

Droplet digital PCR

Die *droplet digital PCR* stellt eine Weiterentwicklung der quantitativen PCR dar und eröffnet neue Möglichkeiten. Als „single molecule“ Technologie erlaubt sie die **Quantifizierung von bisher nur sehr schwer zugänglichen Zielen**, wie **seltene Transkripte, sehr geringe Pathogenlevels, somatische Varianten, Onkogene** und **Methylierungsmuster** sowie **Copy Number Variations** in genomischer und mitochondrialer DNA. Dabei erlaubt sie selbst einzelne Moleküle noch zu detektieren.

Mögliche Anwendungen sind ergeben sich zum Beispiel in den Bereichen:

- ⇒ **Sensitive Detektion und Quantifizierung von somatischen Varianten, Methylierungsmustern und Pathogenen**, auch mit geringen Ausgangsmengen
- ⇒ **Frühe Detektion von Onkogenen, single cell genomics und liquid biopsy Anwendungen**
- ⇒ **Robuste Messung von ca. 1,1 bis 1,2-fachen Unterschieden** in Expression oder copy number. Im Gegensatz dazu, erlauben herkömmliche qPCR Assays meist nur ca. 1,8 bis 2-fache Unterschiede noch verlässlich zu quantifizieren.
- ⇒ **Präzise Quantifizierung von Copy number Variationen**
- ⇒ **Detektion und Quantifizierung von seltenen Transkripten**
- ⇒ Möglichkeit zur **absoluten Quantifizierung ohne Notwendigkeit eines Standards oder einer Referenz.**
- ⇒ **Kosteneffiziente Validierung von NGS Ergebnissen** in den Bereichen seltenen Transkripte oder somatische Varianten

Details zur Methodik

Bei einer *droplet digital PCR* wird der PCR Reaktionsansatz mittels Emulsion in ca. 20.000 einzelnen Fraktionen („Droplets“) unterteilt. Dabei befinden sich anschließend in jeder Partition nur ein oder kein Zielmolekül (daher die Bezeichnung „digital“), sowie spezifische fluoreszenzmarkierte Sonden für die jeweilige Zielsequenz. Das Reaktionsgemisch wird anschließend in einem Lesegerät ausgelesen, welches, ähnlich einem Durchflusssystem, die Fluoreszenz jedes einzelnen Droplets bestimmt. Aufgrund der massiven Partitionierung und getrennten Messung jeder einzelnen Partition, können selbst einzelne Kopien eines Zielmoleküls noch detektiert werden. Da es zu keiner Konkurrenz durch andere Zielmoleküle kommt, kann eine Sensitivität von <0,1% bzw. von wenigen Zielmolekülen erreicht werden.