Instituto Universitario de Investigación Mixto Agroalimentario de Aragón Universidad Zaragoza

"Servicios científico tecnológicos del IA2 en la Universidad de Zaragoza".

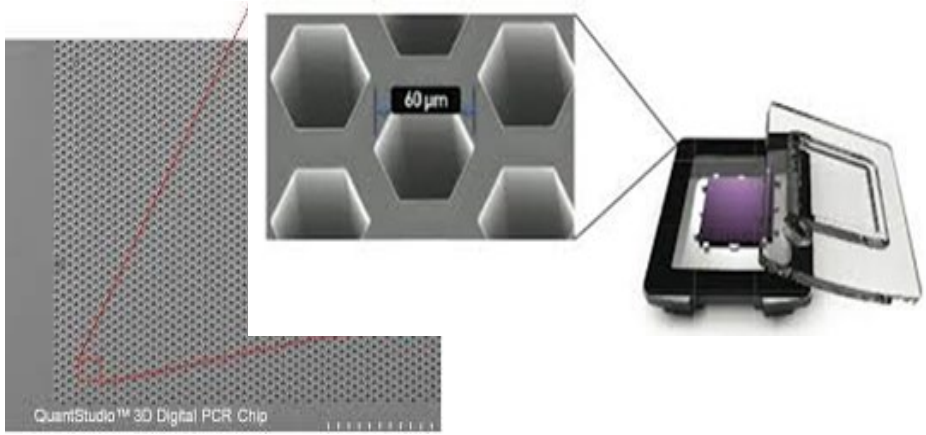
26 de enero de 2021

PCR digital:

Detección y cuantificación absoluta de ácidos nucleicos

PCR digital: ¿Qué es?

- Técnica analítica que permite la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos, mediante la partición de la muestra en miles de sub-réplicas (chip de 20.000 pocillos).

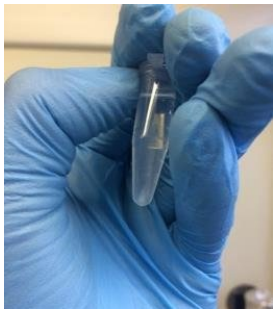


- Se realiza una PCR individual en cada uno de los 20.000 pocillos que se categorizan como positivas o negativas dependiendo de si contienen o no la molécula objetivo (binario/digital).

- Tras la PCR, la amplificación o no de las sub-réplicas se usa para generar un recuento absoluto del número de moléculas de la muestra, sin necesidad de estándares ni controles endógenos.

Esquema flujo general de trabajo

Obtención de ácidos nucleicos



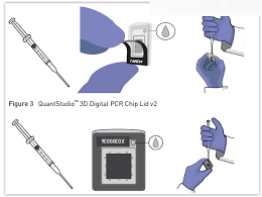
Diversas matrices y soportes (calidad y cantidad).

Preparación mezcla reacción PCR

Material	Volume (µL)	Stock	Final
QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix, 2X	7.25	2X	1X
TaqMan® Assay, 20X (primer/probe mix)	0.725	20X	1X
Diluted DNA	1.5	23 ng/µL*	2.3 ng/µL*
Water	5.025	-	-
Total volume (sample/1 chip)	14.5	* Just an example, it will depend on the application	

(Diseño Taqman de RT-qPCR)

Carga chip

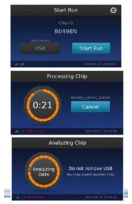


Paso que requiere más manipulación y cuidado

Termociclado

Step		Temp (°C)	Time (mm:ss)
Hold	Polymerase activation	96.0	10:00
Cycling (39 cycles)	Anneal/extend	60.0	2:00
	Denature	98.0	00:30
Hold	Final extension	60.0	2:00
Hold (optional)	Storage	10.0	99:59

Lectura chips

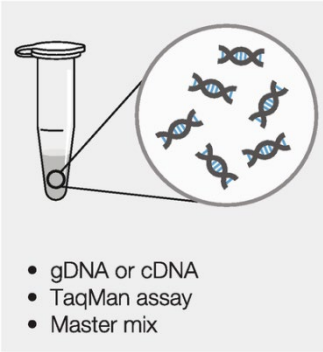


Menos de 1 minuto

Análisis de resultados en la nube (Thermofisher)

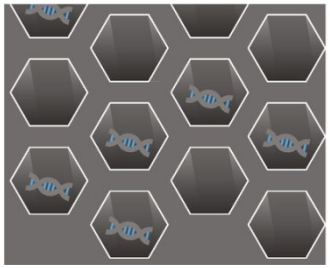
1º

Preparation

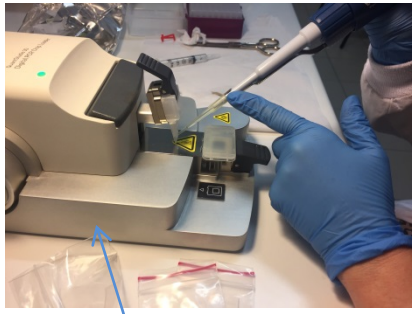


2º

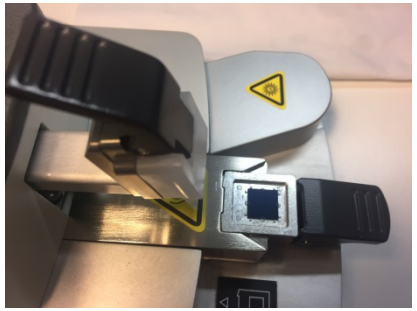
Distribution



Chip v2/ 20.000 pocillos

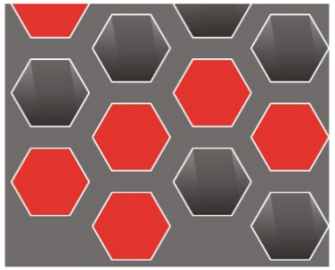


QuantStudio 3D Digital PCR chip loader



3º

Amplification

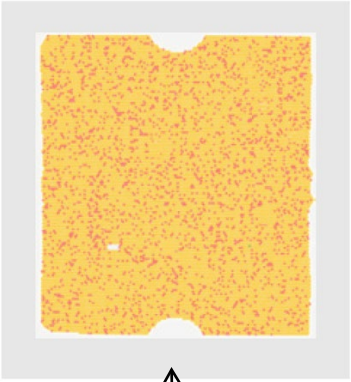


Positive reactions
Negative reactions

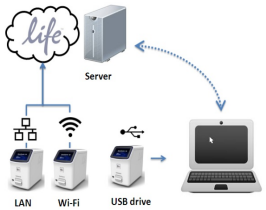
Proflex PCR System

4º

Quantification



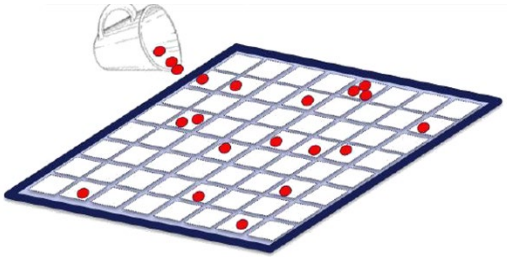
Quantstudio 3D PCR digital system



La PCR digital permite realizar cuantificaciones absolutas (nº de copias por unidad de volumen) sin usar una curva estándar

1- Contar número de pocillos negativos y positivos en el chip

2- Aplicar la corrección de Poisson (para corregir los pocillos que pueden haber recibido más de una molécula de la secuencia objetivo, se aplica un factor de corrección mediante el modelo de Poisson. Implementado en el software de Applied Biosystem).



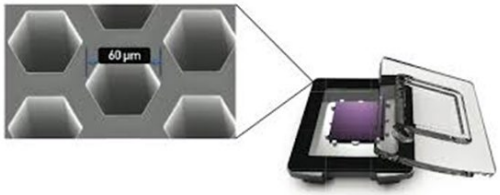
$$\lambda = -\ln\left(1 - \frac{k}{n}\right)$$

λ: número medio de copias por pocillo

k: número de pocillos positivos

n: número total de pocillos

λ/Vol. Pocillo = Copies/ µL → Nº Copies/µL * genoma de la especie



Vol. chip v2: 755pL (20000 pocillos)

↓

Concentración [ng/µL]

λ = Número medio de copias por pocillo

PUNTO IMPORTANTE: Las muestras deben estar diluidas a una concentración de manera que la mayoría de las particiones contengan una molécula o ninguna:
λ Ideal entre 0,6 y 1,59.

Ejemplo:

- Gen concreto (especie humana)…./ virus /bacteria
- Contenido de ADN de un juego de cromosomas haploide humano: 3,3pg
- Volumen del pocillo : 755pL
- Para λ=0,6

λ/Vol. Pocillo = Copies/ µL — 0,6copias/755pL = 794copias/µL

Nº Copies/µL x genoma de la especie — 794copias/µL x 3,3pg = 2.62 ng/µL

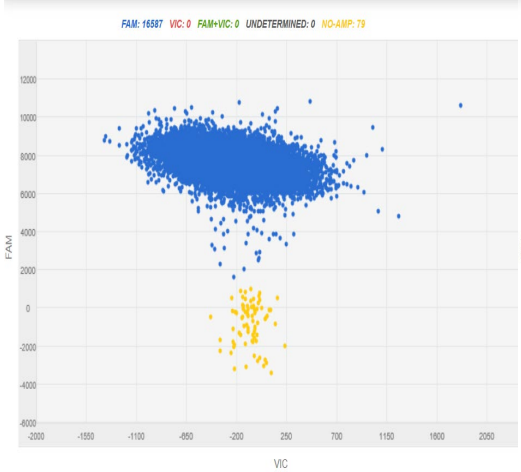
Tamaño de los genomas: http://www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html

Utilización por empresa para generar estándar para kit de diagnóstico

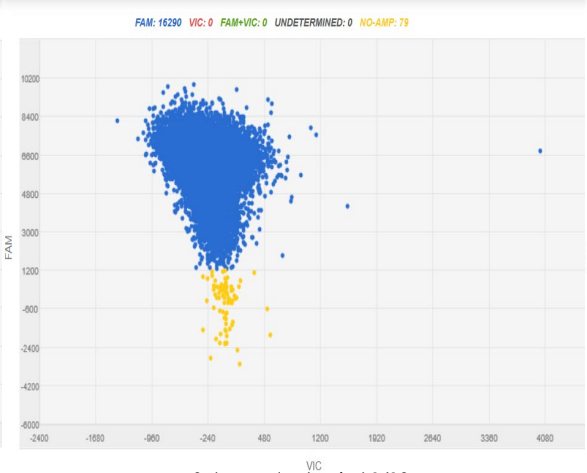
BIOTEC

Diluciones seriadas 1/10

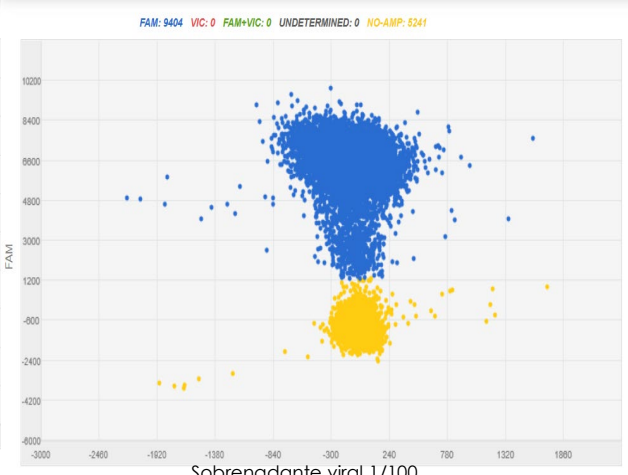
Muestra	k (positivos)	n (total)	k/n	λ	Concentración chip (copias/µl)	Precisión (Error)
Sobrenadante viral	16587	16666	0,995	5,352	7088	4,693%
Sobrenadante viral dil 1/10	16290	16369	0,995	5,334	7064	4,402%
Sobrenadante viral dil 1/100	9404	14645	0,642	**1,028**	1361	2,144%



Sobrenadante viral



Sobrenadante viral 1/10



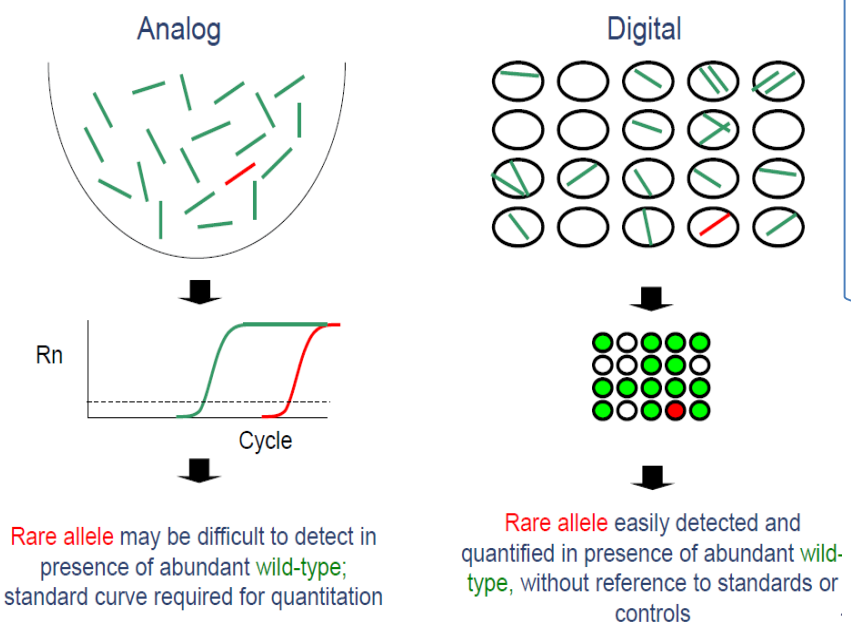
Sobrenadante viral 1/100

CONCLUSION

-Únicamente el sobrenadante viral dil 1/100 entra en el rango de cuantificación fiable (λ=0,6-1,59).

VENTAJAS DE LA PCR DIGITAL
(vs RT-PCR)

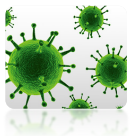
- ✓ No es necesario depender de referencias o estándares.
- ✓ Determinación absoluta y precisa del número de copias.
- ✓Alta tolerancia a los inhibidores y capacidad para analizar mezclas complejas.
- ✓ Transferencia sencilla de ensayos de qPCR a dPCR.
- ✓ Detección de pequeños cambios de expresión.
- ✓Comparada con la qPCR a tiempo real es, más sensible , específica y precisa.



Aplicaciones de PCR digital

Cuantificación absoluta:

Medida del número de copias por unidad de volumen sin necesidad de curva estándar.

- Cuantificación de la carga viral. 
- Cuantificación y generación de estándares y de referencia.
- Detección de patógenos de bajo nivel.
- Detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente (GMO).

Cuantificación relativa:

Esta aplicación permite cuantificar la cantidad de un objetivo en relación con el material genético total.

- Variación del número de copias de alta precisión (CNVs).
- Análisis de mutaciones raras.
- Detección de pequeñas diferencias de expresión génica.

Bibliografía: utilización PCR digital

Control alimentario de fraudes, trazabilidad

Food Chemistry
Volume 173, 15 April 2015, Pages 1054-1058

Analytical Methods

Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR)

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2014, Article ID 810209, 6 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2014/810209

Research Article

Quantitative Analysis of Pork and Chicken Products by Droplet Digital PCR

Caracterización y utilización de materiales de referencia

Biomol Detect Quantif. 2016 May 3;10:47-49. eCollection 2016.

Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials.

Bhat S[1], Emslie KR[1].

SCIENTIFIC REPORTS

Article | OPEN | Published: 30 November 2018

Evaluation of droplet digital PCR and next generation sequencing for characterizing DNA reference material for KRAS mutation detection

Lianhua Dong, Shangjun Wang, Boqiang Fu & Jing Wang

Scientific Reports **8**, Article number: 9650 (2018) | Download Citation

Detección y cuantificación de microorganismos patógenos

Advances in Microbiology, 2013, 3, 403-411
http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.35055 Published Online September 2013 (http://www.scirp.org/journal/aim)

Quantification of Zoonotic Bacterial Pathogens within Commercial Poultry Processing Water Samples Using Droplet Digital PCR

Michael J. Rothrock Jr.[1*], Kelli L. Hiett[2], Brian H. Kiepper[3], Kim Ingram[1], Arthur Hinton[1]

frontiers in Microbiology | Food Microbiology

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE
Front. Microbiol., 24 January 2017 | https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00053

Evaluation of Molecular Methods for the Detection and Quantification of Pathogen-Derived Nucleic Acids in Sediment

Kata Farkas[1], Francis Hassard[1], James E. McDonald[1], Shelagh K. Malham[1] and Davey L. Jones[1]

Microbiología alimentaria

Journal of Microbiological Methods
Volume 118, November 2015, Pages 37-41

Quantification of *Listeria monocytogenes* cells with digital PCR and their biofilm cells with real-time PCR

Detección y cuantificación de alérgenos

European Food Research and Technology
February 2019, Volume 245, Issue 2, pp 499–509 | Cite as

Quantification of the allergen soy (*Glycine max*) in food using digital droplet PCR (ddPCR)

Ital J Food Saf. 2018 Dec 31; 7(4): 7264.
Published online 2019 Feb 11. doi: 10.4081/ijfs.2018.7264

Detection of fish allergen by droplet digital PCR

Cuantificación de GMOs

Biomol Detect Quantif. 2019 Mar; 17: 100076. PMCID: PMC6446038
Published online 2019 Feb 11. doi: 10.1016/j.bdq.2018.12.001 PMID: 30984566

Development of event-specific qPCR detection methods for genetically modified alfalfa events J101, J163 and KK179

Anal Bioanal Chem. 2018; 410(17): 4039–4050. PMCID: PMC6010488
Published online 2018 Mar 24. doi: 10.1007/s00216-018-1010-1 PMID: 29574561

Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms

Microbiología clínica

Archives of Virology
March 2019, Volume 164, Issue 3, pp 691–697 | Cite as

Development of a sensitive and reliable reverse transcription droplet digital PCR assay for the detection of citrus yellow vein clearing virus

ELSEVIER
Molecular and Cellular Probes
Volume 43, February 2019, Pages 50-57

Development of a droplet digital PCR assay for sensitive detection of porcine circovirus 3

Diagnóstico molecular

BMC Cancer. 2018; 18: 676. PMCID: PMC6013872
Published online 2018 Jun 22. doi: 10.1186/s12885-018-4601-5 PMID: 29929476

Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serve as a promising diagnostic method for gastric cancer

Gaoping Zhao,[1,2,3] Tao Jiang,[1,2] Yanzhuo Liu,[2] Guoli Huai,[2] Chunbin Lan,[1,2] Guiquan Li,[4] Guiqing Jia,[1,2] Kang Wang,[1,2] and Maozhu Yang[2,3,5]

…para cualquier consulta podéis contactar con el grupo responsable (LAGENBIO) o utilizar la página web del IA2

¡¡¡¡GRACIAS POR VUESTRA ATENCIÓN!!!!