

## Dijital PZR ve kullanım alanları

### Digital PCR and applications

Ahmet ÇARHAN<sup>1</sup>, Elif ERCAN<sup>1</sup>, Tuğba YALÇINKAYA<sup>1</sup>

#### ÖZET

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), DNA kompleks havuzundan spesifik bir DNA parçasını çoğaltmaya olanak sağlayan basit, etkin ve özellikle moleküler biyoloji alanında yaygın olarak kullanılan enzimatik bir tekniktir. PZR tekniğinin keşfinden günümüze kadar gelişen teknolojiyle birlikte pek çok PZR tekniği ortaya çıkmıştır. Bu tekniklerden bazıları Gerçek Zamanlı PZR, Kantitatif PZR, Ters Transkriptaz PZR, Nested PZR ve Multipleks PZR dir. Günümüze kadar geliştirilmiş PZR tekniklerinin çeşitli zorlukları yüzünden PZR tekniklerinin kullanım alanını genişletmek ve daha ileri seviye PZR teknikleri bulmak araştırmacıların birinci önceliği haline gelmiştir. Nadir mutasyonların, kopya sayısı varyasyonlarındaki ufak değişikliklerin, gen ifadesi değişiklikleri arasındaki farklılıkların veya metilasyon durumunun değerlendirilmesine izin veren yeni bir yöntem olarak dijital PZR (dPZR) teknolojisi geliştirilmiştir. Dijital PZR, DNA kopya sayısının hassas ölçümü için PZR bazlı yeni bir tekniktir ve örnekleri az sayıda seyrelterek çok sayıda PZR gerçekleştirmeye olanak sağlar ve her birinde ayrı ayrı PZR gerçekleşen çok sayıda küçük bölümlere sahiptir. Aynı zamanda dPZR; şu an çok az miktardaki genetik materyalin miktarını dakikalar içinde tespit etme performansı ile birçok nicel yöntemleri geride bırakmıştır. Tek molekülü sayma stratejisi sayesinde bu yöntem yüksek hassasiyet gösterebilmektedir. Güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik

#### ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR), is a simple, effective and widely used enzymatic technic especially in the field of molecular biology which provides the opportunity to amplify a specific DNA fragment from DNA complex pool. Several PCR techniques such as real-time PCR, quantitative and qualitative PCR, Reverse Transcriptase PCR, Nested PCR and multiplex PCR have been developed since the first invention of PCR. Due to the various difficulties of the PCR techniques developed so far, widening the application fields and finding out more advanced level of PCR techniques have become the first priority of the researchers. Digital PCR (dPCR) technology has been developed as a new method to permit the evaluation of the small changes in the copy number variations of the rare mutations, differences between the gene expression changes or state of methylation. Digital PCR is a PCR based new technique for the sensitive measurement of number of DNA copies, it provides opportunity to do large number of PCR with a few number of sample dilution and it has so many small compartments where separate PCRs are executed in each. At the same time, dPCR leaves some of the quantitative methods behind with the performance of determining the quantity of small amount of genetic material within seconds. This method shows high

<sup>1</sup> Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Ahmet ÇARHAN

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA

Tel : +90 505 874 56 82

E-posta / E-mail : ahmet\_carhan@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 12.11.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 25.02.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.48902

Çarhan A, Ercan E, Yalçinkaya T. Dijital PZR ve kullanım alanları. Türk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 183-98.

düzeyi oldukça yüksek bir yöntem olmasıyla da dikkat çekmektedir. Bu derleme, digital PZR yönteminin günümüze kadar olan süreçteki gelişimine ve ilerleyen günlerde çözüm bulunması gereken eksik yönlerine dikkat çekmeyi amaçlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Dijital PZR, Nadir Mutasyon, dMIQE Kuralları

sensitivity with the strategy of counting single molecule. It also attracts the attention as a method having quite a high reliability and repeatability level. This review aims to give insight for dPCR development history and the possible difficulties came across in its application.

**Key Words:** Digital PCR, Rare Mutation, dMIQE rules

## GİRİŞ

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) keşfedildiğinden bu yana biyoloji bilimi kökten değişmiştir (1). Bu teknik adını, DNA Polimeraz enzimi kullanılarak DNA'nın bir parçasını in vitro yöntemle çoğaltılmasından almaktadır. PZR sayesinde birkaç farklı düzenlemeyle üretilen DNA parçasının milyonlarca kopyası arasından, istenilen bir DNA parçasının bir tek veya birkaç kopyasını laboratuvar ortamında çoğaltabilmek mümkündür.

PZR genetik işlemlerin geniş bir yelpazede değiştirebilmesine olanak sağlar (2). Yaygın kullanımı nedeniyle PZR'nin temel prensiplerini, genomun ve genlerin gelişmiş şekilde analizini nasıl modifiye ettiğini anlamak önemlidir (3).

PZR, özellikle moleküler biyoloji alanında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (2). PZR hedefli stratejiler ile İnsan Genom Projesi gibi kapsamlı araştırmalar yürütülmüş, tıbbi alanda da klinisyenler ve araştırmacılar tarafından gen dizileri, hastalıkların teşhisi gibi nitel-nicel ve genomik çalışmalarda kullanılmıştır. Yöntemin hassas ve hızlı olması büyük avantaj sağlamaktadır. Klasik PZR, mikrobiyolojide patojenlerin tespiti ve adli tıpta suçluların tanımlanması gibi alanlarda da kullanılmaktadır (3).

PZR ile ilgili bilgiler ilk olarak 1985'de rapor bildirilmiştir (4). 1993 yılında, Mullis PZR üzerine

çalışmalarından dolayı Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür. DNA'nın belirli bir parçasını izole etmek için kullanılan tekniklerin zaman alıcı olması nedeniyle PZR yöntemine ihtiyaç duyulmuştur. Diğer bilim adamları da sınırsız ve kusursuz bir şekilde genetik materyali elde etmek için güçlü bir teknik arayışına girmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda Polimeraz Zincir Reaksiyonunu geliştirerek başarılı olmuşlardır (5).

### PZR'nin Genel Mekanizması

PZR, DNA kompleks havuzundan spesifik bir DNA parçasını çoğaltmaya olanak sağlayan basit ve neredeyse kusursuz, enzimatik bir işlemdir. PZR işlemini kavramsallaştıran Kary Mullis PZR yöntemini "DNA'nın yalnızca ilgilendiğiniz bir parçasını istediğiniz kadar almanıza olanak sağlıyor" şeklinde açıklamıştır. PZR yönteminde periferik kan, deri, saç, tükürük ve mikroorganizma olmak üzere farklı tipte hayvansal ve bitkisel kökenli materyal DNA kaynağı olarak kullanılmaktadır. PZR için gerekli olan DNA miktarının elde edilmesi ve yalnızca yeterli miktarda kopyanın analiz edilmesi geleneksel laboratuvar yöntemleri ile sağlanır. Bu nedenle PZR hassas bir yöntemdir (3).

PZR yöntemlerinde termal döngü cihazı kullanılmaktadır. Termal döngü belirli bir diziyeye

sahip PZR örneğinin ısıtılması ve soğutulmasıdır. PZR'nin termal döngüsü; DNA erime sıcaklığı ve DNA replikasyon enzimleri için ısıtma ve soğutma reaksiyonlarının tekrar tekrar uygulanmasıyla ısıya dayanıklı DNA Polimeraz, primer dizi (tamamlayıcı hedef bölge) ve dNTP karışımı kullanılmasına dayanır. Böylelikle, milyonlarca kopya DNA'nın çoğaltılması gerçekleştirilmiş olur. Denatürasyon, bağlanma ve uzatma işlemleriyle hem orjinal DNA şablonuna ve hem de tamamlayıcı bölgeye bağlanabilen primer ile yeni iplikler sentezlenmesine devam edilir ve DNA yeni kopyalar üretmek için uzatılır. Sonuç olarak PZR primer dizileri içeren DNA parçaları üstel olarak artmış olur (6-8).

#### PZR Çeşitleri

PZR tekniğinin bulunmasından günümüze kadar gelişen teknolojiyle birlikte pek çok PZR tekniği ortaya çıkmıştır. Bunlardan en sık kullanılanlar Gerçek Zamanlı PZR, Kantitatif PZR, Ters Transkriptaz PZR, Nested PZR ve Multipleks PZR'dir.

Gerçek Zamanlı PZR tekniğinin kullanımı son derece yaygın olup, DNA ya da mRNA gibi makromoleküllerin çoğaltılmasına ve ürünlerin tek bir tüpte tespit edilmesine olanak sağlar (9). Bu metot sayesinde çok az miktardaki biyolojik bir örneğin hedef bölgesinin varlığına/yokluğuna veya miktarına hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ulaşılabilmektedir (10).

Gerçek Zamanlı PZR (qPZR)'nin normal PZR'den farkı, başlangıç DNA miktarının hesaplanabilmesidir. Bu metot ile DNA amplifikasyonu, artan floresan ölçümleri ile ilişkilendirip kantitatif sonuçlar elde edilir (11).

Ters Transkriptaz PZR ise RNA moleküllerinden komplementer DNA (cDNA) sentezini, retrovirüslerden izole edilen Revers Transkriptaz enzimi ile gerçekleştirilmesidir. Hassas ve hızlı bir yöntemdir. cDNA sentezlendikten sonra DNA-RNA sarmalı ayrılır, ayrılan DNA dizisi kalıp olarak kullanılarak çift zincirli DNA dizisi çoğaltılır (12).

Nested PZR metodu PZR'nin spesifikliğini arttırmak için geliştirilmiş olup, birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonu ile karakterizedir. İlk amplifikasyonda, hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılır ve uzun bir bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilir. İkinci amplifikasyonda ise ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç kısmına bağlanan iki iç primer kullanılarak kısa bölgenin de çoğaltılması gerçekleştirilir (11).

Multiplex PZR (mPZR) metodunda ise kalıp DNA üzerinde birden fazla bölge için çoklu primer çifti tasarımı gerçekleştirilir. Sonuç itibariyle aynı örnek üzerinde çoklu bölgenin çoğaltılmasına imkan sağlar. Net, hızlı ve güvenilir bir metottur (13).

#### Dijital PZR

Şimdiye kadar geliştirilmiş PZR türlerindeki zorluklar ve kullanım alanlarının daha da genişletilmek istenilmesi ile ileri teknoloji PZR geliştirilmesi araştırmacıların öncelikli hedefi haline gelmiştir.

Son yıllarda dijital PZR olarak bilinen yeni versiyon PZR, yaygın olarak nükleik asit miktarının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Örneklerin mikrolitrelerin altında porsiyonlanıp nükleik asit ölçümlerinde kesinliğin, güvenilirliğin, doğruluğun ve tekrarlanabilir ölçümlerin arttırdığı bir sistemdir. Bu yöntem analog qPZR'nin aksine, çoğaltma işleminin nerede yapıldığına dair logaritmik sinyali, dış kalibrasyona dayalı miktar tayinini, doğrusal ve dijital miktar tayininin sayı olarak pozitif ve negatif reaksiyonlarının sayısını, Poisson dağılımlarını dikkate alarak, hesaplamaya olanak sağlar (48).

qPZR ile kıyaslandığında sonuçlar daha düşük analitik hassasiyette olabilmesi gibi dPZR metodunda reaksiyon hacmine bağlı olarak bazı kısıtlamalar olmasına rağmen, düşük DNA konsantrasyonlarını ölçmeye ve tekrarlanabilir ölçümler yapmaya olanak sağlar. dPZR'nin bu avantajları göz önünde bulundurulduğunda, kendisine birçok kullanım alanı bulmuştur ve büyük potansiyele sahiptir. Örneğin; bitki patojenleri, genetiği değiştirilmiş organizma testleri,

dirençli bakterilerin tespiti, viral teşhisler, nadir mutasyonların tespiti ve kopya sayısı varyasyonları alanlarında kullanılmaktadır (48).

Örneğin; qPZR tekniğindeki standartlar aracılığıyla analizlerin kalibrasyonunda teknik sınırlamalar mevcuttur. Bu tekrarlı iş akışı araştırmacıya vakit kaybettirmektedir (14). Standart analog ölçümlerde aynı analiz belirteçlerini kullanacak bir yöntem geliştirmek amacıyla yola çıkan araştırmacılar, kısıtlı örneklerde bile çalışan ve dijital formatta bilgi veren dPZR'yi geliştirmişlerdir (23).

Klasik genetikte, germ hattı mutasyonları sadece hastalığı anlamak için önemli kabul edilmiştir. Somatik mutasyonların gerçekleşmesi kanserin birincil nedenidir ve aynı zamanda yaşlanmada rol oynayabileceği yeni genetik prensipler olarak ortaya çıkmıştır. Bu keşifler hastalığın yönetilmesine fayda sağlarken aynı zamanda neoplazi patojenezinin temel araştırmalarına da olanak sağlar. Bununla birlikte bu fırsatlar çok fazla miktardaki normal hücre arasından bir miktar mutant hücrenin tespitine bağlıdır (23).

DNA dizilemesi, germ-line mutasyonların saptanması için altın standart ama mutasyona uğramış aleller yaklaşık %20 daha büyük olduğu zaman kullanışlıdır. Mutantlara spesifik olan oligonükleotitler bazen küçük miktardaki hücrelerde mutasyonları tespit etmek için kullanılabilir fakat mutant ve vahşi tip (WT) şablonların ses sinyali oranı değişkendir. Mutantlara spesifik primerlerin kullanılması ve spesifik restriksiyon endonükleazlar ile PZR ürünlerinin parçalanması gibi yöntemler mutasyonların saptanması için çok hassas yöntemlerdir ama bu tekniklerle başlangıç popülasyonlarında mutant moleküllerin bölümlerini nicelendirmek zordur. Somatik mutasyonların saptanması için diğer yaklaşımlar gözden geçirilmiştir. Bu yöntemler ile ilgili genel sorun bağımsız bir şekilde herhangi bir mutasyonun varlığının teyit edilmesinin zor veya imkansız olmasıdır. Bu nedenle belirtilen güçlüklerin üstesinden gelmek için bazı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri tamamen

mutant ya da tamamen WT'dir. Böylece bu makalede anlatılan strateji ayrı ayrı şablon moleküllerin amplifikasyonunu içerir. PZR ürünlerinin homojenliği mevcut olan tekniklerin ayırt edilmesini kolaylaştırır. Bu gibi ayrı amplifikasyonlar pratik anlamda yararlıdır. Bununla birlikte çok sayıda basit ve güvenilir tespit elde edilebilir. Bu tür değerlendirmeler için kullanılan tekniklerde analizi yapılan popülasyonlarda mutant allel formlarının çıktığı veren dijital okuması sağlanarak geliştirilmiştir. Bu uygulama teknolojileri için çeşitli öngörüler bulunmaktadır (23).

Dijital PZR, kendi gücünün başka bir örneğini temsil etmektedir, son zamanlarda geliştirilen tespit teknolojileri ile birlikte genetik analizler için fırsatlar sağlamaktadır (23).

Nadir mutasyonların, kopya sayısı varyasyonlarındaki ufak değişikliklerin, gen ifadesi değişiklikleri arasındaki farklılıkların veya metilasyon durumunun değerlendirilmesinin tespitine izin veren yeni bir yöntem olarak dPZR teknolojisi geliştirilmiştir (15).

Tek bir molekülün sayımıyla nükleik asitlerin mutlak ölçümü sınırlayıcı dilüsyon (seyreltme) ve Poisson istatistiksel analizine olanak sağlaması 1992 yılında Sykes ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (16).

Dijital PZR, DNA kopya sayısının hassas ölçümü için PZR bazlı yeni bir tekniktir ve örnekleri az sayıda seyrelterek çok sayıda PZR reaksiyonu gerçekleştirmeye olanak sağlar (17). Bu teknikte, her biri ayrı ayrı PZR reaksiyonu geçiren çok sayıda küçük bölümler bulunmaktadır (18). Yöntem, birçok ayrı PZR reaksiyonunun sınırlı seyreltilmesi temeline dayanır (19). Aynı zamanda dPZR; şu an çok az miktardaki genetik materyalin dakikadaki miktarını tespit etme performansı ile birçok nicel yöntemleri geride bırakan güçlü ve uygun tek moleküllü sayma stratejisidir (15).

Droplet dijital PZR (ddPZR) standart bir eğriye ihtiyaç duymadan nükleik asitlerin mutlak kantitatif ölçümüne olanak sağlar. Bu teknik 20.000 ve hatta

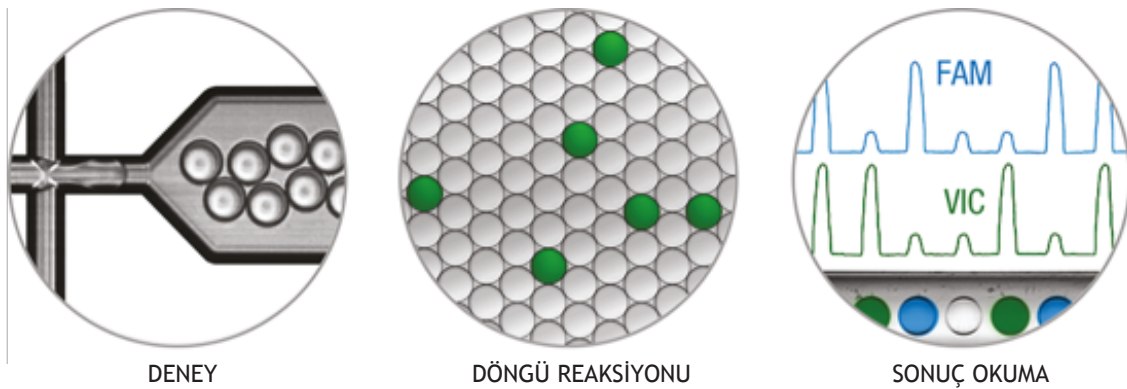
çok daha küçük droplet adı verilen reaksiyon kapları içinde nükleik asitlerin porsiyonlanması temeline dayanır. Standart bir PZR reaksiyonu daha sonra her bir droplet hedefini çoğaltmak için kullanılabilir, böylelikle ayrı ayrı pozitif ve negatif şekilde hedef bağımlı floresan sinyali ölçülebilecektir. “1” olan sinyal pozitif, “0” olan sinyal negatif olmak üzere ikili kod tekniğinin dijital kısmını temsil eder ve veriler Poisson dağılımına uygun olarak hesaplanabilmektedir. Bu da standart eğriye gerek kalmadan herhangi bir örnekten DNA kopya sayılarının doğrudan ve basit bir şekilde hesaplanmasına olanak sağlar (21).

Seyreltilmiş örnek tek tek PZR reaksiyonlarına dağıtılır ve orjinal örnek miktarı analiz bölümlerinin toplam sayısı açısından olumlu bir büyütme ile bölümlerin sayısına göre ölçülür. Bölümlerin içindeki moleküllerin dağılımı bağımsız ve rastgele bir işlemdir (22). Dijital PZR bir numunedeki nükleik asitlerin, kesin olarak miktarının saptanmasını sağlar. Dijital PZR uygulaması için pratik ve ölçeklendirilebilen teknolojilerin eksikliği bu güçlü tekniğin yaygın olarak benimsenmesini engelliyordu. Burada yüksek verimli damlacık dijital PZR sistemi 96 kuyulu bir plaka ile geleneksel TaqMan problemleri kullanılarak ~ 2 milyon PZR reaksiyonu işlenmesini sağlar (20) (Şekil 1). Ayrıca örneğin uygun bir şekilde seyreltilmesi genellikle reaksiyon bölümü başına sadece bir hedef molekülün incelenmesini garanti eder. Daha yüksek konsantrasyonda kalıp kullanılırken, moleküllerin

gerçek sayısı gözden kaçabilir çünkü bazı bölümler birden fazla kalıp molekül içerir. Kullanılan Poisson istatistiği bu bozulmayı bir dereceye kadar önleyebilir (23). Floresan kimyası teknolojisi özgül bir PZR ürünün varlığını veya yokluğunu algılamak üzere qPZR’da da olduğu gibi dPZR’da da kullanılmaktadır. Sonuçta verilerin yorumlanması karmaşık biyoinformatik analizlere sıkı sıkıya bağlı değildir. Bazı uygulamalarda, ardışık olasılık oran testi allel dağılımı normalden farklı olduğu için kanıtların gücünü ölçmekte kullanılabilir (24).

Örneğin Şekil 2’de;

(A) Master mix içeren 20 µL numune, primerler, TaqMan problemleri ve hedef DNA, sekiz kanallı damlacık jeneratör kartuşunun orta kuyularına yüklenir. Emülsiyon stabilize edici yüzey aktif madde içeren damlacık oluşturma yağı (8 x 60 µL) daha sonra damla üretici kartuşunun solundaki kuyunun içine yüklenir. Bir vakum bir basınç farkı oluşturmak için çıkış kuyusuna (sağdaki kuyu) otomatik olarak uygulanır, bu arada mikroakışkan döngü geometrisi sulu örneğin içinde istikrarlı hale dönüşür. Tek dağılımlı olarak su içindeki yağ emülsiyon damlacıkları ve yağ fazındaki yoğunluk farklılıkları nedeniyle yoğunlaşarak kartuşun damlacık toplama kuyusunda toplanır. Her bir kuyudaki damlacıklar daha sonra 96 oyuklu, folyo ile kapatılmış plakaya aktarılır ve son olarak termal döngüye girer (25).



Şekil 1. Dijital PZR'a genel bakış (20)

(B) Amplifikasyon sonrasında plaka damla okuyucuya yüklenir ve burada otomatik olarak damlacıklar mikroakışkan singulatör kullanılarak aspire edilir. Örnekler 100 kHz hızında tek sıra halinde FAM/VIC iki renkli floresan dedektöründen geçirilir.

(C) Damlacıklar için floresan genliklerindeki farklılıklar amplifikasyon varsa veya hiç oluşmadığı durumlarda tipik Fam/Vic dubleks çalışmaları için tüm damlacık popülasyonunu dört ayrı küme halinde böler. Bu dört popülasyonlar hiçbir hedefin bulunmadığı (F -/ V -), hedeflerin birinin (F -V+/ F +V-) veya hedeflerin her ikisini de (F +/ V +) içeren damlacıklar vardır. Damlacıkları sınıflandıran dijital yöntemde her algılama kanalı için bir floresan eşik ayarlanmıştır ve damlacık başına düşen ortalama kopya sayısının hesaplanması pozitif damlacıkların fraksiyonu ve Poisson modelleme ile bulunabilir (25) (Şekil 2).

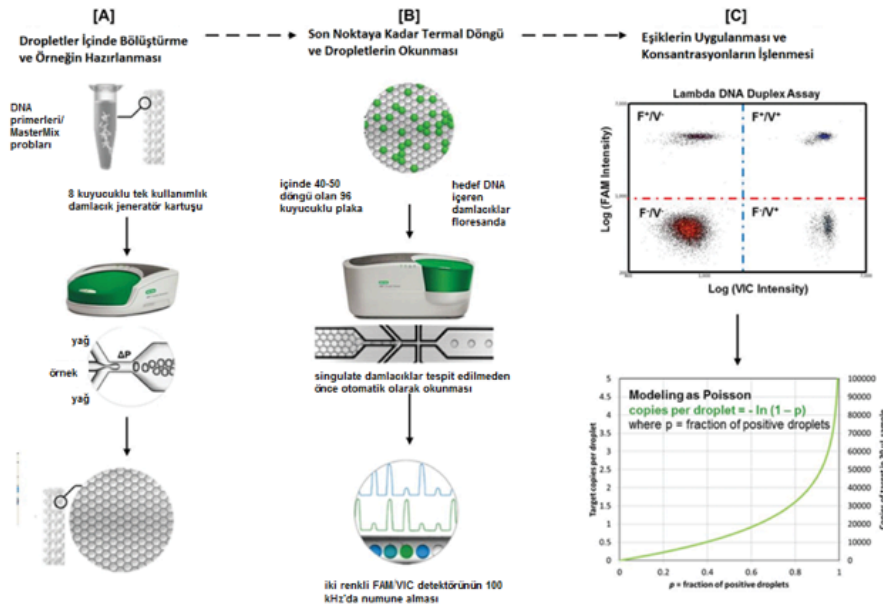
dPZR'nin yukarıda belirtilen özellikleri diğer yöntemlerin tespit yeteneklerinden farklıdır, bu da çeşitli araştırma uygulamaları için dPZR yaklaşımını eşsiz kılar (15). Son zamanlarda dPZR'nin DNA mutlak ölçümü kapasitesi, yeni nesil DNA dizileme

kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılmıştır (26).

### Dijital PZR'nin diğer PZR teknolojilerine göre üstünlükleri

Dijital PZR, qPZR'a kıyasla daha yüksek hassasiyet gösteren PZR bazlı mutlak ölçüm tekniğidir. Bugüne kadar yapılan kanser ve viral enfeksiyonlar üzerindeki çeşitli çalışmalar dPZR'nin qPZR'a göre duyarlılığının ve hassasiyetinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (17). Bu avantajın asıl nedeni, reaksiyonların tek tek bölümlendirilebilmesidir (20). Geleneksel qPZR ile karşılaştırsak ddPZR daha düşük saptama limitlerine ve daha büyük dinamik aralığa sahiptir (21).

Dijital PZR teknik olarak Gerçek Zamanlı PZR'den çok daha basittir ve eşik (threshold) verilerini yorumlayabilmek için standart dilüsyon eğrilerine gerek duyulmamaktadır (19). Böylelikle qPZR ile tespit edilemeyen biyolojik ve transkripsiyonel potansiyele sahip çok düşük düzeyde açıklanan genlerin varlığı ddPZR ile tespit edilebilmektedir. Buna ek olarak, dPZR'nin bir üstünlüğü de mutlak ölçüm sağlamasıdır. qPZR kullanılarak tespit edilemeyen düşük veya limitli



Şekil 2. ddPZR'nin genel çalışma prensibi (25)

miktardaki hedefleri tespit etmek için kullanılması çalışmalara avantaj sağlar (27).

dPZR'nin daha kesin sonuç vermesindeki en önemli özellik metot sağlamlığından (robustness) ileri gelmektedir. qRT-PZR daha yüksek bir dinamik aralığa sahip olmasına rağmen dijital PZR örnekler arasındaki en ufak değişiklikleri bile saptamaya olanak sağlar. qRT-PZR'nin aksine dijital PZR, azaltılmış PZR verimliliği karşısında daha dirençlidir. qRT-PZR ile

karşılaştırıldığında dezavantaj olarak daha düşük bir dinamik aralığı vardır (18).

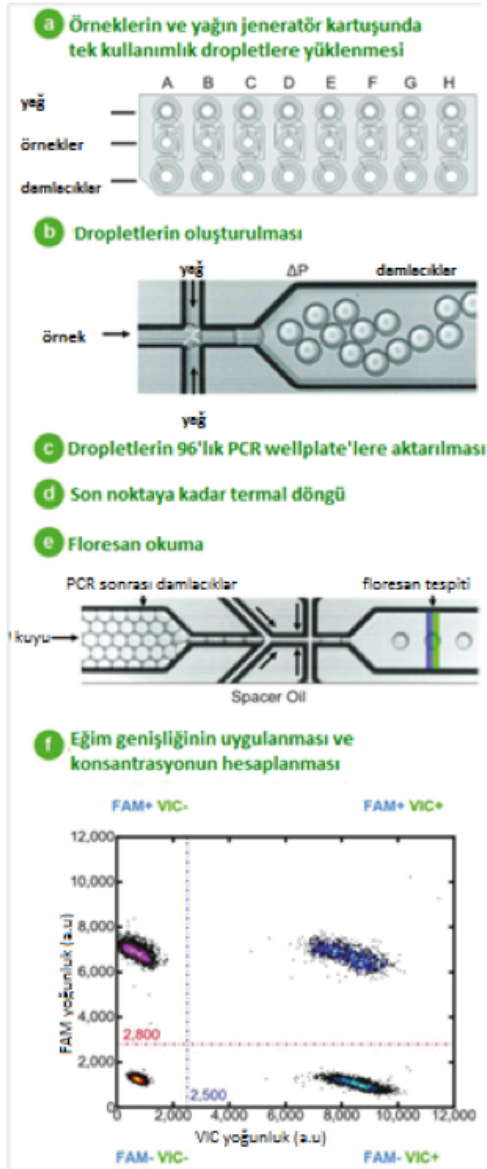
### dPZR Avantaj ve Dezavantajları

Dijital PZR'da daha düşük maliyetlerde yüksek verimlilik mümkündür (17). Yeterli seyreltmeler ile, birçok reaksiyon standart bir eğriye ihtiyaç duymadan Poisson istatistikleri kullanılarak şablon bir DNA içermeden ölçüm gerçekleştirilir (19). Bu yeni metot analizin daha uygulanabilir ve tekrarlanabilir olmasına olanak sağlar (28).

Droplet dijital PZR (ddPZR), teorik olarak tek bir hedef molekülün saptanabilmesine olanak sağladığından dolayı hassasiyeti yüksek olan bir metottur (18). ddPZR son derece düşük frekanslı durumlarda bile efektif çalışır (29).

PZR verimliliğinin hesaplanması için seyreltme eğrilerine ve mutlak ölçüm için DNA standartlarına gerek yoktur (18). dPZR hedef RNA miktarı çok düşük olsa bile gen ekspresyonunun saptanmasına olanak sağlar (27).

Harici standartların kullanılması qPZR'da analitik performans ölçmede merkez noktadır. Harici kalibratörlere dPZR'da gerek duyulmaması ve enzim inhibisyonuna yol açacak maddelere karşı tolerans sahibi olması, nükleik asit kantifikasyonunda kullanılmasının temel sebebidir (26, 30). Her iki teknoloji de nükleik asitlerinin keşfinde aynı floresan kimyasını kullansa bile; dPZR dinamik diziyi eş zamanlı etkileyerek aynı anda kalıbın çoğaltılması için partikül sayımına izin vererek daha kesin bir ölçüm sağlayabilmektedir. dPZR teknolojisindeki son gelişmeler reaksiyon bölümlerinin binlerden milyonlara kadar olmasıyla ölçeklenebilir bir ortam sağlar (20). Sonuç olarak dPZR, qPZR'a göre daha üstün hassasiyet göstermekte olup, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik açısından da nükleik asit ölçüm imkanı sunmaktadır. Lakin düşük maliyetli olması açısından Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR günümüzde hala en çok kullanılan nükleik asit ölçüm yöntemidir (15). Teknik ön amplifikasyon adımına gerek kalmadan



Şekil 3. dDroplet dijital PZR'ın çalışma prensibi (20)

nükleik asitlerin izlerini tespit etmede son derece güçlüdür böylece tahlile özgü önyargılı bir giriş önlenmiş olur (31).

Analitik kesinliğine karşılık gelen katsayı "coefficient" varyasyon değeri, qPZR'a göre dPZR için önemli ölçüde daha düşük olduğu gösterilmiştir (15). Dahası, kalıp bölmeleri azaltılarak arka plandaki DNA ve kirleticilerin seviyeleri düşürülür, pozitif reaksiyon bölümlerinin sinyal sesi arttırılmış ve böylece algılama hassasiyeti arttırılmış olmaktadır (32).

### Kullanım Alanları

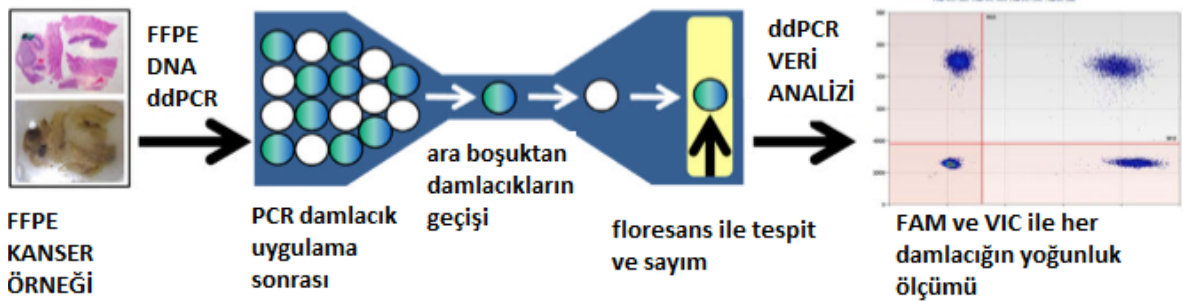
dPZR tekniğinin kullanım alanlarından bahsedecek olursak; heterojen tümörlerde ya da genetik kökenli hastalıklarda nadir allel tespitlerinde (33), periferel vücut sıvılarını kullanarak solid tümörlerin likit biyopsisinde (34), invaziv olmayan prenatal tanıda (20), viral yük tespitinde (35), gen ekspresyonunda, heterojen örneklerde kopya sayısı varyasyonlarında (36) (Şekil 5), kısıtlı miktardaki örneklerin analizinde, örneğin FFPE örnekleri ve tek hücre gen ekspresyonu gibi, dizileme öncesi DNA kalite testlerinde (26, 37) (Şekil 4), gıda alanında Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO) (38) tespitinde kullanılmaktadır.

Örneğin Şekil 4'te görüldüğü üzere; DNA, daha önceden arşivlenmiş bir kanser numunesinden elde edilir. Formalin ile parafin bloğa fikse edilen mide adenokarınoma örneği beraberindeki lekeli bölüm ile gösterilmiştir. DNA izolasyonundan sonra damlacık PZR belirli bir gruba ait PZR primerleri ve floresan

probu ile yapılmaktadır. PZR sonrası emülsiyon damlacıkları iki renkli bir detektöre açılan kılcalın içine doğru tek tek akar; hedef ve referans genler için pozitif damlacıklar 6-FAM ve VIC gibi farklı boyaarla kopya sayısı kantitatif olarak sayılabilir. Bir boya kontrol bölümüne özgüdür ve diğer bölümleri ölçer. Mevcut örnek, eğer tümör hücrelerinin sadece küçük bir kısmını içeriyorsa bile anormal genomik amplifikasyonları algılamak için ddPZR kullanarak FFPE tümör örneklerinde genomik amplifikasyonları ölçmek için güçlü bir çözüm geliştirilmiştir. ddPZR metodunda genomik DNA'dan nanogram miktarda olması yeterlidir, böylece nadir numuneleri bile çalışılması kolaylaşmıştır. Hindson ve arkadaşları tarafından açıklandığı gibi ddPZR metodu belirli genomik etkinliklerin son derece hassas ve spesifik olarak saptanması için örneğin emülsifiye edilmesini içerir (44).

Verimli çalışma platformları içinde dPZR'yi güçlü potansiyele dönüştürmek için, tek bir molekül büyütmesi süreci son derece istikrarlı bir ortamda gerçekleşmelidir. Platformun seçimi özellikle kesinlik derecesi, sonuç, sistem ve tahlillerdeki maliyete bağlıdır (15).

İlk nesil dPZR platformları mikroakışkan kanallar içeren çiplere dayanmaktadır (39). Hedef molekül gerçek zamanlı olarak izlenebilir böylece yanlış pozitif reaksiyonlar her bir reaksiyonunun büyütme (amplifikasyon) eğrisinden çıkarılabilir. Yüksek hassasiyet ve kesinlik için dijital platformların daha



Şekil 4. Formalinde sabitlenmiş ve parafine yerleştirilmiş (FFPE) kanser doku örneklerinin amplifikasyon analizinde droplet dijital PZR'nin genel çalışma prensibi (44)

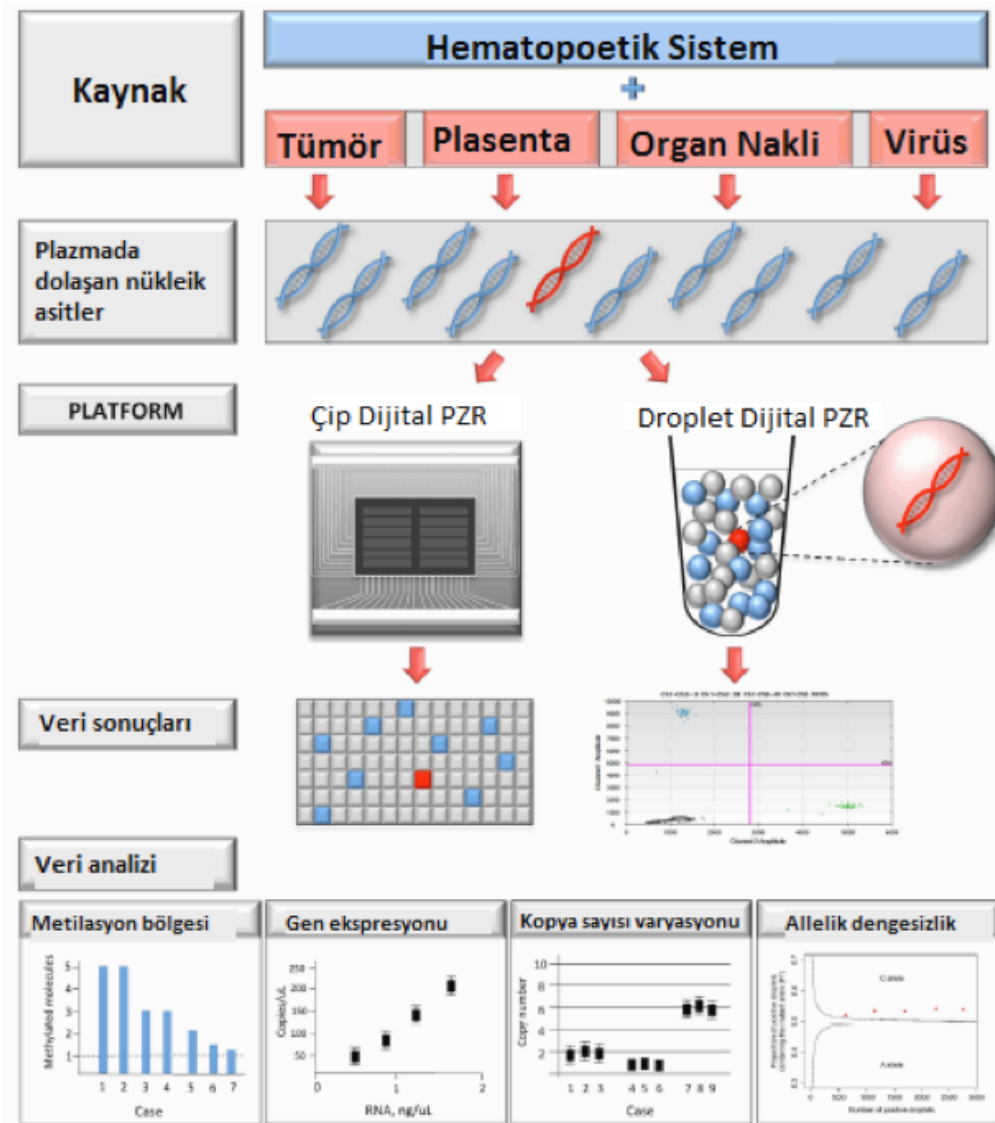


çok sayıda numaralandırılmasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle, şirketler her dPZR reaksiyonunu yağda sulu damlacıkların içinde PZR okuma bitiş noktası ile birleştiren sistemlerini başlatmışlardır. Bu platformlar Gerçek Zamanlı PZR ölçümü gerçekleştiremiyor olmalarına rağmen çok büyük sayıdaki reaksiyon bölümlerinin birbirine benzer ebattaki dinamik değerleri çarpıcı bir artışa yol açmıştır (25). Sysmex Inostics tarafından sağlanan beaming dijital PZR

teknolojisi (boncuk, emülsiyon, amplifikasyon ve manyetik) klonal manyetik parçacıkların varlığında nükleik asitleri çoğaltmaya ve sitometri akışı kullanılarak da miktarı değerlendirmeye olanak sağlar (40). Bu dPZR stratejisi, özellikle kanser araştırmalarında geniş kullanım alanı bulmuştur (15).

Örneğin Şekil 3'te görüldüğü üzere;

a) Örnekler ve damlacık oluşturma yağı sekiz kanallı damlacık jeneratör kartuşu içine yüklenir.



Şekil 5. Dolaşan nükleik asit araştırmasında çip veya droplet dijital PZR teknolojisinin şematik gösterimi (15)

b) 1 nl'lik damlacıklar halinde örneğin ve yağın akışıyla vakum işlemi gerçekleşir. İki dakikadan az bir süre içerisinde, sekiz örnek 20.000 damlacıklı sekiz sete dönüşür.

c) Satbilize olan damlacıklar 96'luk wellplate'lere aktarılır.

d) Droplet PZR'nin çoğaltma basamağından son aşamaya kadar (3.545 döngü) termal döngü işlemleri gerçekleşir.

e) Her bir kuyucuktan çekilen damlacıklar plaka okuyucuya yüklenir, saniyede yaklaşık 1.000 adet geçecek şekilde iki renkli dedektörden geçirilir.

f) Damlacıklar floresan genliklerine göre pozitif ve negatif olarak atanır. Her kanal içerisindeki pozitif ve negatif damlacıklar, %95 Poisson güven aralığında olmak üzere, hedef ve referans DNA dizilerinin konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılır (20) (Şekil 3).

dPZR'nin klinikte RNA biyobelirteçlerinin saptanmasında ve miktarının belirlenmesinde kullanışlı olabileceği belirtilmiştir (27). dPZR'nin analitik gücü bir kopya başına 100.000 yabanıl tip dizinin altında tek bir nükleotid varyantının algılanmasını sağlar (41).

Meme kanseri hücre hattı ile ilgili araştırmalar, HER2 gen kopya sayısı varyasyonunda ince kat farklılıklarının saptanmasında qPZR'a kıyasla dPZR'nin daha üstün hassasiyet ve duyarlılık gösterdiği rapor edilmiştir (36). Dijital PZR kolorektal kanser ve meme kanseri olan hastalarının plazmasındaki belirli bir lokusun metilasyon durumunun değerlendirilmesi için kullanılmıştır (42, 43).

1999 yılında kolorektal kanser ile ilişkili ras onkogen mutasyon miktarının belirlenmesi için Vogelstein ve Kinzler öncü bir çalışma yaparak dPZR'nin klinik çalışmaya yardımcı bir program olabileceğini vurgulamıştır (23). Ancak zahmetli oluşu klinik ortamda rutin kullanımını engellemiştir. Böylece pratik gelişimine odaklanması yönünde çalışmalar yapılması gerektiği belirtilmiştir. Daha sonra mevcut

geliştirilen platformların pratikliği kolaylaştırılmış ve birçok klinik alanda kullanımı sağlamıştır (20).

Viroloji ve bakteriyoloji alanında, Cytomegalovirus (CMV), Hepatit B virüs, HIV-1 virüs, metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* tespitinde ve viral yükün ortaya konmasında dPZR kullanılmıştır (49, 50-52). HIV-1 için yapılabilen düşük düzeydeki viral yük tespiti retroviral tedaviye faydalı olabileceğine işaret etmektedir (53-55).

Mikroakışkan çipler kullanılarak mikrodropletler sayesinde binlerce ya da milyonlarca reaksiyon dijital PZR ile ayrı ayrı bir örnek halinde incelenir. ddPZR örnekleri nanolitreden pikolitreye kadar minimize edilmiş hacimlerde çalışmaya olanak sağlamıştır. Reaksiyon PZR'nin son noktasına ulaştığında; damlalar ilgili hedef dizinin kopyalarını içermeyebilir ya da bazı kopyalarını içerir (27). ddPZR spesifik virüslerin düşük kopyalarının saptanmasında kullanışlı olabilir (21).

ddPZR yüksek miktardaki örneklerin ölçümüne de uygulanabilir. ddPZR yaklaşık 45 dakika numunenin işlenmesine ve sonrasında numune sayısına bağlı droplet okuma vakti olarak 1-2 saat daha ek süreye ihtiyaç duyar (21).

#### Kantitatif Dijital PZR Deneylerinin Yayınlanabilmesi İçin Gerekli Olan Minimum Bilgi (dMIQE) Kuralları

Dijital PZR için ilk ticari platform 2006 yılından beri piyasada olmasına rağmen, zaten iyi kurulmuş bir qPZR ile karşılaştırıldığında klinik ortamda tam potansiyele sadece başlangıçta sahip olduğu gösterilmiştir. Klinik uygulama içinde dPZR uygulanması yolundaki ilk adım farklı laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirliği geliştirmek için deneysel ayrıntıları bildiren bir çerçeve sağlayan dMIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PZR Experiments) kuralları yayınlanarak alınmıştır (45). MIQE kurallarını içeren kontrol listesi, qPZR analizlerinin geliştirilmesi, verilerin tekrarlanabilmesi ve karşılaştırılabilmesi amacıyla

2009 yılında yayımlanmıştır. Tüm öğeler temel olanlar (E-Esansiyel) ya da isteğe bağlı olanlar (İ-isteğe bağlı) şeklinde kategorize edilmiştir (45).

### Sonuç

Dijital PZR yeni uygulamalar ve araştırmalar için gelişmekte olan yeni bir PZR tekniği olarak karşımıza çıkmıştır. Güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik düzeyi oldukça yüksek bir yöntemdir. Çok düşük hacimlerde ve tek molekül konsantrasyonunda çalışılabildiğinden dolayı, yöntem yüksek hassasiyet gerektirmektedir. Deney tasarımı yapılmadan önce tek bir hedef olduğundan emin olunmalıdır. Birden çok hedef olduğu takdirde ise, her hedef farklı bir kuyucukta işlem görür (46).

Nadir allel tespiti durumunda, yanlış pozitiflerin oranı oldukça önemlidir. Çok oldukları takdirde gerçek pozitiflerin sayısını maskeleyebilirler. Kalıbın başlangıç konsantrasyonu da oldukça önemlidir, numunenin uygun seyreltilmesi bu konsantrasyona göre belirlenir. Daha önce de bahsettiğimiz gibi dijital PZR teknolojisinde, standart eğriye gerek duyulmadan DNA parçaları arasında hassas moleküler ölçümler gerçekleştirilebilir, yüksek özgüllük hassasiyeti görülür ve yüksek tekrarlanabilirlik mümkündür. dPZR'nin en büyük gücü kalibratör referansa ihtiyaç duymadan,

kantitatif ölçümler ile hassas bir şekilde doğrudan sayım yapabilmektedir (46).

Araştırmacılar dPZR'nin potansiyeli hakkında istekli olmalarına rağmen, deney tasarımında dikkatli olunması hususunda uyarıda bulunmaktadır. Teknolojinin olgunlaşmış olgunlaşmayacağı, maliyetin de azalması azalmayacağı şu an birçok araştırmacı için merak konusudur. Şu an az miktarda uygulama alanı olsa da yarın çok daha fazla kullanım sahasının olması beklenmektedir (47). Gelişmiş dizileme yöntemi ile dPZR'nin diğer PZR yöntemlerinin yerini alabileceğini söyleyebiliriz, fakat bunun ne zaman gerçekleşeceğini tahmin etmek zordur (31).

Bu tartışmalar üzerine, bu derlemede dPZR'nin bilinirliğini ülkemiz bilim camiasında arttırmak, bu tekniğin gıda ve sağlık alanlarında nadir allel tespiti ve düşük düzey genetik analizlerde uygulanmasının teşvik edilmesi amaçlanmıştır. İlgili teknolojinin kabul edilebilirliğini arttırmak ancak bu tekniğin kullanımının yaygınlaştırılması ile mümkündür. Laboratuvar çalışmalarında kullanımda olan moleküler teknikler tek başına bütün sorularımıza cevap verememektedir. Metotlar birbirinin tamamlayıcıları durumundadır. Dolayısı ile dPZR, kullanım alanlarında hassasiyeti yakalamak isteyenlere daha doğrulayıcı bir yaklaşım sağlayabilecektir.

**Tablo 1.** Tüm kullanıcılar için Kantitatif Dijital PZR deneylerinin yayınlanabilmesi için gerekli olan minimum bilgi (dMIQE) kuralları listesi (45)

Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi	Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi
<b>Deneyel Tasarım</b>		<b>Deneyel Tasarım</b>	
Deney ve kontrol gruplarının tanımlanması	E	Örneğin hacmi veya kütlesi	E
Her grup içindeki numaralar	E	Mikro ya da makrodiseksiyon	E
Analizler merkezi labda mı yoksa araştırmacının kendi labında mı gerçekleştirilecek?	İ	İşleniş prosedürü	E
Güç analizi	İ	Eğer dondurulma varsa-nasıl ve hangi hızda?	E
Örnek tanımı	E	Fikse edilecekse, ne ile ve hangi hızda?	E
		Örneğin saklanma koşulları ve süresi	E

Tablo 1. Devam

Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi	Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi
<b>Nükleik asit ekstraksiyonu</b>		<b>dPZR hedef bilgisi</b>	
Miktar tayini-Gereçler/Yöntem	E	Sekansın katılım numarası	E
Saklama koşulları: sıcaklık, konsantrasyon, süre, tampon çözelti	E	Amplikon konumu	İ
DNA veya RNA miktar tayini	E	Amplikon uzunluğu	E
Kalite/bütünlük, cihaz/yöntem	E	BLAST vs gibi veritabanlarındaki özgüllük ekranı	E
Kalıbın yapısal bilgisi	E	Pseudogenler, retropseudogenler veya diğer homologları	İ
Kalıp modifikasyonu (sindirim, sonikasyon, preamplifikasyon, vs)	E	Sekans hizalama	İ
Kalıp iyileştirme (İlk ısıtma ya da kimyasal denatürasyon)	E	Amplikonun ikinci yapı analizi ve GC içeriği	İ
Seyreltmenin engellenmesi	E	Ekzon veya intron tarafından oluşturulan her primerin konumu (varsa)	E
RNA örneğinde DNA kontaminasyonun değerlendirilmesi	E	Nerede uygundur, hangi ek varyantlar hedeflenmiştir?	E
DNAaz ile muamelenin detayları	E	<b>dPZR Oligonükleotitleri</b>	
Kullanılan reaktiflerin üreticisi ve katalog numaraları	İ	Primer dizileri ve/veya amplikon içerik dizisi	E
Nükleik asitlerin saklama koşulları: sıcaklık, konsantrasyon, süre, tampon çözelti	E	RTPrimerDB (real-time PZR primer ve prob veritabanı)	İ
<b>RT (Eğer gerekliyse)</b>		Prob dizileri	İ
cDNA oluşturma yöntemi ve konsantrasyonu	E	Konum ve kimlik değişimleri	E
Bir ya da iki-basamak protokolü	E	Oligonükleotitlerin üreticisi	İ
Reaksiyon başına kullanılan RNA miktarı	E	Pürifikasyon yöntemi	İ
Reaksiyon bileşenlerinin ve koşullarının ayrıntıları	E	<b>dPZR Protokolü</b>	
RT verimliliği	İ	Reaksiyon koşullarının tamamlanması	E
RT ile birlikte ve RT olmadan ölçülen tahmini kopyalar	İ	Reaksiyon hacmi ve RNA/cDNA/DNA miktarı	E
Reaktiflerin üreticisi ve katalog numaraları	İ	Primer, (Prob), Mg <sup>2+</sup> ve dNTP konsantrasyonları	E
Reaksiyon hacmi (2 basamaklı RT reaksiyonu için)	İ	Polimeraz kimliği ve konsantrasyonu	E
cDNA'nın saklanma koşulları: sıcaklık, konsantrasyon, süre ve tampon çözelti	İ	Tampon/Kit katalog numaraları ve üreticileri	E
		Tampon çözeltinin kimyasal içeriği	İ
		İlaveler (SYBR gren I, DMSO, vs)	E

Tablo 1. Devam

Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi	Kontrol edilecek öge	Önemlilik derecesi
<b>dPZR Protokolü</b>		<b>Veri analizi</b>	
Plate/Tüp katalog numaraları ve üreticileri	i	Bölüm başına ortalama kopya (veya eşdeğeri)	E
Tam termodöngüleme parametreleri	E	dPZR analiz programı (kaynağı, versiyonu)	E
Reaksiyon kurulumu	i	Uyumsuz tanımlama ve düzen	E
Gravimetrik ya da hacimsel seyreltmeler (manuel/robotik)	i	Kalıp olmayan kontrollerin sonuçları	E
Hazırlanan total PZR reaksiyon hacmi	i	Ek veri olarak pozitiflerin ve negatif test sonuçlarının örnekleri	E
Bölüştürme sayısı	E	Referans genlerin sayısının ve seçiminin gerekçesi, uygunluğu	E
Bireysel bölüştürme hacmi	E	Yöntemin normalizasyonu ve tanımı	E
Ölçülen bölüştürme hacimleri	E	Biyolojik kopyaların uyumu ve sayısı	i
Bölüştürme hacmi değişiklikleri/SD	i	Tekniksel kopyaların basamağı (RT veya dPZR) ve sayısı	E
Kontrollerin kapsamlı ayrıntıları ve uygun kullanımı	E	Tekrarlanabilirlik	E
dPZR gereçlerinin üreticisi	E	Çoğaltılabilirlik	i
<b>dPZR test sonucu kontrolü</b>		Deneysel varyans	E
Deney için optimizasyon verileri	i	Analiz için kullanılan istatistiksel yöntemler	E
Özgünlük ( nadir mutasyonlar, patojen dizileri vs ölçülürken)	E	RDML kullanılarak verileri gönderme (Real-time PZR Data Markup Language)	i
Kalibrasyon kontrolünün saptama limiti	i		

Tüm öğeler temel olanlar (E-Esansiyel) ya da isteğe bağlı olanlar (i-isteğe bağlı) olarak kategorize edilmiştir.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

## KAYNAKLAR

1. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 1990; 262: 56-61, 64-5.
2. Bottero MT, Civera T, Nucera D, Rosati S, Sacchi P, Turi RM. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats', and sheeps' milk in dairy products. *Int Dairy J*, 2003; 13: 277-82.
3. Garibyan L, Avashia N. Polymerase Chain Reaction. *J Investig Dermatol*, 2013; 133 (3): e6.
4. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 1991; 252: 1643-51.
5. Gibbs RA, DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry Anal Chem*, 1990; 62 (13): 1202-14.
6. Arnheim N, Erlich H. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annu Rev Biochem*, 1992; 61: 131-56.
7. Sharkey DJ, Scalice ER, Christy KG, Atwood SM, Daiss JL. Antibodies as thermolabile switches: High temperature triggering fort he polymerase chain reaction. *Biotechnol*, 1994; 12: 506-509.
8. Elizabeth G. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*, 2007; 8: 481-8.
9. Klein D. Quantification using real-time PCR tecnology: Applications and limitations. *Trends Mol Med*, 2002; 8: 257-60.
10. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and potential use in clinical diagnosis. *Clin Science*, 2005; 109: 365-79.
11. Karataş M. Moleküler Biyoloji. Nobel Akademik Yayıncılık. 2012; 288-90.
12. Santagati S, Garnier M, Carlo P, Violani E, Picotti GB, Maggi A. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Br Res Prot*, 1997; 1 (3): 217-23
13. Auckenthaler R, Risch M. Do Multiplex PCR techniques displace classical cultures in microbiology? *Ther Umsch*, 2015; 72 (2): 77-85.
14. Karlen Y, McNair A, Perseguers S, Mazza C, Mermod N. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 2007; 8: 131.
15. Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin Biochem*, 2015; 142 (15): 9.
16. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 1992; 13: 444-9.
17. Kim TG, Jeong SY, Cho KS. Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014; 98 (13): 6105-13.
18. Jahn M, Vorpahl C, Türkowsky D, Lindmeyer M, Bühler B, Harms H, et al. Accurate determination of plasmid copy number of flow sorted cells using droplet digital PCR. *Anal Chem*, 2014; 86 (12): 5969-76.
19. Wiencke JK, Bracci PM, Hsuang G, Zheng S, Hansen H, Wrensch MR, et al. A comparison of DNA methylation specific droplet digital PCR (ddPCR) and real time qPCR with flow cytometry in characterizing human T cells in peripheral blood. *Epigenetics*, 2014; 9 (10): 1360-5.
20. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*, 2011; 83: 8604-10.
21. Sze MA, Abbasi M, Hogg JC, Sin DD. A comparison between droplet digital and quantitative PCR in the analysis of bacterial 16S load in lung tissuesamples from control and COPD GOLD 2. *PLoS One*, 2014; 9(10): e110351.
22. Bhat S, Herrmann J, Armishaw P, Corbisier P, Emslie KR. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Anal Bioanal Chem*, 2009; 394: 457-67.
23. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 9236-41.

24. Zhou W, Galizia G, Lieto E, Goodman SN, Romans KE, Kinzler KW, et al. Counting alleles reveals a connection between chromosome 18q loss and vascular invasion. *Nat Biotechnol*, 2001; 19: 78-81.
25. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*, 2012; 84: 1003-11.
26. White RA, Blainey PC, Fan HC, Quake SR. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC Genomics*, 2009; 10: 116.
27. Takahashi K, Yan IK, Kim C, Kim J, Patel T. Analysis of extracellular RNA by digital PCR. *Front Oncol*, 2014; 4: 129.
28. Usmani-Brown S, Lebastchi J, Steck AK, Beam C, Herold KC, Ledizet M. Analysis of  $\beta$ -cell death in type 1 diabetes by droplet digital PCR. *Endocrinology*, 2014; 155 (9): 3694-8.
29. White TB, McCoy AM, Streva VA, Fenrich J, Deininger PL. A droplet digital PCR detection method for rare L1 insertions in tumors. *Mob DNA*, 2014; 5 (1): 30.
30. Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, Jerome KR. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin Chem*, 2013; 59: 1670-2.
31. Whale AS, Cowen S, Foy CA, Huggett JF. Methods for applying accurate digital PCR analysis on low copy DNA samples. *PLoS One*, 2013; 8: e58177.
32. Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, Sharma S, Long TI, Ananthnarayan S, et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight. *Nucleic Acids Res*, 2008; 36: 4689-98.
33. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*, 2011; 11 (13): 2156-66.
34. Chen WW, Balaj L, Liao LM, Samuels ML, Kotsopoulos SK, Maguire CA, et al. BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013; 2: e109.
35. White RA, Quake SR, Curr K. Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus. *J Virol Methods*, 2012; 179 (1): 45-50.
36. Whale AS, Huggett JF, Cowen S, Speirs V, Shaw J, Ellison S, et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res*, 2012; 40: e82.
37. Didelot A, Kotsopoulos SK, Lupo A, Pekin D, Li X, Atochin I, et al. Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. *Clin Chem*, 2013; 59 (5): 815-23.
38. Dobnik D, Spilsberg B, Bogožalec Košir A, Holst-Jensen A, Žel J. Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction. *Anal Chem*, 2015; 87 (16): 8218-26.
39. Spurgeon SL, Jones RC, Ramakrishnan R. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One*, 2008; 3: e1662.
40. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 8817-22.
41. Heyries KA, Tropini C, Vaninsberghe M, Doolin C, Petriv OI, Singhal A, et al. Megapixel digital PCR. *Nat Methods*, 2011; 8: 649-51.
42. Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, et al. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol*, 2009; 27: 858-63.
43. Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, Sharma S, Long TI, Ananthnarayan S, et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight. *Nucleic Acids Res*, 2008; 36: 4689-98.
44. Nadauld L, Regan J, Miotke L, Pai RK, Longacre TA, Kwok SS et al. Quantitative and Sensitive Detection of Cancer Genome Amplifications from Formalin Fixed Paraffin Embedded Tumors with Droplet Digital PCR. *Transl Med (Sunnyvale)*, 2012; 2(2): .

45. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem*, 2013; 59 (6): 892-902.
46. Manoj P. Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas. *Mitochondrial DNA*, 2016; 27 (1): 742-6.
47. Baker M. Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, 2012; 9(6): 541.
48. Pavšič J, Žel J, Milavec M. Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2016; 408 (1): 107-21.