



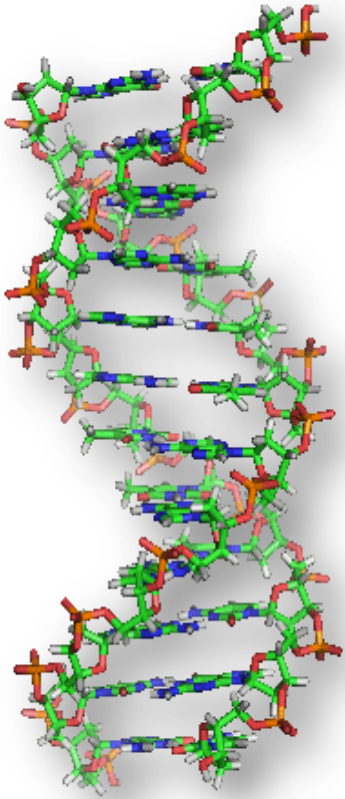
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Αθηνά Μάρκου

Επικ. Καθ. Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας

atmarkou@chem.uoa.gr

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.



1866



- Publishes his work on the patterns of inheritance in pea plant.
- Discovers the basic principles of genetics

Gregor Mendel

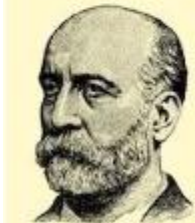


1869



- Identifies 'Nuclein' in nuclei of human white blood cells, which we know today as deoxyribonucleic acid (DNA)

Friedrich Miescher



1944

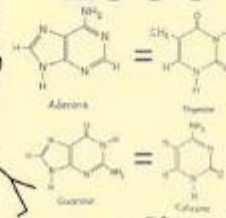


- Identifies DNA as the transforming principle

Oswald Avery



1950



Erwin Chargaff

- Discovers that DNA composition is species specific



1962

- first person to sequence the bases in each codon



Marshall Nirenberg

1953

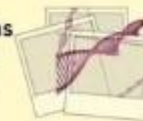
- Discover the double helix structure of DNA



Watson and Crick

1952

- Photographs crystallized DNA fibres



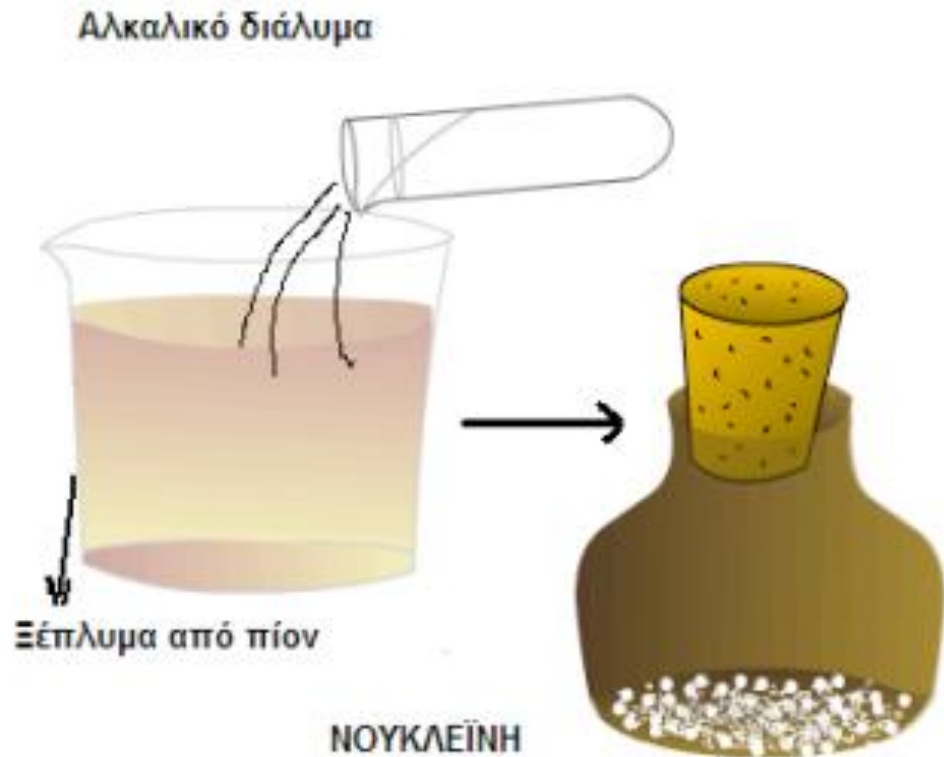
Rosalind Franklin

ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ DNA

Χρησιμοποίησε ένα διάλυμα από άλας για να ξεπλύνει γάζες γεμάτες με πύον. Όταν πρόσθεσε αλκαλικό διάλυμα στα κύτταρα, αυτά λύθηκαν και οι πυρήνες τους σχημάτησαν ένα ίζημα που το ονόμασε νουκλεΐνη.



FRIDRICH MIESCHNER (1869-)



- ❑ Το 1889 ένας μαθητής του, ο Richard Altmann, μας έδωσε τον σύγχρονο όρο για τη νουκλεΐνη: νουκλεϊνικό οξύ

Ανακάλυψη της δομής του DNA

Το μοντέλο του DNA των J. D. Watson και F.C. Crick

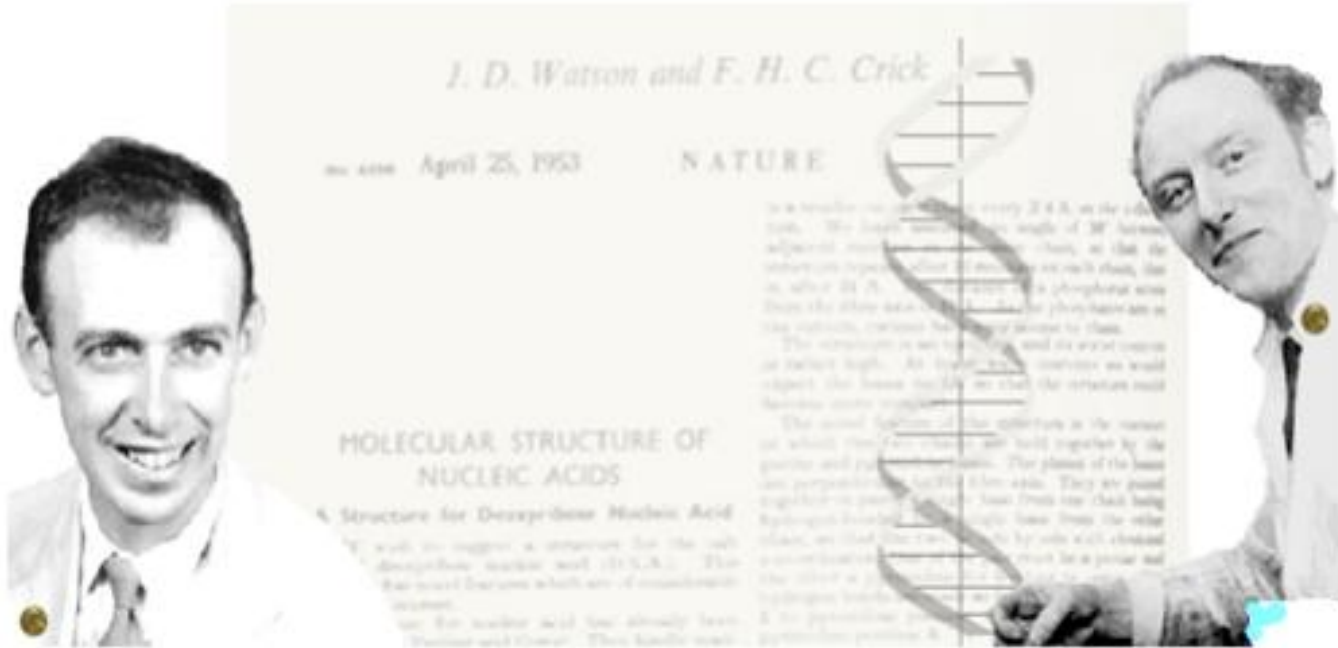
1953: δύο ερευνητές από το πανεπιστήμιο του Καίμπριτζ στην Αγγλία, ο J. D. Watson (αμερικανός) και ο F.C. Crick, δημοσιεύουν το πρώτο ακριβές μοντέλο για τη δομή του DNA.

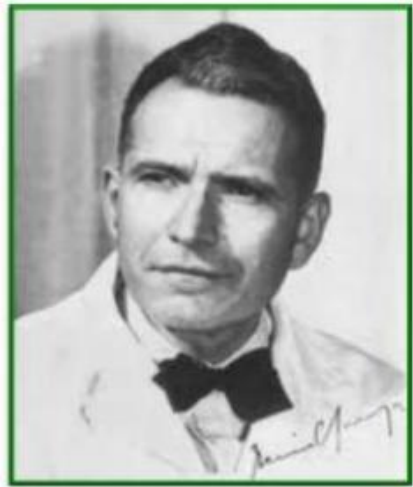
Για να φτάσουν έως εκεί, βοηθήθηκαν πολύ από τρία γεγονότα (ανακαλύψεις):

1. Τα ευρήματα του Chargaff.
2. Τα ευρήματα από την κρυσταλλογραφία με ακτίνες-X (Maurice Wilkins, Rosalind Franklin).
3. Την ανακάλυψη της α- έλικας σε μόρια πρωτεϊνών.

Ανακάλυψη της δομής του DNA

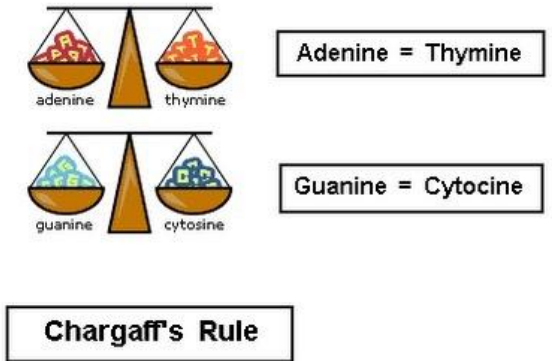
Το 1953 οι J. D. Watson και F.C. Crick δημοσίευσαν το πρώτο ακριβές μοντέλο για τη δομή του DNA





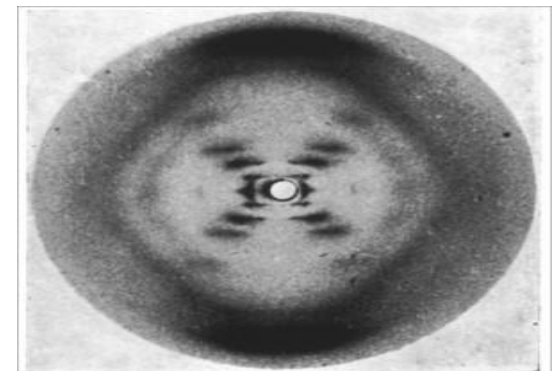
Τα ευρήματα του Chargaff:

Η αναλογία της αδενίνης ήταν πάντα παρόμοια με εκείνη της θυμίνης και εκείνη της γουανίνης ήταν όμοια με την κυτοσίνη. Επομένως, ήταν φανερό, πως όση αδενίνη έχει ένα κύτταρο τόση είναι και η θυμίνη του και όση γουανίνη τόση και η κυτοσίνη του.



Τα ευρήματα της R. Franklin:

Κρυσταλλογραφία με τη βοήθεια ακτίνων-X: Με τη βοήθεια της τεχνικής αυτής φάνηκε πως το μόριο του DNA έχει μια διάμετρο γύρω στα $20 \text{ \AA}$. Αυτό σημαίνει πως είναι μια αλυσίδα (έλικα) που έχει διάμετρο μεγαλύτερη από ένα μονό πολυνουκλεοτίδιο (μονή αλυσίδα). Δηλαδή, πως ταιριάζει καλύτερα με μια διπλή έλικα



Chargaff's Rule

Percentages of Bases in Four Organisms				
Source of DNA	A	T	G	C
<i>Streptococcus</i>	29.8	31.6	20.5	18.0
Yeast	31.3	32.9	18.7	17.1
Herring	27.8	27.5	22.2	22.6
Human	30.9	29.4	19.9	19.8

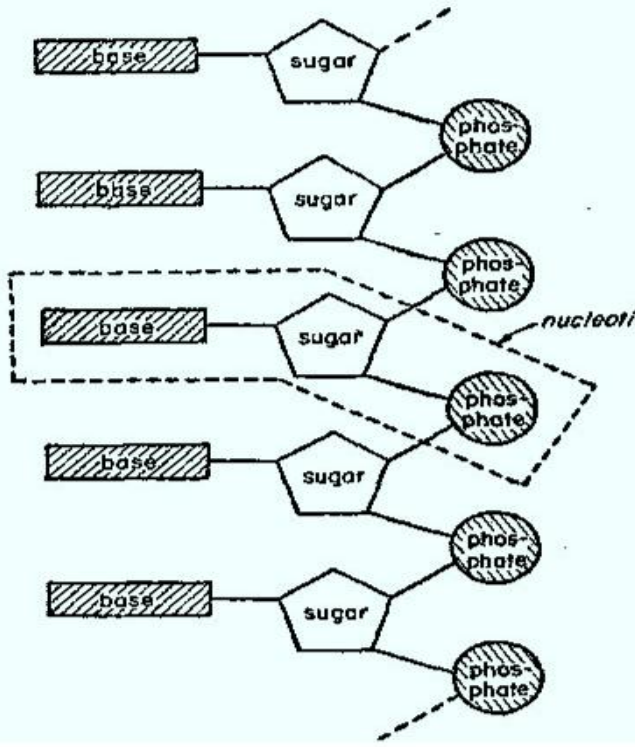
Chargaff's Rules Erwin Chargaff showed that the percentages of guanine and cytosine in DNA are almost equal. The same is true for adenine and thymine.

Why is this significant?

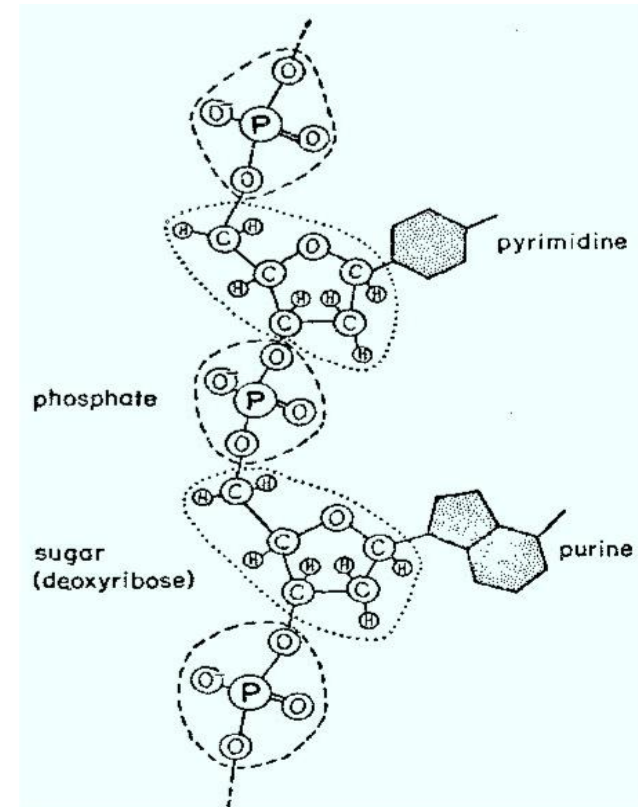
The percentage of adenine and thymine are almost equal. The percentage of guanine and cytosine in DNA are almost equal.

$$\begin{aligned} &\longrightarrow \mathbf{A = T} \\ &\mathbf{C = G} \end{aligned}$$

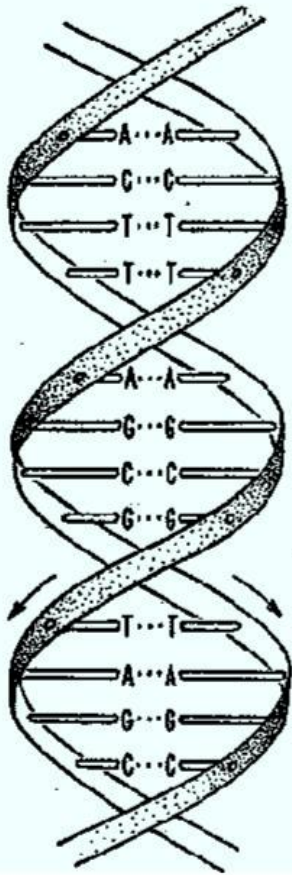
Μια πρώτη άποψη της δομής του DNA



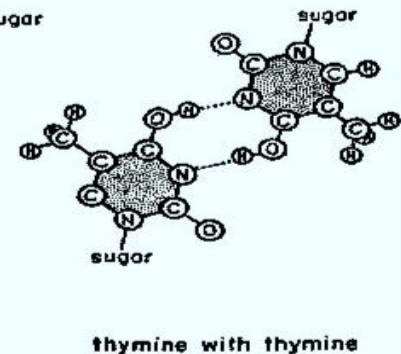
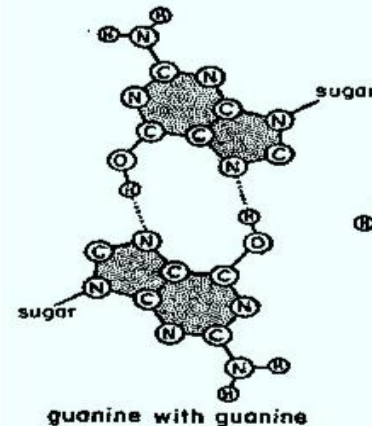
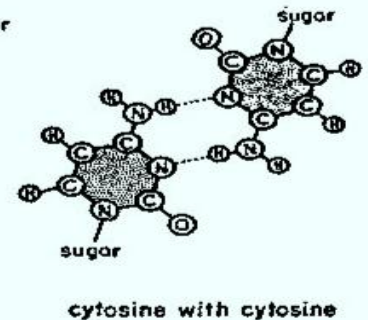
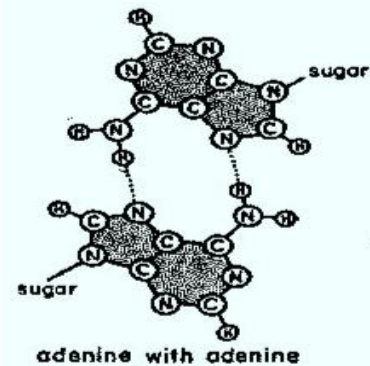
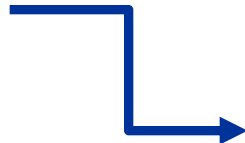
Η ομάδα του Alexander Todd, ως οργανικοί χημικοί, ενδιαφερόταν μόνο για τον τρόπο σύνδεσης των μορίων και έτσι το 1951 φαντάζονταν ότι τα νουκλεοτίδια συνδέονται με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και άφηναν την τρισδιάστατη δομή του DNA στα χέρια των κρυσταλλογράφων



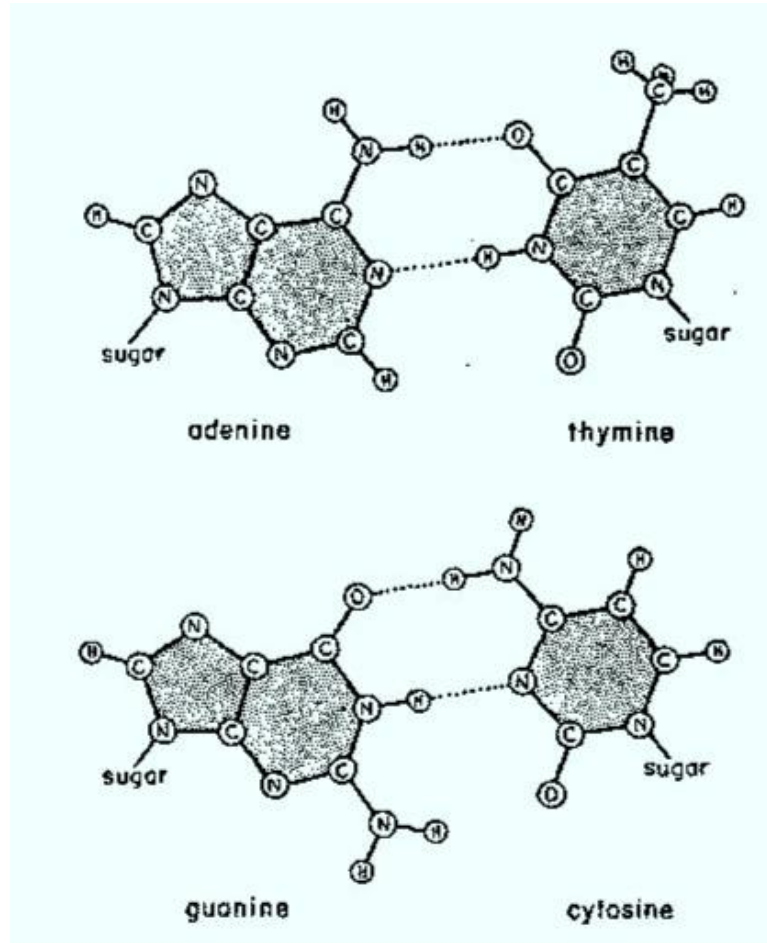
Μια πρώτη και λανθασμένη προσέγγιση του
Watson για τον τρόπο σύνδεσης των βάσεων στην
διπλή έλικα του DNA



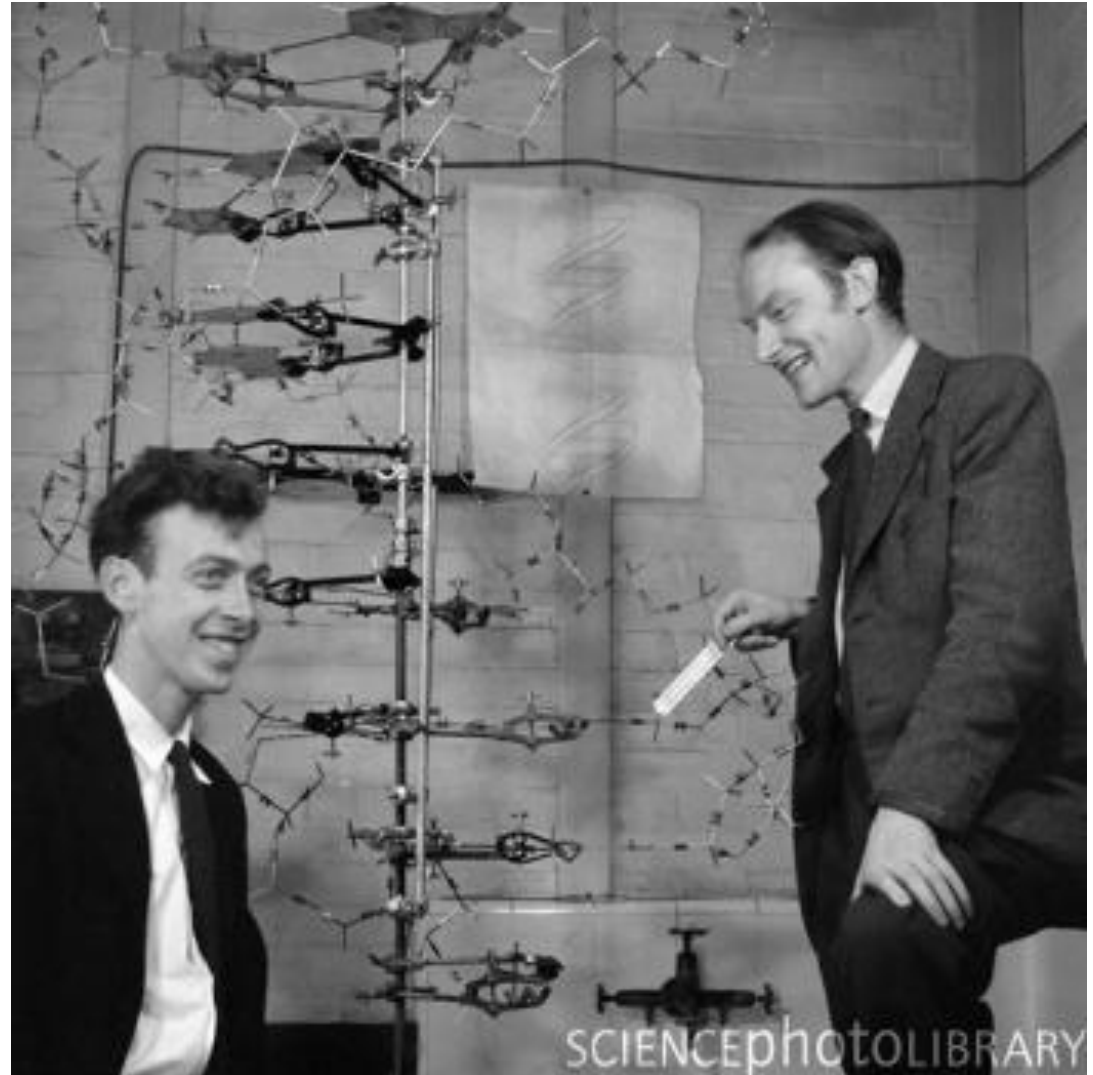
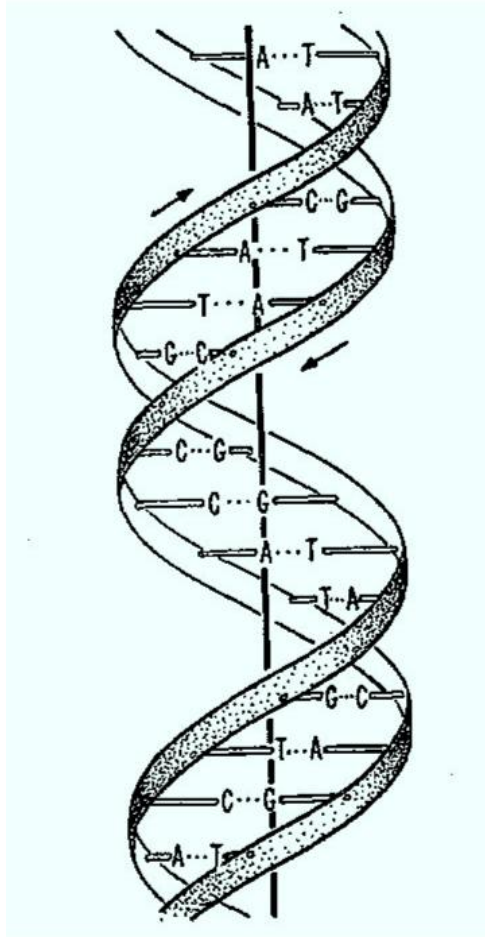
Τρόπος σύνδεσης των αζωτούχων βάσεων με
τον εαυτό τους σύμφωνα με την πρώτη
προσέγγιση του Watson.



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



Οριστική και επιβεβαιωμένη δομή του DNA



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.

¹ Young, F. B., Ottens, H., and Jevons, W., *Phil. Mag.*, **40**, 149 (1920).

² Langlet-Higgins, M. S., *Mon. Not. Roy. Astr. Soc., Geophys. Supp.*, **2**, 285 (1949).

³ Von Arx, W. S., *Wood's Hole Papers in Phys. Oceanogr. Meteor.*, **11** (3) (1956).

⁴ Ekman, V. W., *Arkiv. Mat. Astron. Fysik. (Stockholm)*, **2** (11) (1956).

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 Frazer (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-deoxy-ribofuranose 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 Furburg'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 Furburg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There

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 the 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 x-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 inter-atomic 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.

¹ Pauling, L., and Corey, R. B., *Nature*, **131**, 548 (1953); *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, **39**, 81 (1953).

² Furburg, S., *Acta Chem. Scand.*, **6**, 604 (1952).

³ Chargaff, E., for references see Zamenhof, S., Brannenman, G., and Chargaff, E., *Biochim. et Biophys. Acta*, **9**, 402 (1952).

⁴ Wyatt, G. R., *J. Gen. Physiol.*, **36**, 201 (1952).

⁵ Arthur, W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1**, Nucleic Acid, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).

⁶ Wilkins, 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 describe, 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

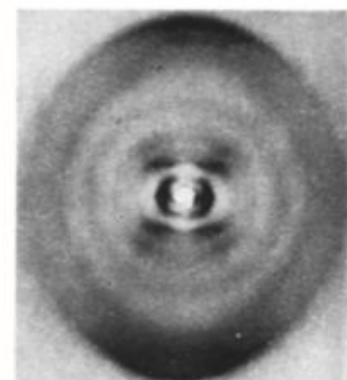


Fig. 1. Fibre diagram of deoxypentose nucleic acid from *B. coli*. Fibre axis vertical.

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_n^2) on the *n*th layer line. The helical configuration produces side-bands on this fundamental frequency, the effect⁶ 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-

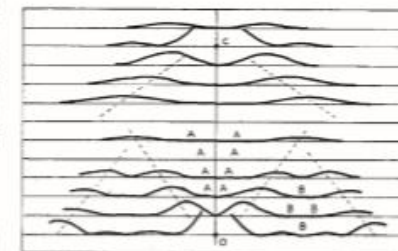


Fig. 2. Diffraction pattern of system of helices corresponding to structure of deoxypentose nucleic acid. The squares of Bessel functions are plotted about 0 on the equator and on the first, second, third and fifth layer lines for half of the nucleotide mass at 20 Å. diameter and remainder distributed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

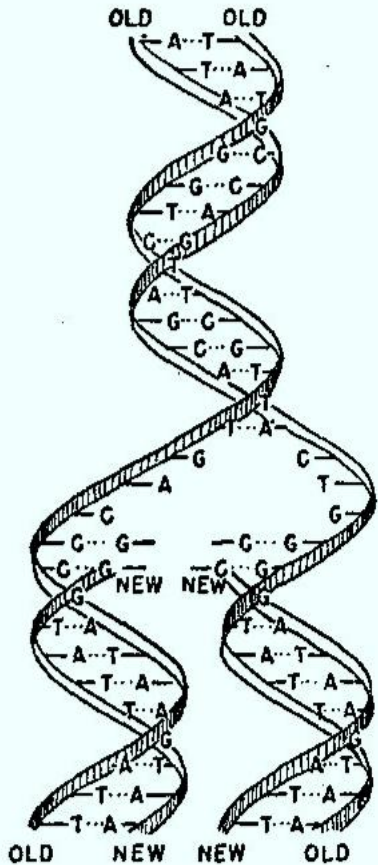
Οι Watson και Crick συνδυάζοντας όλα αυτά τα δεδομένα, κατέληξαν στο συμπέρασμα, πως:

το DNA (που γνώριζαν πως φέρει τη γενετική πληροφορία), είναι μία διπλή έλικα πολυνουκλεοτιδίων, διαμέτρου 20 Å , στην οποία οι δύο αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς Υδρογόνου που σχηματίζονται με πολύ εξειδικευμένο τρόπο: Η Αδενίνη (πουρίνη) ζευγαρώνει πάντοτε με μία Θυμίνη (πυριμιδίνη) και το ίδιο γίνεται ανάμεσα στην Γουανίνη και την Κυτοσίνη. Προτείνουν, ταυτόχρονα, πως κάθε τρεις βάσεις αζώτου στη σειρά, κωδικοποιούν για ένα από τα 20 αμινοξέα στο μόριο μιας πρωτεΐνης.

Απονομή Νόμπελ 1962



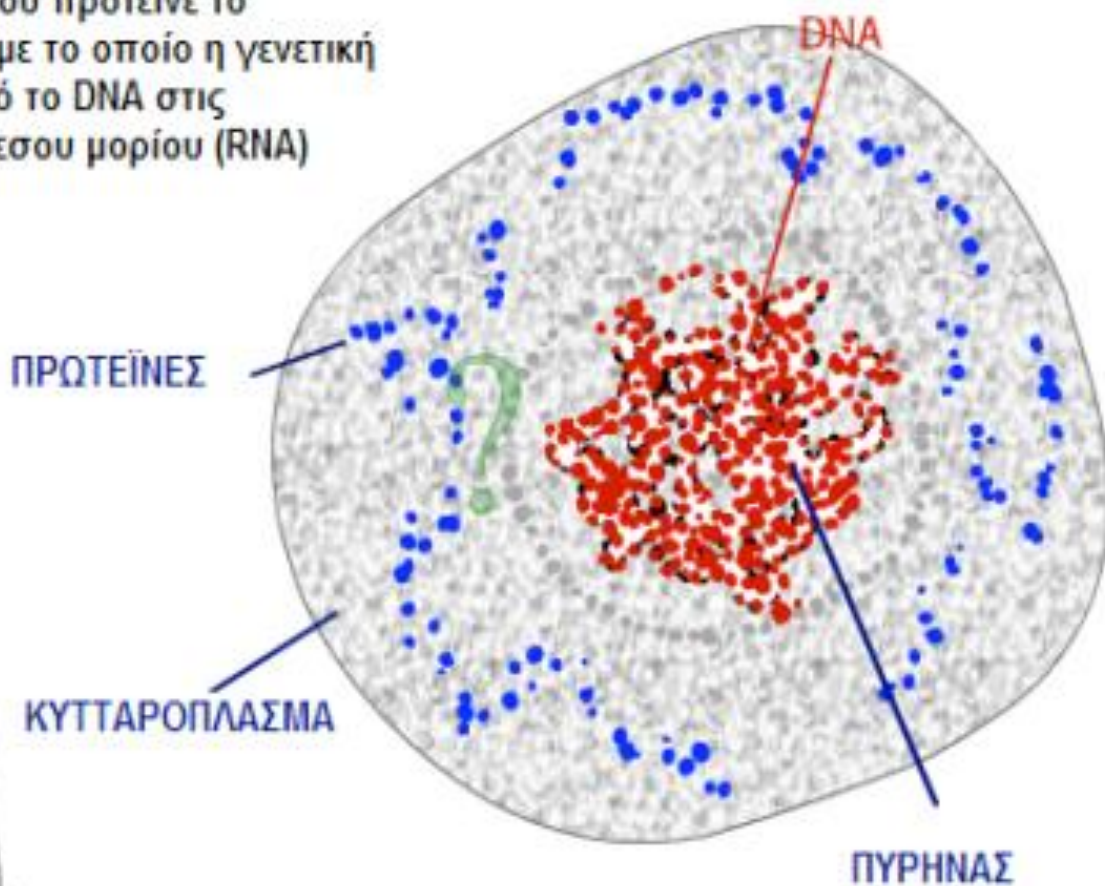
Αντιγραφή του DNA



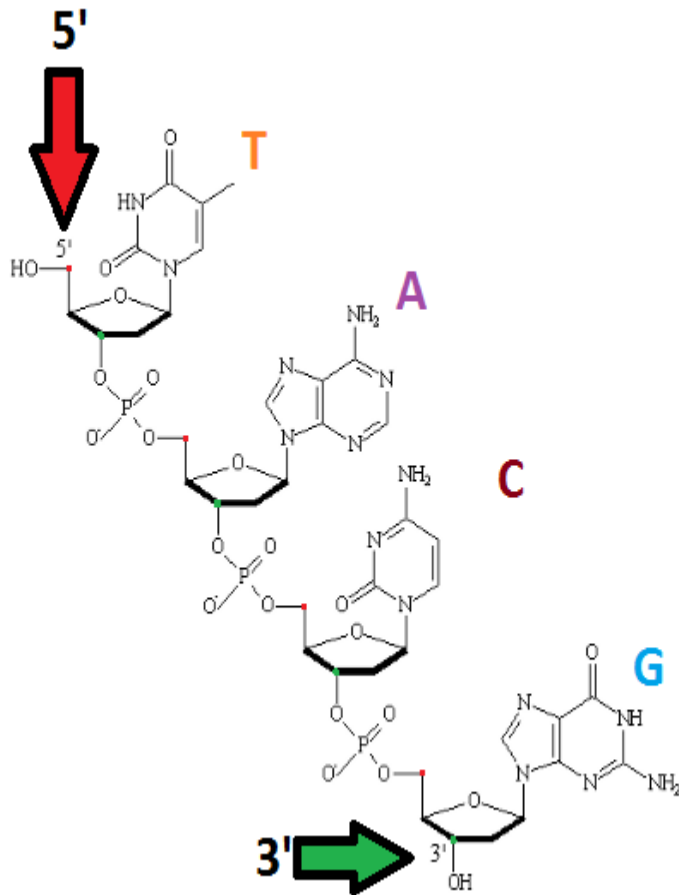
Παράλληλα, προτείνουν και μία εξήγηση για το πώς η Γενετική Πληροφορία μεταδίδεται (σχεδόν) αναλλοίωτη από κύτταρο σε κύτταρο και από γενιά σε γενιά.

Το τελευταίο, ονομάστηκε ημισυντηρητικός τρόπος αυτοδιπλασιασμού του DNA και συνίσταται στο εξής: **Κάθε φορά** που είναι να δημιουργηθεί νέο μόριο DNA, η διπλή έλικα ανοίγει με τη βοήθεια ενζύμων (ων), και με μήτρα τις δύο παλιές αλυσίδες, δημιουργούνται δύο νέες

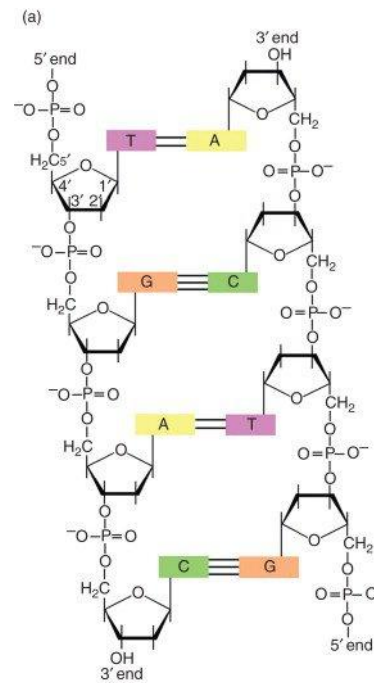
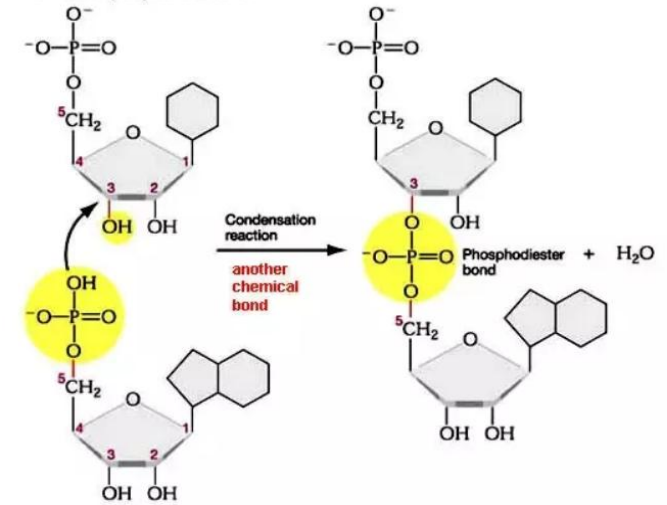
Ο Francis Crick ήταν αυτός που πρότεινε το "κεντρικό δόγμα", σύμφωνα με το οποίο η γενετική πληροφορία μεταφέρεται από το DNA στις πρωτεΐνες μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου (RNA)



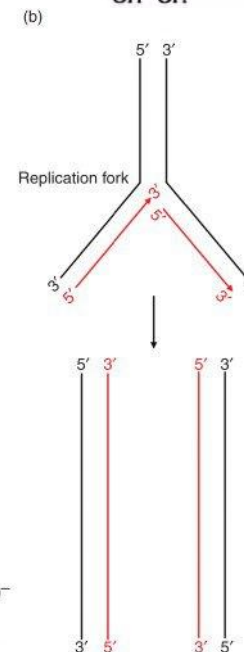
Putting it all together



Formation of phosphodiester bond



Bases: A (adenine), T (thymine)
G (guanine), C (cytosine)



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
- Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Karry Mullis, που εργαζόταν σε μια εταιρεία βιοτεχνολογίας της Καλιφόρνιας. Για την ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε 10 χρόνια αργότερα με το βραβείο Νόμπελ.

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

<https://www.youtube.com/watch?v=iSVy1b-RyVM>

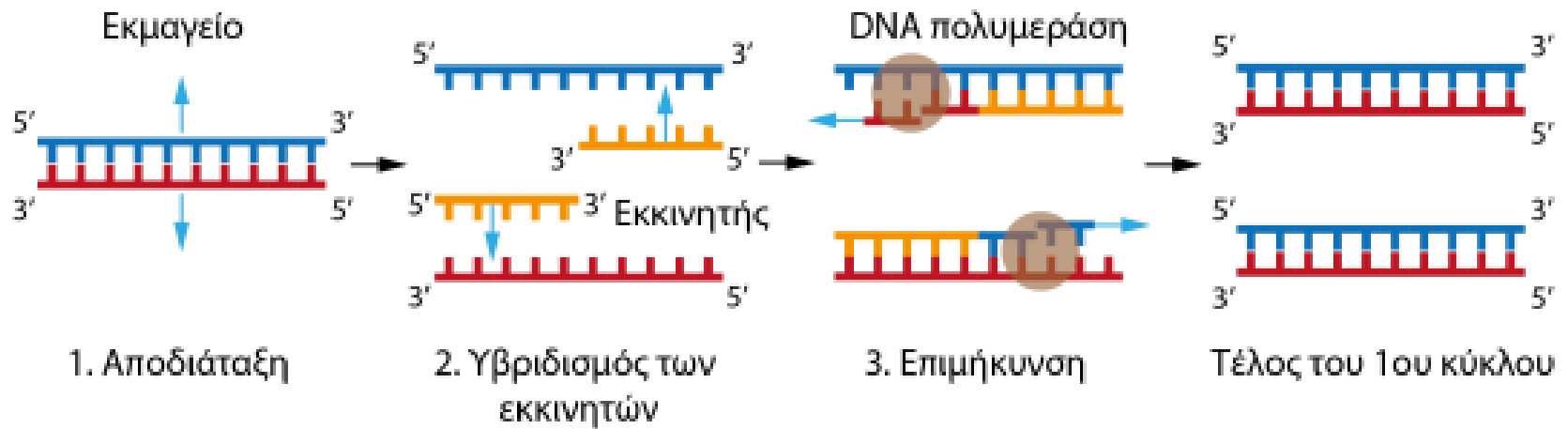
The Invention of PCR

The process, which Dr. Mullis conceptualized in 1983, is hailed as one of the monumental scientific techniques of the twentieth century. A method of amplifying DNA, PCR multiplies a single, microscopic strand of the genetic material billions of times within hours. Mullis explains:

"It was a chemical procedure that would make the structures of the molecules of our genes as easy to see as billboards in the desert and as easy to manipulate as Tinkertoys....It would find infectious diseases by detecting the genes of pathogens that were difficult or impossible to culture....The field of molecular paleobiology would blossom because of P.C.R. Its practitioners would inquire into the specifics of evolution from the DNA in ancient specimens....And when DNA was finally found on other planets, it would be P.C.R. that would tell us whether we had been there before."

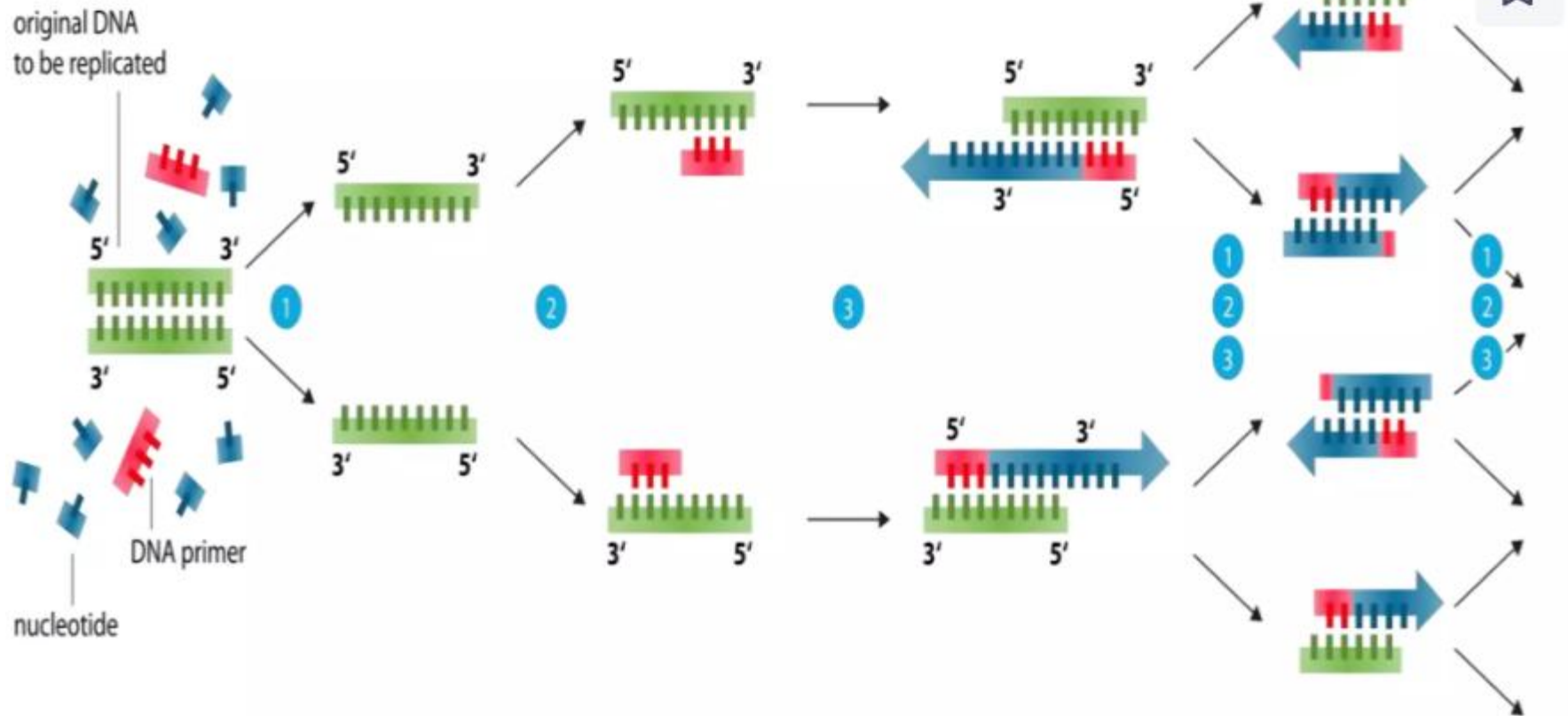


Τα στάδια της PCR

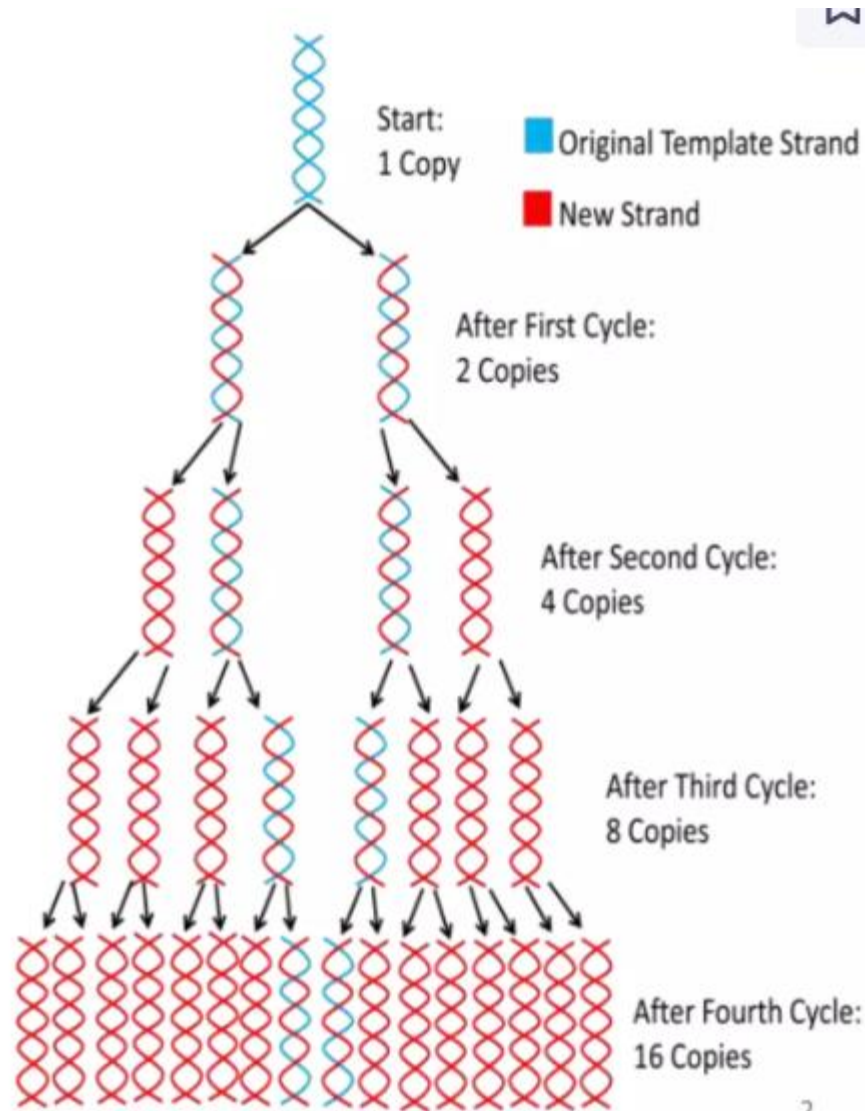


1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.
2. Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό

Polymerase chain reaction - PCR



Αριθμός κύκλων Αριθμός δίκλωνων μορίων-στόχων



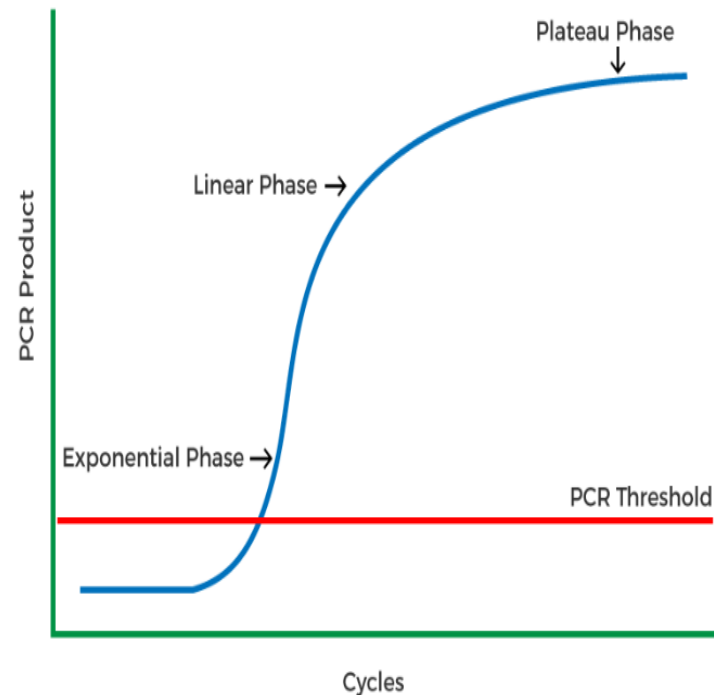
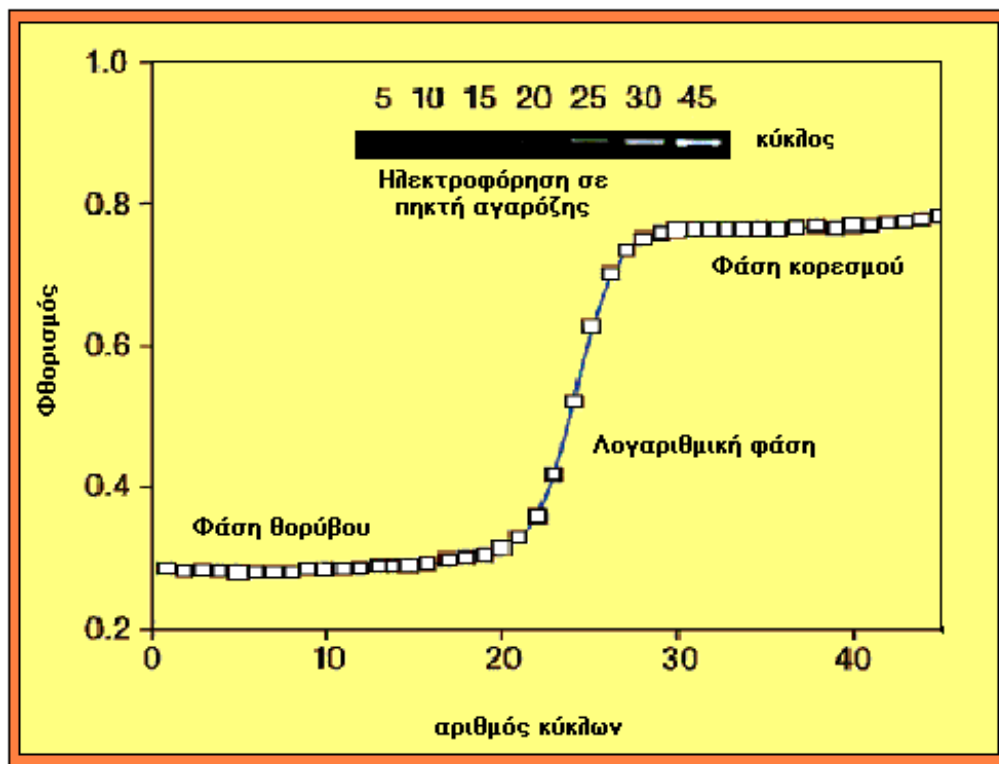
Κινητική της αντίδρασης PCR

Στη θεωρία, η αύξηση των προϊόντων της PCR είναι εκθετική, γιατί κάθε μόριο DNA που παράγεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στον επόμενο κύκλο.

Στην πραγματικότητα όμως η PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- 1. 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.
- 2. Γραμμική φάση:** Παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων.
- 3. 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 ή 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

Τα συστατικά της PCR

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

1. DNA πολυμεράση
2. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές
3. Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος
4. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+}
5. Νουκλεοτίδια (dNTPs)

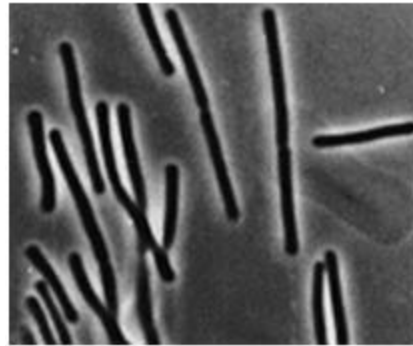
DNA πολυμεράση

- Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς (ευκαρυωτικοί, προκαρυωτικοί και ιοί) και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA.
- Δεν μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA, μπορεί όμως να αντιγράψει ένα υπάρχον που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.
- Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές.

DNA πολυμεράση

- Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστηνή σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72°C , ενώ δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση ακόμη και στους 95°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα
- Η κατεύθυνση της σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι $5'-3'$.
- Η απλή DNA πολυμεράση κάνει περίπου ένα λάθος στις 100.000 βάσεις. Οι πολυμεράσες υψηλής πιστότητας (Proofreading polymerase), οι οποίες έχουν δραστηνότητα $3'-5'$ εξωνουκλεάσης, μπορούν να διορθώσουν τα λάθη που δημιουργούν κατά τη σύνθεση του μορίου DNA.

Yellow stone National Park, Wyoming, USA



Thermus aquaticus



Thomas Brock in 1992 at a hot spring in Yellowstone National Park. It was there, 26 years earlier, that he found *Thermus aquaticus*, a species of bacteria that would be used to develop the chemical process behind PCR testing for the coronavirus. Peter

Οι εκκινητές (Primers)

- ✓ Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.
- ✓ Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR.
- ✓ Υπάρχουν στο διαδίκτυο ειδικά λογισμικά που μας βοηθούν να σχεδιάσουμε εκκινητές

Σχεδιασμός εκκινητών

Μέγεθος των εκκινητών: συνήθως ολιγονουλεοτίδια 18-30 βάσεων. Μικρότεροι εκκινητές οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται η πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού.

Αλληλουχία των εκκινητών: πρέπει να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών οδηγεί στο σχηματισμό διμερών εκκινητών που έχουν μέγεθος 30-50 bp και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της PCR.

Σχεδιασμός εκκινητών

Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών: Η θερμοκρασία αποδιάταξης, Melting temperature (T_m), είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Υψηλό ποσοστό σε βάσεις G και C αυξάνει την T_m

Οι διαφορά των T_m μεταξύ των δυο εκκινητών πρέπει να είναι μικρη

<https://www.minipcr.com/how-to-design-pcr-primers/>

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

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

Δείγμα DNA

- ❑ Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA).
- ❑ Πολύ μικρές ποσότητες DNA (της τάξης των 25-100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50 μ l) είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR.
- ❑ Μεγάλη ποσότητα DNA μπορεί να αναστείλει την αντίδραση.
- ❑ Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.
- ❑ **Αιγυπτιακές μούμιες ηλικίας άνω των 4000 ετών!**

Basic Steps in Isolating DNA

Separate WBCs from RBCs, if necessary



Lyse WBCs or other nucleated cells



Denature/digest proteins



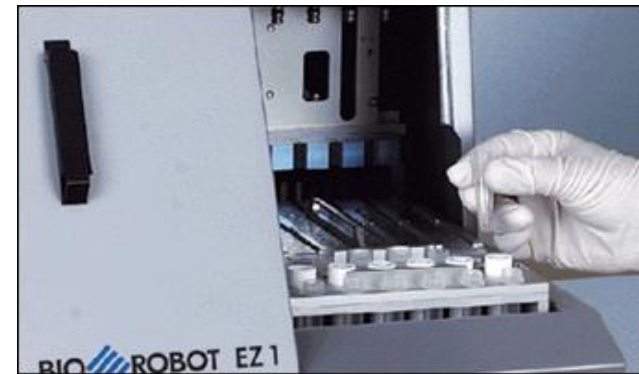
Separate contaminants (*e.g.*, proteins, heme)
from DNA



Precipitate DNA if necessary



Resuspend DNA in final buffer



Automated Genomic DNA Isolation from Whole Blood



- **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.

Nucleic Acid Analysis

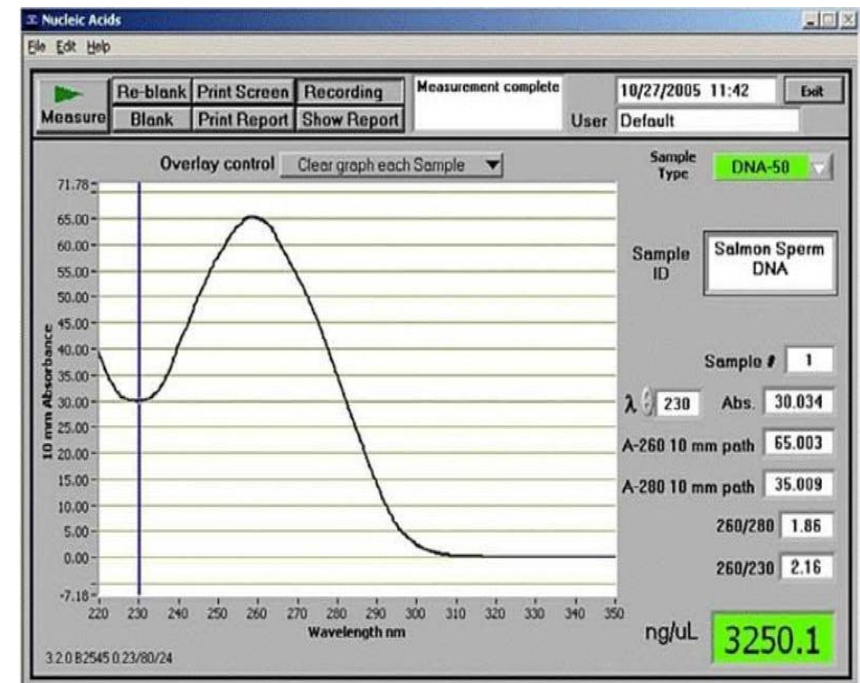
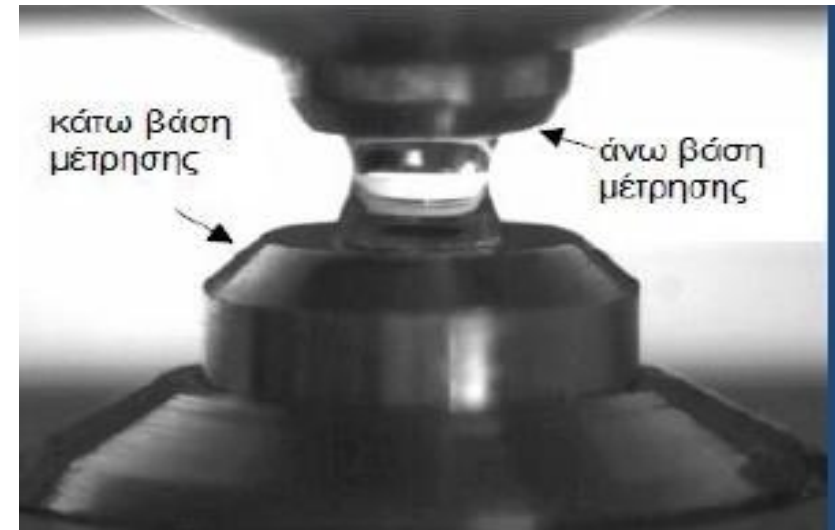
DNA or RNA is characterized using several different methods for assessing quantity, quality, and molecular size.

- UV spectrophotometry
- Agarose gel electrophoresis
- Fluorometry
- Colorimetric blotting

Quantity from UV Spectrophotometry

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

DNA Quantitation - UV Spectrophotometry



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
other contaminant (?)

Νουκλεοτίδια (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 του ελεύθερου ποσού του διαθέσιμου Mg^{+2}

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP)

Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+}

- μεταλλικός συμπαράγοντας 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

Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Περίσσεια Mg^{2+} οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση Mg^{2+} για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων από 1 έως 4 mM.

Αναστολείς και ενισχυτές της αντίδρασης PCR

Αναστολείς:

- φύση των 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%)

REVIEW ARTICLE

PCR inhibitors – occurrence, properties and removal

C. Schrader¹, A. Schielke², L. Ellerbroek¹ and R. Johne¹

¹ Food Hygiene and Safety Concepts, Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany

² Department for Infectious Disease Epidemiology, Robert Koch Institute, Berlin, Germany

doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x

Science of the Total Environment 955 (2024) 176768



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Evaluation of PCR-enhancing approaches to reduce inhibition in wastewater samples and enhance viral load measurements

Anastasia Zafeiriadou, Konstantina Nano, Nikolaos S. Thomaidis, Athina Markou^{*}

Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens, Zografou, 15771 Athens, Greece

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)

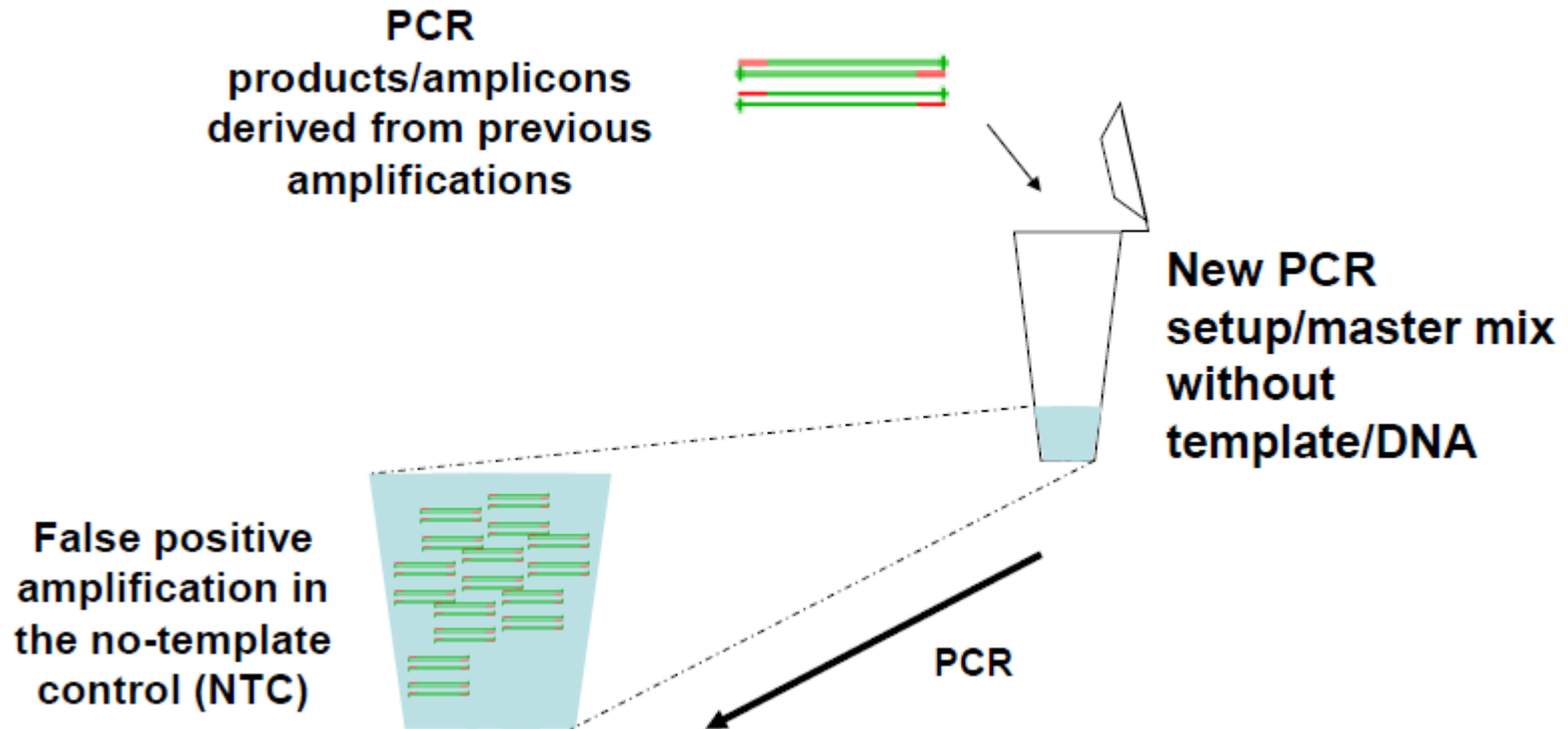
αποφεύγεται με :

- 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

Πιθανές πηγές επιμόλυνσης στην PCR

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

Επιμόλυνση στην PCR



Οργάνωση εργαστηρίου για την 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 την αποφυγή επιμόλυνσης στην PCR

The following operations are done in the **reagent storage and set-up area**:

- preparation of stock solutions, preparation of aliquoted solutions, and preparation of master mix solutions.
- Cleaning of the workplace has to be performed immediately after the termination of the work.
- Also, specific work areas must not be accessed if work was performed earlier in any of the other working areas, particularly in the PCR product analysis area.

Οργάνωση εργαστηρίου για την αποφυγή επιμόλυνσης στην PCR

Job description, work flow

- Delivery of stock reagents and material for sample preparation is best done directly to the reagent storage and set-up area.
- Vessels containing reaction mixtures should always be centrifuged briefly before opening and freezing.
- The required reagents are stored exclusively in this area and processed here into the stock solutions needed.
- After the stock solutions have been checked for suitability, they should be divided into aliquots for storage and further use, to reduce the danger of contamination through frequent opening of reaction vessels and pipetting.
- freeze stock solutions in small aliquots.

Οργάνωση εργαστηρίου για την 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.



Ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης PCR

- ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

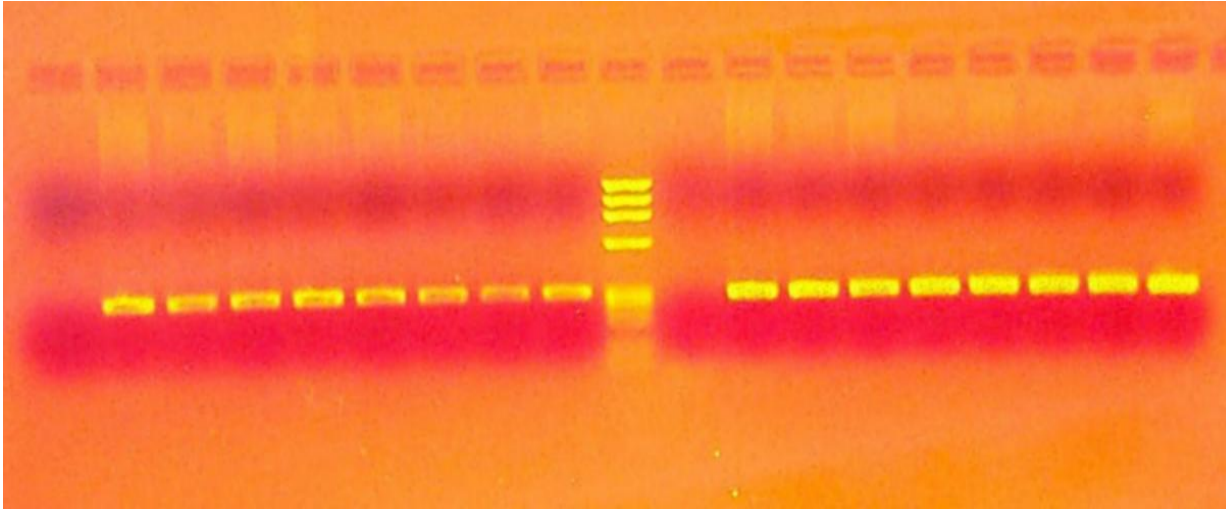
Πίνακας 1. Εύρος διαχωρισμού του DNA σε πηκτές αγαρόζης και πολυακρυλαμίδιου

Αγαρόζη, %	DNA (Kb)	Ακρυλαμίδιο, %	DNA (bp)
0.3	5-60	3.5	1000-2000
0.6	1-2	5.0	80-500
0.7	0.8-10	8.0	60-400
0.9	0.5-7	12.0	40-200
1.2	0.4-6	15.0	25-150
1.5	0.2-3	20.0	6-100

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)

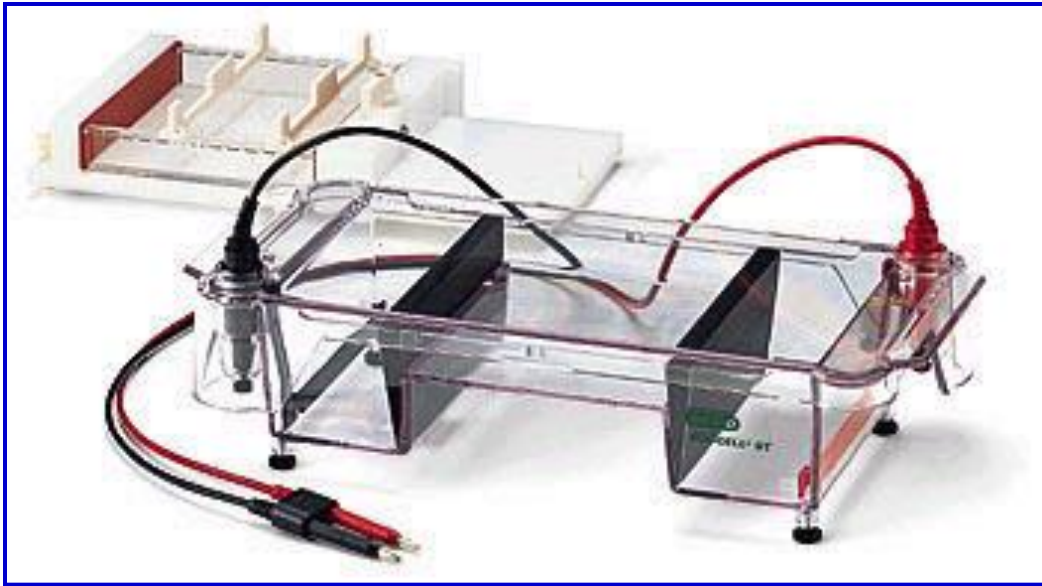
Ανίχνευση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση αгарόζης



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

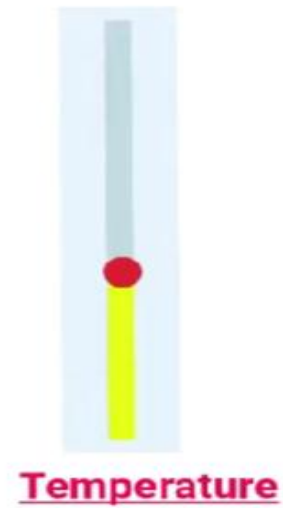
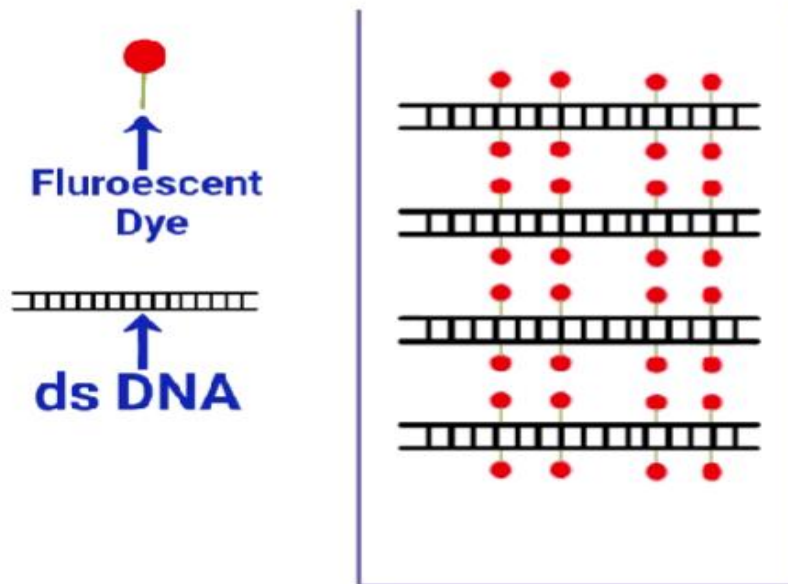
Agarose Gel Electrophoresis

Horizontal Gel Format

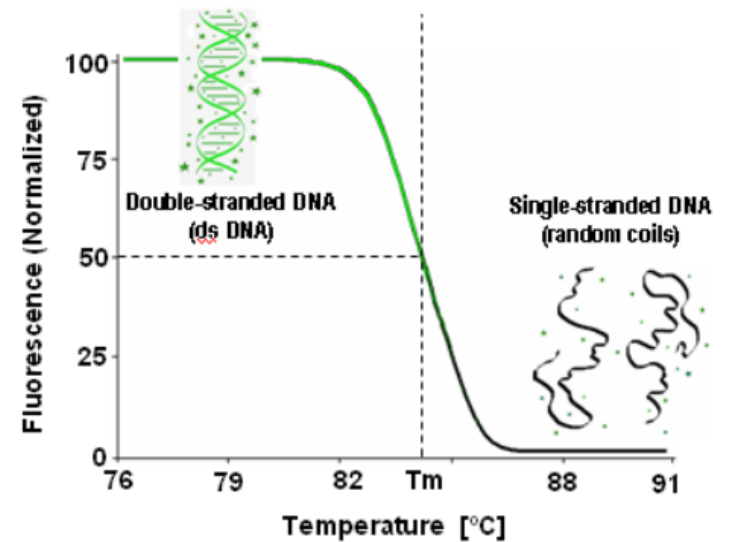


Reservoir/Tank
Power Supply
Casting Tray and Combs

Melting Curve Analysis



B. Normalized Melting Curves



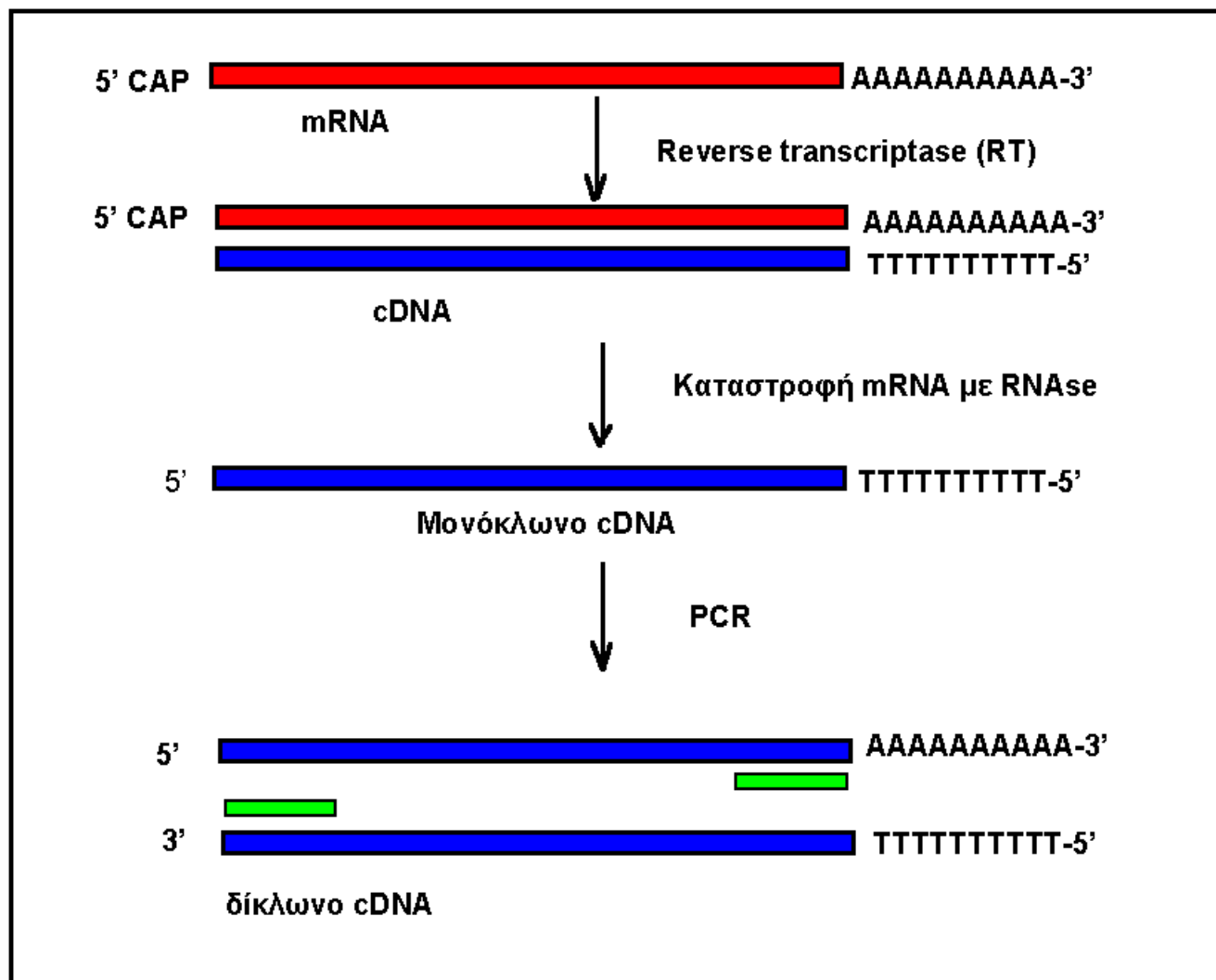
Κυριότερες παραλλαγές της αντίδρασης PCR

- PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)
- Ασύμμετρη PCR
- Διπλή PCR (Nested PCR)
- Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR)
- PCR-ELISA
- PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)
- Ψηφιακή PCR (digital 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 μεταγραφάση
- για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή, oligodTs, ή μόνο ένας ειδικός PCR-εκκινητής
- το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την Taq-πολυμεράση και με δύο ειδικούς PCR εκκινητές δημιουργείται το δίκλωνο cDNA
- το δίκλωνο cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την συνήθη τεχνική της PCR

Βασική αρχή RT-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 μεταγράφουν αντίστροφα RNA παρουσία Mn^{2+} , ενώ ταυτόχρονα δρουν και ως DNA πολυμεράσες

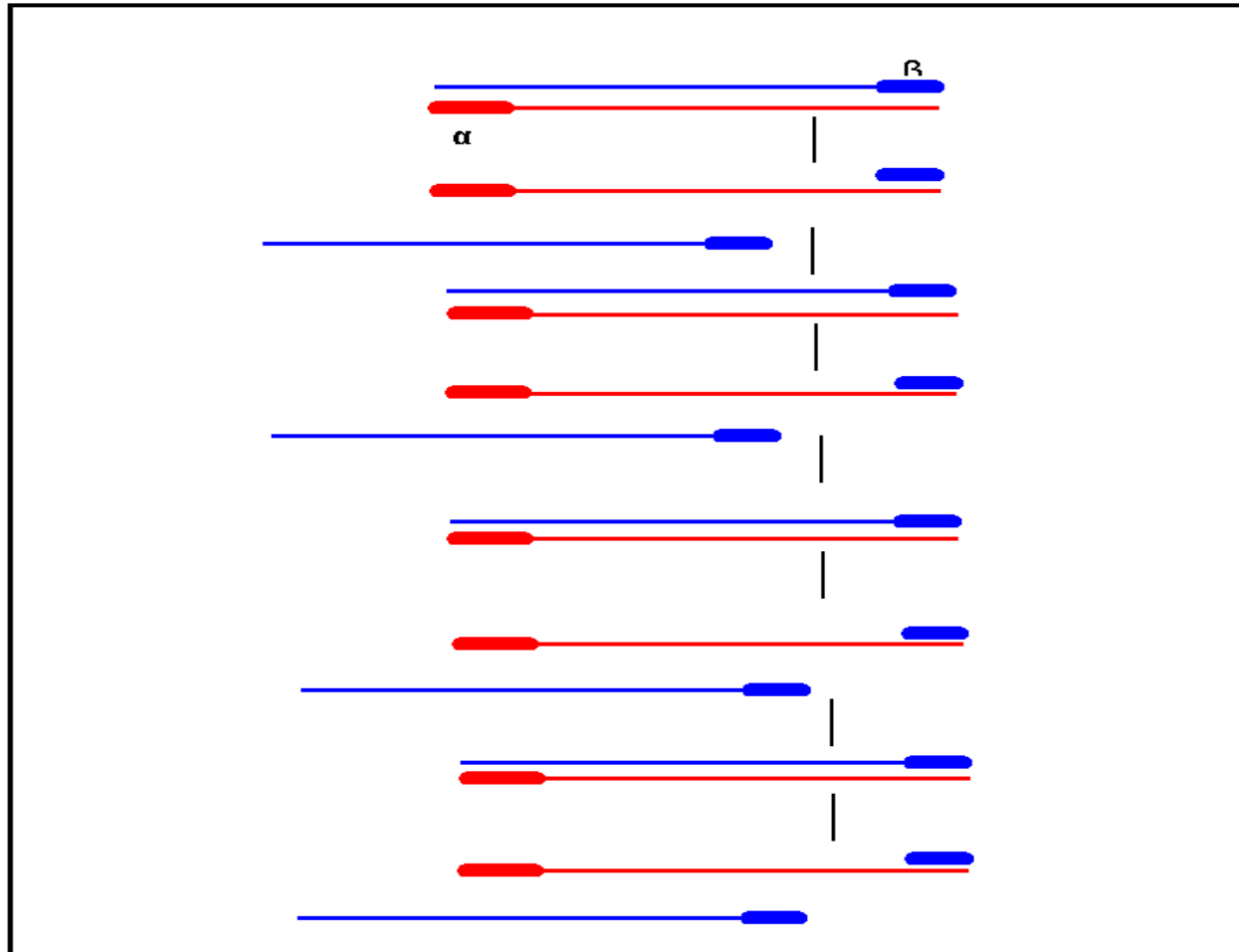
σημαντικά πλεονεκτήματα:

- 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

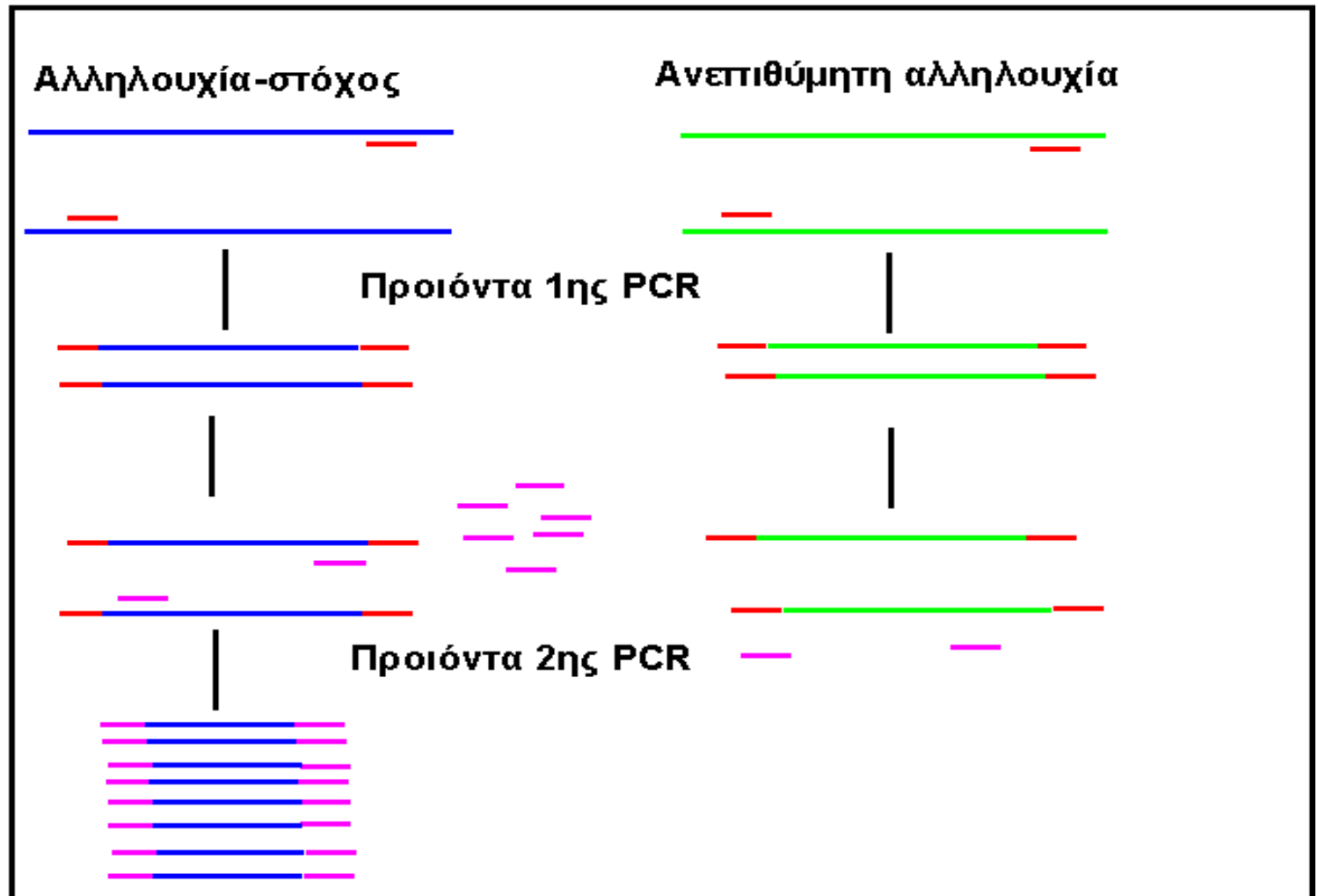
βασική αρχή ασύμμετρης PCR



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

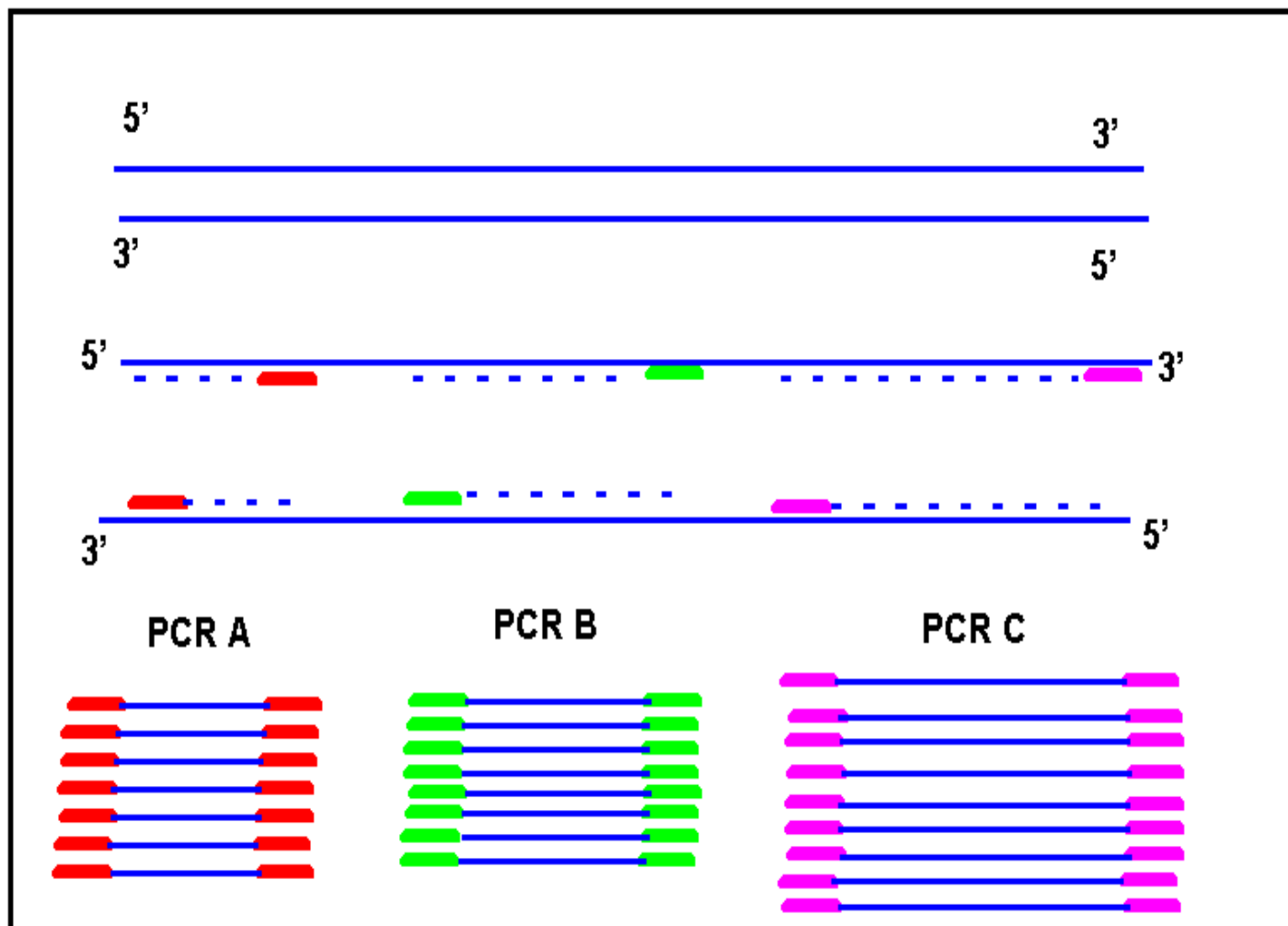
Αρχή μεθόδου διπλής PCR



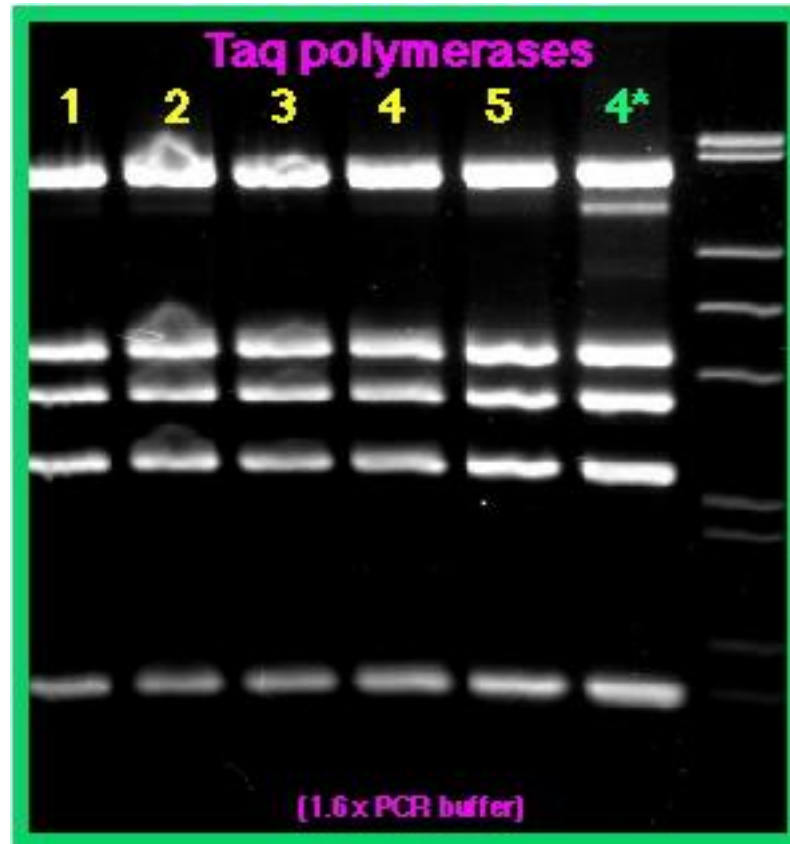
Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR)

- χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιοχών της αλληλουχίας-στόχου
- χρησιμοποιείται στη διάγνωση γενετικών ασθενειών που οφείλονται σε απαλοιφές γενετικού υλικού γονιδίων, όπως η μυϊκή δυστροφία του Duchenne
- πολύ απλούστερη από την αποτύπωση κατά Southern (Southern blot)

Αρχή μεθόδου πολλαπλής PCR



Πολλαπλή PCR



Πρακτικές τροποποιήσεις στη PCR τεχνική

- **RT-PCR**
- **Nested PCR**
- **Intersequence specific (ISSR) PCR**
- **FISSR-PCR**
- **Ligation-mediated PCR**
- **Inverse PCR**
- **Vectorette-PCR**
- **Assembly PCR**
- **Asymmetric PCR-Late PCR**
- **Quantitative PCR**
 - Quantitative real-time PCR
 - Taqman PCR
 - Sybr Green PCR
- **Touchdown PCR**
- **Hot-start PCR**
- **Colony PCR**
- **RACE-PCR**
- **Multiplex (Πολυσύνθετη) - PCR**
- **Ειδικής μεθυλίωσης PCR**
- **In Situ PCR**
- **AFLP PCR**

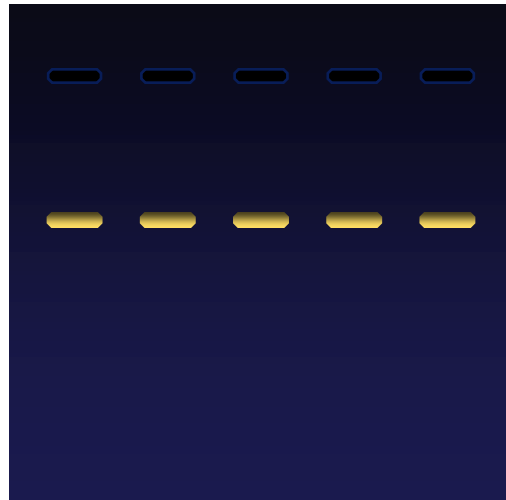
https://www.youtube.com/watch?v=MyLrs_h1OIE

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

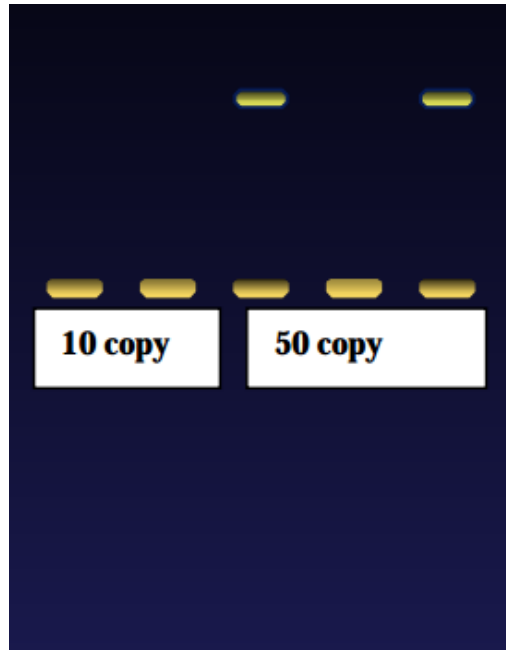
<https://www.youtube.com/watch?v=XSO4ZBzu4jA>

Κλασσική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Πληροφορίες που μας δίνει η ηλεκτροφόρηση αγαρόζης



Πληροφορία για το μέγεθος



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

Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR:

- ❑ η τελικού σημείου (endpoint): Στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση.
- ❑ η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR: η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας.

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

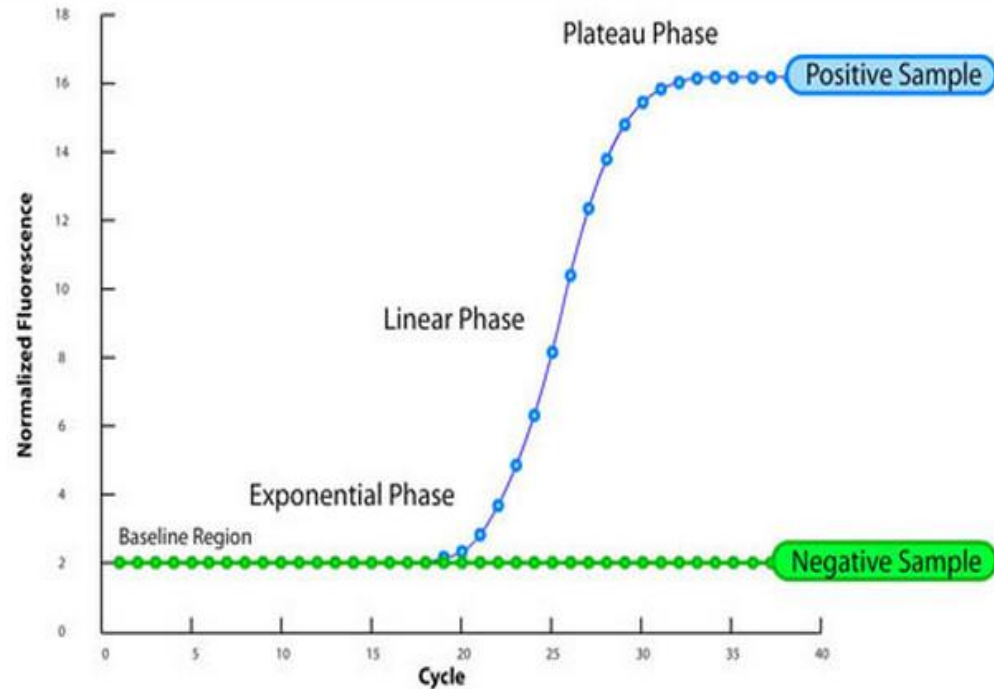
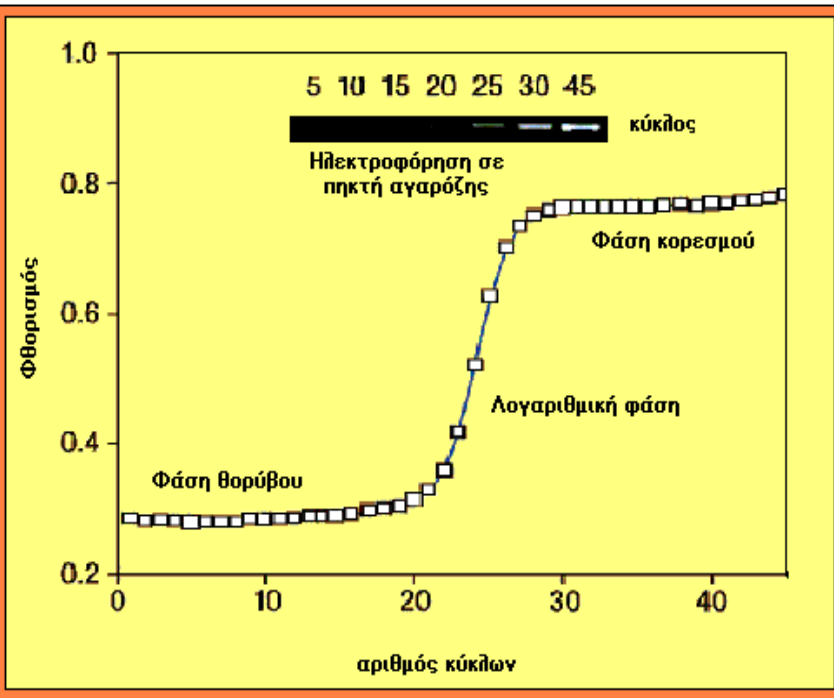
Ποσοτική PCR (qPCR)

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

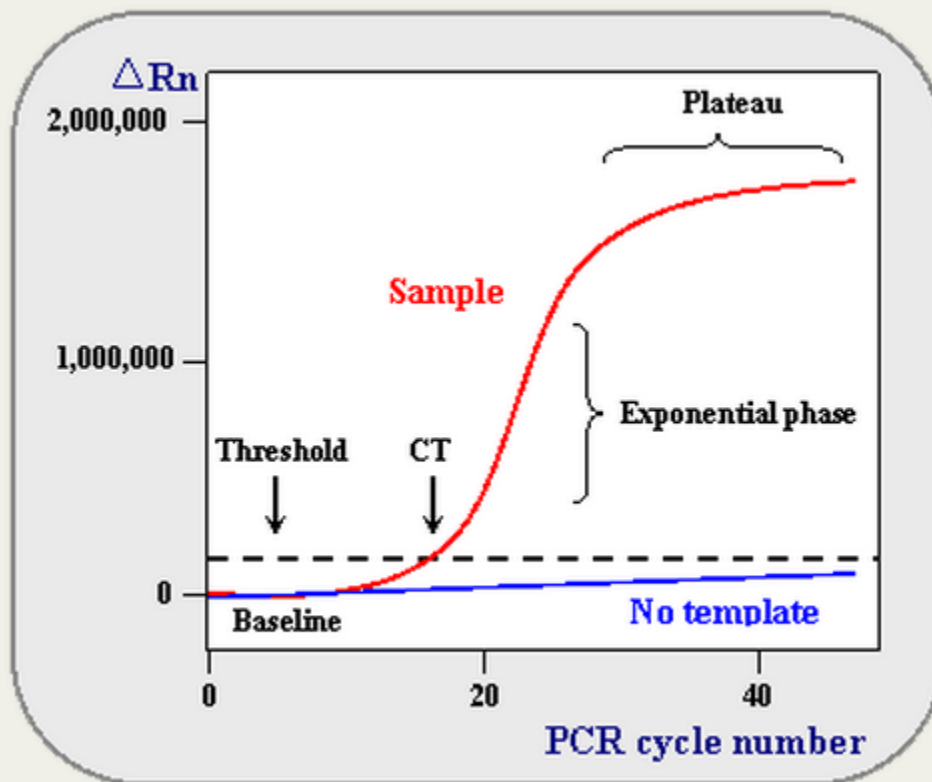
Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο



- ✓ Ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και μέτρηση της έντασης φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης
- ✓ Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος

- ❑ Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.
- ❑ Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή C_q (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold).
- ❑ Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background).
- ❑ Η τιμή C_q είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή C_q τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος

Real time PCR



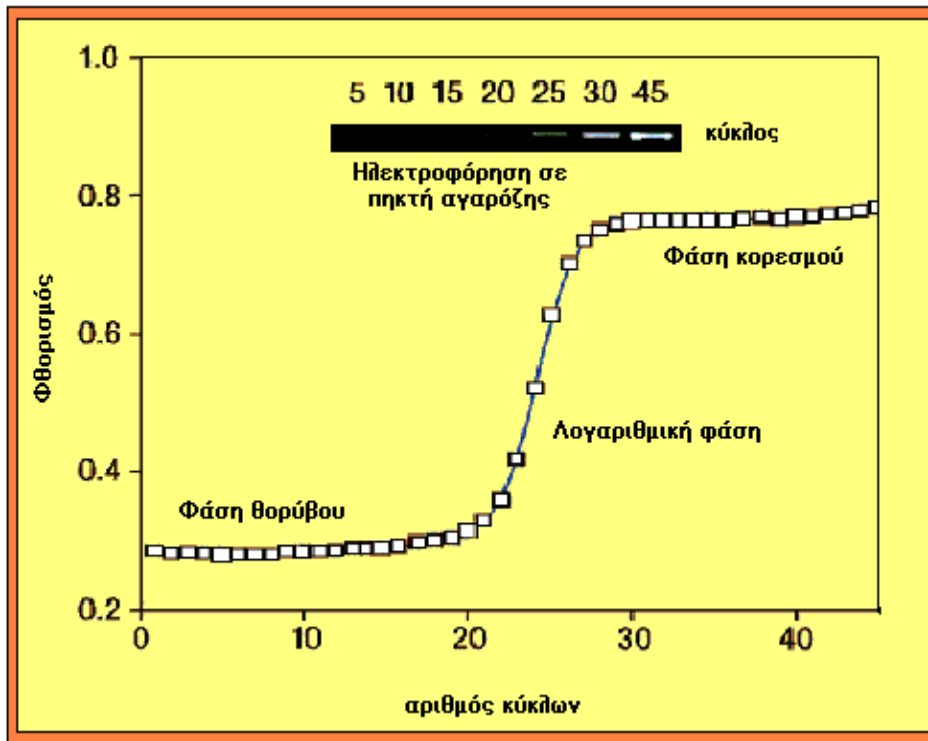
Baseline is defined as PCR cycles in which a reporter fluorescent signal is accumulating but is beneath the limits of detection of the instrument.

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.

Χαρακτηριστικό καταγράφημα αντίδρασης real time PCR



$$N = N_0 \times (1+E)^n$$

N : η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου μετά από n κύκλους

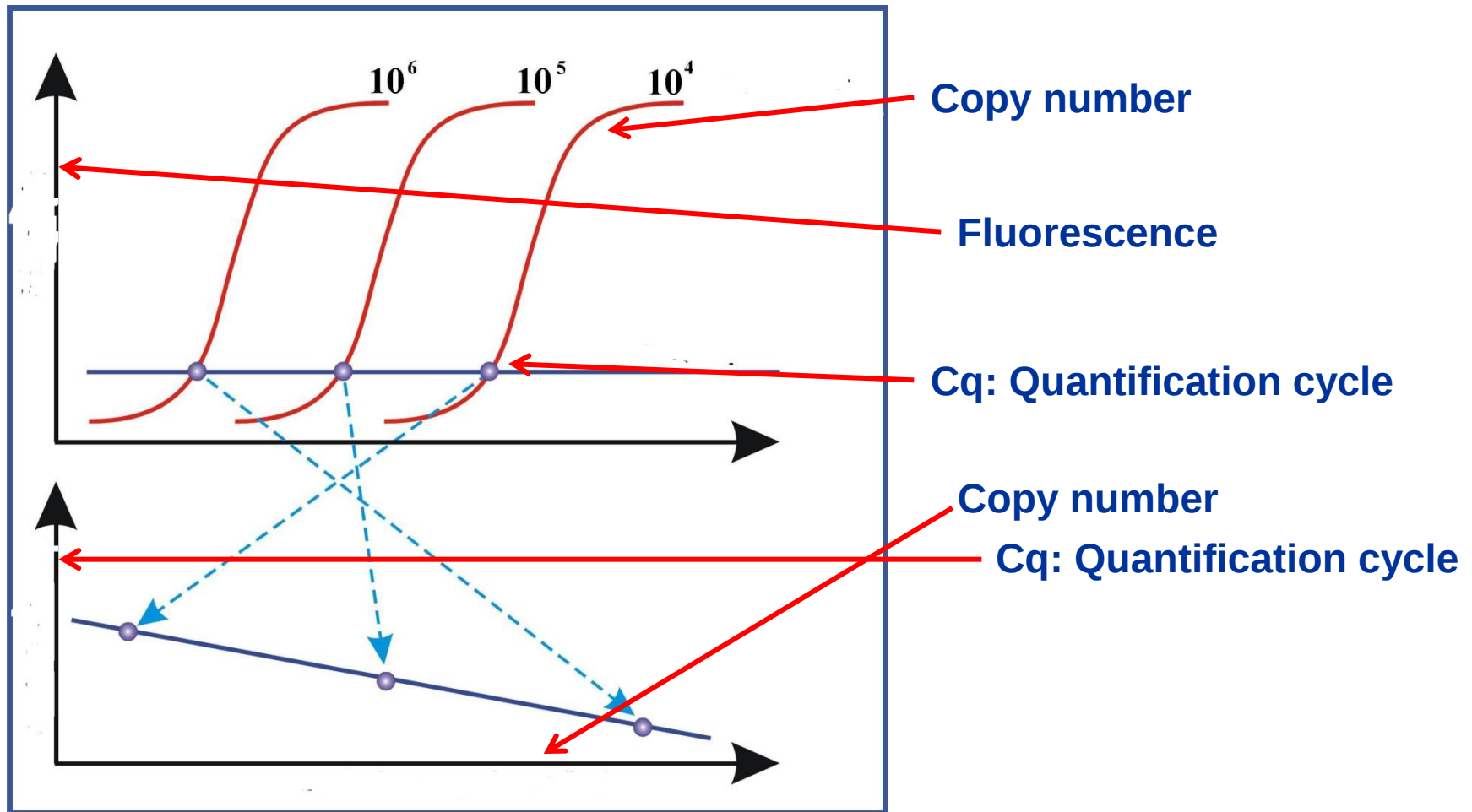
N_0 : η αρχική ποσότητα του στόχου

n : ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης

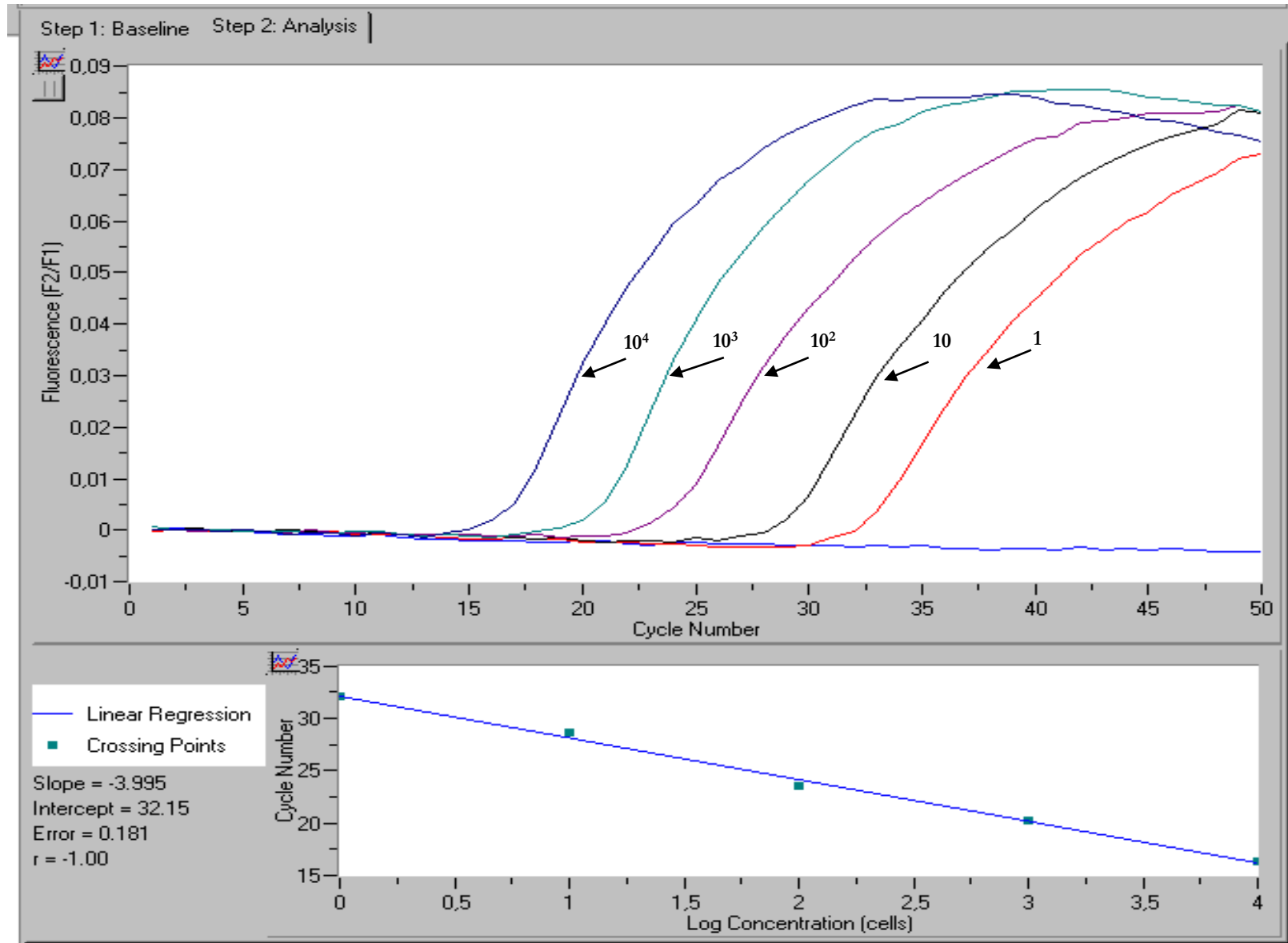
E : η απόδοση της αντίδρασης PCR

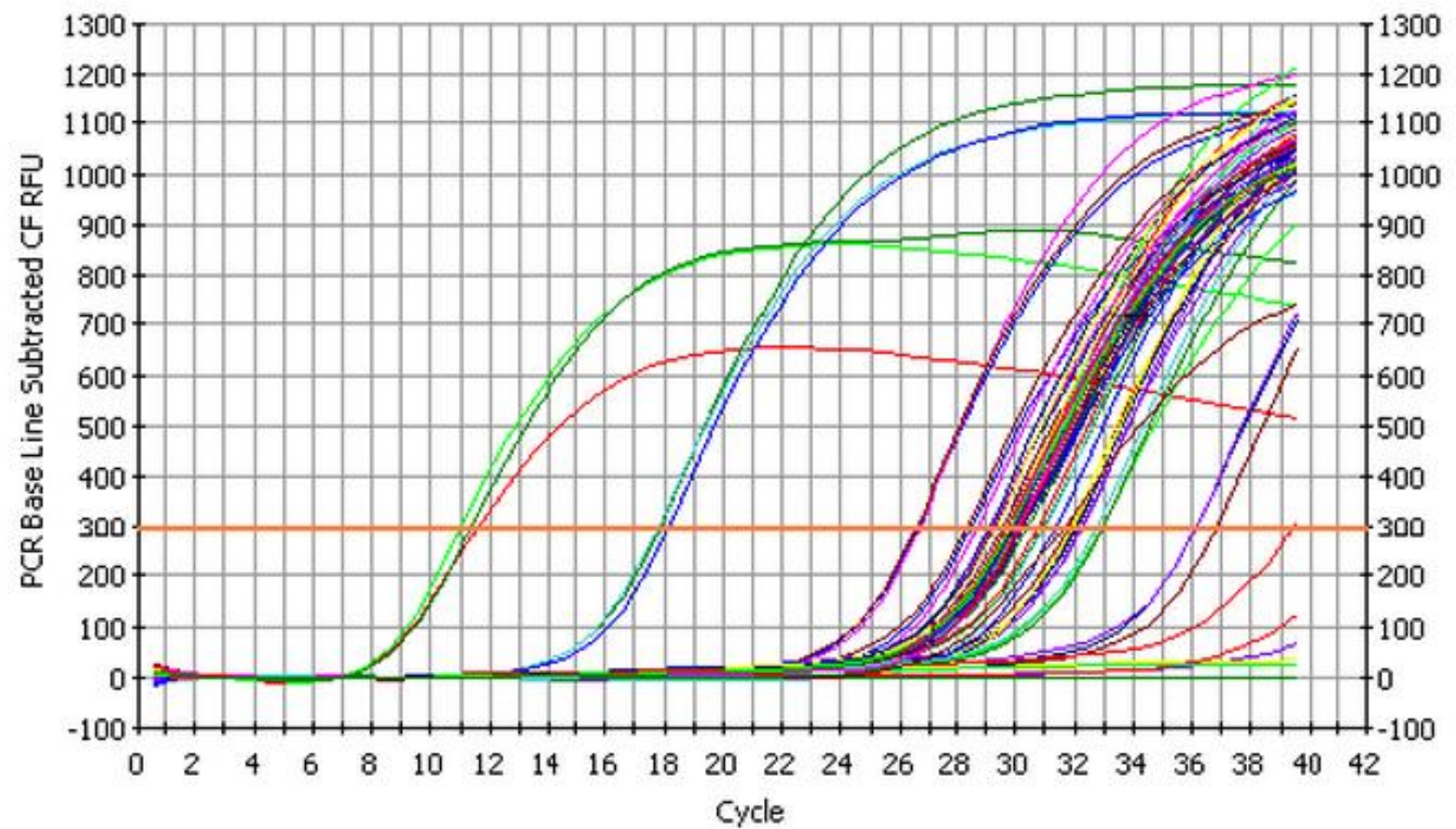
Real Time PCR = qPCR

Main principles of quantification



Real-time quantification Calibration curve





Real-Time-PCR 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

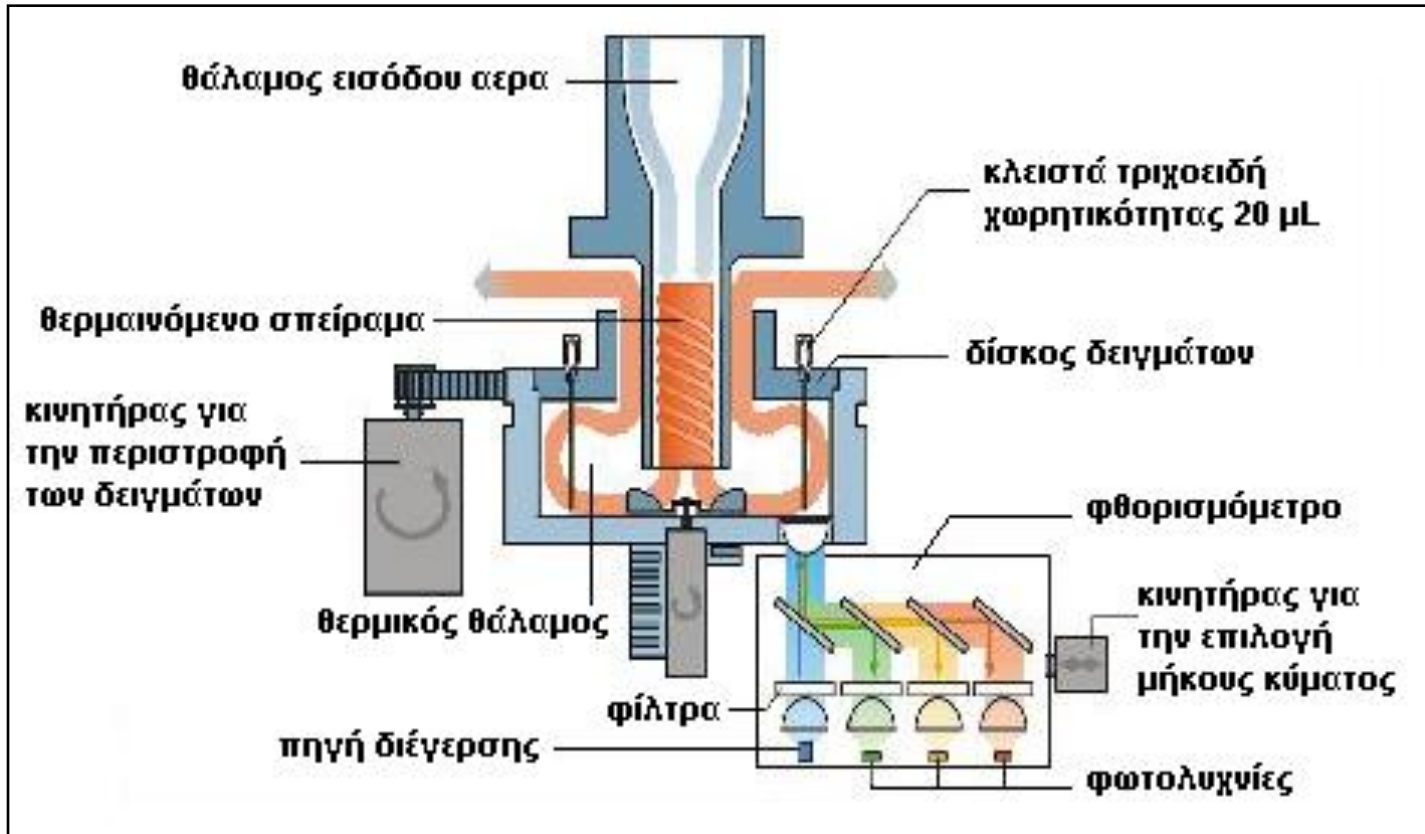
Prototype: LightCycler, 1997



LightCycler



Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
(Real time PCR)
τεχνολογία LightCycler (Roche Diagnostics)



Συνδυασμός φθορισμομέτρου και θερμικού κυκλοποιητή



Smart Cycler (Cepheid)

A flexible system built on the independently programmable I-CORE™ Module

The Smart Cycler is an integrated DNA/RNA amplification and detection instrument system. The system is designed for ease of use, from the expandable modular format to the Smart Cycler Software. Each Smart Cycler Processing Block is built around the proprietary microprocessor-controlled I-CORE™ (Intelligent Cooling/Heating Optical Reaction) Module. Thermally and optically optimized proprietary reaction tubes work in concert with the unique design of the I-CORE Module to deliver rapid cycling, faster amplification and immediate data collection through real time optical detection. Expanding the Smart Cycler System is simple, preserving the investment in hardware while allowing for the changing needs of research environments.

I-CORE™ Module single-site thermal cycler/fluorometer

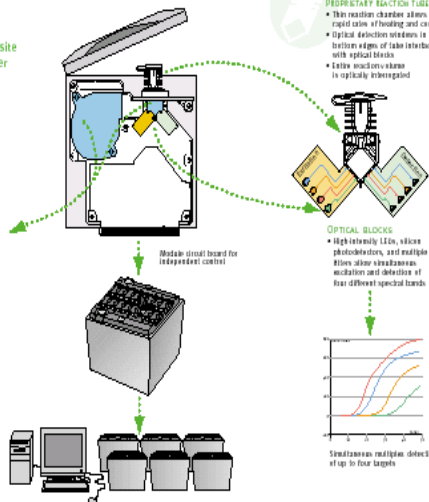
RAPID HEATING AND COOLING

- High thermal conductivity ceramic heater plate with integrated temperature sensors
- High efficiency cooling fan



Rapid thermal cycling enables protocol time reduction

- #### FLEXIBILITY
- Sixteen I-CORE™ Modules per Processing Block
 - Sixteen independently controlled reaction sites, used singly or in groups
 - Link up to six processing blocks in one system

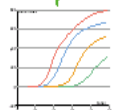


PROPRIETARY REACTION TUBES

- Thin reaction chamber allows rapid rates of heating and cooling
- Optical detection windows in bottom of tube interface with optical blocks
- Extra reaction volume is optically interrogated

OPTICAL BLOCKS

- High intensity LEDs, silicon photodiodes, and multiple filter sets simultaneously excitation and detection of four different spectral bands



Simultaneous multiple detection of up to four targets

The Smart Cycler® System: A **flexible** and **expandable** real time thermal cycler

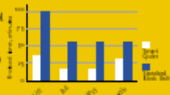
Nucleic acid detection and analysis in today's molecular biology laboratory is performed under the pressures of time and staffing constraints, changing research goals and wide-ranging detection requirements. Labs need to find protocols and instrumentation that provide speed, flexibility and versatility. They need to cycle smarter. The Smart Cycler® System from Cepheid makes it all possible.

Flexibility

Independently programmable reaction sites give maximum flexibility. Up to sixteen different cycling protocols can be performed simultaneously in one processing block. Multiple experimental runs can be started at different times, allowing several operators to use the instrument concurrently.

Speed

Rapid, precise heating and cooling of the reaction mixture to target temperatures significantly reduces cycling protocol times. The Smart Cycler System's combined fast thermal ramp rates and real time detection greatly reduce the total time required to carry out an experiment. Finally, the ability to multiplex cycling protocols and to use multiple dye detection in a single run enhances lab productivity.



Rapid cycling enables without protocol time

Real time detection

The Smart Cycler System Software optically monitors each reaction site as the fluorescent signals develop. Growth curves are displayed in real time as amplification occurs, and the presence of amplified product can be confirmed when the fluorescent signal crosses a defined threshold.

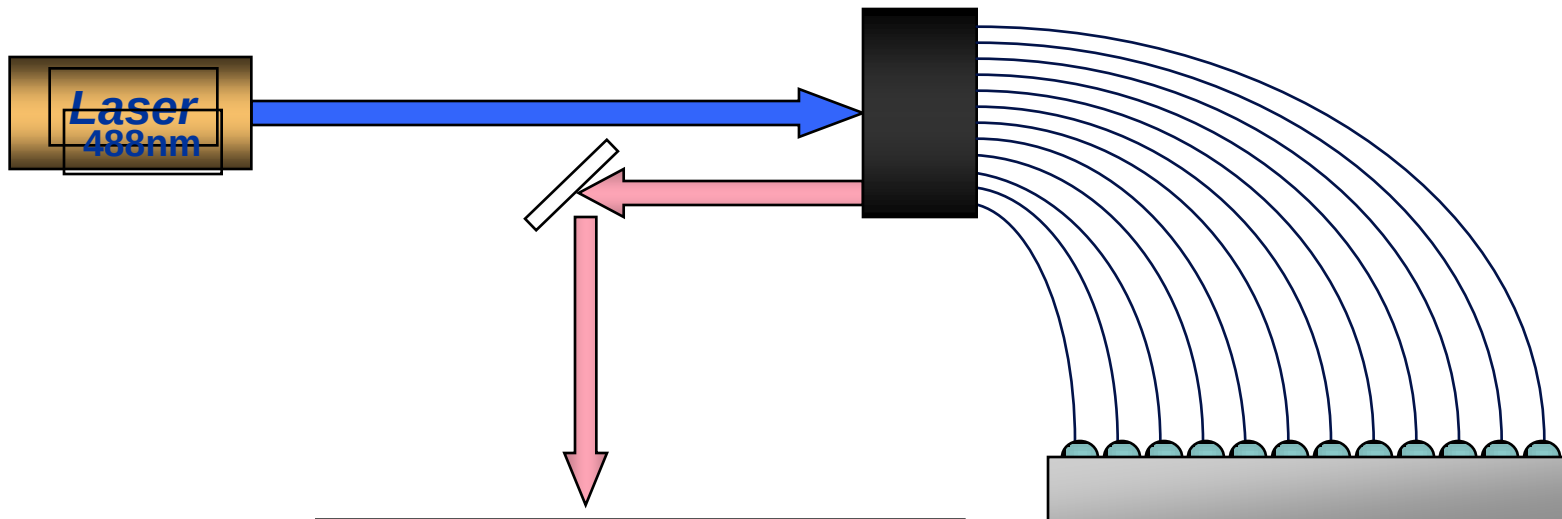
Four-color optical capability

Each of the sixteen reaction sites in a Smart Cycler Processing Block has its own optical subsystem comprised of solid state components and is capable of four-channel fluorescent detection. By using multiple fluorescent reporter dyes, up to four targets can be detected simultaneously in a single reaction mixture.

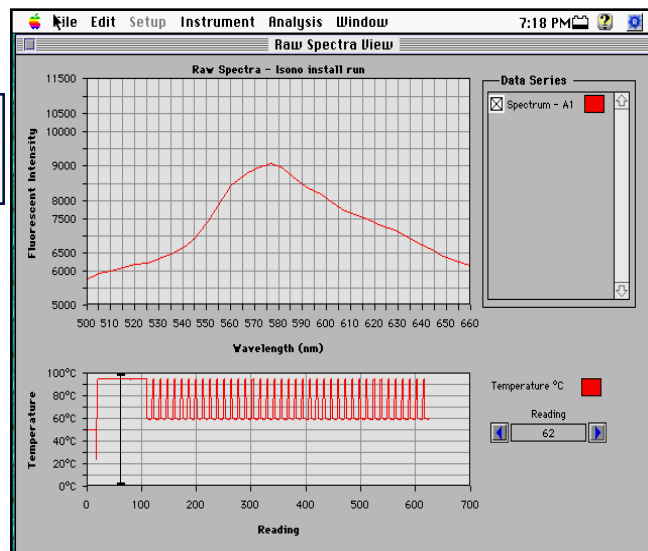
Versatility

The modular nature of the Smart Cycler System gives laboratories a great deal of flexibility to meet workload demands. System capacity can be easily and cost-effectively expanded by adding processing blocks – up to six per System.

ABI Prism Excitation and Emission



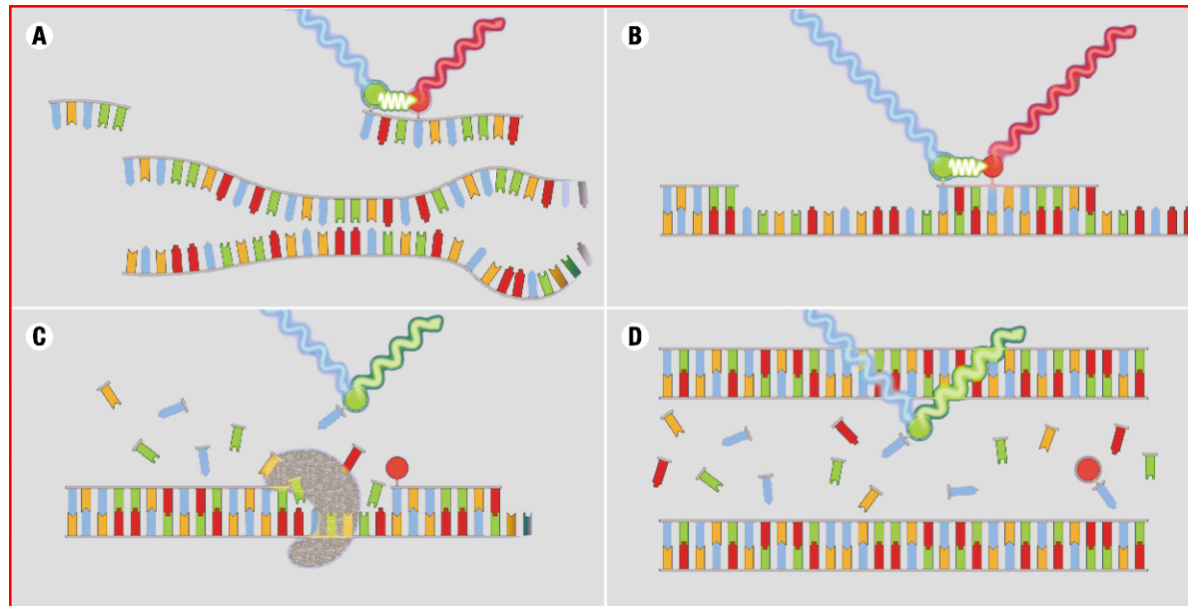
CCD



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

PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)

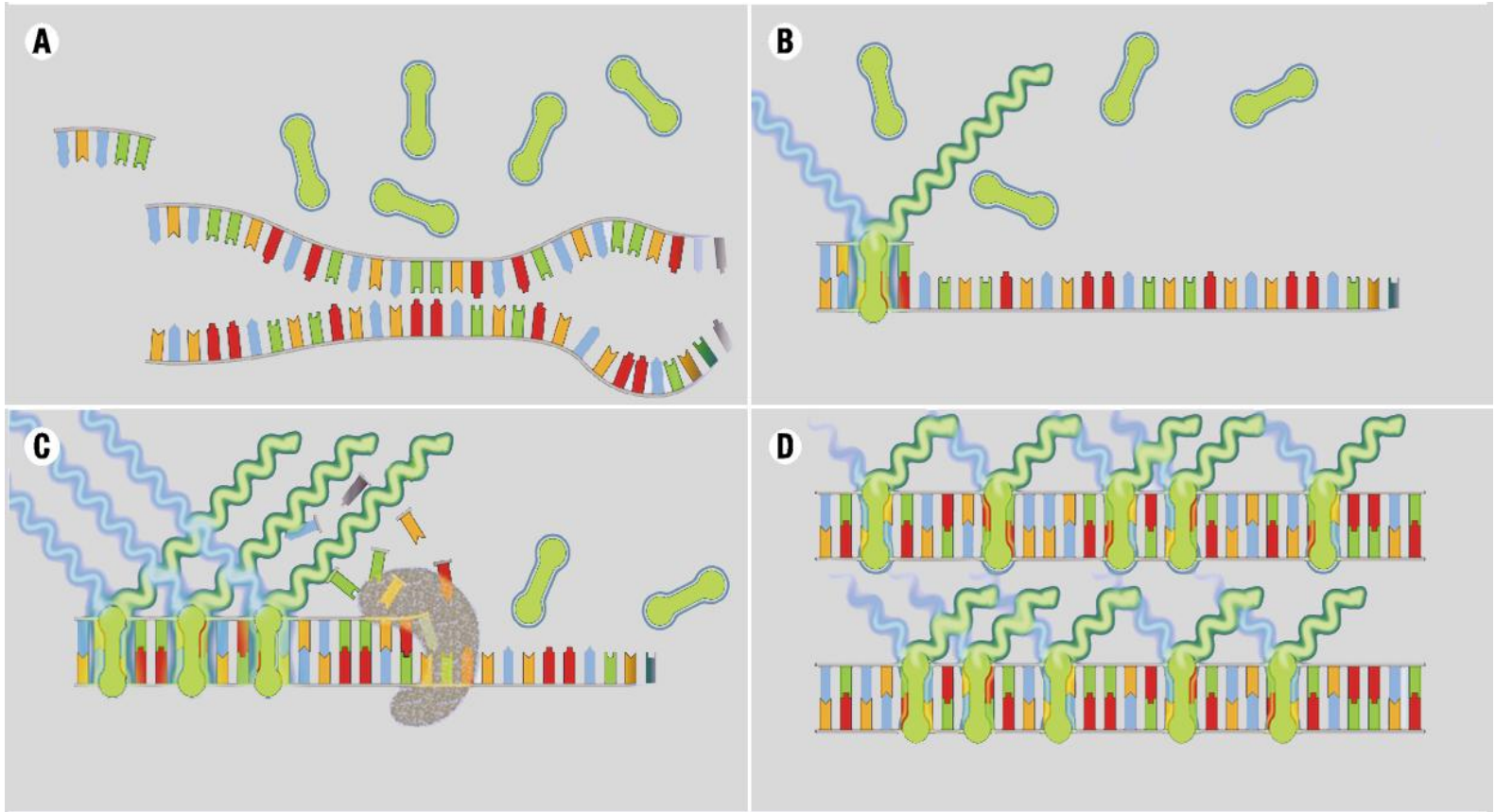
βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR και στη μέτρηση της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού κατά την διάρκεια της αντίδρασης



ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ qPCR

- 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)

Αρχή μεθόδου του συστήματος ανίχνευσης με SYBR Green



- ❑ Συνήθως στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία ενσωματώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA).
- ❑ Μια τέτοια ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR green I.
- ❑ Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm.
- ❑ Η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

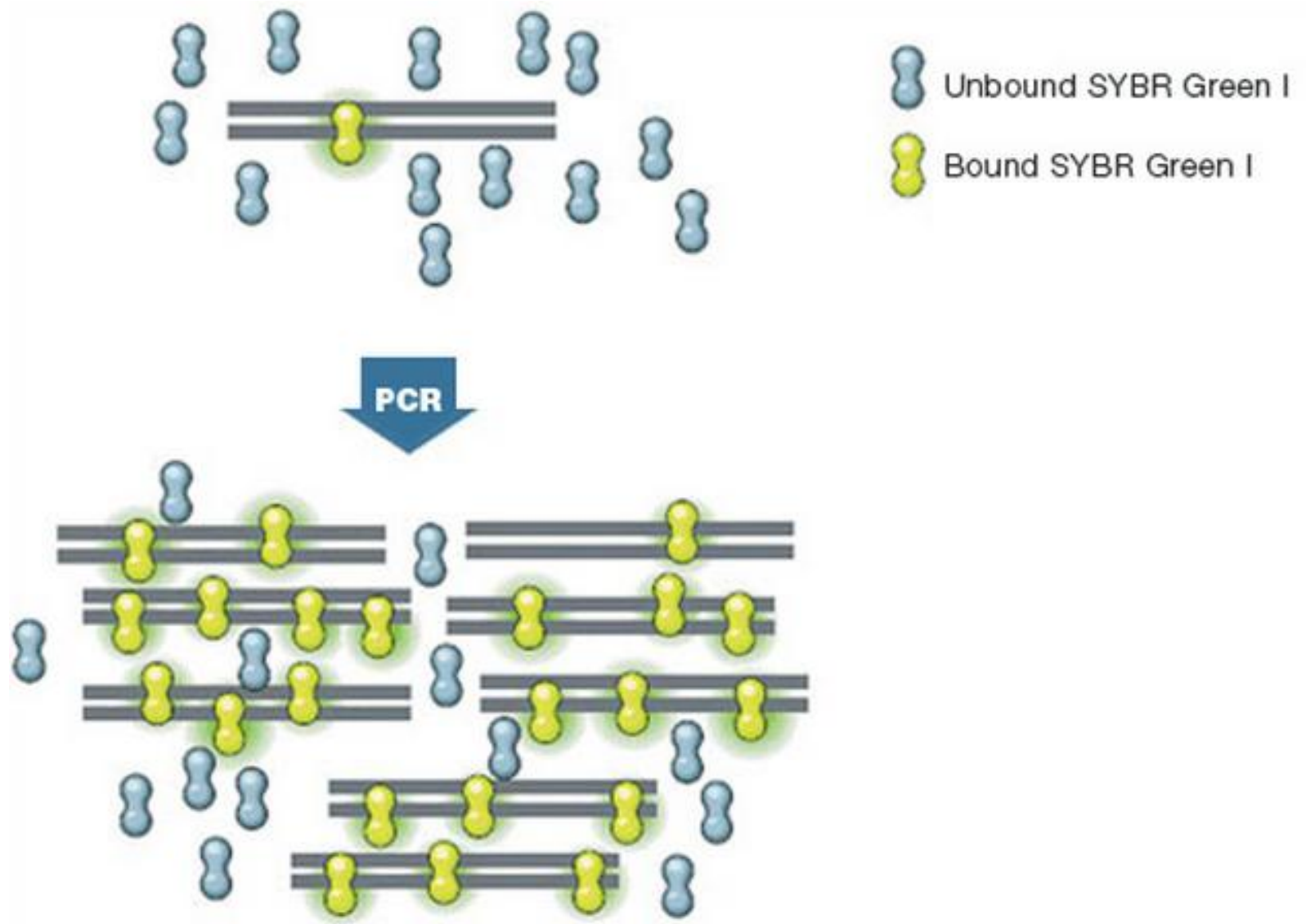
Πλεονεκτήματα της SYBR green:

- δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe).
- μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του προκύπτοντος σήματος

Μειονέκτημα της SYBR green:

- προσδένεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν.
- λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου.

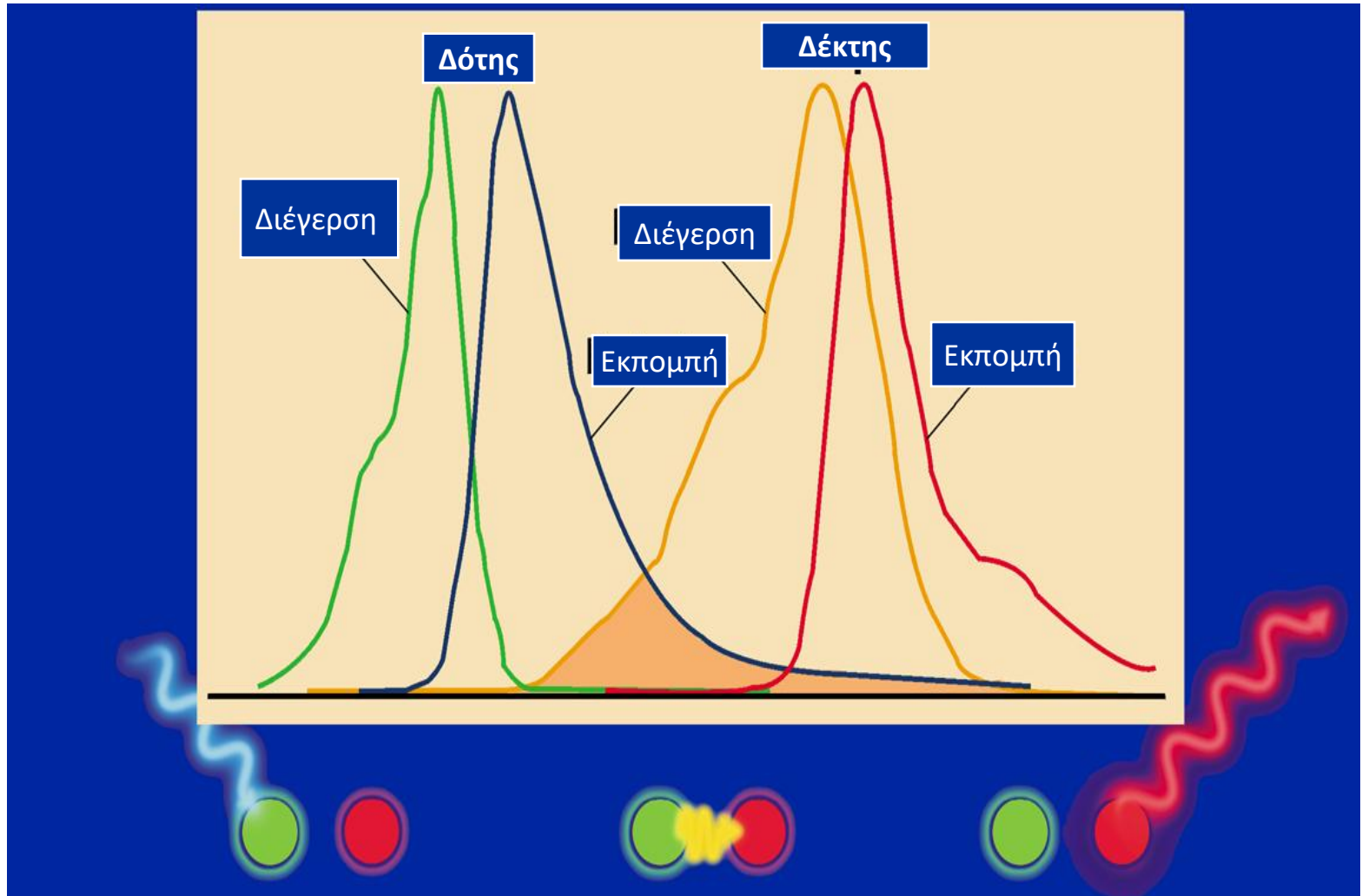
Αρχή μεθόδου του συστήματος ανίχνευσης με SYBR Green



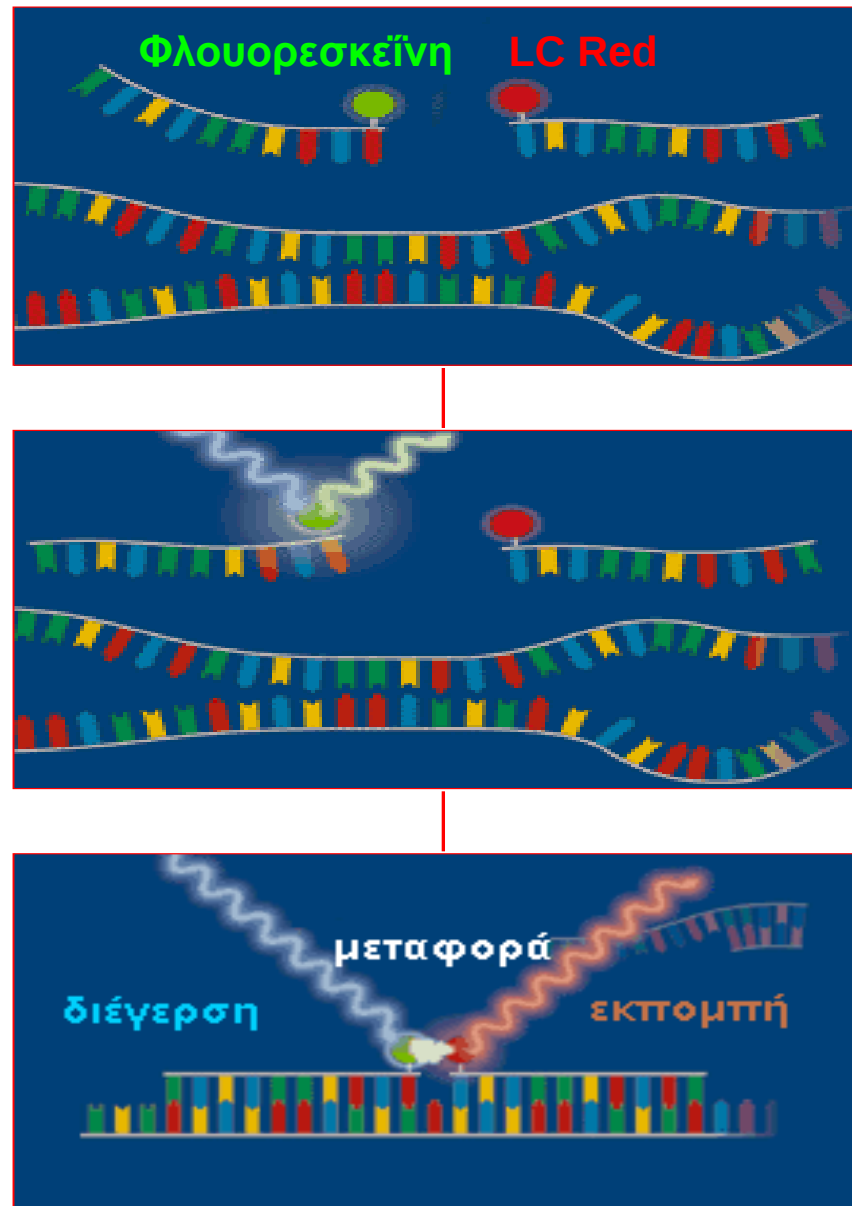
Μεταφορά ενέργειας φθορισμού λόγω συντονισμού [Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer, FRET]

- ❑ Το FRET είναι μία διαδικασία, κατά την οποία λαμβάνει χώρα μεταφορά ενέργειας από ένα φθορισμοφόρο με διηγευμένη ηλεκτρονική κατάσταση (δότης) σε ένα κοντινό δεύτερο φθορισμοφόρο (δέκτης), χωρίς όμως εκπομπή ακτινοβολίας (φωτονίου).
- ❑ Η μεταφορά ενέργειας μπορεί να λάβει χώρα σε ένα εύρος 10-100 Å και η απόδοση της μεταφοράς είναι εξαιρετικά ευαίσθητη ως προς την απόσταση μεταξύ των φθορισμοφόρων. Γι'αυτό τον λόγο το FRET είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την εξέταση αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων
- ❑ Για να συμβεί αυτό, όμως, το φάσμα εκπομπής του δότη πρέπει να επικαλύπτει το φάσμα απορρόφησης του δέκτη

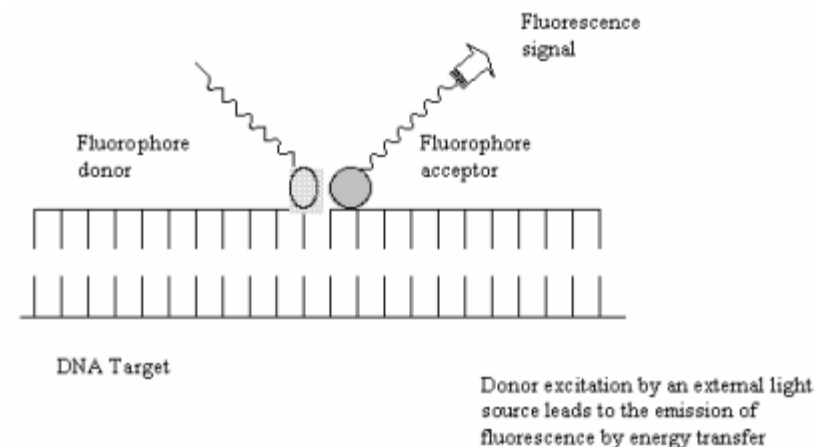
ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕ ΖΕΥΓΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ DNA

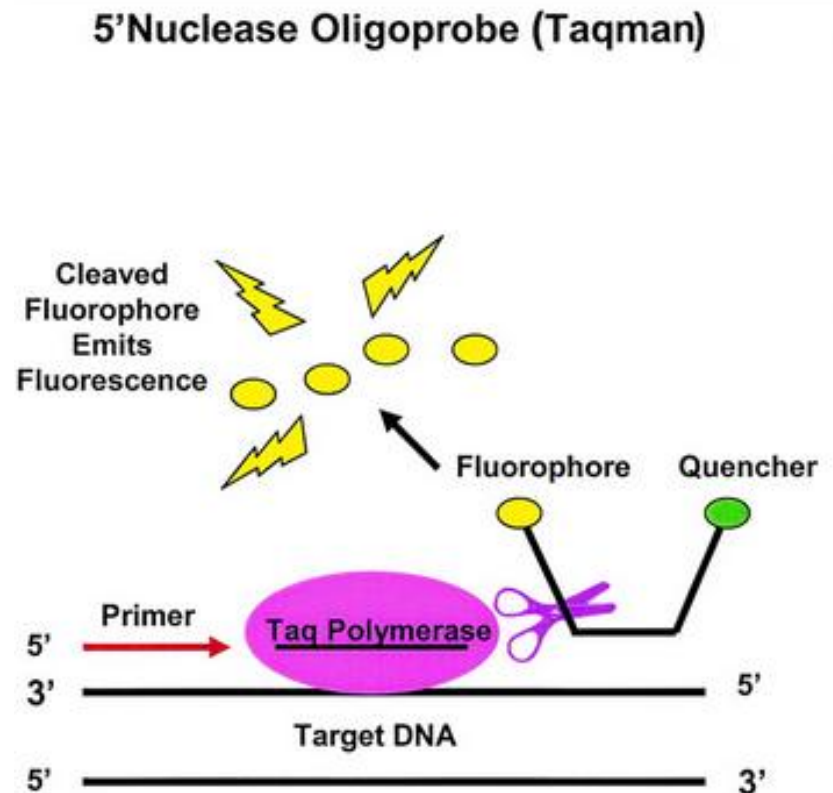
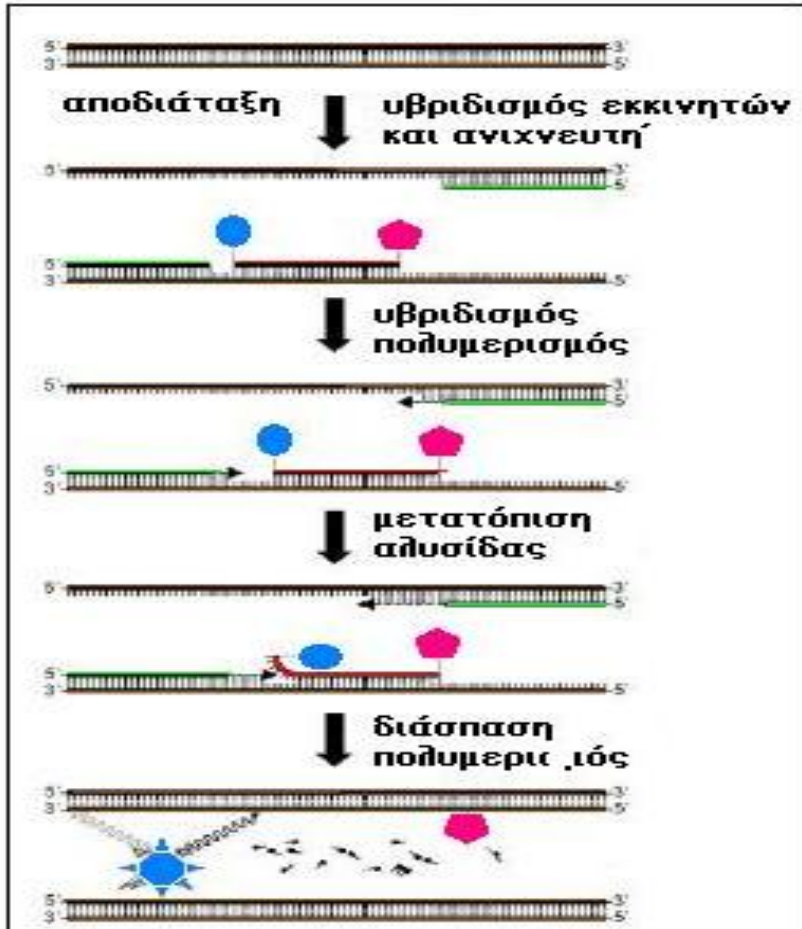


- ❑ Στη περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια: δύο εκκινητές και δύο ανιχνευτές.
- ❑ Οι ανιχνευτές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να δεσμεύονται στο προϊόν της αντίδρασης σε παρακείμενες θέσεις.
- ❑ Ο πρώτος ανιχνευτής φέρει στο 3' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που δρα ως δότης ενέργειας, ενώ ο άλλος ανιχνευτής φέρει στο 5' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που δρα ως δέκτης ενέργειας.
- ❑ Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ενίσχυσης, οι δύο ανιχνευτές προσδένονται στο προϊόν, με αποτέλεσμα τη γειτνίαση των δύο φθορίζόντων μορίων και τη μεταξύ τους μεταφορά ενέργειας μέσω φθορισμού (FRET).
- ❑ Η μεταφορά ενέργειας από την μια χρωστική (δότης) στην άλλη (δέκτης) οδηγεί στην παραγωγή φθορισμού σε διαφορετικό μήκος κύματος.
- ❑ Η ένταση του παρατηρούμενου φθορισμού είναι ανάλογη του συνολικού DNA που παράγεται κατά την αντίδραση.



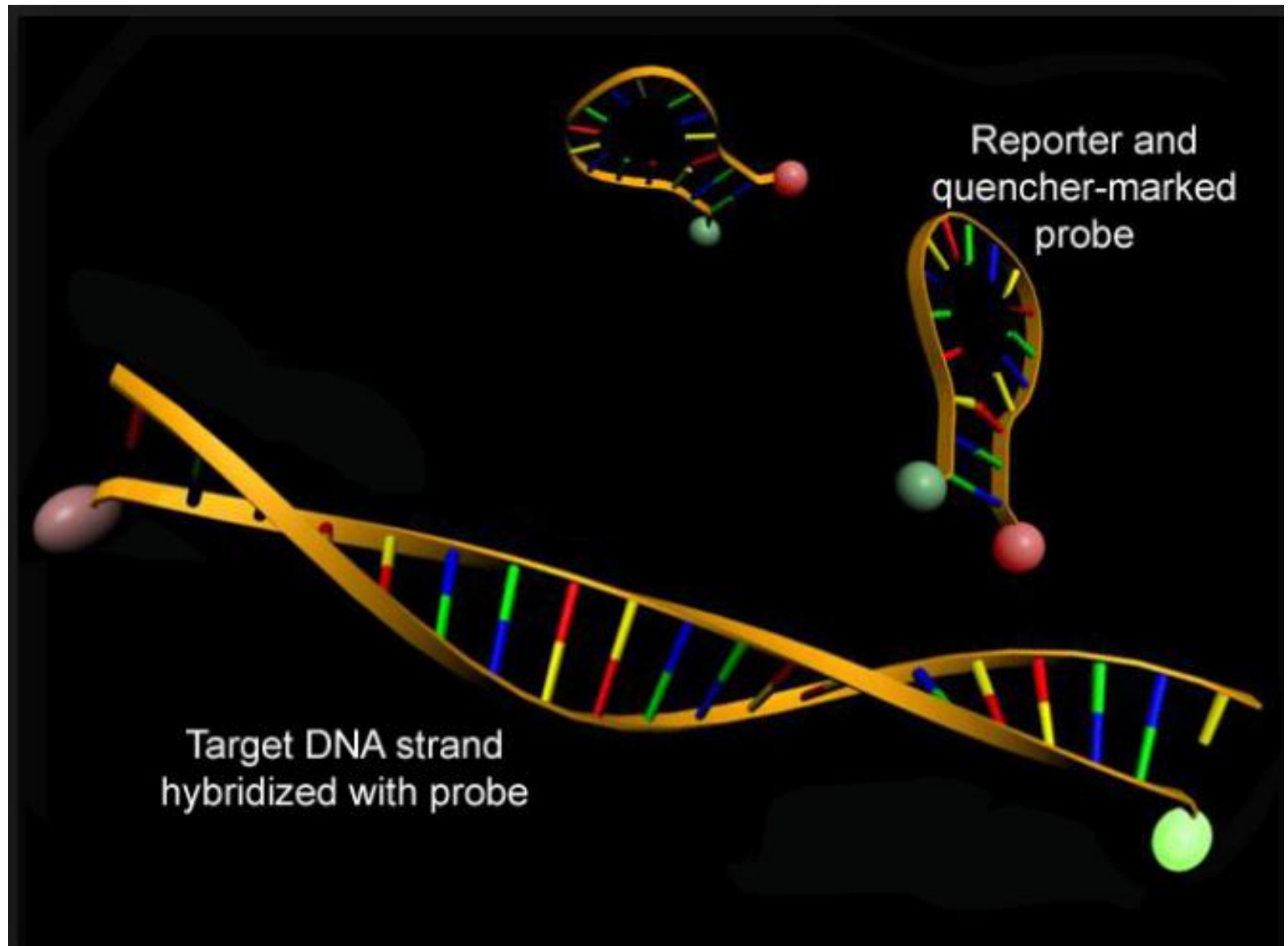
Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτή υδρόλυσης (τύπου TaqMan)



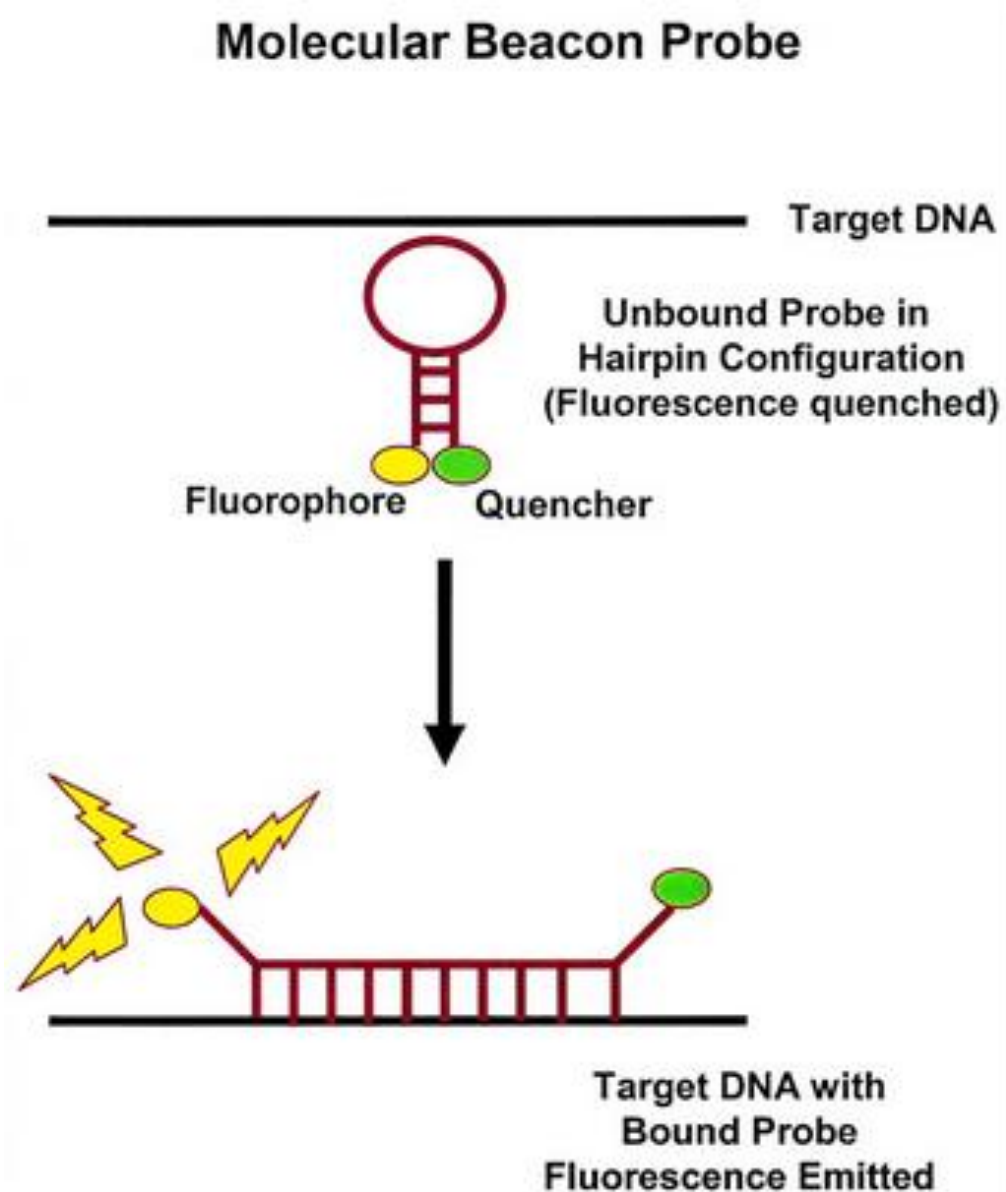
- ❑ Στη συγκεκριμένη περίπτωση, γίνεται χρήση τριών ολιγονουκλεοτιδίων: δύο εκκινητών και ενός ανιχνευτή που αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά σε εσωτερική αλληλουχία του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος της PCR.
- ❑ Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δράση 5'-νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιείται για την υδρόλυση του ανιχνευτή.
- ❑ Ο ανιχνευτής είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει στο 5' άκρο του μια χρωστική που φθορίζει και στο 3' άκρο του μια άλλη χρωστική η οποία απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από την πρώτη. Έτσι, όταν ο ανιχνευτής είναι άθικτος δεν παρατηρείται φθορισμός. Όμως, ο πολυμερισμός κατά την αντίδραση ενίσχυσης, οδηγεί στην αποκοπή του άκρου του ανιχνευτή, από τη πολυμεράση, και κατ'έπείταση στη διακοπή της αλληλοεξουδετέρωσης του σήματος, με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού.
- ❑ Καθώς ο πολυμερισμός συνεχίζεται αυξάνονται τα φθορίζοντα άκρα του ανιχνευτή που απελευθερώνονται και, συνεπώς, αυξάνεται παράλληλα η ένταση του φθορισμού. Η αύξηση αυτή είναι ανάλογη με το προϊόν του DNA που παράγεται.

Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές Μοριακούς Φάρους



- ❑ Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια, των οποίων τα άκρα είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους, οπότε αφού αναδιπλωθούν, αποκτούν μια δομή που αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και μια μονόκλωνη θηλιά.
- ❑ Η αλληλουχία της θηλιάς είναι συμπληρωματική προς μια εσωτερική περιοχή της ενισχυόμενης αλληλουχίας-στόχου.
- ❑ Στο ένα άκρο, τα ολιγονουκλεοτίδια, φέρουν μια φθορίζουσα χρωστική, ενώ στο άλλο άκρο τους φέρουν ένα άλλο μόριο χρωστικής, που εξουδετερώνει το φθορίζον σήμα που παράγεται από την πρώτη.
- ❑ Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ο ανιχνευτής προσδένεται ειδικά στο προϊόν, αφού η αλληλεπίδραση μεταξύ ανιχνευτή-στόχου είναι θερμοδυναμικά πιο ευνοϊκή από την δομή θηλιάς-μίσχου του ανιχνευτή.
- ❑ Η πρόσδεση του ολιγονουκλεοτιδίου στο προϊόν της αντίδρασης οδηγεί στην απομάκρυνση των δύο μορίων χρωστικών και στην αδυναμία μεταφοράς ενέργειας μεταξύ τους μέσω FRET, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού.
- ❑ Οι Molecular beacon ανιχνευτές είναι πολύ πιο ειδικοί από τους συμβατικούς ανιχνευτές ίδιου μήκους.
- ❑ Παρουσιάζουν ευρεία εφαρμογή κυρίως στον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών, στην ποσοτικοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς επίσης και στον προσδιορισμό του φύλου των εμβρύων.

Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές Μοριακούς Φάρους



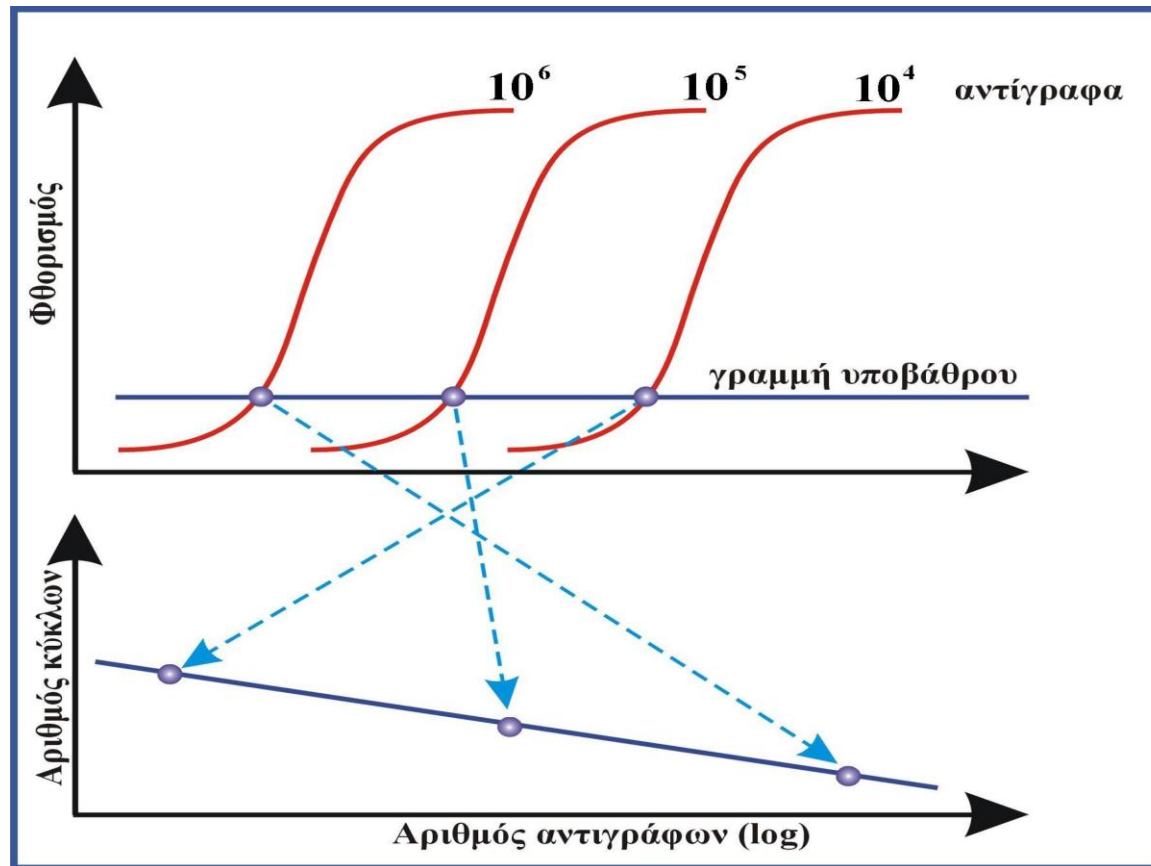
Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της PCR: η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης.

Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται μια πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με βάση διαδοχικές αραιώσεις δείγματος RNA γνωστής συγκέντρωσης. Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιείται ως καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων mRNAs.

Η κατασκευή πρότυπης καμπύλης μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων πλασμιδιακού δίκλωνου DNA, *in vitro* συντιθέμενου μονόκλωνου DNA ή cDNA το οποίο να κωδικοποιεί το γονίδιο-στόχο. Σε όλες τις περιπτώσεις, η συγκέντρωση των DNAs αυτών είναι δυνατόν να υπολογιστεί με φωτομέτρηση σε κατάλληλο μήκος κύματος (260 nm). Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη το μοριακό βάρος του χρησιμοποιούμενου DNA, η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος μετατρέπεται σε αριθμό αντιγράφων.

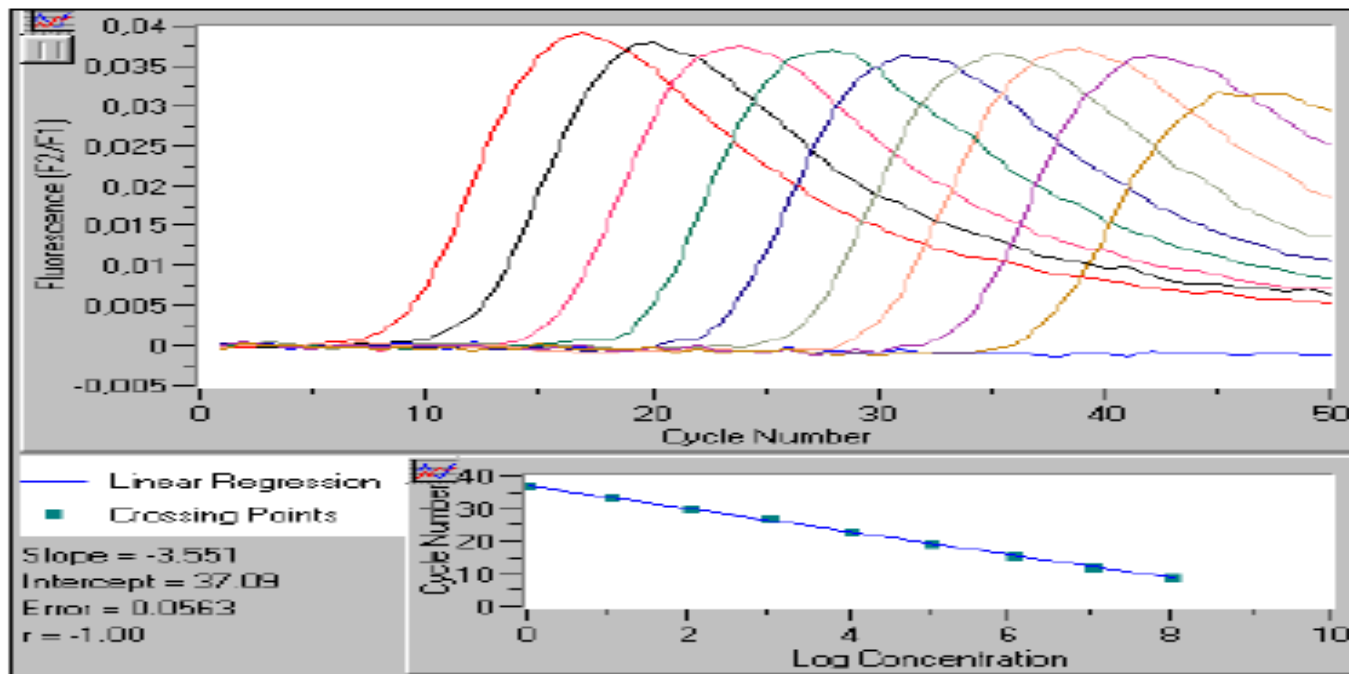
Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού με qPCR



C_q : σημείο στο οποίο η ένταση φθορισμού ξεπερνά το σήμα υποβάθρου (μέγιστο δευτέρης παραγώγου)

Το διάγραμμα βαθμονόμησης κατασκευάζεται με γραφική παράσταση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης των προτύπων συναρτήσει του αντίστοιχου C_q

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ



■ Το διάγραμμα βαθμονόμησης κατασκευάζεται με γραφική παράσταση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης των προτύπων συναρτήσει του αντίστοιχου C_p.

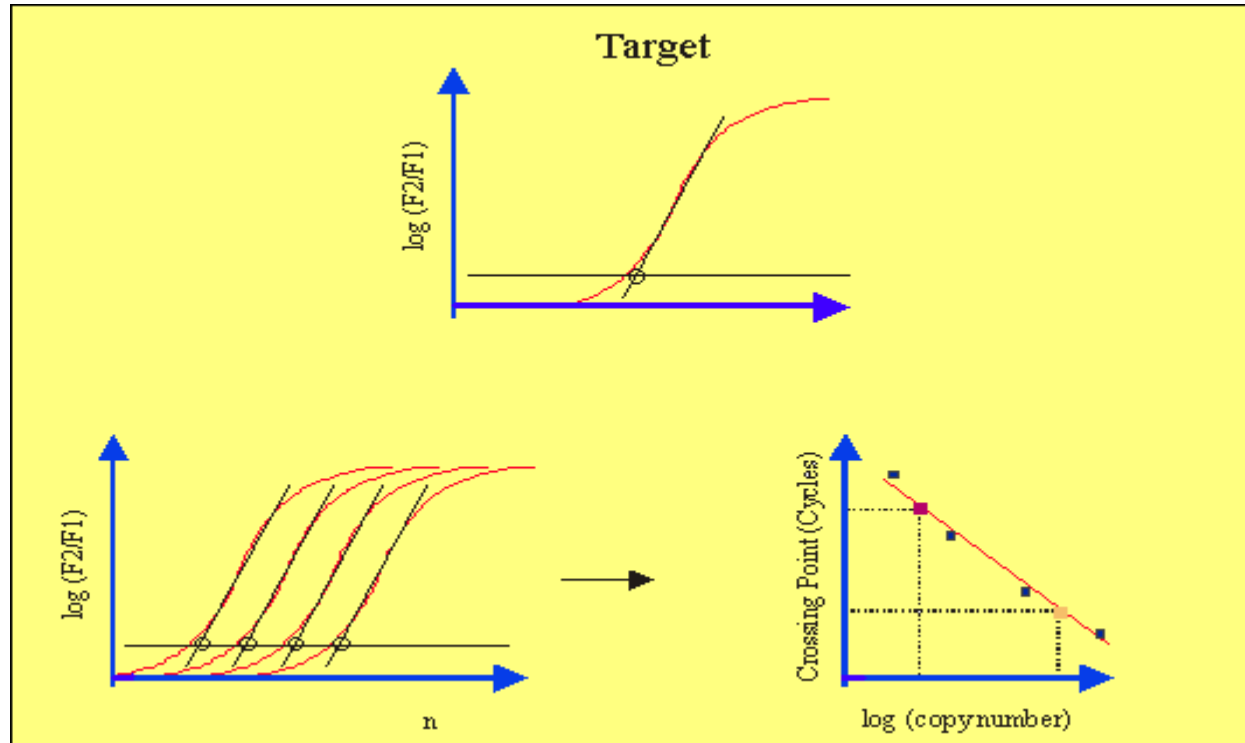
■ Η απόδοση της PCR δίνεται από τον τύπο: $E = 10^{-1 / \kappa \lambda \iota \sigma \eta}$.

■ Ευρεία δυναμική περιοχή: 1×10^8 ως 1×10 copies/ μ L.

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 αναστολές της PCR που πιθανόν να υπάρχουν στο δείγμα.

Q-PCR με χρήση εσωτερικών προτύπων

Εσωτερικά πρότυπα μη ανταγωνιστικού τύπου

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

Σχετική ποσοτικοποίηση

- ❑ οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA ενός γονιδίου-στόχου, προσδιορίζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενός παράλληλα ενισχυόμενου mRNA, ενός κατάλληλου ενδογενούς συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου-ελέγχου (internal control).
- ❑ Οι τιμές C_q του mRNA-στόχου, τόσο των δειγμάτων προς εξέταση όσο και του δείγματος-αναφοράς, κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες τιμές του ενδογενούς γονιδίου-ελέγχου. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην αποδοτικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης.

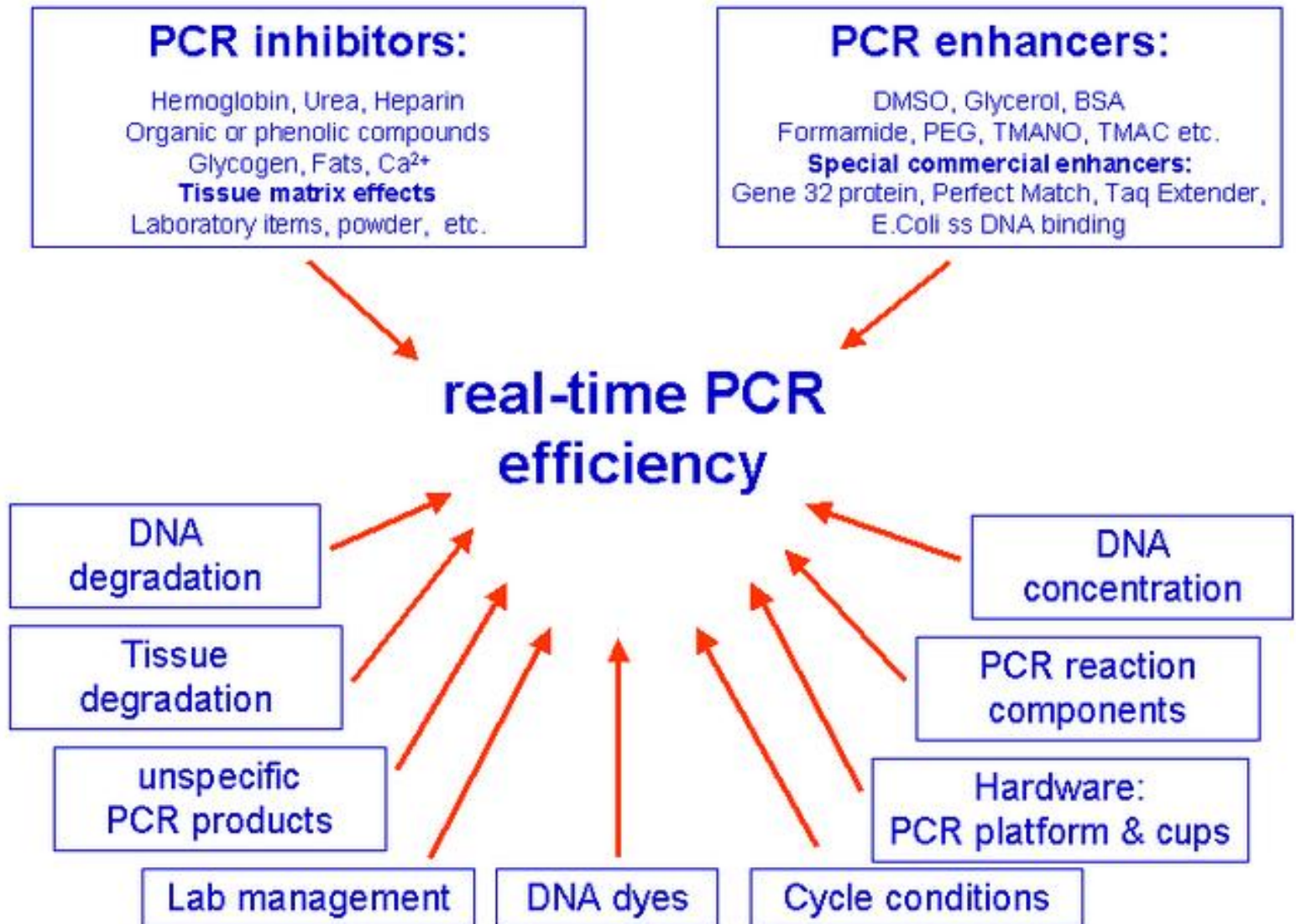
Η χρήση εσωτερικού προτύπου (γονίδιο αναφοράς) διορθώνει διαφορές που οφείλονται σε :

- 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

qPCR Efficiency



Digital PCR

- First paper on digital PCR published in 1999, Bert Vogelstein and 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

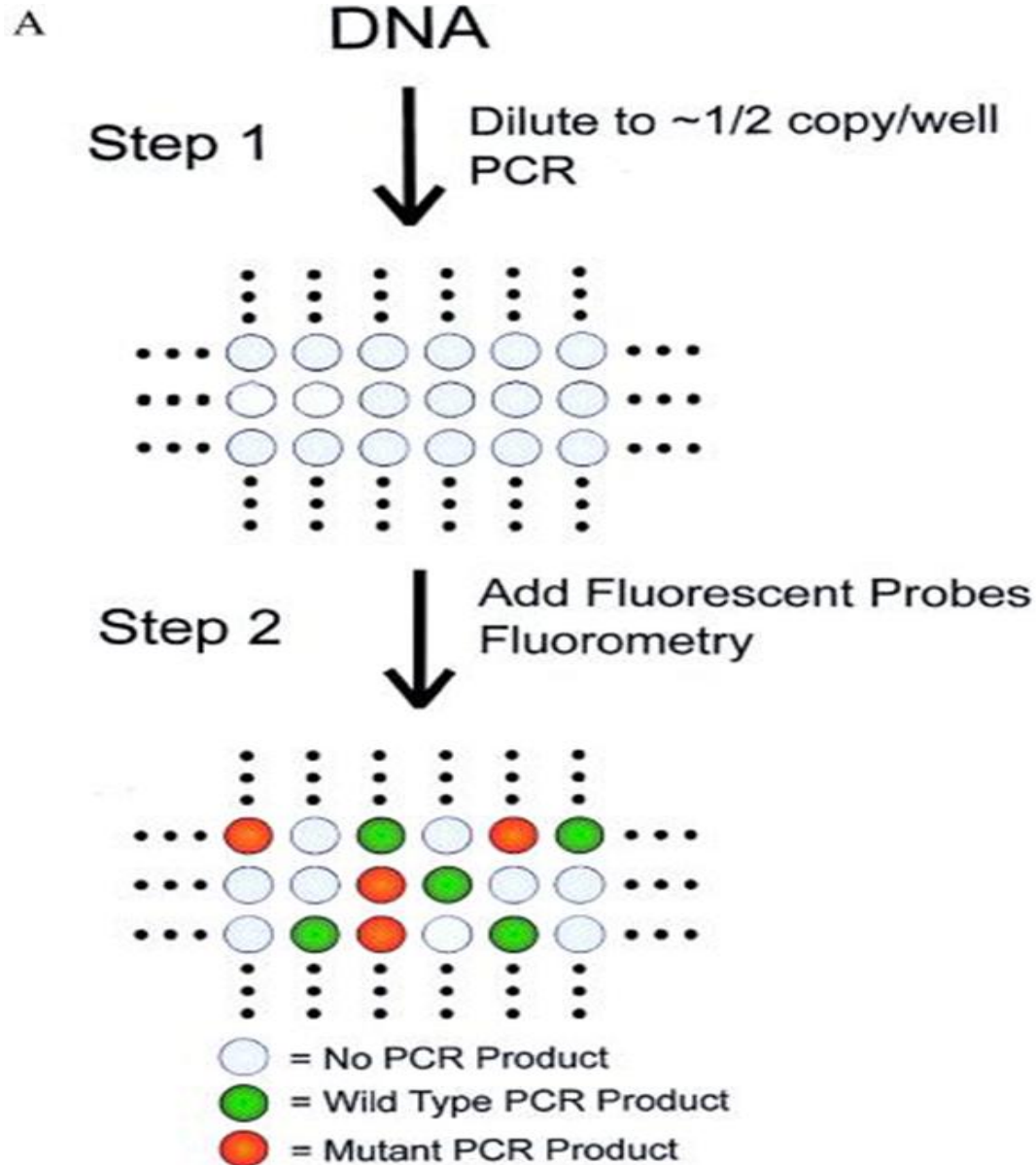
DIGITAL PCR

- Digital polymerase chain reaction (digital PCR, DigitalPCR, dPCR, or dePCR) is a biotechnological refinement of conventional PCR
- With dPCR we can directly quantify and clonally amplify nucleic acids strands including DNA, cDNA, or RNA.
- The key difference between dPCR and traditional PCR lies in the method of measuring nucleic acids amounts
- dPCR is more precise than PCR. A "digital" measurement quantitatively and discretely measures a certain variable, whereas an "analog" measurement extrapolates certain measurements based on measured patterns.
- dPCR also carries out a single reaction within a sample, however the sample is separated into a large number of partitions and the reaction is carried out in each partition individually.
- This separation allows a more reliable collection and sensitive measurement of nucleic acid amounts.

Digital PCR main advantages

- **Absolute quantification**
- **Better accuracy**
- **Higher sensitivity**
- **No need for calibration curves**
- **Less prone to experimental errors**
- **Closed tube**
- **mutiplexing**

Droplet ddPCR - main principles



Droplet dPCR - main principles



One measurement



Nanodroplet PCR reactions
are independent, single
amplification events



Many thousands
of discrete measurements

Droplet dPCR - main principles



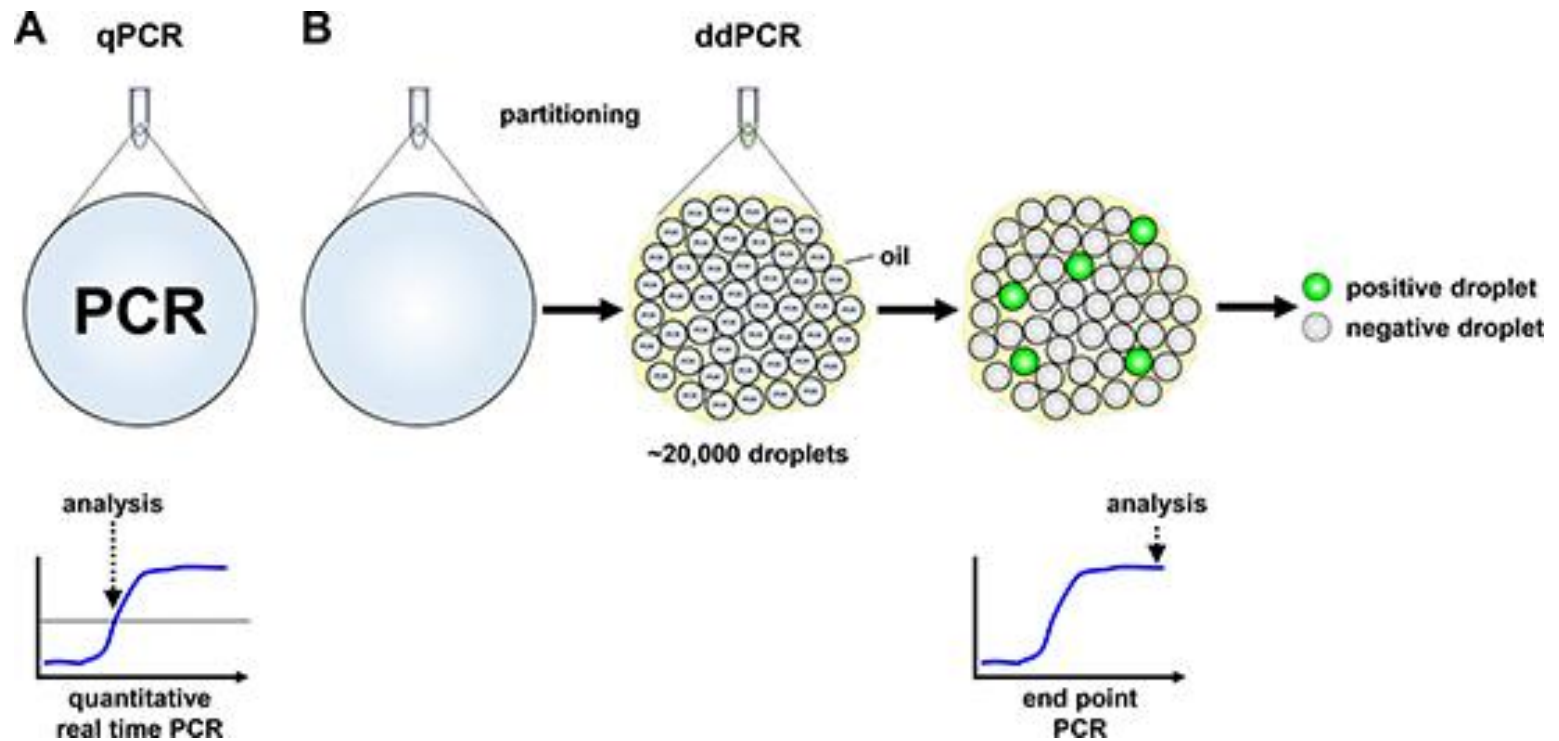
Traditional PCR:
One fluorescence
measurement

VS.

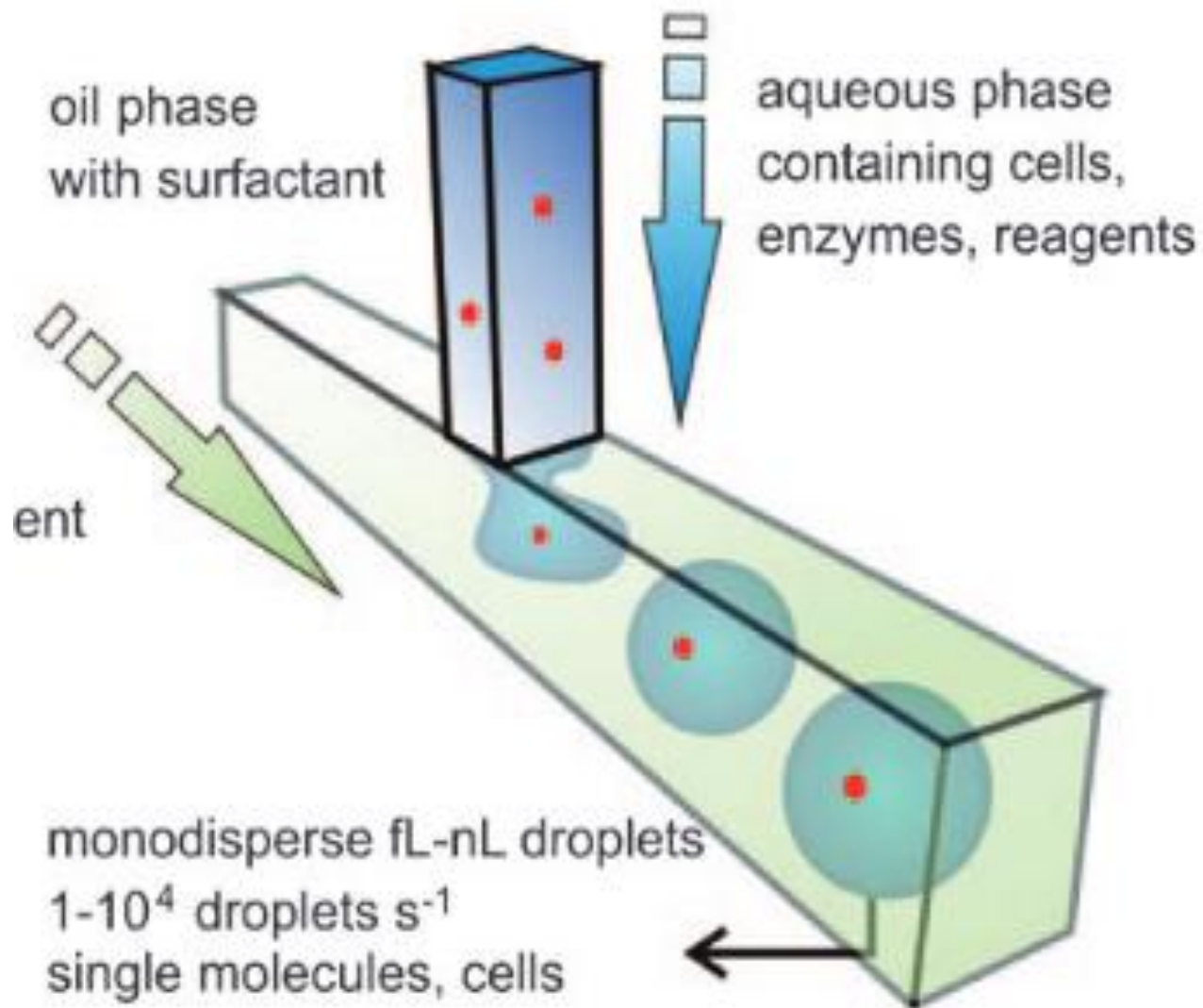


Digital PCR:
Thousands of distinct
fluorescence measurements

Droplet dPCR - main principles



Droplet ddPCR - main principles



Droplet ddPCR - main principles

videos

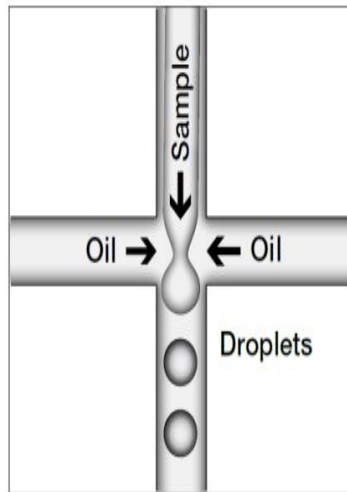
<https://www.youtube.com/watch?v=Qqdmw3wvMFo>

https://www.youtube.com/watch?v=KE8nhJSkG_4

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

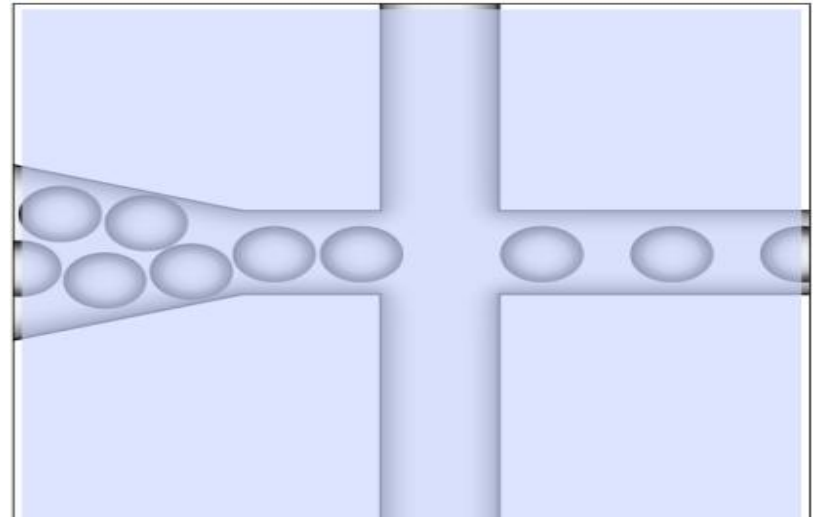
Bio-Rad - QX200™ Droplet Digital™ PCR System

1. QX Droplet Generator –



2. classic PCR in a thermocycler

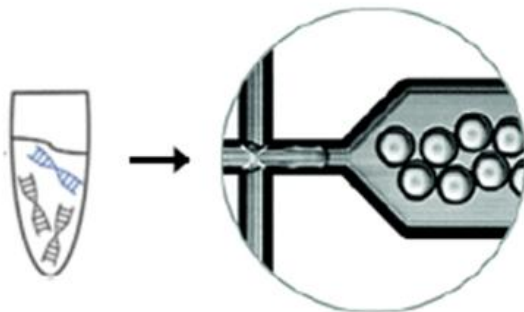
3. QX Droplet Reader-



Bio-Rad - QX200™ Droplet Digital™ PCR System

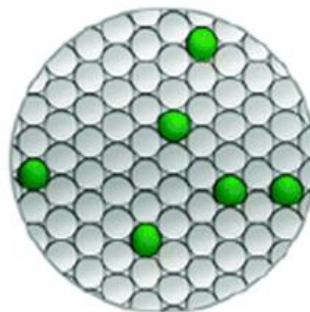


Droplet digital PCR



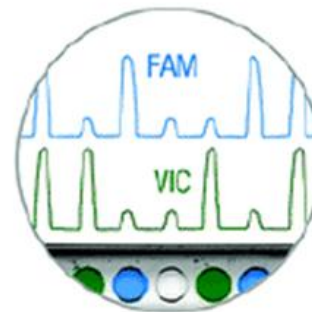
1. MAKE

Sample is partitioned into 20,000 droplets



2. CYCLE

Run PCR cycles in all droplets simultaneously



3. READ

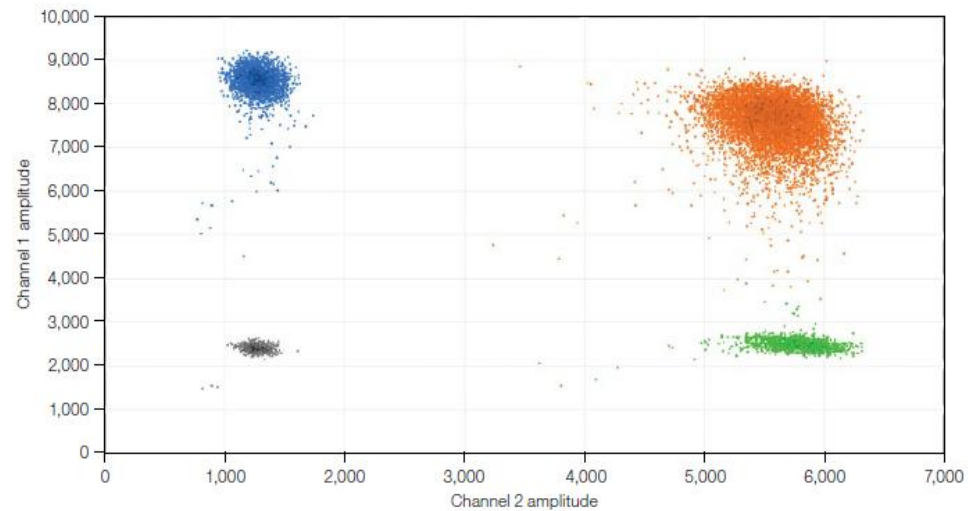
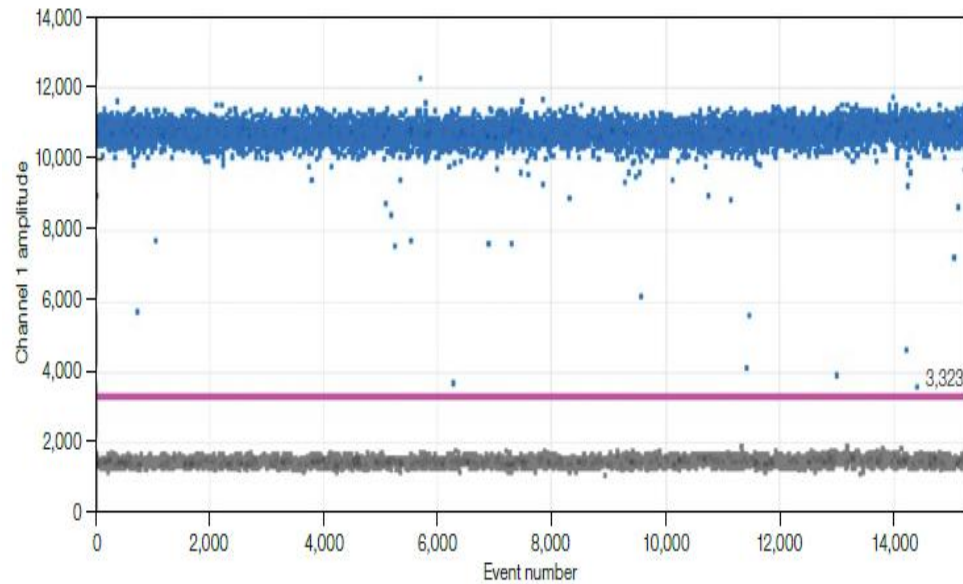
Measure fluorescence intensity in each droplet



Bio-Rad QX100

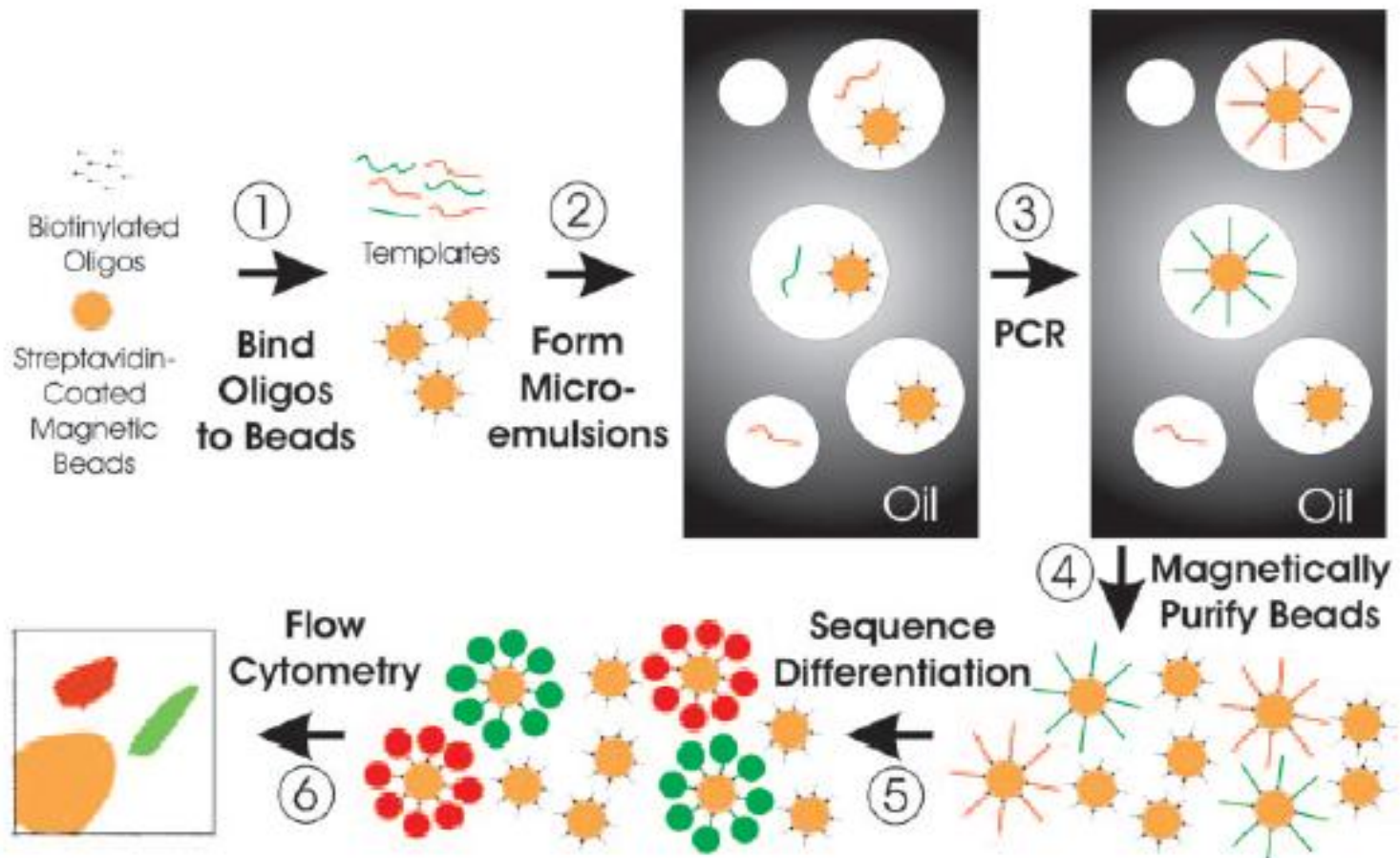
Calculate concentration from number of positive droplets

Bio-Rad - QX200™ Droplet Digital™ PCR System



“BEAMing”

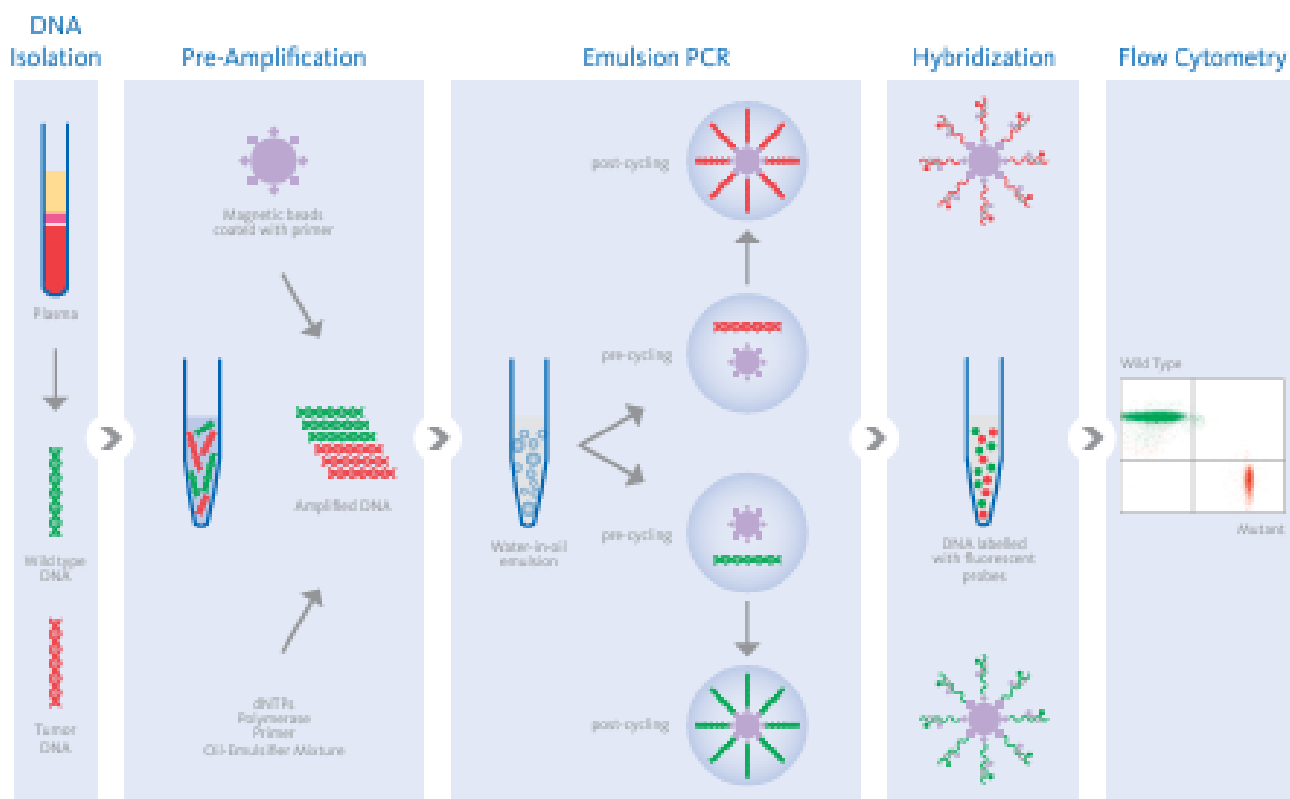
- Kinzler και Vogelstein , 2003
- Beads – Emulsion - Amplification – Magnetics
- Sysmex- Oncobeam technology



Sysmex- OncoBEAM technology

■ [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/Business_Lines/Brochure/Sysmex_Inostics_BEAMing_performance_EU_01.pdf](https://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/Business_Lines/Brochure/Sysmex_Inostics_BEAMing_performance_EU_01.pdf)

OncoBEAM™ Technology: BEAMing Digital PCR



Sysmex Inostics' BEAMing Digital PCR technology combines emulsion PCR with magnetic beads and flow cytometry for the highly sensitive detection of mutant tumor DNA molecules.

Bio-Rad - QX200™ Droplet Digital™ PCR System

multiplexing

VIDEO

<https://www.youtube.com/watch?v=fIJ9sslACk0>

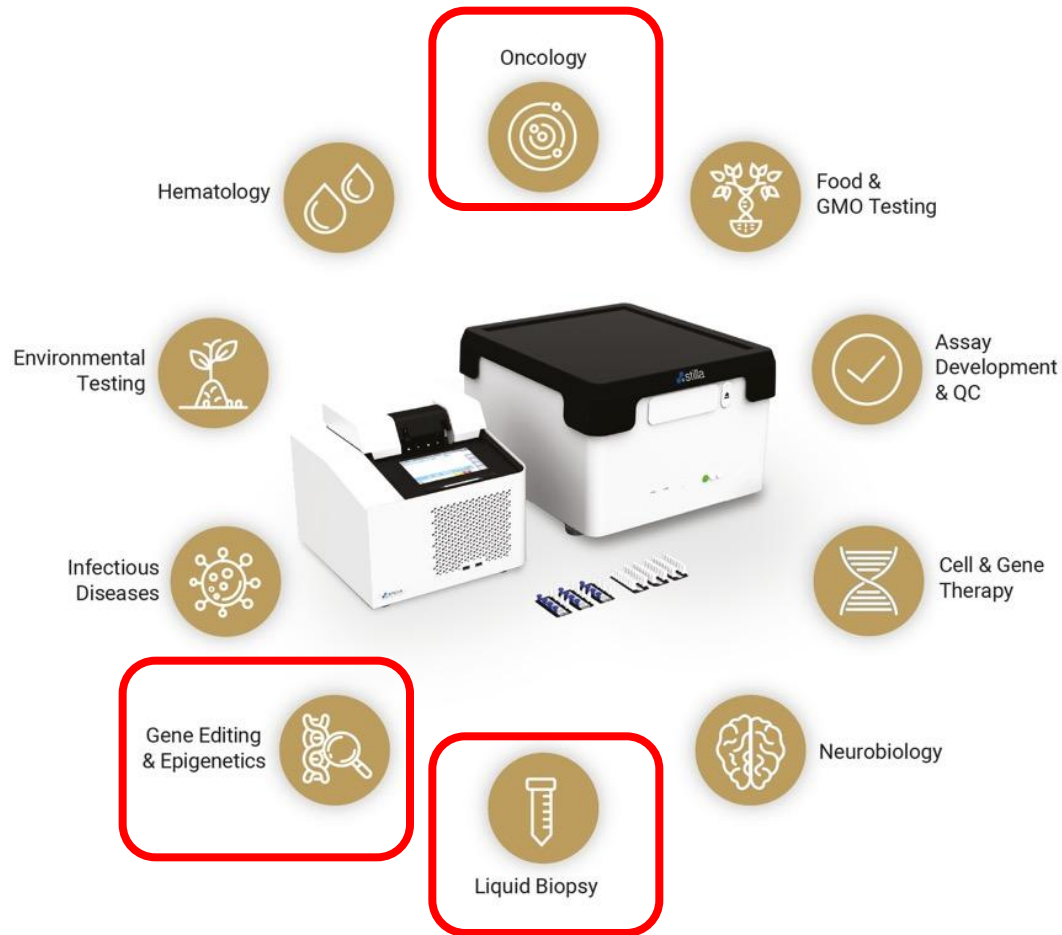
The naica™ system STILLA technologies



THE UNIQUE FEATURES OF THE NAICA™ SYSTEM:

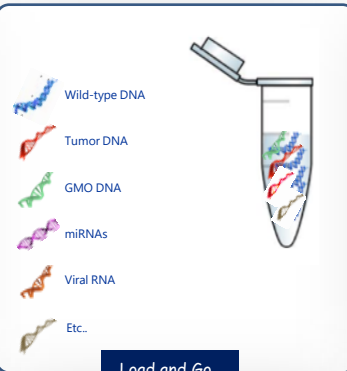
1. An easy-to-use and integrated solution for digital PCR
2. Fast time-to-result (2h 30min)
3. Reliable multiplex assays with 6-color detection

A wide range of applications

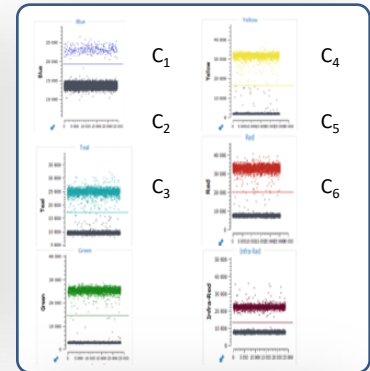
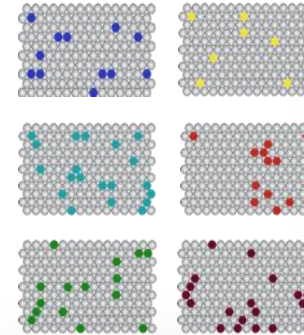
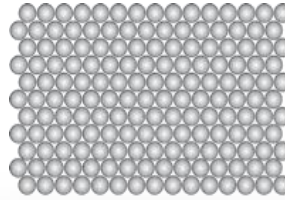


Major steps to perform crystal digital PCR™

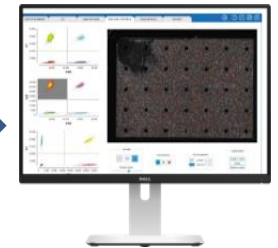
CRYSTAL DIGITAL PCR™ STEP



Droplet crystal:
Self-assembled
array of droplets



NAICA® SYSTEM WORKFLOW



PROCESS TIME

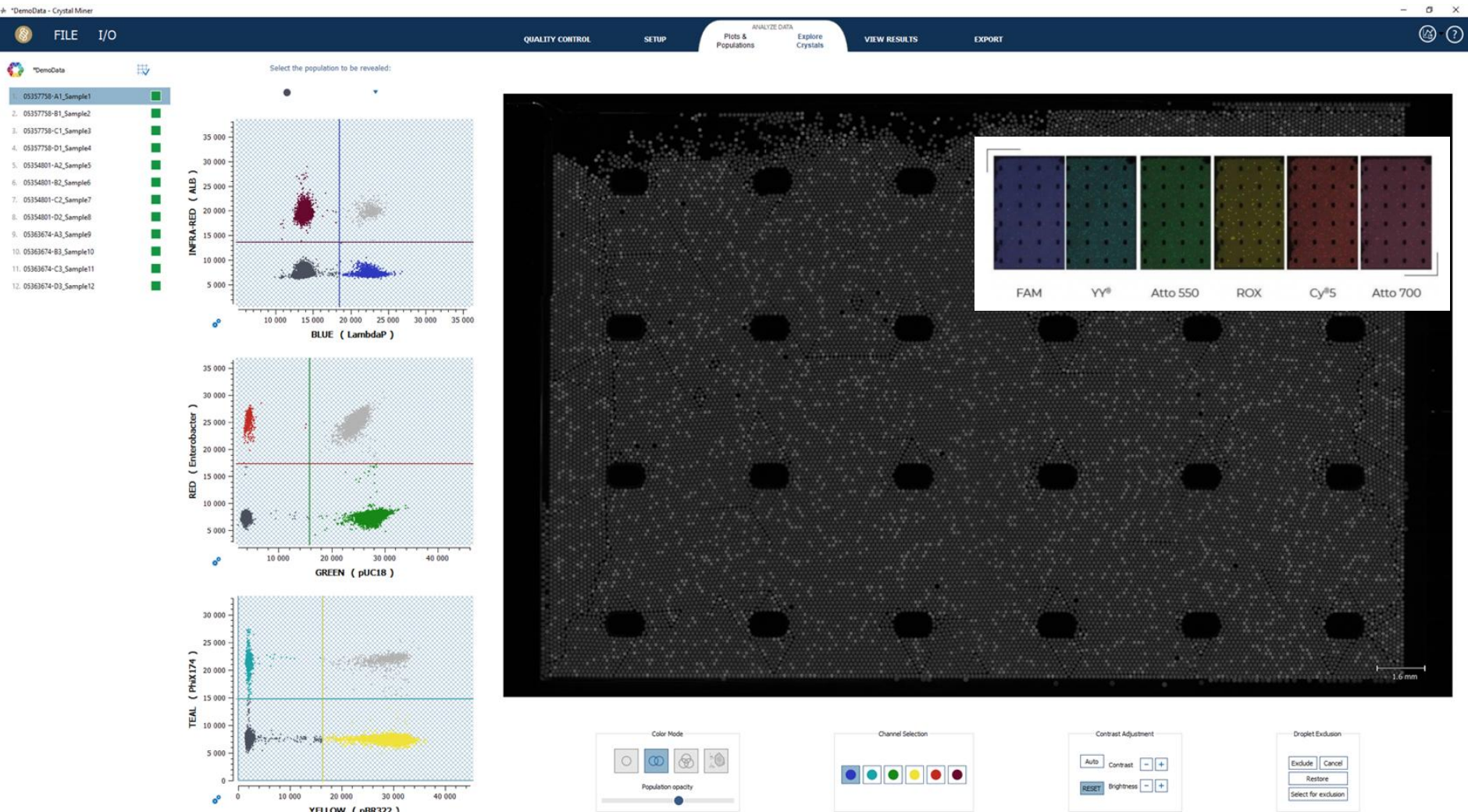
Less than 3h

HANDS-ON TIME

Less than 10min



Data analysis using the Crystal Miner software



PCR APPLICATIONS

PCR-based technologies are used every day in clinical diagnostics, forensic investigations, and agricultural biotechnology. These applications require reliable performance, superb sensitivity, and stringent specifications. As such, thermal cyclers and reagents must be compliant to and specially designed for these purposes. Examples of molecular diagnostics include genetic testing, detection of oncogenic mutations, and testing for infectious diseases. In forensics, human identification by PCR relies on amplification of unique short tandem repeats (STRs) on gDNA to differentiate individuals. In agriculture, PCR plays an integral role in food pathogen detection, plant genotyping for breeding, and GMO testing.