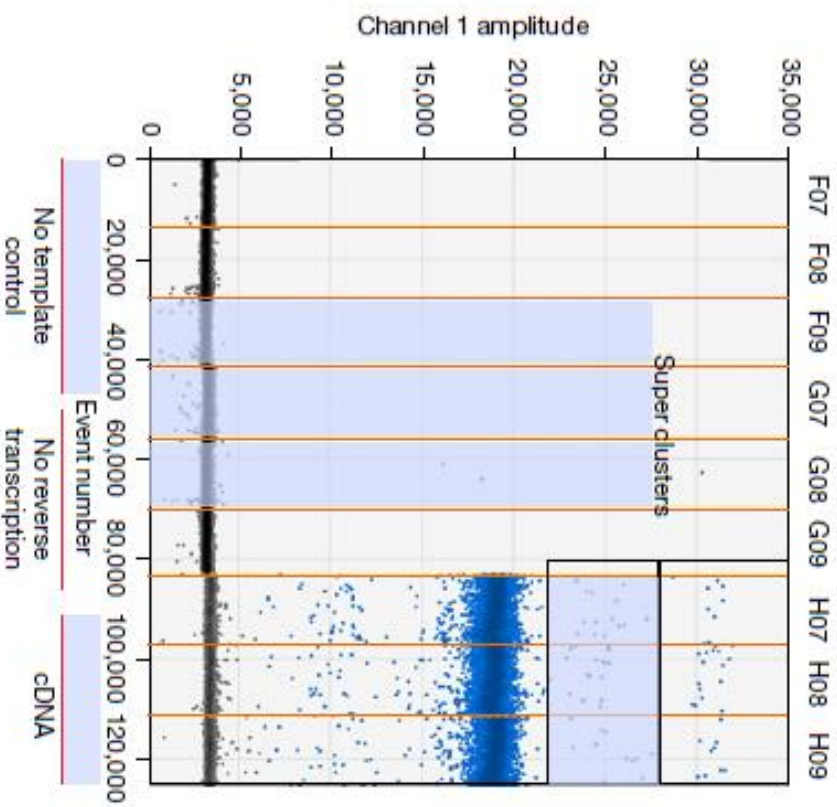


Fig. 2.14. Splice variant discrimination using the QX200 ddPCR EvaGreen supermix with a single set of primer pairs.



OPEN  ACCESS Freely available online

 PLOS | ONE

Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR

Dany Morisset*, Dejan Štebih, Mojca Milavec, Kristina Gruden, Jana Žel

Department of Biotechnology and Systems Biology, National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia



Análisis

Singleplex vs duplex

hmg = endógeno
MON810 = transgene

Digestion vs no Digestion

Rango dinámico

Límite de cuantificación

Límite de detección

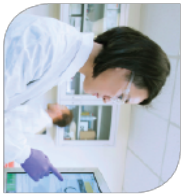
Reproducibilidad

Especificidad

Aplicabilidad

Optimización

ddPCR



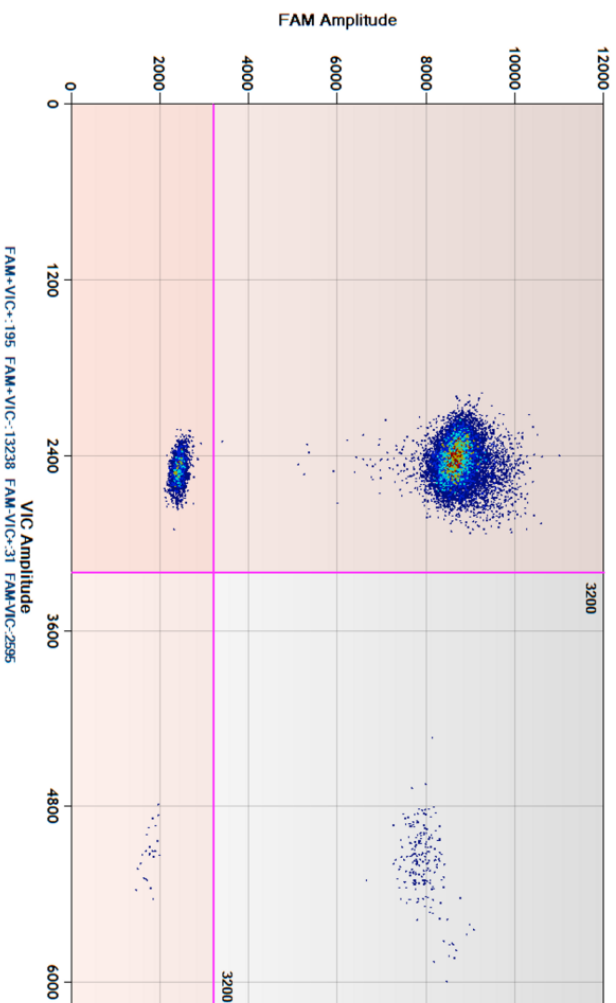
Singleplex vs Duplex

- Método actualmente optimizado para qPCR en reacciones singleplex
- Transferencia de las condiciones de qPCR a ddPCR
- qPCR
 - Mismo comportamiento de hmg en singleplex que en duplex
 - MON810 disminución significativa de la amplificación en duplex
- ddPCR
 - No hay diferencia significativa entre ensayos singleplex y duplex para ambos genes



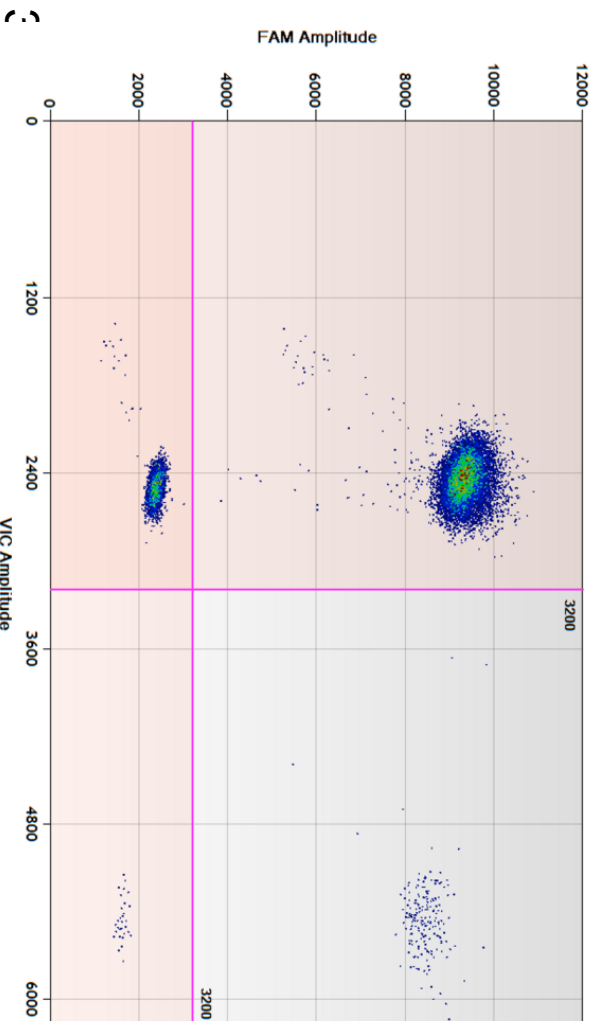
Digestion vs no digestion

FAM-VIC-193 FAM-VIC-13699 FAM-VIC-26 FAM-VIC-1986



Non digested DNA (dilution 6x)
 Total = 15904 droplets
 %FAM+VIC+ = 1.2%
 %FAM+VIC- = 86.1%
 %FAM-VIC+ = 0.2%
 %FAM-VIC- = 12.5%

No es necesario hacer
 digestion del DNA
 genómico

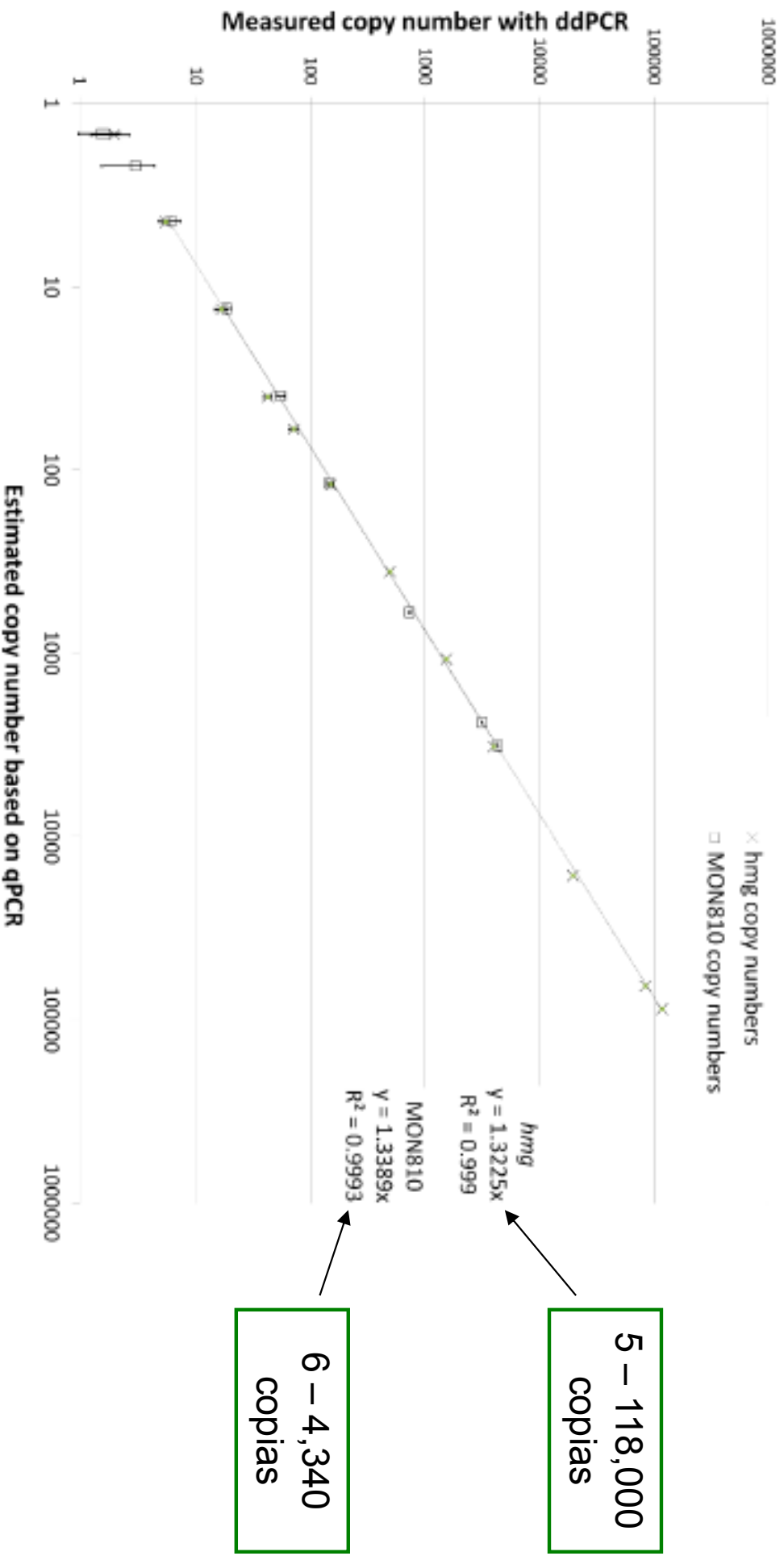


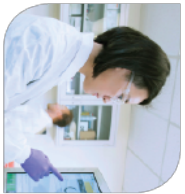
Total digested DNA (dilution 6x)
 Total = 16059 droplets
 %FAM+VIC+ = 1.2%
 %FAM+VIC- = 82.4%
 %FAM-VIC+ = 0.2%
 %FAM-VIC- = 16.1%





Rango dinámico



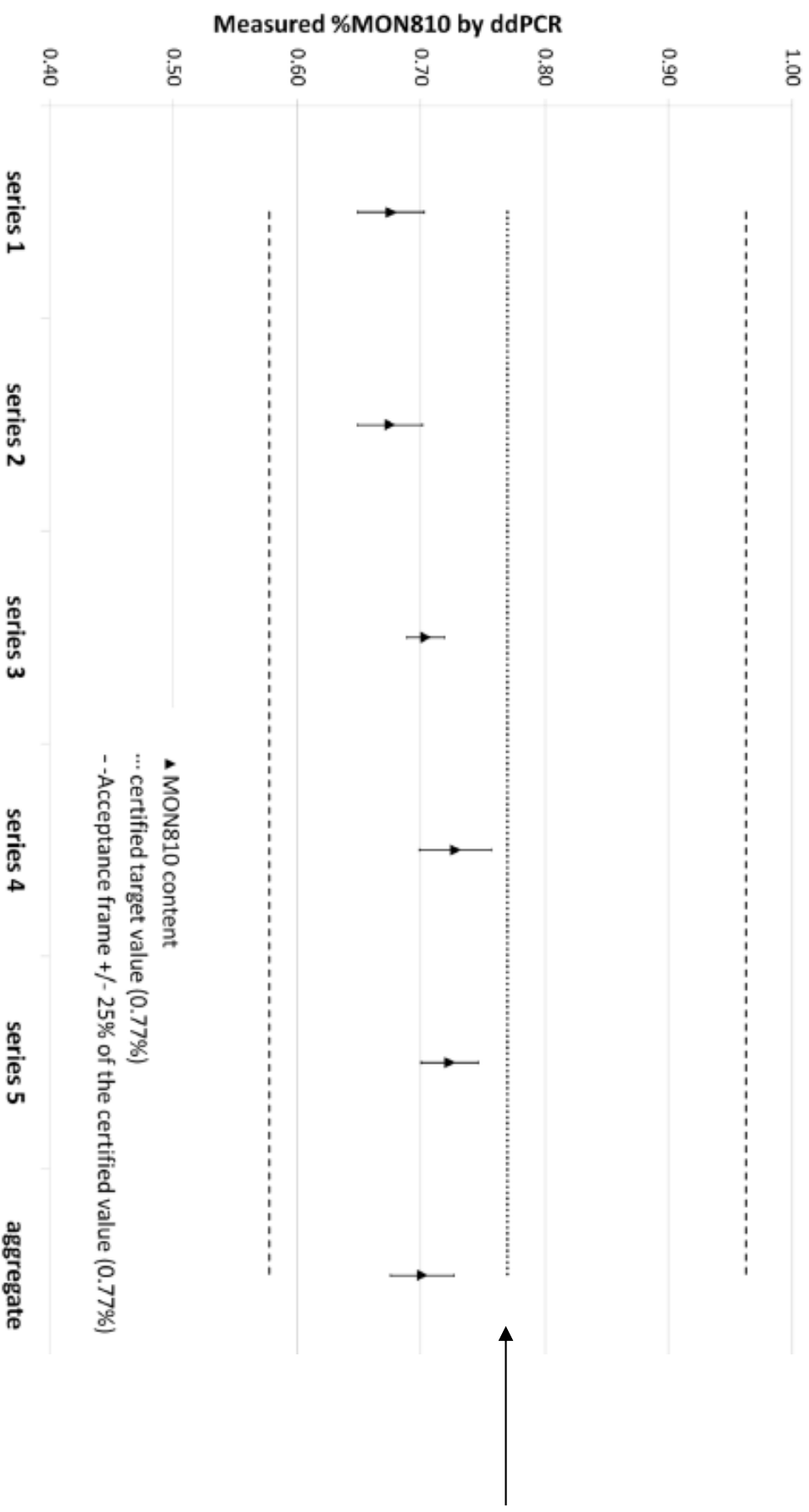


Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

- LOD – El mínimo número de copias del DNA de interés que puede ser detectado de manera confiable
- LOD = La concentración más baja en la cual las 5 réplicas de ddPCR dieron al menos 2 gotas positivas (5 copias para hmg, 6 para MON810)
- LOQ – El mínimo número de copias del DNA de interés que puede ser cuantificado de manera confiable con un aceptable nivel de precisión y exactitud
- LOQ = EL mínimo número de copias detectado dentro del rango dinámico con un $CV \leq$ al 25% (5 copias para hmg, 18 para MON810)



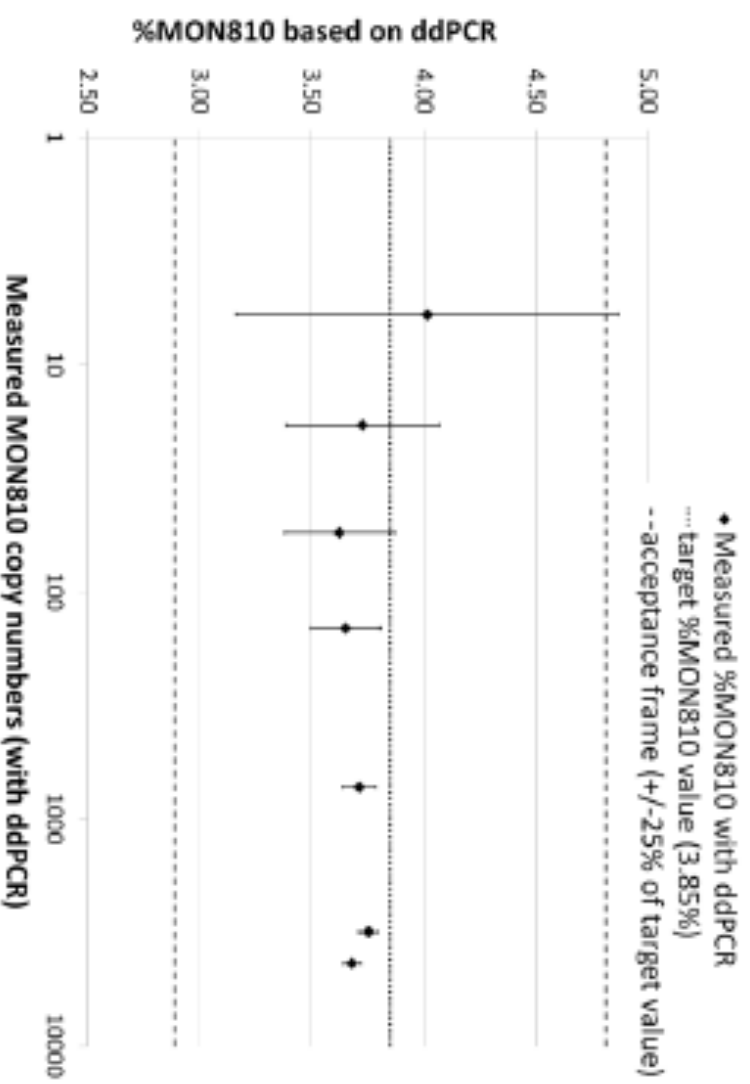
Reproducibilidad



5 series de 7 réplicas



Reproducibilidad



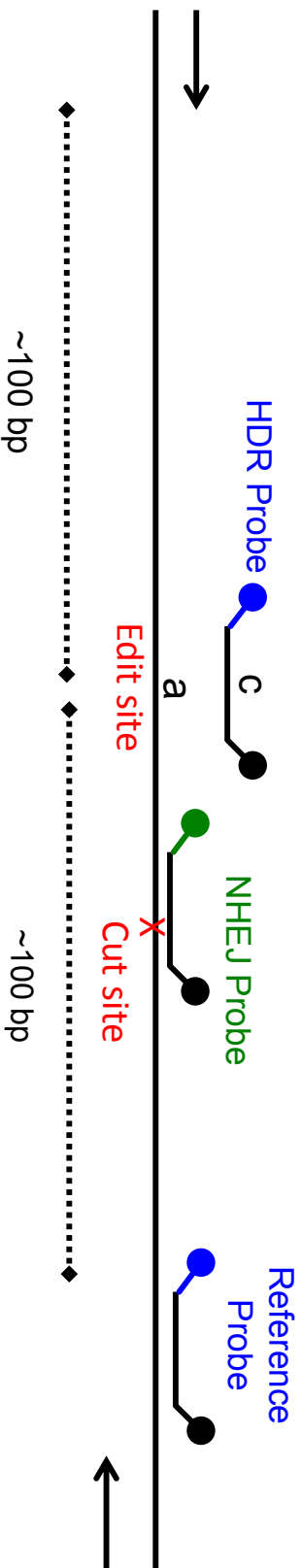
7 diferentes concentraciones con 5 réplicas



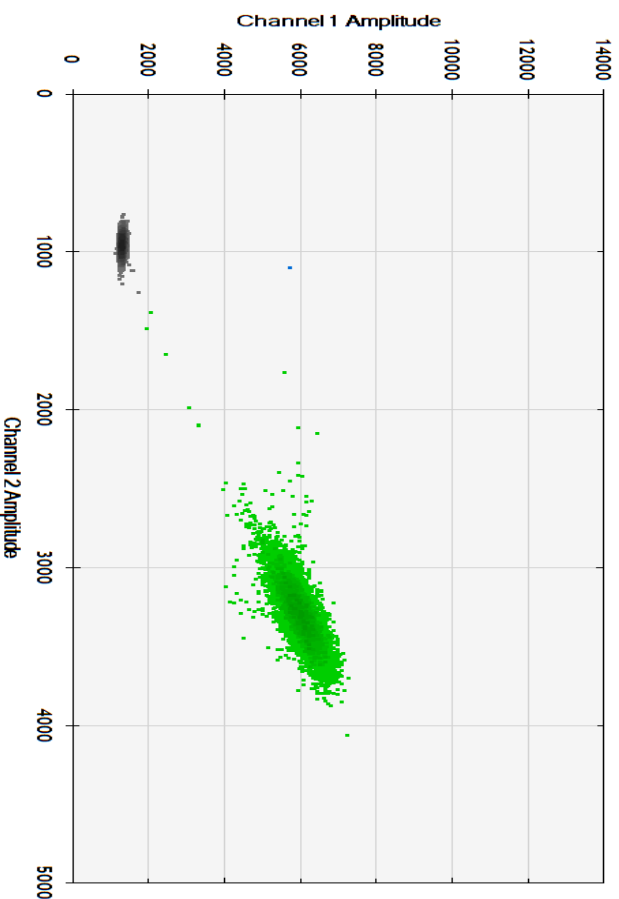
A single assay for simultaneous HDR & NHEJ quantification

Collaboration with Yuichiro Miyaoka, Bruce Conklin Lab, UCSF

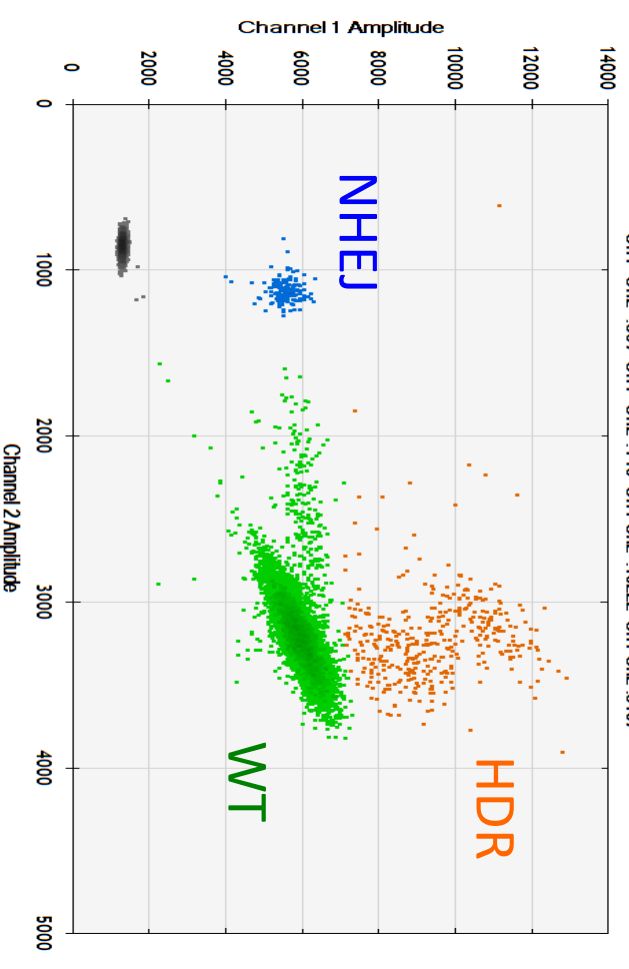
Total Edit Assay Strategy:
CRISPR-Cas9



WT only



Positive Control





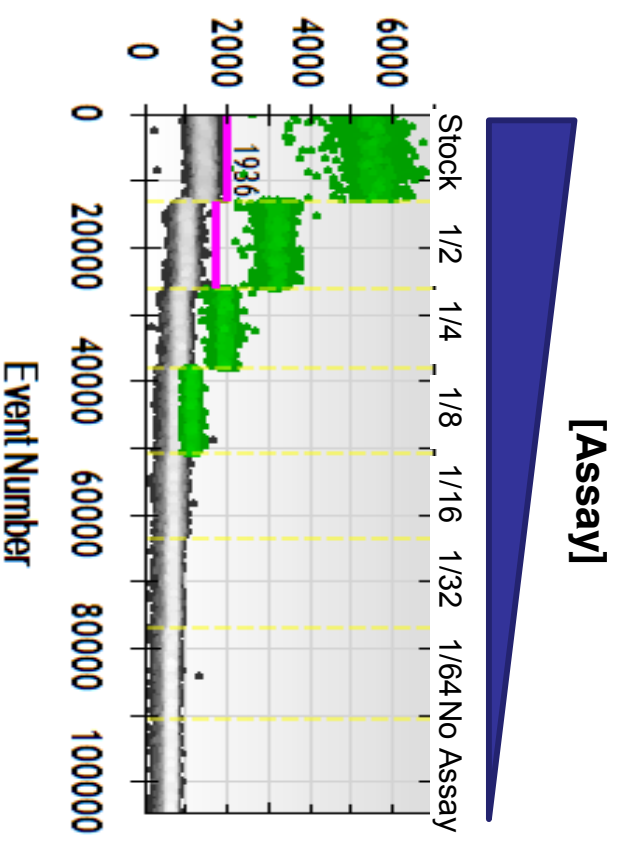
Multiplexing con ddPCR

Usando sondas

- Variar la concentración del ensayo
- Variar la concentración de sonda

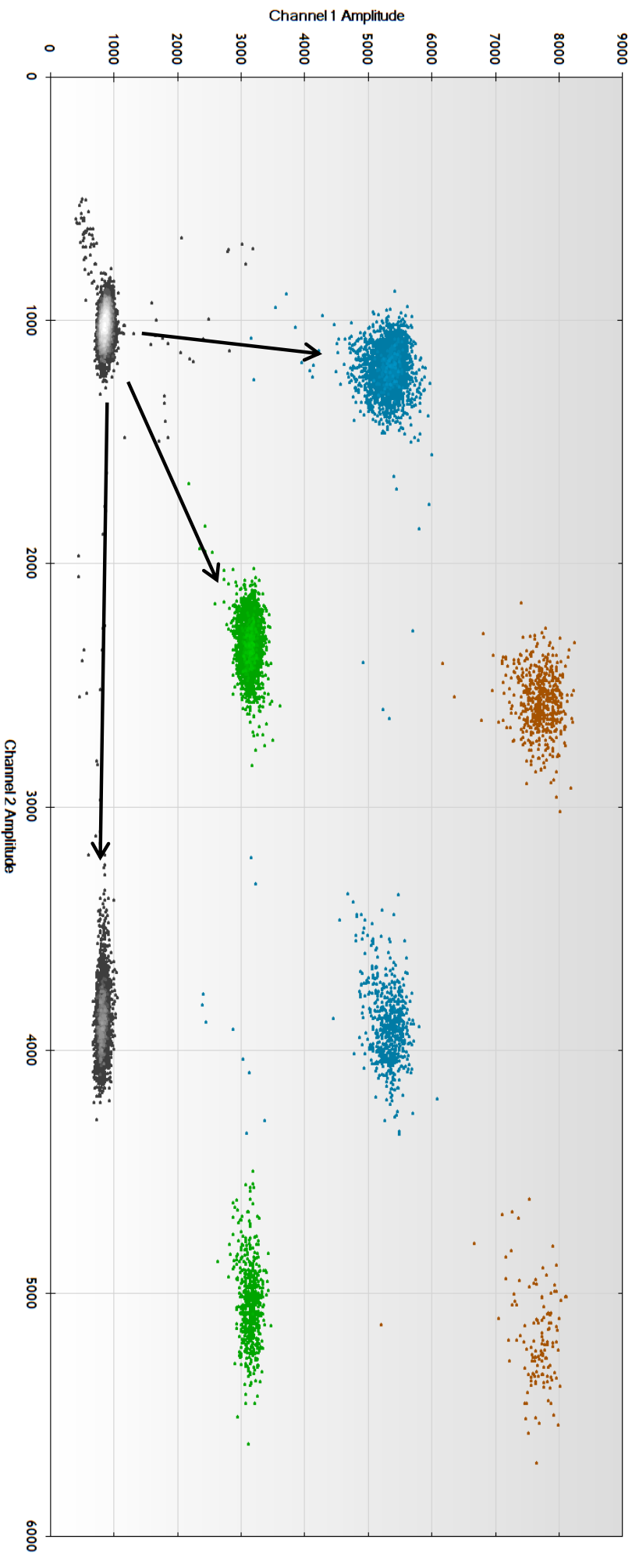
Usando Evagreen

- Variar la longitud del amplicon
- Variar la temperatura de alineamiento
- Variar la concentración de primers

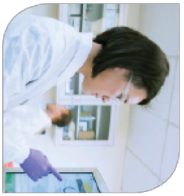




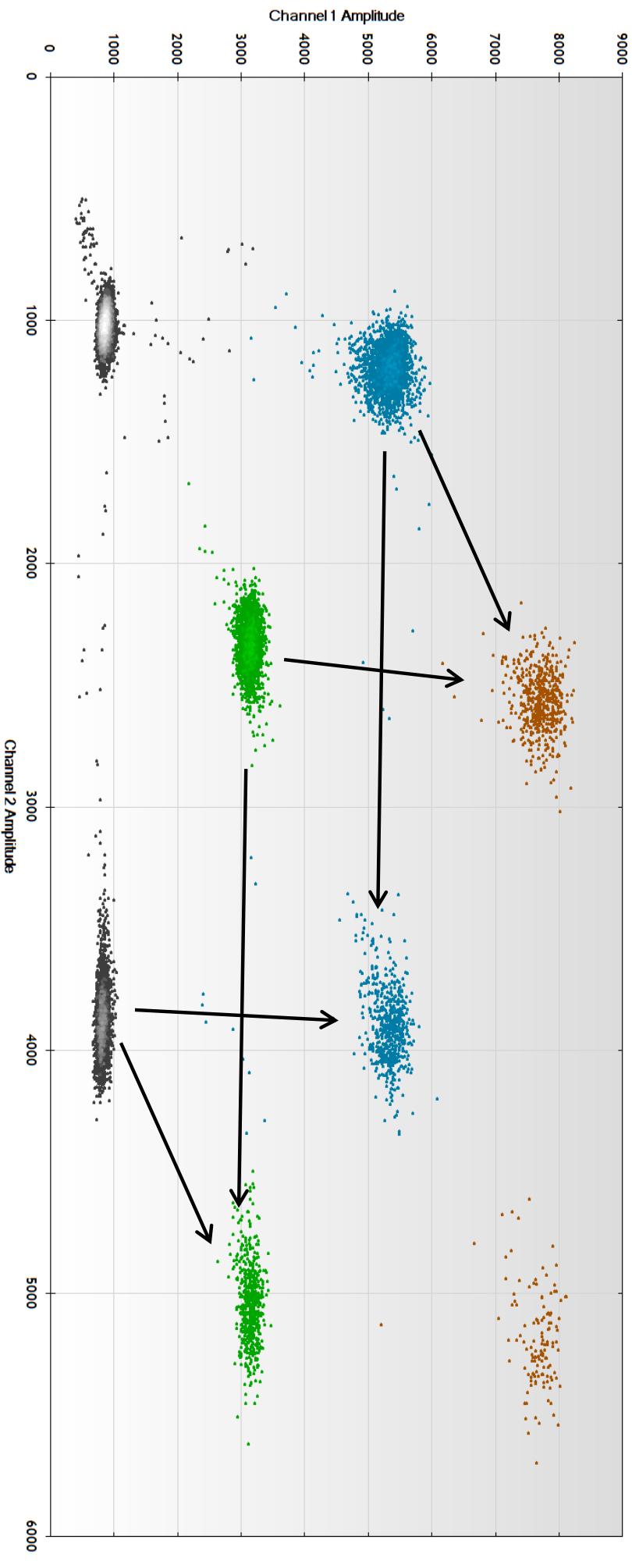
Multiplexing with Probes: Probe Combination



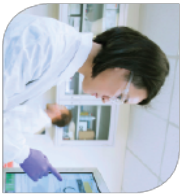
Populations of single positives



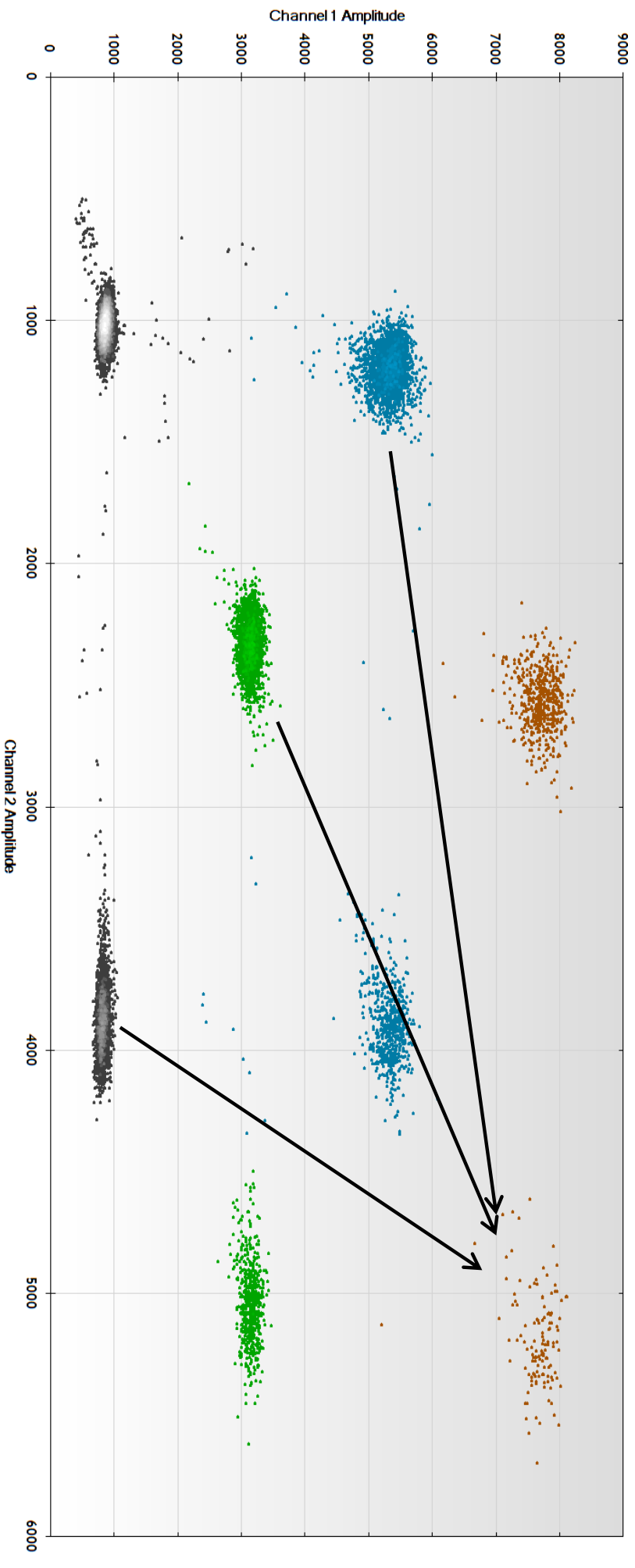
Multiplexing with Probes: Probe Combination



Populations of double positives



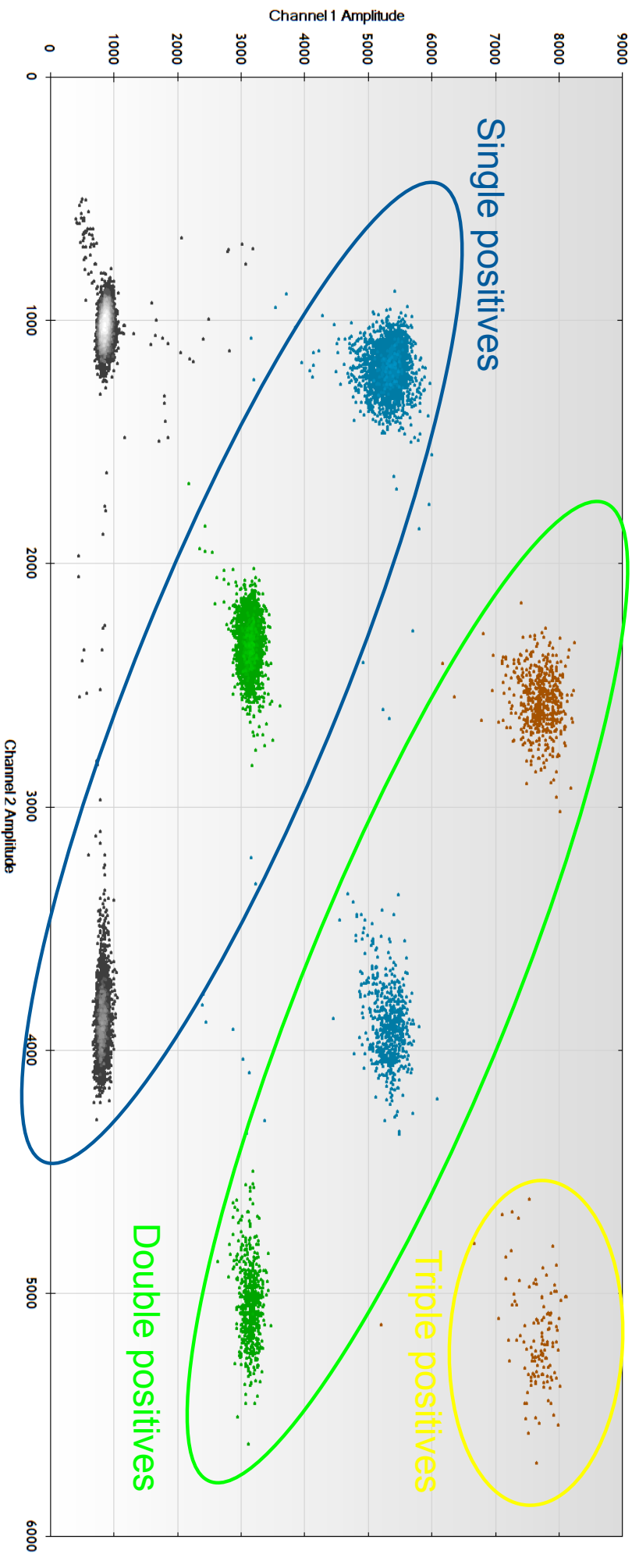
Multiplexing con sondas: Combinación de sondas



Populations of triple positives



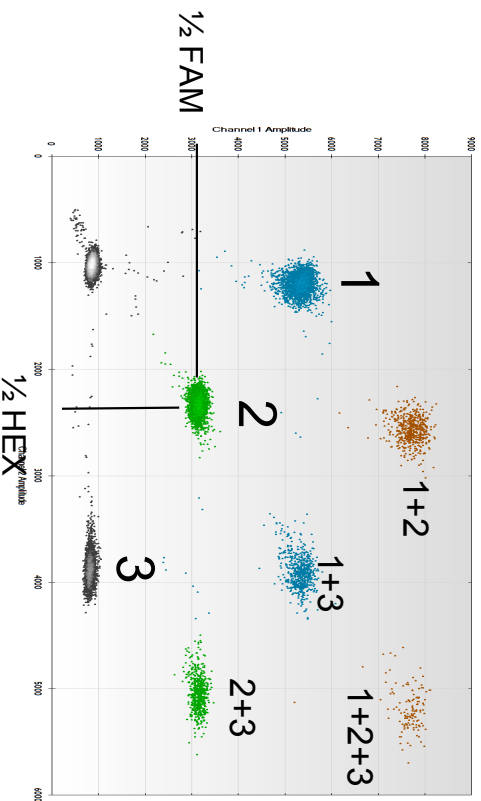
Multiplexing con sondas: Combinación de sondas





Multiplexing con sondas

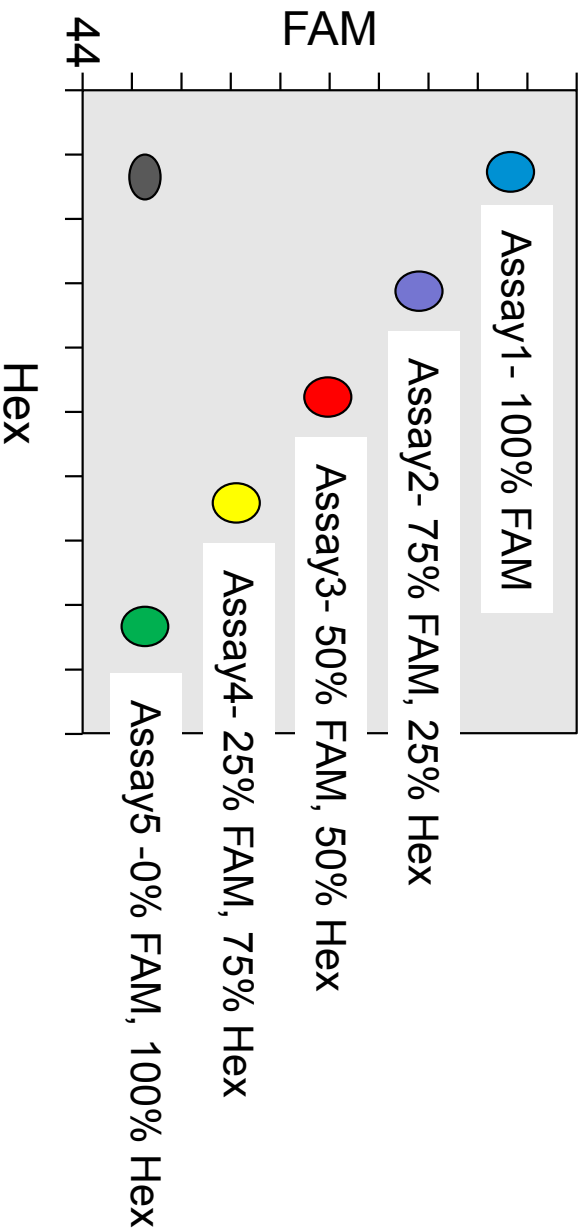
Concept of probe mixing - triplex



Double,
Triple
positives

3plex	Assay mixing
1	100% FAM, 0% Hex
2	50% FAM, 50% Hex
3	0% FAM, 100% Hex

Theoretical clustering -5plex

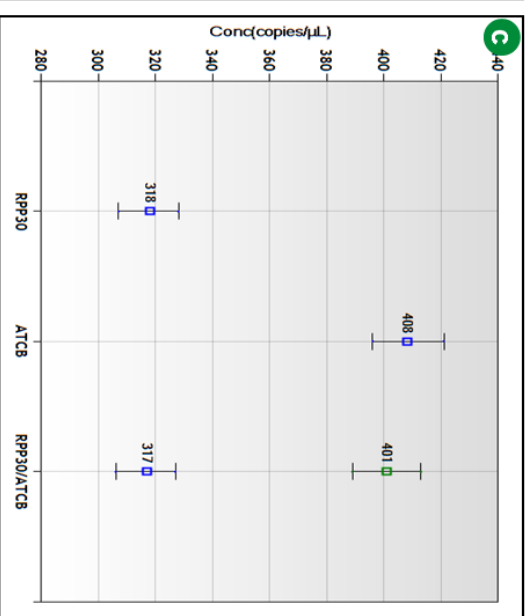
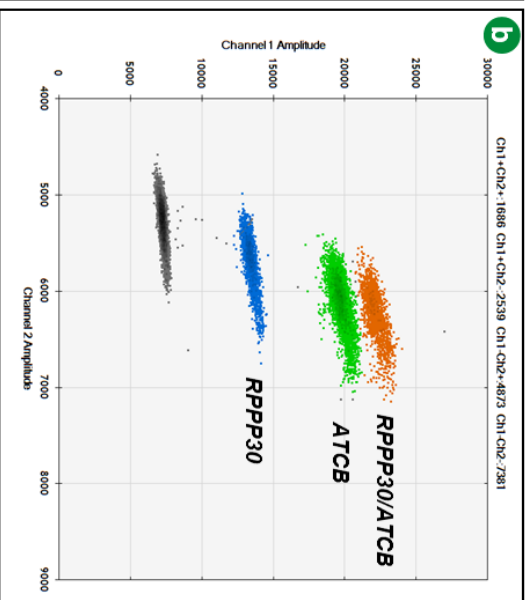
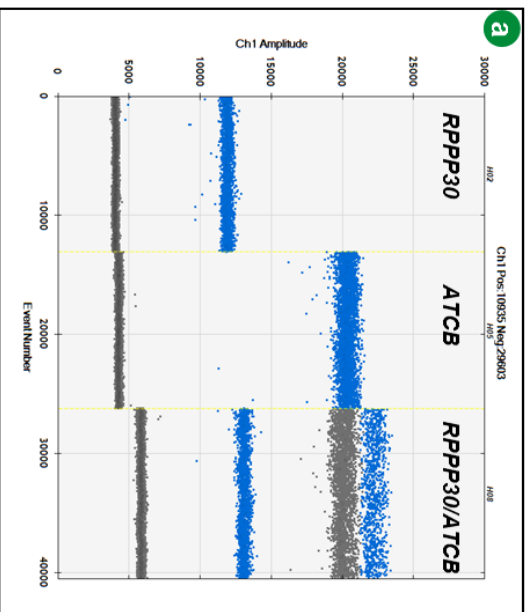


5plex	Assay mixing
1	100% FAM, 0% Hex
2	75% FAM, 25% Hex
3	50% FAM, 50% Hex
4	25% FAM, 75% Hex
5	0% FAM, 100% Hex



Multiplexing con EvaGreen: Longitud del amplicon

- Amplicon length:
 - *RPP30*
 - 62 base-pairs
 - *BetaActin*
 - 137 base-pairs





Consideraciones en la generación de gotas

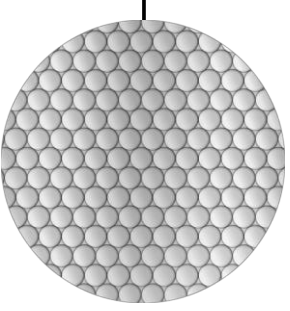
- Cartuchos y gaskets no son reusables
- Son recomendables las puntas **Rainin p-20 aerosol barrier tips** para cargar la muestra
- **La muestra se carga primero** después el aceite
- Los pozos vacíos se cargan con 1x ddPCR buffer control solution
- Evitar generar burbujas





Consideraciones en la generación de gotas

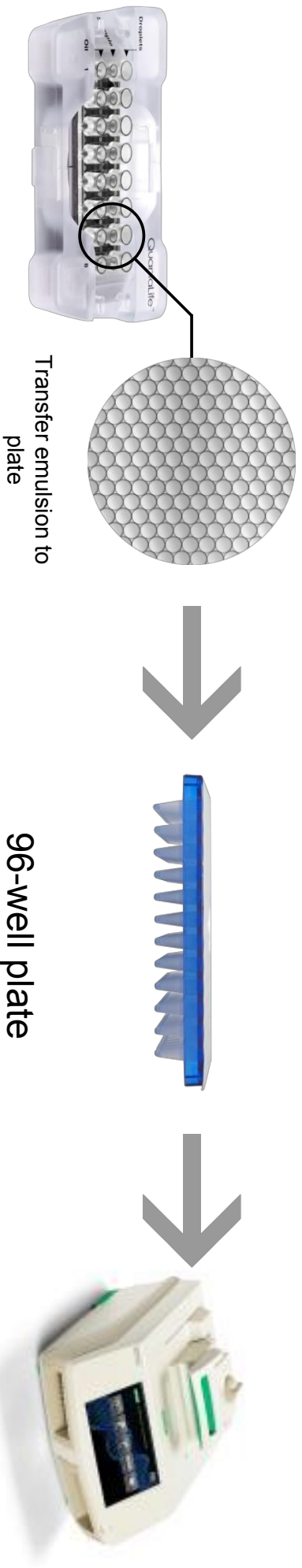
- Cuando pipetee gotas, aspire y distribuya suavemente y lentamente usando una pipeta multicanal Rainin L-50 con puntas P-200 .
- Contar ~ 5 segundos cuando el dibujo lentamente 40ul de gotas en la punta de la pipeta y dispensar lentamente en una placa de 96 pozos
- Coloque la punta de la pipeta a lo largo del lado y cerca de la parte inferior del pozo
- Las gotitas son frágiles en este punto (antes de la PCR). Una buena técnica minimizará el cizallamiento de las gotitas durante la transferencia y producirá mayores recuentos de gotas
- El aceite puede evaporarse si las gotas y el aceite de generación de gotas se dejan sin cubrir durante largos períodos de tiempo (> 60 min). Cubra la placa mientras procesa gotitas y selle la placa después de generar gotitas





PCR Droplets

- Es necesario usar placas Bio-Rad o **Eppendorf Twin Tec semi-skirted 96-well plate** (951020362)
- Sellar la placa utilizando el **PX1 heated plate sealer** (180°C, 5 sec)
- Usar una rampa de 2°C / seg para asegurar que la temperatura llegue a todas las gotas
- 40 ciclos de PCR son suficientes para optimizar una reacción de PCR.





TaqMan Assay Thermal Cycling Protocol

- Always start with the recommended assay concentrations, thermal cycling conditions, and restriction digestion protocol
- The standard thermal cycling parameters for Probes are:

Step	Temperature	Time	Ramp	Number of Cycles
1	95°C	10 min	2°C/sec	1
2	94°C	30 sec	2°C/sec	40
3	60°C (variable)	1 min	2°C/sec	
4	98°C	10 min	2°C/sec	1
5	4–12°C	Hold	1°C/sec	1

Step 1. Enzyme hot start

Step 2. Denaturation

Step 3. Annealing/extension

Step 4. Enzyme inactivation

Step 5. Storage



EvaGreen Assay Thermal Cycling Protocol

- The standard thermal cycling parameters for EvaGreen are:

Step	Temperature	Time	Ramp	Number of Cycles
1	95°C	5 min	2°C/sec	1
2	95°C	30 sec	2°C/sec	40
3	60°C (variable)	1 min	2°C/sec	
4	4°C	5 min	2°C/sec	
5	90°C	5 min	2°C/sec	
6	12°C	Hold	1°C/sec	1

Step 1. Enzyme hot start

Step 2. Denaturation

Step 3. Annealing/extension

Step 4. Dye stabilization

Step 5. Dye stabilization/enzyme inactivation

Step 6. Storage



¿Preguntas?



Gracias

Sócrates Avilés

socrates_aviles@bio-rad.com

Especialista de Aplicaciones, LSG

Bio-Rad México/Latinoamérica