



Molecular Solutions
for Diagnostics,
Research and
Therapeutics

www.
letgenbio.
com

No: 001
Şubat 2021

DİJİTAL PCR'NİN GÜCÜ

Dijital PCR Nedir?

Dijital PCR, qPCR'ye alternatif bir metottur ve benzer karakteristiğe sahiptir. Dijital PCR (dPCR), nükleik asit ölçümü için oldukça hassas bir yaklaşımdır. Yaygın olarak nükleik asit belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem numunedeki hedef molekülün ilk miktarını belirlemek için qPCR'de olduğu gibi amplifikasyon döngülerinin sayısına güvenmek yerine; hedef moleküllerin mutlak sayısını istatistiksel yöntemlerle tahmin eder. Dijital PCR, hassas ve tekrarlanabilir nükleik asit tespiti ve miktar tayini için oldukça hassas bir yaklaşımdır. Ölçümler, herhangi bir bireysel reaksiyonda "sıfır" veya "bir" hedef molekül mevcut olacak şekilde numuneyi bölümlere ayırarak gerçekleştirilir. Her bölüm, bir floresan sinyalin varlığı veya yokluğu için son nokta PCR döngüsünden sonra analiz edilir ve numunede bulunan mutlak molekül sayısı hesaplanır. Numune hedef kantitasyonu için standart bir eğriye gerek duymaz. Standart eğrinin olmaması sayesinde hata payı azalır ve hassasiyet artar.

Nasıl Çalışır?

dPCR reaksiyonunda kullanılan test bileşenleri qPCR'da olduğu gibi master miks, primerler, TaqMan problemleri ve hedef DNA'dan ibarettir.

Her bir numuneyi çok sayıda ayrı ve paralel reaksiyona ayırarak veya bölerek analizi gerçekleştirir. Seyreltilmiş numuneye sahip master miks bölünerek tek tek PCR reaksiyonlarına dağıtılır. Bölümlerin içindeki moleküllerin dağılımı bağımsız ve rastgele bir işlemdir. Bazı bölümlerde bir veya daha fazla hedef molekül kalırken; diğerleri hiçbirini içermeyebilir. Tipik olarak 20.000 bölüm yapılır ve amplifiye edilir. Bölme işlemi kanallar içeren mikrolapla ya da damlacık yöntemi ile gerçekleştirilir. Her bölüm uç noktaya kadar PCR amplifikasyonuna tabii tutulur. Amplifiye olmuş numuneler ile olmayan bölümler ayrı ayrı sayılır. Endpoint tespit yöntemi ile her reaksiyon kuyucuğu "evet" ya da "hayır" cevabını verir. Amplifiye edilmiş ürün içeren ve floresan sinyal gösterenler pozitif olarak belirlenir ve "1" olarak numaralandırılır. Amplifiye ürünü olmayan ve sadece arka plan sinyali gösteren olanlar negatif olarak belirtilir ve "0" olarak numaralandırılır. Ulaşılan sayı ikili sistem olduğu için dijital PCR olarak tanımlanmıştır. Poisson istatistiksel analizi ile daha sonra referanslara veya standartlara gerek duyulmadan ilk numunede bulunan hedefin mutlak DNA konsantrasyonunu doğrudan belirlenmesine olanak sağlar.

qPCR'ye Göre Avantajları

Kantitatif PCR (qPCR), geniş bir dinamik aralık, yüksek verim ve çok sayıda numunenin taranmasıyla sonuçlanarak, zaman gerektiren yönlendirme uygulamalarında bağlı ölçüm için iyi yapılandırılmış ve tercih edilen bir yöntemdir.

dPCR'nin avantajları göz önüne alındığında kendisine birçok kullanım alanı bulmuştur ve bu potansiyel hızla devam etmektedir. Mutlak kantitasyon, karmaşık arka plandaki düşük hedef DNA'ları yüksek hassasiyetle tekrarlanabilir ölçümler yapmaya olanak sağlaması ile qPCR'ye göre önemli avantajlar sunar.

Çok az miktardaki hedef DNA'nın dakikalar içindeki miktarını tespit edebilme potansiyeli sayesinde diğer birçok yöntemi geride bırakan güçlü bir platformdur.

Ayrıca, bölümlenme sayesinde inhibitörlere karşı artan tolerans ve amplifikasyon verimliliğine veya qPCR'de oluşturulan standart eğrilerin kalibrasyonundaki teknik sınırlamalar nedeniyle dPCR'nin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Tüm bu özellikleri dPCR'yi basit ve uygun maliyetli bir yeni nesil teknoloji haline getirir.

qPCR'nin Avantajları

- İyi kurgulanmış protokol ve veri analiz teknikleri
- Geniş dinamik alan
- Örnek başına düşük maliyet
- Yüksek numune verimi

dPCR'nin Avantajları

- Standart eğri ya da referans örneğe ihtiyaç duyulmaması
- İnhibitörlere karşı yüksek tolerans
- Üstün ve artan hassasiyet
- Yüksek tekrarlanabilirlik
- Az örnek için bile basit iş akışı
- Daha fazla PCR replikası kullanarak hassasiyeti artırma yeteneği
- Small-fold değişikliklerinin doğrusal tespiti

dPCR'nin Dezavantajları

- Henüz çok yaygınlaşmış olmaması
- Valide edilmiş metotların azlığı
- Ticari kitlerin üretilmemiş olması

Teknolojinin olgunlaşmış olgunlaşmayacağı, maliyetin de azalıp azalmayacağı şu an birçok araştırmacı için merak konusudur. Şu an az miktarda uygulama alanı olsa da yarın çok daha fazla kullanım sahasının olması beklenmektedir.

Metotlar birbirinin tamamlayıcıları durumundadır. Dolayısı ile dPCR, kullanım alanlarında hassasiyeti yakalamak isteyenlere daha doğrulayıcı bir yaklaşım sağlayabilecektir.

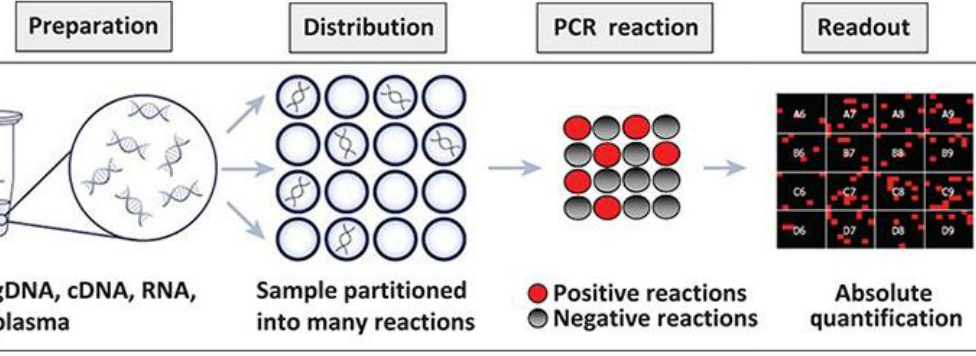
Reaksiyon
hazırlama

Bölümleme
Damlacık
Nanofluidic Chip

Amplifikasyon

Okuma

Yazılıma
aktarım



Dijital PCR'nin Yıllara Göre İlerlemesi

- **1992** İlk dPCR sistemi tasarlandı ve tanımlandı.
- **1999** İlk dijital PCR terimini kullanan makale yayınlandı.
- **2007** İlk ticari dPCR sistemi, mikroakışkan çipler ve mikrodiziye dayalı olarak tanıtıldı.
- **2010** İlk ticari dPCR sistemi, dönen mikroakışkan disklerle dayalı olarak tanıtıldı.
- **2011** İlk su-yağ emülsiyonu/damlacıklara dayalı ticari dPCR sistemi tanıtıldı.
- **2017** İlk ticari mikrolapla tabanlı dPCR sistemi tanıtıldı.
- **2020** İlk ticari nanoplate tabanlı dPCR sistemi piyasaya sürüldü.

dPCR'nin Kullanım Alanları

- Kopya sayısı varyasyonları
- Nadir Mutasyon Tespiti
 - ~Kanserin mevcut tespit seviyelerinin altında belirlenmesi
 - ~Kanserde yeni mutasyonları ve kopyaları tespit etmek
 - ~Nadir ilaç dirençli mutasyonların izlenmesi
- Viral yük tespiti
 - ~Bakteriyel yük
- Gen ekspresyonu
 - ~mRNA seviyelerinin belirlenmesi
- Metilasyon olaylarının incelenmesi
- NSG kütüphanelerinin kantitasyonu
- Absolut kantifikasyon (Var/yok analizleri)
- Tek nokta mutasyonları (SNP)
- GDO analizleri
- Genotipleme
- Enfeksiyon hastalıkları (FactorV, MTHFR vb.)
- Çevresel testler
- Prenatal diyabetik
- Organ nakilleri
- DNA ekstraksiyonunun etkinliğinin belirlenmesi
- Düşük düzeyli patojenlerin kantitasyonu
- Yeterlilik testlerinde referans metot olma özelliği
- Laboratuvarlar arası sonuçların daha iyi karşılaştırılabilirliği

Neden dPCR'ye geçelim?

Nükleik asit hedefleri arasında standart eğriye gerek olmadan yüksek hassasiyetli kantitatif sonuç alabilme dPCR'nin en büyük gücü olarak gözükmektedir.

Patojen analizi ve GDO tespiti için uygun maliyetli yöntem sunması. İnhibisyonlu örnek ve tohum örneklerinde yüksek hassasiyet sağlaması.

Basitleştirilmiş sonuç yorumlama sistemi.

Optimal altı sayılabilecek testlerde geliştirilmiş duyarlılık.

