

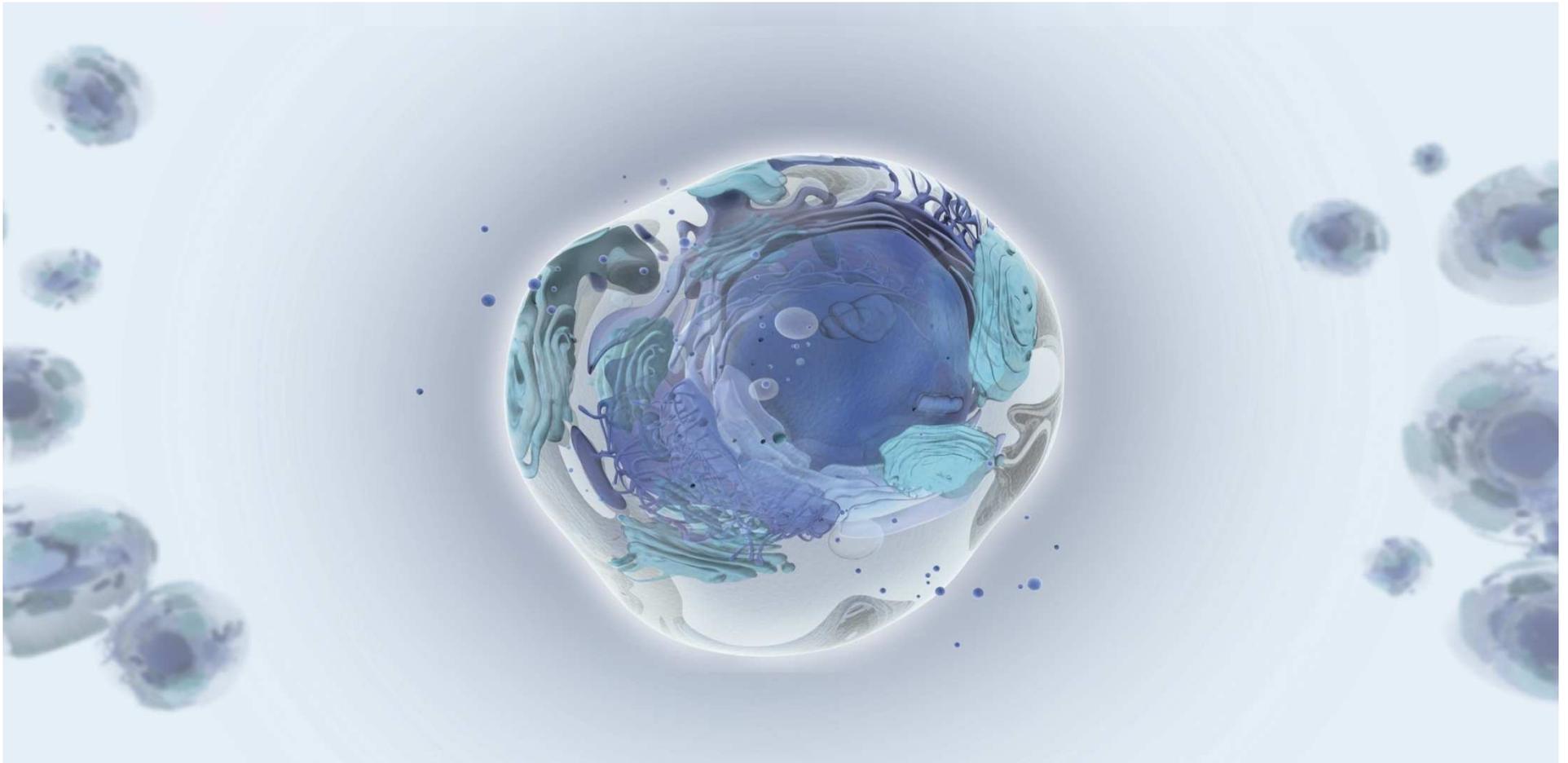
Les nouveaux outils pour réussir la qPCR



I2MC

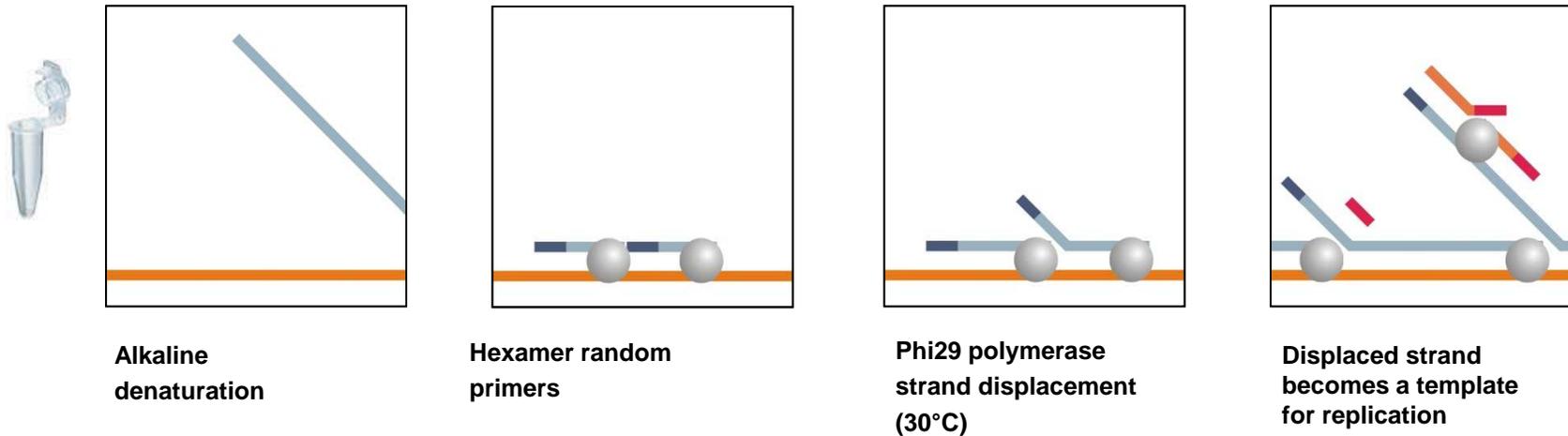
13 octobre 2016

Hélène BAUBY
Spécialiste BRC-uNGS



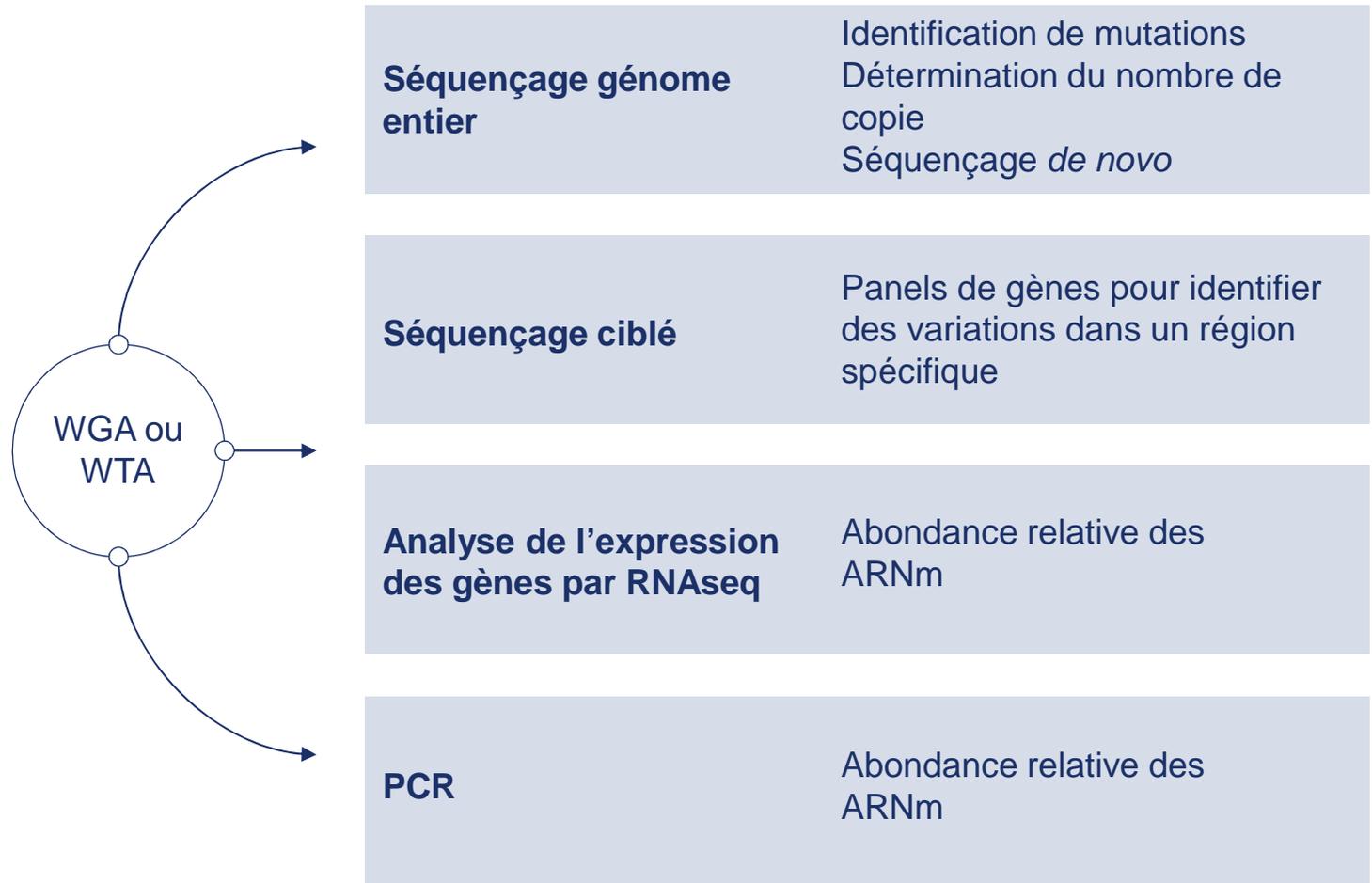
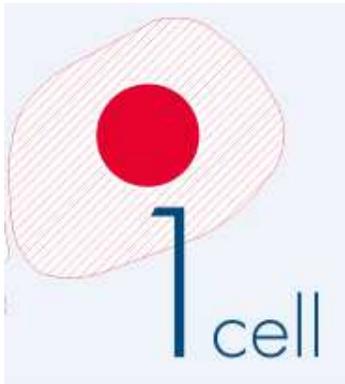
Single-cell genomics :
Famille des produits REPLI-g et Single Cell

MDA : Multiple Displacement Amplification



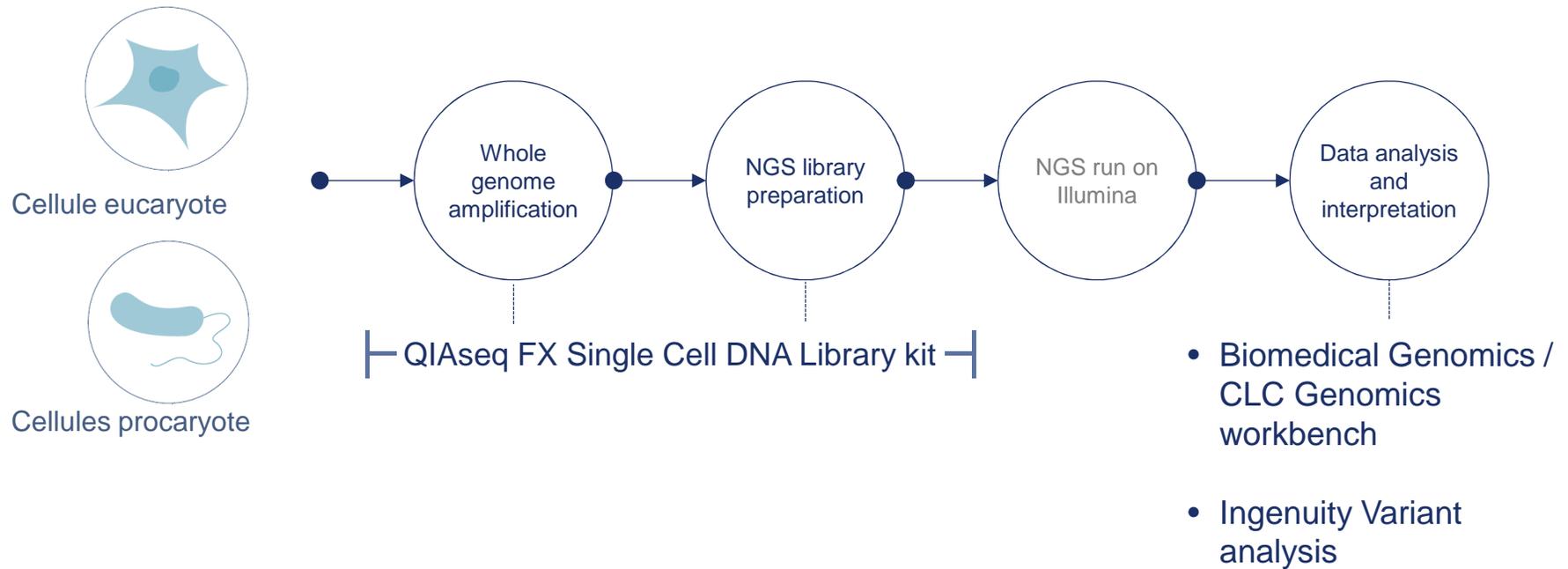
- Dénaturation douce – la matrice ADN reste intacte
- Alignement des random primers – amplification homogène sur tout le génome
- Enzyme Polymérase Phi29 haute-fidélité modifiée (SensiPhi)
 - Processivité accrue – taille des fragments : 10-100 kb
 - Activité de relecture environ 1000 fois plus efficace qu'une Taq classique
- Amplification par déplacements multiples

(1) J.Liang et al., Journal of Genetics and Genomics 41 (2014) 513-528





Identification de variations dans le génome



● Analyse du génome d'une cellule unique – technologie REPLI-g



QIAseq FX Single Cell DNA Library kit

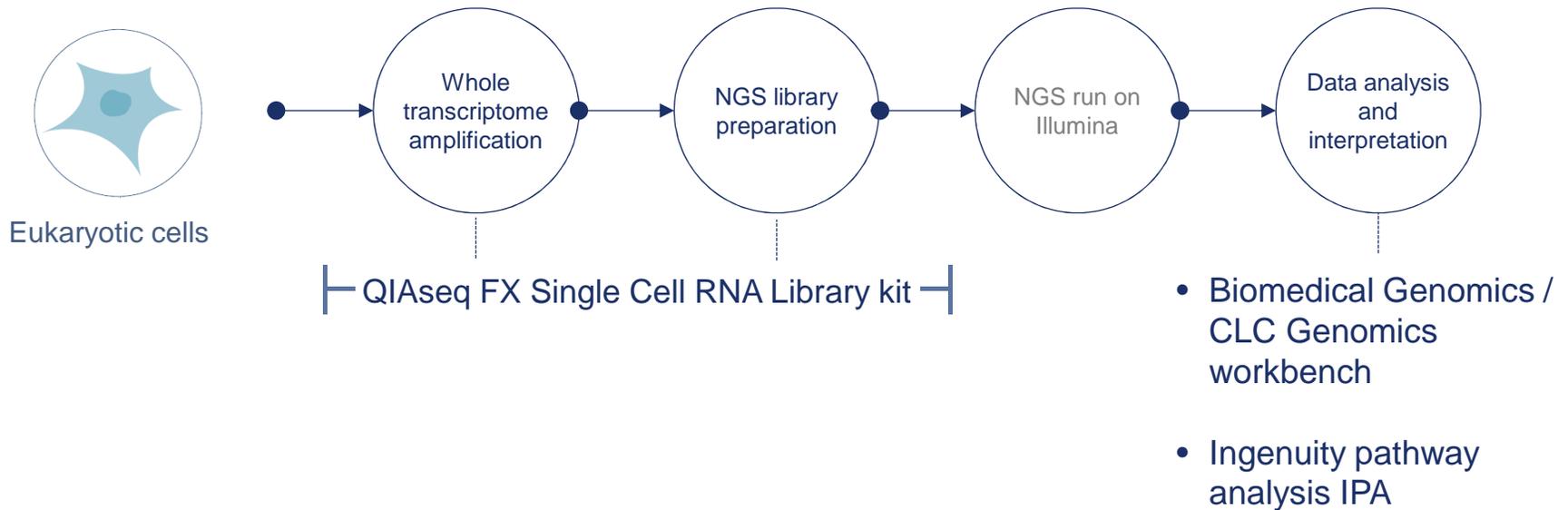
Pour du séquençage whole genome ou whole exome sur Illumina. Détection de mutations rare, cancer, neuroscience, maladies infectieuses, microbiome

- Workflow complet, de la cellule à la librairie, en un kit comprenant la fragmentation enzymatique
- Librairie sans PCR, pas de duplicat, biais GC réduit

Bénéfices

- Couverture complète du génome, génération de données plus fiables
- Amplification du génome HiFi, détection de variants en faibles quantités
- Workflow sans PCR, pas de duplicats, pas de biais
- Adaptateurs à usage unique, pas de contaminations croisées
- Compatible avec eukaryotes et bactéries
- Echantillon : 1-1000 cellules ou 1-10 ng d'ADN Eu / 6-100 pg d'ADN Bactérien
- Rendement WGA 15-40 µg selon taille de l'échantillon
- Concentration librairie : 2 nM-35 nM selon la quantité de WGA utilisé

Librairie NGS sans PCR réalisée sur Cellule unique en seulement 3 heures. Haute fidélité et couverture maximale du genome.



● Comprendre les regulations de l'expression des gènes dans une cellule unique



QIAseq FX Single Cell RNA Library kit

RNAseq sur plateforme **illumina** : cancer, neuroscience, maladie infectieuses, virologie, développement

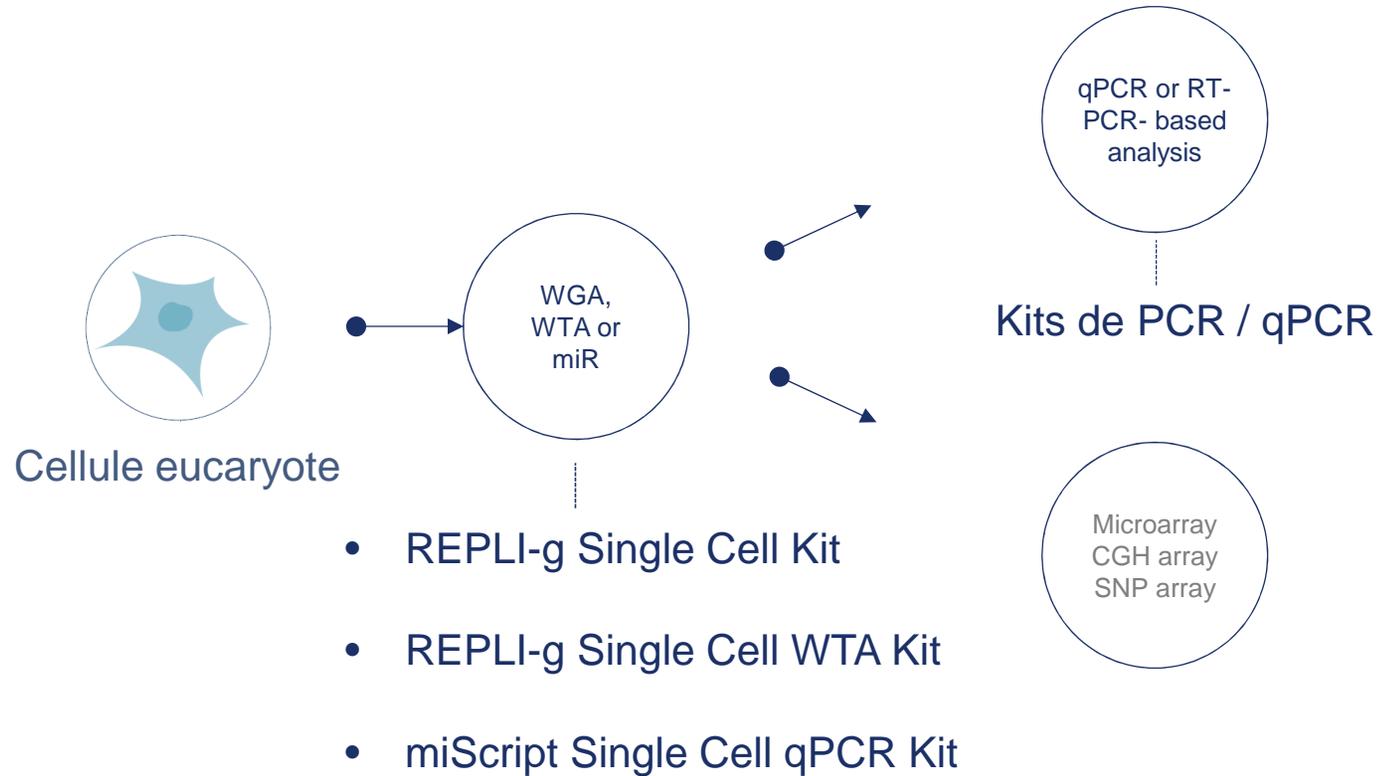
- Analyse d'expression de gènes, d'hétérogénéité cellulaire, découverte et quantification de transcrit
- 5.5 heures, 1 heure de manip en cumulé

Bénéfices

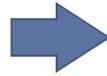
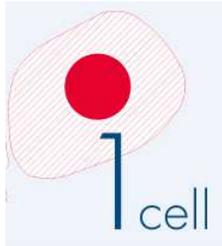
- ARNm et ARN non codant
- Pas de PCR, pas du duplicat
- Workflow complet, de la cellule à la librairie (RT, ADNc, librairie)
- Prix catalogue bas, permettant l'analyse de plus d'échantillons pour le même budget (pouvoir statistique)
- Amplification Whole transcriptome High-fidelity : beaucoup moins d'erreurs
- Echantillon : 1 à 1000 cellules, 10 pg-10 ng d'ARN
- Rendement minimum de 26 μ L avec une concentration supérieure à 4 nM. Rendement minimum de la WTA : \sim 15 μ g d'une seule cellule eukaryote. Congélation possible.



● Solution complète pour le RNAseq sur cellule unique. Création de librairie avec un biais réduit, étude des ARNm et des ARN non codants.



● La bonne solution pour votre projet

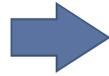
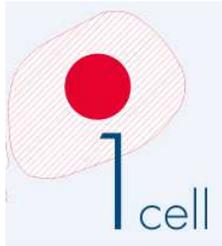
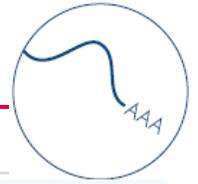


**ADN amplifié
Pas de PCR**



- Le gold standard pour les applications sensibles
- Haut rendement, conservation de l'ADN pour de futures analyses
- Construction de librairies de haute qualité
- Analyses possibles :
 - NGS
 - Microarray
 - PCR
 - Multiple analyses from 1 single cell

(1) Zhang, C.-Z. et al. (2015) Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. Nature, published online 27 May 2015. **6**, 6822.



**ADNc amplifié
Pas de PCR**



- Conservation des ARNm d'une cellule unique sous forme d'ADNc (MDA – multiple displacement amplification)
- Compatible avec la qPCR, le NGS ou les microarray
- Protocole combinant les PolyA et les random primers (conservation de tous les ARN)
- Analyses possibles :
 - NGS
 - Microarray
 - PCR
 - Multiple analyses from 1 single cell



Portail « Single Cell » : www.qiagen.com/SingleCellAnalysis



Shop

Products

Resources

Support

About QIAGEN

Careers

Hello Hélène BAUBY ▾



Resources

- ▶ GeneGlobe
- ▶ Search Resources
- ▼ Knowledge Area
 - Liquid Biopsy
 - Reproducibility through automations
 - Sample Quality Control
 - Microbiology & Microbiome
 - ▼ **Single Cell Analysis**
 - RNA Sequence Analysis of Single Cells by NGS
 - Whole Genome Sequencing of Bacterial or Eukaryotic Single Cells
 - Targeted Sequencing Starting with Single Cells
 - Array and PCR-based Analysis of Single Cells
 - miRNA qPCR-based Analysis
 - Single Cell Knowledge Hub
- ▶ Technologies
- ▶ e-Learning
- ▶ Mol. Biol. Methods
- ▶ Find & Order
- ▶ Event Calendar
- ▶ Product Selection Guides
- ▶ Innovations & Insights
- ▶ Apps



Single cells, multiple details – simplify the complexity!

Every cell is unique. QIAGEN's solutions accelerate single cell analysis in diverse research areas, from oncology, immunology and microbiology to neuroscience, stem cell and developmental biology, allowing you to access the smallest dimensions of biological research. Decipher the genomic and transcriptomic differences between cells and uncover the heterogeneity in your sample for new biological insights. Enter the world of the single cell through this dedicated resource site and explore single cell applications and discover products that best match your needs. Take advantage of our extensive knowledge hub to access informative resources including webinars, posters, videos and scientific publications.

Contact QIAGEN

- ▶ Global contacts
- ▶ Technical Service
- ▶ Customer Care

New Video! MDA is the Preferred Method for WGA



▶ Discover why

Single cell whole genome libraries



▶ Discover the QIAseq FX Single Cell DNA Library Kit



RNA Sequence Analysis of Single Cells by NGS

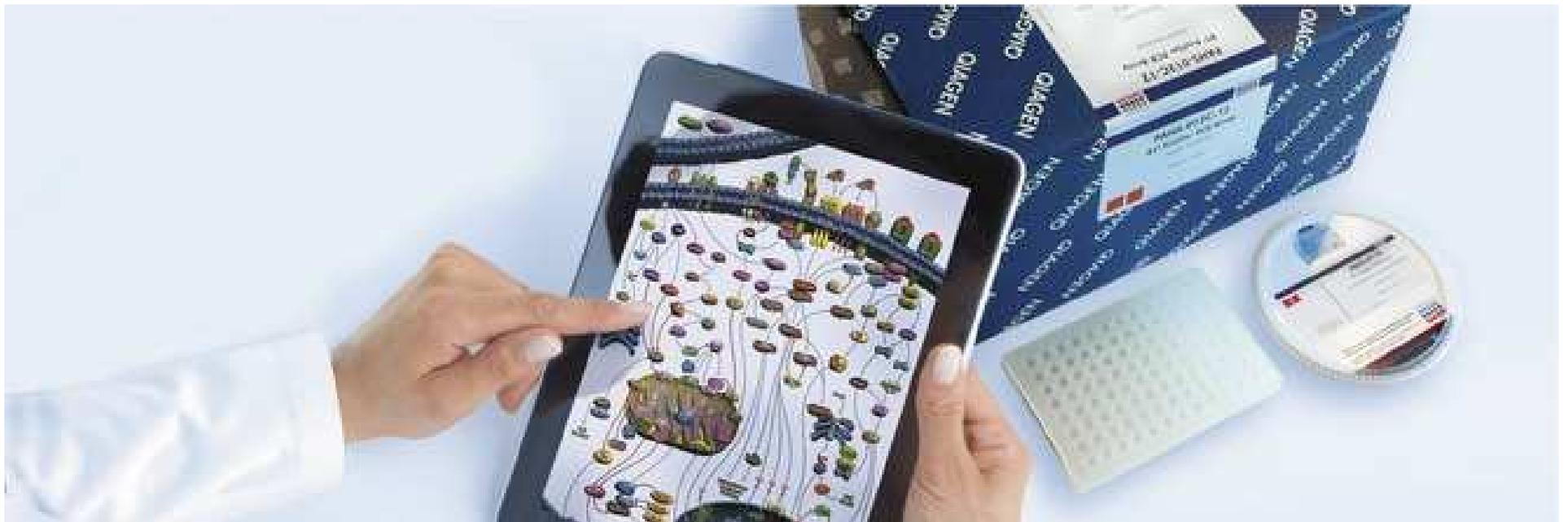
Discover more with greater power with our robust and complete end-to-end solution, making single cell RNA-seq streamlined and routine.

- ▶ Gain an understanding of single cells



Whole Genome Sequencing of Bacterial or Eukaryotic Single Cells

RNA-seq libraries from single cells



Etude de l'expression de gènes : Système RT2 Profiler PCR

Comment se présente une plaque RT2 Profiler ?

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	GDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Housekeeping
genes

Genomic
DNA
control

Reverse
transcription
controls

Positive
PCR controls

- 84 gènes d'intérêts (spécifique d'une voie de signalisation)
- 5 gènes de ménages
- **GDC** : contrôle de contamination ADNg
- **RTC** : contrôle de la transcription inverse
- **PPC** : contrôle positif de la PCR

Tous les couples de primers ont été développés pour des performances optimales
Toutes les plaques sont validées à la pailleasse

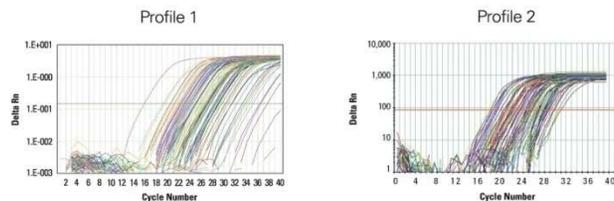
1. Convert Total RNA to cDNA.



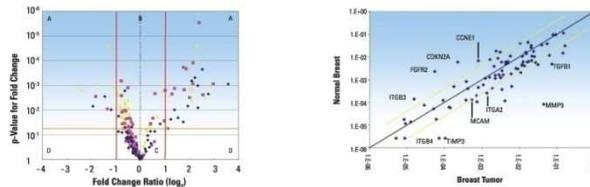
2. Add cDNA to RT² qPCR Master Mix & Aliquot Mixture Across PCR Array.



3. Run in Your Real-Time PCR Instrument.



4. Data Analysis.



■ Synthèse des ADNc

- Genomic DNA Removal Step (5 min)
- Reverse Transcription Step (20 min)

■ Chargement de la plaque

- 1 échantillon par plaque
- Quelques minutes à la pipette multicanaux

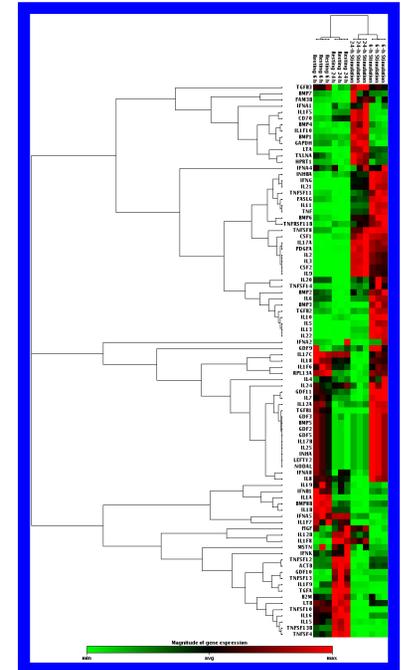
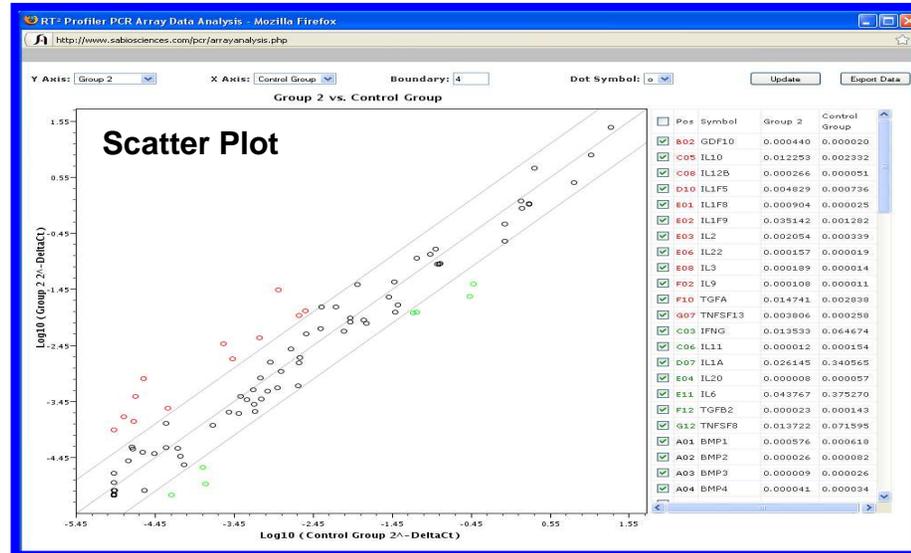
■ Run de qPCR – 40 cycles

- Conditions standards
- Tous les instruments
- 2 heures

■ Analyse des données

- Quelques minutes pour le contrôle qualité, la normalisation et les calculs de $\Delta\Delta Ct$

- Logiciel gratuit accessible en ligne
- Résultats en Fold changes
 - Méthode $\Delta\Delta C(t)$ Method
- Analyse complète
 - Scatter Plot
 - Volcano Plot
 - Multi-Group Plot
 - Clustergram



- **Applied Biosystems (ABI)**

- Standard 96-Well Blocks: 7000, 7300, 7500, 7700
- FAST 96-Well Blocks: 7500, 7900HT
- FAST 384-Well Block: 7900HT
- StepOnePlus



- **Bio-Rad**

- iCycler, MyiQ, iQ5, CFX96
- MJ Research: Opticon, Opticon 2, Chromo 4



- **Stratagene**

- Mx3000p, Mx3005p, Mx4000p



- **Roche**

- LightCycler 480



- **Eppendorf**

- Masterplex ep



- **Fluidigm**

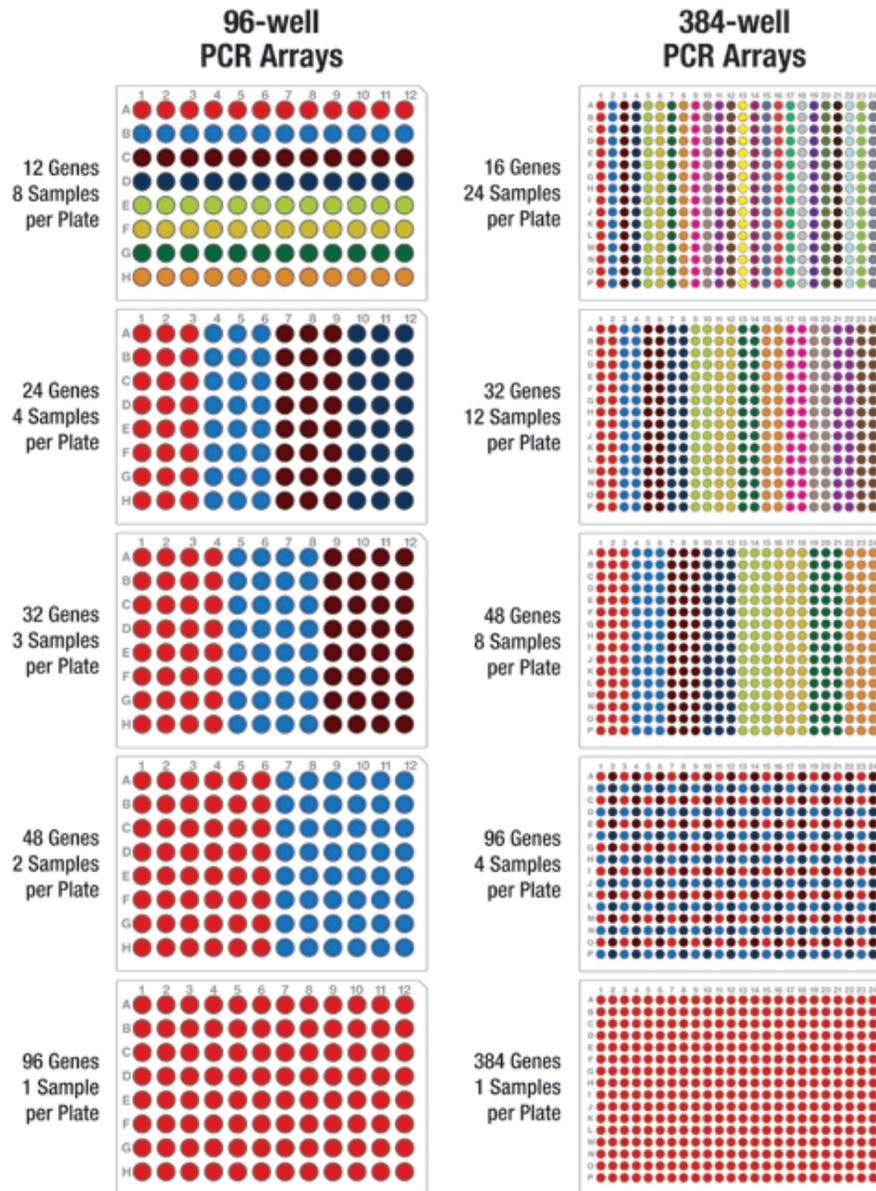
- Biomark



- **Takara**

- TP800





Analyse des gènes importants pour vous

- N'importe quel instrument
- Plaques Custom prêtes en 2 à 3 semaines
- Analyse toujours gratuite



Exemples de plaques – différentes espèces

Cancer and Apoptosis	Cytokines & Inflammation	Development & Stem Cells
<u>Apoptosis</u>	<u>Inflammatory Cytokines</u>	<u>Stem Cells</u>
<u>Cell Cycle</u>	<u>Th17 for Inflammation (NEW!)</u>	<u>Wnt Signaling</u>
<u>Human miRNA Array (NEW!)</u>	<u>Common Cytokines</u>	<u>Notch Signaling</u>
<u>Breast Cancer & Estrogen Receptor</u>	<u>Chemokines</u>	<u>TGFβ / BMP Signaling</u>
<u>Tumor Metastasis</u>	<u>NF-κB Signaling Pathway</u>	<u>Endothelial Cell Biology</u>
<u>Cancer PathwayFinder</u>	<u>Th1-Th2-Th3</u>	<u>Osteogenesis</u>
<u>Angiogenesis</u>	<u>TNF Ligands</u>	<u>Growth Factors</u>
<u>Cancer Drug Resistance</u>	<u>Toll-like Receptors</u>	<u>ECM & Adhesion</u>
Signal Transduction	Toxicology & Drug Metabolism	Neuroscience
<u>Signal Transduction PathwayFinder</u>	<u>Drug Metabolism</u>	<u>Neuroscience Ion Channels</u>
<u>NFκB Signaling</u>	<u>Drug Phase I Enzymes</u>	<u>Neurotransmitter Receptors</u>
<u>Jak / Stat Signaling</u>	<u>Drug Transporters</u>	<u>Neurotrophins & Receptors</u>
<u>DNA Damage Signaling</u>	<u>Oxidative Stress</u>	<u>Neurogenesis and Neural Stem Cell</u>
<u>Insulin Signaling</u>	<u>Stress & Toxicity</u>	
<u>MAP Kinase Signaling</u>	Other Diseases	Custom PCR Arrays
<u>cAMP / Calcium Signaling</u>	<u>Atherosclerosis</u>	<u>96-Well Custom Arrays</u>
<u>p53 Signaling</u>	<u>Diabetes</u>	<u>384-Well Custom Arrays</u>
	<u>Complete PCR Array List</u>	



Les rôles de l'épigénétique en biologie
Technologies de détection des modifications
épigénétiques

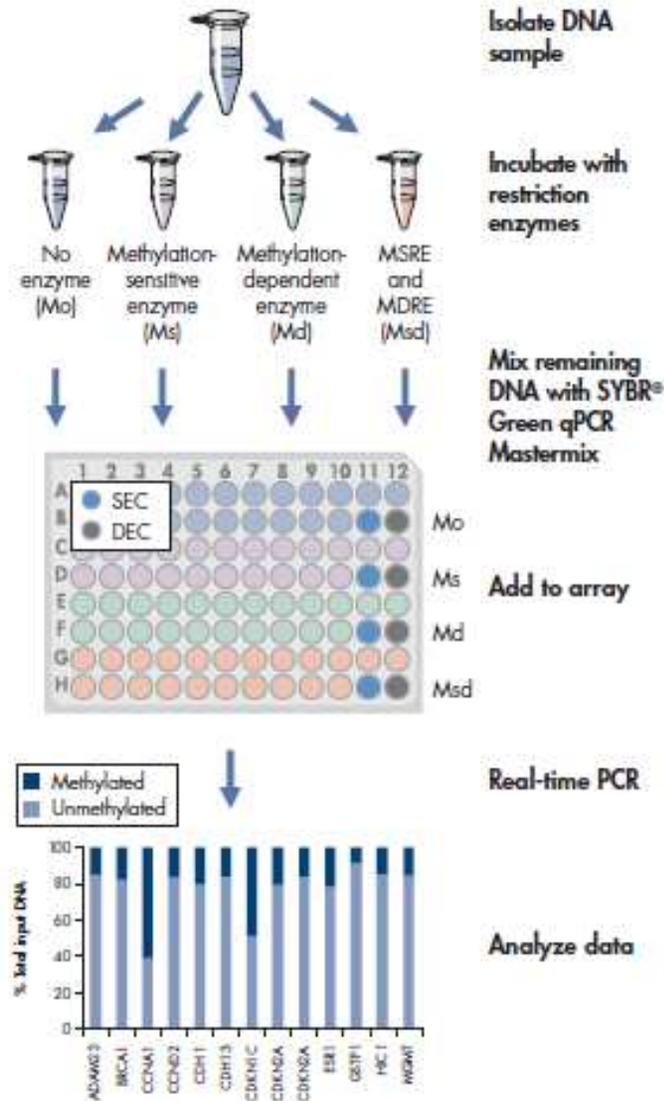
Modifications épigénétiques

- ❑ Méthylation de l'ADN
- ❑ Dé-acétylation des histones
- ❑ miRNA

Méthodes de détection de la méthylation

- ❑ PCR méthylation-spécifique (MSP)
- ❑ Conversion bisulfite / séquençage Pyroséquençage, NGS
- ❑ Analyses par enzymes méthylation spécifiques/ dépendantes

Workflow of EpiTect Methyl II PCR Array System





Basée sur la détection quantitative de molécules d'ADN restantes après traitement avec des **enzymes de restriction méthylation-sensibles (MSRE)** et **méthylation dépendantes (MDRE)**

Enzyme	Fonctionnement	ADN restant
MOCK	Pas d'enzyme	Fraction entière
MSRE	Digère les copies non-méthylées et partiellement méthylées	Fraction méthylée
MDRE	Digère les copies méthylées et partiellement méthylées	Fraction non méthylée
MSRE & MDRE (Double)	Digère les copies non-méthylées, partiellement méthylées et méthylées	Fraction résistante aux enzymes de restriction



Maladies & voies de signalisation : DNA Methylation PCR Arrays

Disease-focused

Breast Cancer

Cancer miRNA

Colon Cancer

Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)

Gastric Cancer

Leukemia & Lymphoma

Liver Cancer

Lung Cancer

Melanoma

Prostate Cancer

Tumor Suppressor Genes

Pathway-focused

Apoptosis

Cell Cycle

Cytokine Production

DNA Repair

Homeobox (HOX) Genes

Inflammatory Response and Autoimmunity

Mental Disorders

Notch Signaling Pathway

Polycomb & Trithorax Complexes

Stem Cell Transcription Factors

Stress & Toxicity

T Cell and B Cell Activation

T Helper Cell Differentiation

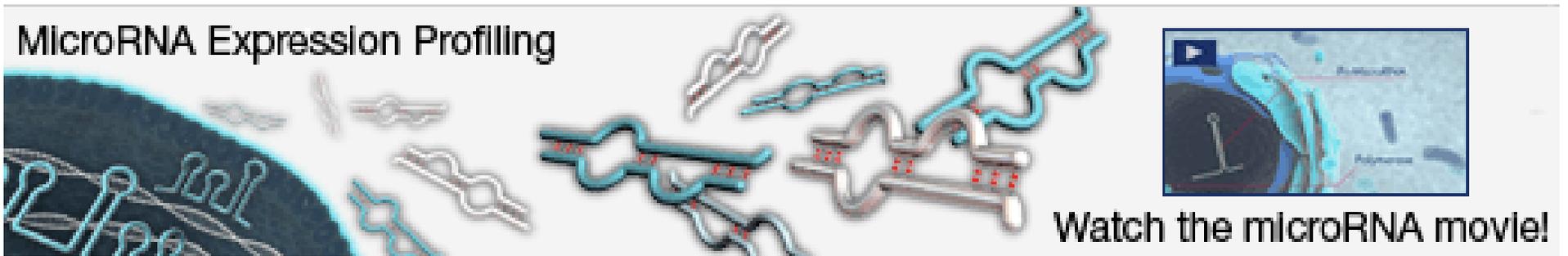
Tumor Suppressor Genes

Toll Like Receptor Signaling

TGF- β /BMP Signaling

Wnt Signaling

MicroRNA Expression Profiling



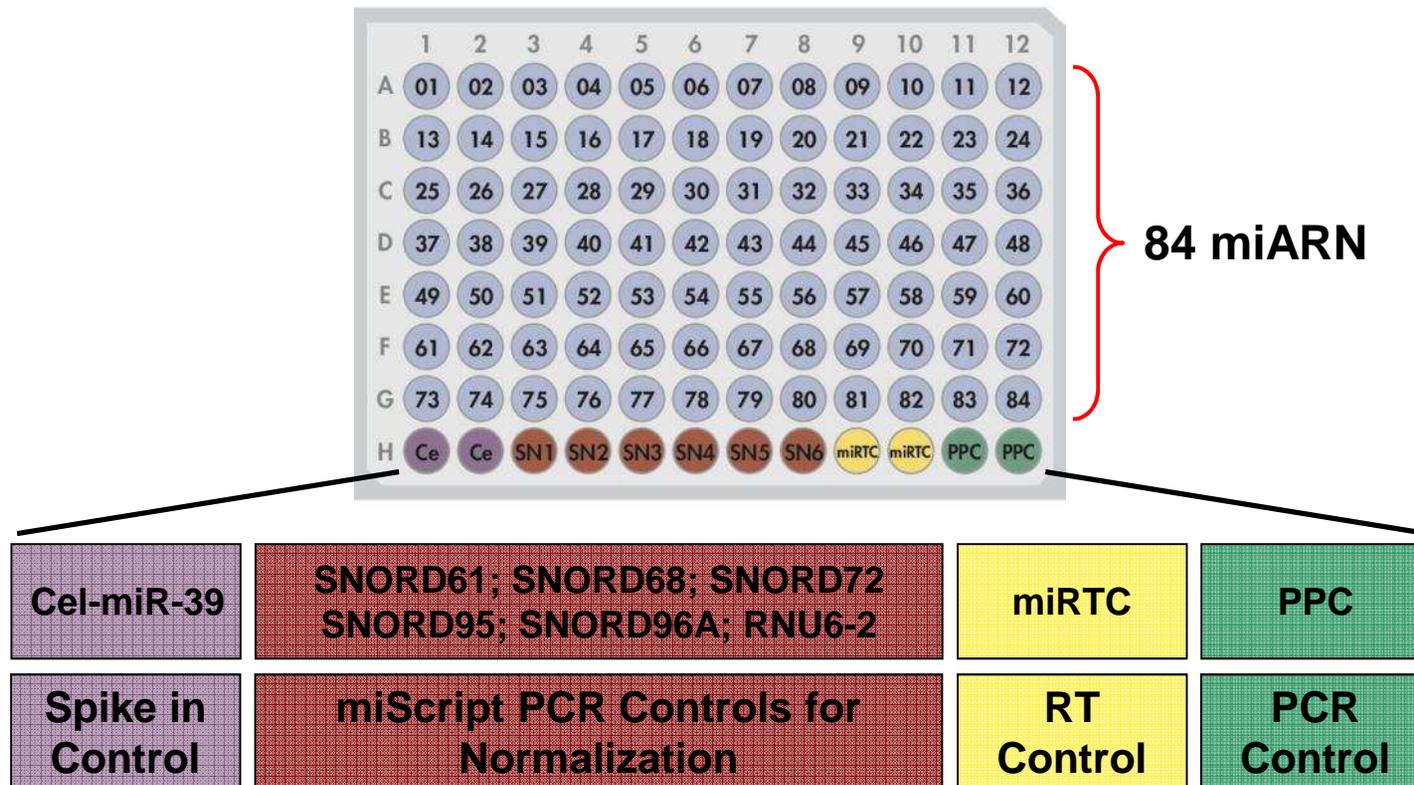
Watch the microRNA movie!

The diagram illustrates the process of microRNA expression profiling. It shows a cell with a nucleus and cytoplasm. In the cytoplasm, a microRNA (represented by a blue line) is shown binding to a target mRNA (represented by a grey line). This binding leads to the degradation of the target mRNA, as indicated by the red dots. A small inset image shows a microRNA being loaded into a protein complex, with labels for 'MicroRNA' and 'Protein'.

Etude des microARN – Système miScript

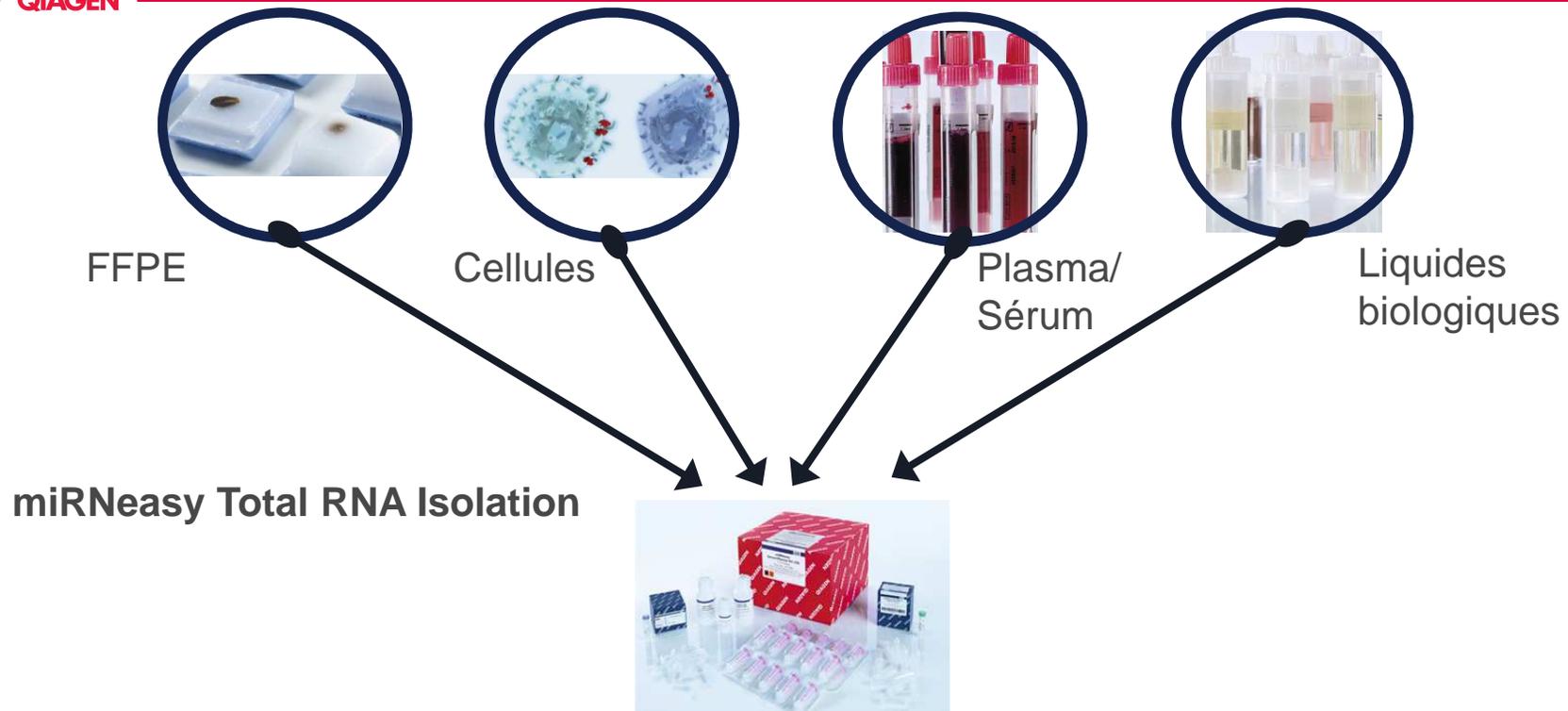
miScript miRNA PCR Arrays

Voies de signalisation : 84 miRNAs + 12 Contrôles



- **Cel-miR-39**
 - Méthode de normalisation alternative : Spike-In Syn-cel-miR-39 miScript miRNA Mimic
- **miScript PCR Controls**
 - Méthode de quantification $\Delta\Delta C_T$
- **miRNA reverse-transcription control (miRTC)**
 - Evaluation de la performance de l'étape de RT
- **Positive PCR control (PPC)**
 - Evaluation de la performance de l'étape de PCR

Echantillon : n'importe quel échantillon, n'importe quelle quantité



miScript PreAmp

- Permet le profiling de miARN à partir de quantités très limitées
 - Cellules ou tissus : 1 ng d'ARN
 - Fluides:
 - Sérum/plasma : 50 μ L
 - Urine
 - Liquide cérébro-spinal
 - Humeur aqueuse





Système complet de quantification des miARN

1. miScript II RT Kit Universel

2. miScript miRNA PCR Arrays

miRNome v16, v21

Voies de signalisation

3. miScript PreAMP Kit

Optional step for small or precious samples

Full miRNome profiling from as little as 1 ng RNA

4. Assays

miScript Primer Assays

miScript Precursor Assays

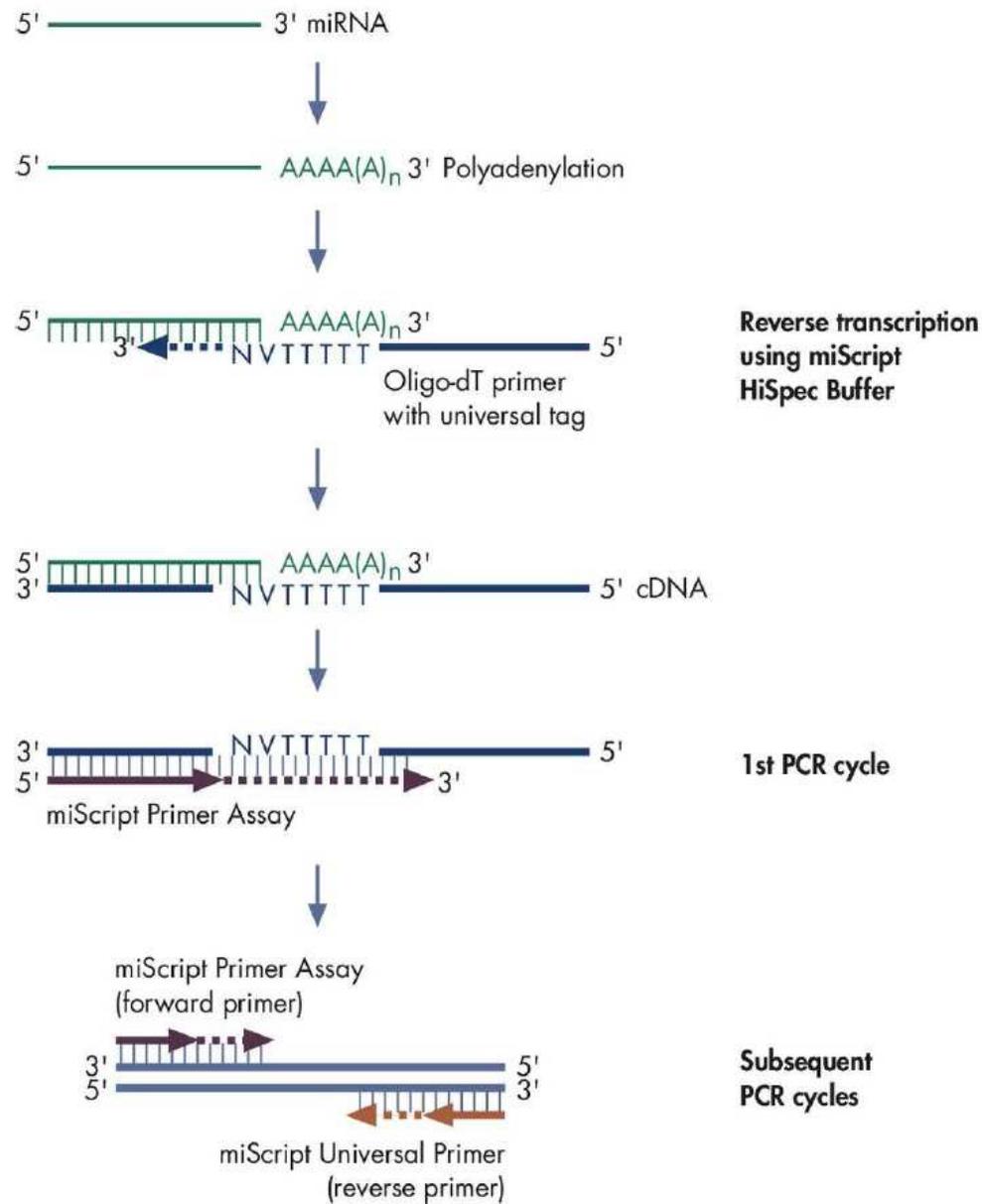
5. miScript SYBR Green PCR Kit

6. miScript miRNA PCR Array data analysis software

Logiciel d'analyse gratuit et facile à utiliser



miScript II RT Kit





Pertinence biologique

miFinder
Cancer PathwayFinder
Brain Cancer
Breast Cancer
Ovarian Cancer
Liver miFinder
Apoptosis
Cell Differentiation & Development
Immunopathology
Inflammatory Response &
Autoimmunity
Diabetes
Neurological Development &
Disease
T-Cell & B-Cell Activation
Prostate Cancer
Cardiovascular Disease
Serum & Plasma

100% validé

Chaque primer est validé à la
pailleasse

Chaque plaque est contrôlée
Remise à jour régulière pour
coller aux découvertes publiées

Personnalisable (Custom) Conversion d'espèce

Protocole miRNA PCR Array

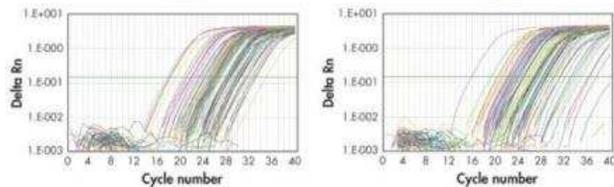
1. Convert miRNA to cDNA.



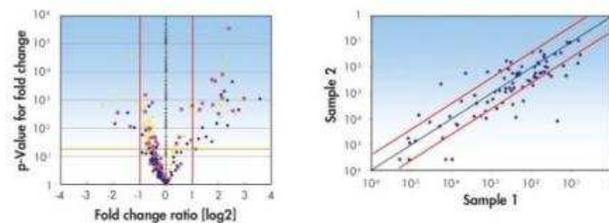
2. Combine cDNA to QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, miScript Universal Primer, and water. Aliquot mixture across miScript PCR Array.



3. Run in real-time PCR cycler.



4. Analyze data.



- Synthèse des ADNc depuis les miARN

⇒ **1 heure**

- Chargement de la plaque (à la pipette multicanaux)

⇒ **Quelques minutes**

- Programme de qPCR – 40 cycles

⇒ **2 heures**

- Analyse des données

⇒ **30 minutes**



Systeme miScript : plus que de la qPCR

- **Les outils miScript pour les études fonctionnelles**
 - **miScript Target Protectors**
Protection d'une seule cible d'un miARN donné
 - **miScript miRNA Mimics**
ARN synthétique simple brin mimant un miARN connu
 - **miScript miRNA Inhibitors**
ARN synthétique simple brin inhibant un miARN connu

- **Etude des effets des Mimics et Inhibitors : modification de l'expression des gènes cibles**

Merci !

Des questions ?

Contact : helene.bauby@qiagen.com