

Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

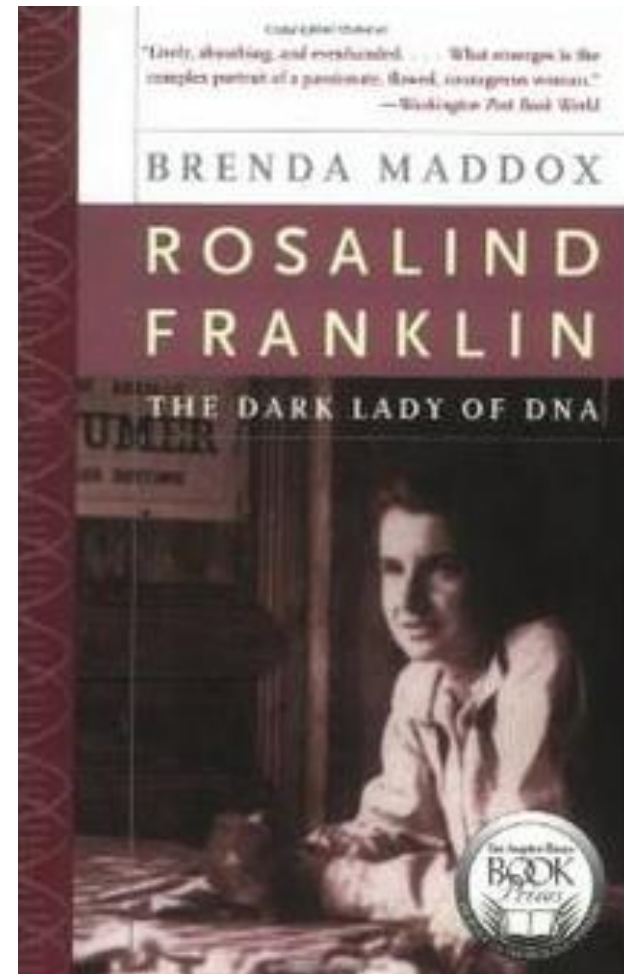
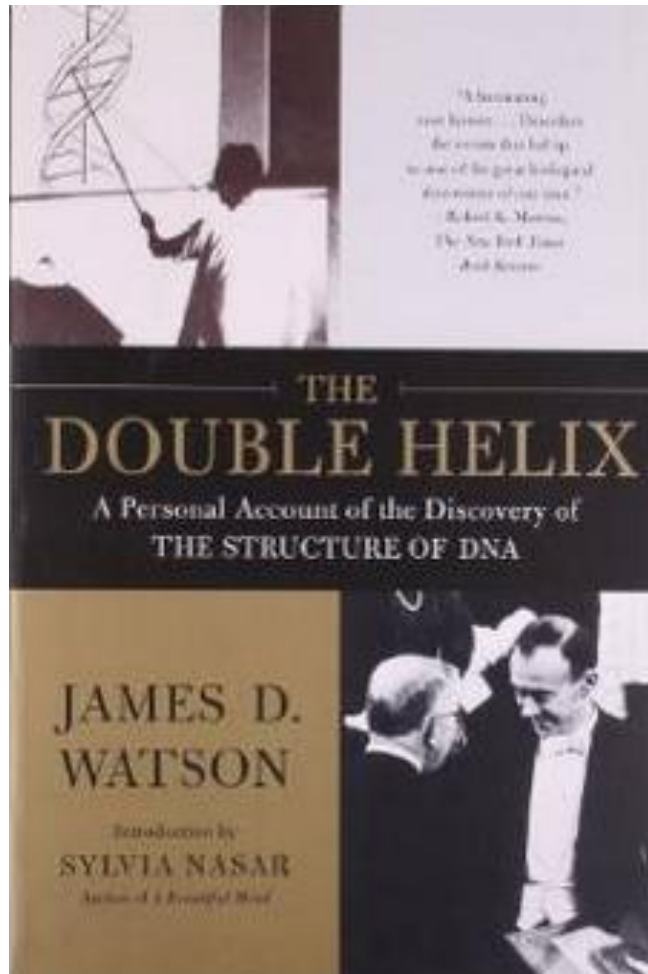
Διάλεξη 7 -PCR ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Αλίκη Ντζιφά, PhD

2024

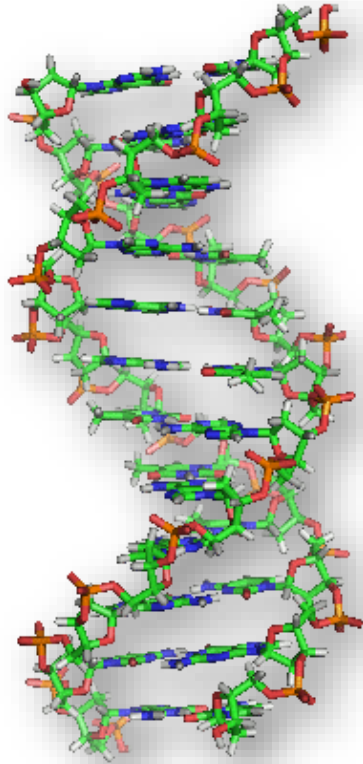
Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

DNA discovery



<http://www.nature.com/nature/dna50/archive.html>

DNA



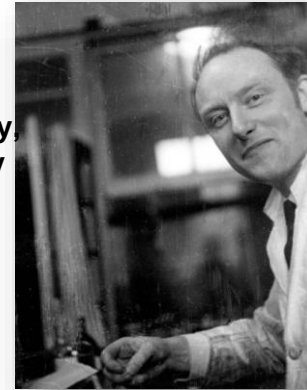
- Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
- Σε αυτό φυλάσσεται η γενετική πληροφορία, η οποία μεταφέρεται μέσω της μεταγραφής στο mRNA και μέσω της μετάφρασης στις πρωτεΐνες.
- Ευκαρυωτικά κύτταρα: βρίσκεται στον πυρήνα
- Προκαρυωτικά κύτταρα: βρίσκεται σε μια περιοχή του κυτταροπλάσματος, το πυρηνοειδές.
- Φυσικό πολυμερές, τα μονομερή του ονομάζονται νουκλεοτίδια.
- Δομή διπλής έλικας. Στο εξωτερικό ένας κορμός από φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και στο εσωτερικό οι βάσεις. Οι δυο κλώνοι της έλικας συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου.

Ανακάλυψη της δομής του DNA

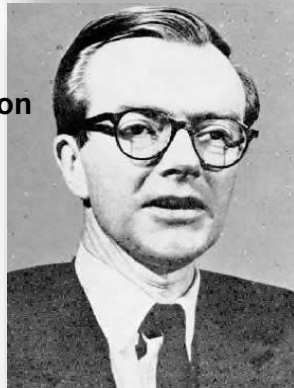
James Watson,
Cavendish
Laboratory,
Cambridge
University
Πεδίο ενασχόλησης:
Γενετική



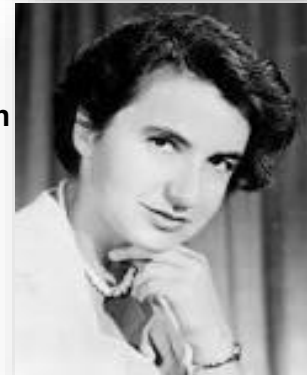
Francis Crick,
Cavendish Laboratory,
Cambridge University
Πεδία Ενασχόλησης:
Φυσική, Μοριακή
Βιολογία



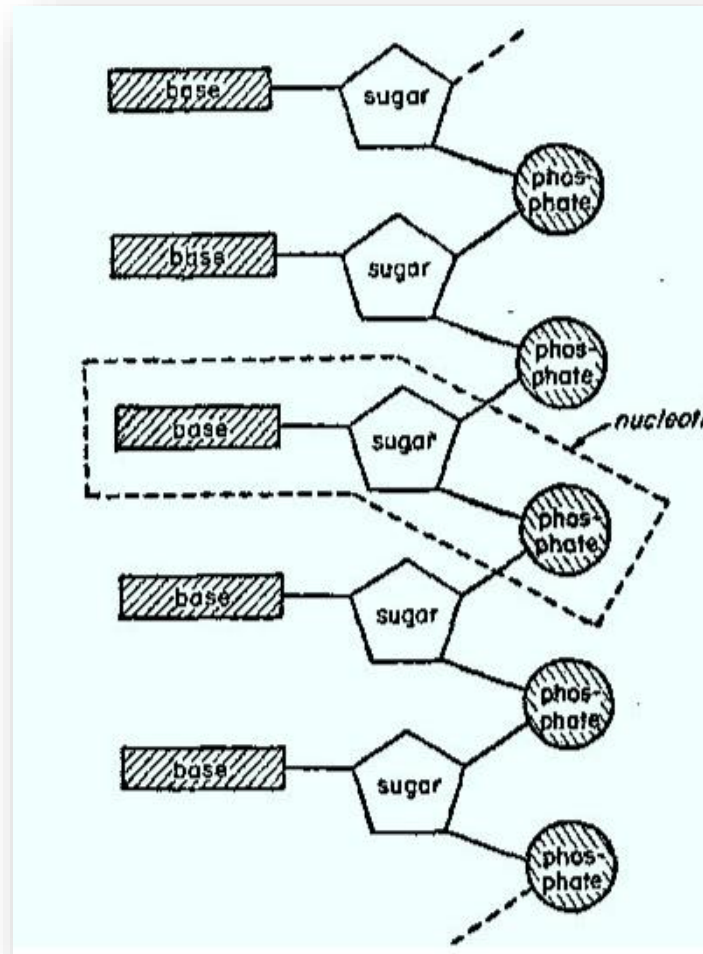
Maurice Wilkins,
King's College London
Πεδία ενασχόλησης:
Φυσική, Μοριακή
Βιολογία



Rosalind Franklin,
King's College London
Πεδίο ενασχόλησης:
Κρυσταλλογραφία
ακτίνων X

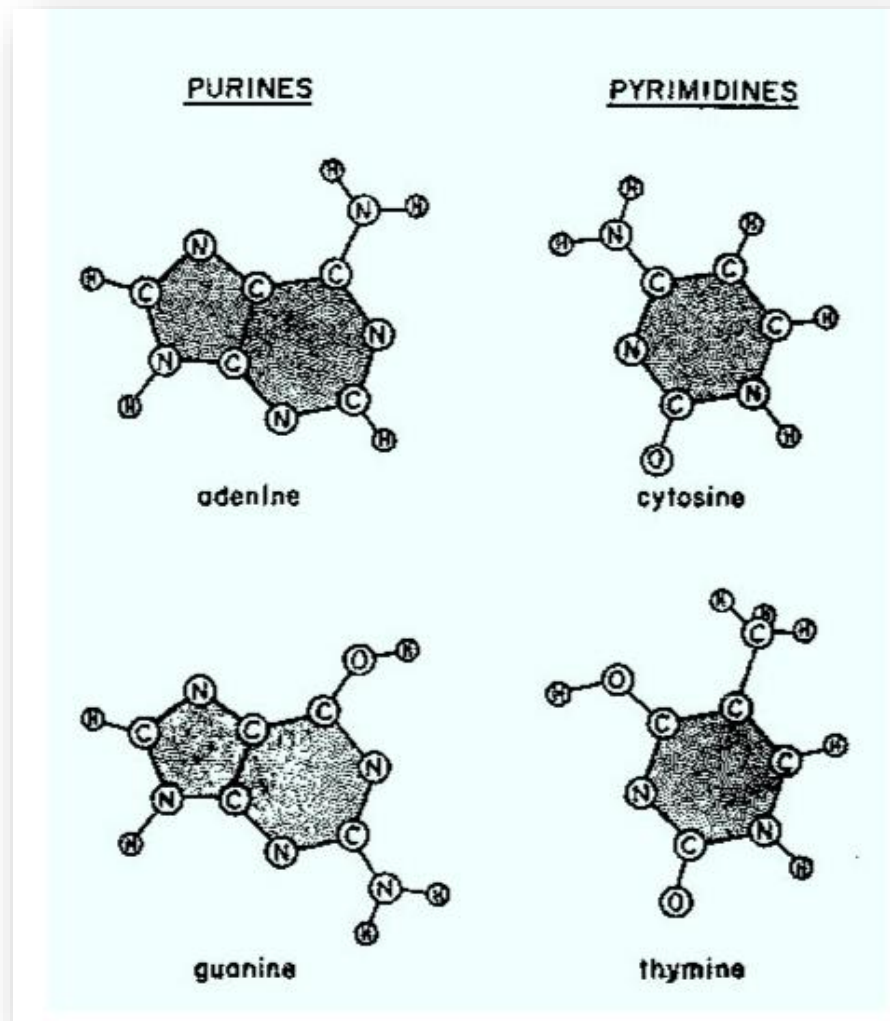


Μια πρώτη άποψη της δομής του DNA

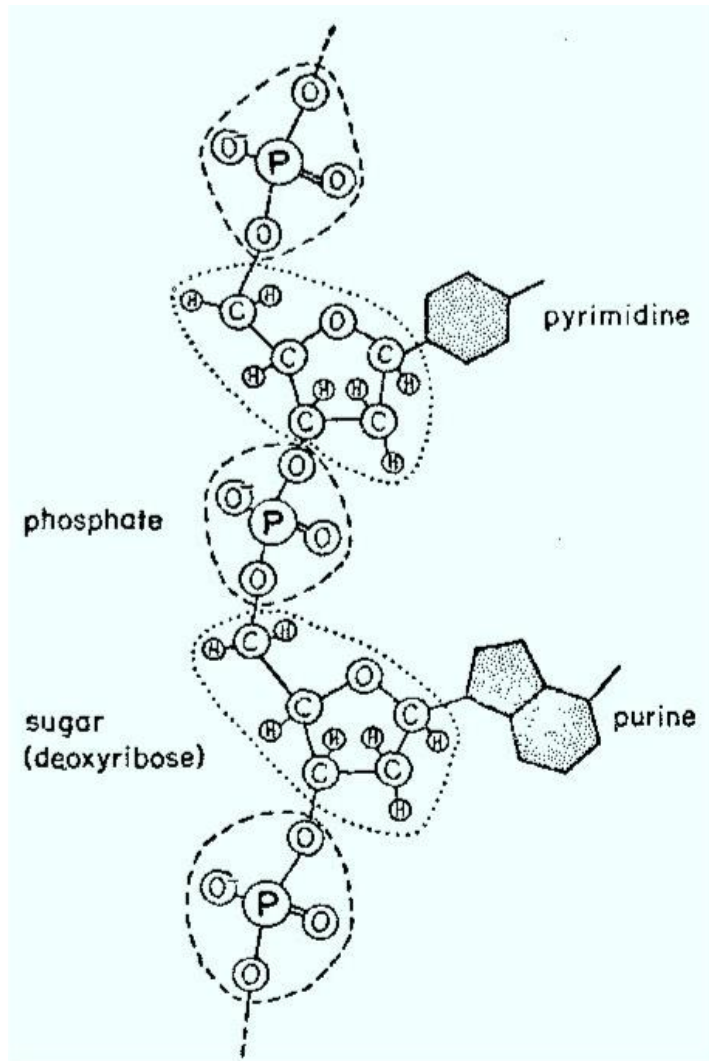


- Η ομάδα του Alexander Todd, ως οργανικοί χημικοί, ενδιαφερόταν μόνο για τον τρόπο σύνδεσης των μορίων και έτσι το 1951 φαντάζονταν ότι τα νουκλεοτίδια συνδέονται με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και άφησαν την τρισδιάστατη δομή του DNA στα χέρια των κρυσταλλογράφων

Συνήθης τρόπος απεικόνισης των αζωτούχων βάσεων (1951)

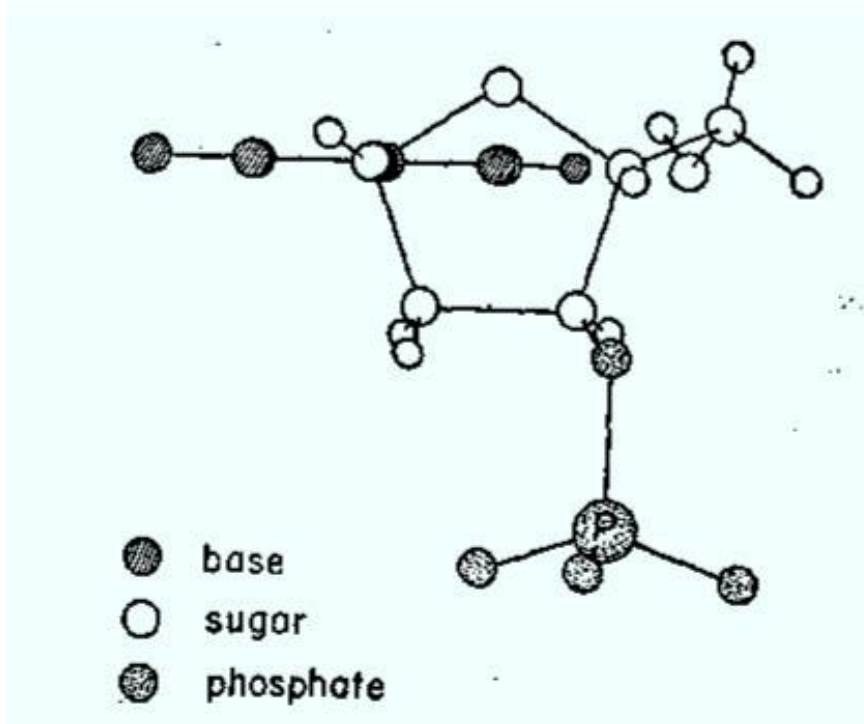


Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί του DNA



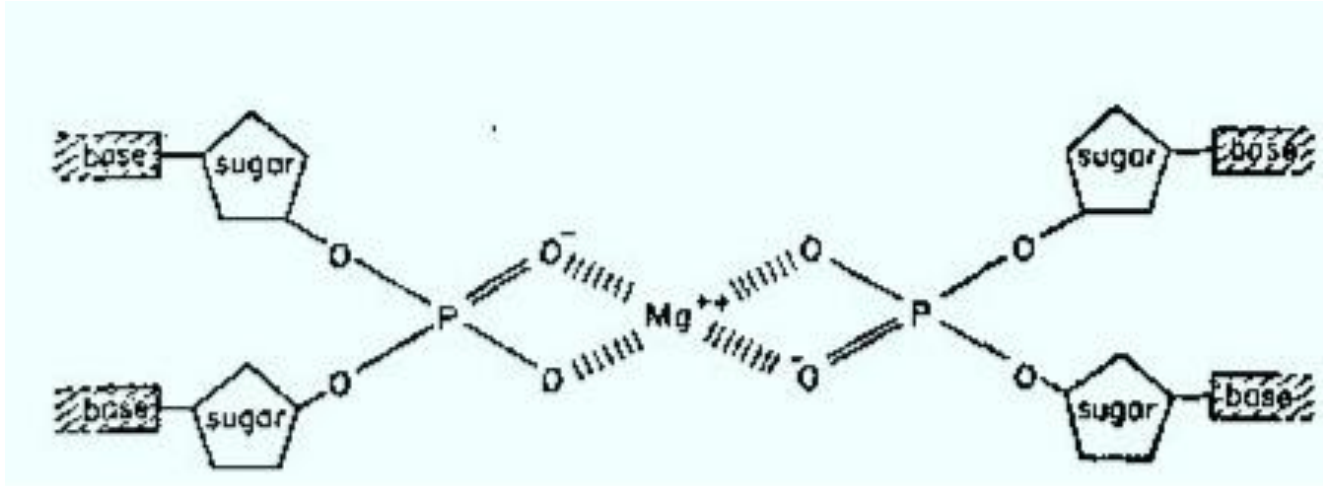
- Μια λεπτομερής απεικόνιση του σκελετού του DNA

Δομή νουκλεοτιδίου



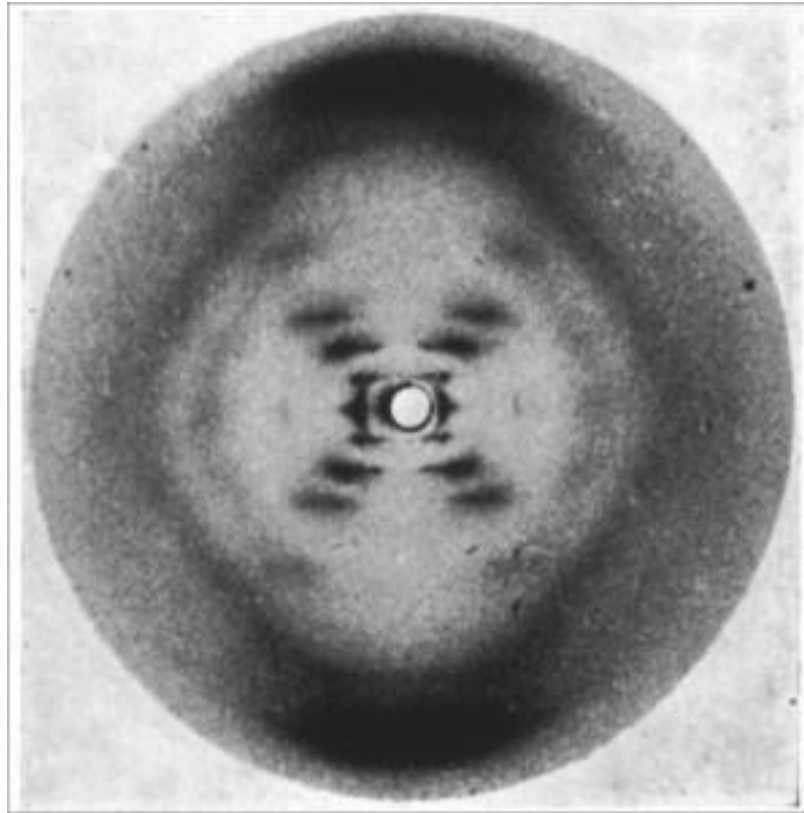
- Σύμφωνα με αυτή την απεικόνιση, η αζωτούχος βάση είναι κάθετη στο επίπεδο του δακτυλίου της δεοξυριβόζης (Φιρμπεργκ- μονόκλωνες δομές).

ιόντα μαγνησίου



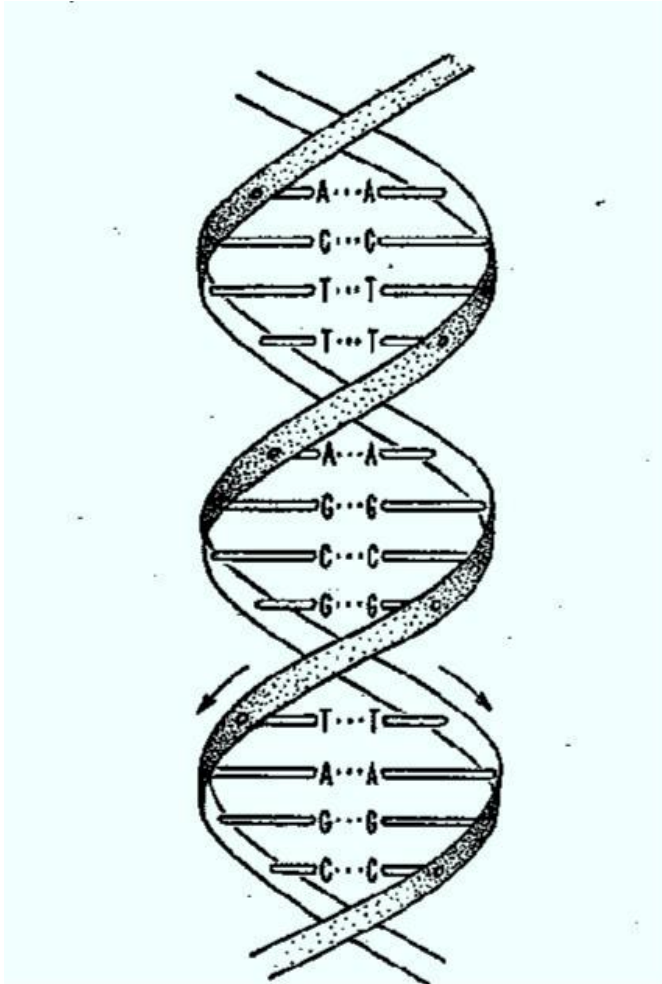
- Μία σκέψη του Watson για το πώς αντισταθμίζεται το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ιόντων από τα ιόντα μαγνησίου.

Photo 51



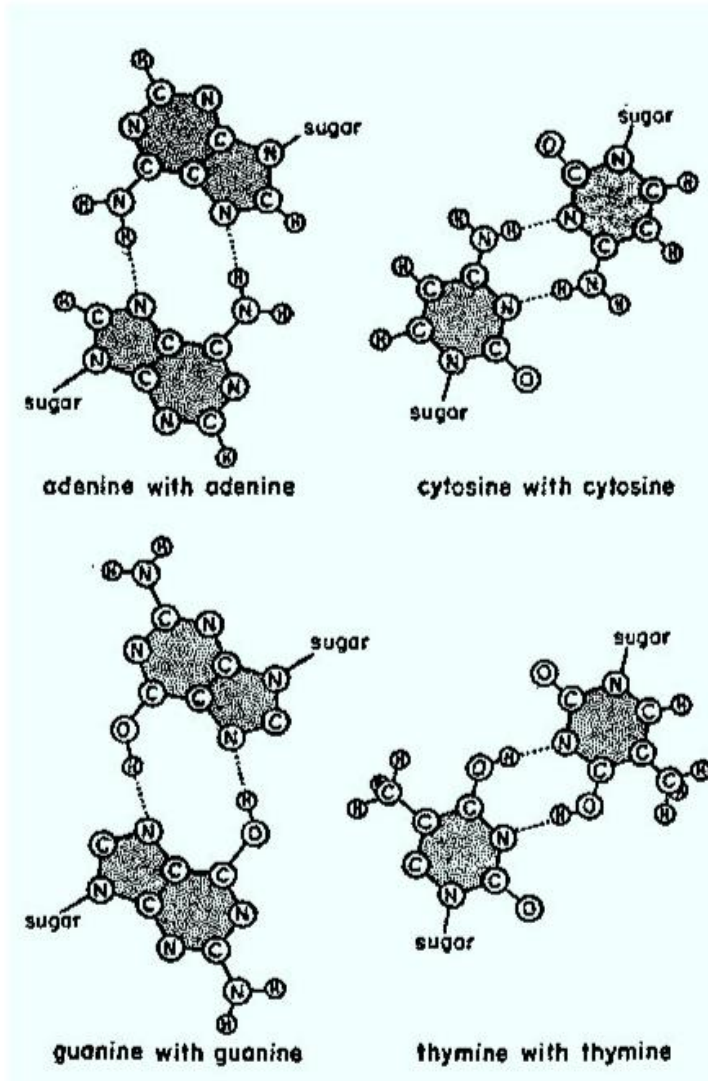
- Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της B μορφής του DNA από την Rosalind Franklin, King's College, London, UK

πρώτη λανθασμένη προσέγγιση ...



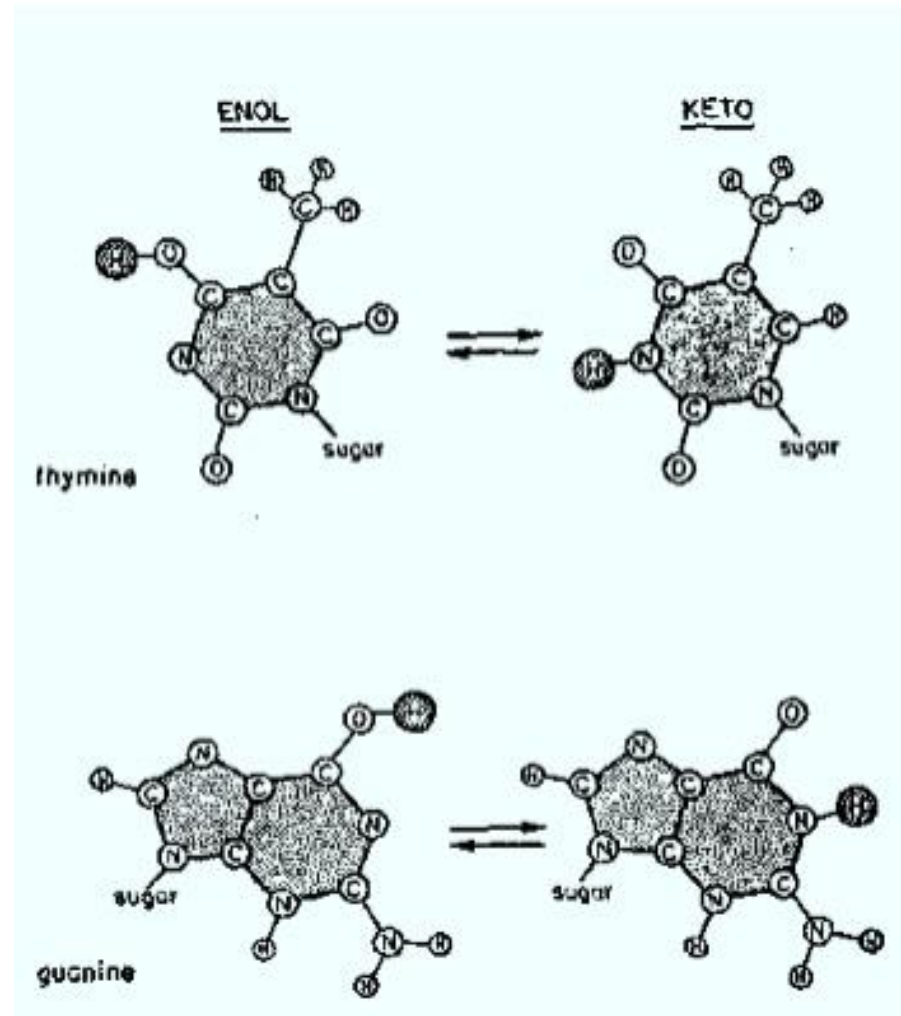
- Μια πρώτη και λανθασμένη προσέγγιση του Watson για τον τρόπο σύνδεσης των βάσεων στην διπλή έλικα του DNA

πρώτη λανθασμένη προσέγγιση ...

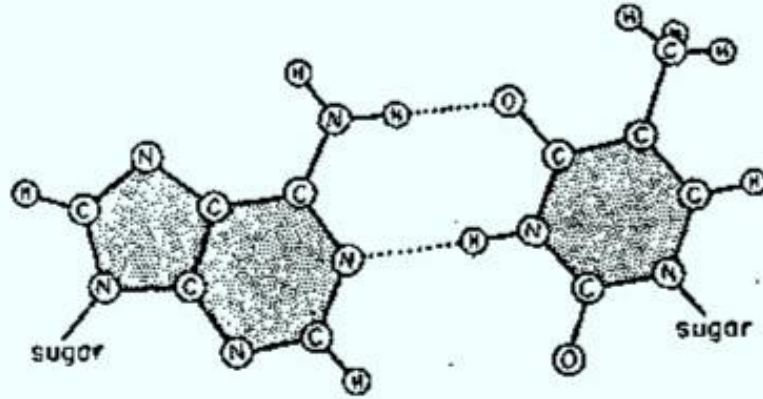


- Τρόπος σύνδεσης των αζωτούχων βάσεων με τον εαυτό τους σύμφωνα με την πρώτη προσέγγιση του Watson.

Ισορροπία ενολικής και κετονικής μορφής της θυμίνης και της γουανίνης

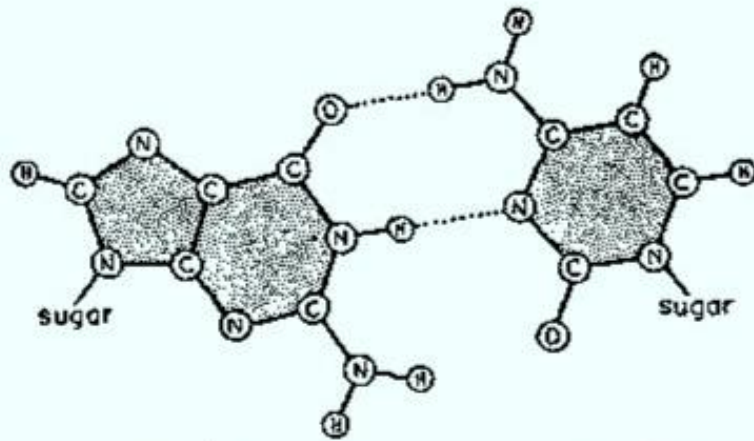


Τρόπος σύνδεσης των αζωτούχων βάσεων



adenine

thymine

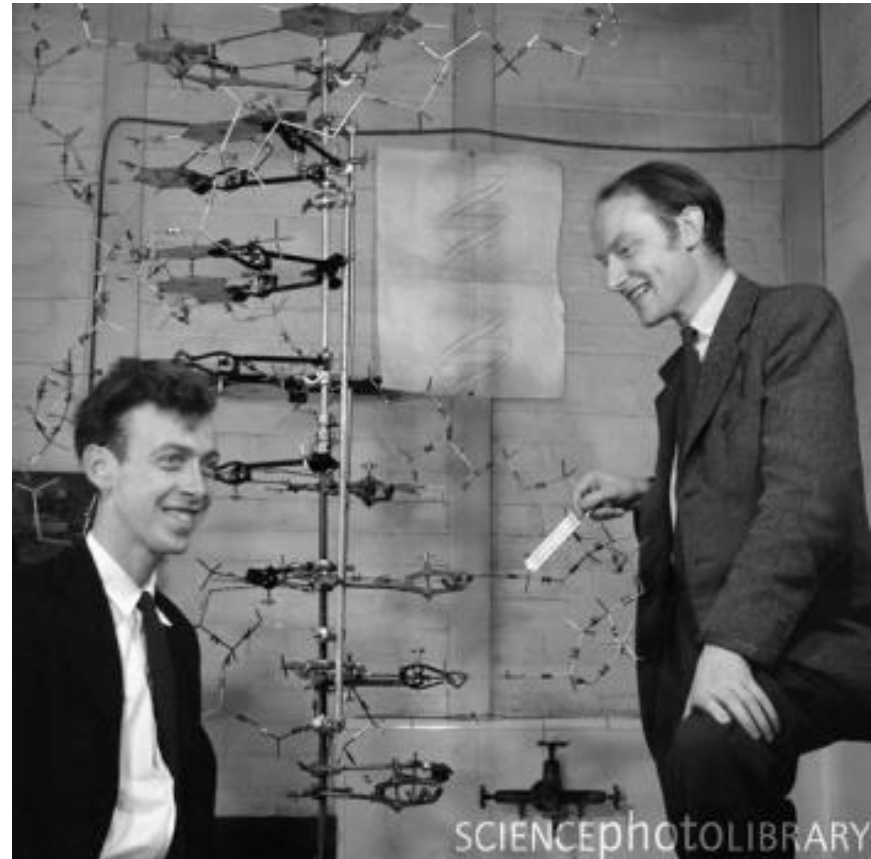
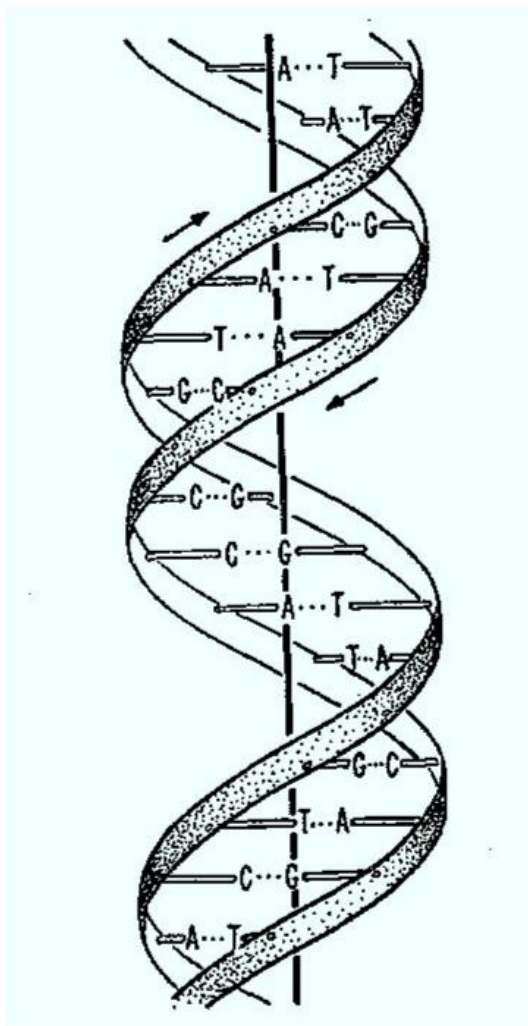


guanine

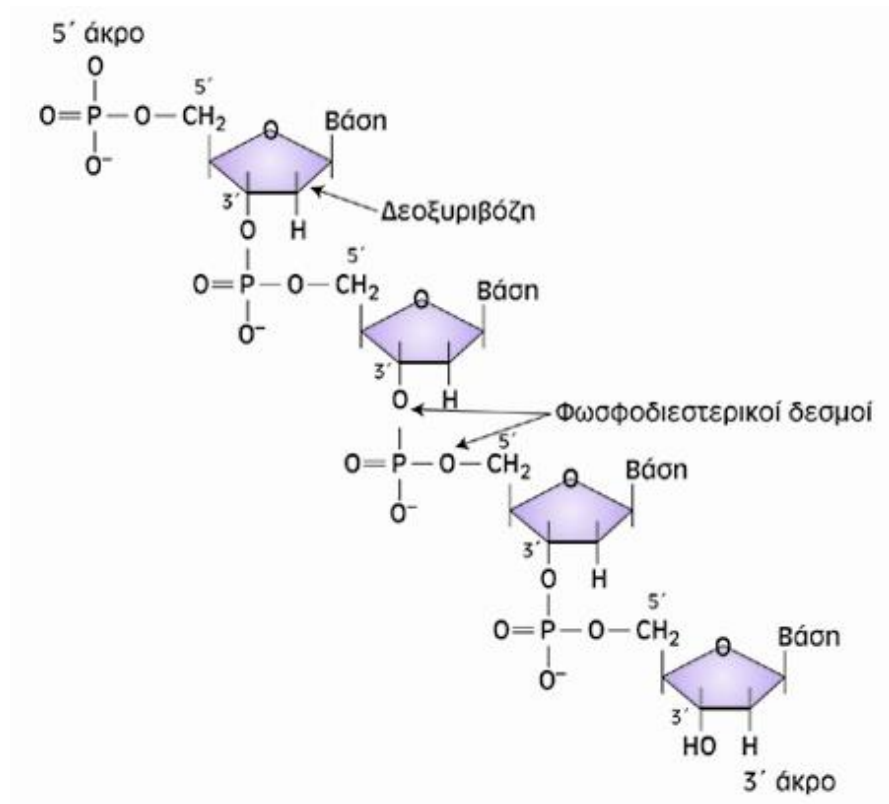
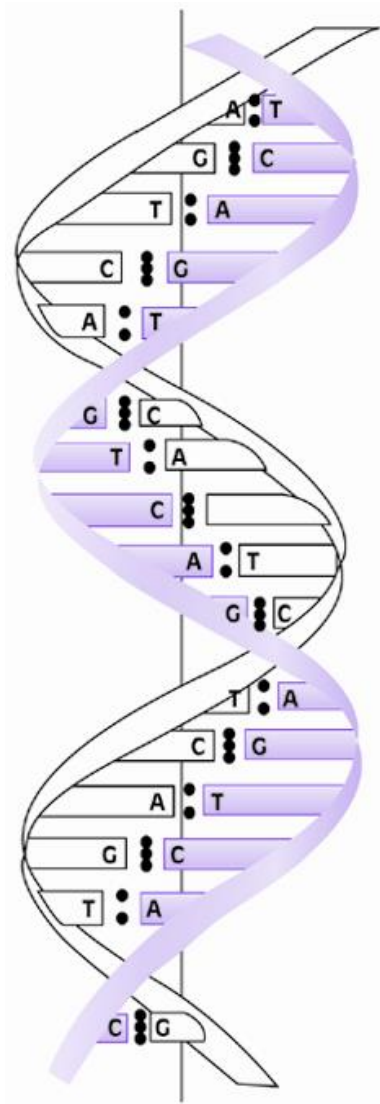
cytosine

- Μια πιο ορθή προσέγγιση για τον τρόπο σύνδεσης των αζωτούχων βάσεων. Για την γουανίνη και την κυτοσίνη πίστευαν ότι ανέπτυξαν μεταξύ τους τουλάχιστον 2 δεσμούς H.

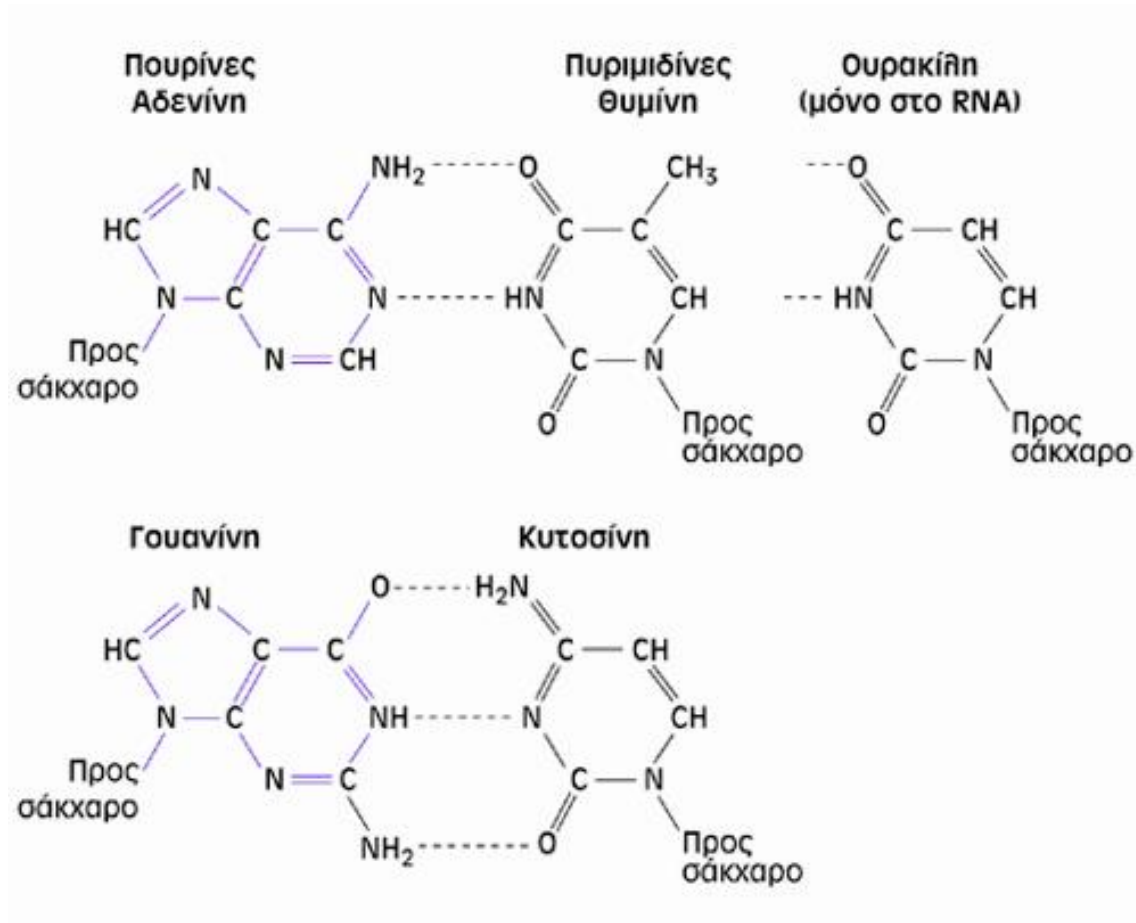
Οριστική και επιβεβαιωμένη δομή του DNA



DNA



A:T (2 δεσμοί H), C:G (3 δεσμοί H)



equipment, and to Dr. G. E. R. Deacon and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

- ¹Young, F. E., Orstadi, H., and Jevons, W., *Phil. Mag.*, **40**, 149 (1925).
- ²Louquet-Higgins, M. S., *Mon. Not. Roy. Astr. Soc., Geophys. Supp.*, **3**, 255 (1949).
- ³Van Arx, W. S., *Woods Hole Papers in Phys. Oceanogr. Meteor.*, **11** (3) (1952).
- ⁴Ekman, V. W., *Arkiv. Mat. Astron. Fysik. (Stockholm)*, **2**(11) (1935).

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey¹. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining 3'-*o*-deoxyribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's² model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. This

This figure is purely diagrammatic. The two ribbons resemble two phosphate-sugar chains and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.



is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{3,4} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data^{4,5} on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material. Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

King's College, London. One of us (J. D. W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

J. D. WATSON

F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge, April 2.

- ¹Pauling, L., and Corey, R. B., *Nature*, **171**, 346 (1952); *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, **39**, 81 (1952).
- ²Furberg, S., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 634 (1952).
- ³Chargaff, E., *In: Information and Zamenhof, S., Strausman, G., and Chargaff, E., Biochim. et Biophys. Acta*, **8**, 402 (1952).
- ⁴Wyatt, G. R., *J. Gen. Physiol.*, **36**, 201 (1951).
- ⁵Astbury, W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1**, Nucleic Acid, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).
- ⁶Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, **10**, 192 (1953).

Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids

WHILE the biological properties of deoxypentose nucleic acid suggest a molecular structure containing great complexity, X-ray diffraction studies described here (cf. Astbury¹) show the basic molecular configuration has great simplicity. The purpose of this communication is to demonstrate, in a preliminary way, some of the experimental evidence for the polynucleotide chain configuration being helical, and existing in this form when in the natural state. A fuller account of the work will be published shortly.

The structure of deoxypentose nucleic acid is the same in all species (although the nitrogen base ratios alter considerably) in nucleoprotein, extracted or in cells, and in purified nucleate. The same linear group of polynucleotide chains may pack together parallel in different ways to give crystalline²⁻⁴, semi-crystalline or paracrystalline material. In all cases the X-ray diffraction photograph consists of two regions, one determined largely by the regular spacing of nucleotides along the chain, and the other by the longer spacings of the chain configuration. The sequence of different nitrogen bases along the chain is not made visible.

Oriented paracrystalline deoxypentose nucleic acid ('structure B' in the following communication by Franklin and Gosling) gives a fibre diagram as shown in Fig. 1 (cf. ref. 4). Astbury suggested that the strong 3.4-Å. reflexion corresponded to the inter-nucleotide repeat along the fibre axis. The ~34 Å. layer lines, however, are not due to a repeat of a polynucleotide composition, but to the chain configuration repeat, which causes strong diffraction as the nucleotide chains have higher density than the interstitial water. The absence of reflexions on or near the meridian immediately suggests a helical structure with axis parallel to fibre length.

Diffraction by Helices

It may be shown⁵ (also Stokes, unpublished) that the intensity distribution in the diffraction pattern of a series of points equally spaced along a helix is given by the squares of Bessel functions. A uniform continuous helix gives a series of layer lines of spacing corresponding to the helix pitch, the intensity distribution along the *n*th layer line being proportional to the square of J_n , the *n*th order Bessel function. A straight line may be drawn approximately through

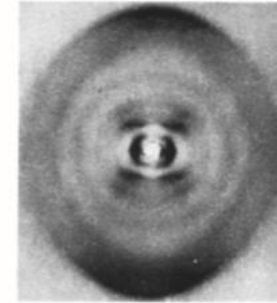


Fig. 1. Fibre diagram of deoxypentose nucleic acid from *E. coli*. Fibre axis vertical.

the innermost maxima of each Bessel function and the origin. The angle this line makes with the equator is roughly equal to the angle between an element of the helix and the helix axis. If a unit repeats *n* times along the helix there will be a meridional reflexion (J_0^2) on the *n*th layer line. The helical configuration produces side-bands on this fundamental frequency, the effect⁵ being to reproduce the intensity distribution about the origin around the new origin, on the *n*th layer line, corresponding to C' in Fig. 2.

We will now briefly analyse in physical terms some of the effects of the shape and size of the repeat unit or nucleotide on the diffraction pattern. First, if the nucleotide consists of a unit having circular symmetry about an axis parallel to the helix axis, the whole diffraction pattern is modified by the form factor of the nucleotide. Second, if the nucleotide consists of a series of points on a radius at right-angles to the helix axis, the phases of radiation scattered by the helices of different diameter passing through each point are the same. Summation of the corresponding Bessel functions gives reinforcement for the inner-

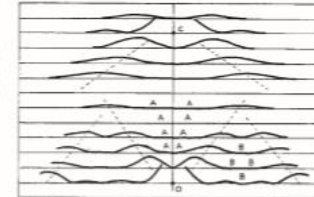


Fig. 2. Diffraction pattern of system of helices corresponding to structure of deoxyribose nucleic acid. The squares of Bessel functions are plotted about 0 on the equator and on the first, second, third and fifth layer lines for half of the nucleotide mass at 20 Å. diameter and remainder distributed along a radius, the mass at a given radius being proportional to the radius. About C' on the tenth layer line smaller functions are plotted for an inner diameter of 12 Å.

Δημοσίευση στο Nature

❖ DNA discovery April 25, 1953: Rosalind Franklin and Ray Gosling

740

NATURE

April 25, 1953 Vol. 171

We wish to thank Prof. J. T. Randall for encouragement; Profs. E. Chargaff, R. Signer, J. A. V. Butler and Drs. J. D. Watson, J. D. Smith, L. Hamilton, J. C. White and G. R. Wyatt for supplying material without which this work would have been impossible; also Drs. J. D. Watson and Mr. F. H. C. Crick for stimulation, and our colleagues R. E. Franklin, R. G. Gosling, G. L. Brown and W. E. Seeds for discussion. One of us (H. R. W.) wishes to acknowledge the award of a University of Wales Fellowship.

M. H. F. WILKINS
Medical Research Council Biophysics
Research Unit,

A. R. STOKES
H. R. WILSON
Wheatstone Physics Laboratory,
King's College, London.
April 2.

¹ Astbury, W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1, Nucleic Acid (Cambridge Univ. Press, 1947).

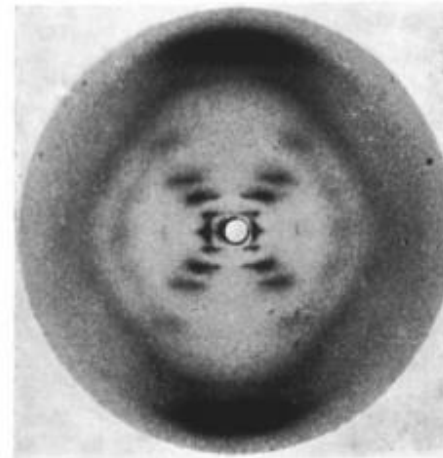
² Riley, D. P., and Oster, G., *Biochim. et Biophys. Acta*, 7, 526 (1951).

³ Wilkins, M. H. F., Gosling, R. G., and Seeds, W. E., *Nature*, 167, 759 (1951).

⁴ Astbury, W. T., and Bell, F. O., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 6, 109 (1938).

⁵ Cochran, W., Crick, F. H. C., and Vand, V., *Acta Cryst.*, 5, 581 (1952).

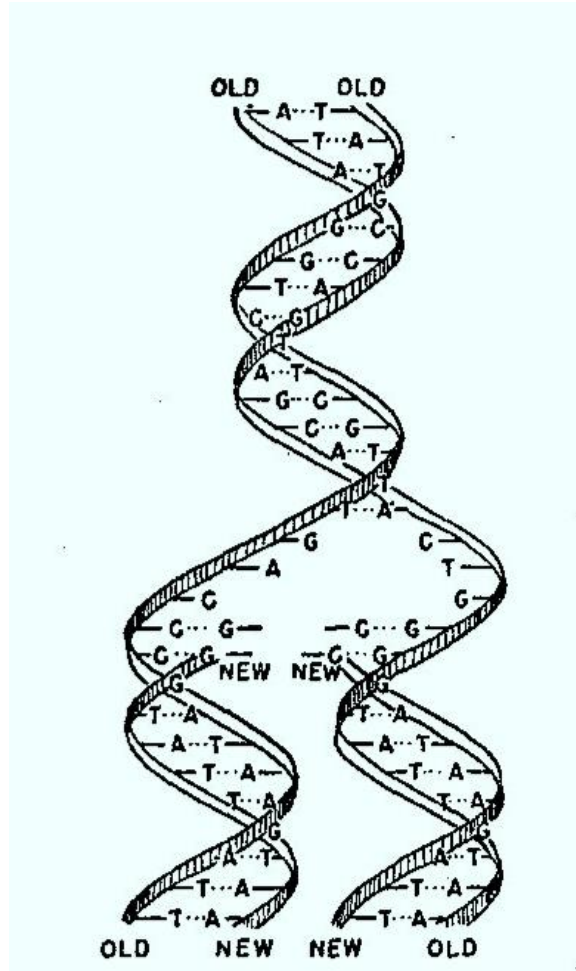
⁶ Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, 10, 192 (1953).



Sodium deoxyribose nucleate from calf thymus. Structure B

molecules, each unit being shielded by a sheath of water. Each unit is then free to take up its least-energy configuration independently of its neighbours and, in view of the nature of the long-chain molecules involved, it is highly likely that the general form will be helical³. If we adopt the hypothesis of a helical

Αντιγραφή του DNA



- Ο Watson εκτός από την δομή του DNA ανακάλυψε και τον ημισυντηρητικό τρόπο αντιγραφής του

Watson and Crick, 1953



“This structure has novel features which are of considerable biological interest”

Watson and Crick, 1953

Απονομή Νόμπελ 1962



Cambridge: the EAGLE



The Eagle, Cambridge
Discovery of DNA

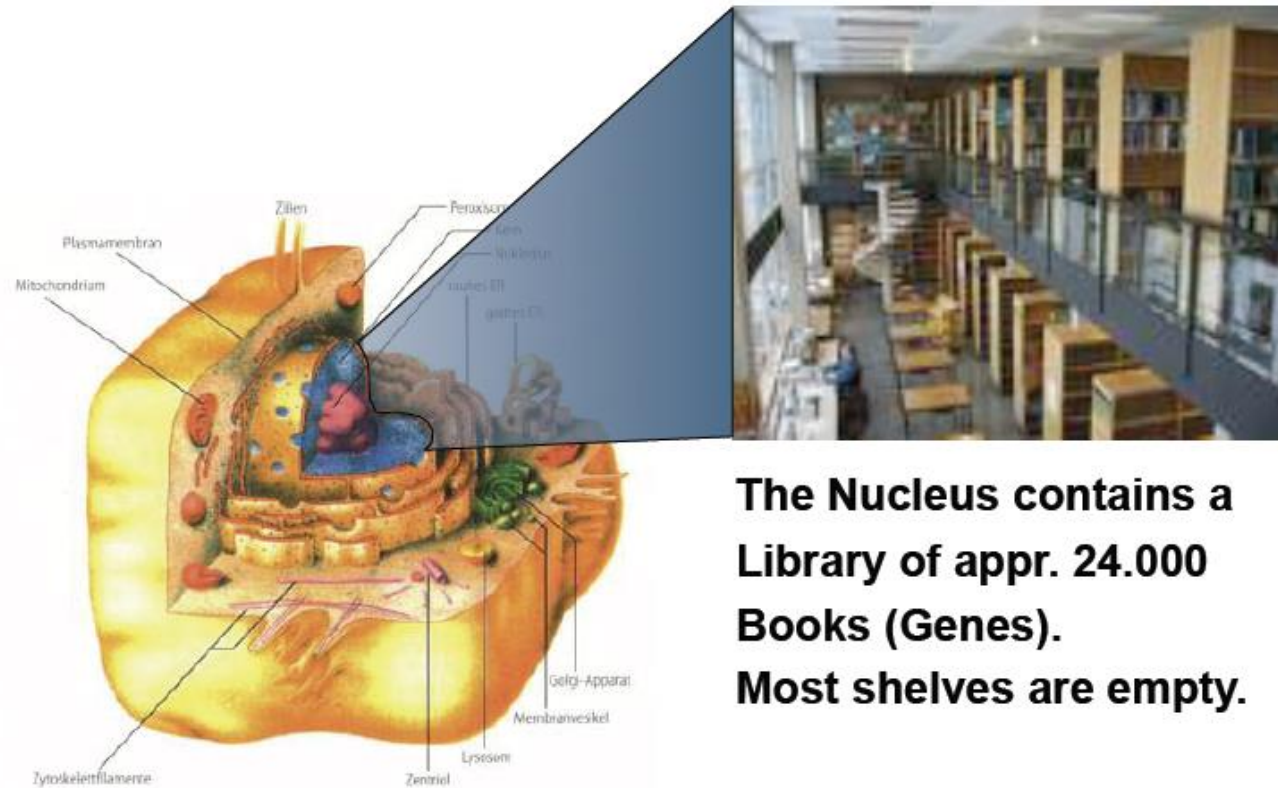
On this spot, on February 28, 1953, Francis Crick and James Watson made the first public announcement of the discovery of DNA with the words "We have discovered the secret of life". Throughout their early partnership Watson & Crick dined in this room on six days every week.



Cambridge: the surroundings of DNA structure discovery



Organization of the genome in a eukaryotic cell

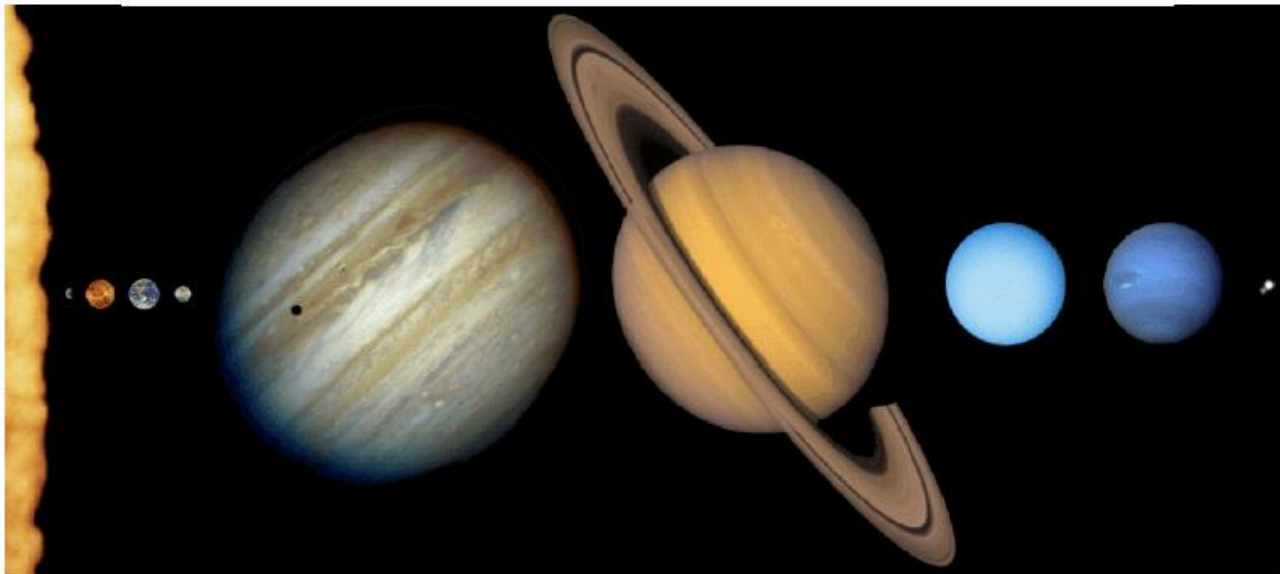


**The Nucleus contains a
Library of appr. 24.000
Books (Genes).
Most shelves are empty.**

How long is the genome of a 3 years old child?

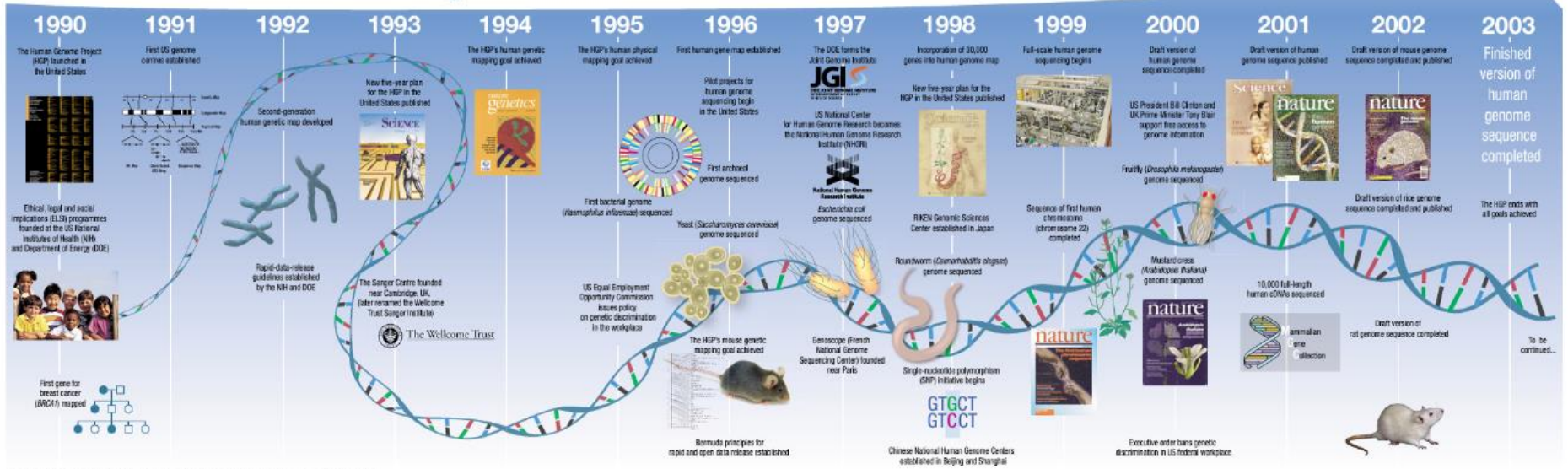
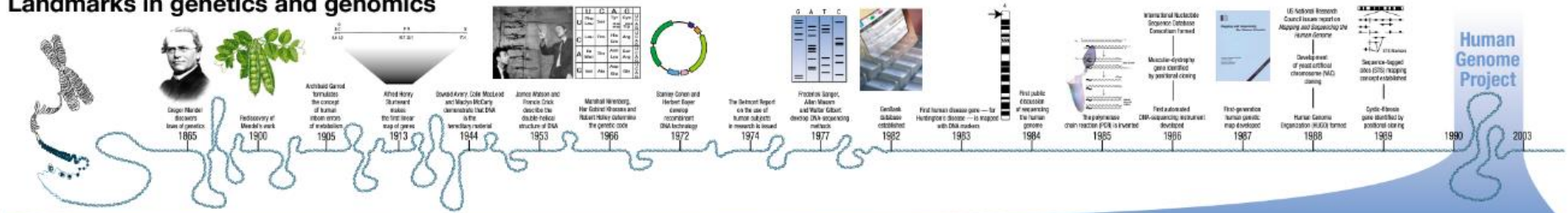


← DNA of a small child: 5 Roundtrips through the Solar System →



The Human Genome Project

Landmarks in genetics and genomics

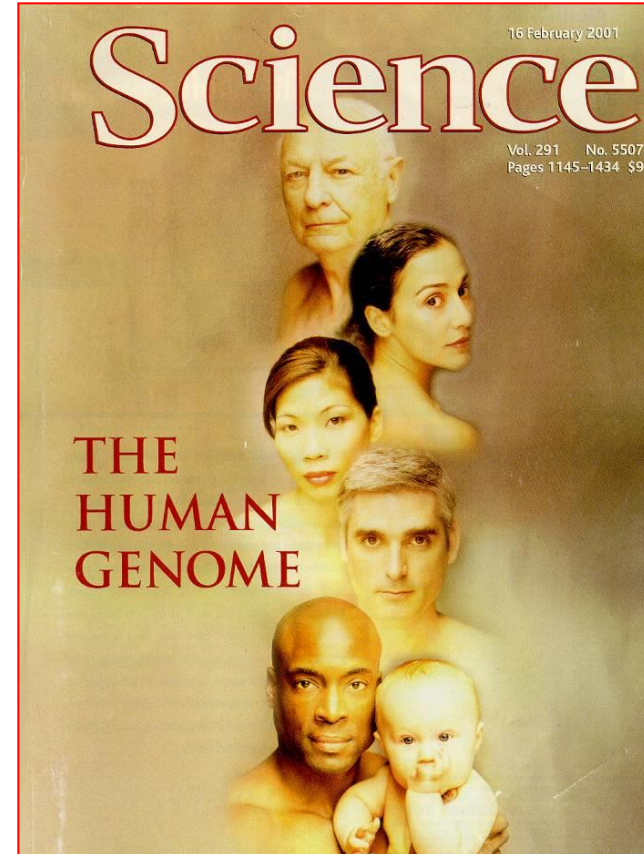


➤ **Launched in October 1990 and completed in April 2003!**

The Human Genome Project

➤ February 2001

Launched in October 1990 and completed in April 2003



<https://www.genome.gov/human-genome-project>

Μοριακή Διαγνωστική

- βασίζεται στην αξιοποίηση των τεχνικών ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων με σκοπό τη διάγνωση ασθενειών σε μοριακό επίπεδο καθώς και την έγκαιρη και ευαίσθητη ανίχνευση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών
- Οι μέθοδοι μοριακής διαγνωστικής αποτελούν σήμερα τις μεθόδους επιλογής για την έγκαιρη διάγνωση κληρονομικών ασθενειών, τον μοριακό χαρακτηρισμό του καρκίνου και την ανίχνευση παθογόνων (πχ ιών)
- Σημαντική προϋπόθεση για ευρεία εφαρμογή των μεθόδων της μοριακής διαγνωστικής στη ρουτίνα των κλινικών εργαστηρίων αποτελεί η απλότητα, ο εύκολος χειρισμός και η δυνατότητα αυτοματοποίησης, όπως επίσης και το σχετικά χαμηλό κόστος

Οι τεχνικές της μοριακής διαγνωστικής στοχεύουν κυρίως:



- Στην ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων (point mutations), ελλείψεων (deletions) και ενθέσεων (insertions) που σχετίζονται με κληρονομικές ασθένειες όπως κυστική ινώδη νόσο, μυϊκή δυστροφία, μεσογειακή αναιμία, καρκίνος μαστού.
- Στην ανίχνευση/προσδιορισμό νουκλεϊκών οξέων διαφόρων παθογόνων που βρίσκονται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις σε βιολογικά υγρά (HIV, HPV, HBV, HCV)
- Στη έγκαιρη διάγνωση και παρακολούθηση μικρομεταστάσεων σε περιπτώσεις νεοπλασιών (λευχαιμίες, καρκίνος μαστού)
- Στην παραγωγή δακτυλικού αποτυπώματος DNA (DNA fingerprinting) για εφαρμογές στην ιατροδικαστική

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR)

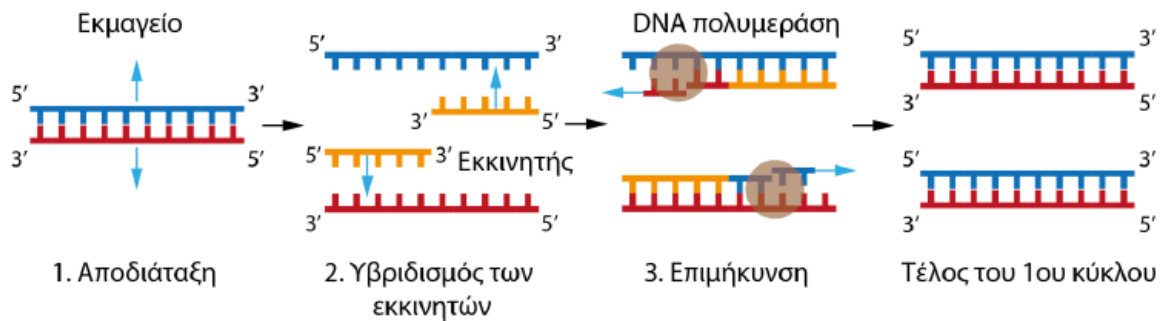
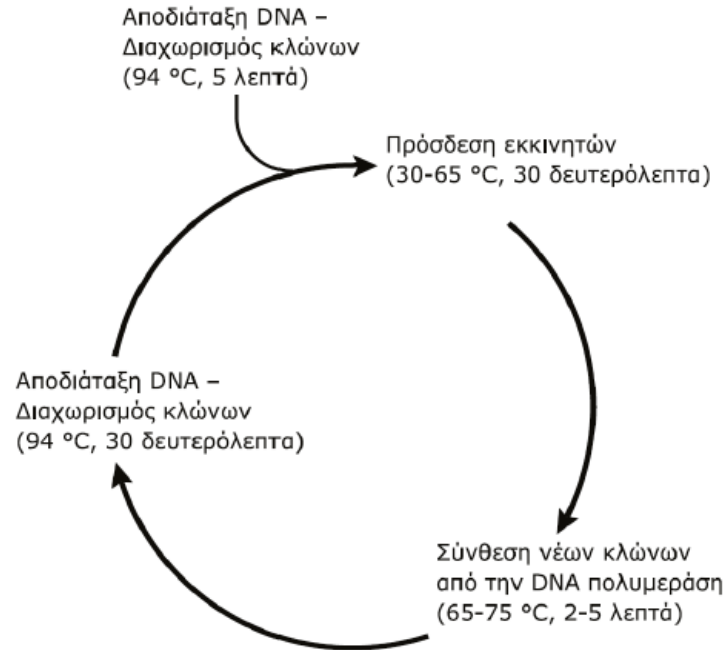
- in vitro μέθοδος για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA
- δίνει τη δυνατότητα απόκτησης μεγάλης ποσότητας DNA για ανάλυση
- in vitro μέθοδος κλωνοποίησης
- *With PCR the bits of embedded, often hidden genetic information can be amplified into large quantities of accessible, identifiable and analysable material, (Guyer RL, Koshland DE. The molecule of the year, Science, 246:1543, 1989)*

Ιστορική αναδρομή

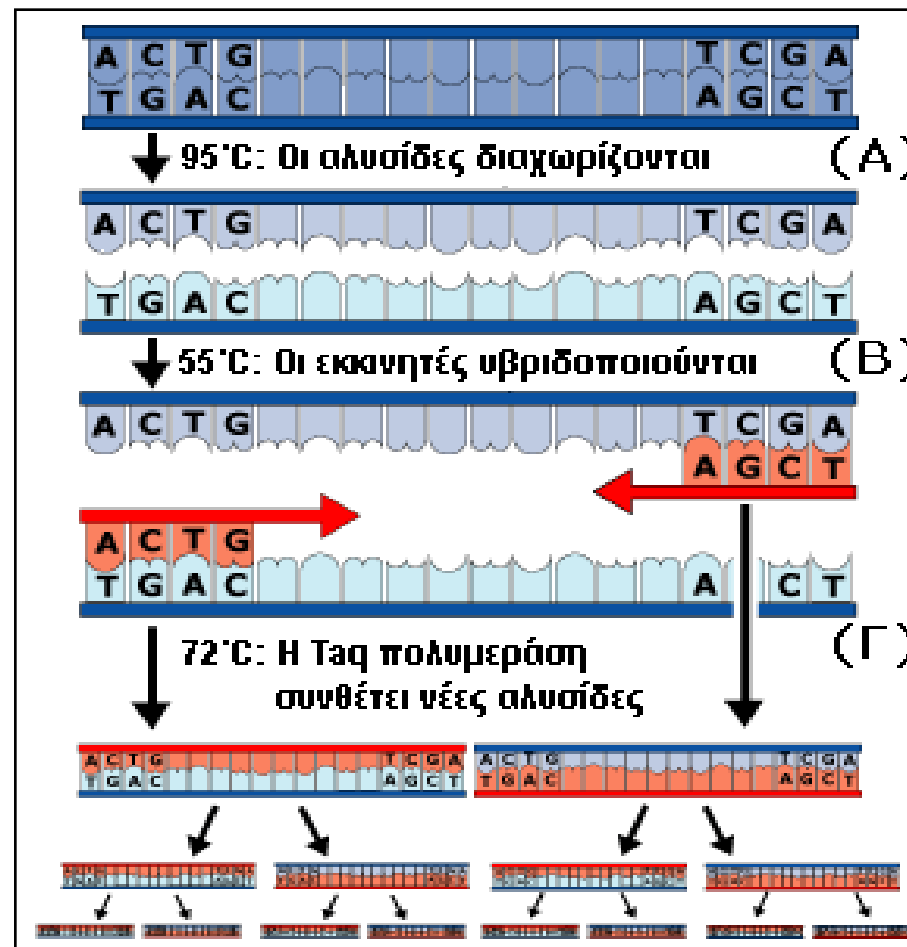
- 1983: σύλληψη της ιδέας, K. Mullis, Cetus Corporation
- 1985: πρώτη δημοσίευση, Science 1985, 230:1350-1354
- 1988: θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, Science 1988, 239:487-491
- 1988-σήμερα : Χιλιάδες άρθρα με εφαρμογές PCR
- 1989 το περιοδικό Science επέλεξε την PCR σαν το "μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα" και την Taq DNA πολυμεράση σαν το "μόριο της χρονιάς"
- 1993 βραβείο Nobel Χημείας στον K.Mullis

	The Nobel Prize in Chemistry 1993 Kary B. Mullis, Michael Smith
The Nobel Prize in Chemistry 1993	
Nobel Prize Award Ceremony	
Kary B. Mullis	
	Biographical Nobel Lecture
	Interview Other Resources

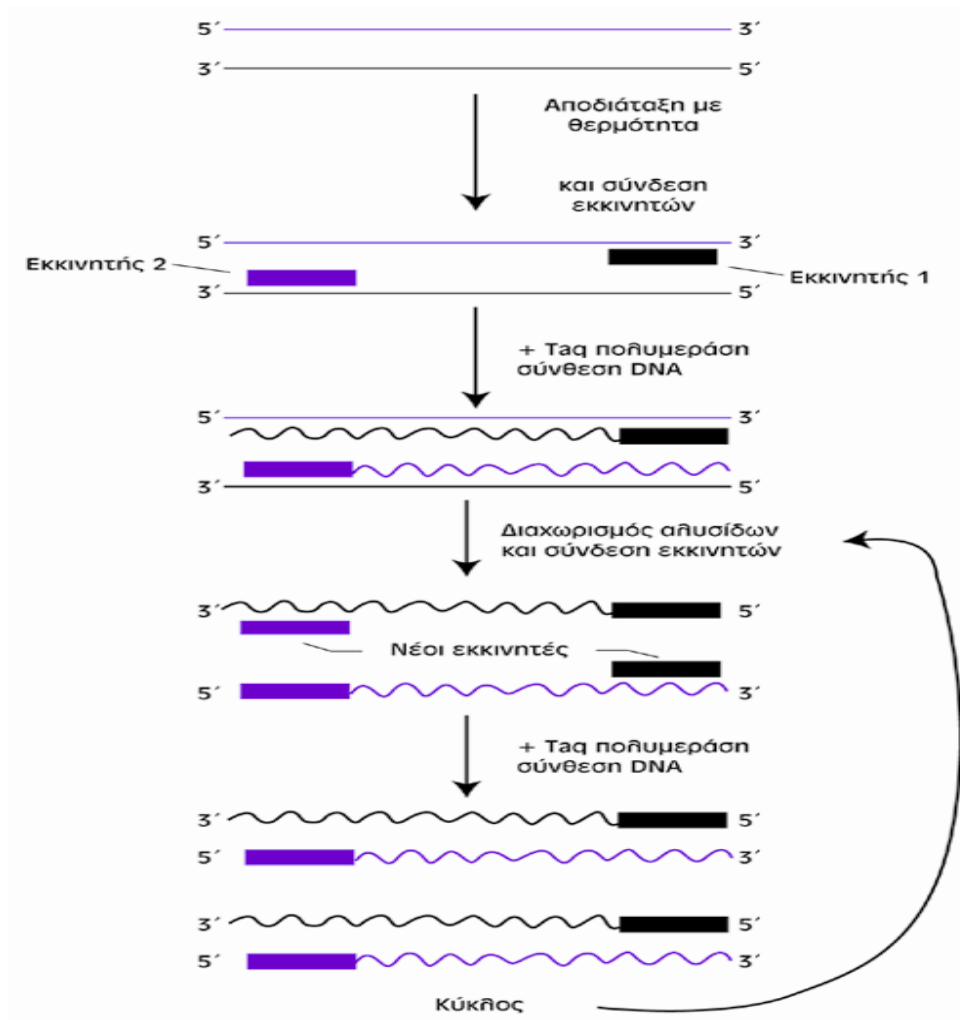
Ο κύκλος της τεχνικής PCR



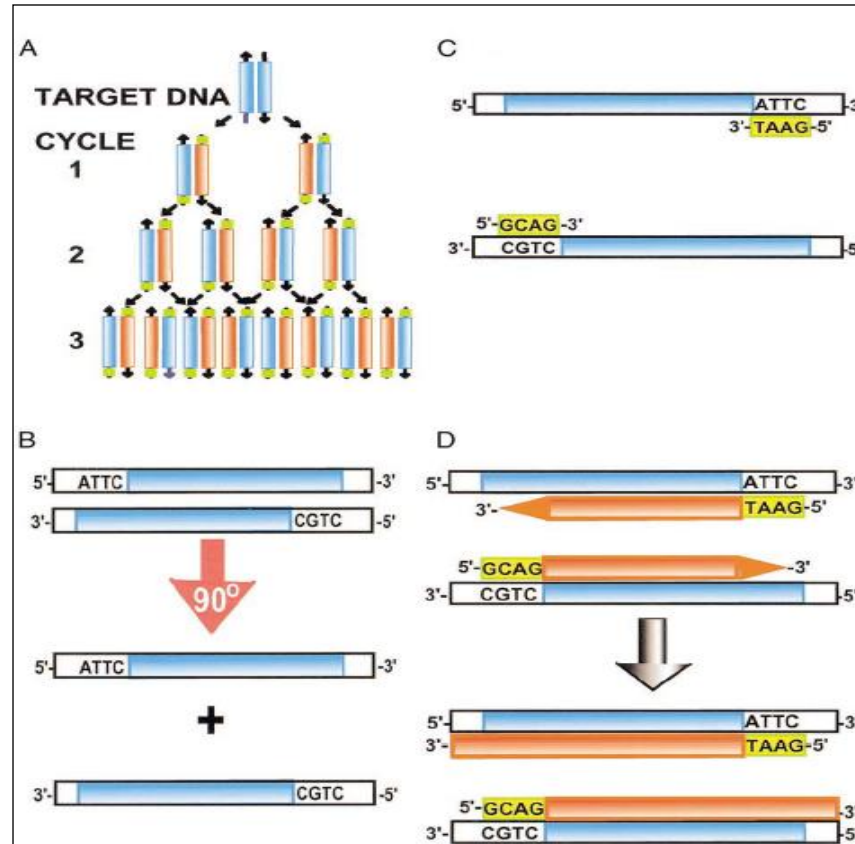
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης



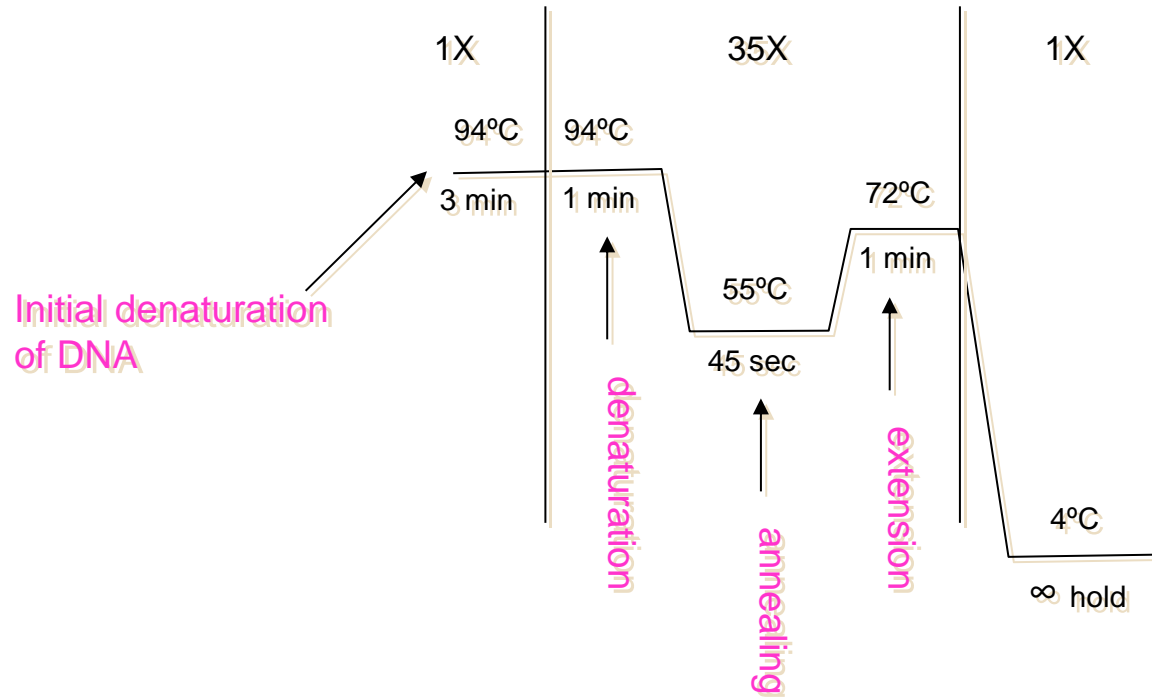
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης



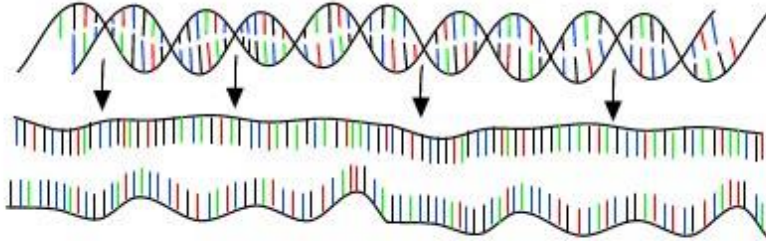
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης



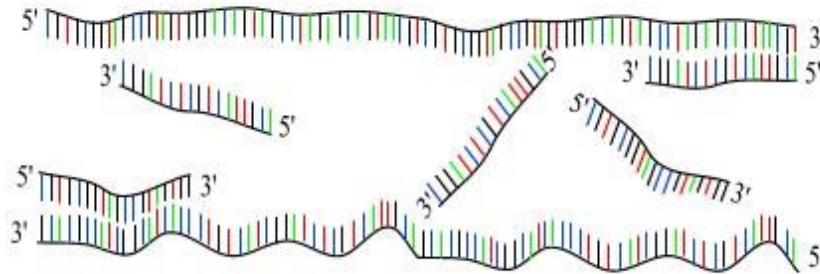
A simple thermocycling protocol



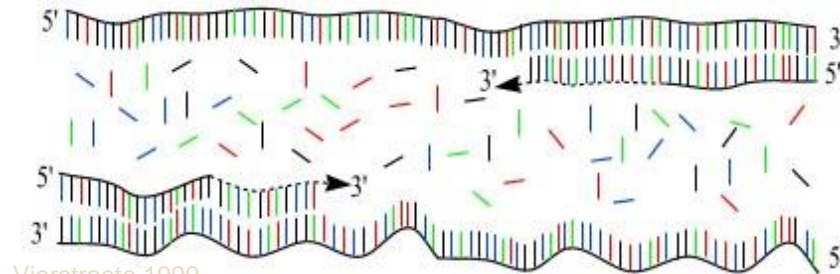
Στάδια PCR



Step 1:
Denaturation
dsDNA to ssDNA



Step 2:
Annealing
Primers onto template

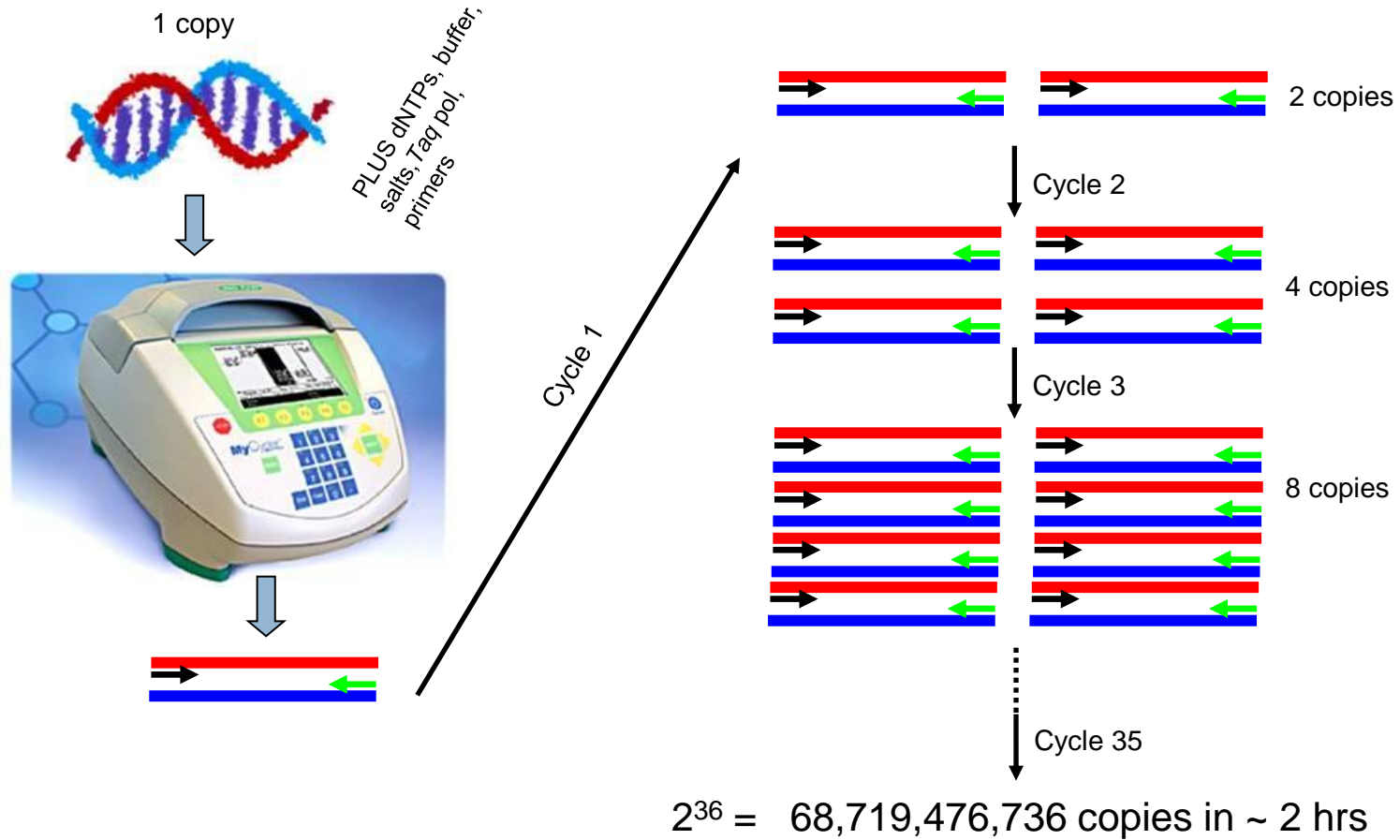


Step 3:
Extension
dNTPs extend 2nd strand

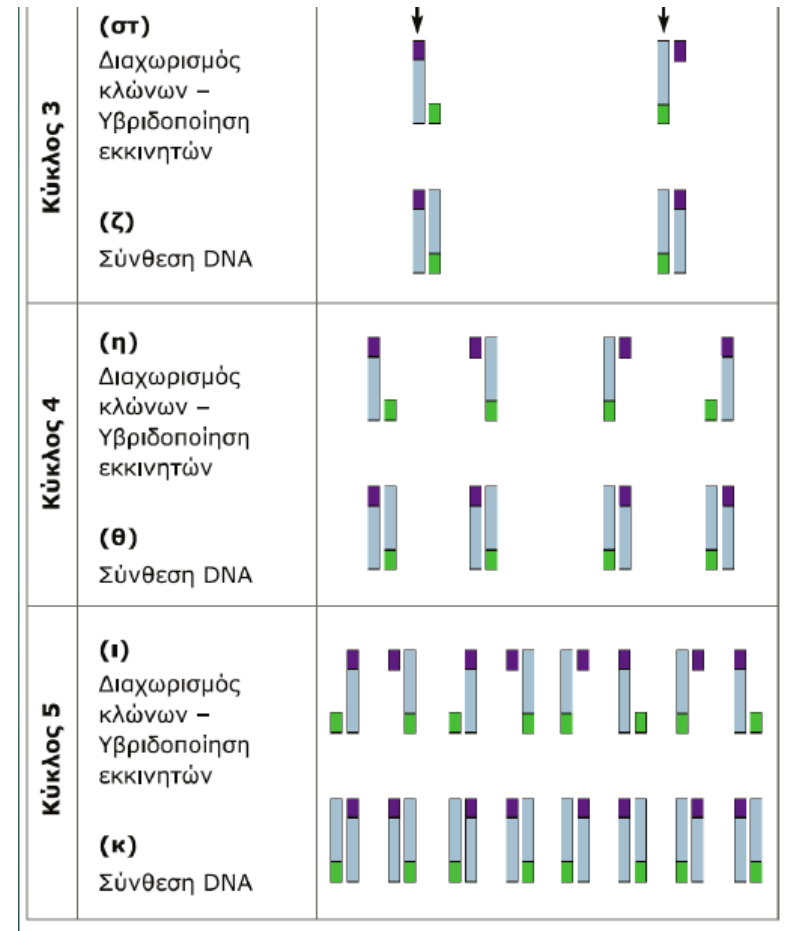
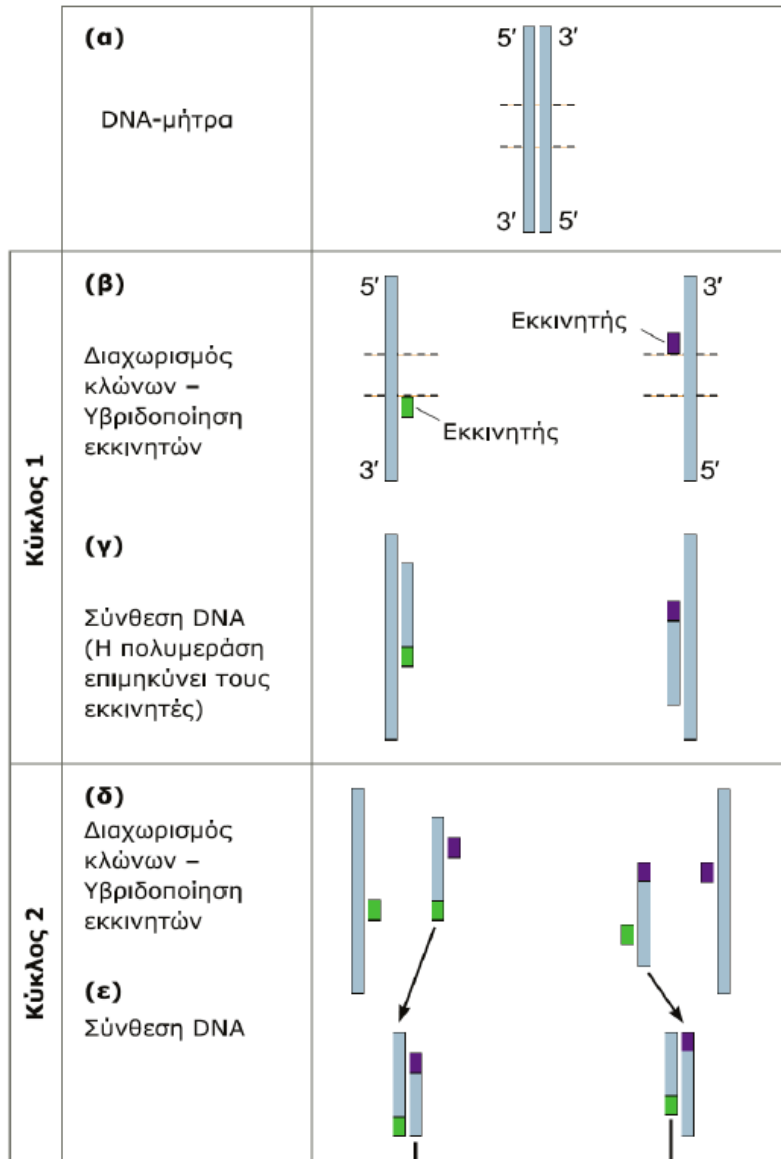
Vierstraete 1999

extension products in one cycle serve as template in the next

“Xeroxing” DNA



Αριθμός κύκλων - Αριθμός δίκλωνων μορίων - στόχων



- Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR

Πολλαπλασιασμός μορίων κατά την PCR

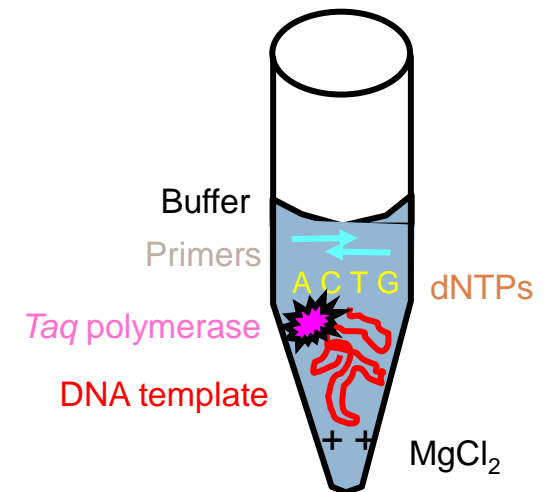
Αριθμός κύκλου	Αριθμός δίπλωνων μορίων-στόχων
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1.024
13	2.048
14	4.096
15	8.192
16	16.384
17	32.768
18	65.536
19	131.072
20	262.144
21	524.288
22	1.048.576
23	2.097.152
24	4.194.304
25	8.388.608
26	16.777.216
27	33.554.432
28	67.108.864
29	134.217.728
30	268.435.456
31	536.870.912
32	1.073.741.824

$$N = N_0 2^n$$

Αριθμός μορίων DNA στόχου	Αριθμός κύκλων PCR
3×10^5	25-30
15×10^4	30-35
1×10^3	35-40
50	40-45

Παράγοντες που επιδρούν στην PCR

1. δείγμα DNA
2. DNA πολυμεράση
3. επιλογή εκκινητών
4. συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+}
5. συγκέντρωση dNTPs
6. παρουσία ενισχυτών και αναστολέων
7. αριθμός κύκλων



Δείγμα DNA

- Το DNA είναι ένα πολύ σταθερό μόριο, εάν δεν εκτεθεί στη δράση ειδικών ενζύμων, των νουκλεασών
- επαρκές λιγότερο από ένα μικρογραμμάριο ολικού γενωμικού DNA
- ενίσχυση αλληλουχιών από ένα μόνο μόριο DNA
- Στο εμπόριο σήμερα κυκλοφορούν έτοιμα kit για την απλή, αποδοτική και γρήγορη εκχύλιση των νουκλειικών οξέων από βιολογικά δείγματα
- βιολογικά δείγματα (ιστοί, περιφερικό αίμα, κα)
- βιοψίες διατηρημένες σε παραφίνη ηλικίας άνω των 40 ετών
- Αιγυπτιακές μούμιες ηλικίας άνω των 4000 ετών!

Εκχύλιση/απομόνωση DNA

Separate WBCs from RBCs, if necessary



Lyse WBCs or other nucleated cells



Denature/digest proteins



**Separate contaminants (e.g., proteins, heme)
from DNA**



Precipitate DNA if necessary

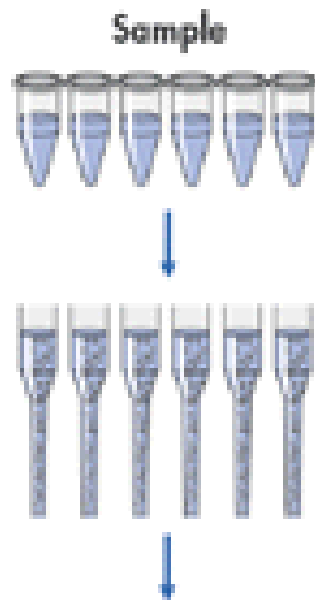


Resuspend DNA in final buffer



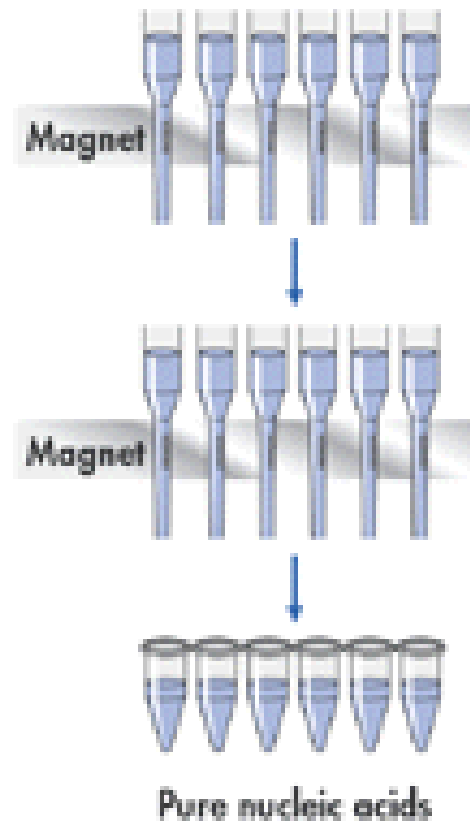
Εκχύλιση/απομόνωση DNA

Easy nucleic acid purification



Lysis

DNA binds
to magnetic
particles



Magnetic
separation

Wash

Magnetic
separation

Elute

Pure nucleic acids

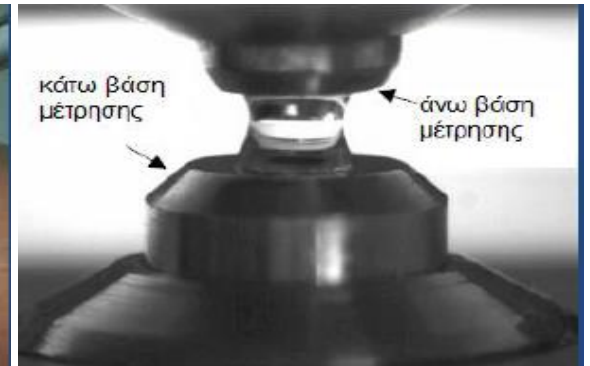
Αυτοματοποιημένες μέθοδοι απομόνωσης DNA



- Significant labor reduction - Completely automated walk-away systems
- Improved accuracy and reliability - Dependable DNA isolation with trouble-free robotic operation
- Increased productivity - Frees lab personnel for other tasks
- Compact size
- high quality and high yield DNA, ready for your downstream application.

DNA Quantitation - UV Spectrophotometry

- DNA and RNA absorb maximally at 260 nm.
- Proteins absorb at 280 nm.
- Background scatter absorbs at 320 nm.

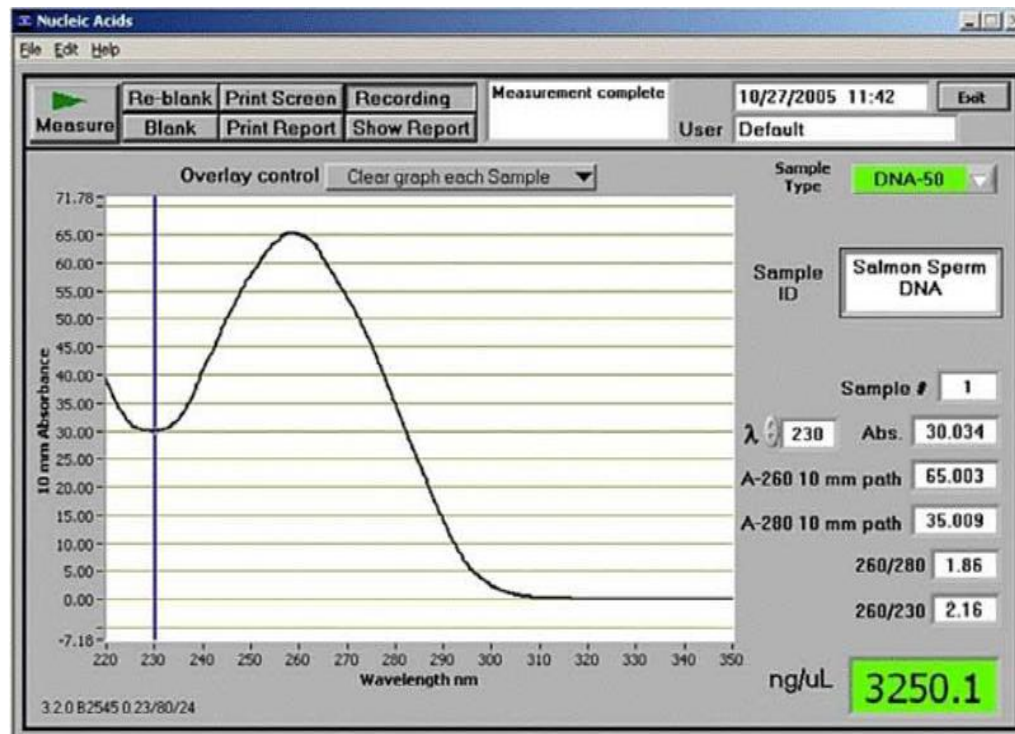


Quantity from UV Spectrophotometry

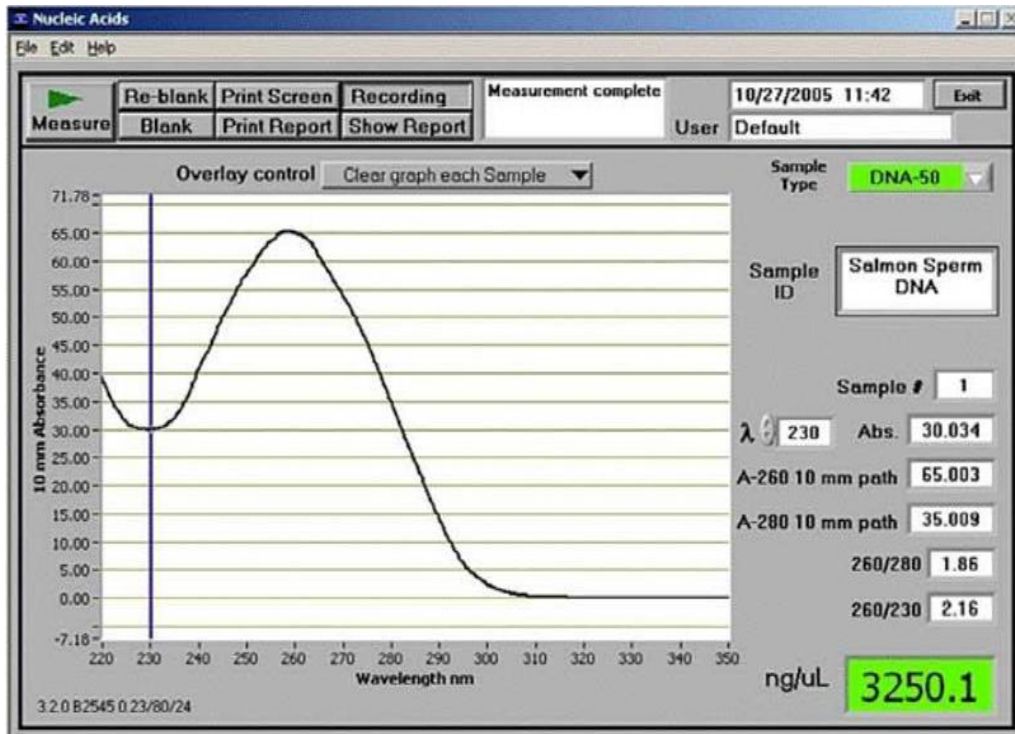
$$[\text{DNA}] = (A_{260} - A_{320}) \times \text{dilution factor} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

$$[\text{RNA}] = (A_{260} - A_{320}) \times \text{dilution factor} \times 40 \mu\text{g/mL}$$

Concentration = μg of DNA or RNA per mL of hydrating solution



Purity from UV Spectrophotometry



A_{260}/A_{280} = measure of purity

$$(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

1.7 – 2.0 = good DNA or RNA

<1.7 = too much protein or
another contaminant (?)

Το NanoDrop εκτός από τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δείγματος RNA ή DNA παρέχει τη δυνατότητα της εκτίμησης της καθαρότητας του μέσω του υπολογισμού των λόγων απορρόφησης A_{260}/A_{280} και A_{260}/A_{230} .

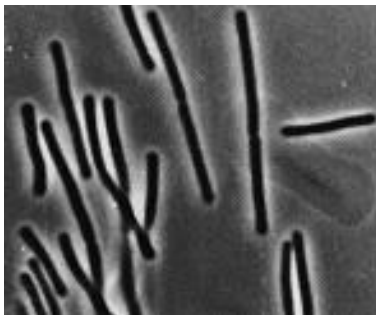
Το DNA απορροφά στα 260 nm. Ο λόγος A_{260}/A_{280} θα πρέπει να έχει τιμή 1,8-2,0 οπότε το δείγμα θεωρείται αποδεκτό. Αν η αναλογία είναι μικρότερη, υποδεικνύεται πιθανή παρουσία πρωτεϊνών ή άλλων ουσιών που απορροφούν ισχυρά στα 280 nm. Δευτερευόντως, ο λόγος A_{260}/A_{230} θα πρέπει να έχει τιμή 2,0-2,2. Αν η αναλογία είναι μικρότερη, υποδεικνύεται πιθανή παρουσία φαινολών ή άλλων ουσιών που απορροφούν ισχυρά στα 230 nm.

Ταq πολυμεράση

- **Yellow stone National Park, Wyoming, USA**



- **Thermus aquaticus**



Σύγκριση Klenow vs Taq Πολυμεράσης

Klenow

- optimum---->37°C
- μη ειδική σύνθεση DNA
- primer mismatching
- καταστροφή ενζύμου στους 94°C
- απαιτείται συνεχώς προσθήκη νέου ενζύμου

Taq

- optimum----->72°C
- μεγάλη εξειδίκευση
- καλύτερη απόδοση
- δυνατότητα αυτοματοποίησης
- 95°C, 20s/cycle, 65% activity, 50 κύκλοι

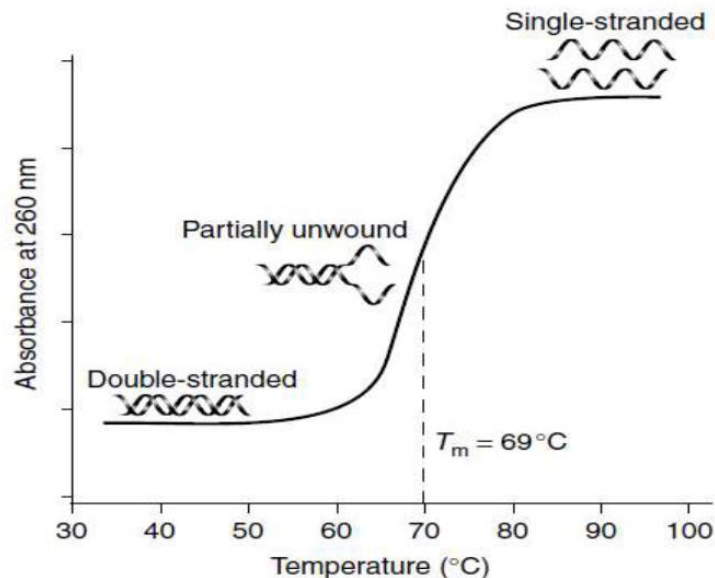
Κριτήρια επιλογής εκκινητών

- Βέλτιστο μήκος 20-26 βάσεις (bp)
- περιεκτικότητα σε βάσεις G, C 40-60%
- αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών εντός του κλώνου των εκκινητών, ειδικά στο 3' άκρο
- αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών των εκκινητών με μη επιθυμητές αλληλουχίες DNA
- απόρριψη των εκκινητών που έχουν ομολογία με ανεπιθύμητες περιοχές άνω του 70%
- αποφυγή επανάληψης των G και C στο 3' άκρο των εκκινητών (πχ GCCCC, GGGG)

Θερμοκρασία υβριδισμού

$$T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C} \quad (< 20\text{bp})$$

- Η θερμοκρασία αποδιάταξης, (Melting temperature T_m), είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή
- Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature), εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις G και C
- θερμοκρασία 55°C είναι καλή για ένα τυπικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή 20 βάσεων με περίπου 50% σύσταση σε GC
- μεγαλύτερες θερμοκρασίες μπορεί να είναι απαραίτητες προς αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή



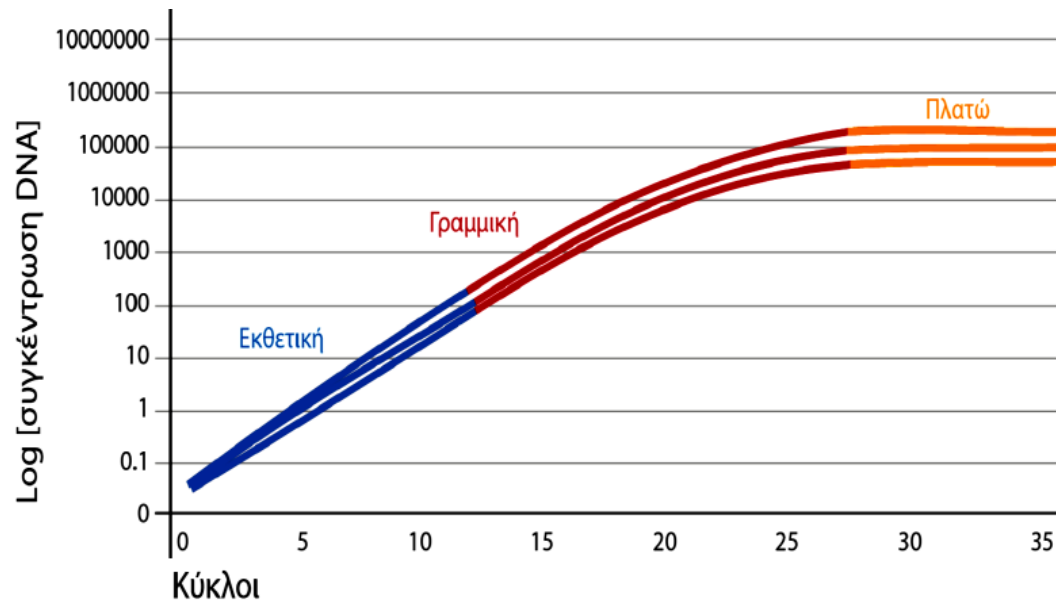
Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+}

- μεταλλικός συμπράγοντας Taq DNA πολυμεράσης
- μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR
- Συνήθης βέλτιστη συγκέντρωση 1.5 mM (0.5-5 mM)
- περίσσεια Mg^{2+} θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος
- έλλειψη Mg^{2+} θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος

Συγκέντρωση dNTPs

- τα dNTPs αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA
- οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200μM
- υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση
- τα dNTPs ενώνονται με τα Mg^{2+} και το ποσό των dNTPs προσδιορίζει το ελεύθερο ποσό διαθέσιμου Mg^{2+}
- αν η συγκέντρωση των dNTPs αλλάξει σημαντικά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και μια αλλαγή στη συγκέντρωση τού ελεύθερου ποσού του διαθέσιμου Mg^{2+}

Οι φάσεις της αντίδρασης PCR



- ❑ **Εκθετική φάση:** Μόλις έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας στόχου. Όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε επάρκεια και η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζονται τα μόρια της αλληλουχίας στόχου.
- ❑ **Γραμμική φάση:** Παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων.
- ❑ **Φάση πλατώ:** Δεν συντίθενται νέα μόρια DNA εξαιτίας της εξάντλησης ενός ή περισσότερων αντιδραστηρίων.

Φάση κορεσμού (plateau)

□ Φάση κορεσμού οφείλεται σε:

- έλλειψη αρκετής ποσότητας αρχικού DNA εκμαγείου
- ατελής σύνθεση νέων κλώνων
- εξάντληση των εκκινητών και dNTPs
- καταστροφή ή απενεργοποίηση των συστατικών της αντίδρασης σε υψηλές θερμοκρασίες
- παρεμπόδιση της αντίδρασης από τα προϊόντα (πυροφωσφορικά και δίκλωνο DNA)
- ανταγωνισμός των αντιδρώντων με μη ειδικά προϊόντα η διμερή των εκκινητών (primer dimers)
- επανασύνδεση του προϊόντος της PCR σε υψηλές συγκεντρώσεις ($>10^{-9}$ M) προ του υβριδισμού των εκκινητών
- κορεσμός του ενζύμου σε συνδυασμό με μειωμένη ενεργότητα έπειτα από πολλούς κύκλους

Απόδοση PCR

Y= ενίσχυση

X= μέση απόδοση

n= αριθμός κύκλων

$$Y = (1+X)^n$$

εάν $X=1$ -----> $Y=2^n$, πρακτικά όμως $X= 80-85\%$,

<u>απόδοση</u>	<u>20 κύκλοι</u>	<u>30 κύκλοι</u>
1.00	1.048.576	1.073.741.824
0.90	375.900	230.466.619
0.80	127.482	45.517.160

Αναστολείς και ενισχυτές της αντίδρασης PCR

αναστολείς:

- φύση των βιολογικών δειγμάτων
- μέθοδο απομόνωσης του DNA
- χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του DNA
- ιοντικά επιφανειοδραστικά (SDS ισχυρός αναστολέας της Taq πολυμεράσης)

ενισχυτές:

- φορμαμίδιο (5%)
- DMSO (<10%)
- PEG (5-15%)
- Tween-20 (0.1-2.5%)
- T4gene32 protein
- γλυκερόλη (10-15%)

Εξειδίκευση PCR

οφείλεται:

- στη δυνατότητα επιλογής της προς ενίσχυση περιοχής DNA μέσω της επιλογής κατάλληλων εκκινητών

επιτυγχάνεται με:

- χαμηλή συγκέντρωση Mg^{2+} , dNTPs, Taq, εκκινητών
- χαμηλό αριθμό κύκλων
- αυξημένη θερμοκρασία υβριδισμού
- αυξημένο ρυθμό αυξομείωσης θερμοκρασίας
- θερμική εκκίνηση (hot start)

Μη ειδικό προϊόν PCR οφείλεται συνήθως σε :

- πιθανότητα λάθους της πολυμεράσης (1 στα 10^9 nt in vivo, 2×10^4 nt in vitro)
- μη ειδική σύνδεση των εκκινήτων
- **επιμόλυνση** από προηγούμενα προϊόντα PCR



Επιμόλυνση στην PCR



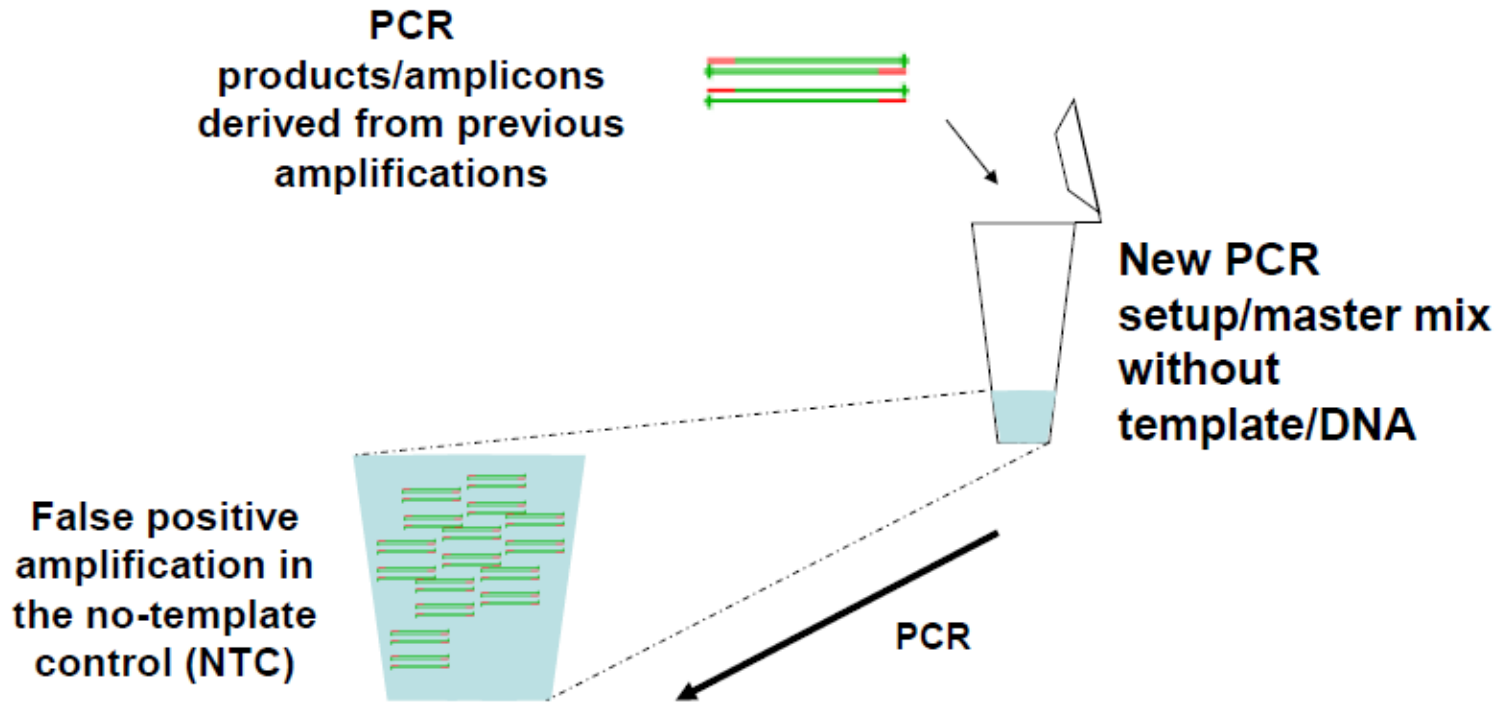
οφείλεται στην εξαιρετική ευαισθησία της PCR

- πολύ σημαντική ειδικά όταν ενισχύονται σπάνιες αλληλουχίες
- πολύ σημαντική ειδικά όταν χρησιμοποιείται για διαγνωστικό σκοπό (πχ HIV, HCV, HBV)

αποφεύγεται με :

- καλή εργαστηριακή πρακτική
- χρήση control (πχ H₂O) σε κάθε PCR
- ακτινοβόληση του μίγματος της αντίδρασης με UV πριν την προσθήκη του δείγματος DNA
- χρήση διαφορετικών χώρων και πιπετών για προετοιμασία μίγματος και PCR

Επιμόλυνση στην PCR



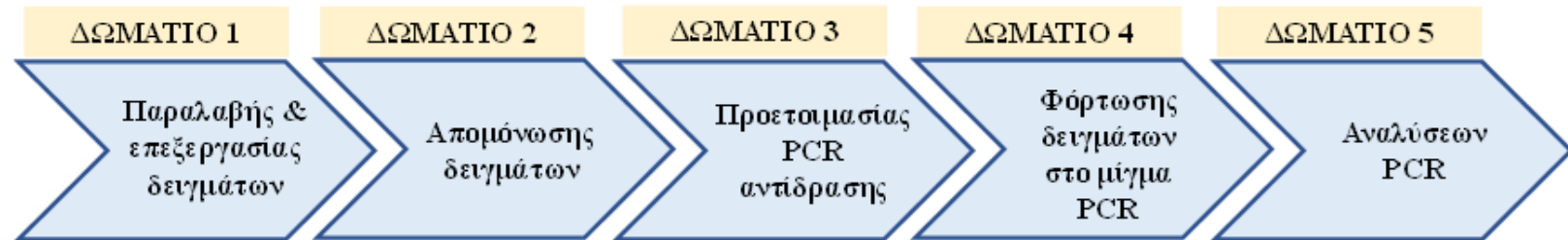
Πιθανές πηγές επιμόλυνσης στην PCR

- βιολογικά δείγματα
- εργαστηριακό περιβάλλον
- υγρό άζωτο/πάγος
- πιπέτες/ρύγχοι πιπετών
- υαλικά/σωληνάρια
- αντιδραστήρια
- θερμικός κυκλοποιητής
- τράπεζα UV
- συσκευές ηλεκτροφόρησης

Οργάνωση εργαστηρίου για αποφυγή επιμόλυνσης στην PCR

PCR laboratories should be divided into four separate work areas, each having dedicated special equipment for:

- (a) reagent storage and set-up
- (b) sample preparation
- (c) PCR reaction mix assembly and amplification
- (d) PCR product analysis.



Οργάνωση εργαστηρίου για αποφυγή επιμόλυνσης στην PCR

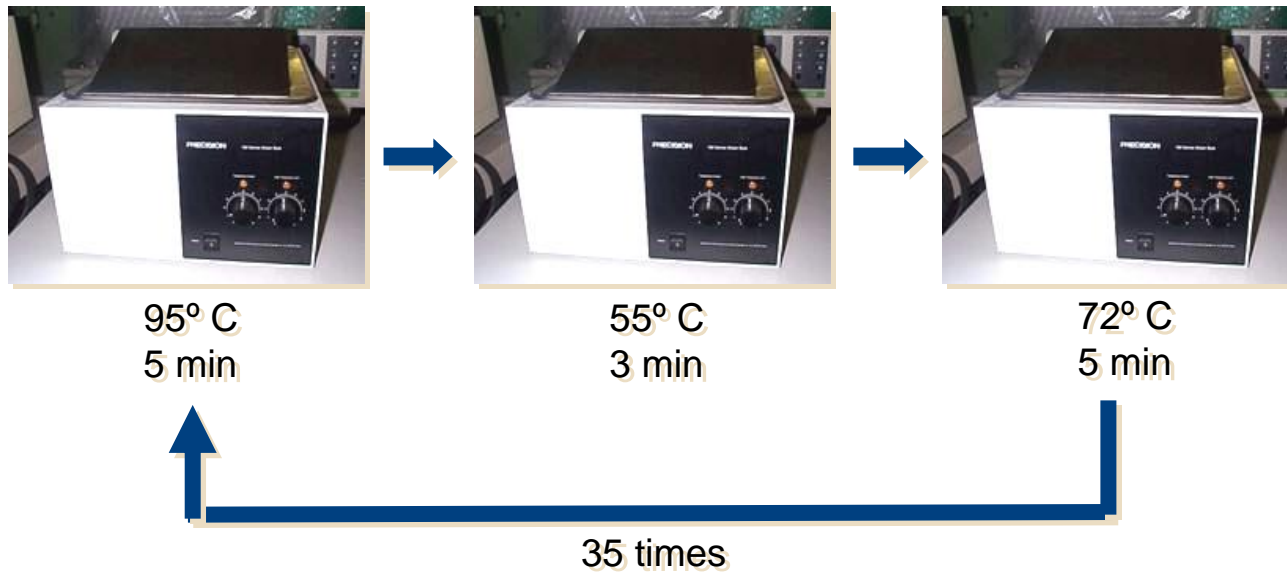
- The respective rooms must be marked as related to the specific areas
- **PCR-Setup is a one way street!**
- → Otherwise spreading of severe **carryover contamination** is possible.



Θερμικοί κυκλοποιητές (Thermal cyclers)

- εκτέλεση PCR εντός φρεατίων πλακών μικροπιλοδοτήσεως 96 και 384 θέσεων
- εκτέλεση 2 ανεξάρτητων κύκλων σε ανεξάρτητες κεφαλές στον ίδιο κυκλοποιητή
- διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού (gradient)
- εκτέλεση PCR σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου (in situ PCR)
- ταχύτατη αυξομείωση θερμοκρασίας με συστήματα Peltier καθώς και με κυκλοφορητή αέρα (air cycling systems)
- παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)
- σημαντική μείωση του χρόνου για την ολοκλήρωση της αντίδρασης
- δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των αρχικών DNA στόχων

PCR - before the thermocycler



8 **BORING** hours per PCR!

Thermocyclers

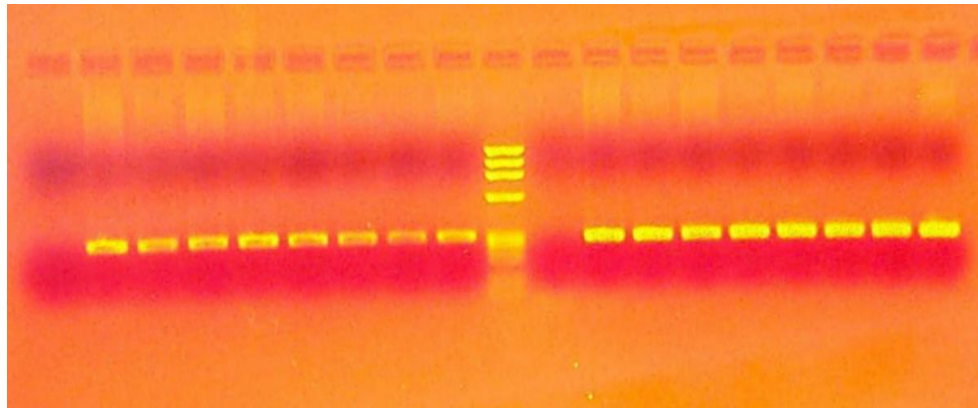


heated lids
adjustable ramping times
single/multiple blocks
gradient thermocycler blocks

Ανίχνευση προϊόντων της αντίδρασης PCR

- βρωμιούχο αιθίδιο
- SYBR GREEN, SYBR GOLD (Molecular Probes): πολύ υψηλή ευαισθησία
- χρώση αργύρου: πολύ υψηλή ευαισθησία
- αυτοραδιογραφία (autoradiography)
- αποτύπωση (blotting) (Southern Blot για DNA και Northern Blot για RNA)

Ανίχνευση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης



- #1: PCR blank
- #2-#9: BRCA1, exon 14
- #10: DNA marker
- #11 PCR blank
- #12-19: BRCA1, exon 22

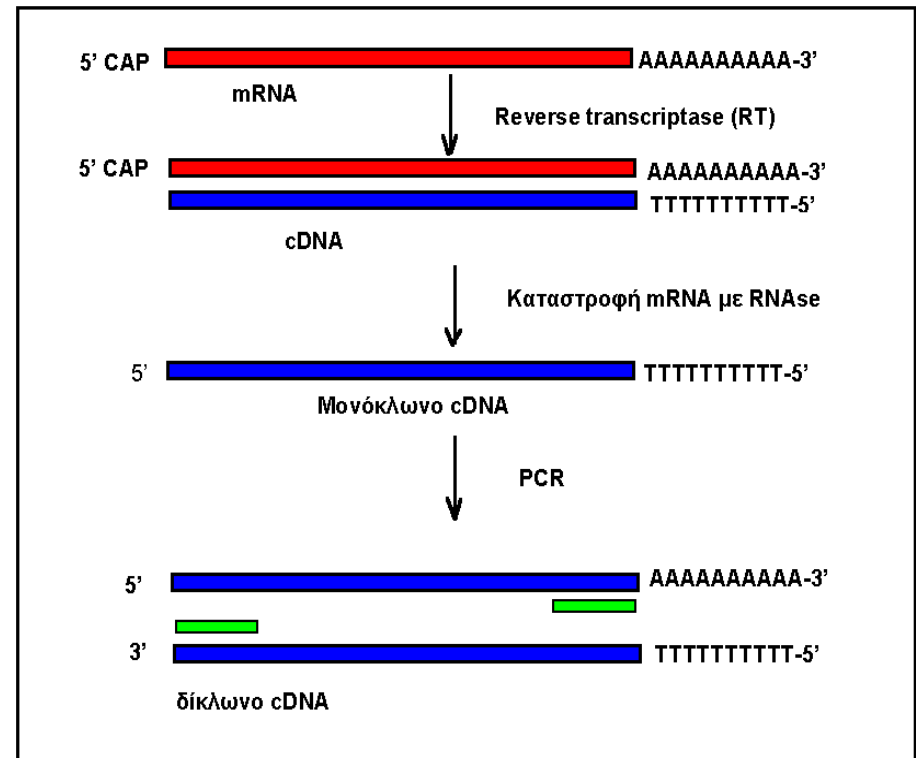
Κυριότερες παραλλαγές της αντίδρασης PCR

- PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)
- Ασύμμετρη PCR
- Διπλή PCR (Nested PCR)
- Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR)
- ARMS-PCR
- PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

□ PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)

- ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το RNA αντί του DNA
- το RNA μετατρέπεται σε cDNA με αντίστροφη μεταγραφή
- για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή, oligodTs, ή μόνο ένας ειδικός PCR-εκκινητής
- το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την Ταq-πολυμεράση και με δύο ειδικούς PCR εκκινητές δημιουργείται το δίκλωνο cDNA
- το δίκλωνο cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την συνήθη τεχνική της PCR



RT-PCR ενός σταδίου (one step RT-PCR)

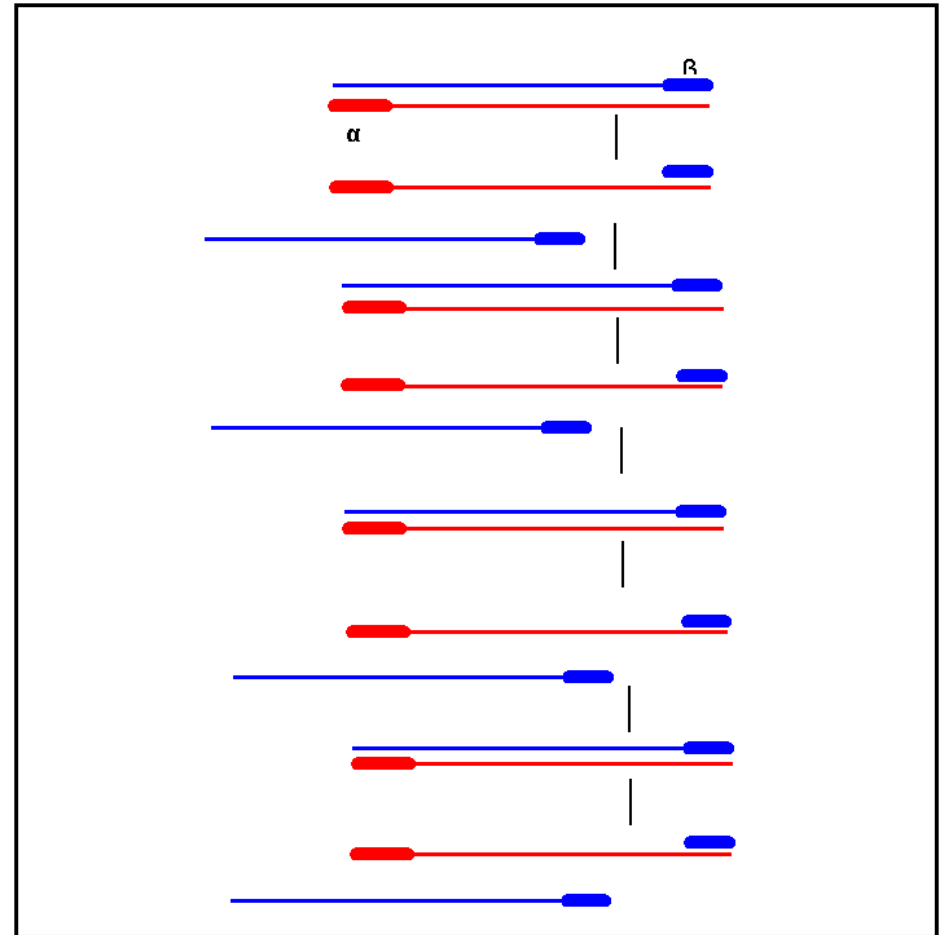
- ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο
- αξιοποίηση της διπλής ιδιότητας ορισμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών όπως η *T. Thermophilus* (Tth) DNA πολυμεράση να μεταγράψουν αντίστροφα RNA παρουσία Mn^{2+} , ενώ ταυτόχρονα δρούν και ως DNA πολυμεράσες

σημαντικά πλεονεκτήματα:

- δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων
- ταχύτητα-απλούστερη διαδικασία
- προστασία από κίνδυνο επιμόλυνσης

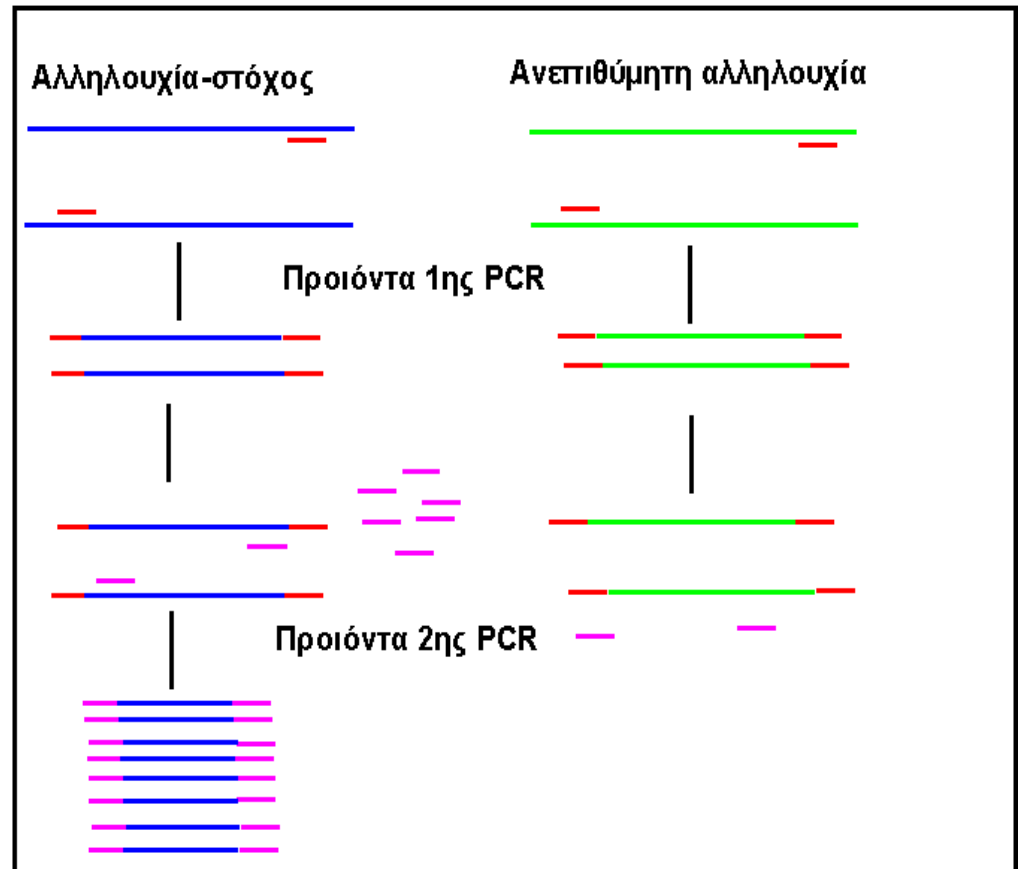
Ασύμμετρη PCR

- παράγεται μονόκλωνο DNA
- χρησιμοποιείται για DNA-sequencing
- χρησιμοποιούνται άνισες (ασύμμετρες) συγκεντρώσεις των δύο εκκινητών (σε αναλογίες 1:10, 1:2, 1:50)
- στους πρώτους 15-25 κύκλους, το περισσότερο προϊόν που παράγεται είναι δίκλωνο
- καθώς ο μικρής συγκέντρωσης εκκινητής εξαντλείται, στους επόμενους κύκλους παράγεται πλεόνασμα της μιας αλυσίδας
- το μονόκλωνο DNA συσσωρεύεται γραμμικά



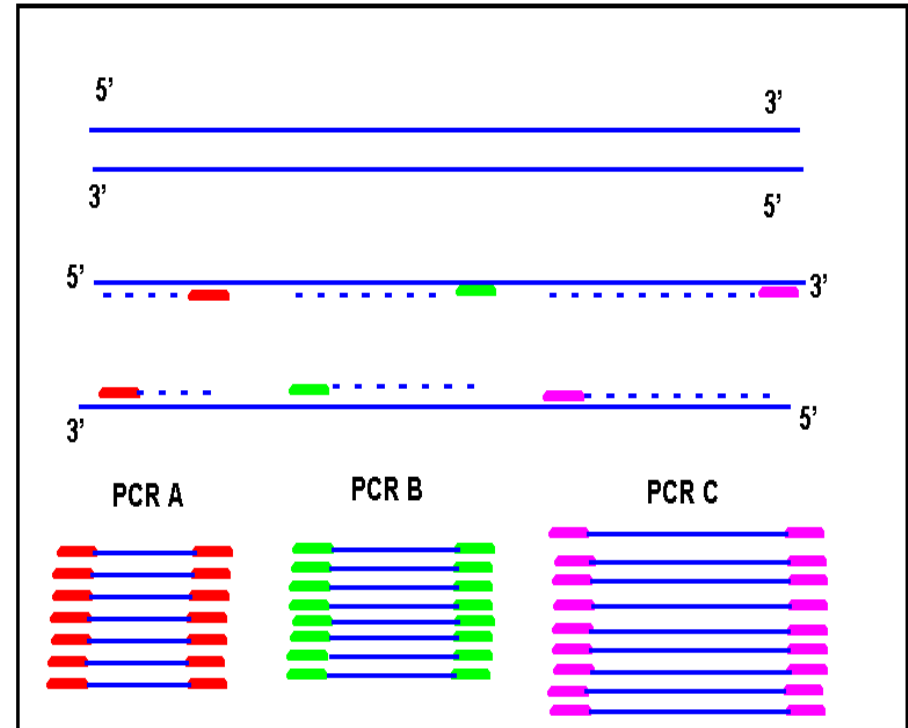
Διπλή PCR (nested PCR)

- χρησιμοποιείται για αύξηση της ειδικότητας της αντίδρασης PCR
- δύο PCR όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (εξωτερικό και εσωτερικό)
- το εσωτερικό ζεύγος υβριδοποιείται σε περιοχή που ενισχύεται από το άλλο
- στον πρώτο γύρο της PCR, χρησιμοποιείται το εξωτερικό ζεύγος των εκκινητών
- στον δεύτερο γύρο ενισχύονται επιλεκτικά τα κομμάτια που περιέχουν την αλληλουχία-στόχο



Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR)

- χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιοχών της αλληλουχίας-στόχου
- χρησιμοποιείται στη διάγνωση γενετικών ασθενειών όπως η μυϊκή δυστροφία του Duchenne που οφείλεται σε γονιδιακά ελλείματα
- Κατάλληλη για περιπτώσεις όπου χρειάζεται να μελετήσουμε πολλούς στόχους σε πολύ μικρή ποσότητα δείγματος



ARMS-PCR

(Amplification Refractory Mutation System)

- Αποτελεί παραλλαγή της PCR
- Allele-specific PCR- αλληλοειδική PCR
- Μέθοδος για την ανάλυση γνωστών μεταλλάξεων
- Βασίζεται στην ιδιότητα των εκκινητών της PCR να μην λειτουργούν αν έχουν στο 3' άκρο τους έστω και μία βάση μη-συμπληρωματική με την προς ενίσχυση αλληλουχία υπό ορισμένες συνθήκες
- Κάθε δείγμα ελέγχεται με δύο αντιδράσεις:
 - Normal primer - common primer
 - Mutant primer - common primer

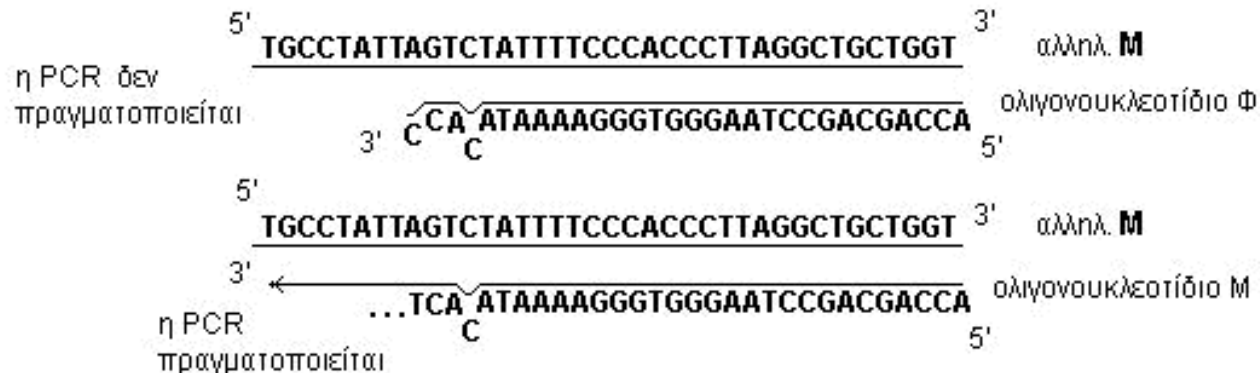
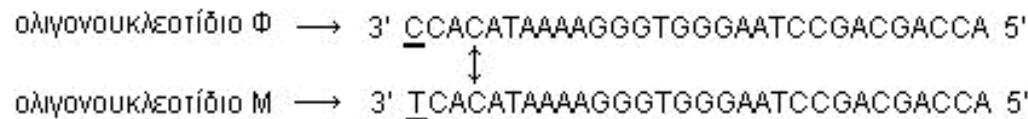
Βασικά πλεονεκτήματα:

- ταχύτητα ανάλυσης, καθώς το στάδιο της ενίσχυσης και το διαγνωστικό στάδιο συνδυάζονται ταυτόχρονα σε μία αντίδραση PCR

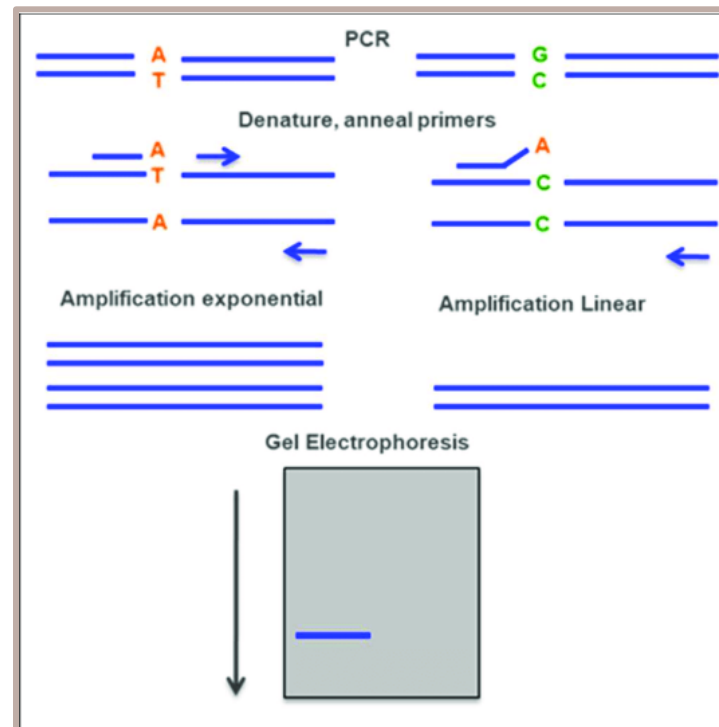
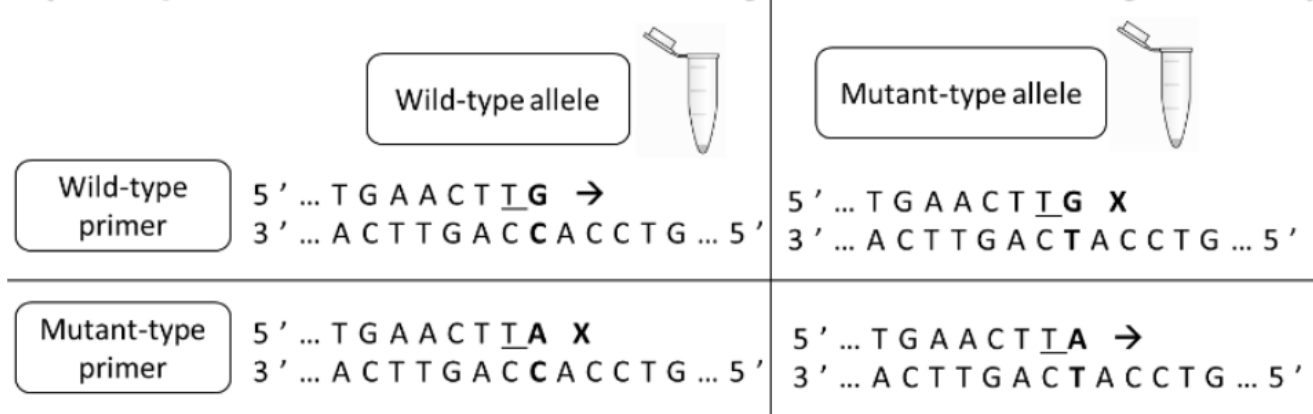
Αρχή μεθόδου ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System)



Δημιουργία ολιγονουκλεοτιδίων για **Φ** & **M** αλληλουχιών :



Αρχή μεθόδου ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System)



Εφαρμογές της PCR στη Μοριακή Διαγνωστική

- Προγεννητική διάγνωση (κυστική ίνωση, μεσογειακή αναιμία, διάφορες κληρονομικές νόσοι)
- Προγεννητική διάγνωση (Τρισωμία 21, σύνδρομο Down)
- Διάγνωση και χαρακτηρισμός μολυσματικών ασθενειών (ανίχνευση HIV, HBV, HCV, HPV κα)
- Διάγνωση και χαρακτηρισμός νεοπλασιών
- καρκίνος του μαστού (BRCA-1, BRCA-2)
 - καρκίνος των ωοθηκών (BRCA-1)
 - ρετινοβλάστωμα(Rb)
 - χρόνια μυελογενής λευχαιμία
- Ανίχνευση μικρομεταστάσεων
 - καρκίνος του μαστού (mRNA της CK-19)

ΧΡΗΣΙΜΑ WEBSITES

❑ DNA DISCOVERY

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/index.html

❑ PCR DISCOVERY – KARRY MULLIS

<http://www.karymullis.com/pcr.shtml>

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html

❑ Human genome project

<https://www.youtube.com/watch?v=qOW5e4BgEa4>

<https://www.youtube.com/watch?v=MvuYATh7Y74>

❑ PCR

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

<https://www.youtube.com/watch?v=NYIT3f-MZ5o>

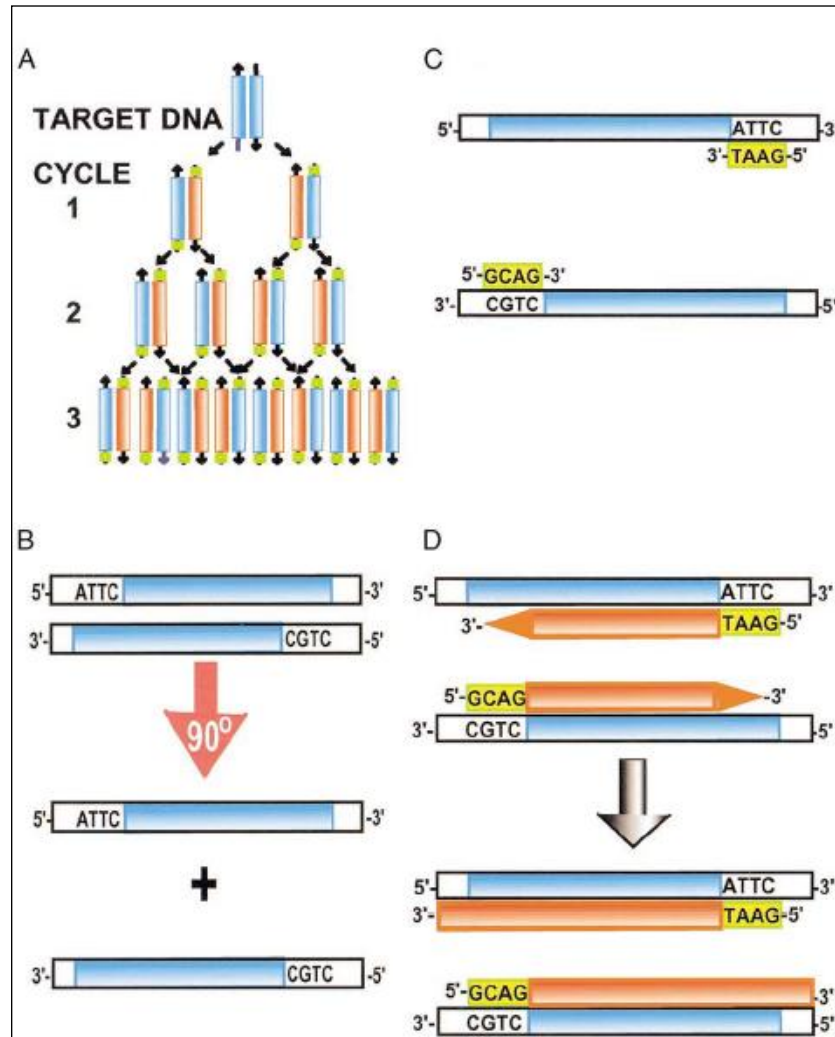
https://www.youtube.com/watch?v=k4_AVz6loUM

<https://www.youtube.com/watch?v=YLp4pZsJzXM>

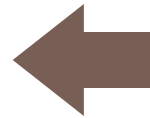
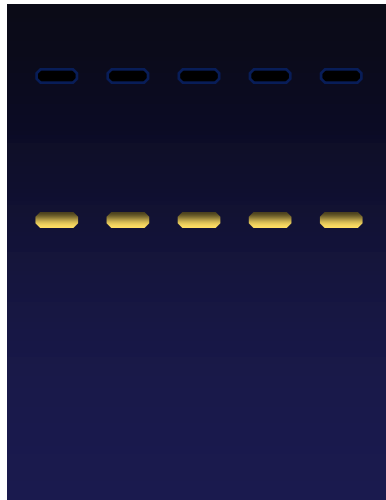
-Ποσοτική PCR (qPCR)

-Αλυσιδωτή αντίδραση της
πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
(Real time PCR)

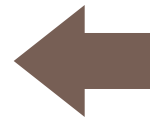
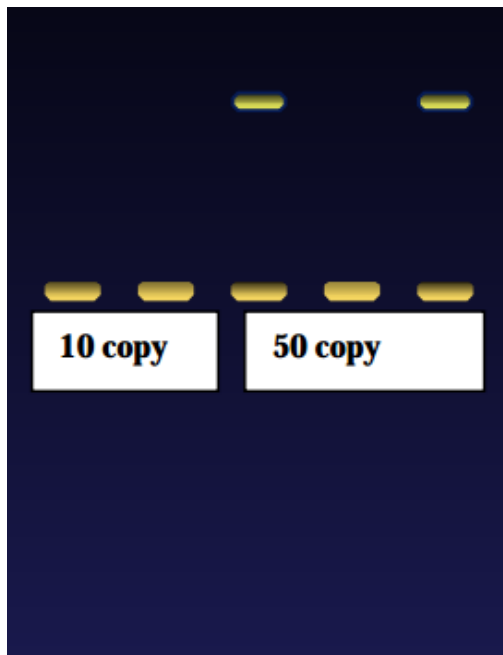
PCR



Κλασσική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) Πληροφορίες που μας δίνει η ηλεκτροφόρηση αγαρόζης

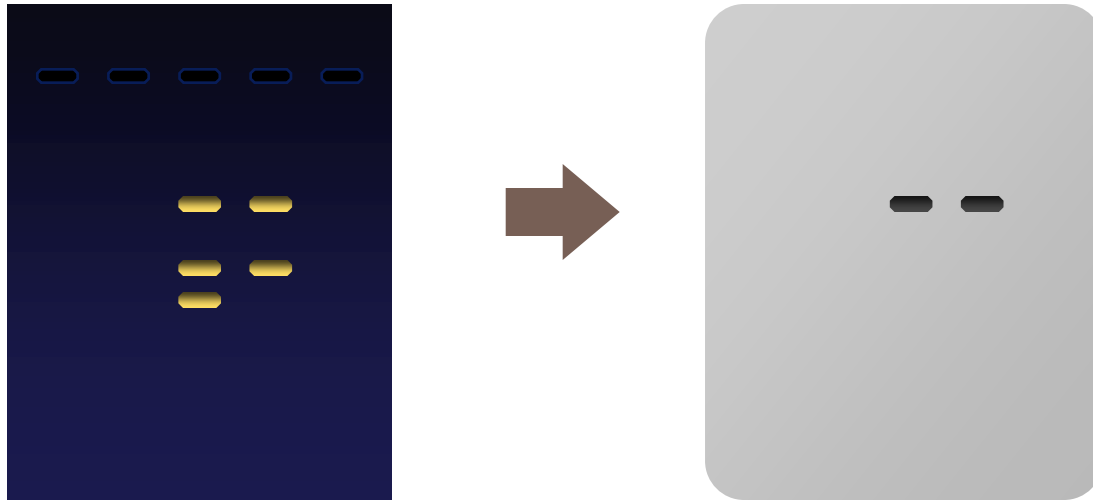


Πληροφορία για το μέγεθος



Καμία πληροφορία για την αλληλουχία αλλά ούτε και για την αρχική ποσότητα

Κλασσική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) Πληροφορίες που μας δίνει το blot



Πληροφορία για το μέγεθος

**πληροφορία
για την αλληλουχία αν είναι ελεγχόμενες
και αυστηρές οι συνθήκες υβριδισμού**

Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού

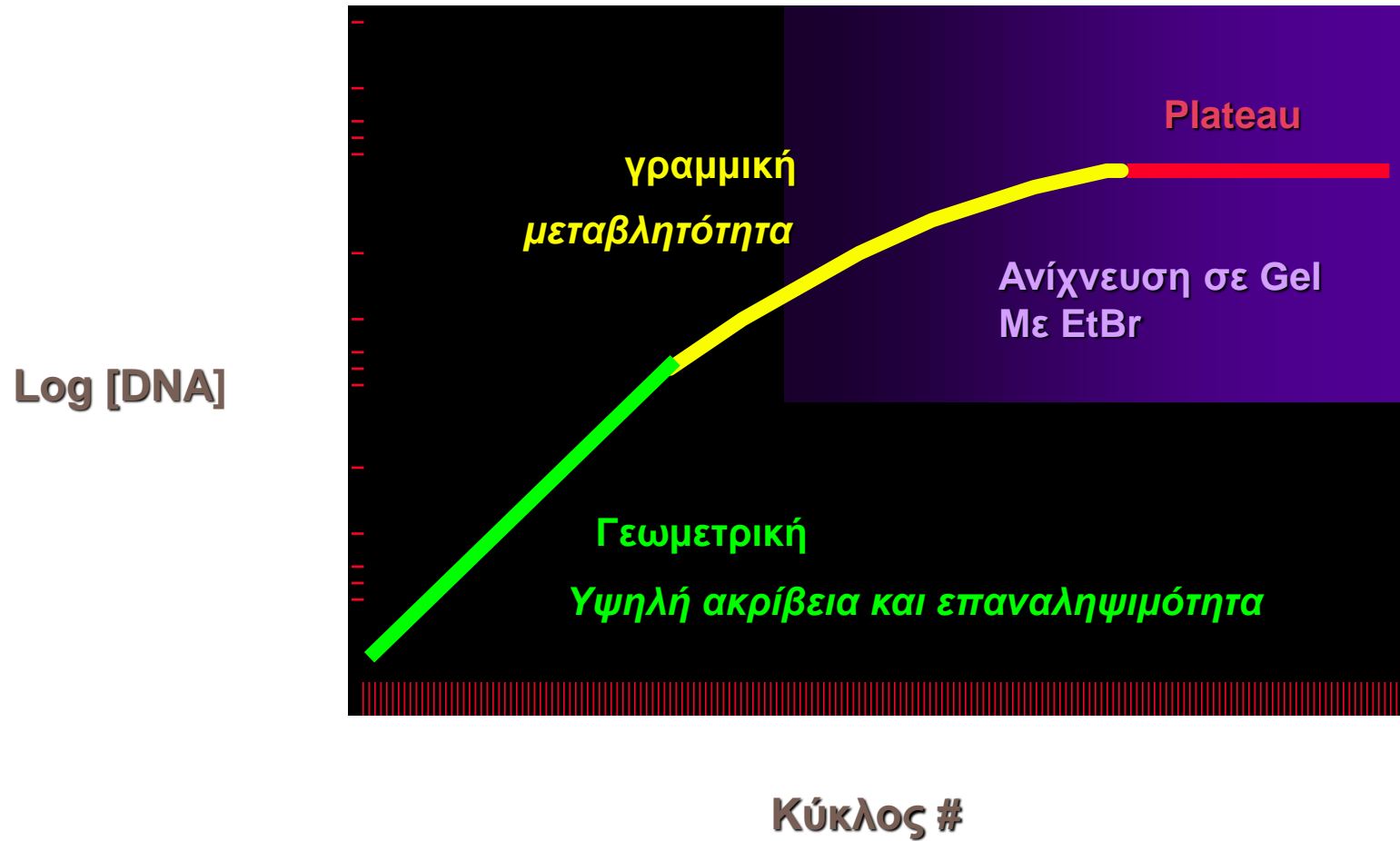
- Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)
- Ποσοτική PCR (qPCR)

- ❖ Η PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για τη γρήγορη και ακριβή ποσοτικοποίηση RNA και DNA
- ❖ Η ποσοτική PCR δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης PCR κατά τη διάρκεια της εξέλιξής της

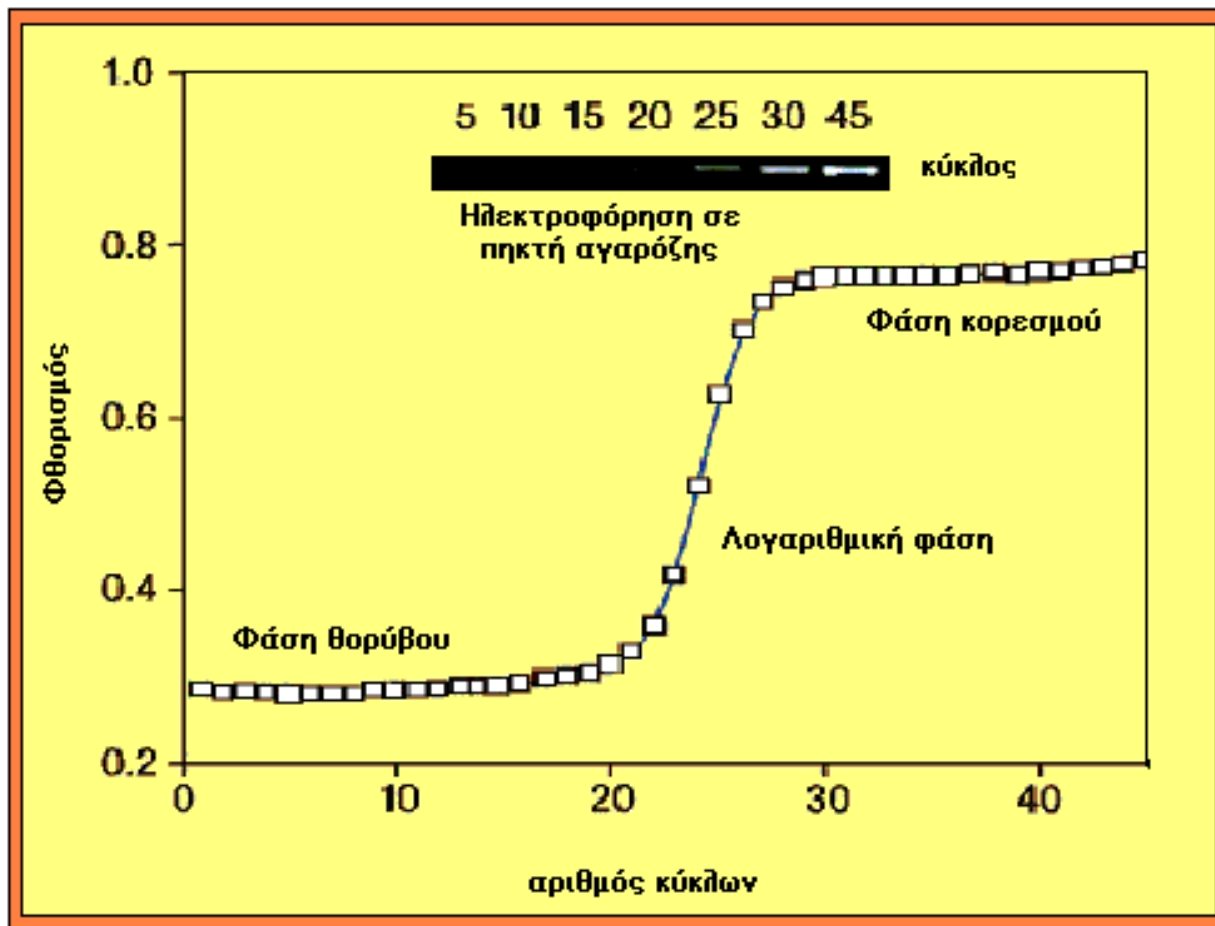
Πλεονεκτήματα:

- Αυτοματοποίηση
- Δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού
- Αποφυγή ηλεκτροφορήσεων
- Αποφυγή επιμολύνσεων
- Υψηλή ευαισθησία
- Κατάλληλη για μεγάλο αριθμό δειγμάτων

Φάσεις της αντίδρασης PCR

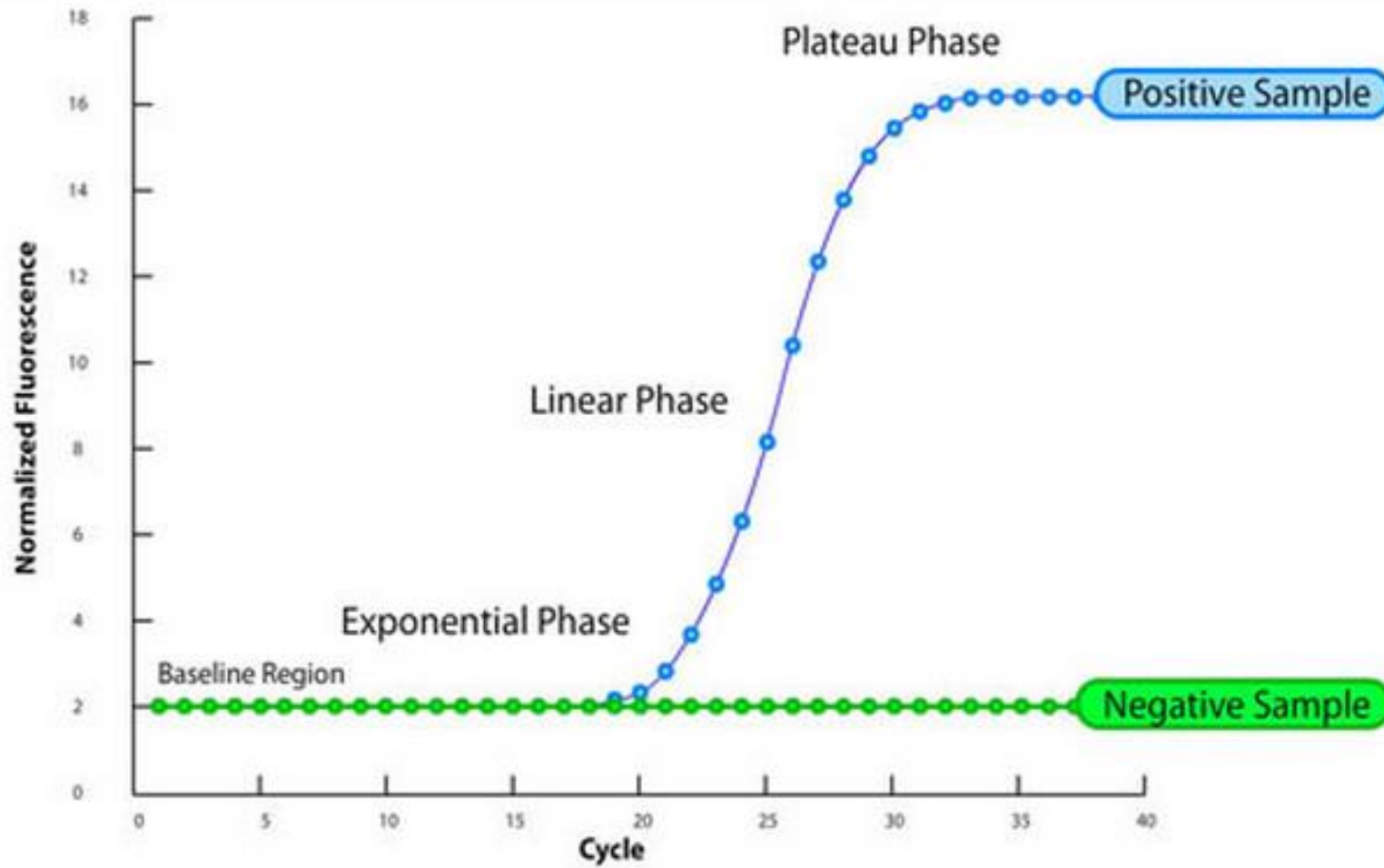


Φάσεις της αντίδρασης PCR



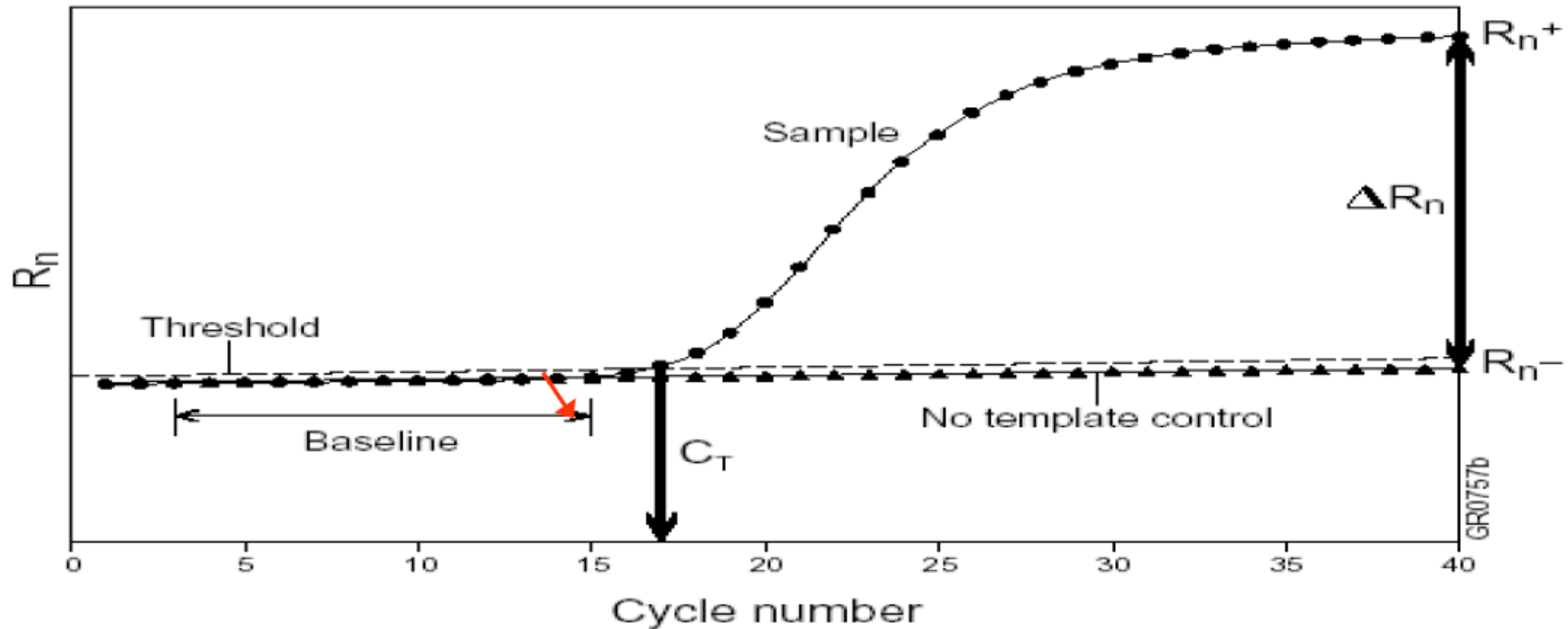
Ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και μέτρηση της έντασης φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης

Φάσεις της αντίδρασης PCR



Ποσοτική vs Κλασική PCR

- ❖ Βασική διαφορά ανάμεσα στην ποσοτική και την κλασική PCR είναι η φάση της αντίδρασης, στην οποία συλλέγονται τα δεδομένα και εξάγονται τα αποτελέσματα

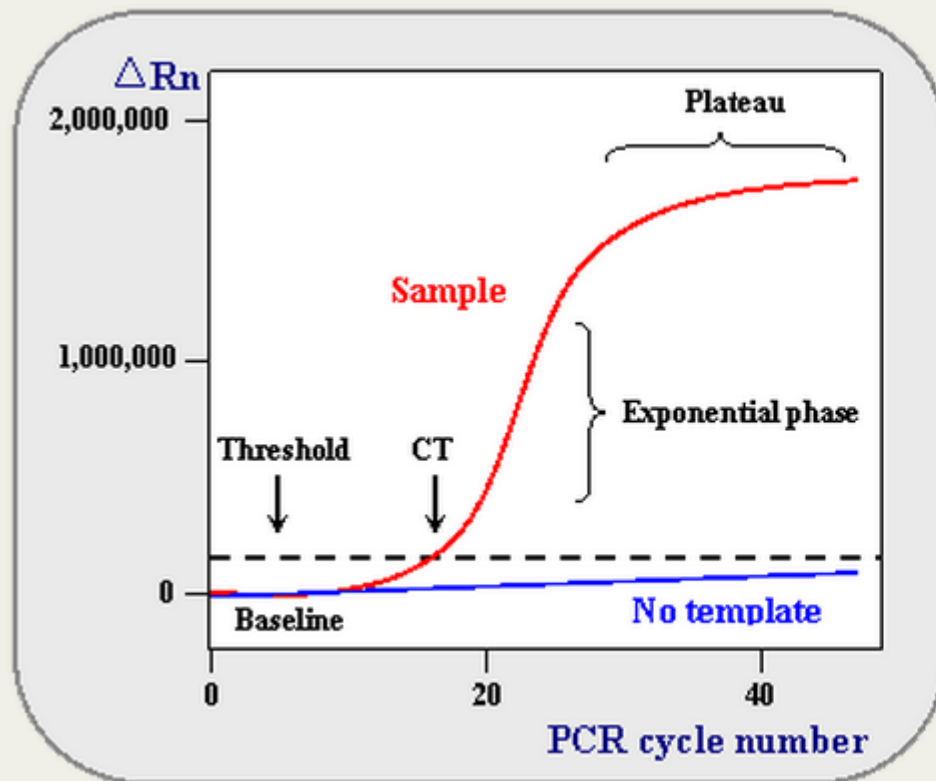


- Στην ποσοτική PCR τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης.
- Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή C_q , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline).

Το C_q υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα.

- ✓ Τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο C_q υπολογίζονται από την πρότυπη καμπύλη. Αντίστοιχα υπάρχουν και άλλοι μαθηματικοί τύποι υπολογισμού που περιλαμβάνουν διόρθωση για τη μείωση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης που παρατηρείται με το πέρασμα των κύκλων πολλαπλασιασμού.
- ✓ Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται στο ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA ή cDNA στο αρχικό δείγμα τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης.
- ✓ Επομένως δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο C_q από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα. Επίσης είναι καλό να σημειωθεί ότι η παραγωγή του προϊόντος της PCR έχει γραμμική συσχέτιση με τον παραγόμενο φθορισμό.

Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού με qPCR



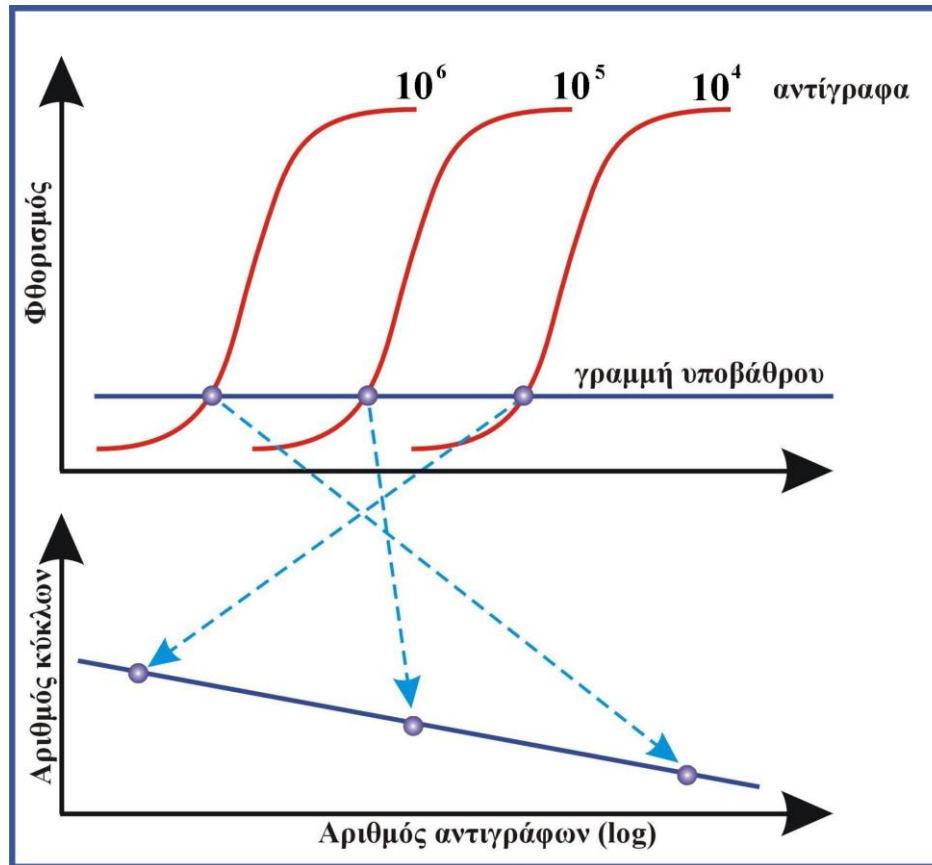
Baseline is defined as PCR cycles in which a reporter fluorescent signal is accumulating but is beneath the limits of detection of the instrument.

ΔR_n is an increment of fluorescent signal at each time point. The ΔR_n values are plotted versus the cycle number.

Threshold is an arbitrary level of fluorescence chosen on the basis of the baseline variability. A signal that is detected above the threshold is considered a real signal that can be used to define the threshold cycle (Ct) for a sample. Threshold can be adjusted for each experiment so that it is in the region of exponential amplification across all plots.

Ct is defined as the fractional PCR cycle number at which the reporter fluorescence is greater than the threshold. The Ct is a basic principle of real time PCR and is an essential component in producing accurate and reproducible data.

Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού με qPCR

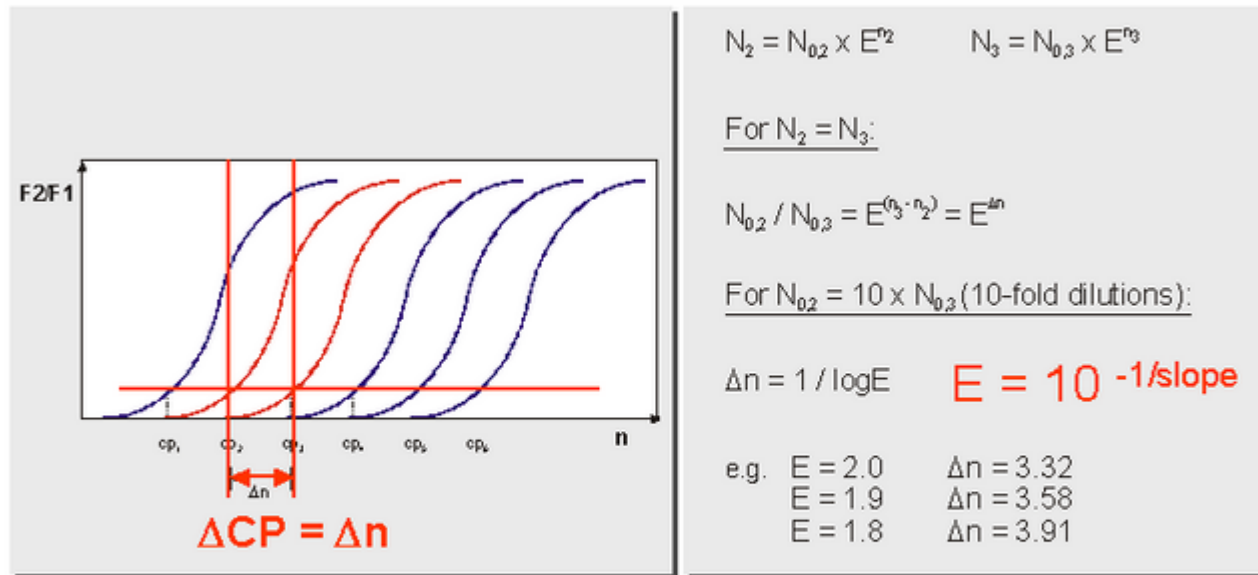


- C_q : σημείο στο οποίο η ένταση φθορισμού ξεπερνά το σήμα υποβάθρου (μέγιστο δεύτερης παραγώγου)
- Το διάγραμμα βαθμονόμησης κατασκευάζεται με γραφική παράσταση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης των προτύπων συναρτήσει του αντίστοιχου C_q

- τρία δείγματα συγκεντρώσεων, 10^6 , 10^5 και 10^4 αντιγράφων.
- όσο λιγότερα αντίγραφα περιέχονται στο δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για να εισέλθει η αντίδραση στην εκθετική της φάση και να ανιχνευθεί το παραγόμενο σήμα που αντιστοιχεί στην μεταβολή του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Calculation of real-time PCR efficiency

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \Rightarrow E = 10^{-1/-3.337} \Rightarrow E = 10^{0.299} \Rightarrow E = 1.99$$



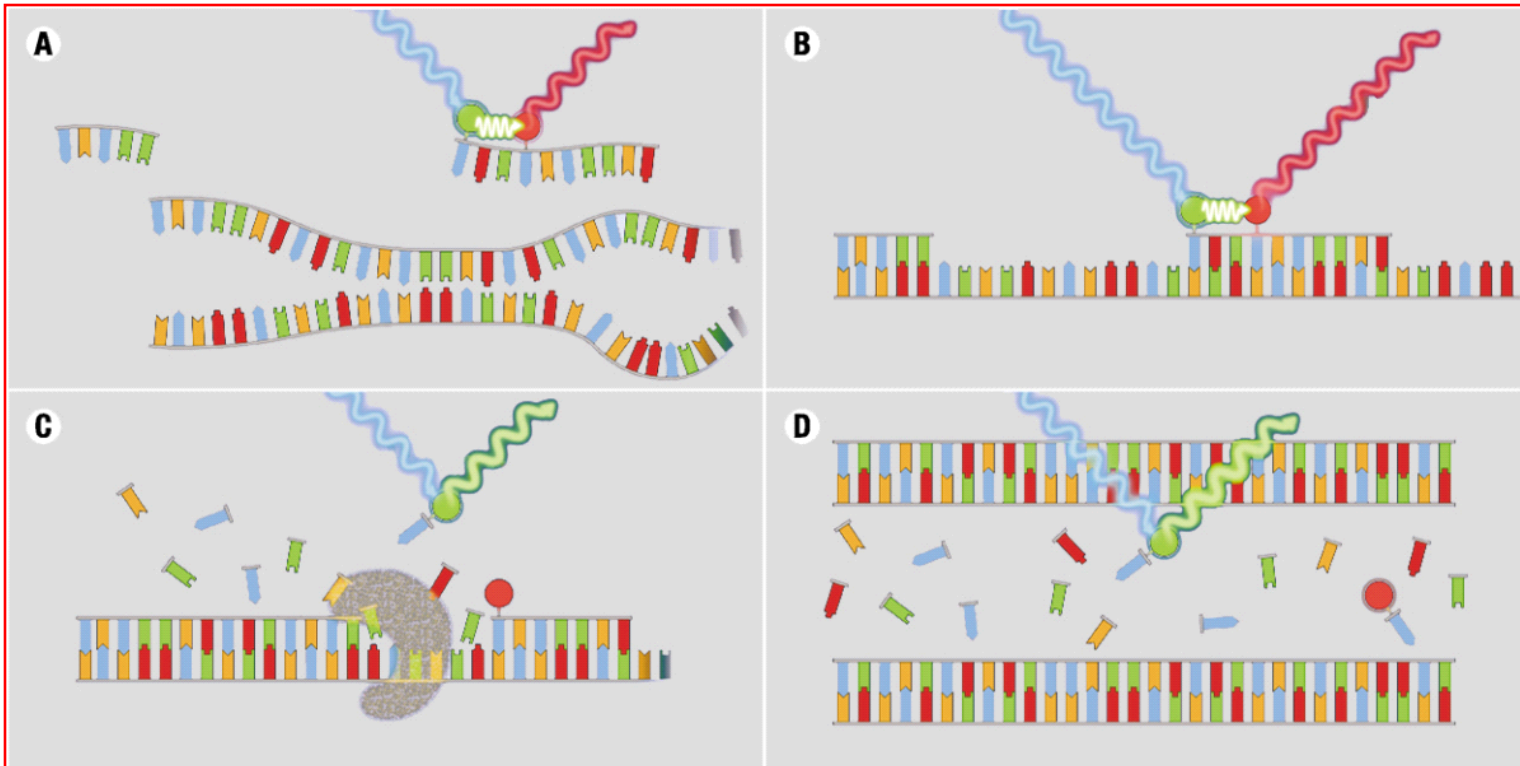
Roche Diagnostics, LC rel. Quantification software, March 2001

Rasmussen, R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds.

Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg; page 21-34

Αρχή της Real-time PCR

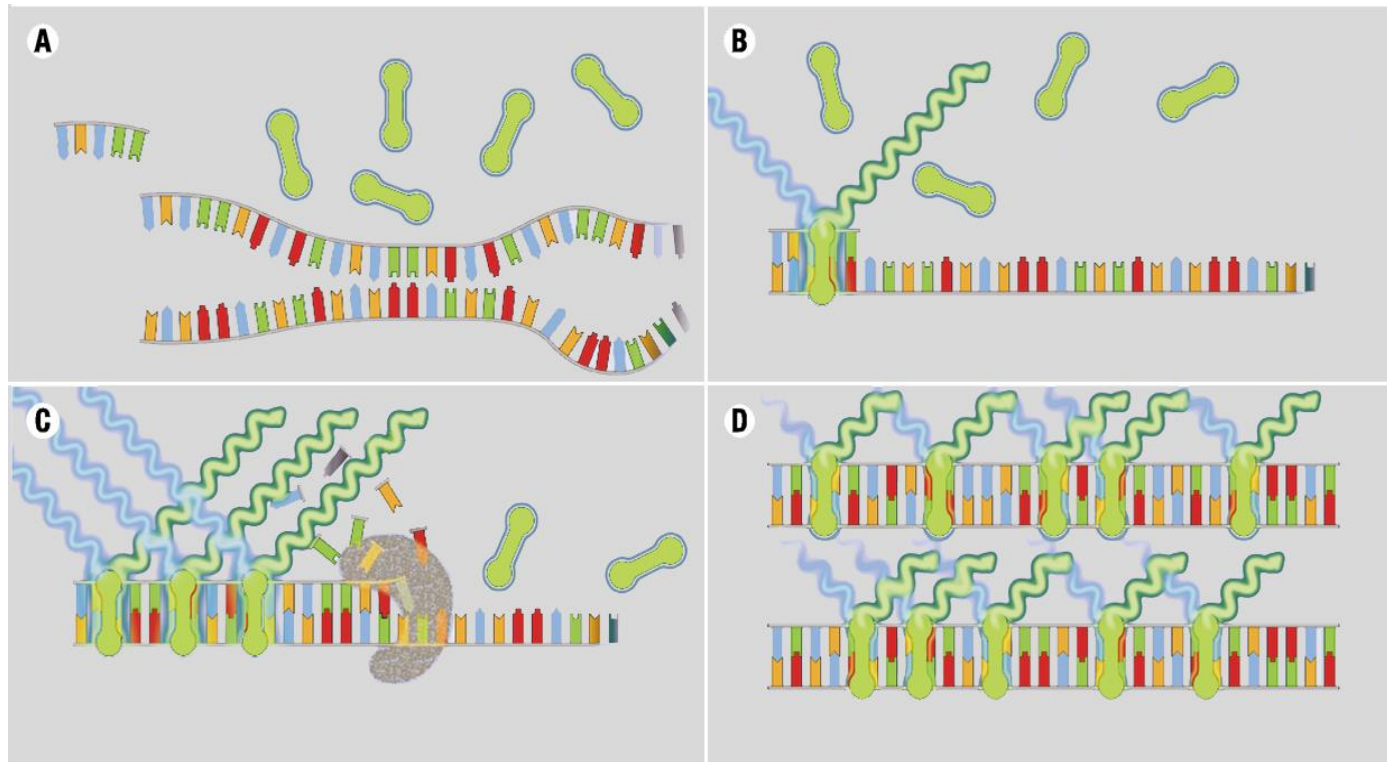
- Είναι η διαδικασία **ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας** με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Real-time PCR), μέσω της χρήσης ειδικών φθορίζουσων χρωστικών που ενσωματώνονται στην αλληλουχία που ενισχύεται.



ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ qPCR

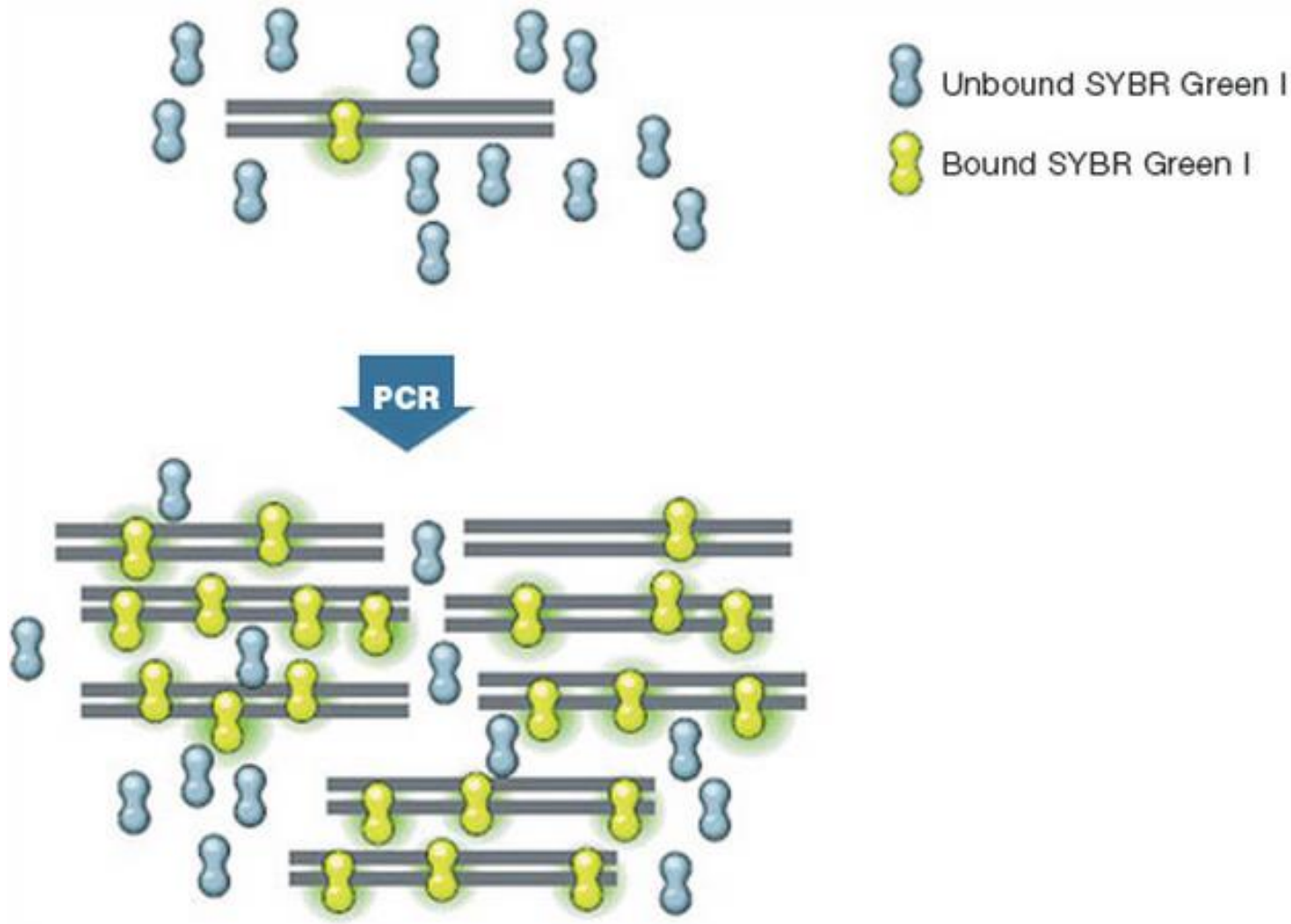
- ΜΗ ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ dsDNA (SYBR[®] Green, LCGreen)
- ΖΕΥΓΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ (dual hybridization probes)
- ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ (hydrolysis probes, TaqMan[®])
- ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΦΑΡΟΙ (molecular beacons)
- ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΤΥΠΟΥ «ΣΚΟΡΠΙΟΣ» (scorpions)

Μη ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ dsDNA SYBR Green



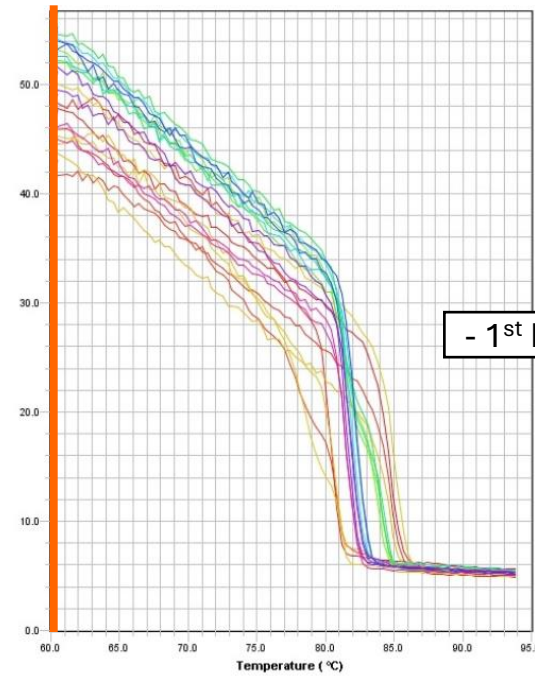
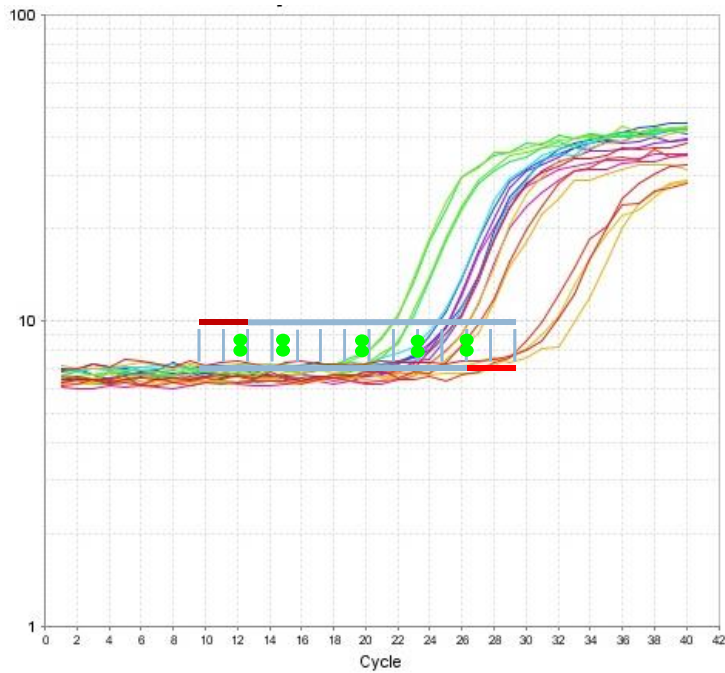
- ✓ Παρουσιάζουν ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερες στο διάλυμα (A) και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA (B, C).
- ✓ Κατά την ποσοτική PCR πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού σε κάθε κύκλο μετά το τέλος της επιμήκυνσης των μορίων DNA.
- ✓ Όσο περισσότερα PCR προϊόντα παράγονται τόσο περισσότερο αυξάνει ο φθορισμός που καταγράφεται από το μηχάνημα

Μη ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ dsDNA SYBR Green

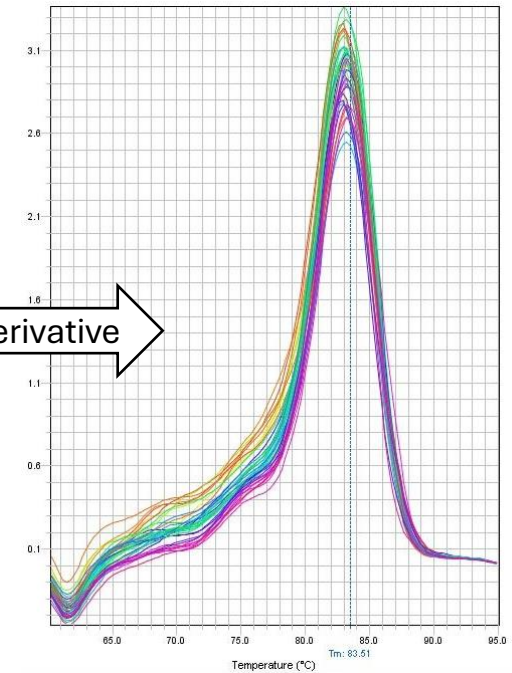


Μη ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ dsDNA SYBR Green

The SYBR Green I assay: what is a melt curve?

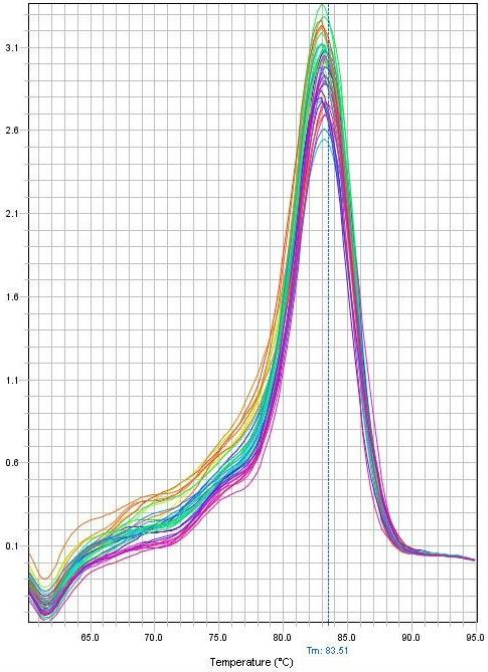


- 1st Derivative

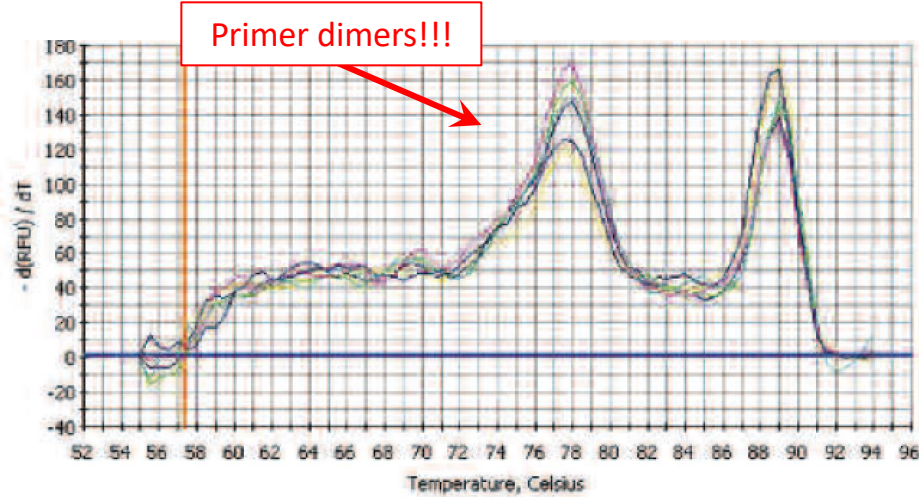


Μη ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ dsDNA SYBR Green

The SYBR Green I assay: good vs. bad melt curves



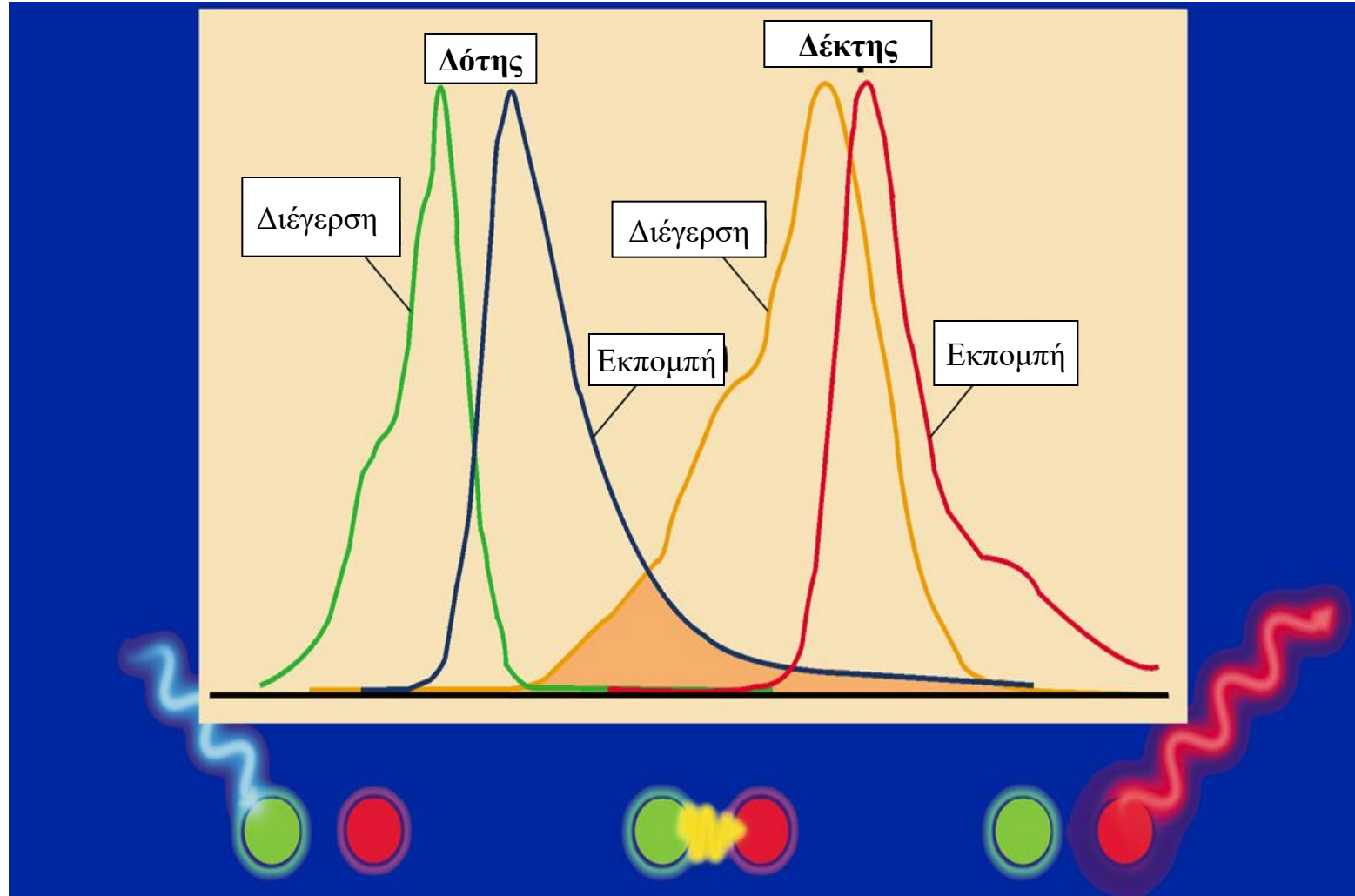
Good melt curve



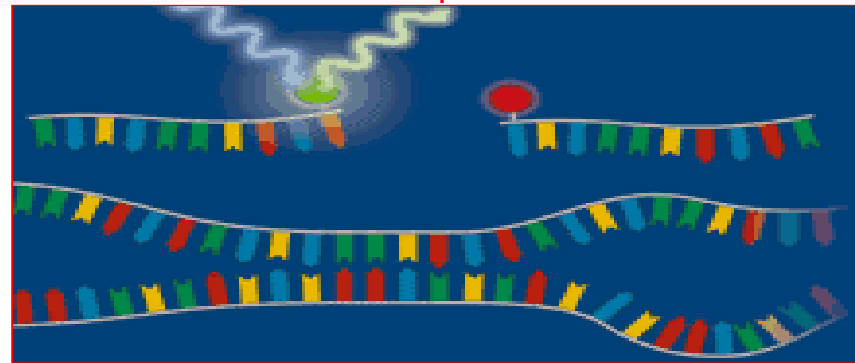
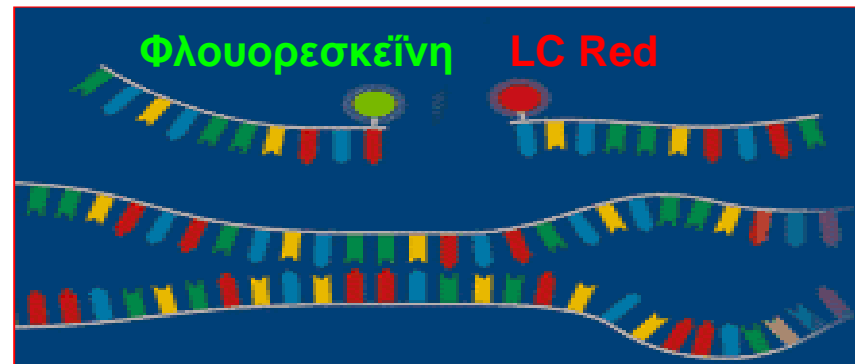
Primer dimers!!!

ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

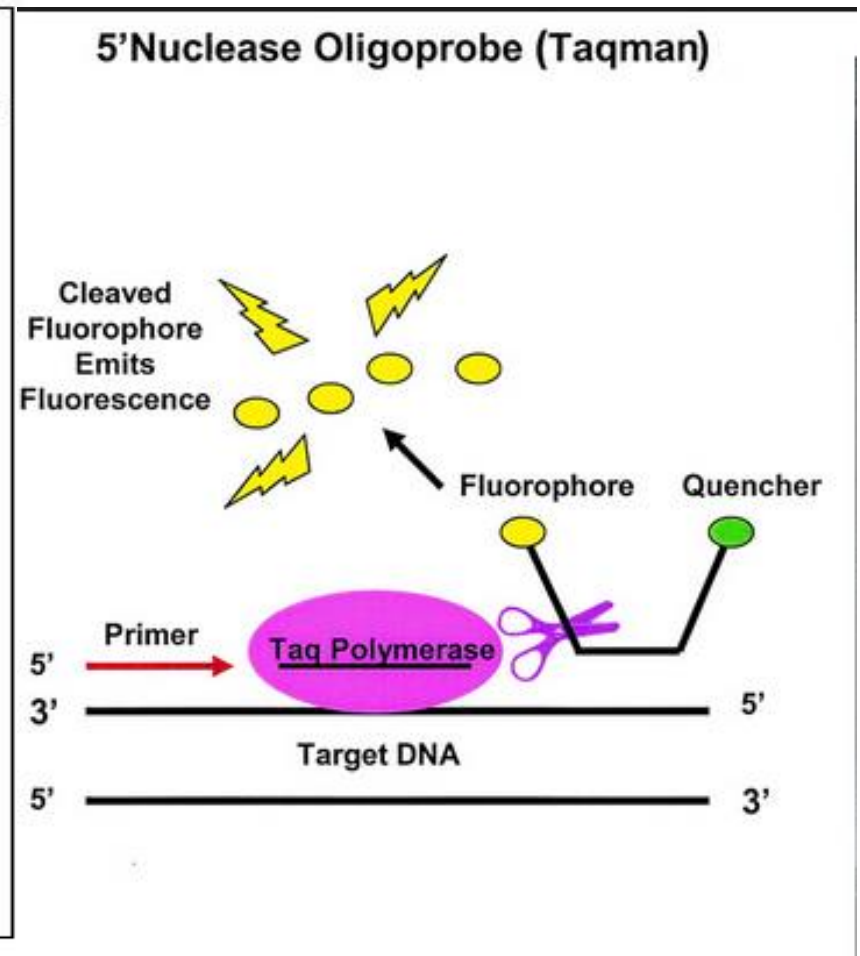
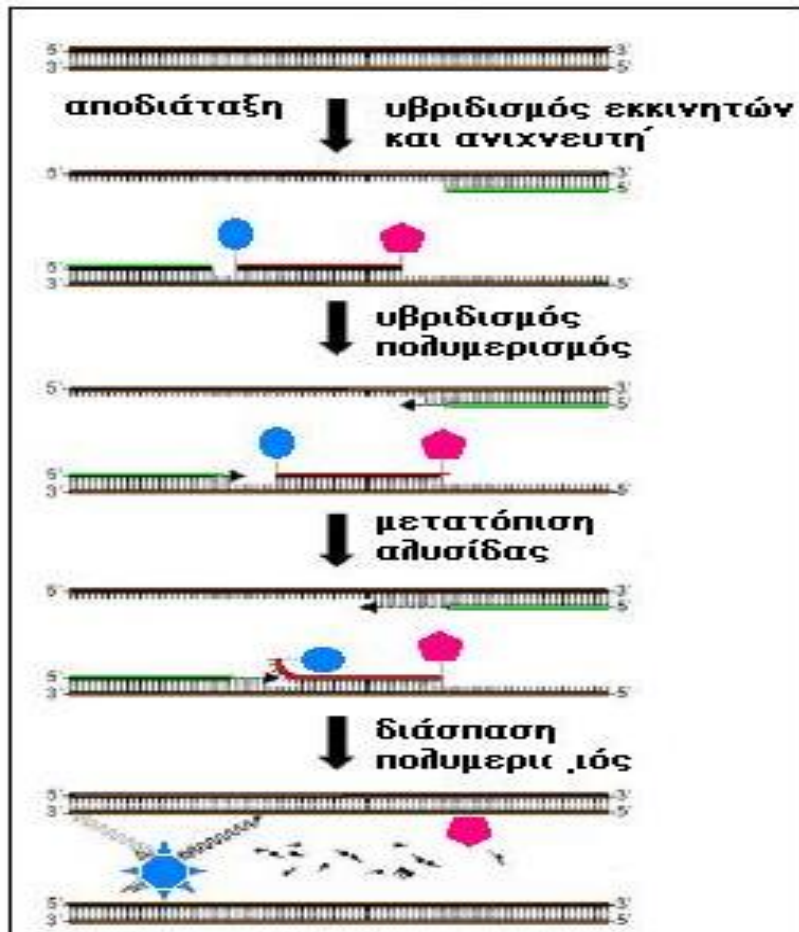
(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕ ΖΕΥΓΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ DNA

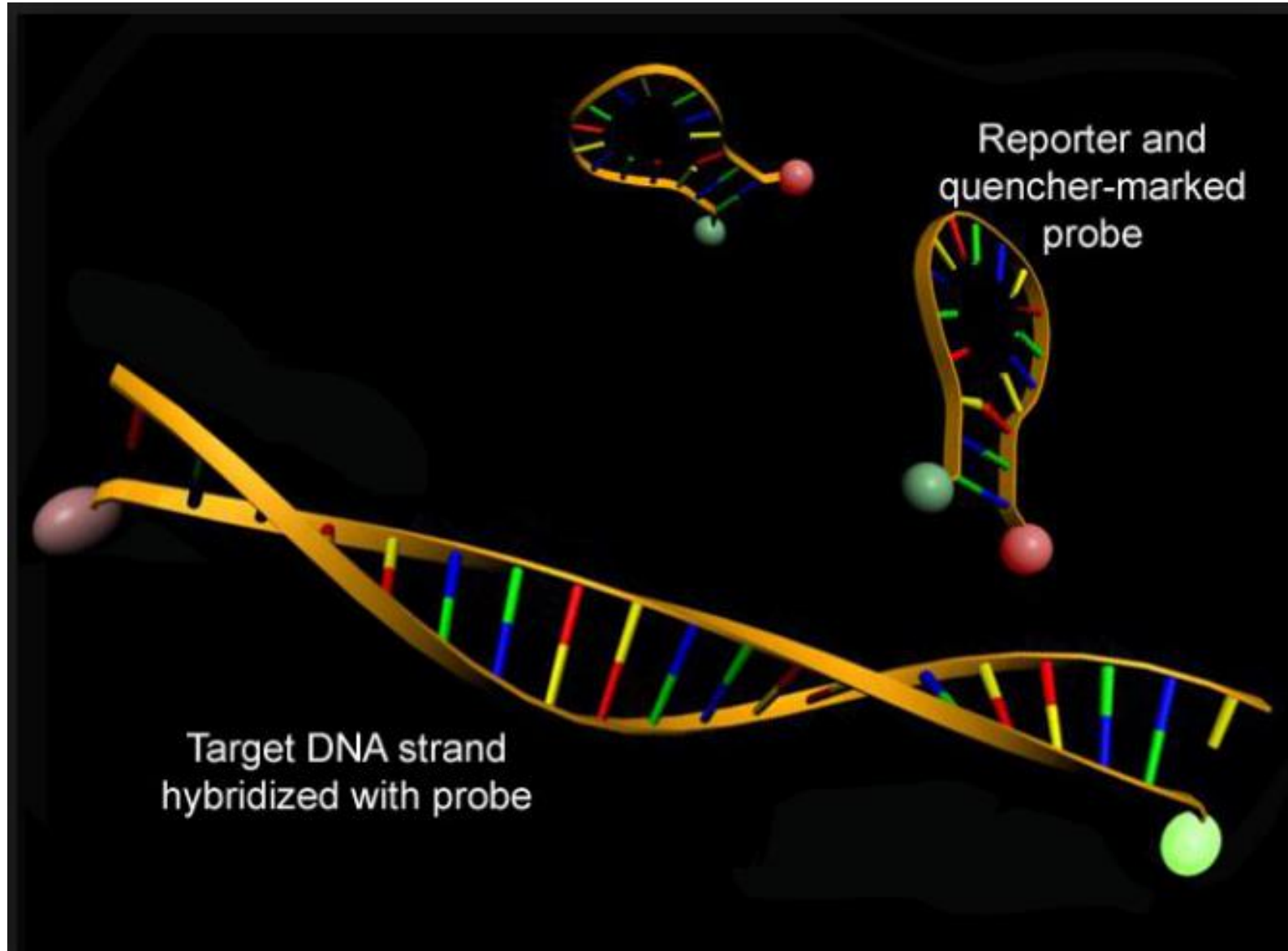


Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτή υδρόλυσης (τύπου TaqMan)

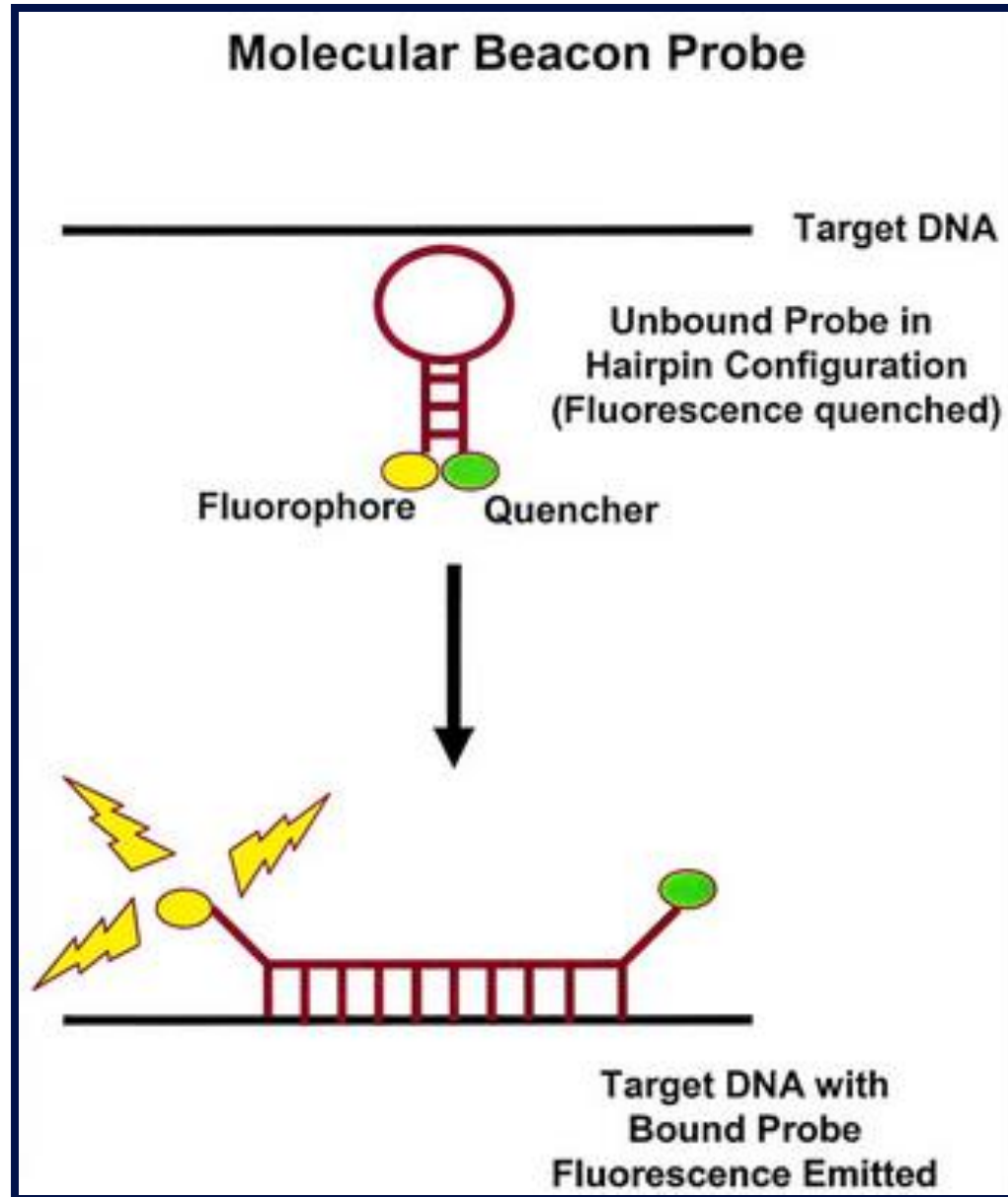


(Bustin SA. *J Mol Endocrinol* 2000, 25: 169-193)

Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές Μοριακούς Φάρους

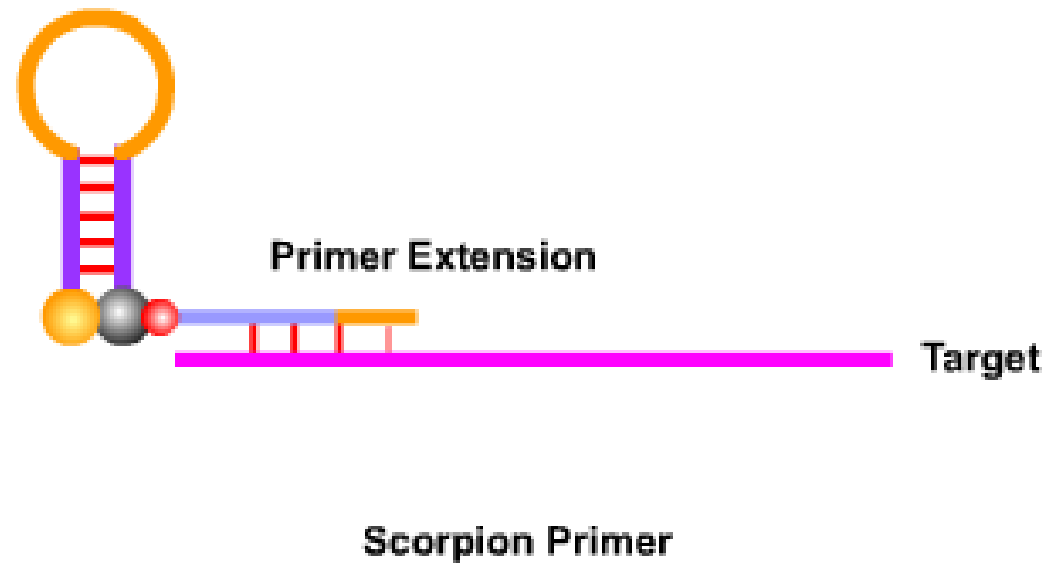


Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές Μοριακούς Φάρους

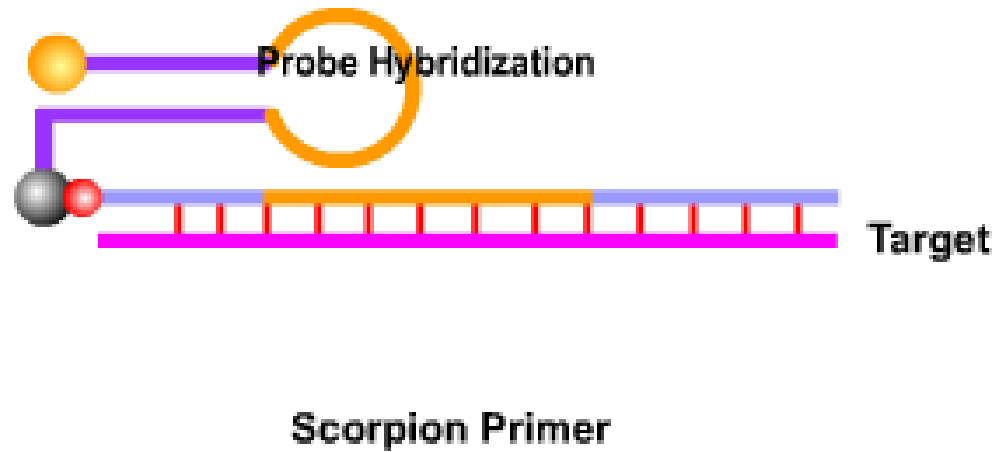


Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές τύπου Scorpions

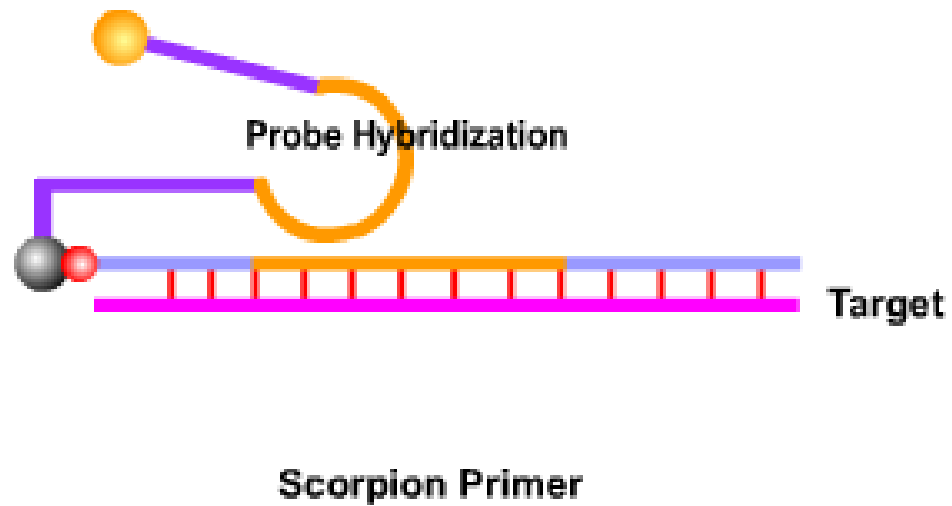
Scorpion[®] Primers:



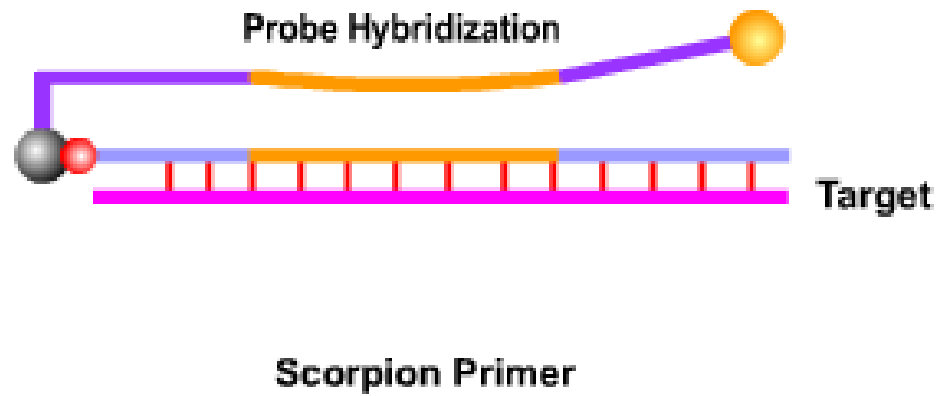
Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές τύπου Scorpions



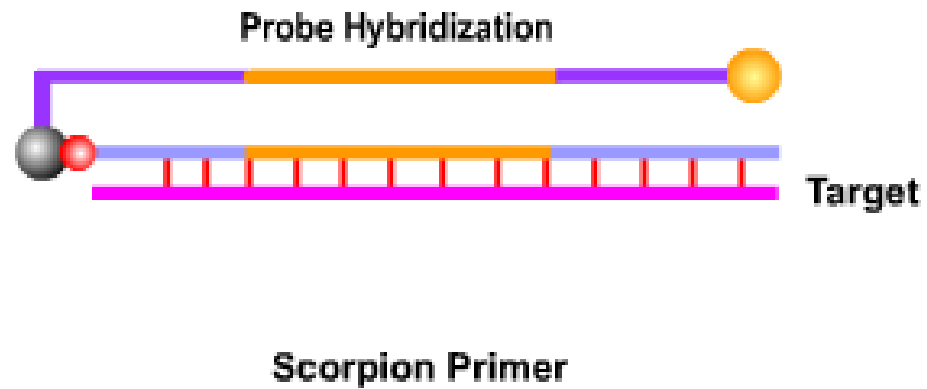
Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές τύπου Scorpions



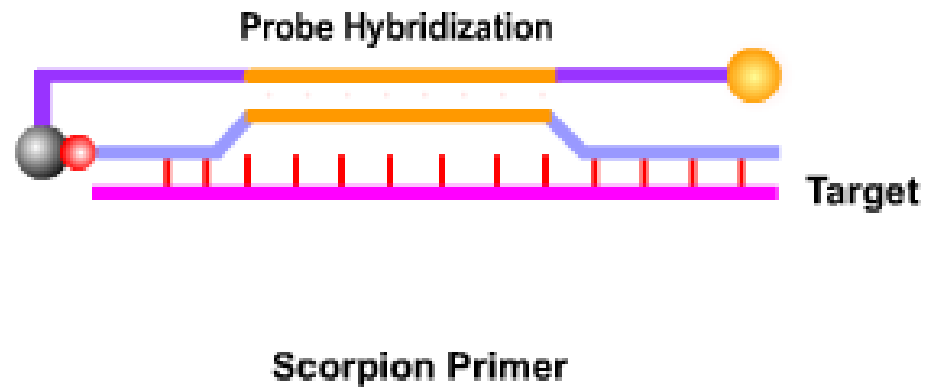
Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές τύπου Scorpions



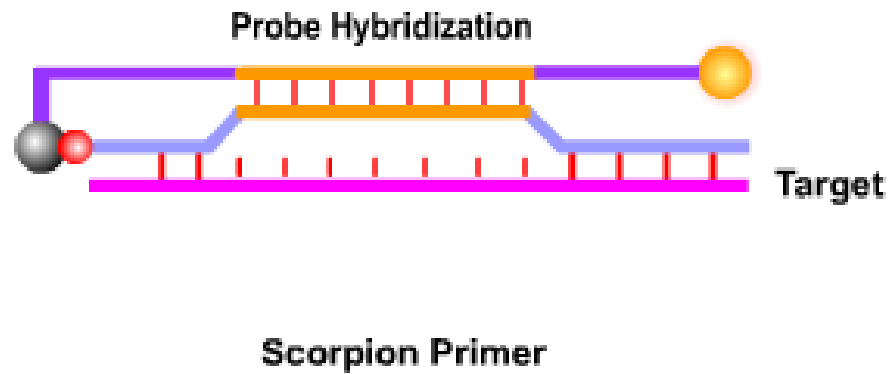
Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές τύπου Scorpions



Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές τύπου Scorpions



Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές τύπου Scorpions



Real-time instruments



ABI 7900
28 x 33 x 25



ABI 7500
13 x 18 x 19



StepOne
10 x 20 x 17



CFX96
13 x 18 x 14



iQ5
11 x 23 x 15



MiniOpticon
7 x 13 x 13



LightCycler 480
24 x 24 x 22



LightCycler 2.0
11 x 20 x 15



Mx4000
30 x 18 x 20



Mx3005P
13 x 18 x 17



SmartCycler
12 x 12 x 10



RotorGene Q
15 x 17 x 11



RealPlex
10 x 16 x 16



PIXO
12.3 x 13.6 x 12.3



LightCycler 24

Prototype: LightCycler, 1997



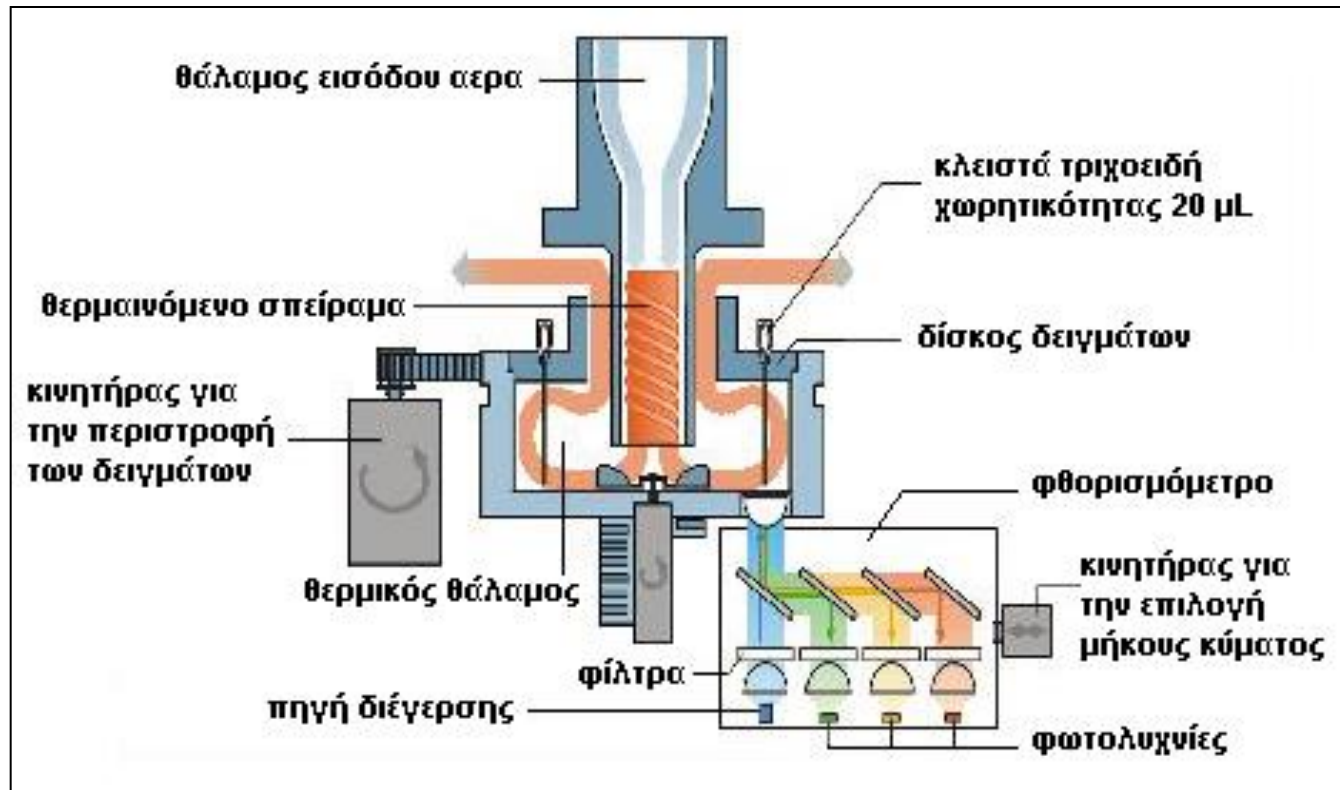
LightCycler Inventor: Dr. Carl Wittwer, Univ of Utah, Salt Lake City



LightCycler



Τεχνολογία LightCycler (Roche Diagnostics)



- Συνδυασμός φθορισμομέτρου και θερμικού κυκλοποιητή

Cobas z480, (Roche Diagnostics)

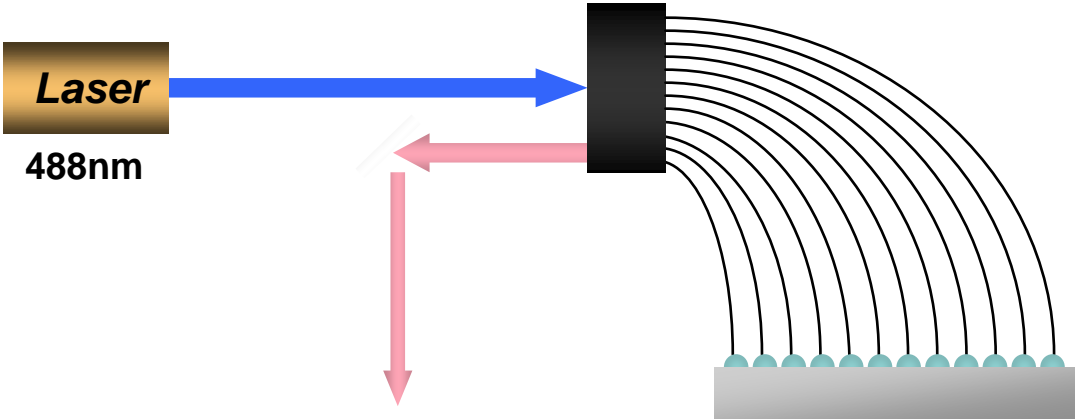


BioRAD

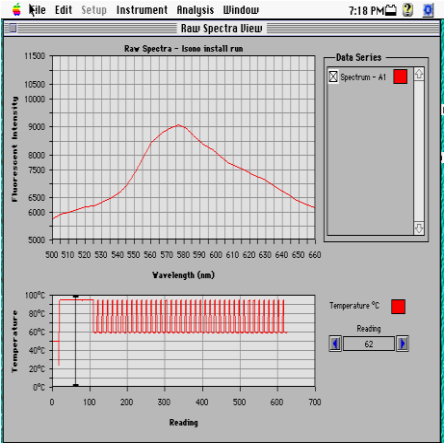


ABI Prism

ABI Prism Excitation and Emission



CCD



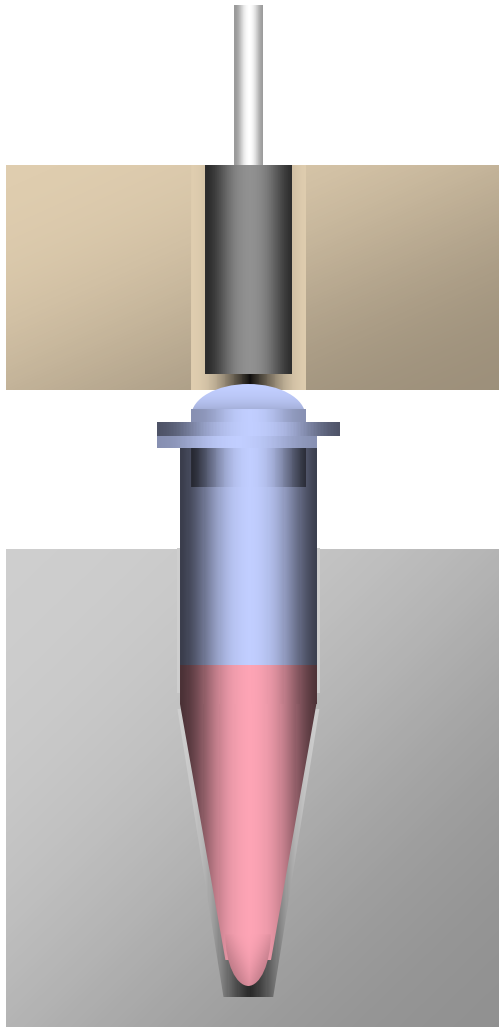
**96 wells every
7 - 8 seconds.**

The 7700 has an argon laser, which emits light at 488nm.

This light is sequentially distributed along 96 fiber optic cables to each of the 96 wells in the thermal cycler block. The fluorescent light from the dyes is reflected along mirrors to a CCD, which records the entire spectrum from 500-660nm. The speed of data collection is such that all 96 wells are detected every 7-8 seconds.

ABI Prism

Ανίχνευση μέσω των σωληναρίων της PCR



Detection occurs through the caps of the 0.2ml MicroAmp optical tubes.

There are 96 holes in the heated lid, into which are placed 96 lens assemblies and fiber optic cables.

The 0.2ml tubes are optical grade, which means that the plastics are quality controlled for fluorescent contaminants. The bottoms of the tubes are frosted, so that light is reflected more efficiently. The optical caps have also been polished to increase their transparency.

ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR

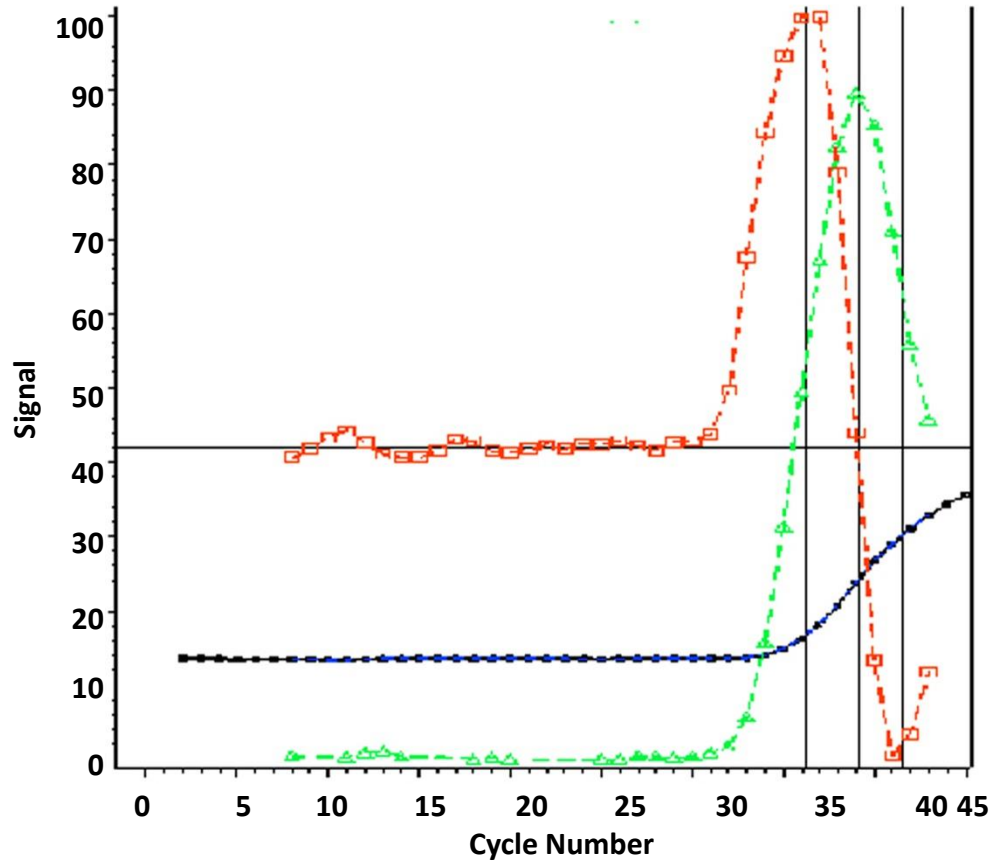
Ο αριθμός των αρχικών μορίων νουκλεϊκού οξέος διπλασιάζεται με κάθε κύκλο PCR με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του προϊόντος σύμφωνα με τη σχέση:

$$P = T (1+E)^n (1)$$

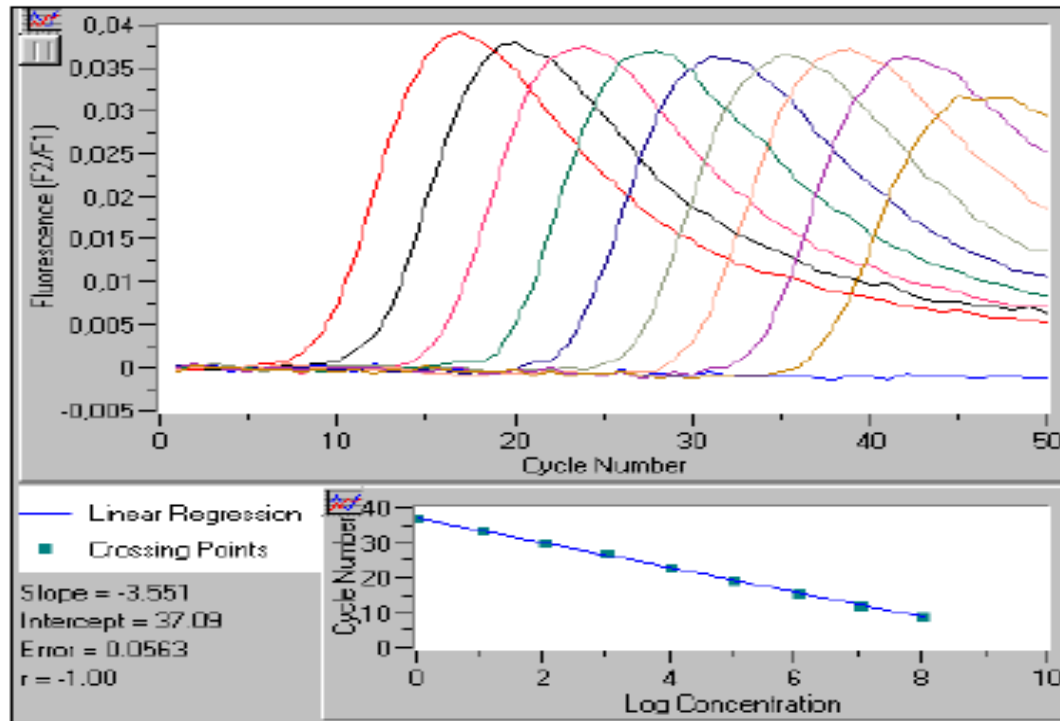
Όπου P , η ποσότητα του προϊόντος,
 T , η αρχική ποσότητα του DNA στόχου (*target*),
 n , ο αριθμός των κύκλων της PCR, και
 E , η μέση απόδοση της αντίδρασης για κάθε κύκλο

Η ποσοτική PCR προϋποθέτει μία σταθερή και επαναλήψιμη σχέση μεταξύ του αναλυτικού σήματος που λαμβάνεται από το προϊόν της αντίδρασης και της αρχικής ποσότητας του DNA στο δείγμα

Υπολογισμός του σημείου ποσοτικοποίησης C_q ($C_{\text{quantification}}$) με τη μέθοδο της δευτέρας παραγώγου



ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ



- Το διάγραμμα βαθμονόμησης κατασκευάζεται με γραφική παράσταση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης των προτύπων συναρτήσει του αντίστοιχου C_p .
- Η απόδοση της PCR δίνεται από τον τύπο: $E = 10^{-1 / \text{κλίση}}$.
- Ευρεία δυναμική περιοχή: 1×10^8 ως 1×10 copies/ μL .

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΗ REAL-TIME PCR

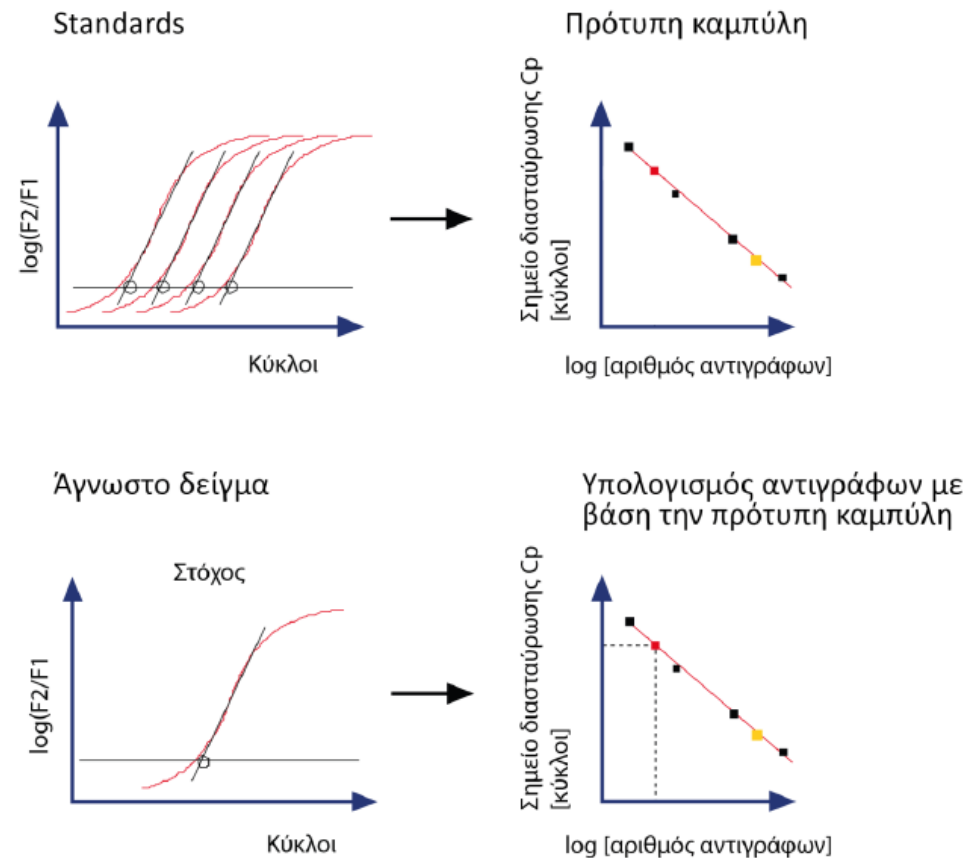
2 βασικές αρχές μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού

A) **απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός** όπου η συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου εκφράζεται ως απόλυτη τιμή και καθορίζεται με τη βοήθεια καμπύλης βαθμονόμησης που λαμβάνεται από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης

B) **σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός** όπου η συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου εκφράζεται σε σχέση με τη συγκέντρωση ενός γονισίου βασικής λειτουργίας (housekeeping gene). Το διάγραμμα βαθμονόμησης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αλληλουχίας στοχου και του γονιδίου αναφοράς

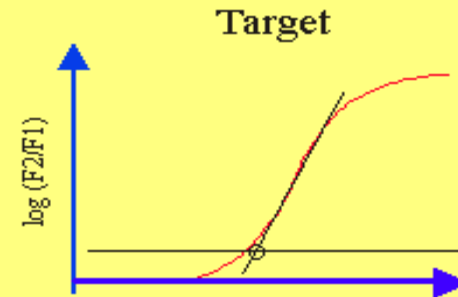
A) Απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων ενός γονιδίου με χρήση πρότυπης καμπύλης.

- ✓ Η απόλυτη ποσοτικοποίηση στην ποσοτική PCR πραγματοποιείται βάσει μια **πρότυπης καμπύλης**, η οποία δημιουργείται από δείγματα με γνωστή συγκέντρωση ή καλύτερα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (standards).
- ✓ Η συσχέτιση των σημείων διασταύρωσης (C_q) των standards και του λογαρίθμου της συγκέντρωσής τους μας δίνει την πρότυπη καμπύλη.
- ✓ Στη συνέχεια, γνωρίζοντας μόνο το σημείο διασταύρωσης (C_q) ενός άγνωστου δείγματος, μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των αντιγράφων του υπό μελέτη γονιδίου.

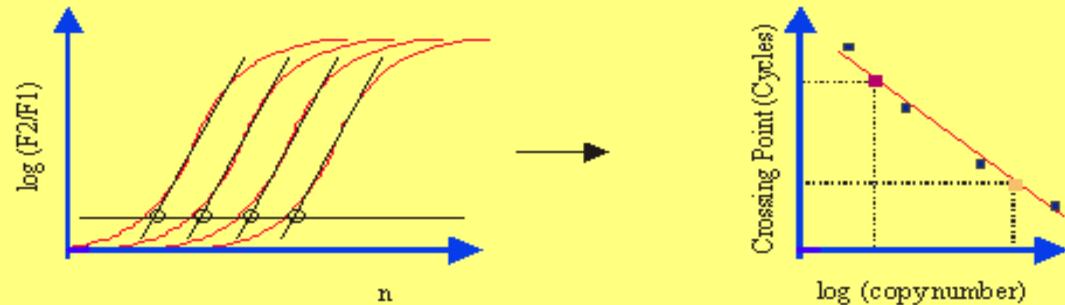


ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ (Quantification NOT Quantitation!!!) ΜΕ ΕΞΩΤΕΡΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ

Άγνωστο δείγμα



Διάγραμμα
βαθμονόμησης



- Η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων υπολογίζεται σε αντίγραφα του γονιδίου-στόχου.
- Το πρότυπο είναι εξωτερικό και ομόλογο.
- Ευρεία δυναμική περιοχή.
- Δεν υπάρχει έλεγχος για αναστολείς της PCR που πιθανόν να υπάρχουν στο δείγμα.

Απολυτή ποσοτικός προσδιορισμός qPCR με χρήση διαγράμματος βαθμονόμησης και εσωτερικών προτύπων

Εσωτερικά πρότυπα μη ανταγωνιστικού τύπου

- Χρησιμοποιείται επίσης εξωτερικό διάγραμμα βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γονιδίου-στόχου
- Επιπλέον, σε κάθε δείγμα προστίθεται γνωστή ποσότητα μιας ουσίας που λειτουργεί ως εσωτερικό πρότυπο για κάθε δείγμα
- Ενισχύονται ταυτόχρονα με το ίδιο ζεύγος εκκινητών-διαφορετικά ζεύγη ανιχνευτών
- Το εσωτερικό πρότυπο ως δείκτης απόδοσης της PCR

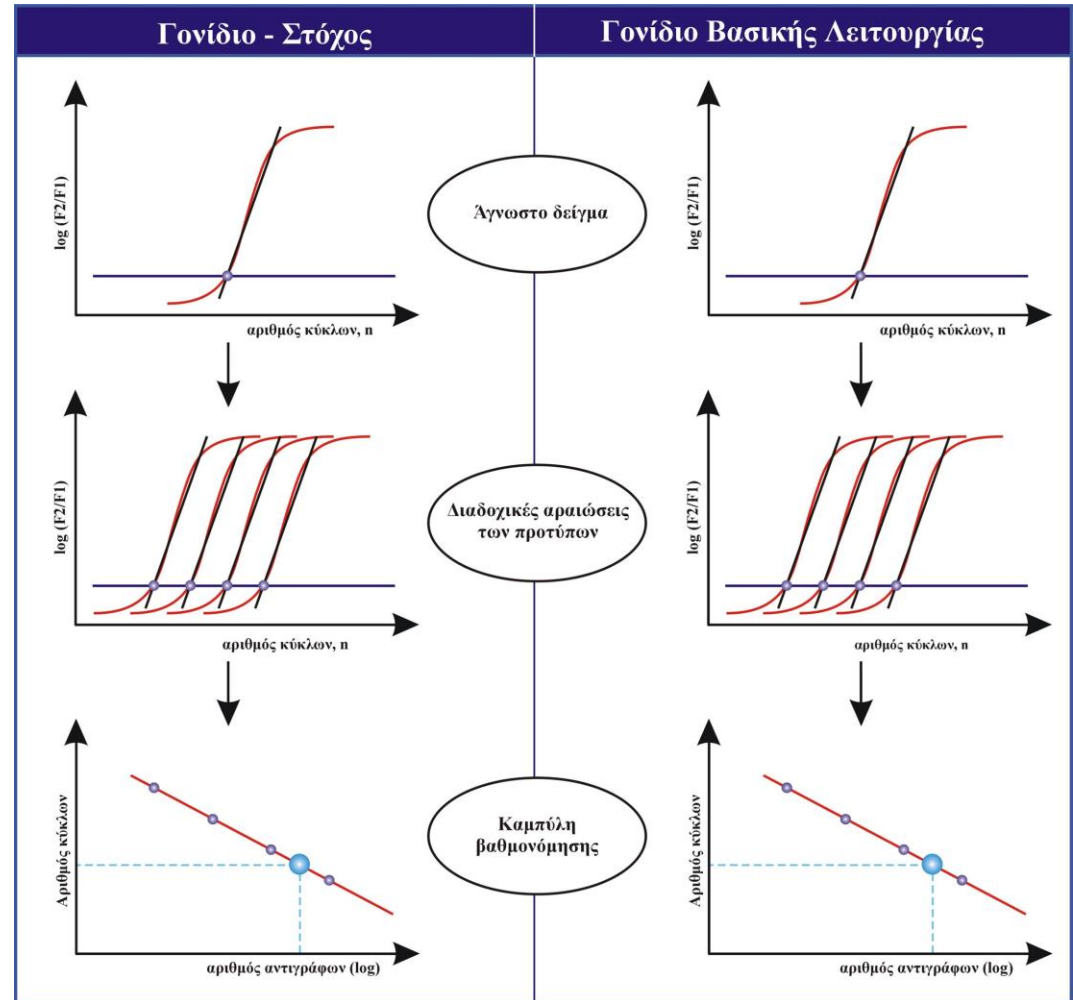
ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Γονίδια αναφοράς (reference genes), όπως η β-ακτίνη

χρησιμοποιούν διαφορετικούς εκκινητές και υποβάλλονται σε PCR παράλληλα με το δείγμα με το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών

❖ Απαραίτητη προϋπόθεση: ταυτόσημο επίπεδο μεταγραφής του mRNA του προτύπου

Υπολογίζεται η ποσότητα της αλληλουχίας στόχου ως προς την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς μέσα στο ίδιο δείγμα



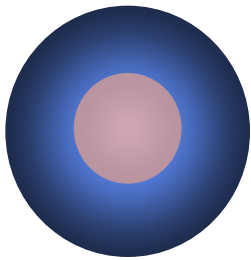
Η χρήση εσωτερικού προτύπου (γονίδιο αναφοράς) διορθώνει διαφορές που οφείλονται σε :

- Διακυμάνσεις στις αρχικές ποσότητες των δειγμάτων
 - Διακυμάνσεις στα ποσοστά ανάκτησης των νουκλεϊκών οξέων
 - Πιθανή ποιοτική υποβάθμιση του υλικού του δείγματος
 - Διακυμάνσεις στη φόρτωση των δειγμάτων ή σφάλματα πιπεταρίσματος
 - Διακυμάνσεις στην απόδοση κατά τη σύνθεση του cDNA (κυμαίνεται από 5% έως 90%)
- Προϋποθέτει :
- Σταθερή έκφραση του γονιδίου αναφοράς
 - Να μη διαφέρει η απόδοση στην αντίδραση του γονιδίου-στόχου και του γονιδίου-αναφοράς

Εφαρμογές της real-time PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης γονιδίων

- Μελέτη μικρομεταστατικής νόσου στον καρκίνο (μαστού, παχέος εντέρου, πνεύμονα, κα)
- Αποτελεί μέθοδο αναφοράς για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με μικροσυστοιχίες
- Πολλαπλές άλλες εφαρμογές

Εφαρμογές της ποσοτικής real-time PCR



Ποσοτικός προσδιορισμός
παθογόνων

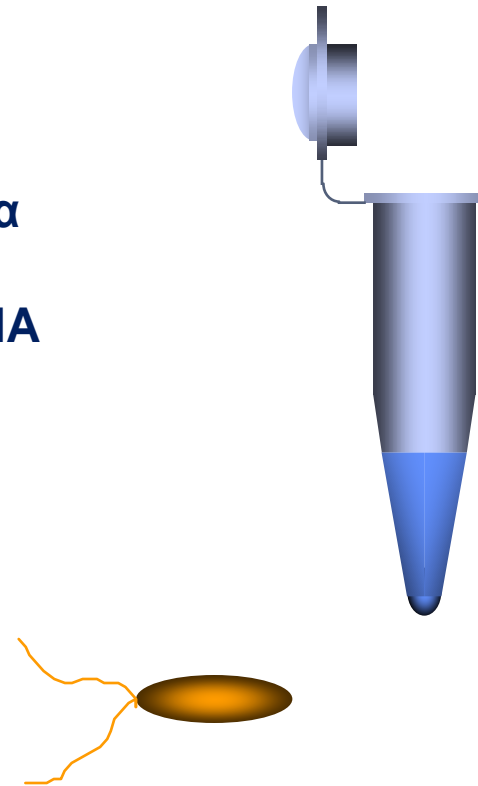
Γονιδιακή έκφραση

Φαρμακευτική θεραπεία

Μελέτη βλαβών στο DNA

Έλεγχος ποιότητας

Γονιδιακή θεραπεία



-Ψηφιακή PCR (Digital PCR-dPCR)

Digital PCR-ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

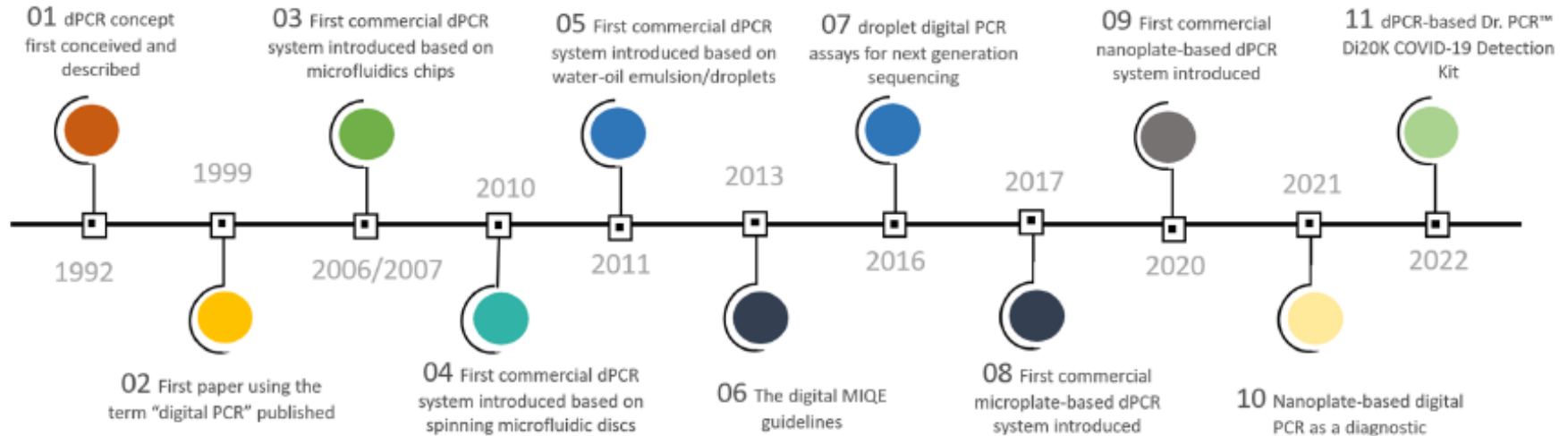


Fig. 1. Illustrates the evolution of digital polymerase chain reaction (dPCR).

- Το πρώτο άρθρο για την digital PCR δημοσιεύτηκε τον Αύγουστο του 1999 από τους Bert Vogelstein και Kenneth Kinzler
- Πριν από την δημοσίευση αυτή είχαν γίνει αναφορές στην μέθοδο αλλά μετά το 2007 υπήρξε ταχεία αύξηση του αριθμού των δημοσιεύσεων που αναφέρονταν στην digital PCR

Digital PCR-ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

- Το πρώτο άρθρο για την digital PCR δημοσιεύτηκε τον Αύγουστο του 1999 από τους Bert Vogelstein και Kenneth Kinzler

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 96, pp. 9236–9241, August 1999
Genetics

Digital PCR

BERT VOGELSTEIN* AND KENNETH W. KINZLER

The Howard Hughes Medical Institute and the Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD 21231

Contributed by Bert Vogelstein, June 9, 1999

ABSTRACT The identification of predefined mutations expected to be present in a minor fraction of a cell population is important for a variety of basic research and clinical applications. Here, we describe an approach for transforming the exponential, analog nature of the PCR into a linear, digital signal suitable for this purpose. Single molecules are isolated by dilution and individually amplified by PCR; each product is then analyzed separately for the presence of mutations by using fluorescent probes. The feasibility of the approach is demonstrated through the detection of a mutant *ras* oncogene in the stool of patients with colorectal cancer. The process provides a reliable and quantitative measure of the proportion of variant sequences within a DNA sample.

We therefore sought to develop an approach to the problem that would overcome some of the aforementioned difficulties. The strategy described in this paper involves separately amplifying individual template molecules so that the resultant PCR products are completely mutant or completely WT. The homogeneity of these PCR products makes them easy to distinguish with existing techniques. Such separate amplifications are only useful in a practical sense, however, if a large number of them can be assessed simply and reliably. Techniques for such assessments were developed, with the output providing a digital readout of the fraction of mutant alleles in the analyzed population. A variety of applications for this technology are foreseeable.

MATERIALS AND METHODS

Digital PCR-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Βασική αρχή:

Κλασματοποίηση δείγματος σε μέρη ίσου όγκου ώστε να περικλείουν 0 ή 1 μόριο στόχο

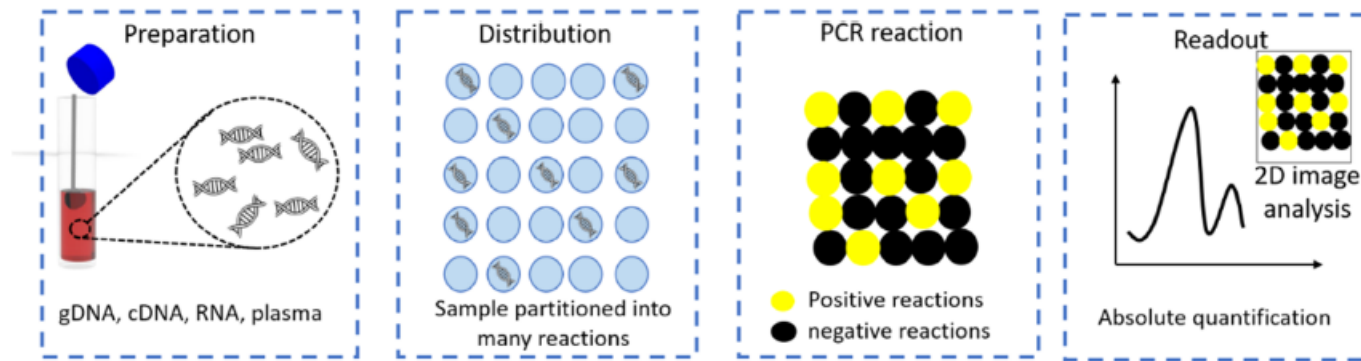


Fig. 4. The basic principle of dPCR. Different steps for dPCR, for example, sample preparation, distribution, amplification, and absolute quantification involved in dPCR are illustrated one by one in the above figure.

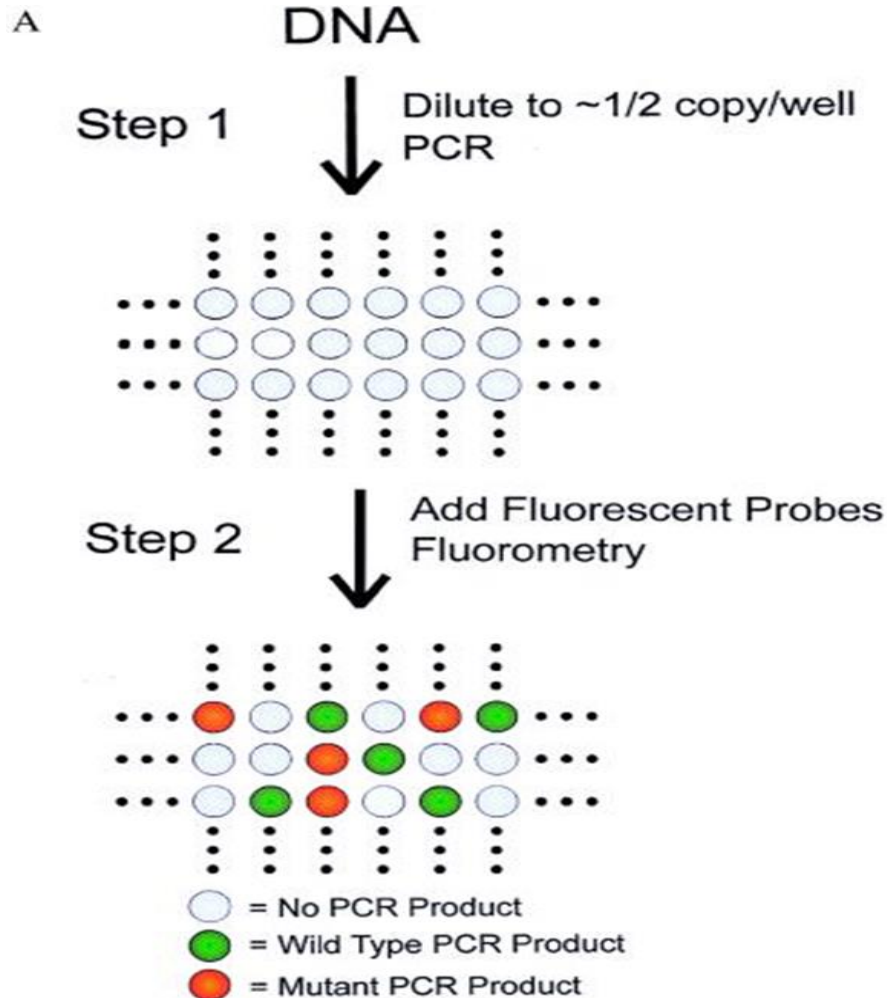
- 2 γενικές κατηγορίες:

A. Μικρορρευστονική

B. Γαλακτώματα ή σταγονίδια

-Υποκατηγορία : “BEAMing”

Digital PCR-ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ



1) Αραίωση του δείγματος σε πλάκες πολλαπλών φρεατίων

2) Προσθήκη ανιχνευτών φθορισμού απευθείας στα φρεάτια της αντίδρασης

3) Μέτρηση σημάτων φθορισμού και καταμέτρηση των θετικών σημάτων

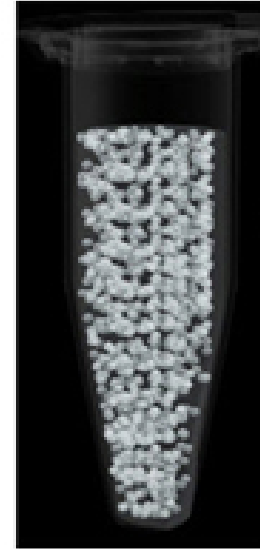
Digital PCR vs PCR



One measurement



Nanodroplet PCR reactions
are independent, single
amplification events



Many thousands
of discrete measurements

Digital PCR vs PCR



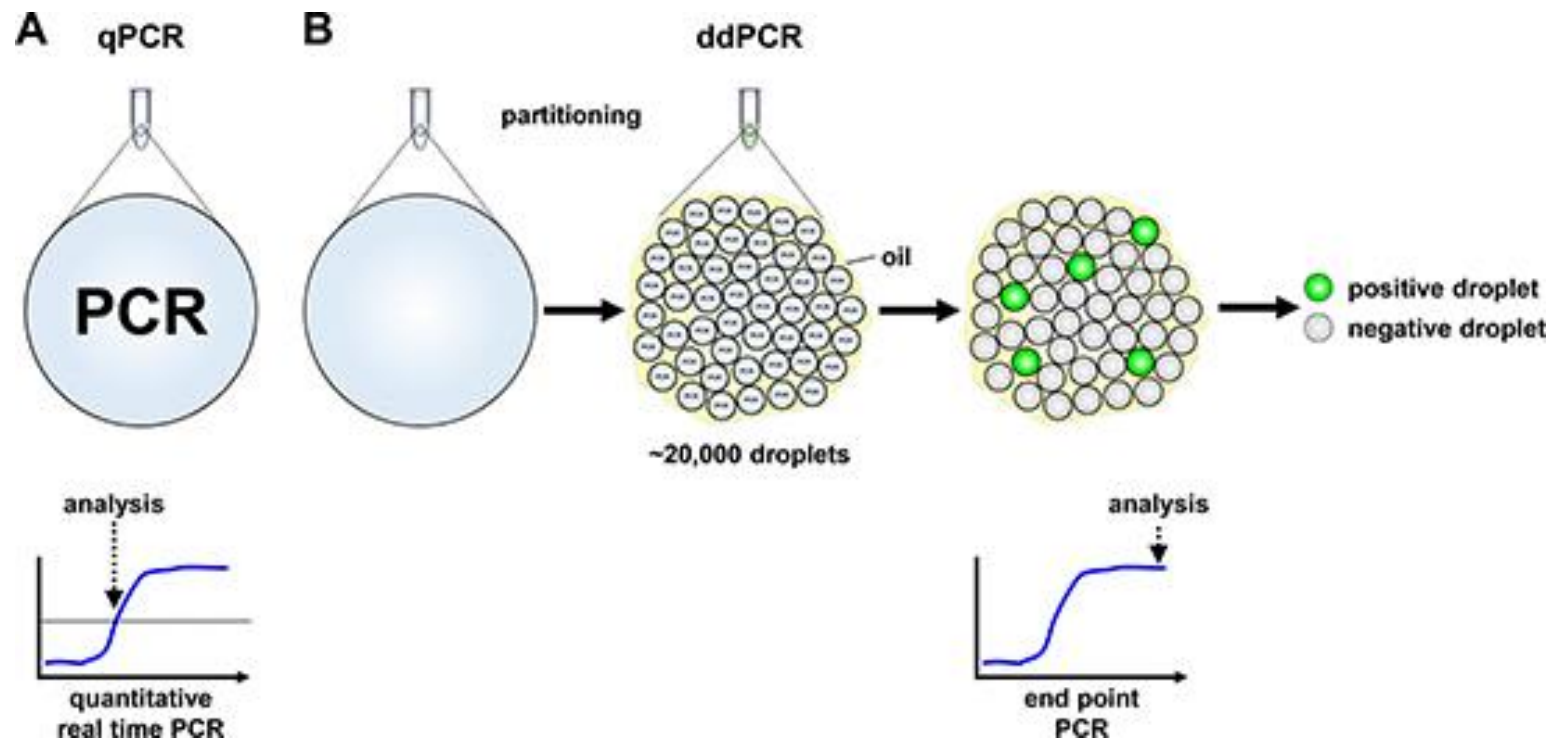
Traditional PCR:
One fluorescence
measurement

VS.



Digital PCR:
Thousands of distinct
fluorescence measurements

Digital PCR vs qPCR



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ Digital PCR

- **Δυνατότητα απόλυτου ποσοτικού προσδιορισμού**
- **Αύξηση του αριθμού των κύκλων της PCR: βελτίωση της ακρίβειας**
- **Αυξημένη ευαισθησία: ο διαχωρισμός του δείγματος οδηγεί σε μείωση αναλογίας σήματος αλληλουχίας φυσικού τύπου → ανίχνευση δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης**
- **Δεν απαιτείται καμπύλη βαθμονόμησης: απόλυτη ποσοτικοποίηση από την καταμέτρηση του ποσοστού των ενισχυμένων προϊόντων προς το συνολικό αριθμό του δείγματος**
- **Μειωμένα σφάλματα: η dPCR εξαρτάται λιγότερο από παράγοντες όπως π.χ. ο βαθμονομητής**

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ Digital PCR

- κατανομή Poisson
- Περισσότερο ανθεκτική-Σταθερή διακύμανση: μέτρηση έχοντας ως βάση την στους αναστολείς
- Ικανότητα πολλαπλών μετρήσεων (με διαφορετικές συγκεντρώσεις του ίδιου φθορισμοφόρου): αύξηση του αριθμού των μορίων που μετρώνται σε μια αντίδραση και ανάλυση σύνθετων δειγμάτων
- Δεν απαιτείται επεξεργασία του δείγματος μετά την ανάλυση
- Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται είναι γραμμικά: η μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί μικροσκοπικές ποσότητες δείγματος
- Εξαιρετικά κατάλληλη για αναλύσεις υγρής βιοψίας

Digital PCR vs qPCR

Table 1

Difference between qPCR and dPCR.

qPCR	dPCR
Quantitative and absolute quantification and reference material are required	Quantitative and absolute quantification and no reference material are required
Mass PCR	Sample compartments
Flexible sample volume	Higher inhibitor tolerance
Results are affected by the PCR amplification efficiency	Unaffected by the changes in amplification efficiency
Measurement of the standard curve at each cycle	Results are measured at the end of the PCR cycles
The mutation rate at $>1\%$	The mutation rate at $>0.1\%$
Well established protocols measures low and high expression levels in the same reaction	Higher efficiency and reproducibility It is usually used a quantify rare targets in complex backgrounds

Digital PCR vs PCR

Table 1. Comparative study between conventional PCR, qPCR, and dPCR.

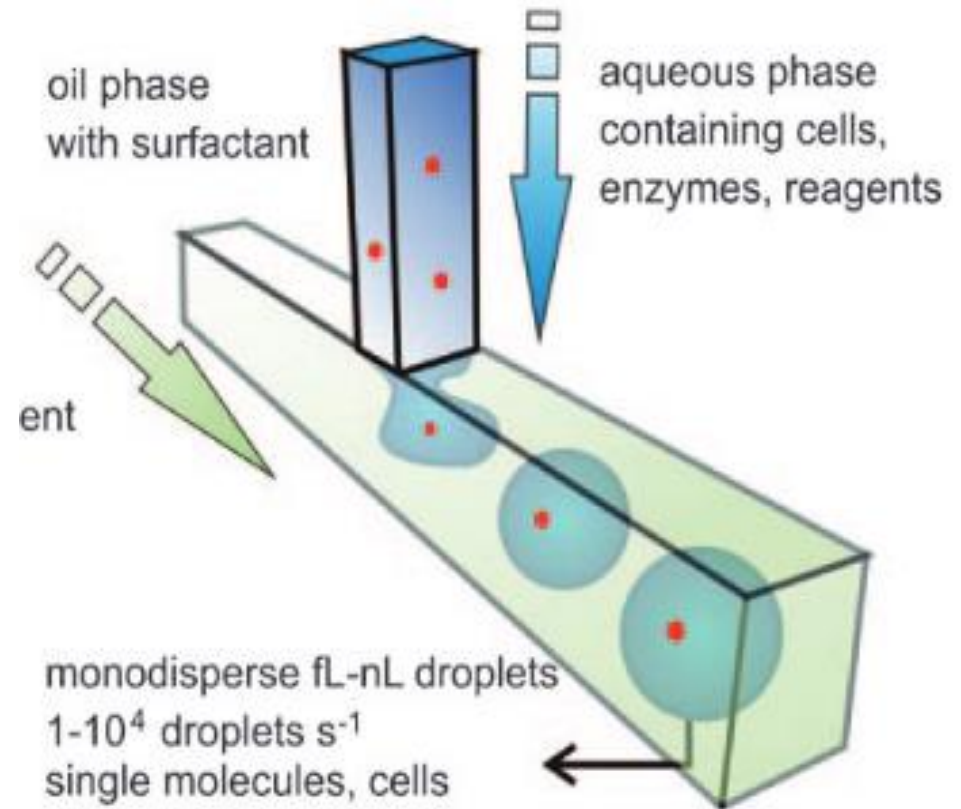
Parameters	Conventional PCR	Quantitative/real-time PCR	Digital PCR
Experiment output	Copies of specific template made <i>in vitro</i>	Ct, Δ Ct, or $\Delta\Delta$ Ct	Copies per μ L
Quantification	Cannot be done	Relative quantification [61]	Absolute quantification [62]
Sensitivity of results based on primer, probe and template	Depends on the <ul style="list-style-type: none"> • Number of index species mismatches [63,64] • GC base pair richness of the target amplicon 	Depends on <ul style="list-style-type: none"> • Detection chemistry (e.g., TaqMan Assays or SYBR Green dyes) • Amplification efficiency of PCR primers/probe [32] 	Results are not affected by any of these factors [21]
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> • Possibility of end-point detection as well as detection during reaction • Used as a molecular diagnostic tool for disease diagnosis • Multiplexing potential [26] • Widely used molecular diagnostic format [34] 	<ul style="list-style-type: none"> • Ability to monitor the progress of PCR reaction [33] • Possibility to precisely measure the amount of amplicon at each cycle • Accurate quantification of the amount of starting material [27] • Increased dynamic range of detection [26] • Single step amplification and detection • No post-PCR manipulation required [61] 	<ul style="list-style-type: none"> • No references or standard curve [35] • More precise than real-time PCR [13,42] • Improved interlaboratory commutability [18] • Highly tolerant to inhibitors [20] • Less affected by poor amplification efficiency [56] • Better detection of low-copy-number variants [59]
Limitations	<ul style="list-style-type: none"> • Prone to inhibitors and non-target NA [27] • Poor Precision • Low sensitivity [32] • Short dynamic range <2 logs • Low resolution [34] • Not automated • Size-based discrimination only, i.e., results are not quantitative • Requires post-PCR processing 	<ul style="list-style-type: none"> • Prone to inhibitors and non-target NA [32] • Expensive detection equipment and consumables [31] • Requirement of fluorescent probe [65] • Restricted to referral laboratory with good financial support 	<ul style="list-style-type: none"> • Limited reaction mixture volume [42] • High contamination risk • More complex to perform compared to qPCR [13] • More expensive instrumentation and reagents than qPCR [13] • Smaller dynamic range [35] • Molecular dropout [13] • Lower specimen throughput [37]

ΠΛΑΤΦΟΡΜΕΣ Digital PCR

- Τελευταία >10ετία διάφορες πλατφόρμες
- Κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς
- Αντιδράσεις σε κλίμακα νάνο- και πικολίτρων
- Digital PCR: εργαλείο με τεράστια δυναμική στον τομέα της Μοριακής Διαγνωστικής

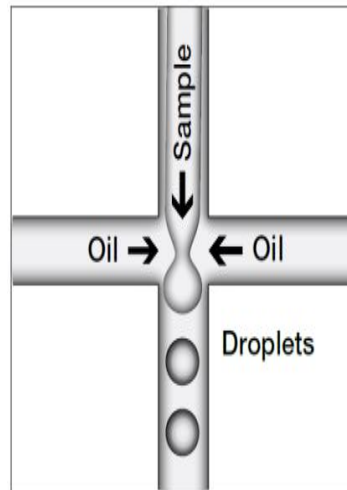
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ

- Σύστημα 2 φάσεων
- Σταγονίδια που περιβάλλονται από ένα μη αναμίξιμο έλαιο
- Όγκος της τάξεως πικολίτρων
- Αυξημένη ευαισθησία – εκατομμύρια αντιδράσεις PCR ταυτόχρονα

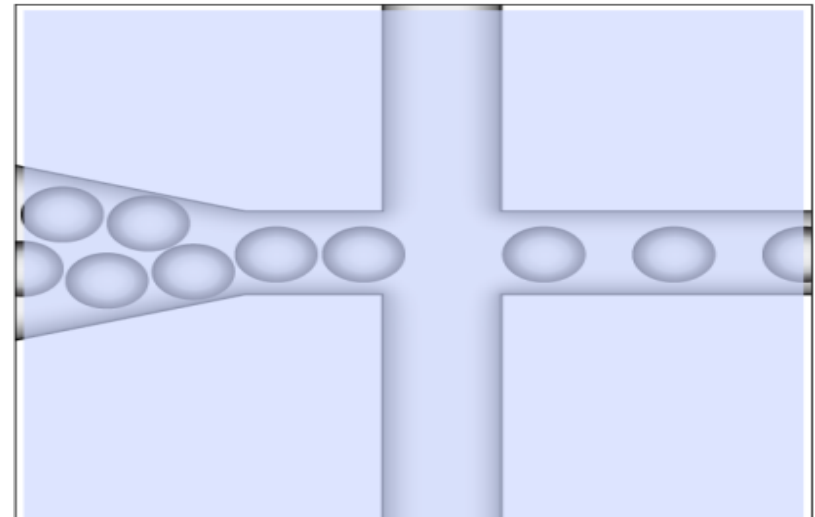


Bio-Rad - QX200™ Droplet Digital™ PCR System

1. QX Droplet Generator – παραγωγή σταγονιδίων



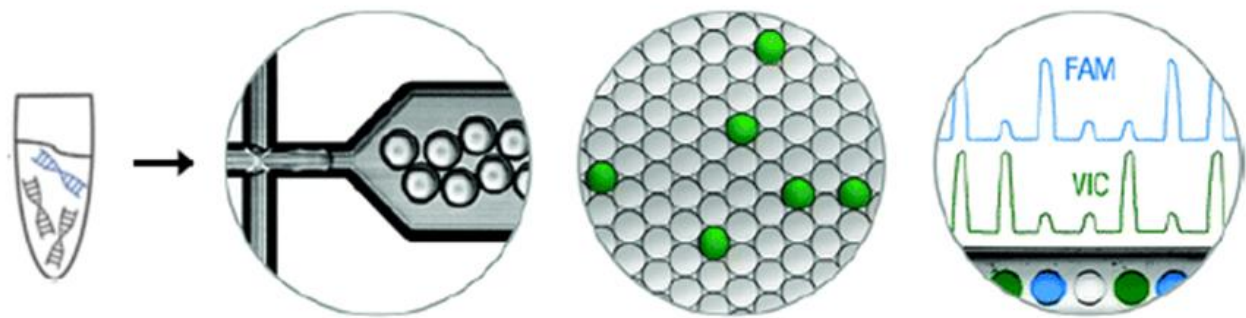
2. Κλασική PCR σε thermocycler
3. QX Droplet Reader-
Διαχωρισμός
μικροσταγονιδίων ένα προς
ένα –αυτόματη πιπέττα



Bio-Rad - QX200™ Droplet Digital™ PCR System



Droplet digital PCR



1. MAKE

Sample is partitioned into 20,000 droplets

2. CYCLE

Run PCR cycles in all droplets simultaneously

3. READ

Measure fluorescence intensity in each droplet

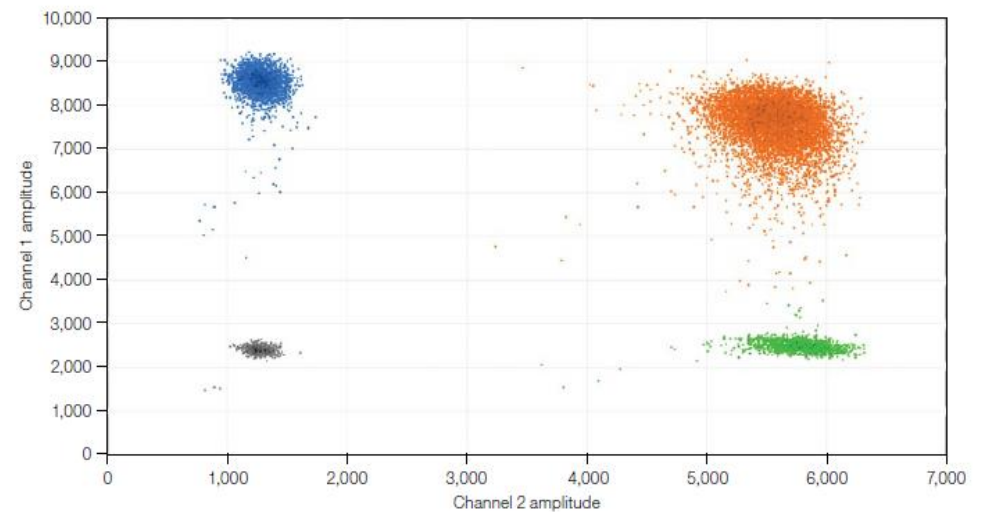
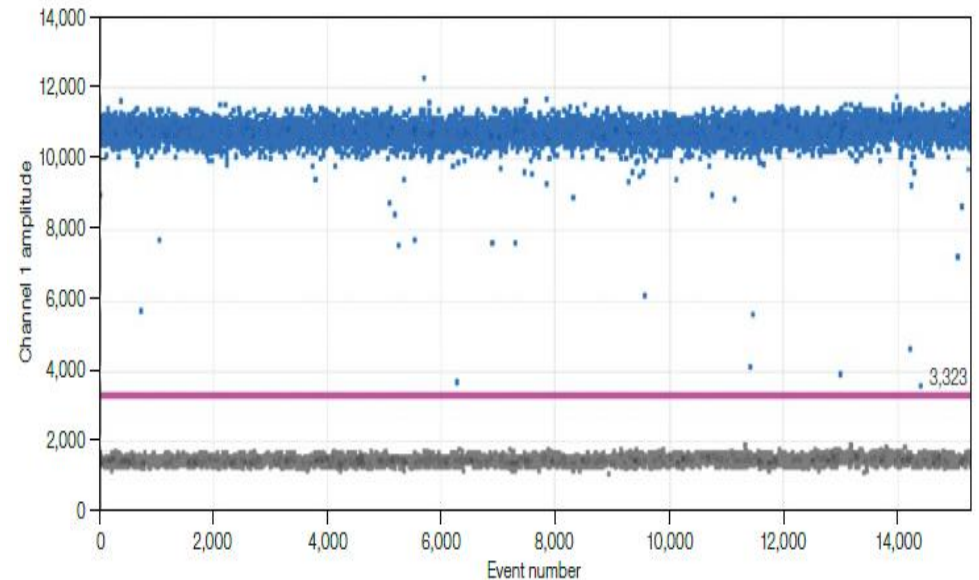
Calculate concentration from number of positive droplets



Bio-Rad QX100

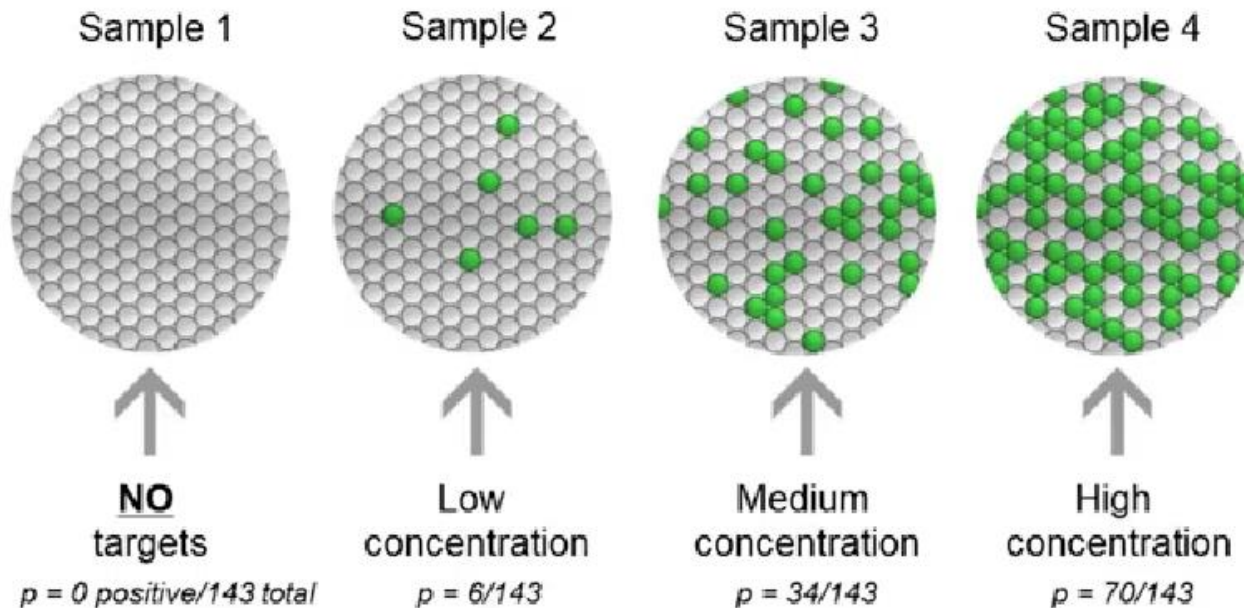
Bio-Rad - QX200™ Droplet Digital™ PCR System

4. Ανάλυση σήματος σε 1- Δ ή 2- Δ διαγράμματα
5. Poisson: αρχική συγκέντρωση σε μονάδες αντιγράφων/ μ L αρχικού δείγματος



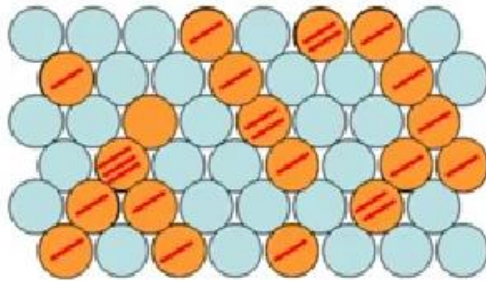
Bio-Rad - QX200™ Droplet Digital™ PCR System

Counting positive droplets → Measuring concentration



ΚΑΤΑΝΟΜΗ POISSON

Poisson correction for high occupancy



Siméon Denis Poisson
(1781-1842)

Concentration formula

$$c = -\ln\left(\frac{N_{neg}}{N}\right) / V_{droplet}$$

N_{pos} = number of positive droplets
 N_{neg} = number of negative droplets
 N = total number of droplets
 c = concentration

κατανομή Poisson βασισμένη σε δύο υποθέσεις:

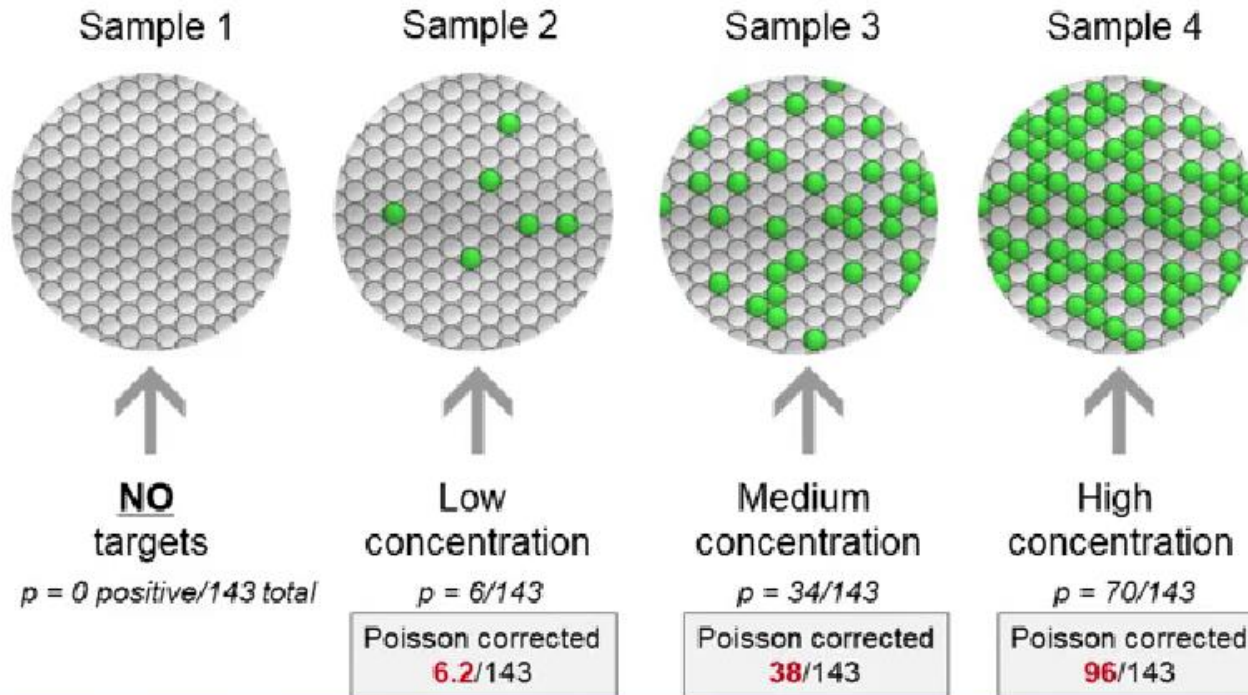
α) όλα τα partitions είναι ίδιου όγκου και

β) τα μόρια στόχοι έχουν κατανομηθεί τυχαία στα επιμέρους partitions.

➤ Αν όλα τα partitions είναι ίδιου όγκου, ο μέσος όρος των μορίων στόχων ανά partition μπορεί να εκτιμηθεί από την πιθανότητα ένα partition να είναι αρνητικό χρησιμοποιώντας το ποσοστό των αρνητικών partitions και της κατανομής Poisson

KATANOMH POISSON

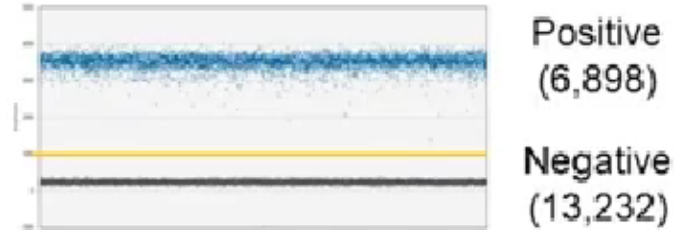
Counting positive droplets → Measuring concentration



BIO-RAD

ΑΠΟΛΥΤΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Actual number of target molecules



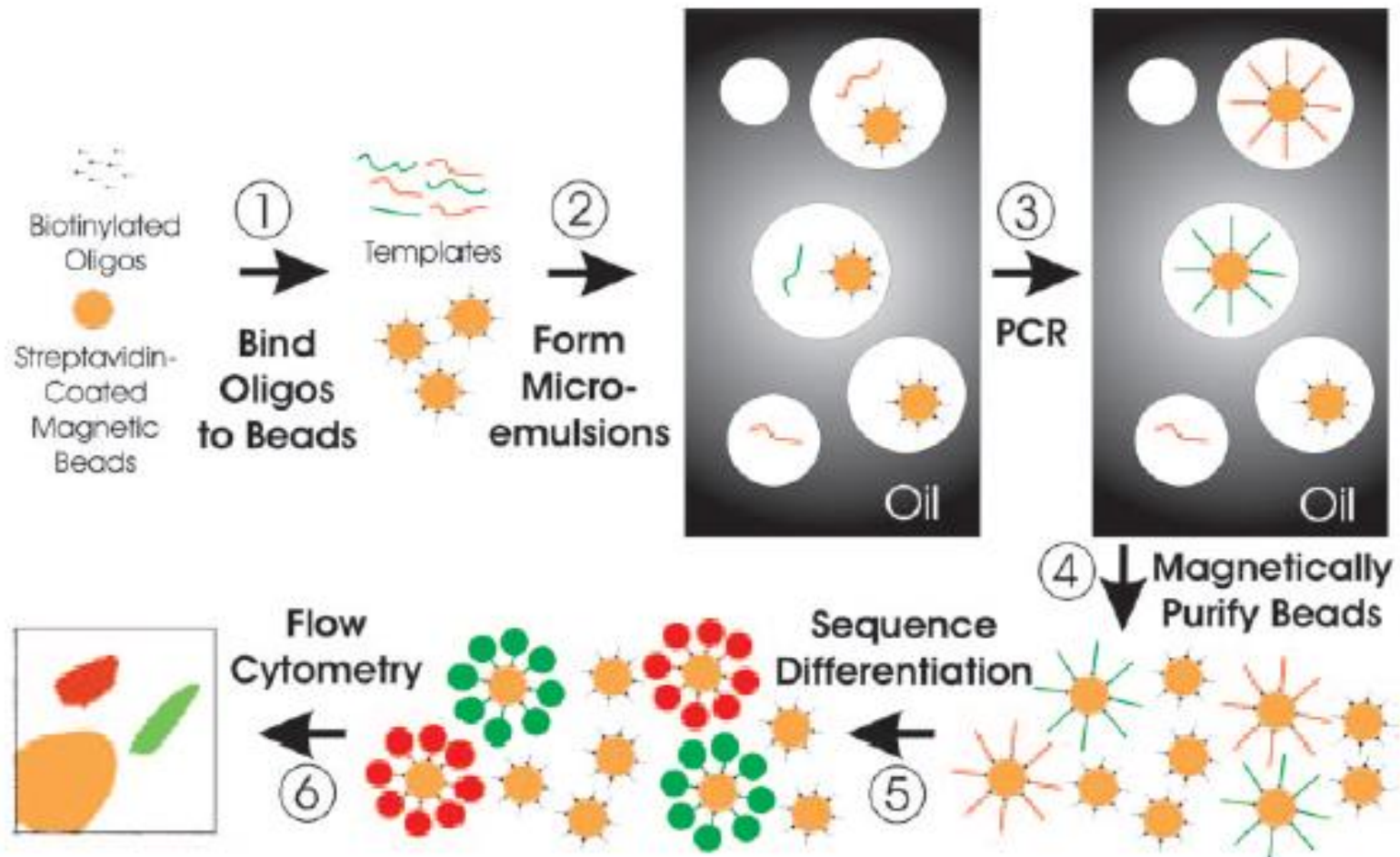
$$c = -\ln\left(\frac{N_{neg}}{N}\right) / V_{droplet}$$

$$-\ln\left(\frac{13,232}{20,130}\right) / 0.85\text{nl} = 494 \text{ copies per } \mu\text{l}$$

$$494 \text{ copies per } \mu\text{l} \times 20 \mu\text{l reaction} = 9,880 \text{ copies}$$

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ “BEAMing”

- Kinzler και Vogelstein , 2003
- BEAMing → **B**eads – **E**mulsion - **A**mplification – **M**agnetics
- Πλατφόρμα της Sysmex- έως 300 εκατ. προϊόντα PCR



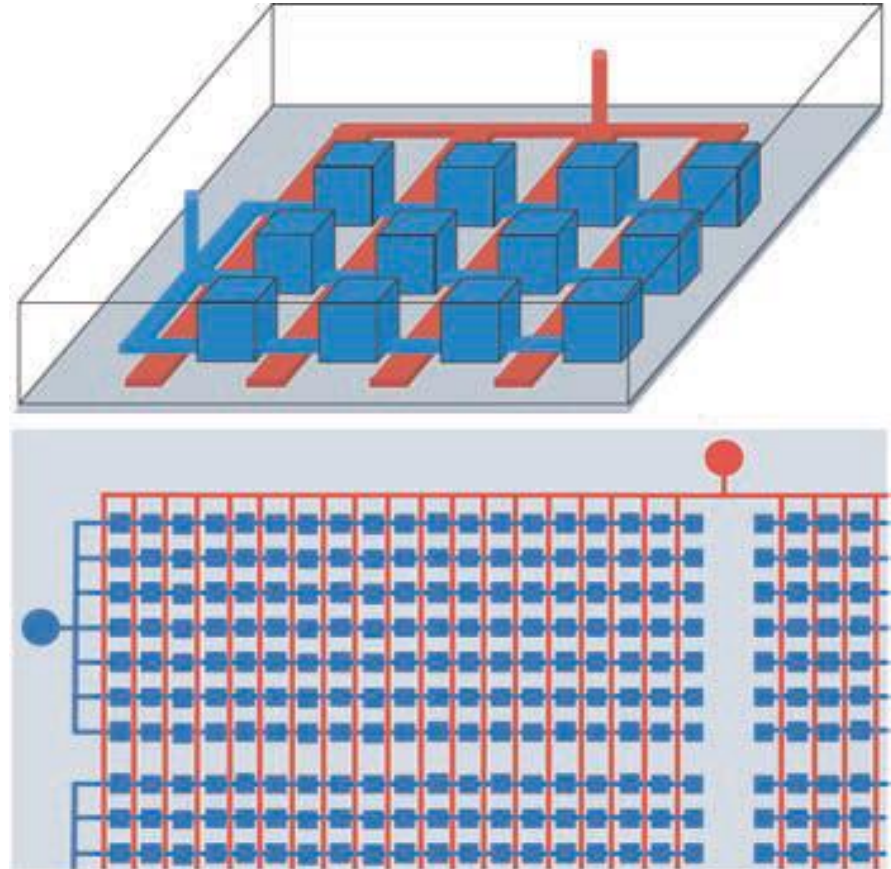
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ “BEAMing”

ΣΤΑΔΙΑ BEAMing

- 1) Παραμαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με μόρια στρεπταβιδίνης, παρουσία ολιγονουκλεοτιδίων ενώνονται στο 5' άκρο μέσω του συστήματος γέφυρας βιοτίνης-στρεπταβιδίνης
- 2) Ετοιμάζονται τα μικροσκοπικά γαλακτώματα νερού -σε –λάδι που περιέχουν τα μαγνητικά σφαιρίδια και ποσότητα από το DNA εκμαγείο
- 3) Ακολουθούν κύκλοι PCR ,κατά τη γνωστή διαδικασία, και η ενίσχυση του δείγματος λαμβάνει χώρα εντός των σταγονιδίων
- 4) Έπειτα, τα μικροσταγονίδια διασπώνται ώστε να ελευθερωθούν και να απομονωθούν τα μαγνητικά σφαιρίδια
- 5) Χρησιμοποιώντας δύο φθορίζοντες ανιχνευτές, επισημαίνονται τα δύο αλληλία και
- 6) Τέλος, τα επισημασμένα μαγνητικά σφαιρίδια περνούν από το κυταρρόμετρο ροής για να ποσοτικοποιηθούν τα μόρια-στόχοι

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΡΡΕΥΣΤΟΝΙΚΗΣ - microfluidics

- Τσιπ με παράλληλα φρεάτια επικοινωνούν
- Βαλβίδες και αντλίες απομονώνουν τα φρεάτια χωρίζοντας το δείγμα
- Ξεχωριστοί θάλαμοι αντίδρασης



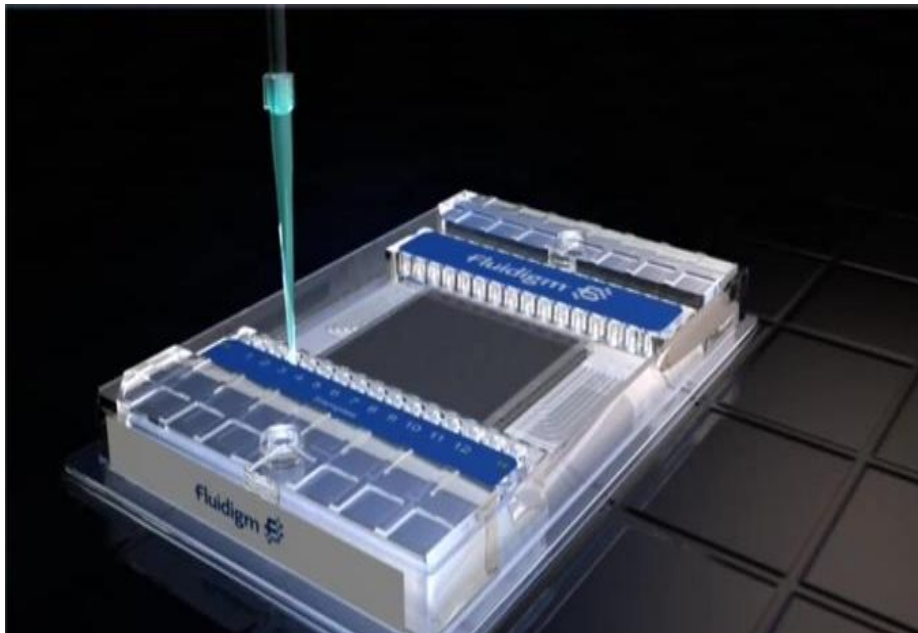
Fluidigm -BioMark™ HD system



- **2006-η πρώτη εταιρεία με σύστημα dPCR**
- **Παρακολουθεί την πορεία της αντίδρασης**
- **Και τελικού σημείου αποτελέσματα**

Fluidigm -BioMark™ HD system

- Τσιπ 12 ή 48 θέσεων για δείγματα – 765 ή 770 φρεάτια αντίστοιχα

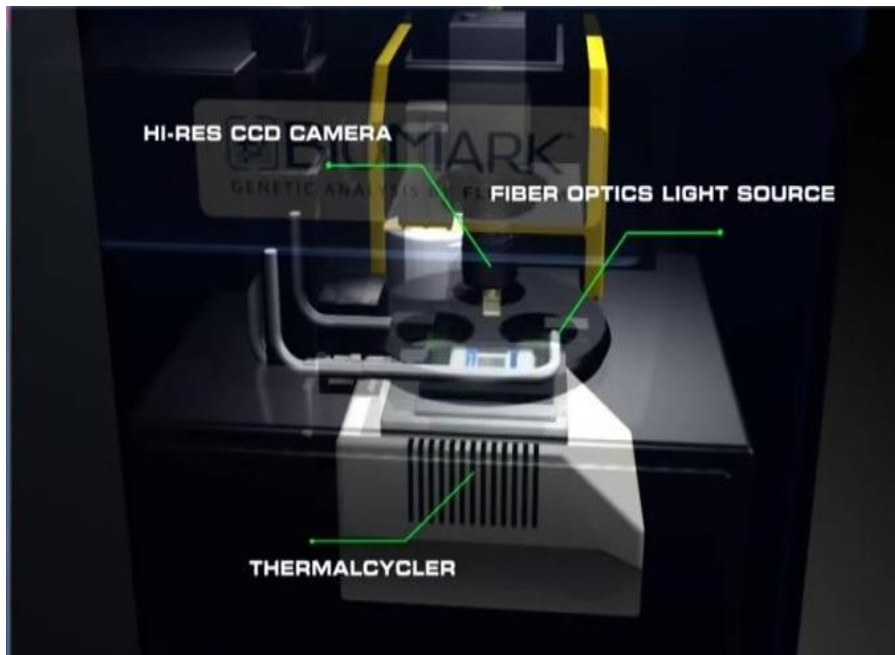


- Τοποθετείται στο IFC Controller για διαχωρισμό κάθε δείγματος

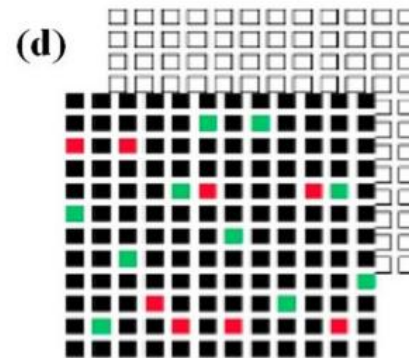
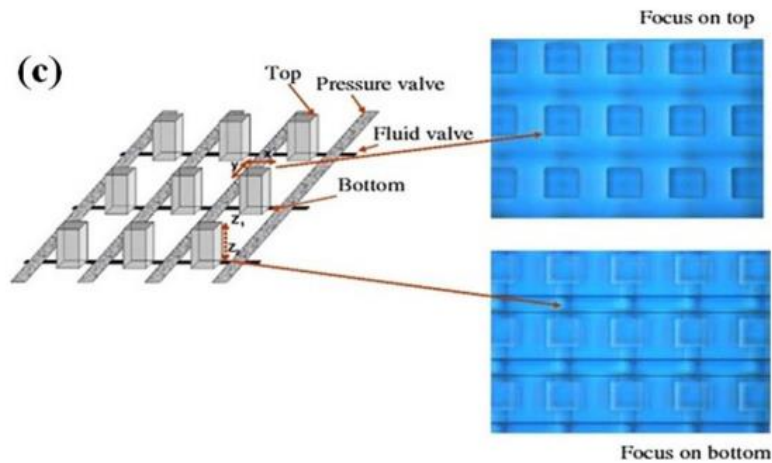
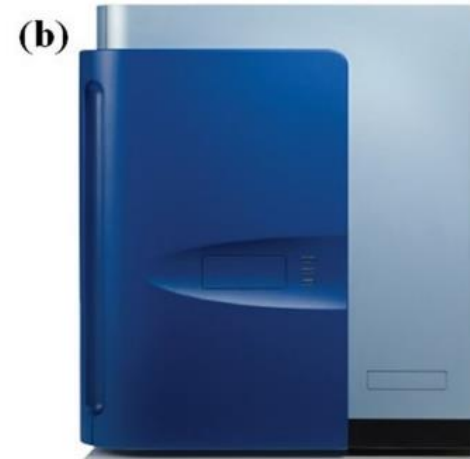
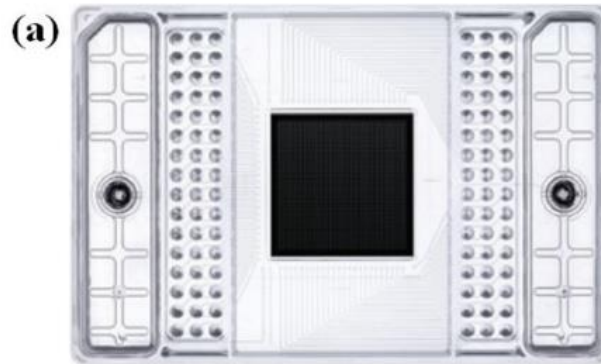


Fluidigm -BioMark™ HD system

- Το ίδιο τσιπ στο BioMark HD για κλασική PCR και ανάγνωση σημάτων φθορισμού



Fluidigm -BioMark™ HD system



Life Technologies

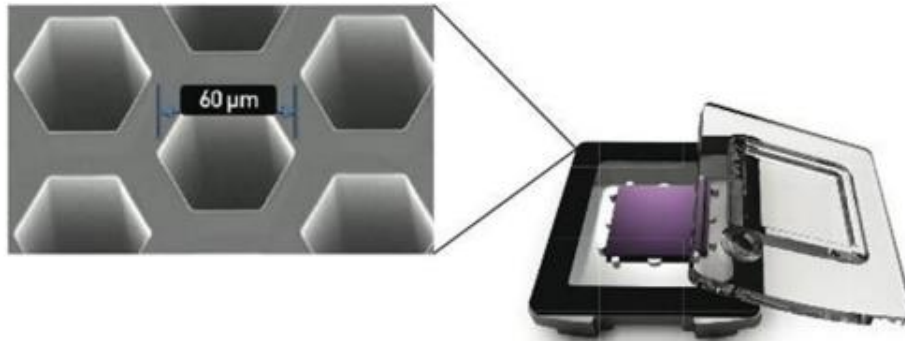
QuantStudio® 3D Digital PCR System

- 2009- δύο συστήματα:
Open Array και Quant Studio 12K Flex
- τσιπ μεγέθους πλακιδίων μικροσκοπίου με 3.072 οπές
- Συγκρατείται το δείγμα λόγω επιφανειακής τάσης-επικαλυμμένη με μια υδροφοβική και μια υδροφιλική επιφάνεια
- 2013- QuantStudio 3D- πιο εξελιγμένη μορφή
- τσιπ νανορρευστονικής
- Σε 20.000 ανεξάρτητες αντιδράσεις



Life Technologies QuantStudio® 3D Digital PCR System

(a)



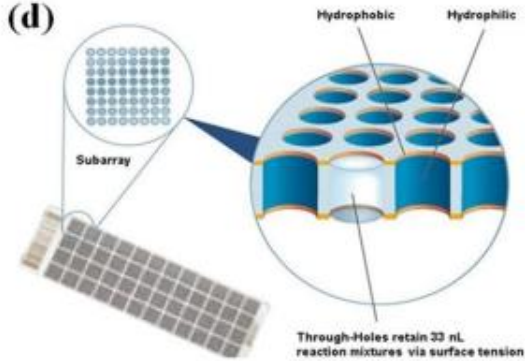
(b)



(c)

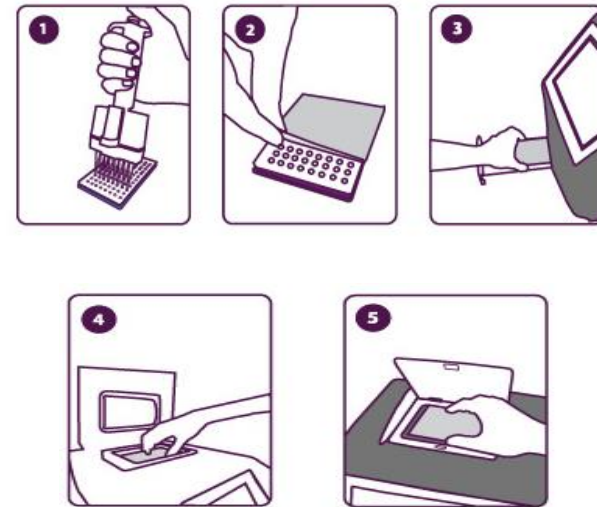


(d)

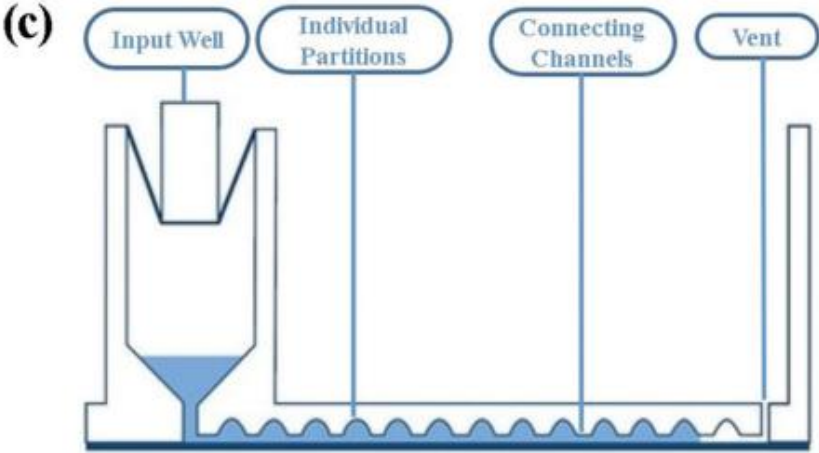
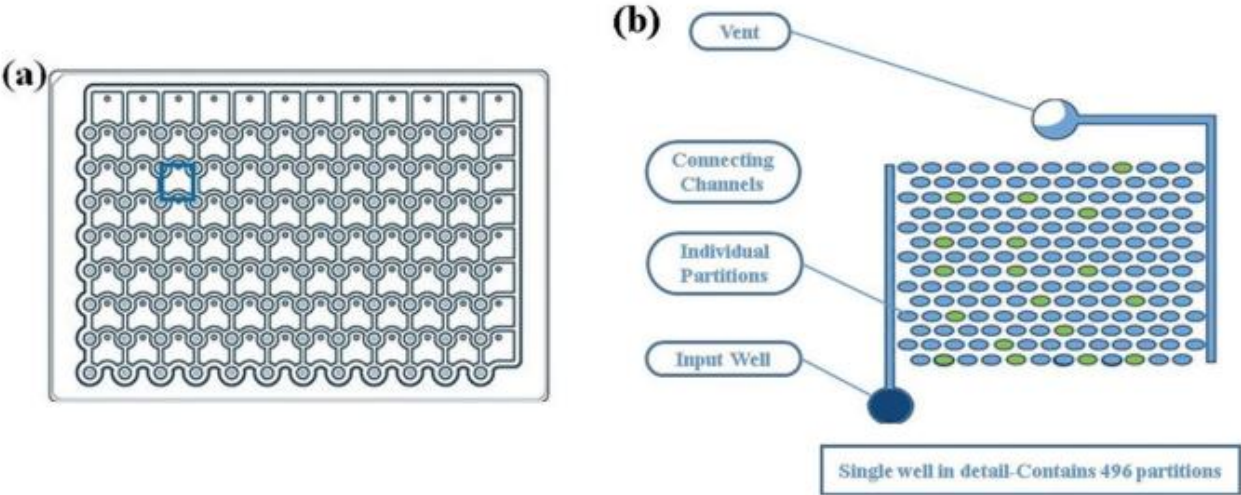


Formulatrix - Constellation Digital PCR

- 2014- φθηνή πλατφόρμα- υψηλής απόδοσης
- 96 κυψελίδια-498 μέρη



Formulatrix - Constellation Digital PCR



RainDance Technologies- RainDrop® Digital PCR System

- > 1 δισεκατομμύριο αντιδράσεις/ ημέρα
- Αυξημένη ευαισθησία
- Απόλυτη ποσοτικοποίηση



- 2 όργανα με τα αντίστοιχα τσιπ:

1. RainDrop Source- παράγει μικροσταγονίδια (έως 10 εκατ./ πικολίτρων)

2. RainDrop Sense- ταυτοποιεί και ποσοτικοποιεί κάθε μικροσταγονίδιο

RainDance Technologies- RainDrop® Digital PCR System



Source chip

**8 υποδοχείς δειγμάτων και είναι
ικανό να παράγει 5 εκατομμύρια
σταγονίδια το λεπτό**



Sense chip

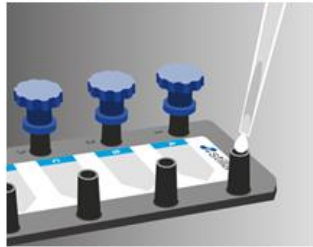
**από ανθεκτικά μικροσκοπικά
ακροφύσια (nozzles) που
ευθυγραμμίζονται αυτόματα και
ξεχωρίζουν τα σταγονίδια ένα προς
ένα ώστε να ταυτοποιηθούν και να
μετρηθούν**

RainDance Technologies- RainDrop® Digital PCR System



CRYSTAL DIGITAL PCR (naica system, Stilla Technologies)

α) Sapphire chip



Load of samples



β) Geode



- Partitioning (up to 30,000 droplets)
- Amplification



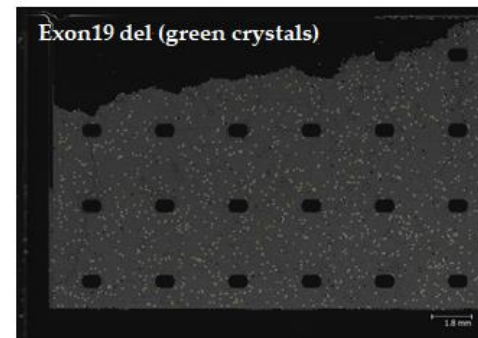
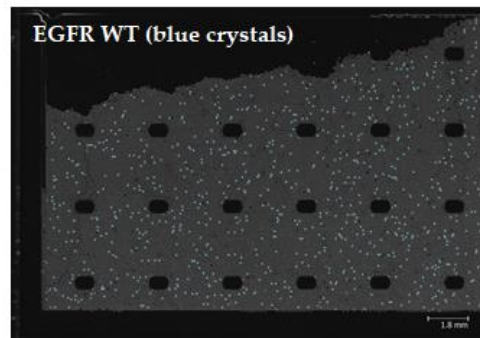
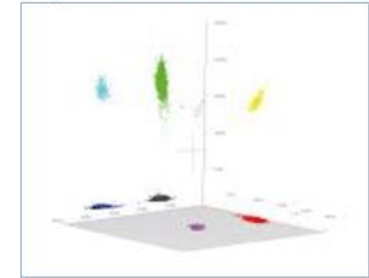
γ) Prism 3



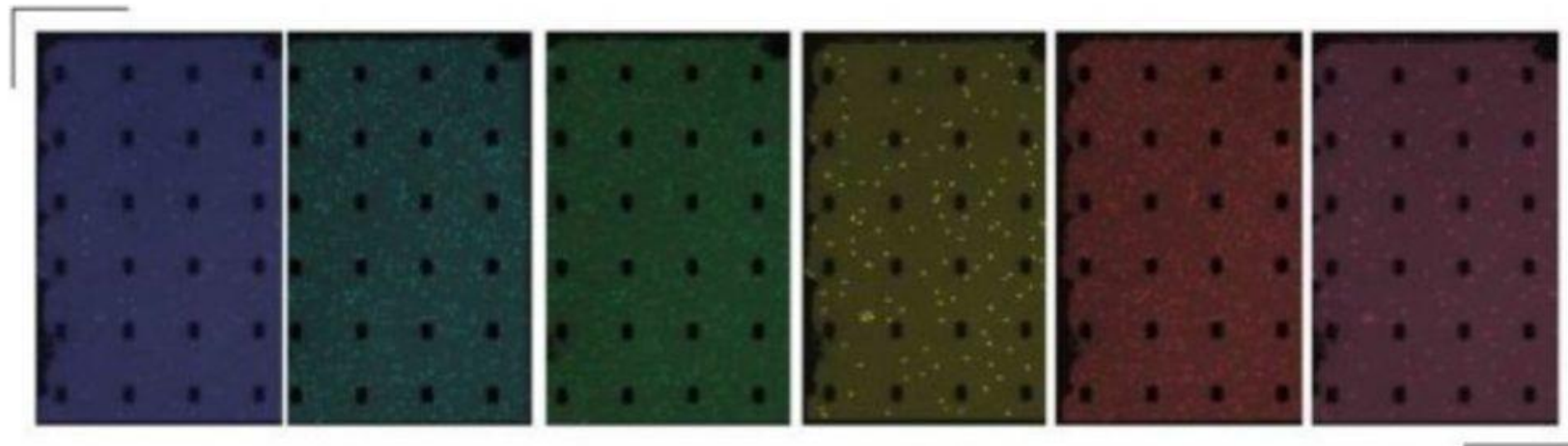
Reading Chips by using 3 channels (FAM, HEX, Cy5)



Crystal Miner software



The naica® system - Multiplex Crystal Digital PCR™ (Stilla Technologies)



FAM

YY®

Atto 550

ROX

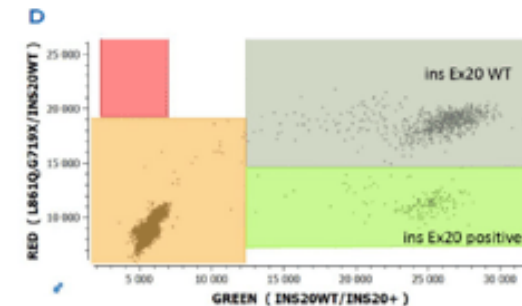
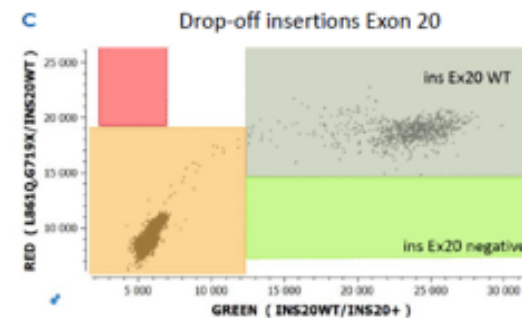
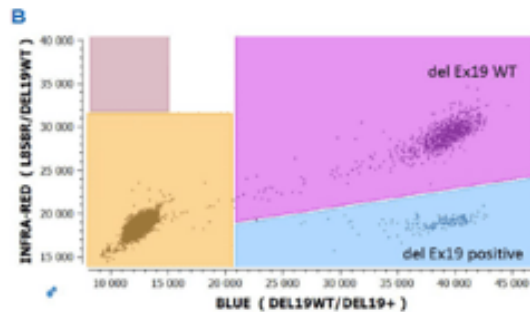
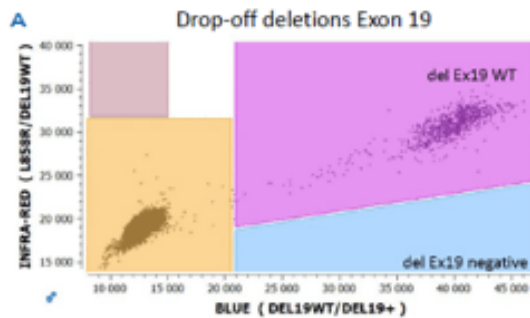
Cy®5

Atto 700

The Nio+ system (Stilla Technologies)



- 7 colors
- Automation-friendly
- Capacity of over 768
- Continuous loading
- Dual Thermocyclers



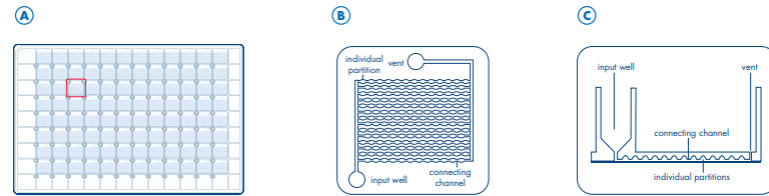
Qiagen - QIAcuity® Digital PCR System

5-plex



No droplets. No chips. No crystals.
Digital PCR in nanoplates.

The QIAcuity Digital PCR System uses a microfluidic nanoplate technology to overcome challenges with inconsistent droplet generation, complex workflow, slow droplet readout, and limitations concerning the uncertainty of assays.



A Nanoplate with 96 wells B Single well detail C Cross section view of the partitions

The Magic is Inside

It's in the seamless integration of all digital PCR (dPCR) workflow components into an all-in-one walkaway instrument, delivering the speed and throughput every laboratory needs.

It's in the microfluidic nanoplate technology that puts every run ahead of the curve with its precision and sensitivity.



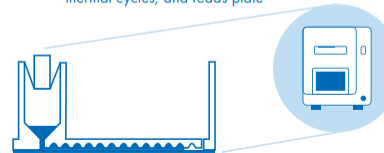
1 Pipette reaction mixtures to dPCR plate



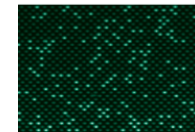
2 Apply rubber plate seal to dPCR plate and place in instrument



3 Instrument automatically partitions, thermal cycles, and reads plate



4 Analyze results



Τσιπ

- Ανάλυση σε πραγματικό χρόνο ή στο τελικό σημείο
- Παράλληλη ανάλυση πολλών δειγμάτων
- Αυτοματοποίηση πειραμάτων
- Στενότερο δυναμικό εύρος- μερικές χιλιάδες χωρίσματα

dPCR σε γαλάκτωμα ή σταγονίδια

- Σε περισσότερα μέρη
- Χαμηλότερο κόστος
- Αυξημένο δυναμικό εύρος- ανάλυση μεγαλύτερου φάσματος συγκεντρώσεων
- Συλλογή δεδομένων τελικού σημείου σε 1-Δ ή 2-Δ διαγράμματα ανάλογα της έντασης φθορισμού

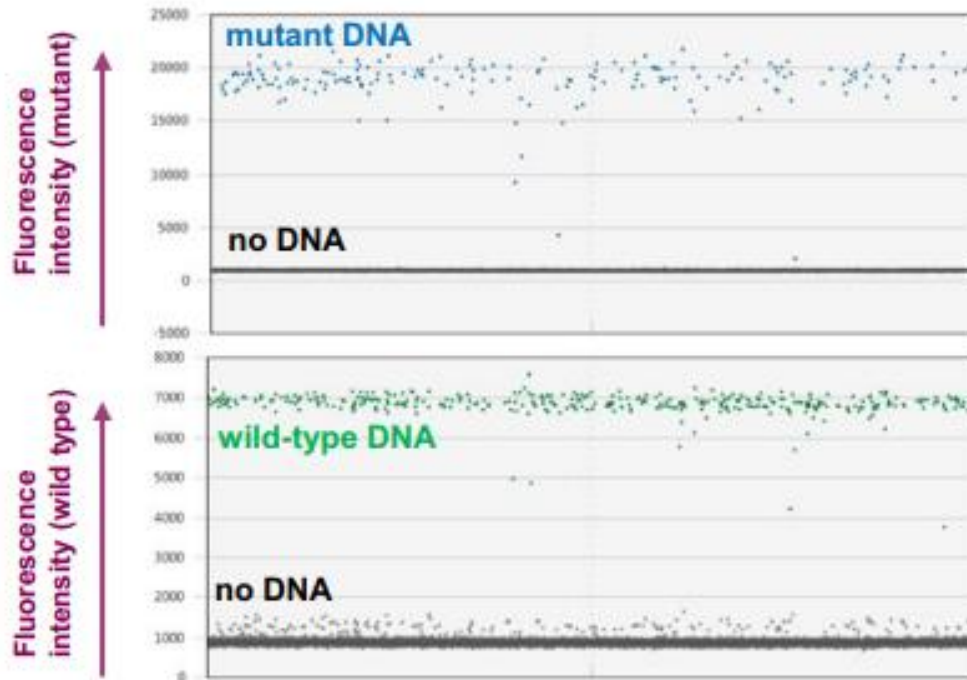
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ddPCR

Table 2. Comparison of dPCR platforms based on performance.

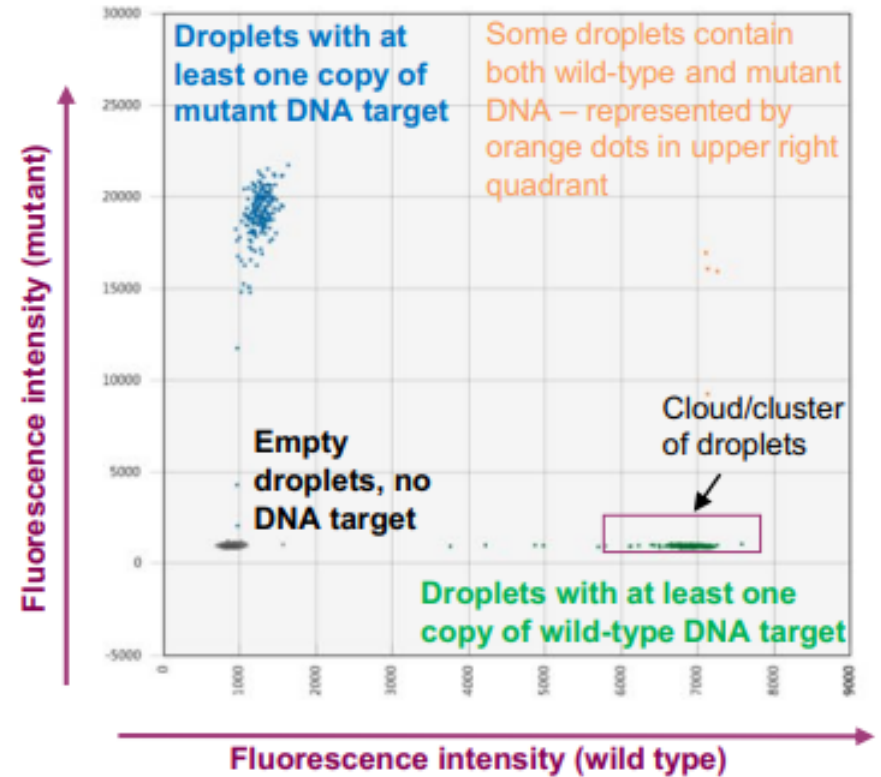
Category	Chamber dPCR (cdPCR)						Droplet dPCR (ddPCR)		
	BioMark	Quant Studio 3D	Quant Studio 12K Flex	Constellation/QIAcuity	Clarity/Clarity Plus	Optolane	QX200/QXONE	RainDrop	Naica
dPCR platforms	BioMark	Quant Studio 3D	Quant Studio 12K Flex	Constellation/QIAcuity	Clarity/Clarity Plus	Optolane	QX200/QXONE	RainDrop	Naica
Partition number per sample	765 (12-inlet chip) or 770 (48-inlet chip)	20 000	In multiples of 64	8000 (Standard) or 36 000 (High dynamic range)	80 000–32 000	9–22 000	20 000	5×10^6 – 10×10^6	25 000–30 000
Partition volume	6 nL (12-inlet), 0.85 nL (48-inlet)	0.865 nL	33 nL	0.34 nL	1.5 nL	1.5 nL	0.85 nL	5 pL	0.43 nL
Total reaction volume (μl)	4–8	14.5	2.2	10	15	30	20	25–50	20
Dynamic range	6 logs (HD)	5 logs	Up to 7 logs with OpenArray qPCR	10–50 000 copies/μl	4 logs	NA	1–120 000 copies/20 μl	6 logs	0.2–20 000 copies/μl
Samples per run	12 or 48	24	48 samples per plate. Up to 3 plates per run.	96 or 24 per plate. Up to 8 plates per run.	32	NA	8 or 96 and 480 samples per run in QXONE	8	12
Through-put time (h)	~4	~3	~4	~2	~3	~1	~5.5	~7–8	~2.5
qPCR capacity	Yes (HD), no (EP1)	No	Yes	No	No	Yes	No	No	No
Sample recovery	No	No	No	No	No	Yes	Yes (if not read for fluorescence)	Yes	Yes
Multiplex capability	3 colors	2 colors	2 colors	5 colors	4–6 colors	2 colors	2 colors and 4 colors in QXONE up to 10-plex for amplitude-based method	2 colors, up to 10-plex for amplitude-based method	3 colors
Dyes	FAM/EvaGreen, HEX/VIC, ROX	FAM/SYBR, VIC, ROX	FAM/SYBR, VIC/JOE/TET/HEX, NED/TAMRA, ROX, LIZ	FAM/EvaGreen, VIC, ROX, NED, Cy5	FAM/SYBR/EvaGreen, VIC/HEX	FAM and FRET FAM/Cy5	FAM/EvaGreen, VIC/HEX and FAM, HEX(VIC), Cy5, Cy5.5 in QXONE	FAM, VIC	FAM, Cy3/VIC/HEX, Cy5
Master Mix	Open	Proprietary	Proprietary	Open	Open	Proprietary	Proprietary	Open	Proprietary

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ 1-D & 2-D ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ddPCR

a. 1D plot



b. 2D plot

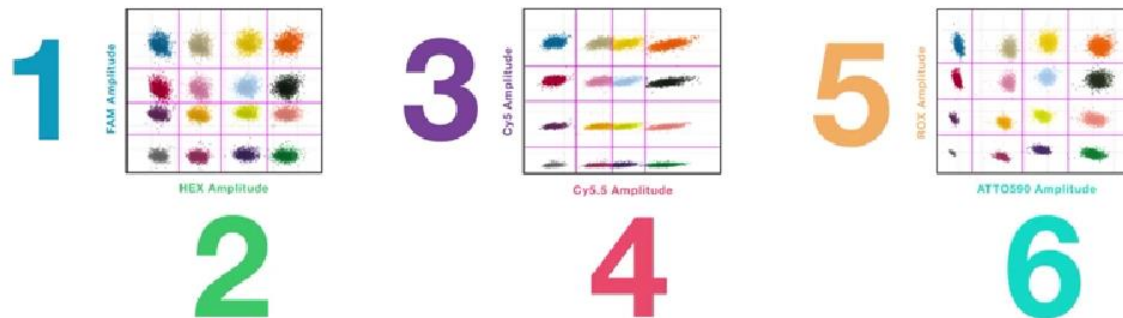


Δυνατότητες βελτίωσης τεχνολογίας Digital PCR

- Ανάπτυξη νέας γενιάς οργάνων:
 - Φθηνότερων
 - Ταχύτερων
 - Περισσότερο εύχρηστων

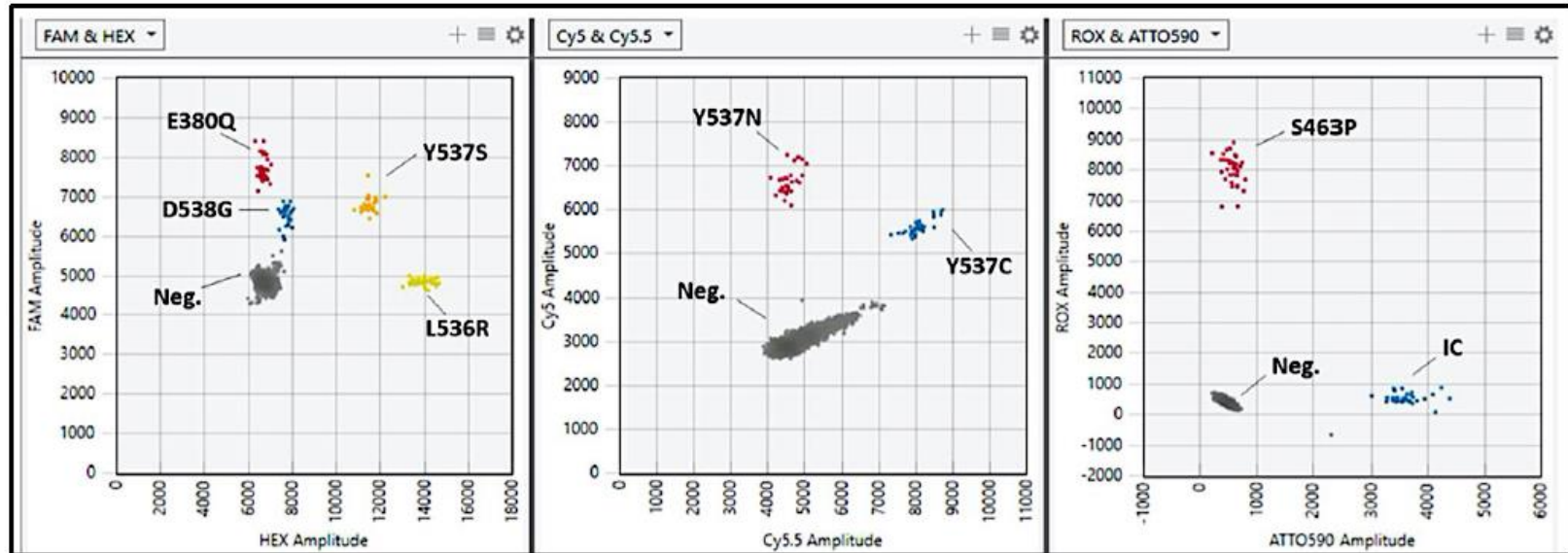
Δυνατότητα πολυπαραμετρικών αναλύσεων με εφαρμογές πρωτοκόλλων πολλαπλής PCR

6-Color Multiplexing



6-plex assay with QX600 ddPCR (BioRad)

A



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ DIGITAL PCR στον καρκίνο

- **COPY NUMBER VARIATION, (CNV)**
- **Ανίχνευση μεταλλάξεων**
- **Γονιδιακή έκφραση**
- **Ανίχνευση miRNAs**
- **Επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης: μεθυλίωση DNA**
- **Υγρή βιοψία: αναλύσεις σε πλάσμα cfDNA, ή CTCs**
- **ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΠΑΝΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ: μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του ογκογονιδίου KRAS, ανίχνευση μεταλλάξεων του EGFR σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων στο πλάσμα (υγρή βιοψία)**

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ DIGITAL PCR στην ανίχνευση παθογόνων

- **Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ιικών φορτίων**
- **Ανίχνευση του παθογόνου πριν και μετά από αλλογενή μεταμόσχευση**
- **Μελέτη και παρακολούθηση ασθενών θετικών σε HIV, HCV, HPV, etc**
- **Μελέτη μηχανισμών ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένες θεραπείες**
- **Ανίχνευση ιών σε δείγματα λυμάτων**

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ DIGITAL PCR στην ανάλυση τροφίμων

- **ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ**

a) Παθογόνα στα τρόφιμα

b) Έλεγχος γενετικά τροποποιημένων οργανισμών **GMOs**, ανάλυση τροφίμων