



GeT
Génome et
Transcriptome

Plateforme GeT-PlaGe

<http://get.genotoul.fr>

Sophie Valière

- Lundi 13 mai 2013 -

- Salle de séminaire du pôle - Centre INRA de Toulouse -



GET
Génome et
Transcriptome

Droplet Digital PCR Bio-Rad

Equipements

QX100 Droplet Generator:

1 échantillon = 20 000 gouttelettes

QX100 Droplet Reader:

Analyse individuelle des gouttelettes générées
Système de détection optique à 2 couleurs



QX100 Droplet Reader & QX100 Droplet Generator

WorkFlow



Mix - Load - Generate

1- Préparation des échantillons/ Mix et chargement

Amorces et sondes TaqMan
(FAM, VIC ou HEX)
Mix Bio-Rad ddPCR
H2O
ADN/ARN



Top wells (droplets)
Middle wells
(20 μ l sample)
Bottom wells (70 μ l oil)

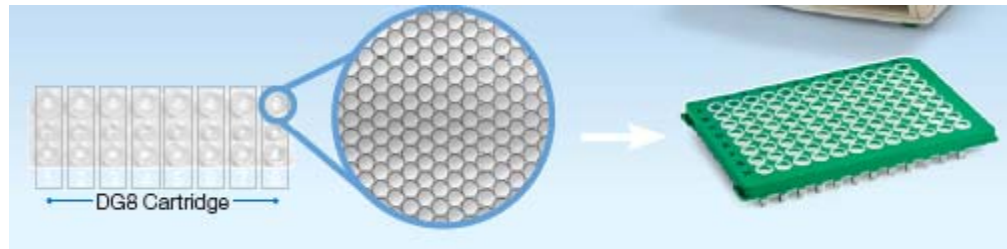
2- Génération des gouttelettes



QX100 Droplet Generator

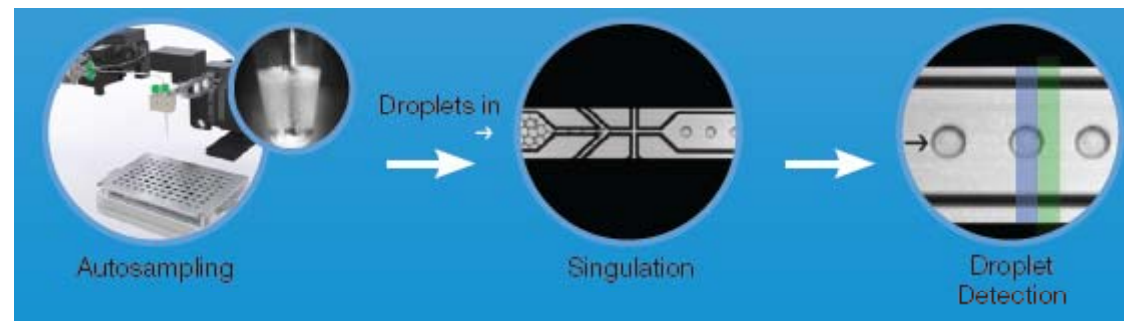
Transfer - Amplify - Read

3- Transfert et Amplification PCR



C1000 Touch Thermal Cycler
plaque 96

4- Lecture sur le QX100 Droplet Reader



1 aiguille => lecture puits/puits

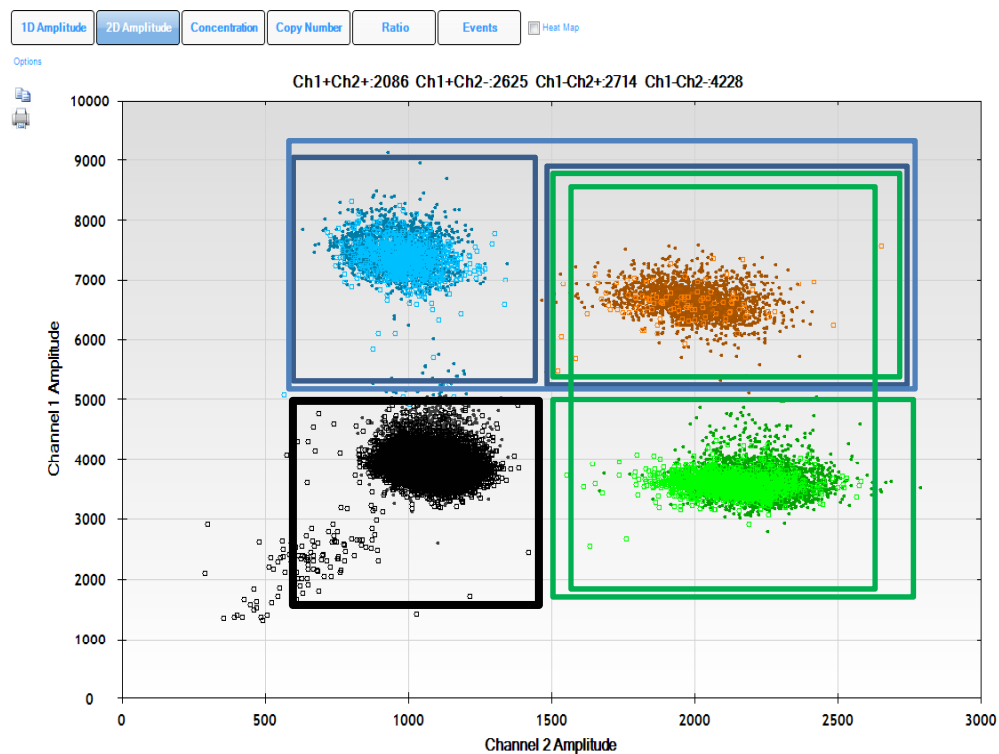
Lecture des gouttelettes + et – pour chaque éch

Détecte la fluorescence de chaque gouttelettes

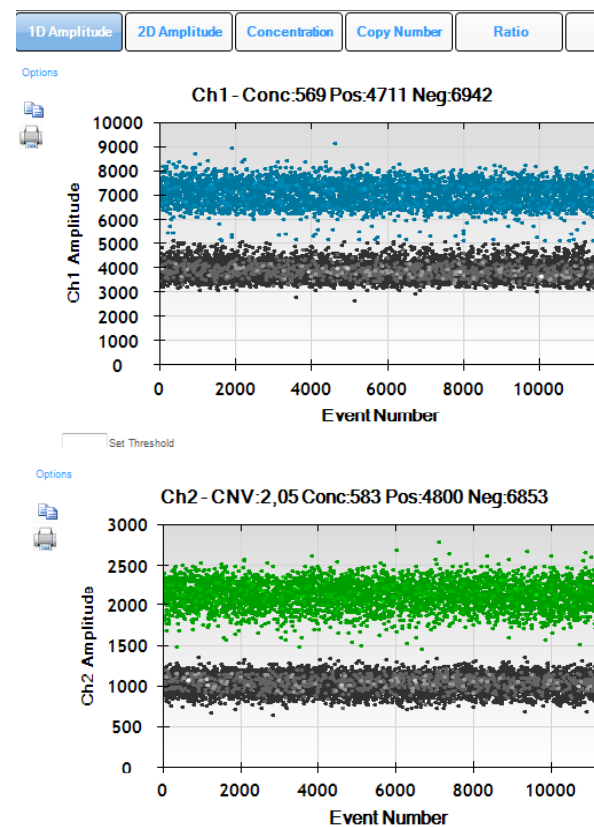
Logiciel d'Analyse

- Visualisation des échantillons 2D et 1D
- Calcul des concentrations en nb de molécules/μl
- Calcul du nombre de copie
- Calcul du ratio Fluo1/Fluo2
- Calcul du nombre de gouttelettes comptées/ech

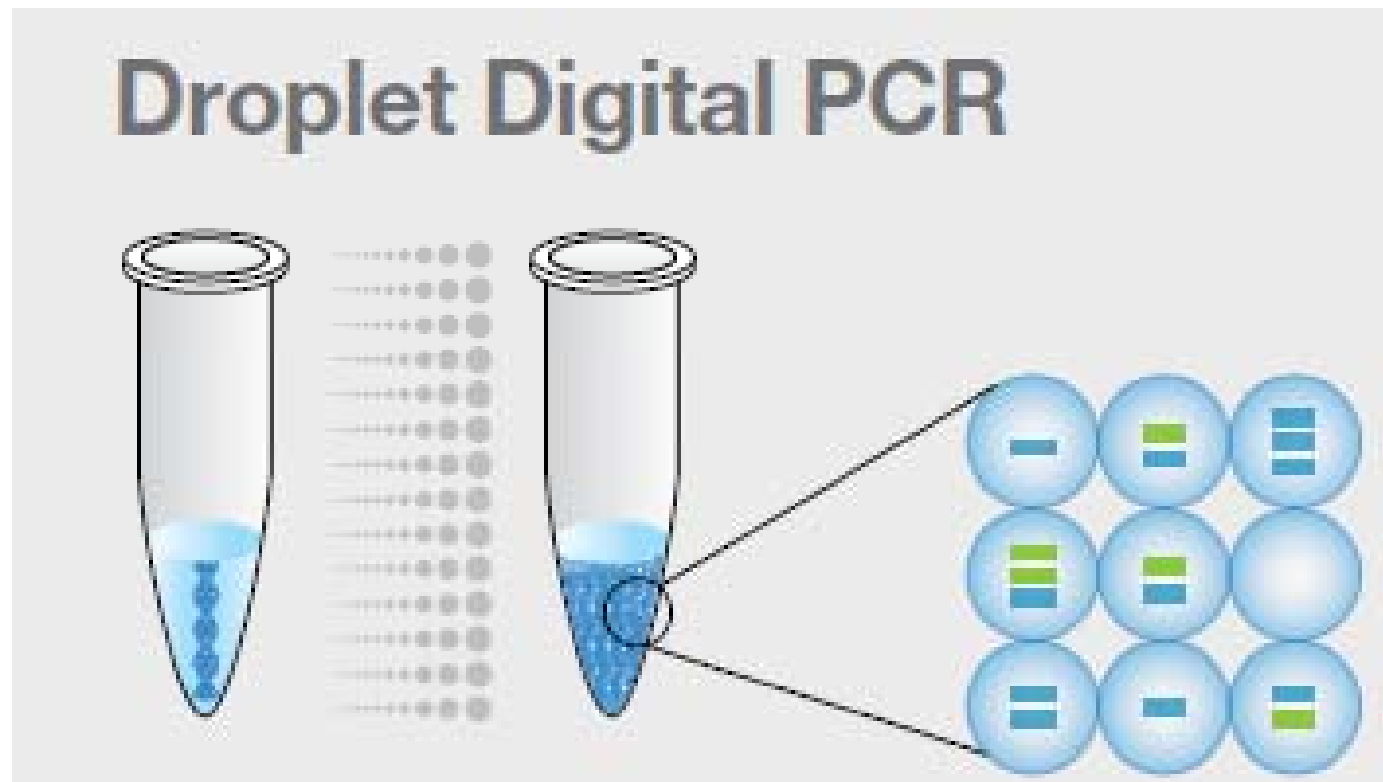
Représentation 2D des résultats



Représentation 1D des résultats



Correction par la loi de Poisson



Démarche Globale

- 1- Tester les amorces et les sondes sur un appareil de qPCR classique
- 2- Digérer les échantillons (CNV)
- 3- Optimiser la T_m des amorces sur la ddPCR
- 4- Réaliser la manip de ddPCR
- 5- Analyse des résultats

Investissement

QX100 Droplet Generator	75 000 €
QX100 Droplet Reader	
C1000 Touch Thermal Cycler plaque 96	8 000 €
PX1™ PCR Plate Sealer	3 200 €
86 200 €	

Consommables

		Plaque
Gasket (1 paquet de 24= 2 plaques)	192 €	96 €
Cartridge (1 paquet de 24= 2 plaques)	55 €	27,50 €
Plaques PCR TWIN TEC 96 puits semi jupes Eppendorf	105 €	4,20 €
Films thermoscellables, non pelables, et perçables (100 feuilles)	80 €	0,80 €
support Cartridge (1 paire livrée avec le générateur) facultatif	470 €	
		128,50 €

1.34 € / puits

Réactifs

		Plaque
ddPCR Supermix for probes 5 ml (1 tube = environ 1 plaque)	395 €	79 €
huile pour la génération des droplets (10 x 7 ml = 100 réactions, 10 plaques)	240 €	2,40 €
Huile de lecture (2 x 1 L = 10 plaques)	675 €	67,50 €
		148,90 €

1.55 € / puits

Avantages / Inconvénients

Avantages:

- Quantification absolue: pas de courbe étalon et pas de calcul du $\Delta\Delta C_t$
- Détection de cibles rares milieux complexes
- CNV
- Fiabilité et reproductibilité des résultats
- Calculs automatisés des concentrations et des CNV : **Analyse facilitée!**

Inconvénients:

- Utilisation de sondes hydrolyses 6-FAM et HEX (95 € la sonde), VIC (TaqMan :280€) => assez couteuses
- Côté logiciel: import Excel pas disponible (pour l'instant)

Applications

Quantification Absolue

- ✓ Quantification du nombre de copies intégrées de vecteur lentiviral par ddPCR - **Régis Gayon – Vectalys**

Analyse de CNV

- ✓ Etude d'un CNV impliqué dans la coloration de la robe chez le porc. **Katia Fève - INRA LGC**
- ✓ Analyse CNV des gènes de la fertilité sur le chromosome Y: résultats du premier test avec le QX100 pour patients et témoins » **Stéphanie Schiavinato / Patricia Balaesque - UMR5288 Laboratoire Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse**

Allèles spécifiques

- ✓ Validation de résultats HiSeq par deux technologies (ddPCR et Pyroséquençage) : application à la quantification de l'expression allélique dans l'embryon de poulet - **Laure Frésard / Sophie Leroux - INRA LGC**



GET
Génome et
Transcriptome

Merci