



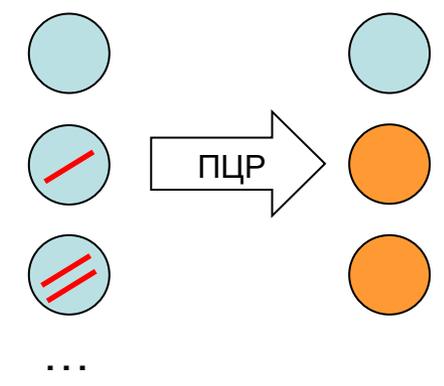
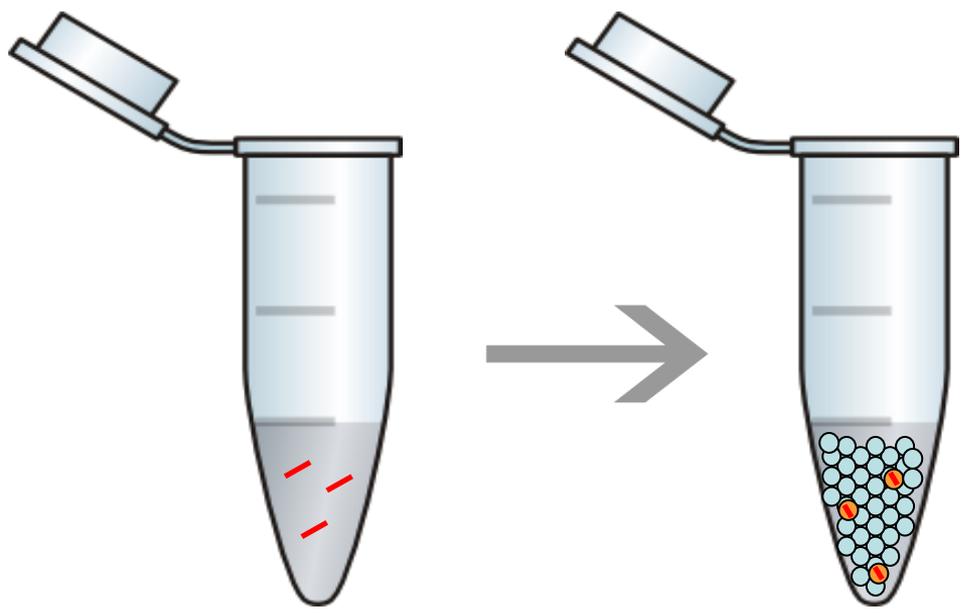
# Применение капельной цифровой ПЦР в биотехнологии растений и биозащите

**Анастасия Шнырева, к.б.н.**  
специалист по продукции  
[anastasia\\_shnyreva@bio-rad.com](mailto:anastasia_shnyreva@bio-rad.com)

**BIO-RAD**



# Тысячи нанокапель позволяют проводить тысячи независимых реакций в одной пробирке



**ПЦР:**  
Одно измерение

**кцПЦР:**  
Множество  
независимых  
измерений

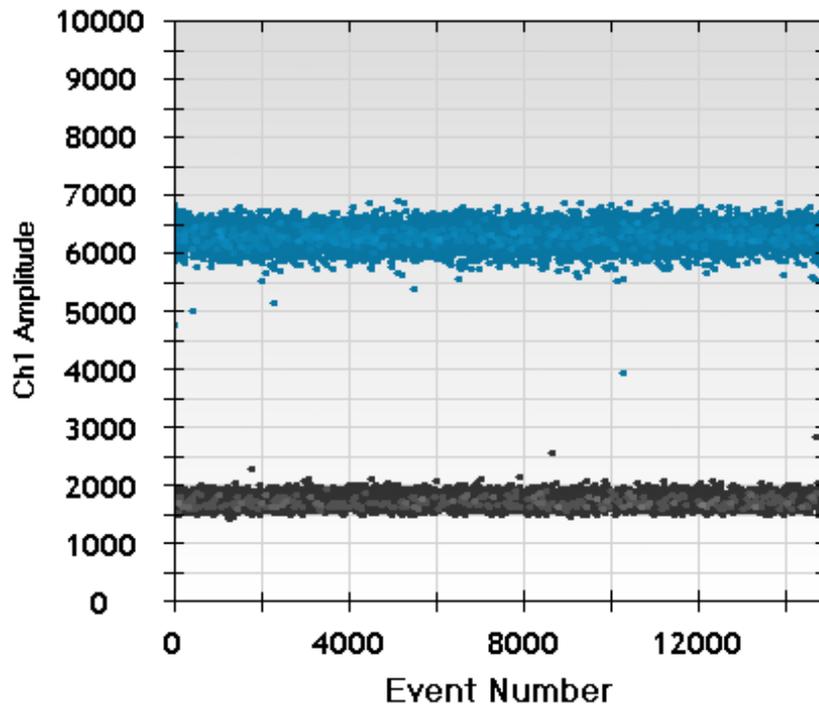
Подсчет «-» (0) и  
«+» (1)

Капли с положительным и отрицательным сигналом подсчитываются для каждого образца и ПО подсчитывает концентрацию ДНК-мишени в виде числа копий в микролитре.



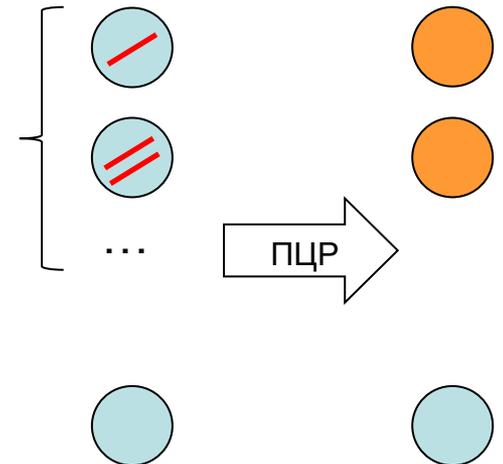
# Положительный и отрицательный сигнал

- Положительные нанокაпли содержат как минимум одну молекулу мишени. В результате амплификации образуется сильный сигнал флуоресценции
- Отрицательные нанокაпли не содержат мишени



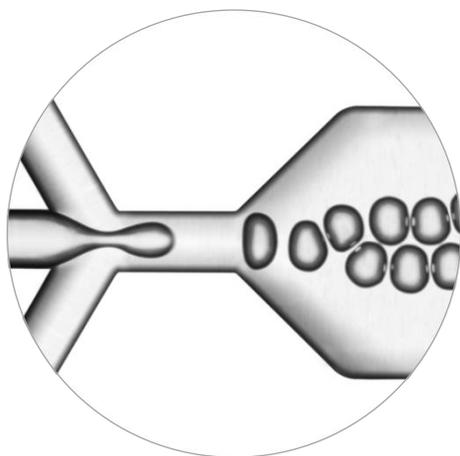
«+» нанокაпли

«-» нанокაпли



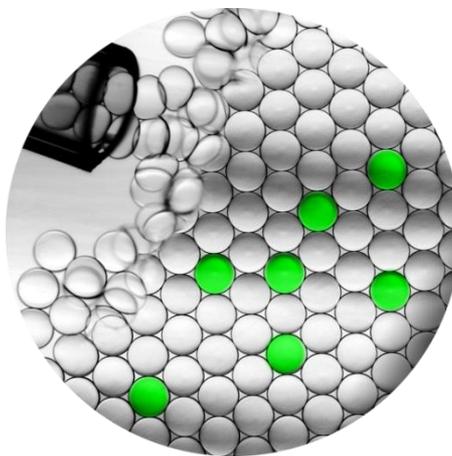
# Капельная цифровая ПЦР

## 1. Создание нанокapель



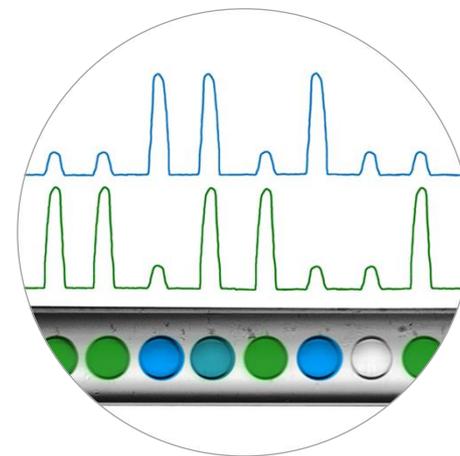
Генератор капель

## 2. Амплификация



ПЦР  
Термоциклер

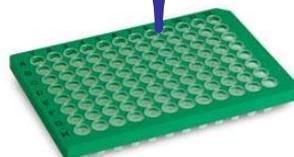
## 3. Прочтение флуоресценции нанокapель



Ридер капель



4



96-луночный  
формат

**BIO-RAD**



# Метод капельной цифровой ПЦР ( ddPCR). Основные достоинства.

## Высокая устойчивость к ингибиторам

## Чувствительность

- Детекция редких мутаций в сложном окружении
- Раннее обнаружение мутаций
- 10-1000x кратное улучшение по сравнению с реал-тайм ПЦР

## Абсолютная количественная оценка

- Точнее определяет уровень экспрессии
- Точнее работает при низких уровнях экспрессии
- Не требует калибровочной кривой

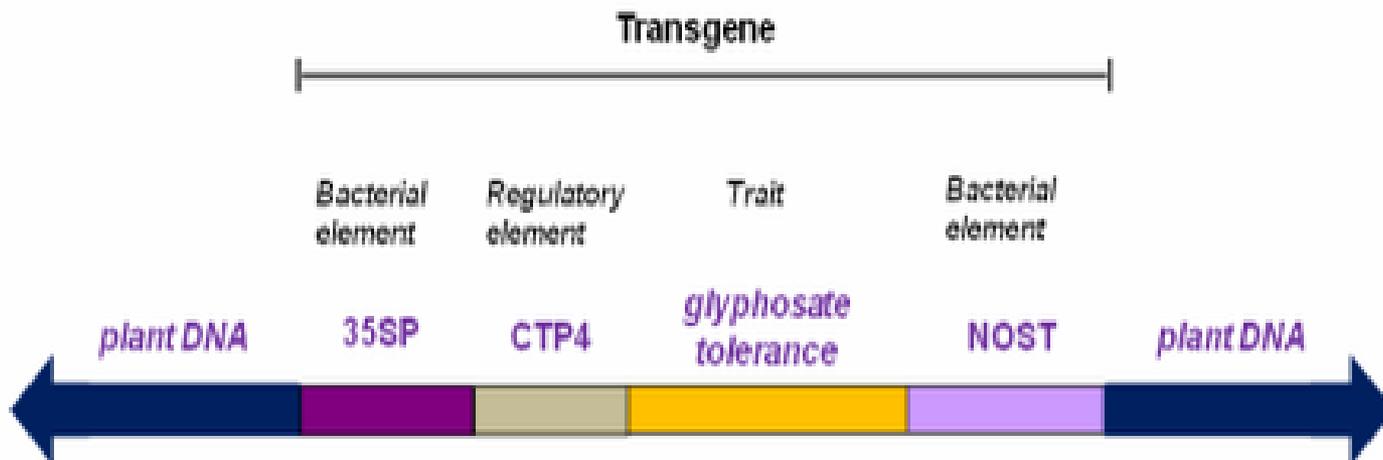
## Точность

- Измеряет меньшие различия в уровне экспрессии генов
- Детектирует копийность генов (CNV)

# Разработка ГМО

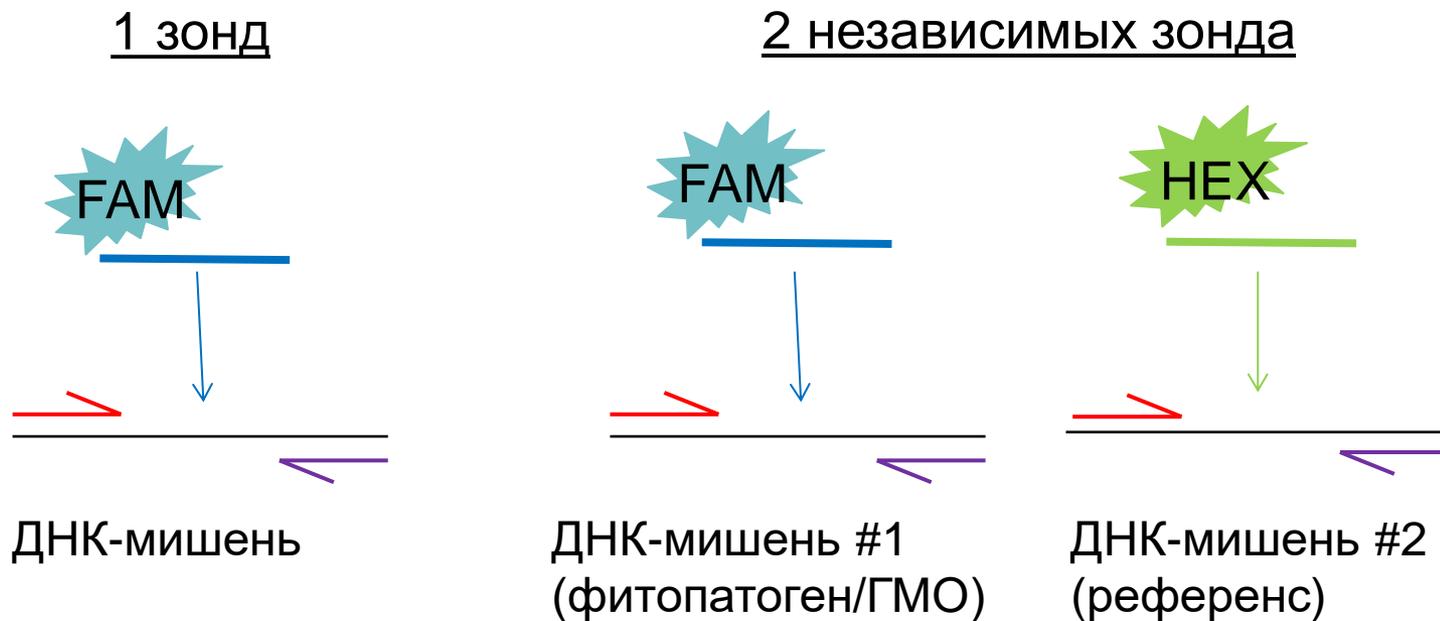
Создание ГМО происходит с помощью генно-инженерных подходов, в результате действия которых в геном привносятся последовательности, не характерные для этого организма

## Roundup Ready soybean



# Дизайн эксперимента по поиску редкой последовательности

Редкие (чужеродные) последовательности зачастую имеют минимальную гомологию с геномной ДНК объекта. Подсчет их идет в **количестве копий/объем** или **количестве копий/ геномную референсную последовательность**



# Количественная оценка ГМО

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

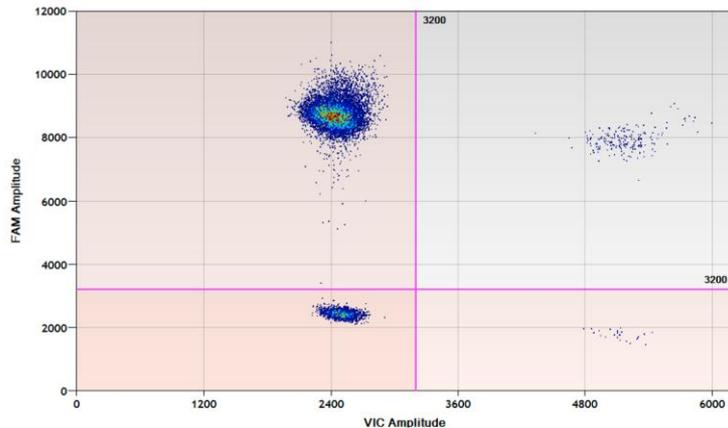
Department of Biotechnology and Systems Biology, National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia

**Трудности в детекции ГМО  
в образцах – низкий  
уровень целевой ДНК  
(ГМО) и ингибиторы ПЦР**



# Количественная оценка ГМО

**кцПЦР существенно сокращает время и стоимость эксперимента за счет того, что не требует построения калибровочных кривых и не требует постановки образцов в повторностях**



	ddPCR	qPCR (96 well plate)
Time needed	6 hours	13 hours (less if several simultaneous instrument)
Hands-on time	65 min	310 min
Number reactions	96	400
Cost/sample	11.4€	12.7€

# Количественная оценка ГМО

кцПЦР показывает большую точность при детекции низких уровней ГМО, чем ПЦР в реальном времени, **снижая ошибку эксперимента**

Sample	Source	Matrix	Target value(cp/cp)	ddPCR (bias)	qPCR (bias)
ERM-BF413d	CRM	Seed-powder flour	0.57% ±0.17%	0.62% (8.0%)	0.46% (-19.3%)
ERM-BF413f	CRM	Seed-powder flour	2.85% <sup>a</sup>	2.92% (2.5%)	2.29% (-19.6%)
ERM-BF413ek	CRM	Seed-powder flour	0.77% ±0.08%	0.70% (-9.0%)	0.58% (-24.7%)
ERM-BF413gk	CRM	Seed-powder flour	3.85% <sup>a</sup>	3.68% (-4.1%)	3.66% (-4.9%)
G0009/04	USDA/GIPSA PP	Seed-powder flour	0.29% ±0.13% <sup>b</sup>	0.26% (-11.7%)	/
G0180/07	USDA/GIPSA PP	Seed-powder flour	0.04% ±0.02% <sup>b</sup>	0.04% (2.9%)	/
G211/10	ILC-EURL-GMFF PP	Seed-powder flour	0.45% ±0.098% <sup>c</sup>	0.46% (-1.8%)	0.50% (11.1%)
G212/10	ILC-EURL-GMFF PP	Seed-powder flour	2.10% ±0.35% <sup>c</sup>	2.32% (10.4%)	2.30% (9.5%)
G147/08	Gemma PP	Seed-powder flour	29.6% ±8.9% <sup>b</sup>	21.7% (-26.7%)	/
G231/11	Routine	Corn flakes	2.64% ±0.8% <sup>b</sup>	2.31% (-12.4%)	/
G254/11	Routine	Feed	3.82% ±1.1% <sup>b</sup>	3.47% (-9.2%)	/



# Duplex digital droplet PCR for the determination of non-Basmati rice in Basmati rice (*Oryza sativa*) on the base of a deletion in the fragrant gene

Thomas B. Bucher<sup>1</sup> · René Köppel<sup>1</sup>

- Выявление с чувствительности 1% примеси риса сорта «не Басматти» в коммерческих образцах, которые идут под названием «Басматти»
- Перенос праймеров и зондов с qPCR на ddPCR



# Бактериальные патогены растений

PAPER IN FOREFRONT

## Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot

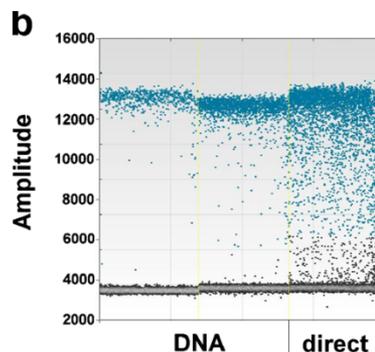
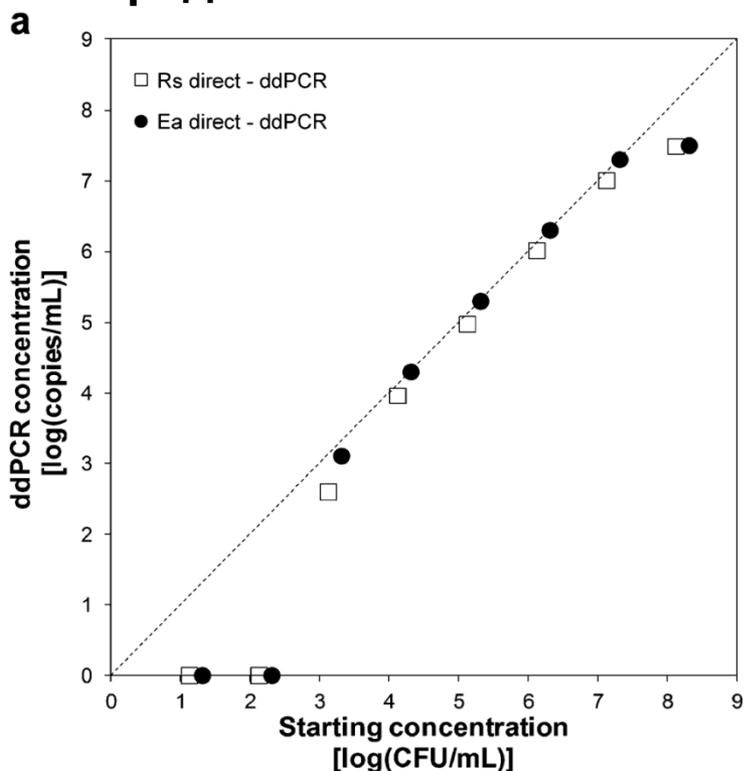
Tanja Dreo • Manca Pirc • Živa Ramšak • Jernej Pavšič •  
Mojca Milavec • Jana Žel • Kristina Gruden

**Задача:** разработка теста на бактериальный ожог плодовых культур и бурый бактериоз (бактериальное увядание) картофеля

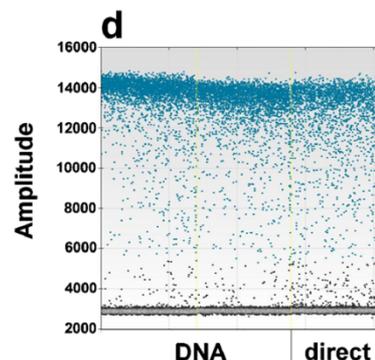


# Бактериальные патогены растений

**Прямое добавление** патогена в ddPCR, минуя этап выделения ДНК, позволяет сделать количественную оценку в диапазоне 4 порядков концентрации, а также успешно работает с предельно низкими количествами контаминанта



*Erwinia amylovora*  
бактериальный ожог  
плодовых культур



*Ralstonia solanacearum*  
бурый бактериоз  
(бактериальное увядание) картофеля

# Вирусы картофеля

[Analytical and Bioanalytical Chemistry](#)

June 2018, Volume 410, [Issue 16](#), pp 3815–3825 | [Cite as](#)

## Validated reverse transcription droplet digital PCR serves as a higher order method for absolute quantification of *Potato virus Y* strains

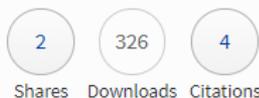
Authors

[Authors and affiliations](#)

Nataša Mehle , David Dobnik, Maja Ravnikar, Maruša Pompe Novak

Research Paper

First Online: 03 May 2018



- Участие РНК-вирусов в мутагенезе, рекомбинации и генетической variability сортов при селекции
- Биоразнообразие Potato virus Y (PVY) в разных рекомбинантных линиях картофеля
- Перенос и использование qPCR праймеров и зондов на RT-ddPCR для выявления типа и вирусной нагрузки PVY в образцах с высокой точностью, чувствительностью, без стандартной кривой

## Abstract

RNA viruses have a great potential for high genetic variability and rapid evolution that is generated by mutation and recombination under selection pressure. This is also the case of *Potato virus Y* (PVY), which comprises a high diversity of different recombinant and non-recombinant strains. Consequently, it is hard to develop reverse transcription real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with the same amplification efficiencies for all PVY strains which would enable their equilibrate quantification; this is specially needed in mixed infections and other studies of pathogenesis. To achieve this, we initially transferred the PVY universal RT-qPCR assay to a reverse transcription droplet digital PCR (RT-ddPCR) format. RT-ddPCR is an absolute quantification method, where a calibration curve is not needed, and it is less prone to inhibitors. The RT-ddPCR developed and validated in this study achieved a dynamic range of quantification over five orders of magnitude, and in terms of its sensitivity, it was comparable

**BIO-RAD**

# Определение вирусной нагрузки при кцПЦР



Virology

Volume 524, November 2018, Pages 127-139



## Expression and antiviral function of ARGONAUTE 2 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with two isolates of tomato ringspot virus with varying degrees of virulence

Dinesh Babu Paudel <sup>a</sup>, Basudev Ghoshal <sup>a,1</sup>, Sushma Jossey <sup>b</sup>, Marta Ludman <sup>c</sup>, Karoly Fatyol <sup>c</sup>, H el ene Sanfa on <sup>b</sup> 

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.08.016>

[Get rights and content](#)

### Abstract

ARGONAUTES (notably AGO1 and AGO2) are effectors of plant antiviral RNA silencing. AGO1 was shown to be required for the temperature-dependent symptom recovery of *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus (isolate ToRSV-Rasp1) at 27  C. In this study, we show that symptom recovery from isolate ToRSV-GYV shares similar hallmarks of antiviral RNA silencing but occurs at a wider range of temperatures (21–27  C). At 21  C, an early spike in AGO2 mRNAs accumulation was observed in plants infected with either ToRSV-Rasp1 or ToRSV-GYV but the AGO2 protein was only consistently detected in ToRSV-GYV infected plants. Symptom recovery from ToRSV-GYV at 21  C was not prevented in an *ago2* mutant or by silencing of AGO1 or AGO2. We conclude that other factors (possibly other AGOs) contribute to symptom recovery under these conditions. The results also highlight distinct expression patterns of AGO2 in response to ToRSV isolates and environmental conditions.

- Исследование влияния последовательности, кодирующей белки семейства ARGONAUTE в противовирусной активности у растений рода *Nicotiana* к заражению вирусом кольцевой пятнистости томата
- Использование ddPCR для определения вирусной нагрузки ToRSV-Rasp1 в экспериментах

**BIO-RAD**

# кцПЦР в биотехнологии и сельском хозяйстве

## Чувствительность

- Абсолютная количественная оценка ГМО в образце

## Точность

- кцПЦР позволяет определить сложные CNV в трансгенном геноме растения

## Устойчивость к ингибиторам

- Позволяет изучать «сложные» образцы

## Высокая производительность по относительно низкой цене

- Позволяет проводить систематическое тестирование большого потока образцов

Система для проведения капельной цифровой ПЦР QX200 :



**BIO-RAD**



Спасибо за внимание!