

Instituto
de Investigación Sanitaria
de Palma

IdISPà

Plataforma de Genómica

Dr. Víctor J. Asensio

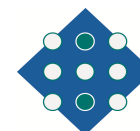
Técnico de Plataforma

27 de febrero de 2015



**Govern
de les Illes Balears**

FISIB
Fundació d'Investigació Sanitària
de les Illes Balears



Instituto
de Investigación Sanitaria
de Palma

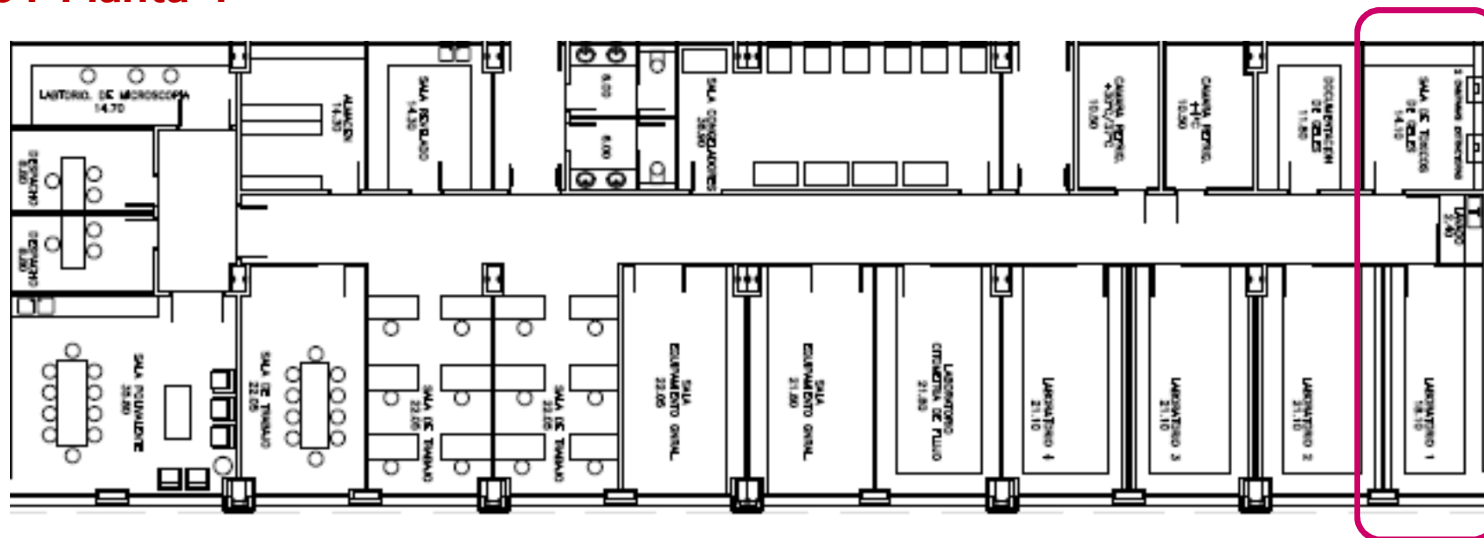
IdISPà

Plataforma de Genómica del IdISPa



La Plataforma de Genómica del IdISPa está ubicada en el Hospital Universitario Son Espases; consta de dos salas con un total de 34,60 m².

Módulo F Planta -1



Pt. Genómica

Plataforma de Genómica del IdISPa



Equipamiento:

- Secuenciador masivo Next-generation Illumina Miseq
- Plataforma de arrays Affymetrix
- Bioanalizador Agilent 2100
- PCR digital QX200 Bio-Rad
- Real Time-PCR y PCR convencionales
- Electroforesis de campo pulsado (PFGE). CHEF Mapper XA.
- Espectrofotómetro Nanovue Plus
- Cubetas electroforesis
- Sonicador Bioruptor Pico
- Documentador de geles Gel Doc EX Image Bio-rad
- Lectores de geles G:Box. Syngene
- Ingenuity software

Plataforma de Genómica del IdISPa

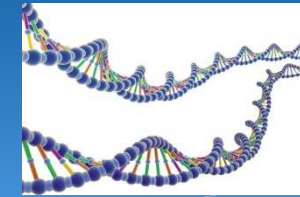


Aplicaciones:

- Real Time-PCR
- PCR digital QX200 Bio-Rad
- Bioanalizador Agilent 2100
- Secuenciador masivo Next-generation Illumina Miseq
- Plataforma de arrays Affymetrix



Plataforma de Genómica del IdISPa



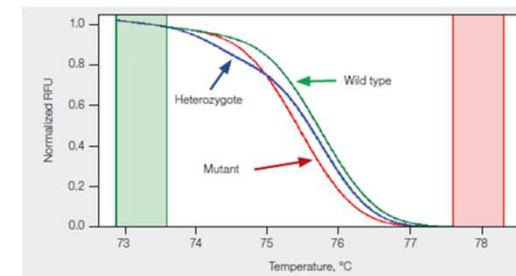
Real Time-PCR

CFX96 Bio- Rad / Eco Illumina

- **Expresión génica:**
 - Cuantificación relativa
 - Cuantificación absoluta (Curva standard)

- **High Resolution Melting “Eco Illumina”**
 - Genotipado
 - Single nucleotide polymorphism (SNP)

- **Multiplex:**
 - Discriminación alélica



Plataforma de Genómica del IdISPa



Real Time-PCR

* CFX96 Bio- Rad: 10 μ l 96 wells 5 canales Low Profile

* Eco Illumina: 10 μ l 48 wells 4 canales

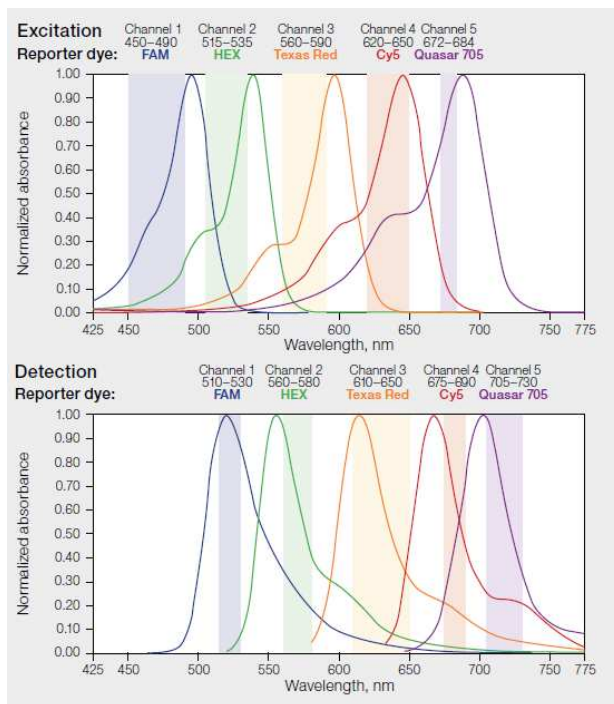
- Diseño experimental
 - Método extracción RNA
 - Síntesis cDNA; Poly-dT o Random P.
- Diseño de primers y sondas
- Puesta a punto:
 - Cálculo de eficiencias
 - Curva de melting

Plataforma de Genómica del IdISPa



Real Time-PCR

CFX96 Bio- Rad 5 canales



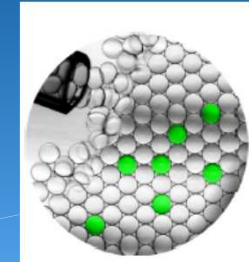
Eco Illumina

4 canales

Table 2: Eco System Excitation and Emission Wavelengths

Channel	Excitation (nm)	Emission (nm)	Example Fluorophores Detected
1	452-486	505-545	SYBR, FAM
2	542 - 582	604-644	ROX
3	452 - 486	562-596	HEX, VIC
4	542-582	665-705	Cy5, Q670

Plataforma de Genómica del IdISPa



Droplet digital PCR QX200

PCR



Una medida



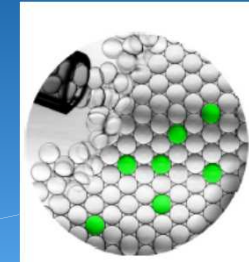
Nanogotas independientes
Medidas individuales

ddPCR

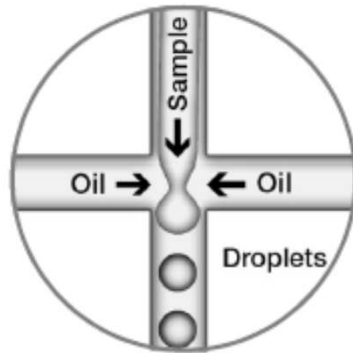


Múltiples medidas

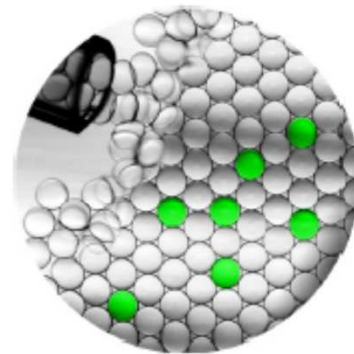
Plataforma de Genómica del IdISPa



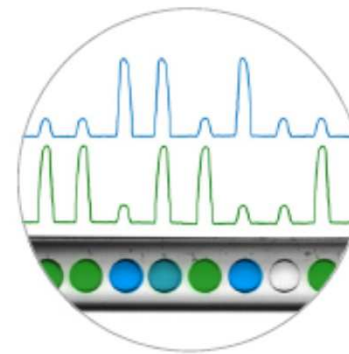
Droplet digital PCR QX200



Hacer gotas



PCR gotas

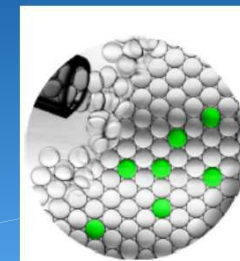


Leer gotas



Cuantificación

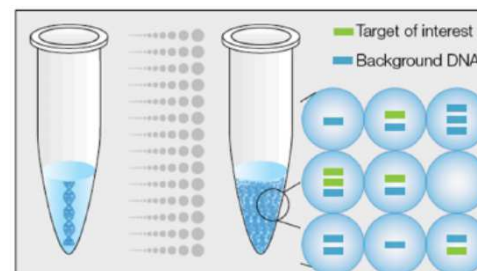
Plataforma de Genómica del IdISPa



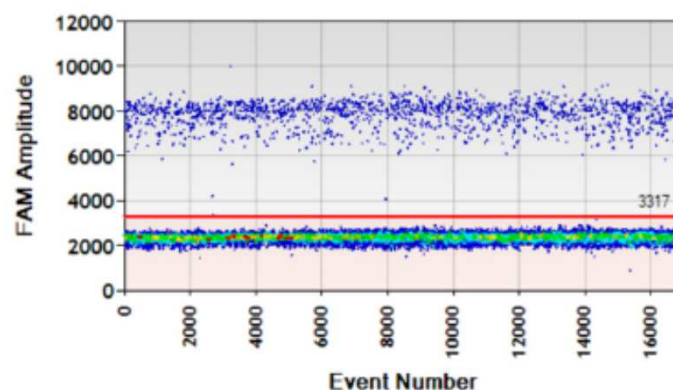
Droplet digital PCR QX200



Cuantificación absoluta de gotas positivas y negativas



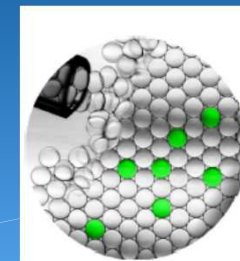
Resultados: Copias/ μ l
(Ley Poisson)



Consideración:

A menudo, el DNA genómico debe ser digerido mediante enzimas de restricción

Plataforma de Genómica del IdISPa



Aplicaciones ddPCR

* Cuantificación absoluta de una diana ADN o RNA

Abstracts of the HIV Drug Therapy Glasgow Congress 2014
Ruelle J et al. *Journal of the International AIDS Society* 2014, **17**(Suppl 3):19675
<http://www.jiasociety.org/index.php/jias/article/view/19675> | <http://dx.doi.org/10.7448/IAS.17.4.19675>



Poster Sessions – Abstract P143

Validation of an ultrasensitive digital droplet PCR assay for HIV-2 plasma RNA quantification

Ruelle, Jean; Yfantis, Vasileios; Duquenne, Armelle and G

AIDS Reference Laboratory, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

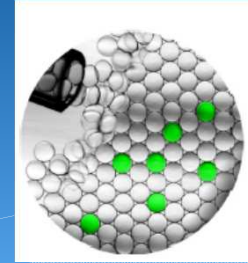
Clinical Chemistry 61:1
290-296 (2015)

Cancer Diagnostics

Next Generation Digital PCR Measurement of Hepatitis B Virus Copy Number in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Hepatocellular Carcinoma Tissue

Jing-Tao Huang,^{1†} Ying-Juan Liu,^{2†} Jin Wang,^{2†} Zhi-Gao Xu,⁴ Ying Yang,¹ Fan Shen,¹ Xing-hui Liu,⁵ Xin Zhou,¹ and Song-Mei Liu^{1,2*}

Plataforma de Genómica del IdISPa

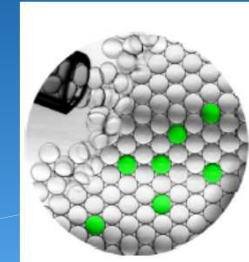


Aplicaciones ddPCR

* Variación en el número de copia (CNV)

- Alzheimer: 2x gen APP
- Parkinson: 2x/3x SNCA
- Retinoblastoma: delección RB1
- Retraso mental ligado a X
- Atrofia muscular espinal SMN1 y SMN2
- etc...
- N° integraciones (transfección o transgénico)

Plataforma de Genómica del IdISPa



Aplicaciones ddPCR

* CNV-¿copias en tandem?

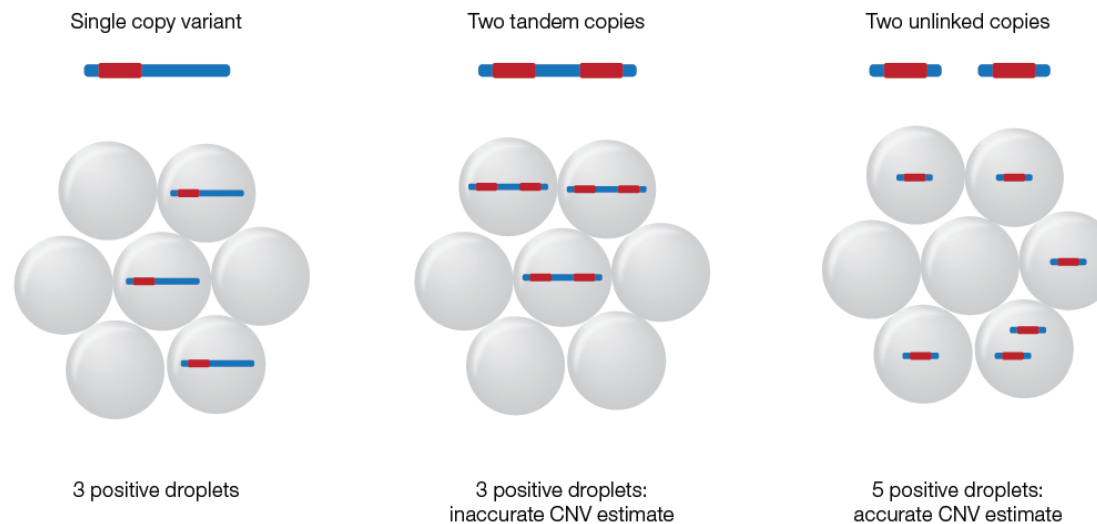
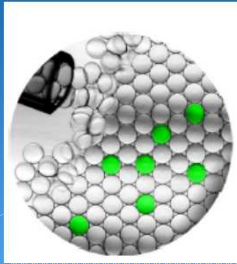


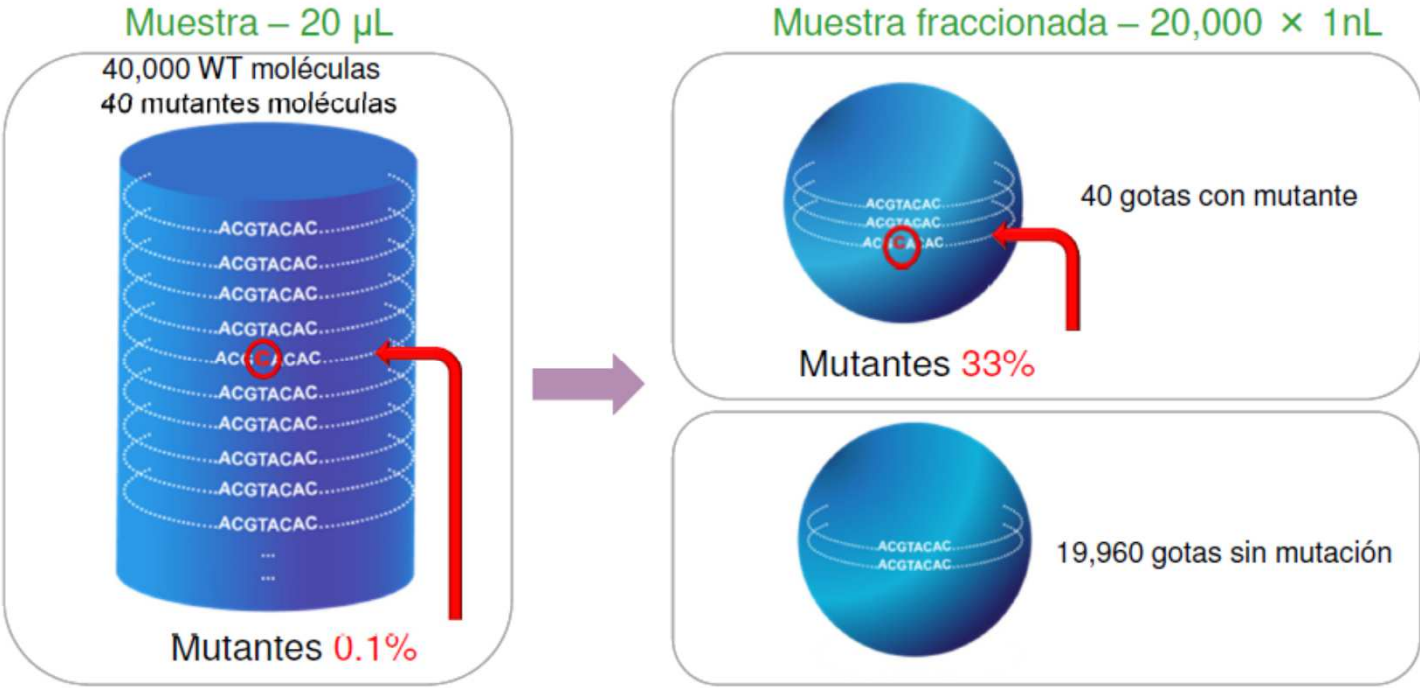
Fig. 4.4. Restriction digestion separates tandem gene copies.

Plataforma de Genómica del IdISPa

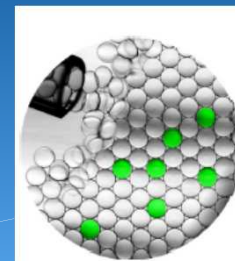


Aplicaciones ddPCR

* Detección de mutaciones escasas



Plataforma de Genómica del IdISPa



Aplicaciones ddPCR

* Detección de mutaciones escasas

0% mutant (wildtype)

12,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0

0 events

749 events

0 2,000 4,000 6,000 8,000

FAM intensity (a.u.)

VIC intensity (a.u.)

0.01% mutant

12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0

1 events

917 events

0 2,000 4,000 6,000 8,000

FAM intensity (a.u.)

VIC intensity (a.u.)

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed.gov

US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed ddPCR KRAS mutation cancer

Search

RSS Save search Advanced

Help

Abstract

Sent to:

Full text links

Final Version
Full text

Save items

Add to Favorites

Related citations in PubMed

Highly sensitive and noninvasive detection of epidermal growth factor re [Clin Chim Acta. 2013]

Detection of EGFR mutations in plasma DNA from lung cancer patients by [Lung Cancer. 2011]

A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor [J Thorac Oncol. 2011]

Review Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine [Clin Lung Cancer. 2009]

Review Non-small-cell lung cancer harbouring mutations in the EGFR [Clin Transl Oncol. 2010]

See reviews...
See all...

Cited by 3 PubMed Central articles

Quantification and dynamic monitoring of EGFR T790M in plasma cell-free DNA [PLoS One. 2014]

Geftinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free [J Thorac Oncol. 2014]

Circulating Tumor Cells: What Is in It for the Patient? A Vision toward [Cancers (Basel). 2014]

PMID: 24429876 [PubMed - indexed for MEDLINE] PMCID: PMC3959249 [Available on 2015-03-15]

Publication Types, MeSH Terms, Substances, Grant Support

LinkOut - more resources

aplicaciones Presentación de PowerP...

assay scheme

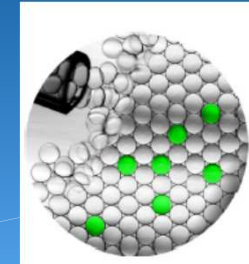
UT R

event data key

Mutant	+
Wildtype	+
Mutant	-
Wildtype	+

Intensity (a.u.)

Plataforma de Genómica del IdISPa



Aplicaciones ddPCR

* Análisis de librerías Next-Generation Sequencing

- Normalización de librerías
- Control calidad de librerías

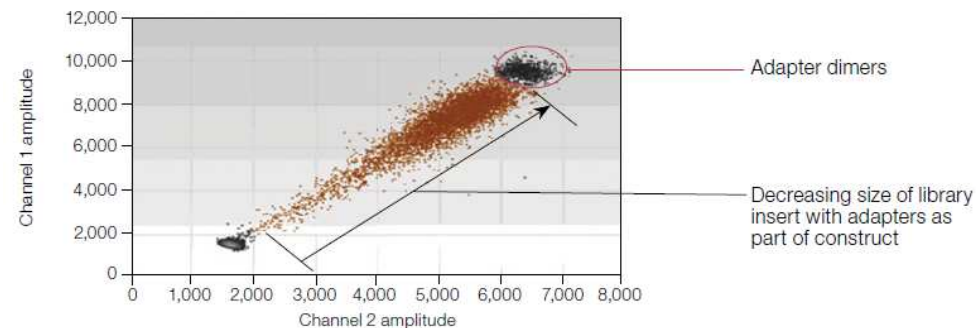
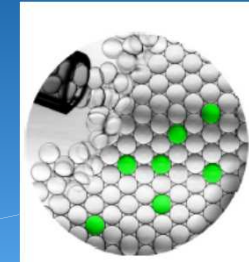


Fig. 7.4. Additional library information produced by ddPCR.

Plataforma de Genómica del IdISPa



Aplicaciones ddPCR

* ddPCR permite multiplex con EvaGreen

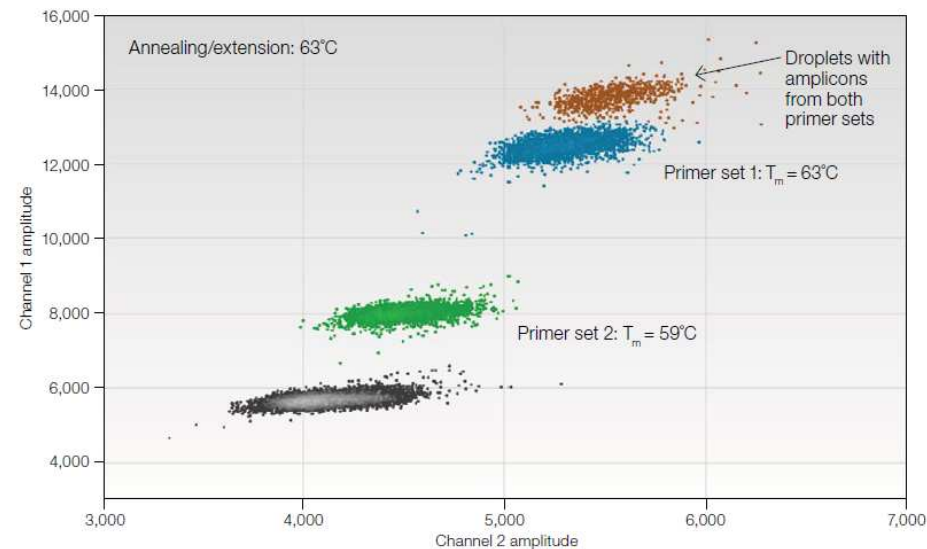


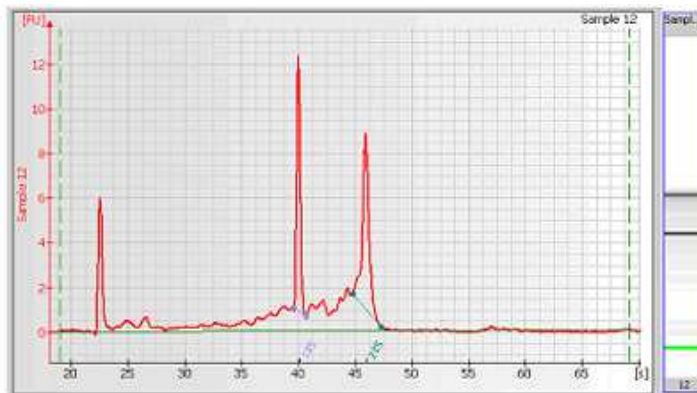
Fig. 2.15. Multiplex assays performed using ddPCR with EvaGreen. Differences in amplitude are due to differences in optimal annealing temperature. T_m , melting temperature.

Plataforma de Genómica del IdISPa



Bioanalyzer 2100 Agilent

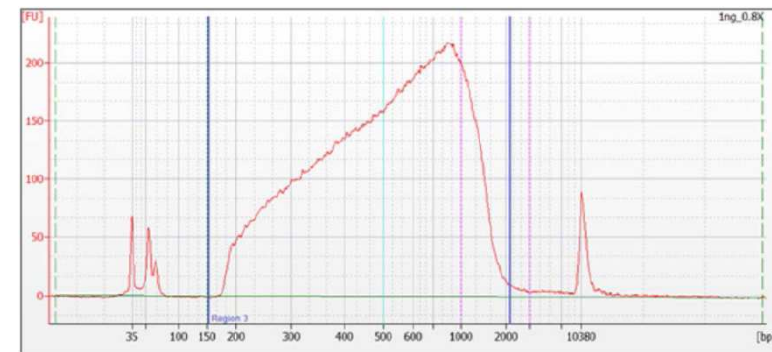
RNA or miRNA



RIN (RNA Integrity number)

RIN >8

DNA



Control de calidad de librerías NGS

Plataforma de Genómica del IdISPa



Miseq-Next Generation Sequencing



- Targeted Resequencing
 - Clinical exome, paneles
- De Novo sequencing
- Small Genome sequencing
 - mtDNA, BAC/YAC, bacteria
- RNA sequencing
 - RNA or miRNA
- Chip Sequencing
- Methylated DNA
- 16s metagenomics v3 y v4

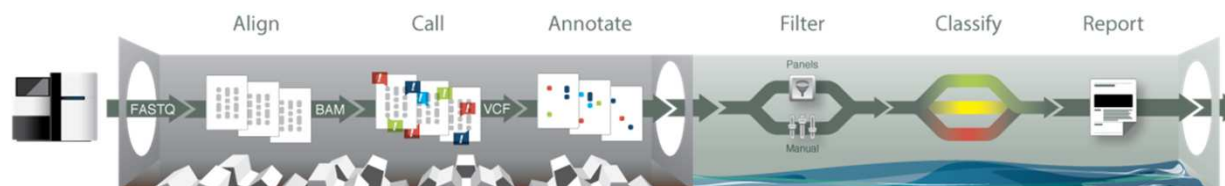
Plataforma de Genómica del IdISPa



Miseq-Next Generation Sequencing

Miseq Reporter software

Analysis Step	Format	Purpose
Demultiplexing	*.demux	Intermediate files containing demultiplexing results.
FASTQ	*.fastq.gz	Intermediate files containing quality scored base calls. FASTQ files are the primary input for the alignment step.
Alignment	*.bam	Compressed binary files containing sequence alignment data. BAM files are the primary input for the variant calling step.
Variant Calling	*.vcf	Text files containing SNPs, indels, and other structural variants.

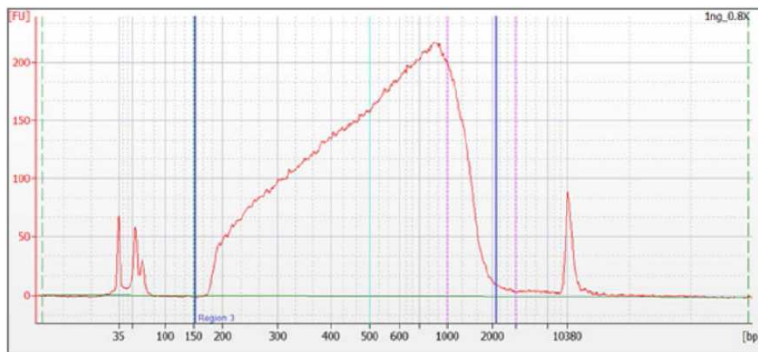


Plataforma de Genómica del IdISPa

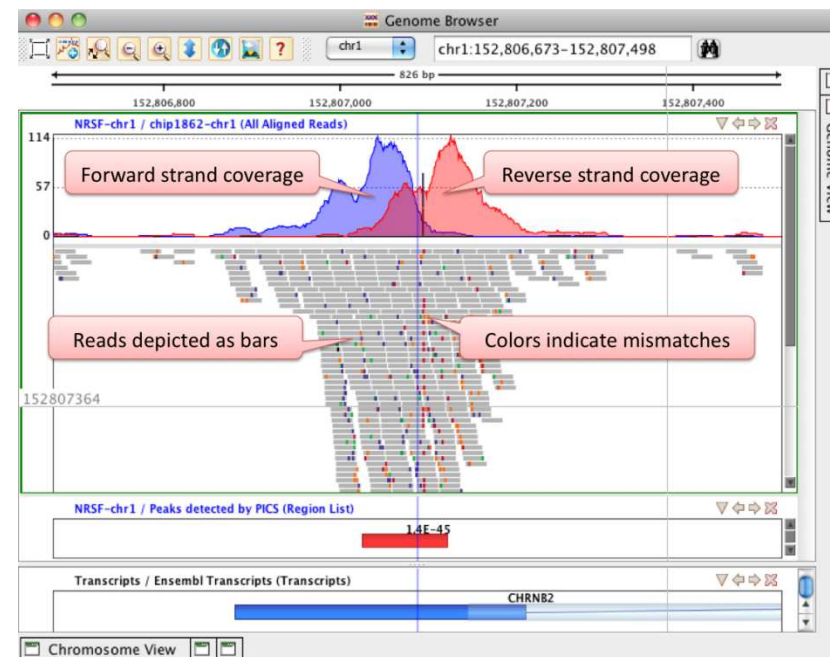


Miseq-Next Generation Sequencing

Preparar buenas librerías que aseguren una buena cobertura



Perfil bioanalizador



Plataforma de Genómica del IdISPa



Miseq-Next Generation Sequencing

	TruSight One Clinical exome	TruSight Cancer	TruSight Cardiomyopathy	TruSight Inherited Disease	TruSight Autism
Number of Genes	4,813	94	46	552	101
Genomic Content	12 Mb	255 Kb	244 Kb	2.25 Mb	328 Kb
Number of Samples per MiSeq Run	3 for MiSeq v3	24 for MiSeq v2	24 for MiSeq v2	9 MiSeq v3	24 for MiSeq v2
Recommended MiSeq Flow Cell and # of samples per run	V3 – 3 Samples	Micro – 12 Samples V2 – 24 Samples	Micro – 12 Samples V2 – 24 Samples	V2 – 4 Samples V3 – 8 Samples	Micro – 8 Samples V2 – 24 Samples
% Targets at 20x minimum coverage	95%	99%	99%	98%	99%
Sample price euros	391	235	235	360	235

Plataforma de Genómica del IdISPa



Miseq-Next Generation Sequencing

Trusigh Myeloid Sequencing Panel

Table 1: Gene Regions Assessed by the TruSight Myeloid Sequencing Panel

Gene	Target Region (exon)	Gene	Target Region (exon)	Gene	Target Region (exon)	Gene	Target Region (exon)
<i>ABL1</i>	4-6	<i>DNMT3A</i>	full	<i>KDM6A</i>	full	<i>RAD21</i>	full
<i>ASXL1</i>	12	<i>ETV6/TEL</i>	full	<i>KIT</i>	2, 8-11, 13 + 17	<i>RUNX1</i>	full
<i>ATRX</i>	8-10 and 17-31	<i>EZH2</i>	full	<i>KRAS</i>	2 + 3	<i>SETBP1</i>	4 (partial)
<i>BCOR</i>	full	<i>FBXW7</i>	9 + 10 + 11	<i>MLL</i>	5-8	<i>SF3B1</i>	13-16
<i>BCORL1</i>	full	<i>FLT3</i>	14 + 15 + 20	<i>MPL</i>	10	<i>SMC1A</i>	2, 11, 16 + 17
<i>BRAF</i>	15	<i>GATA1</i>	2	<i>MYD88</i>	3-5	<i>SMC3</i>	10, 13, 19, 23, 25 + 28
<i>CALR</i>	9	<i>GATA2</i>	2-6	<i>NOTCH1</i>	26-28 + 34	<i>SRSF2</i>	1
<i>CBL</i>	8 + 9	<i>GNAS</i>	8 + 9	<i>NPM1</i>	12	<i>STAG2</i>	full
<i>CBLB</i>	9, 10	<i>HRAS</i>	2 + 3	<i>NRAS</i>	2 + 3	<i>TET2</i>	3-11
<i>CBLC</i>	9, 10	<i>IDH1</i>	4	<i>PDGFRA</i>	12, 14, 18	<i>TP53</i>	2-11
<i>CDKN2A</i>	full	<i>IDH2</i>	4	<i>PHF6</i>	full	<i>U2AF1</i>	2 + 6
<i>CEBPA</i>	full	<i>IKZF1</i>	full	<i>PTEN</i>	5 + 7	<i>WT1</i>	7 + 9
<i>CSF3R</i>	14-17	<i>JAK2</i>	12 + 14	<i>PTPN11</i>	3 + 13	<i>ZRSR2</i>	full
<i>CUX1</i>	full	<i>JAK3</i>	13				

Truseq Amplicon Cancer Panel-FFPE Samples

Genes in the TruSeq Amplicon - Cancer Panel

<i>ABL1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GNAS</i>	<i>MLH1</i>	<i>RET</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MPL</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HRAS</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>APC</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>SMO</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SRC</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>STK11</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KDR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FLT3</i>	<i>KIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>VHL</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNA11</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>	
<i>CTNNB1</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RB1</i>	

Plataforma de Genómica del IdISPa



Affymetrix - Arrays de expresión

Recomendaciones para el Diseño experimental

Objetivo: resultados fiables y reproducibles, dado la gran inversión de tiempo y dinero en estos experimentos

- Cuál es el objetivo del experimento
- Establecer los controles más apropiados para estudiar las muestras
- Definir nº de réplicas por cada condición experimental. Mínimo 3 replicas biológicas
- Se pueden hacer mezclas ("pooles") de las muestras para disminuir la variabilidad de cada individuo (NO SIEMPRE ESTÁ RECOMENDADO)

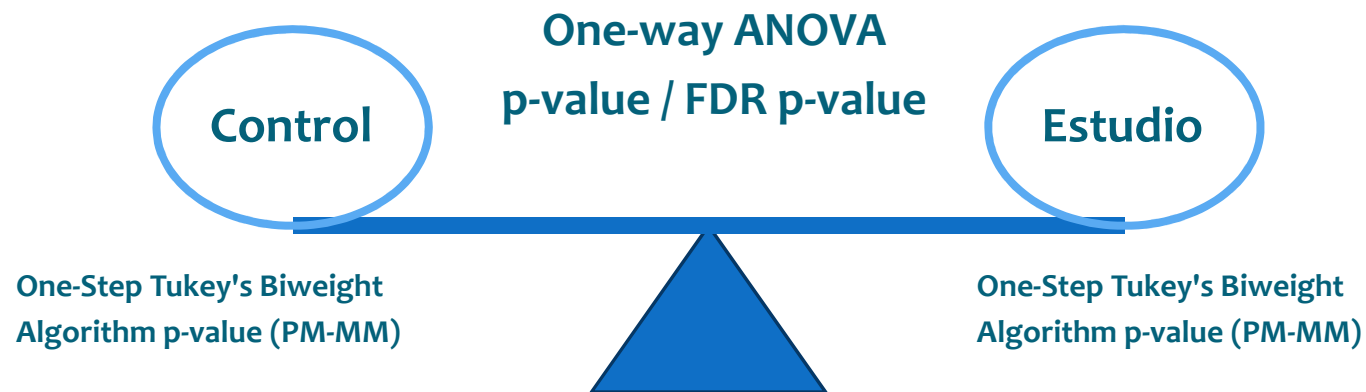


Plataforma de Genómica del IdISPa



Affymetrix - Arrays de expresión

Arrays de expresión es un balance estadístico

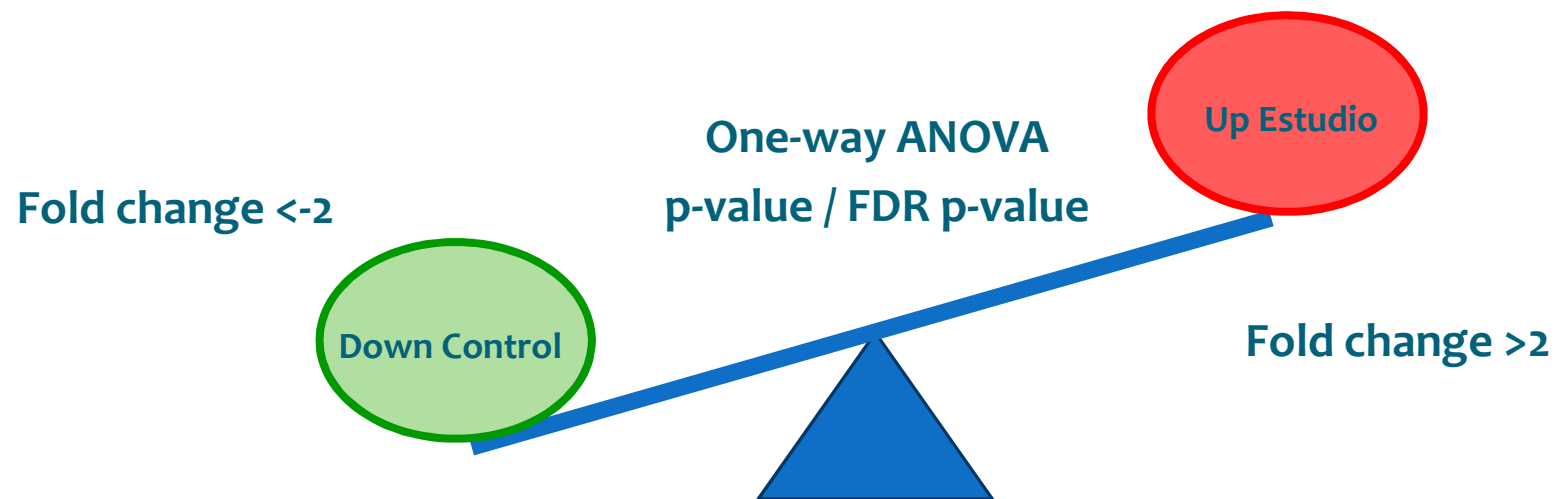


Plataforma de Genómica del IdISPa



Affymetrix - Arrays de expresión

Genes Diferencialmente Expresados

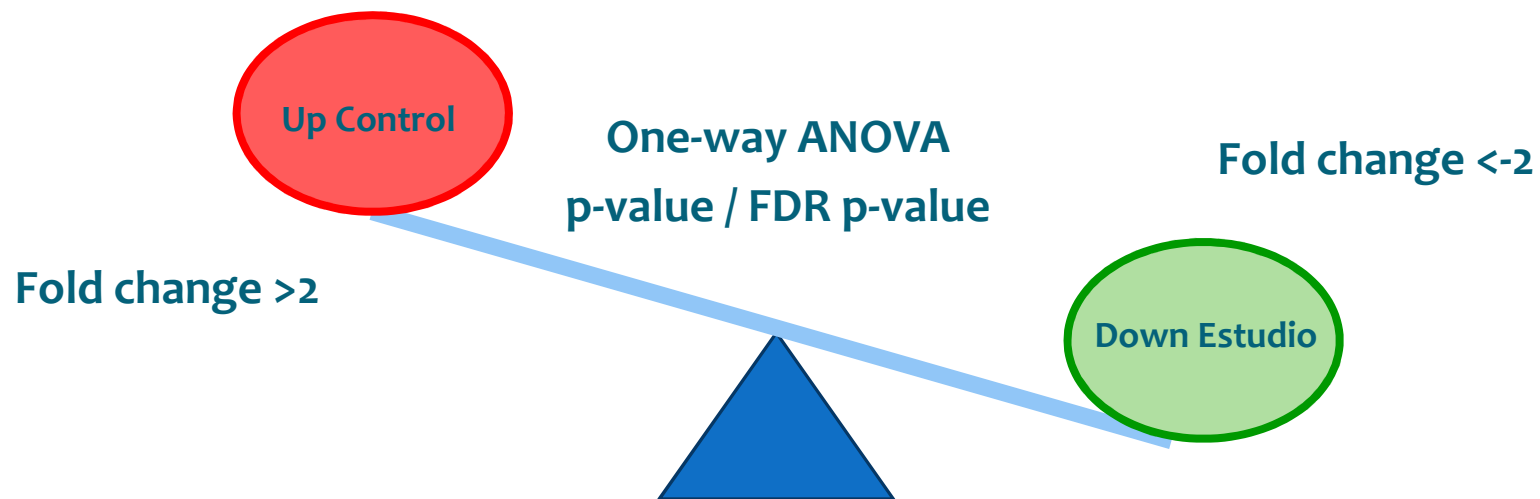


Plataforma de Genómica del IdISPa



Affymetrix - Arrays de expresión

Genes Diferencialmente Expresados



Plataforma de Genómica del IdISPa



Affymetrix - Arrays de expresión

Variables a considerar

- Variabilidad de la muestra; sexo, edad, dieta, nº pases, etc...
- Obtención de muestra; fresco, nitrógeno líquido, FFPE, etc...
- Extracción de RNA o DNA: (Columnas, trizol, etc...)
- Calidad de la muestra; ej RIN>8 en RNA total.
- Procesamiento de la muestra:
 - Transcripción RNA a cDNA
 - Marcaje (Labelling)
 - Hibridación
 - Adquisición de imagen (.cell)

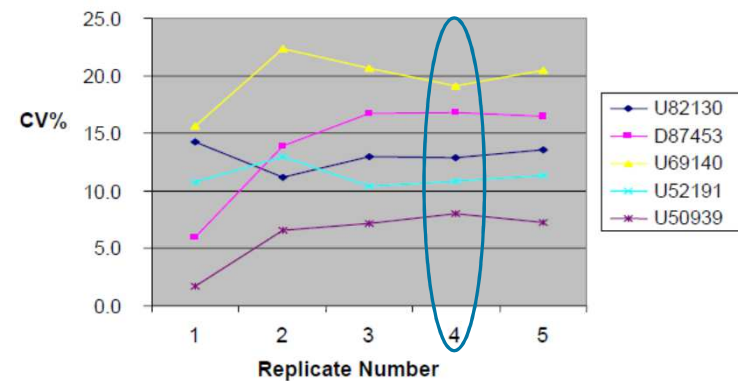
Plataforma de Genómica del IdISPa



Affymetrix - Arrays de expresión

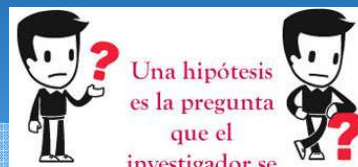
Considerar el número de réplicas biológicas necesarias

Comparison of CV% Between Replicates of the 25th Percentile of Signal Intensities



N° réplicas = n+1

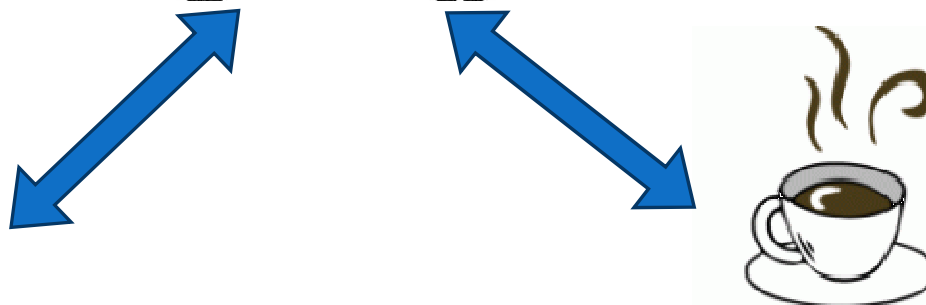
Plataforma de Genómica del IdISPa



Una hipótesis es la pregunta que el investigador se formula para diseñar un experimento



Tel: 871 20 50 50 ext. 64529
e-mail: victor.asensio@ssib.es



Qué muestra tengo
Qué "n" necesito
Cómo la proceso
¿¿Controles??
Etc...

Solicitud de Servicio
<http://www.idispa.es>