

УДК 57.088.1

СОВРЕМЕННЫЕ ПЛАТФОРМЫ ЦИФРОВОЙ ПЦР

© 2024 г. Ю. Л. Лебедева^{1, *}, Е. А. Черкашин¹, В. Г. Акимкин¹

¹ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, 111123 Россия

*e-mail: j_kuzmina@pcr.ms

Поступила в редакцию 21.10.2023 г.

После доработки 30.11.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Традиционная количественная полимеразная цепная реакция является золотым стандартом среди методов молекулярной диагностики и применяется повсеместно как для определения возбудителей различных заболеваний, так и для генотипирования и стандартизации библиотек секвенирования нового поколения. Технология цифровой полимеразной цепной реакции представляет собой модернизированную версию количественной полимеразной цепной реакции и за последние 5 лет проявила себя как более чувствительный, специфичный и точный метод. В данной статье представлен обзор современных платформ цифровой полимеразной цепной реакции и проведен их сравнительный анализ. Рассмотрены технические особенности, удобство использования и возможные области применения.

Ключевые слова: количественная полимеразная цепная реакция, молекулярная диагностика, цифровая полимеразная цепная реакция

DOI: 10.56304/S023427582401006X

ВВЕДЕНИЕ

Научно-технический прогресс в области диагностических исследований, в первую очередь, связан с развитием оборудования и технологий и приводит как к возникновению принципиально новых методов исследования, так и модернизации уже существующих. Но в основе этого процесса всегда лежит идея. Однако, любая идея относительно бесполезна, если нет технологии для ее реализации.

Идея цифровой полимеразной цепной реакции (цПЦР) возникла приблизительно в то же время, что и идея количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) в режиме реального времени, однако, в связи с тем, что на тот момент не имела достаточной материально-технической базы для своего адекватного воплощения, была почти забыта. За последние 100 лет в области диагностики инфекционных заболеваний мало что может сравниться по значимости с открытием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Если на

первых этапах эволюция этого метода была связана прежде всего с совершенствованием приборной и химической базы (ферменты), то теперь, по мере развития приборостроения и совершенствования систем микрофлюидики, появилась возможность модернизации самой сути построения аналитического процесса метода ПЦР. Поэтому можно смело заявить, что развитие технологий дало цифровой ПЦР второй шанс.

Принцип разделения реакционной смеси на множество отдельных микро- или даже нано-реакций, основанный на методе лимитирующих разведений, сейчас стал основным трендом в развитии методов молекулярной диагностики в целом и ПЦР в частности. Этот способ позволяет добиться более точного, чувствительного и специфичного анализа искомой молекулы, а также существенно снизить расход реагентов, а соответственно, понизить стоимость анализа. Данный подход используется как для анализа молекул белкового происхождения при проведении цифрового иммуноферментного анализа [1], так и для обнаружения нуклеиновых кислот, то есть цифровой полимеразной цепной реакции (цПЦР). Свое название “цифровой” эти методы получили из-за способа анализа, напоминающего двоичный код, где результат оценивается как 0 (отсутствие сигнала) и 1 (наличие сигнала). Технология цифровой ПЦР предполагает разделение исследуемого образца, содержащего искомую нуклеи-

Список сокращений: кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, ПЦР – полимеразная цепная реакция, цПЦР – цифровая полимеразная цепная реакция, LOD – (Limit of Detection) предел обнаружения, LOQ – (Limit of Quantitation) предел количественного определения, РОС – (point-of-care) диагностика в месте наблюдения за больным, LAMP – (Loop-Mediated Isothermal Amplification) технология петлевой изотермической амплификации.

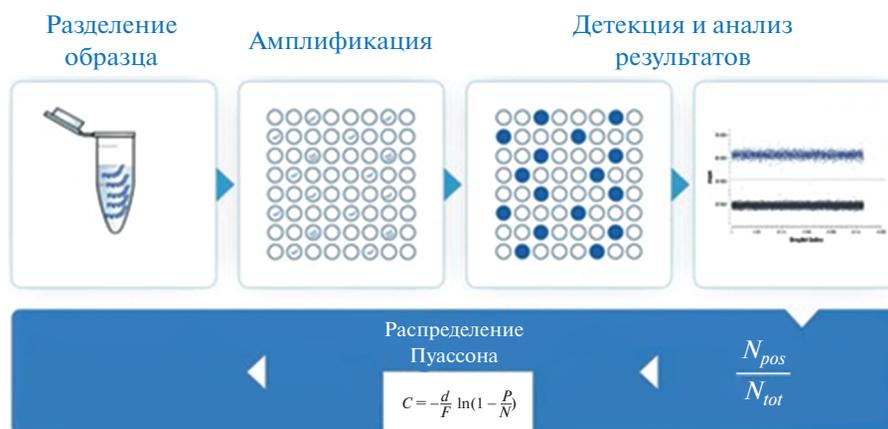


Рис. 1. Схематическое изображение рабочего процесса при постановке реакции цифровой ПЦР.
Fig. 1. Digital PCR workflow schematic representation.

новую кислоту, на сотни или даже миллионы отдельных микрореакторов, которые, в идеале, содержат либо одну, либо ни одной матричной нуклеиновой кислоты (рис. 1).

Далее следует стадия рутинного термоциклирования, после чего идет автоматизированный подсчет количества микрореакторов, где прошла амплификация исследуемого образца. Однако, при недостаточном разведении образца, в отдельные микрореакторы может попасть более одной искомой молекулы, поэтому к полученному числу положительных проведенных реакций амплификации применяется статистический коррекционный анализ Пуассона, тем самым определяя абсолютное количество молекул-мишеней.

Таким образом, цифровая ПЦР имеет ряд дополнительных преимуществ, включая более высокую точность детекции, отсутствие необходимости использования контрольных образцов-калибраторов и большую устойчивость к ингибиторам амплификации. Данные преимущества позволили использовать эту технологию в таких областях, как прецизионная медицина (инфекционные заболевания и рак) [2–6], клиническая диагностика (жидкостная биопсия, пренатальное тестирование, вирусология) [7–9] и другие [10–13].

Целью данного обзора является анализ и сравнение технологических аспектов работы существующих сегодня платформ цифровой ПЦР основываясь на литературных данных [14–17], а также, учитывая собственный опыт при использовании некоторых из них.

Исторический экскурс

Первым задокументированным упоминанием идеи цифровой ПЦР можно считать публикацию корпорации *Cetus* в 1988 году, в которой исследователи, используя метод лимитирующих разведе-

ний, показали, что может быть амплифицирована и достоверно обнаружена одна копия гена β -глобина [18]. Далее в 1990 г. Симмондс и Браун использовали эту концепцию для количественной оценки провирусов в ВИЧ-инфицированных клетках [19]. Однако только Алекс Морли и Памела Сайкс увидели преимущество этого метода в отсутствии калибраторов и отнесли его к абсолютным количественным в 1992 г. [20]. В своей работе они провели количественную оценку наличия гена, кодирующего участок тяжелой цепи иммуноглобулина IgH в клетках лейкомиического клона, на фоне избытка этого гена в клетках нормальных лимфоцитов. В 1999 г. Берг Фогельштейн и Кеннет Кинзлер ввели термин “цифровая ПЦР” и показали, что этот метод можно использовать для обнаружения редких онкологических мутаций на примере онкогена *KRAS* [21].

Однако на тот момент цифровая ПЦР была трудно выполнима: метод оказался трудоемким при анализе большого количества образцов и требовал большой аккуратности. В 2003 г. Кинзлер и Фогельштейн продолжили совершенствовать цифровую ПЦР и создали улучшенный метод, который они назвали технологией *BEAMing*, первая часть слова – аббревиатура, и расшифровывается как “шарики (B), эмульсия (E), амплификация (A) и магнетизм (M)” [22]. В новом протоколе использовалась эмульсия с магнитными частицами для разделения реакций амплификации в одной пробирке. Это изменение позволило ученым масштабировать метод до тысяч реакций за один прогон.

Компании, разрабатывающие коммерческие системы цифровой ПЦР, постепенно интегрировали технологии, позволяющие повысить эффективность процесса: автоматическое разделение образцов, цифровой подсчет мишеней нуклеиновых кислот и увеличение количества капель. В последние годы ученые разработали и коммерци-

ализировали основанную на цифровой ПЦР диагностику ряда заболеваний, включая немелкоклеточный рак легкого и синдром Дауна. Первая система цифровой ПЦР для клинического использования получила маркировку CE в 2017 г. и одобрена Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США в 2019 г. для диагностики хронического миелоидного лейкоза.

Цифровую ПЦР можно рассматривать как модифицированную версию количественной ПЦР. Далее, чтобы понять основные различия между этими платформами, мы коротко проведем сравнение традиционной количественной ПЦР в режиме реального времени и современных методов цифровой ПЦР.

Принцип работы цифровой ПЦР

Цифровая ПЦР в настоящее время является популярной версией ПЦР, которая преодолевает недостатки количественной ПЦР, позволяя абсолютное количественное определение амплифицированного целевого фрагмента нуклеиновой кислоты.

На рис. 2 схематически показан рабочий процесс цифровой ПЦР для обнаружения и количественного определения нуклеиновых кислот, он включает в себя следующие этапы:

I. Экстракция нуклеиновых кислот.

Начальный этап в подготовке любой ПЦР представляет собой экстракцию нуклеиновых кислот из образца ткани или другого материала с использованием различных методов, например, магнитного сорбента нуклеиновых кислот [24] или любого другого метода предварительной обработки [25, 26].

II. Разделение реакционной смеси.

Экстракт, содержащий искомую нуклеиновую кислоту-мишень, затем подвергается значительному разбавлению и разделению на несколько тысяч или миллионов отдельных единиц, где каждый микрореактор может содержать одну или несколько копий искомой нуклеиновой кислоты или вообще не содержать ее. Традиционно это делалось с использованием обычных 96- или 384-луночных планшетов, что было достаточно трудоемко и утомительно. Маленькое количество микрореакторов и их достаточно большой объем (диапазон микролитров) ограничивали чувствительность и точность ранних версий цифровой ПЦР [27]. Современные коммерческие платформы благодаря развитию микрофлюидных технологий позволили существенно уменьшить размер микрореактора и фактически делят реакционную смесь на десятки тысяч нано/пиколитровых микрореакторов. Этот прорыв позволил сделать цифровую ПЦР доступной и массовой.

В процессе развития технологии для цифровой ПЦР были разработаны различные методы разде-

ления реакционной смеси образцов, в том числе на основе капель (капельная цифровая ПЦР), с использованием капиллярной силы в микролунках, на базе микрофлюидных каналов и камер [28, 29], и дисперсия образцов с помощью печати (струйная печать или контактная печать) [30, 31]. Данные методы отличаются размером микрореактора (или объемом оцифрованного образца), количеством микрореакторов (характеризует пропускную способность прибора), термической стабильностью реакции и скоростью диспергирования [32–34]. Мультиплексная цифровая ПЦР с использованием шариков гидрогеля является еще одной стратегией разделения образца [35–37]. Как правило, для систем цифровой ПЦР с небольшим объемом микрореактора характерна хорошая термическая стабильность, большая пропускная способность и высокая скорость диспергирования [38].

III. Амплификация нуклеиновых кислот.

Помимо образца ДНК или РНК, каждый микрореактор также заполнен реагентами для проведения ПЦР, аналогичными тем, которые используются для обычной количественной ПЦР и, таким образом, может функционировать как изолированный нано-реактор ПЦР. Амплификация ПЦР состоит из стадий денатурации, отжига и элонгации, которые регулируются термически. Процесс термоциклирования может быть стационарным или распределенным в пространстве в зависимости от расположения термоблока. В итоге, в микрореакторах, в которых нет нуклеиновой кислоты, не будет и продуктов ПЦР после амплификации. В то время как те, которые содержали искомую нуклеиновую кислоту, будут иметь положительный сигнал флуоресценции и, следовательно, в них будут присутствовать продукты ПЦР.

IV Анализ цифровой ПЦР

Флуоресцентный сигнал отличный от фона после амплификации будет только у тех микрореакторов, которые содержали искомую матрицу. Флуоресценция микрореакторов сравнимая с фоном, означает полное отсутствие в них целевых молекул нуклеиновой кислоты. Далее простым подсчетом положительных и отрицательных микрореакторов с помощью сверхчувствительных детекторов флуоресценции, можно оценить количество исследуемой ДНК или РНК в образце. Именно это и приводит к бинарному количественному определению продукта ПЦР и, следовательно, к термину “цифровой”. Поскольку, даже при достаточном разбавлении образца существует вероятность попадания в один микрореактор нескольких одинаковых молекул ДНК/РНК, используется математическая модель уравнения Пуассона. Доверительные интервалы Пуассона (C_b) обычно указываются в описании оборудования для цифровой ПЦР с учетом ошибки разделения и ошибки подвыборки (рис. 3).

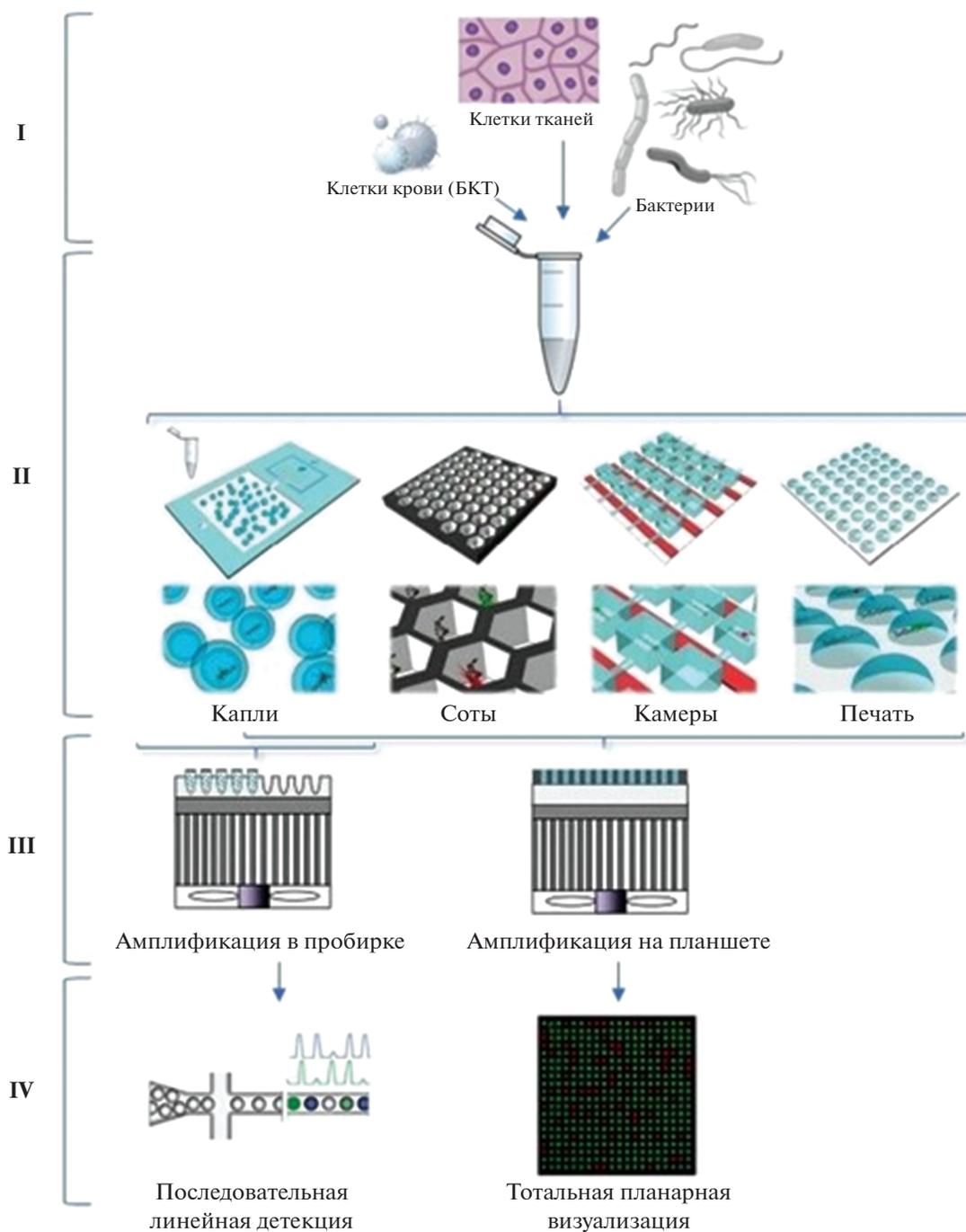


Рис. 2. Объединенное схематическое изображение рабочего процесса при постановке реакции цифровой ПЦР, отражающее четыре основных этапа: выделение нуклеиновой кислоты, разделение реакционной смеси, амплификация и процесс детекции и анализа результата [23].

Fig. 2. A combined schematic representation of the digital PCR workflow, showing four main stages: nucleic acid isolation, separation of the reaction mixture, amplification and the process of detection and analysis of the result [23].

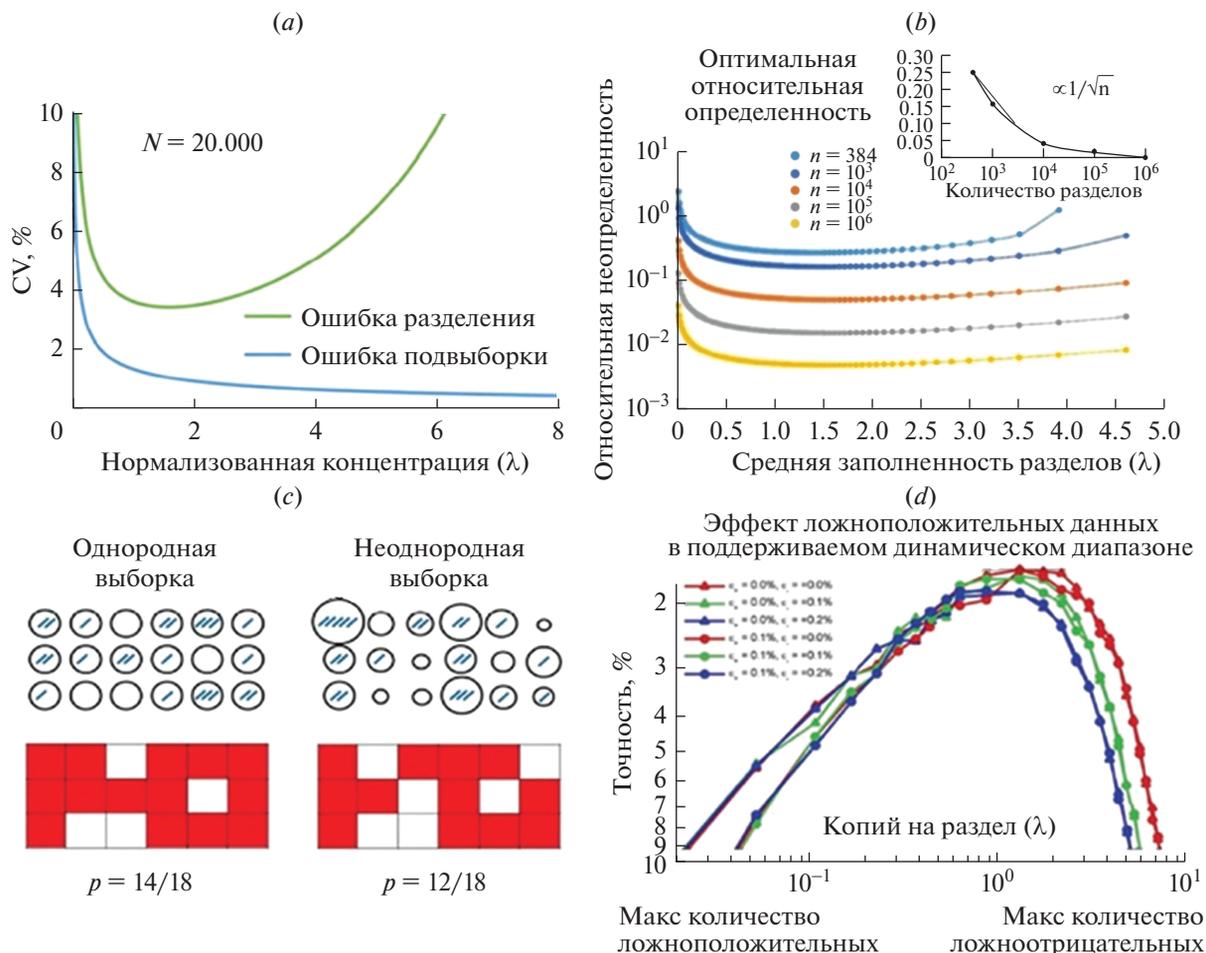


Рис. 3. Результаты, показывающие, что неопределенность в цифровом ПЦР зависит от среднего количества молекул в микрореакторе (λ) и вариабельности его объема. (a) — Относительный вклад ошибок разделения и подвыборки образцов в общую ошибку цифровой ПЦР [27]. (b) — Точность количественного определения цифровой ПЦР для разного количества реакционных микрореакторов. В верхней части рис. показано отрицательное изменение относительной неопределенности (взятой при $\lambda \sim 1.6$), выражаемое как обратный квадратный корень из числа микрореакторов [14]. (c) — Влияние изменения объема микрореактора на распределение молекул. Оба случая содержат такое же количество копий, но на правой панели изменчивость объема микрореактора дает меньшее количество положительных сигналов единицы измерения [40]. (d) — Влияние ложных вызовов реакции на точность и динамический диапазон. Ложные срабатывания по-разному влияют на кривые точности от ложноотрицательных показателей. Ложноположительные показатели представлены на графике фигурами (треугольники = 0.0%, кружки = 0.1%). Ложноотрицательные представлены цветами (красный = 0.0%, зеленый = 0.1%, синий = 0.2%). Обратите внимание, что ложные срабатывания сильно влияют на точность при более низких концентрациях (где очень мало положительных результатов) и ложноотрицательные результаты сильно влияют на точность при более высоких концентрациях. (где минусов очень мало) [86].

Fig. 3. Results showing that uncertainty in dPCR depends on average number of molecules per partition (λ) and partition volume variability. (a)—Relative contribution of partitioning error and subsampling error to dPCR error [27]. (b)—Quantification accuracy of dPCR with different partition numbers. The inset shows the evolution of the relative uncertainty (taken at $\lambda \sim 1.6$) decays as an inverse square root with the number of partitions [14]. (c) — Shows the effect of partition volume variation on the distribution of molecules. Both cases contain the same number of copies, but in the right panel, partition volume variability yields a smaller number of positive signal units [40]. (d)—Shows the effect of false reaction calls on precision and dynamic range. False positives effect precision curves differently from false negatives. False positive rates are represented in the plot via shapes (triangles = 0.0%, circles = 0.1%). False negative rates are represented by colors (red = 0.0%, green = 0.1%, blue = 0.2%). Note that false positives strongly impact precision at lower concentrations (where there are very few positives) and false negatives strongly impact precision at higher concentrations (where there are very few negatives) [86].

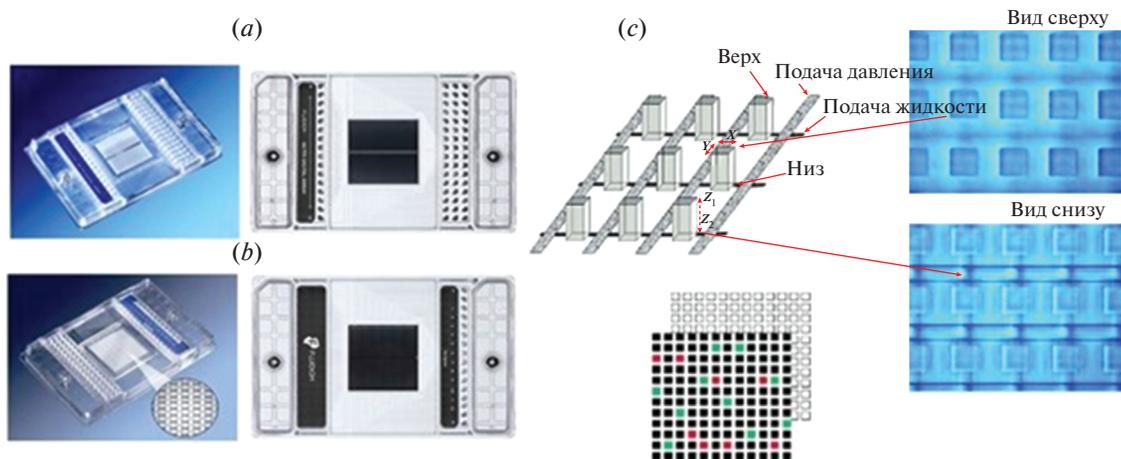


Рис. 4. Чипы Integrated Fluidic Circuits (IFCs): (a) – qdPCR 37K™ (полностью аналогичен IFC 48.770 Digital Array™); (b) – IFC 12.765 Digital Array™; (c) – схематическое изображение устройства чипа.

Fig. 4. Integrated Fluidic Circuits (IFCs) chips: (a) qdPCR 37K™ (exactly the same as IFC 48.770 Digital Array™); (b) – IFC 12.765 Digital Array™; (c) – schematic diagram of the chip design.

По сравнению с количественной, преимуществами цифровой ПЦР являются более высокая точность, повышенная устойчивость к ингибиторам, большая чувствительность для обнаружения низкого числа копий и отсутствие необходимости построения калибровочной кривой и применения калибраторов с известной концентрацией.

Обзор современных коммерческих платформ цифровой ПЦР

На момент написания статьи можно выделить два принципиально различных подхода данного метода, имеющиеся на рынке:

1) капельные платформы для цифровой ПЦР (капельная или эмульсионная цПЦР), в которых идет приготовление капель эмульсии из исходной реакционной смеси;

2) платформы, использующие фиксированное камерное разделение на основе чипов или планшетов (планшетные цПЦР). Как правило, анализ результатов реакции на данных приборах также отличается: для приборов капельного типа характерен линейный последовательный анализ потока капель эмульсии, в то время как для планшетных приборов это планарная визуализация общей картины результатов амплификации (рис. 2).

Камерные или планшетные приборы для цифровой ПЦР

Принцип разделения смеси в устройствах камерной цифровой ПЦР, также известной как цифровая ПЦР на чипах/планшетах или цифровая ПЦР в микролунках, основан на пассивном разделении смеси на отдельные фиксированные реакционные подразделы [40]. В архитектуре устройств

данного типа чаще всего используются различные полимерные материалы, например, полидиметилсилоксан (PDMS), полиметилметакрилат (PMMA), а в качестве основы – кремниевые подложки. Технология изготовления таких чипов во многом сходна с технологией производства печатных плат и включает такие методы как фотолитография, импринт-литография и другие.

Серия BioMark от Fluidigm

Первой компанией, выпустившей прибор для цифровой ПЦР на рынок в 2006 г., была корпорация Fluidigm (сейчас Standard BioTools Inc, США). Компания специализируется на выпуске оборудования для камерной цифровой ПЦР. На данный момент компания представляет две основные платформы для анализа цифровой ПЦР – систему Biomark™ HD и отдельно EP1™ Reader, более бюджетный вариант.

Разделение реакционной смеси в системе Bio-mark происходит под давлением в контроллере IFC Controller на специальных чипах – Integrated Fluidic Circuits (IFCs) (рис. 4). Данные чипы имеют такой же размер, как и стандартный 96-луночный планшет для ПЦР. Однако, в зависимости от модели, микрофлюидные конфигурации камер различаются. Архитектура каналов и камер построена из слоев специального газопроницаемого материала, что позволяет максимально заполнять пространство внутри и исключить появление мертвого объема. Загрузка и разделение образцов внутри картриджа происходит под давлением с использованием специального иммерсионного масла, которое изолирует каждую реакционную камеру в процессе разделения и является своеобразным

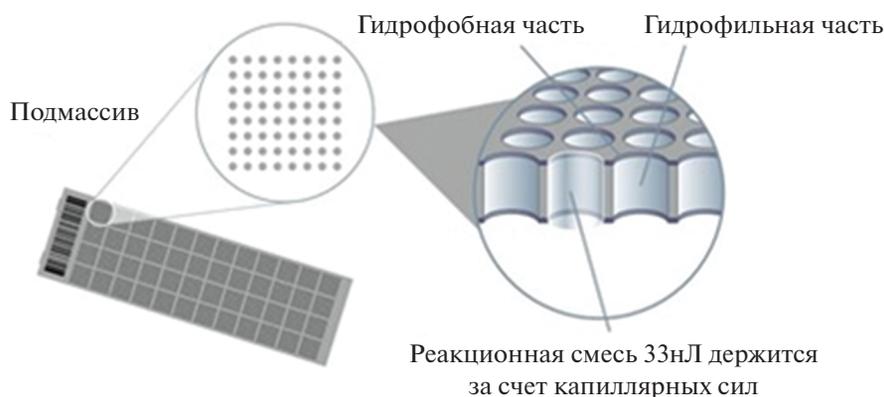


Рис. 5. Устройство планшетов OpenArray plate.
Fig. 5. OpenArray plate architecture.

переключателем потоков жидкости при смешивании образца и реакционной смеси.

Для проведения цифровой ПЦР доступны три варианта микрофлюидных планшетов: qdPCR 37K™, IFC 48.770 Digital Array™ и IFC 12.765 Digital Array™ IFC. Использование первого варианта конфигурации планшета позволяет проводить амплификацию разделенных образцов в режиме реального времени, последние два — предназначены для амплификации и детекции по конечной точке. Разделение реакционной смеси возможно на 765 камер при анализе 12 образцов (всего 9180 реакций) объемом 6 нл, либо на 770 отдельных реакций объемом 0.85 нл для 48 образцов (всего 36960 реакций) за один цикл работы прибора.

Система Biomark™ HD имеет встроенный термоциклер и способна проводить цифровую ПЦР в режиме реального времени, в то время как прибор EP1™ Reader представляет собой исключительно детектор флуоресцентного сигнала по конечной точке. Термоциклирование планшетов происходит в отдельно стоящем приборе. Соответственно, можно масштабировать эксперимент имея несколько термоциклеров и контроллеров.

BioMark HD производит амплификацию и позволяет детектировать флуоресценцию как по конечной точке, так и в режиме реального времени с помощью планарной методики визуализации результатов эксперимента [41]. Данные возможности не только существенно расширяют область применения этого прибора, но также позволяют производить программную корректировку при получении ложноположительных результатов отдельных реакционных ячеек, что имеет большое значение при статистическом обчете и точности получения абсолютных значений концентрации искомого образца [42]. Существенным плюсом технологии является открытость платформы то есть система не привязана к конкретным производителям реактивов. Компания предлагает различные гото-

вые панели реагентов для анализа как ДНК, так и РНК молекул, содержащие специфические праймеры и олигонуклеотидные зонды, ферменты и буферные растворы, а также отдельные компоненты для проведения исследований, смоделированных пользователем. Для готовых наборов реагентов можно также использовать специально разработанные приложения программного обеспечения данной системы, например, для определения однонуклеотидных замен или вариаций числа копий генов.

В работах Уайта и соавт. была показана абсолютная количественная оценка скрытого вируса гепатита В с использованием системы цифровой ПЦР от Fluidigm. Это первое исследование, предлагающее GBV-C репликацию в моноцитарных клональных клетках с использованием цПЦР. Было показано, что можно изучать вирусную нагрузку РНК-вируса млекопитающих непосредственно в цифровом формате [39].

Cepия QuantStudio om Thermo Fisher Scientific

Системы цифровой ПЦР QuantStudio от Thermo Fisher Scientific Inc. (США) также относятся к приборам цифровой ПЦР планшетного типа. На данный момент на рынке представлены два основных технологических решения — система QuantStudio 3D Digital PCR System и QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System. Системы используют разные типы планшетов для ПЦР.

Система QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System является самым универсальным инструментом линейки амплификаторов QuantStudio и представляет собой довольно гибкое устройство, позволяющее проводить ПЦР в режиме реального времени на различных форматах ПЦР-планшетов как в классических 384-луночных и 96-луночных планшетах (0.1 и 0.2 mL), так и в специальных картах TaqMan Array Card, а также, используя



Рис. 6. (а) – Устройство чипа QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip. (б) – Процесс внесения образца на чип QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip.

Fig. 6. (a)—QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip device. (b)—Sample loading process on the QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip.

специальные чипы для цифровой ПЦР – OpenArray plate (рис. 5).

Чип OpenArray plate представляет собой сеть из сквозных цилиндрических ячеек диаметром и высотой 300 мкм и имеют объем 33 нл. Один чип содержит 3072 таких ячейки, за один цикл работы системы можно поставить 4 чипа одновременно. Образец вводится на чип и удерживается капиллярными силами. Амплификация и детекция флуоресцентного сигнала происходит в одном приборе.

Система QuantStudio 3D Digital PCR System была создана исключительно для постановки реакции цифровой ПЦР и использует только специальные чипы QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip (рис. 6). Реакционная смесь вводится на чип сверху специальным наконечником, напоминающим лезвие, и проникает в соты. Сверху насаивается иммерсионное масло, которое препятствует смешиванию образцов. Чип запаивается для предотвращения кросс-контаминации и помещается в амплификатор в специальных плоских термоблоках. Анализатор имеет два канала детекции и не позволяет проводить ПЦР в режиме реального времени.

Чип QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip состоит из 20000 индивидуальных ячеек размером 10 мм² каждая. За один рабочий цикл прибора можно поставить одновременно в амплификатор до 24 чипов, что соответствует 480000 реакциям.

COMBINATi Absolute Q

В сентябре 2020 г. Combinati Inc. (США), поставщик медицинского оборудования, предложил принципиально новый формат цифровой ПЦР и даже разработал тест-систему для быстрой и точной диагностики COVID-19. Технология предполагала полностью автоматизированный процесс постановки ПЦР в цифровом формате, пользователь лишь должен был загрузить образцы на специальный чип и поместить его в прибор. Это существенно снижало трудозатраты и исключало ряд возможных ошибок. Разделение образцов,

амплификация и анализ флуоресцентного сигнала происходит в одном приборе, один рабочий цикл которого занимает всего 90 минут.

В январе 2022 г. данная технология была приобретена Thermo Fisher Scientific Inc. и анонсирована как первый полностью интегрированный прибор для цифровой ПЦР под новым названием QuantStudio Absolute Q.

Absolute Q основана на микрофлюидной массиве технологии Microfluidic Array Plate Technology (MAP16). Картридж MAP (рис. 7, 8) имеет 16 реакционных единиц для цифровой ПЦР, которые легко различить. Каждая реакционная единица (непрозрачный квадрат) состоит из 20480 микрокамер с фиксированным массивом. Сами микрокамеры связаны распределительной сетью, которая используется для доставки реагентов для ПЦР. После разделения реагентов на микрокамеры начинается ПЦР-амплификация и далее подсчитывается количество микрокамер с успешной амплификацией нуклеиновых кислот. Данная модель отличается тем, что использует инъекционный способ формовки микрофлюидного массива, что существенно снижает стоимость картриджей.

Использование фиксированных камер для отдельных реакций исключает стохастический сдвиг жидкости, возникающий при работе с системами капельной цифровой ПЦР, где отдельные реакционные камеры представляют собой капли эмульсии вода-масло. Кроме того, удается существенно снизить отходы производства.

Несколько исследовательских групп использовали систему Quantstudio. Так, Донг и соавт. была проведена точная количественная оценка копий сертифицированной плазмидной ДНК pNIM-001 с применением платформы цифровой ПЦР QuantStudio 12k. Они предоставили независимую оценку эффективности определения числа копий ДНК и подчеркнули важность объема раздела при разработке экспериментов цифровой ПЦР [43]. Конте и соавт. предложили чиповый метод профилирования, основанный на определении цир-

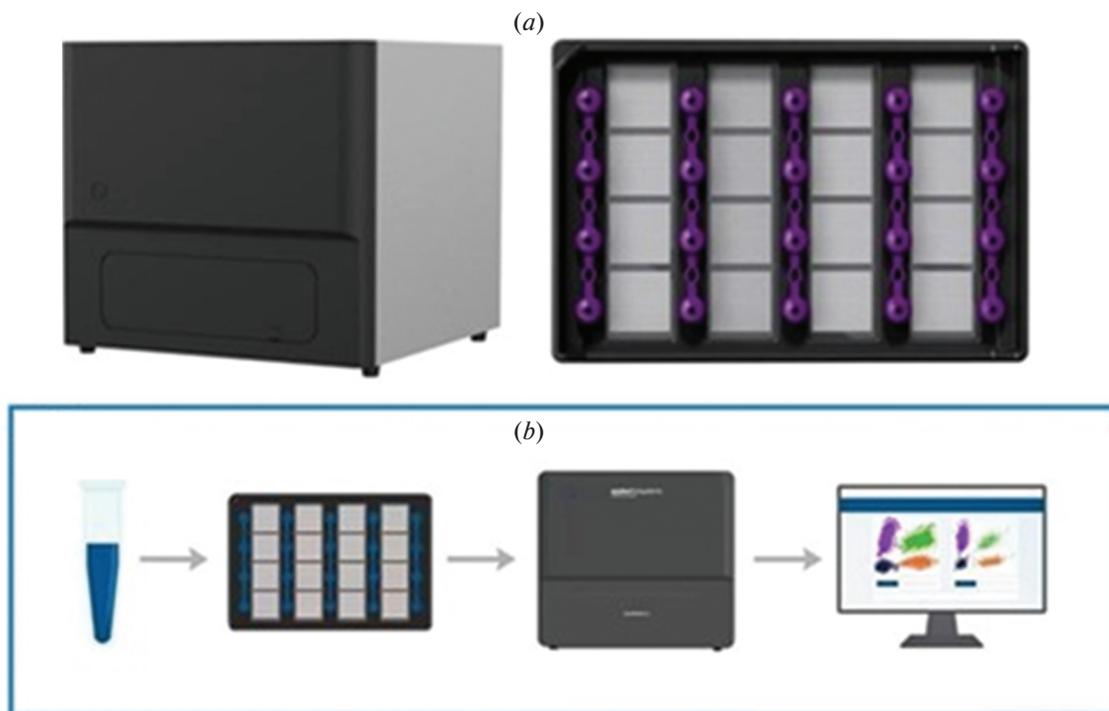


Рис. 7. (a) – Прибор COMBINATi Absolute Q и чип. (b) – Схематическое изображение рабочего процесса прибора COMBINATi Absolute Q.

Fig. 7. (a)—COMBINATi Absolute Q device and chip. (b)—Schematic representation of the COMBINATi Absolute Q operating process.

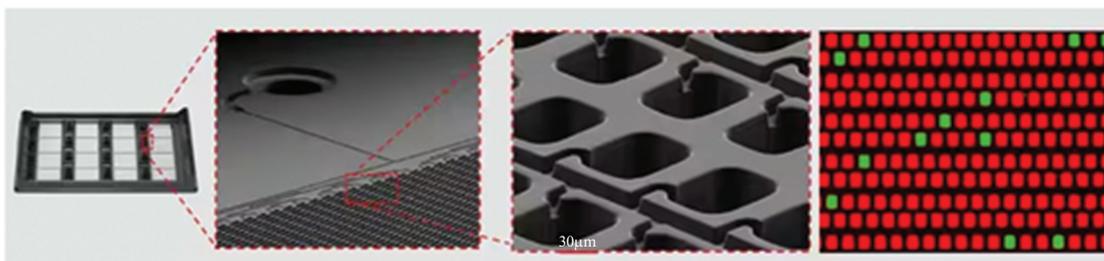


Рис. 8. Детальное изображение устройства чипа Microfluidic Array Plate Technology (MAP16) для COMBINATi Absolute Q.

Fig. 8. Detailed image of the Microfluidic Array Plate Technology (MAP16) chip for COMBINATi Absolute Q.

кулирующей микроРНК из образцов плазмы пациентов с раком легких, а также в тканях легких и клеточных линиях с помощью системы QuantStudio 3D. Этот метод количественной оценки копий микроРНК в настоящее время надежный инструмент для диагностики рака легких и других заболеваний [44]. Фэнг и соавт. также использовали систему цифровой ПЦР QuantStudio 3D для обнаружения мутаций рецептора эпидермального фактора роста в плазме (EGFR) T790M у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Они сравнили результаты анализа с системой ARMS ПЦР и показали, что QuantStudio 3D демонстрирует более вы-

сокую чувствительность и специфичность для обнаружения мутации EGFR T790M в плазме [45].

Компания COMBINATi разработала набор COMBINATi Q SARS-CoV-2 RT-dPCR Triplex Kit, который в сочетании с платформой Absolute Q и реагентами от Promega RSC для очистки нуклеиновых кислот широко использовались при обнаружении и количественном определении SARS-CoV-2. Количественный анализ также может быть применен для широкого спектра приложений, включая мониторинг изменения вирусной нагрузки при терапии у пациентов или оценки качества сточных вод.

Цзян и соавт. опубликовали работу по исследованию спинальной мышечной атрофии (SMA),

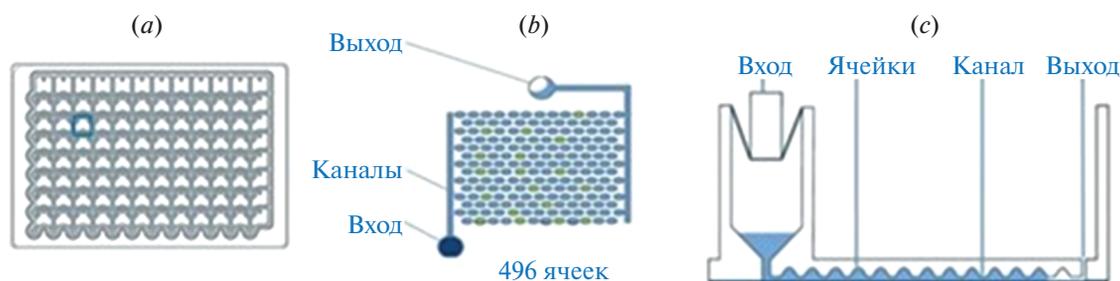


Рис. 9. Устройство нанопластины в системе QIAcuity. (a) – общий план архитектуры картриджа. Отдельная ячейка выделена синим цветом, (b) – устройство отдельной ячейки картриджа, вид сверху, (c) – устройство отдельной ячейки, вид сбоку.

Fig. 9. Design of a nanoplate in the QIAcuity system. (a)—general plan of the cartridge architecture. An individual cell is highlighted in blue, (b)—device of an individual cartridge cell, top view, (c)—device of a separate cell, side view.

и провели анализ генотипирования методом цифровой ПЦР с использованием COMBiNATi Q [46]. Дук и соавт. использовали эту систему для обнаружения и количественного анализа редких мутантов EGFR T790M при немелкоклеточном раке легкого, анализируя циркулирующую внеклеточную ДНК [47].

Qiagen QIAcuity

В 2013 году был представлен прибор для цифровой ПЦР Constellation от Formulatrix, где разделение, термоциклирование и визуализационный анализ происходят в одном автоматизированном инструменте. В 2019 г. Formulatrix была приобретена компанией Qiagen (Германия) и повторно представлена как система QIAcuity в 2020 г.

В цифровой ПЦР-системе QIAcuity используется так называемая микрожидкостная технология нанопластин для преодоления проблем с нестабильной генерацией капель, трудоемким рабочим процессом, медленным считыванием капель и ограничений, касающихся различного рода неопределенностей при получении результатов анализов. Подготовленные образцы переносятся пипеткой на специальную нанопластину, где они автоматически разделяются на 0.34 нл камерные соты (рис. 9).

Рабочий процесс системы цифровой ПЦР QIAcuity на основе нанопластин аналогичен рабочему процессу стандартной количественной ПЦР, где пробоподготовка включает перенос разбавленных образцов и добавление мастер-микса, зондов и праймеров на 96- или 24-луночный наноплашет. Система полностью автоматизирует интегрированный рабочий процесс цифровой ПЦР – разделение, термоциклирование и визуализацию – что позволяет существенно ускорить работу и обеспечить получение результатов в течение менее двух часов.

Прибор позволяет проводить количественную оценку до 5 мишеней по разным каналам флюо-

ресцентной детекции одновременно и совместим как с флуоресцентным красителем EvaGreen, так и с флуоресцентными зондами типа Taqman.

Диллон и соавт. проводили исследование по обнаружению токсинов *Clostridium difficile* A и B с помощью количественной ПЦР. Они успешно заменили количественную ПЦР на цифровую от Constellation Formulatrix и провели сравнительный анализ. Было показано, что эта цифровая ПЦР от Constellation Formulatrix работает надежно, воспроизводимо и с более высокой чувствительностью по сравнению с традиционной количественной ПЦР [48]. Лей и соавт. провели клинические исследования длины теломеров от сотен пациентов с использованием восьми 96-луночных планшетов по 8500 мкл в каждой лунке и показали, что анализ может быть легко произведен в течение одного дня с помощью цифровой системы QIAcuity [49].

JN MedSys Clarity

Система Clarity от компании JN MedSys для разделения образцов предлагает так называемый метод “трубки в стрипе” (рис. 10). Clarity dPCR выпустила два разных продукта для цифровой ПЦР – Clarity и Clarity Plus. В данных системах происходит разделение образца на 10000–40000 разделов на специальном чипе высокой плотности внутри 0.2 мл пробирки для ПЦР в стрипе. Смесь для ПЦР, праймеры, зонды и образец вносятся в каждую пробирку, жидкость быстро втягивается автозагрузчиком в ячейки на кристалле под действием капиллярных сил [50].

Параллельно можно запускать вплоть до восьми реакций с выходом 32000–80000 ячеек на полосу трубки. Затем ячейки герметизируются уплотняющей жидкостью для разделения образцов и происходит этап обычного термоциклирования. Далее полоски трубок переносятся на считывающее устройство, где одновременно детектируются флуоресцентные сигналы от каждого раздела.

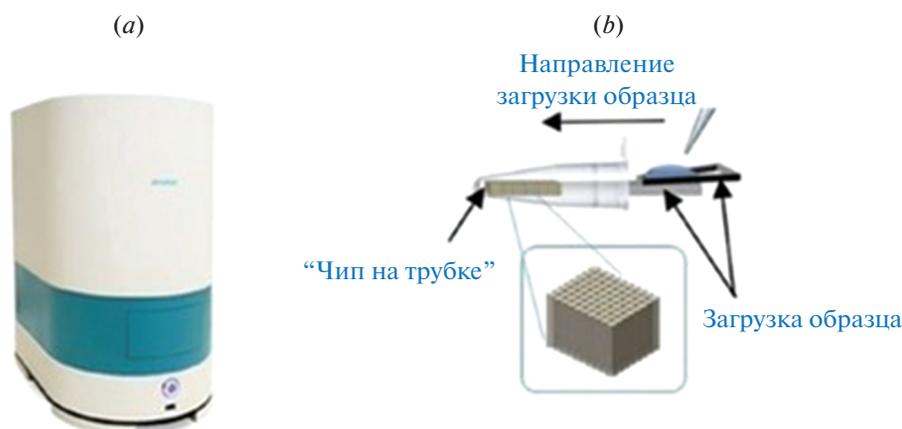


Рис. 10. Устройство системы Clarity от JN MedSys. (a) – внешний вид прибора, (b) – устройство “чипа на трубке”.
Fig. 10. Clarity system device from JN MedSys. (a)—appearance of the device, (b)—“chip on tube” device.

Дальнейший анализ: определение количества положительных реакций и общее число разделов, концентрацию каждого образца – определяют с использованием программного обеспечения Clarity и статистической корректировки Пуассона. Трубочные полоски Clarity совместимы с обычными тепловыми амплификаторами, позволяющими проводить до 96 реакций ПЦР за цикл. Операции позволяют считывать несколько реакций автоматически без вмешательства пользователя, обеспечивая простой рабочий процесс для высокопроизводительных экспериментов цифровой ПЦР. Прибор имеет два канала флуоресцентной детекции.

Недавно Лоу и соавт. показали, что количественная оценка ДНК при использовании Clarity сравнима с более распространенными системами QX100 от Bio-Rad и BioMark HD. Для изучения эффективности работы системы Clarity использовали единственный экземпляр гена РНКазы Р человека. Было измерено число копий гена ДНК с применением различных наборов мастер-миксов на основе красителей probead [50]. Цифровой метод на базе CRISPR для быстрой абсолютной амплификации нуклеиновых кислот [51] и метод абсолютного количественного определения гена рибосомной РНК [52] также были получены с использованием цифровой системы Clarity. Тан и др. изучали абсолютную количественную оценку вируса SARS-CoV-2 с помощью оптимизации анализа Clarity Plus. Они сравнили методы стандартной количественной ПЦР и цифровой ПЦР и показали, что последняя имеет более высокую чувствительность при обнаружении низких концентраций SARS-CoV-2 [53].

Цифровая технология ПЦР в режиме реального времени Optolane

Компания Optolane представила новейший фотосенсор CMOS на основе полупроводниковой тех-

нологии как третье поколение цифровых устройств ПЦР в режиме реального времени (рис. 11). Система позволяет выполнять сверхточную, сверхвысокоскоростную цифровую ПЦР в реальном времени. Как только образцы вводятся в специальный картридж d-RTPCR (Dr. PCR 20 K), они разделяются на 22000 лунок размером около 50 нм. каждая. Компания Optolane в настоящее время предоставляет наборы для цифровой ПЦР на ДНК ВИЧ в Центр по контролю за заболеваемостью США, а также подала заявку на одобрение наборов для диагностики COVID-19, которые позволяют получать результаты анализа менее чем за час.

Не так давно Лии и соавт. сравнили производительность систем цифрового ПЦР QX200 от Bio-Rad и Optolane на трех разных мишенях (ДНК EGFR, SARS-CoV-2 и РНК ВИЧ-1). Они обнаружили, что, хотя оба устройства цифровой ПЦР показали сходные количества копий для количественного определения ДНК и РНК, устройство компании Optolane обладало более высокой чувствительностью и точностью с точки зрения LOD (Limit of Detection) и LOQ (Limit of Quantitation), когда целевое число копий было весьма низким [54]. Согласно техническому примечанию, Kaiga COVID-19 Variant Detection Kit, набор для диагностики *in vitro* от Optolane (только для исследовательских целей) был разработан для количественного определения SARS-CoV-2. Кроме того, точная количественная оценка BCR-ABL1 и эталонных генов (т. е. ABL1 и GUSB) в диагностике лейкемии K562 и клетках HEK был выполнен с использованием Dr.PCR компании Optolane. Оба низкокопийные (BCR-ABL1) и высококопийные компоненты (ABL1) были надежно измерены с помощью Optolane dRTPCR без необходимости предварительного разбавления, демонстрируя большой динамический диапазон.

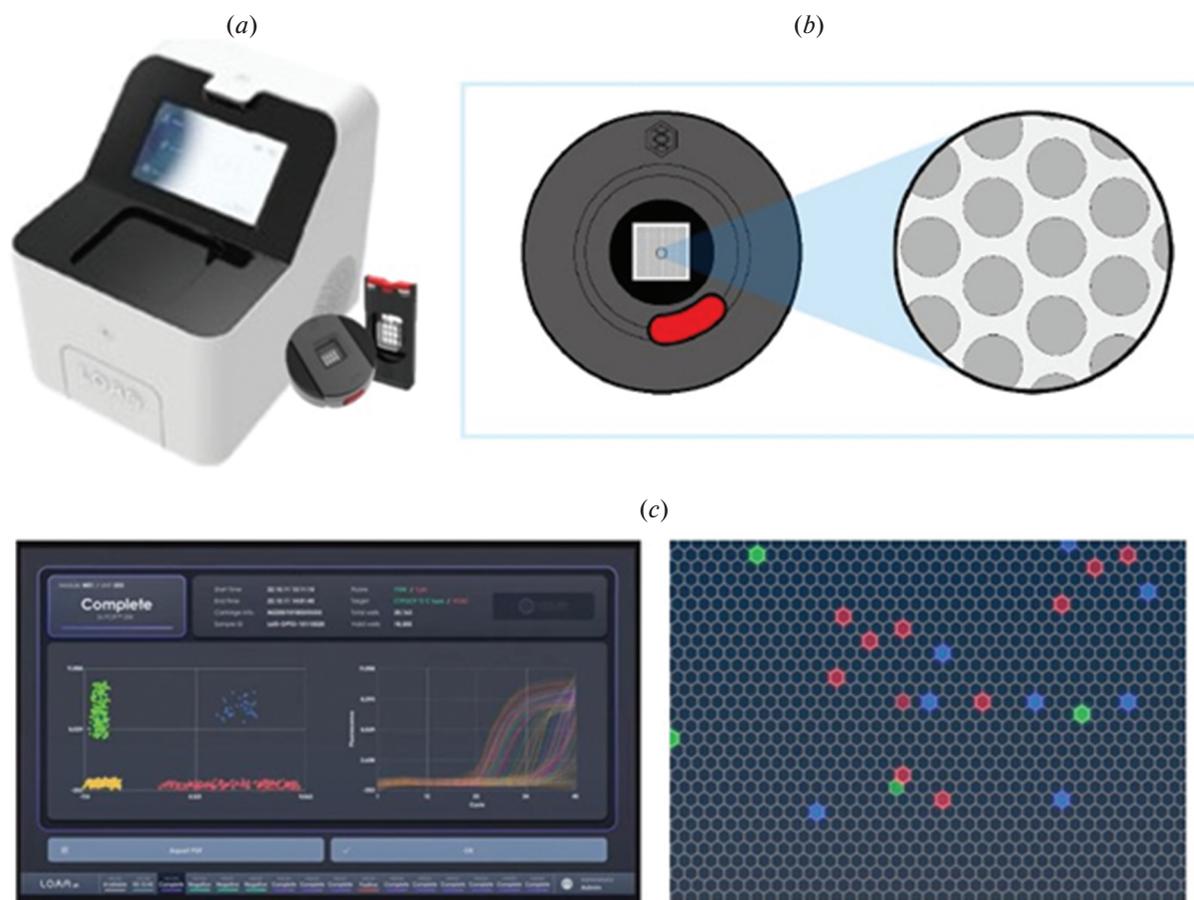


Рис. 11. Компоненты системы Optolane: (a) – прибор и картридж, (b) – устройство картриджа для проведения цифровой ПЦР, (c) – изображение полученных результатов.

Fig. 11. Components of the Optolane system: (a)—device and cartridge, (b)—cartridge device for digital PCR, (c)—image of the results obtained.

Технологии капельной цифровой ПЦР (droplet digital PCR)

Основой принципа разделения реакционной смеси в капельной цифровой ПЦР, также известной как микрожидкостная или эмульсионная цифровая ПЦР, является разделение образцов путем образования эмульсии вода/масло [55]. Монодисперсные капли эмульсии можно получить разными способами, например, методом Т-образной инъекции, перекрестным методом, где два потока масла объединяются с одним потоком жидкости, струйным методом или ступенчатым эмульгированием (рис. 12) [56–59].

Этот метод дает возможность манипулировать небольшими объемами капель, регулировать их объем, скорость непрерывного потока для производства капель и обеспечивает низкий расход реагентов.

Минеральное масло, которое используется для приготовления капель эмульсии, должно быть химически инертным и иметь низкую растворимость, чтобы предотвратить диффузию реагентов между

реакционными камерами. В данной технологии часто используются фторуглеродные масла, а для предотвращения коалесценции капель и стабилизации их поверхности на границе раздела фаз добавляют поверхностно-активные вещества, которые не должны взаимодействовать с образцом и препятствовать диффузии небольших биомолекул в минеральное масло [60–65]. Решения на основе микрожидкостных капель были успешно коммерциализованы компаниями Bio-Rad Laboratories и Stilla.

Серия Bio-Rad QX (панель QuantaLife)

Серия Bio-Rad QX в настоящее время является самой популярной системой капельной цифровой ПЦР. Устройство капельной цифровой ПЦР компания Bio-Rad приобрела у QuantaLife, Inc. и на данный момент на рынке уже представила три основных платформы, включая автоматизированную систему капельной цифровой ПЦР QX ONE. Серия QX100 была заменена на QX200 в связи с

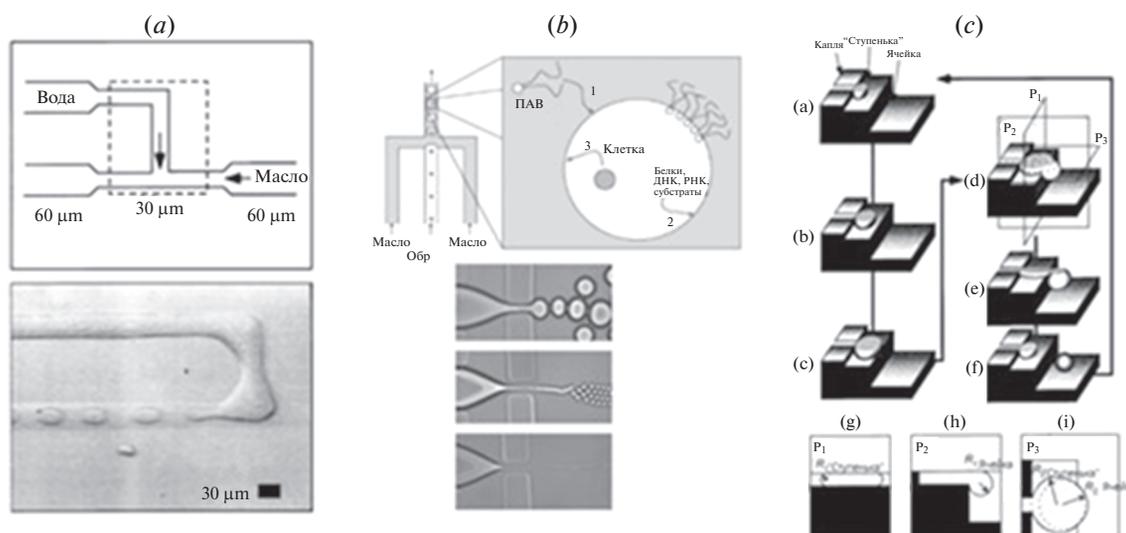


Рис. 12. Разные способы приготовления капель эмульсии вода-масло: (а) — метод Т-образной инъекции, (б) — струйный метод, где размер капель регулируется скоростью выдуваемого потока жидкости, (с) — ступенчатое эмульгирование.

Fig. 12. Different methods for preparing water-oil emulsion droplets: (a)—T-shaped injection method, (b)—jet method, the size of the droplets is controlled by the speed of the blown liquid flow, (c) — stepwise emulsification.

модернизацией химического состава реакционной смеси и внедрением возможности использования интеркалирующего красителя EvaGreen. Дальнейшее усовершенствование относилось к увеличению числа каналов флуоресцентной детекции до 6.

Основными компонентами системы капельной цифровой ПЦР являются два прибора: генератор и ридер капель эмульсии. Генератор способен произвести до 20000 капель эмульсии размером 1 нанолитр из каждого из 8 образцов, загруженных в специальный картридж, в котором происходит разделение образцов по системе микрофлюидных каналов. Затем капли из картриджа переносятся в стандартный 96-луночный планшет, запаиваются фольгой и помещаются в амплификатор, то есть амплификация происходит в планшете. Затем он помещается в ридер капель эмульсии, где из общей массы капель эмульсии от каждого образца формируется монопоток размером в одну каплю и происходит считывание флуоресцентного сигнала от каждой капли последовательно (рис. 13). Однако данный метод имеет ряд недостатков, один из наиболее существенных — зависимость от стабильности сформированных капель эмульсии [66].

Дутра и соавт. провели работу по восстановлению ДНК из капель, сгенерированных системой QX200. Эмульсия была приготовлена из образцов ДНК размером до 1 т.п.н., которые были использованы в качестве исходных данных для оценки эффективности восстановления ДНК. Авторы измеряли эффективность восстановления ДНК в процентах от исходной концентрации для каждо-

го образца. Количественный анализ проводили с использованием высокочувствительного Qubit dsDNA анализа (Thermo Fisher Scientific) [67].

Raindrop (приобретена BioRad)

RainDrop от компании RainDance Technologies была приобретена Bio-Rad в 2017 г. однако рыночное название оборудования в настоящее время не было изменено.

Raindrop основан на методе капельной цифровой ПЦР, в котором используется интегрированная конструкция, обеспечивающая высокую пропускную способность обработки и визуализация в режиме реального времени более 1 млн. капель на пиколитр. Это достигается за счет сочетания быстрого образования капель, термоциклирования на кристалле и широкопольной флуоресцентной визуализации на одной микрожидкостной платформе. Скорость образования капель частотой 3–8 кГц достигается с помощью разветвителя на 256 капель на стеклянной подложке PDMS (рис. 14) [68]. Система RainDrop имеет самую высокую пропускную способность из всех приборов, представленных на рынке цифровой ПЦР, являясь полезным приложением для изучения и выявления очень редких аллелей онкогенов, экспрессии генов, вариаций количества копий генов и измерение однонуклеотидных замен.

Демеке и др. использовали систему RainDrop для абсолютной количественной оценки наличия гено-модифицированного материала в образцах канолы, льна и сои. Уровень транскриптов опре-

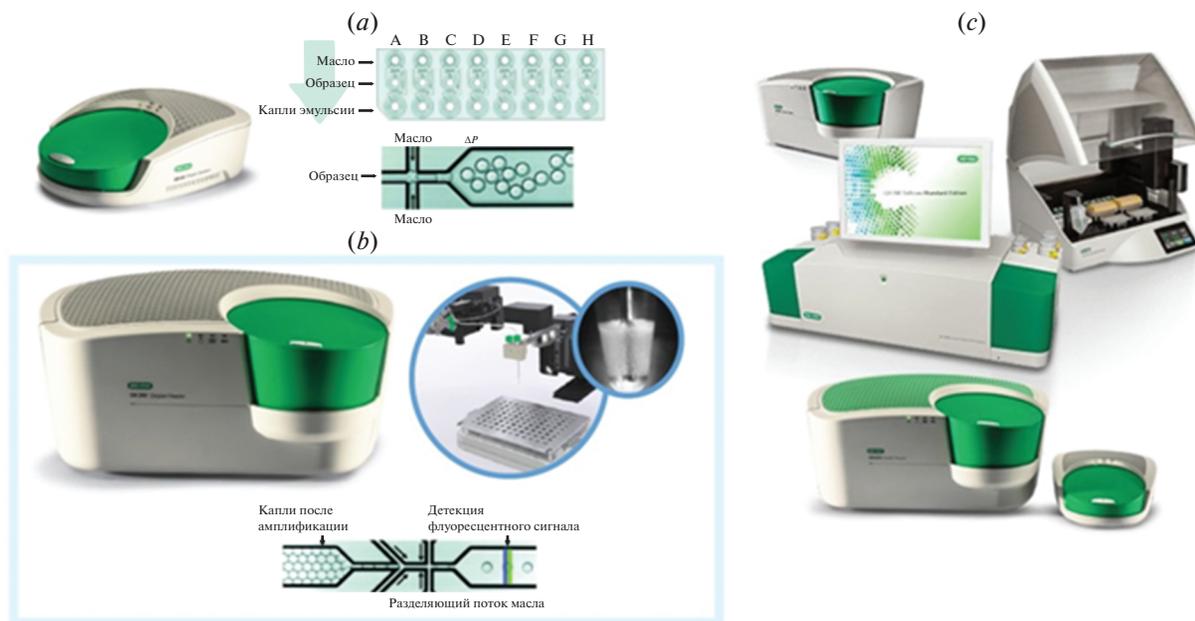


Рис. 13. Компоненты системы цифровой ПЦР от Bio-Rad. (a) – Генератор капель эмульсии. Устройство картриджа для генерации капель эмульсии и процесс формирования капель в системе микрофлюидных каналов генератора капель эмульсии системы QX Bio-Rad. (b) – Прибор для амплификации и считывания флуоресцентного сигнала преобразованного потока капель эмульсии в ридере капель системы QX Bio-Rad. (c) – Представленные на данный момент на рынке приборы цифровой ПЦР от компании Bio-Rad.

Fig. 13. Bio-Rad Digital PCR System Components. (a)—Emulsion droplet generator. The device of the cartridge for generating emulsion droplets and the process of droplet formation in the system of microfluidic channels of the emulsion droplet generator of the QX Bio-Rad system. (b)—Instrument for amplifying and reading the fluorescent signal of the converted stream of emulsion droplets in the droplet reader of the QX Bio-Rad system. (c)—Digital PCR devices currently on the market from Bio-Rad.

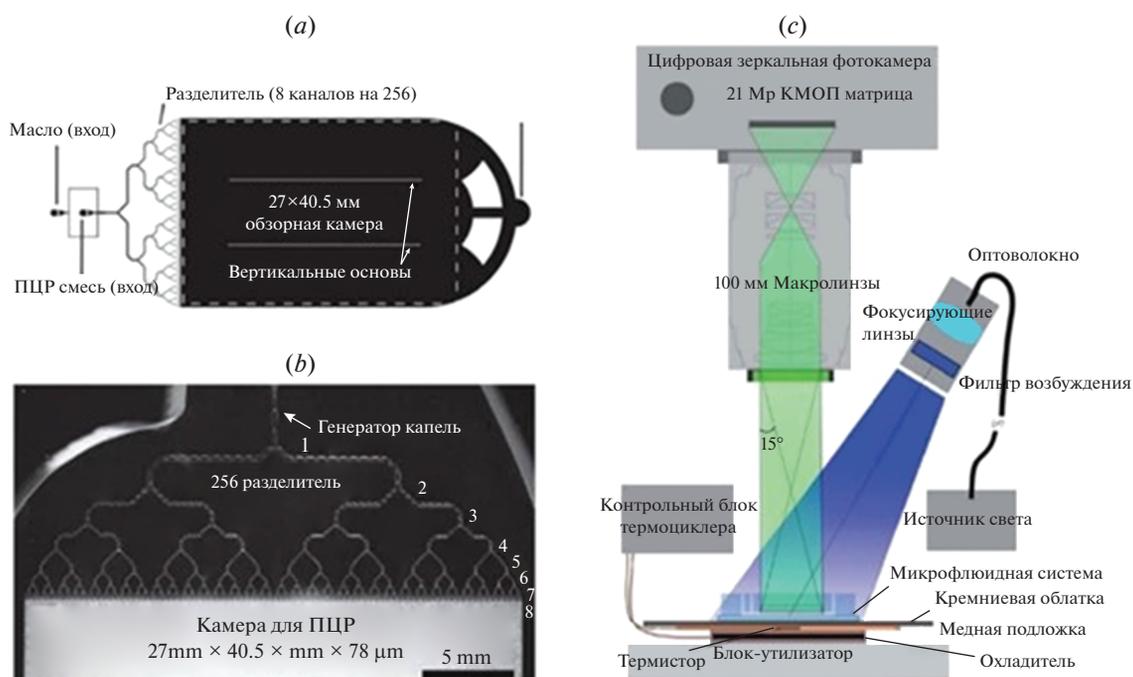


Рис. 14. Устройство системы RainDrop: (a), (b) – детальное изображение системы каналов для приготовления капель эмульсии, (c) – устройство считывания полученной информации с капель эмульсии.

Fig. 14. Design of the RainDrop system: (a), (b)—detailed image of the channel system for preparing emulsion drops, (c)—device for reading the received information from emulsion drops.

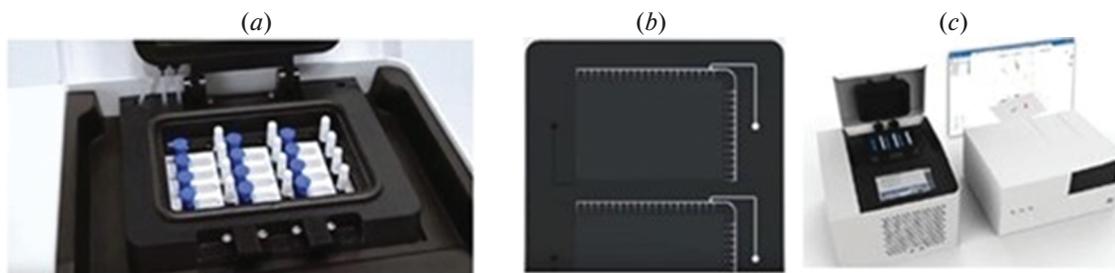


Рис. 15. Устройство системы цифровой ПЦР от Naica: (a) — общий вид постановки картриджей в приборе, (b) — архитектура картриджа, (c) — приборные компоненты системы Naica.

Fig. 15. Design of a digital PCR system from Naica: (a)—general view of the arrangement of cartridges in the device, (b)—cartridge architecture, (c)—instrument components of the Naica system

делялся наличием модифицированных генов в ОХУ235 (канола), FR967 (лен) и DP305423 (соя) на фоне дикого типа.

Результаты показали возможность применения капельной цифровой ПЦР для абсолютного количественного определения низких уровней концентрации генетически модифицированных материалов в образцах зерна [69]. Чанг и соавт. использовали платформу Raindrop и обновили протокол неинвазивного пренатального теста (НИПТ) для диагностики гомозиготных аутосомно-рецессивных точечных мутаций без необходимости получения фракции ДНК плода и успешно предсказали генотипы плода, используя одноэтапный НИПТ [70].

Технологии Стилла Naica

Stilla Technologies назвала свою технологию Naica “кристаллическая цифровая ПЦР”, которая представляет собой объединение технологии капельной цифровой ПЦР включенной в формат 2D-массива на подложке [71]. Тем не менее, Naica классифицируется как капельная цифровая ПЦР, так как капли реагента разделяется на масляной основе. Образцы для анализа вводятся в специальный чип Sapphire посредством герметизации в камере Naica Geode (рис. 15). Масло предварительно залито в сапфировый чип и когда водная смесь для ПЦР проходит через каплю форсунки, она самопроизвольно распадается на монодисперсные капли. Затем проводят термоциклирование и визуализацию.

Смесь Naica PCR специально разработана для оптимизации анализа кристаллической цифровой ПЦР на системе Naica, а линейка наборов для идентификации нуклеиновых кислот предлагает полный спектр решения для применения данной технологии в онкологии. Реагенты доступны как в концентрации 5×, так и в концентрации 1×, что делает эти мастер-миксы для ПЦР самыми высоко сконцентрированными для приложений цифровой ПЦР и увеличивает чувствительность ана-

лиза за счет увеличения поглощения образца и снижение анализа LOD [72].

Сравнение платформ цифровой ПЦР

В этом разделе мы попытались провести детальное сравнение технических характеристик и возможного практического применения обсуждавшихся выше коммерческих платформ цифровой ПЦР. В табл. 1 приведено подробное сравнение технических показателей 9 различных устройств цифровой ПЦР. Оказалось, что в большинстве исследований либо используются камерная система Biomark, HD (Fluidigm) [73–80] или системы капельных цифровых ПЦР компании Bio-Rad — QX100 и QX200 [81–85]. Поэтому сравнение в основном посвящено этим двум типам систем.

Точность и диапазон измерения

Как следует из табл. 1 инструменты QX200, RainDrop и Naica обычно генерируют наибольшее количество разделов реакционной смеси на образец при меньших объемах капель. Наименьшее и наибольшее количество капель на образец было сформировано RainDrop (5×10^6 – 10×10^6). В отличие от цифровой ПЦР планшетного типа, системы капельной цифровой ПЦР не ограничены в образовании количества и размеров капель эмульсии и могут быть использованы для создания большего количества капель при меньшем объеме реакционной смеси. Однако QuantStudio на основе чипов, Constellation/QIAcuity и Clarity также были в состоянии достичь более 10000 разделов на образец при объемах менее 2 нл. Чем больше количество разделений реакционной смеси, тем выше точность анализа.

Кроме того, чем выше количество разделений, тем больше динамический диапазон обнаружения, т.е. точные результаты получаются в более широком интервале измерений среднего количества копий на каплю. Более широкий динамический диапазон позволяет количественно оценить

Таблица 1. Сравнительная характеристика различных систем цифровой ПЦР, представленных на рынке. Таблица условно разделена на две: отдельно представлены предложения на основе камерной цифровой ПЦР, отдельно – капельного типа
Table 1. Comparative characteristics of various digital PCR systems on the market. The table is conditionally divided into two: proposals based on chamber digital PCR are presented separately, and proposals based on droplet type are presented separately

цПЦР платформа	цПЦР на чипах (камерные)					
	BioMark	QuantStudio 3D	QuantStudio 12K Flex	QIAcuity	Clarity/Clarity Plus	Optolane
Количество разделений на образец	765 (чип на 12) или 770 (чип на 48)	20 000	Кратно 64	8000 (стандарт), 36 000 (высокое разрешение)	80 000–32 000	9–22 000
Объем микрореактора	6 нл (чип на 12), 0.85 нл (чип на 48)	0.865 нл	33 нл	0.34 нл	1.5 нл	1.5 нл
Общий объем реакционной смеси, мкл	4–8	14.5	22	10	15	30
Динамический диапазон	6 lg (HD)	5 lg	До 7lg (для OpenArray)	10–50 000 копий/ мкл	4lg	NA
Образцов на 1 запуск прибора	От 12 до 48	24	48 образцов на плашку, до 3 плашек за один запуск	96 или 24 на плашку, до 8 плашек за один запуск	32	NA
Время работы прибора	Около 4 ч	Около 3 ч	Около 4 ч	Около 2 ч	Около 3 ч	Около 1 ч
Возможность ПЦР в реальном времени	Да (для HD), нет (для EP1)	Нет	Да	Нет	Нет	Да
Возможность восстановления образцов	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Да
Количество каналов детекции	3 цвета	2 цвета	2 цвета	5 цвета	4–6 цветов	2 цвета
Используемые красители	FAM/EvaGreen, HEX/VIC, ROX	FAM/SYBR, VIC, ROX	FAM/SYBR, VIC/JOE/ТЕТ/HEX, NED/TAMRA, ROX, LIZ	FAM/EvaGreen, VIC, ROX, NED, Cy5	FAM/SYBR/EvaGreen, VIC/HEX	FAM и FRET FAM/Cy5
ПЦР смесь	Открытая	От производителя	От производителя	Открытая	Открытая	От производителя

Таблица 1. Окончание

цПЦР капельного типа			
цПЦР платформа	QX200/ QX ONE	RainDrop	Naiica
Количество разделений на образец	20 000	$5 \times 10^6 - 10 \times 10^6$	25 000–30 000
Объем микрореактора	0.85 нл	5 пл	0.43 нл
Общий объем реакционной смеси, мкл	20	25–50	20
Динамический диапазон	1–120 000 копий/ мкл	6lg	0.2–20 000 копий/ мкл
Образцов на 1 запуск прибора	8 или 96 и 480 образцов на запуск QX ONE	8	12
Время работы прибора	Около 5.5 ч	7–8 ч	Около 2.5 ч
Возможность ПЦР в реальном времени	Нет	Нет	Нет
Возможность восстановления образцов	Да, если не прошел цикл считывания флуоресценции	Да	Да
Количество каналов детекции	2 цвета или 4 цвета для QX ONE, т.е. до 10 анализируемых мишеней с помощью амплитудного метода	2 цвета или до 10 анализируемых мишеней с помощью амплитудного метода	3 цвета
Используемые красители	FAM/EvaGreen, VIC/HEX и FAM, HEX/(VIC), Cy5, Cy5.5 для QX ONE	FAM, VIC	FAM, Cy3/VIC/HEX, Cy5
ПЦР смесь	От производителя	Открыта	От производителя

более высокую концентрацию молекул-мишеней без необходимости разбавления или меньшую концентрацию без концентрирования. Все устройства цифровой ПЦР демонстрируют динамический диапазон в районе четырех порядков или выше, а RainDrop может выполнять точную количественную оценку в интервале более шести порядков, приближаясь к достижимому как у количественной ПЦР. Дополнительные возможности количественной ПЦР обеспечивают более широкий динамический диапазон до семи порядков и доступны на платформах BioMark HD и QuantStudio 12 K Flex. Однако следует отметить, что точность количественной ПЦР зависит от калибровки в нужных областях.

Удобство использования и пропускная способность

Простота и удобство выполнения рабочего процесса систем цифровой ПЦР решающим образом влияют на развитие и распространение данной технологии. Удобство использования демонстрируется во всех рекламных роликах каждой системы цифрового ПЦР. Приборы цифровой ПЦР оцениваются на основе их пропускной способности, количества анализируемых образцов за один цикл работы и необходимости ручного переноса реагентов. Время пропускной способности определяется как время от разделения реакционной смеси и приготовления выборки до термоциклирования, и окончательного измерения флуоресценции и получения данных обработки. Разница во времени может возникнуть из-за различных методов разделения выборки и/или считывания флуоресценции. Например, QX200 принимает последовательную конфигурацию считывания, которая ограничивает общую пропускную способность. Добавление большего количества считывателей капель в параллель может увеличить пропускную способность, однако, это существенно увеличит стоимость реакции.

Продолжительность термоциклирования также может немного различаться для разных устройств цифровой ПЦР. Например, в процессе пробоподготовки для приборов на основе эмульсионных капель есть этап термической стабилизации эмульсии, который занимает дополнительное время. Из всех устройств, Constellation/QIAcuity обеспечивает самую высокую пропускную способность до 768 образцов за 2 ч. Хотя техническое описание Optolane рекламирует самую высокую производительность (1 ч) среди всех устройств. Однако, мы не можем дать точную оценку из-за отсутствия важной информации (такой как количество образцов за прогон, динамический диапазон). Все обсуждаемые инструменты имеют высоко автоматизированные процессы разбиения образцов и считывания, но все равно требуют наличие экспериментатора и необходимость ручную гото-

вить реагенты и образцы, что также может увеличить время и потребовать дополнительного предварительного разбавления для устройств цифровой ПЦР с более низким динамическим диапазоном. Также, чипы/капли, возможно, придется переносить вручную между устройствами. В этом аспекте устройства Constellation/QIAcuity и Optolane выделяются, так как образцы автоматически секционированы, запечатываются, термоциклируются, и анализируются на одной машине без ручного вмешательства на любом этапе работы.

Каналы обнаружения и возможность мультиплексирования

Идентификация/количественное определение двух или более мишеней одновременно возможно при мультиплексировании. По сравнению с параллельным моноплексным анализом, оно уменьшает технические ошибки, такие как накопленная неточность пипетирования, а также снижает потребность в реагентах и времени. Мультиплексирование на основе флуоресценции позволяет различать мишени с помощью зондов с различными конъюгированными флуоресцирующими красителями. Constellation/QIAcuity и Clarity имеют возможность мультиплексирования в четыре и более оптических каналах, BioMark и Naica по трем каналам, а остальные системы только в двух. Однако доступно мультиплексирование и более высокого порядка, которое может быть достигнуто путем анализа отношения детекции конечной флуоресценции или амплитуды разных концентраций одного красителя. Все устройства совместимы с использованием красителей FAM и VIC, в то время как ROX, NED и Cy5 используются только на некоторых из них.

Риски контаминации

Чаще всего риски контаминации возникают при частом переносе реагентов в процессе работы. Большинство современных платформ цифровой ПЦР приняли меры предосторожности, позволяющие минимизировать подобные риски. Например, использование одноразовых микрофлюидных планшетов или покрытие образца перегородкой крышкой. Однако система QX200 предполагает шаг ручного пипетирования, когда капли эмульсии разных образцов переносят на 96-луночный планшет для дальнейшего термоциклирования. После амплификации плашка с эмульсией помещается в флуоресцентный ридер, где капли всасываются через одно сопло шприца и последовательно анализируются. Ляо и соавт. [87] указали на недостатки этой методики в контексте клинических испытаний. Ручное пипетирование также может привести к механическому нарушению целостности капель. Однако использование

QX200 с AutoDG устраняет необходимость ручного переноса.

ВЫВОДЫ

Применение метода ПЦР стало одним из наиболее ценных инструментов, используемых в настоящее время в биологии, диагностике инфекционных заболеваний, а также, в судебной медицине. На данный момент в приоритете развития два основных направления использования цПЦР в области биологических наук: высокопроизводительные системы ПЦР и устройства ПЦР на основе микрофлюидики для применения в местах оказания медицинской помощи (РОС). Глобальная вспышка COVID-19 привела к росту спроса на такие точные, надежные и быстрые диагностические инструменты. ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени сейчас является золотым стандартом диагностики SARS-CoV-2. Пандемия COVID ускорила это развитие, вызвав бум систем РОС за счет преобразования существующих устройств, таких как ID NOW на основе LAMP, первоначально разработанных для гриппа, в SARS-CoV-2. Вероятно, для SARS-CoV-2 будет разработано больше РОС-устройств, которые позже будут преобразованы для диагностики других РНК-вирусов. Также можно ожидать дальнейшего развития методов на основе CRISPR. Системы диагностики в конечном итоге могут быть связаны вместе, образуя “Интернет вещей”, как было продемонстрировано ранее в ПЦР

Однако, несмотря на серьезное технологическое развитие методов цифровой ПЦР, процесс клинической валидации этой технологии все еще не завершен. Коммерческие компании при поддержке ученых пытаются устранить эти трудности. Именно поэтому, методика как таковая не нашла широкого применения по сравнению с проверенными методами количественной ПЦР и на данный момент используется лишь в качестве вспомогательного инструмента для узкоспецифических исследований. Как ожидается с ростом распространенности инфекционных, хронических и генетических заболеваний (таких как рак, гепатит В, ВИЧ и так далее) и снижением цены одного ПЦР, мы ожидаем огромный интерес к данному методу и значительному росту рынка цПЦР. К сожалению, развитие методов и технологий требуют также эволюции способов регистрации данных изобретений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Noji H., Minagawa Y., Ueno H.* Enzyme-based digital bioassay technology – key strategies and future perspectives. *Lab. Chip.*, 2022, 22(17), 3092–3109. <https://doi.org/10.1039/d2lc00223j>
2. *Tadmor A.D., Ottesen E.A., Leadbetter J.R., Phillips R.* Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR. *Science*, 2011, 333(6038), 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.1200758>
3. *Wang J., Ramakrishnan R., Tang Z., Fan W., Kluge A., Dowlati A., Jones R.C., Ma P.C.* Quantifying EGFR alterations in the lung cancer genome with nanofluidic digital PCR arrays. *Clin. Chem.*, 2010, 56(4), 623–632. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.134973>
4. *Denis J.A., Patroni A., Guillerme E., Pepin D., Benali-Furet N., Wechsler J., Manceau G., Bernard M., Coulet F., Larsen A.K., Karoui M., Lacorte J.-M.* Droplet digital PCR of circulating tumor cells from colorectal cancer patients can predict KRAS mutations before surgery. *Mol. Oncol.*, 2016, 10(8), 1221–1231. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.05.009>
5. *Whale A.S., Bushell C.A., Grant P.R., Cowen S., Gutierrez-Aguirre I., O’Sullivan D.M., Žel J., Milavec M., Foy C.A., Nastouli E., Garson J.A., Huggett J.F.* Detection of rare drug resistance mutations by digital PCR in a human influenza A virus model system and clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 2016, 54(2), 392–400. <https://doi.org/10.1128/JCM.02611-15>
6. *Lo Y.M.D., Lun F.M.F., Chan K.C.A., Tsui N.B.Y., Chong K.C., Lau T.K., Leung T.Y., Zee B.C.Y., Cantor C.R., Chiu R.W.K.* Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(32), 13116–13121. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705765104>
7. *Takai E., Totoki Y., Nakamura H., Kato M., Shibata T., Yachida S.* Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment and precision medicine in pancreatic cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016, 924, 13–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42044-8_3
8. *Gorges T.M., Penkalla N., Schalk T., Joosse S.A., Riethdorf S., Tucholski J., Lücke K., Wikman H., Jackson S., Brychta N., Von Ahsen O., Schumann C., Krahn T., Pantel K.* Enumeration and molecular characterization of tumor cells in lung cancer patients using a novel in vivo device for capturing circulating tumor cells. *Clin. Cancer Res.*, 2016, 22(9), 2197–2206. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1416>
9. *Hall Sedlak R., Keith R Jerome K.R.* The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2014, 14(4), 501–507. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.910456>
10. *R. Luthra, R. Singh, K.P. Patel.* Clinical Applications of PCR (Methods in Molecular Biology, 1392), 3rd ed., Humana Press, New York, USA.
11. *Pohl G., Shih I.-M.* Principle and applications of digital PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2004, 4(1), 41–47. <https://doi.org/10.1586/14737159.4.1.41>
12. *Wong Y.K., Tsang H.F., Xue V.W., Chan C.M., Au T.C., Cho W.C., Chan L.W., Wong S.C.* Applications of digital PCR in precision medicine. *Expert Rev. Precis. Med. Drug Dev.*, 2017, 2(3), 177–186. <https://doi.org/10.1080/23808993.2017.1347482>

13. *Kuypers J., Jerome K.R.* Applications of digital PCR for clinical microbiology. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, 55(6), 1621–1628.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17>
14. *Quan P.L., Sauzade M., Brouzes E.* dPCR: A Technology Review. *Sensor.*, 2018, 18(4), 1271.
<https://doi.org/10.3390/s18041271>
15. *Fajardo V., González I., Rojas M., García T., Martín R.* A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, 21(8), 408–421.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.06.002>
16. *Pomari E., Piubelli C., Perandin F., Bisoffi Z.* Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2019, 25(12), 1510–1516.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.06.009>
17. *Salipante S.J., Jerome K.R.* Digital PCR – an emerging technology with broad applications in microbiology. *Clin. Chem.*, 2020, 66(1), 117–123.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2019.304048>
18. *Saiki R., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239, 487–491.
<https://doi.org/10.1126/science.2448875>
19. *Simmonds P., Balfe P., Peutherer J.F., Ludlam C.A., Bishop J.O., Brown A.J.* Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J. Virol.*, 1990, 64, 864–872.
<https://doi.org/10.1128/JVI.64.2.864-872.1990>
20. *Sykes P.J., Neoh S.H., Brisco M.J., Hughes E., Condon J., Morley A.A.* Quantitation of targets for the polymerase chain reaction by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 1992, 13, 444–449.
21. *Vogelstein B., Kinzler K.W.* Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96(16), 9236–9241.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236>
22. *Dressman D., Yan H., Traverso G., Kinzler K.W., Vogelstein B.* Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100(15), 8817–8822.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1133470100>
23. *Cao L., Cui X., Hu J., Li Z., Choi J.R., Yang Q., Lin M., Hui L.Y., Xu F.* Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosens. Bioelectron.*, 2017, 90, 459–474.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.082>
24. *C. Ruffert.* Magnetic bead—magic bullet. *Micromachines*, 2016, 7(2), 21.
25. *Kothari A., Morgan M., Haake D.A.* Emerging technologies for rapid identification of bloodstream pathogens. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, 59(2), 272–278.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciu292>
26. *Gosiewski T., Szala L., Pietrzyk A., Brzywczy-Włoch M., Heczko P.B., Bulanda M.* Comparison of methods for isolation of bacterial and fungal DNA from human blood. *Curr. Microbiol.*, 2014, 68(2), 149–155.
<https://doi.org/10.1007/s00284-013-0451-1>
27. *Basu A.S.* Digital assays part I: partitioning statistics and digital PCR. *SLAS Technol.*, 2017, 22(4), 369–386.
<https://doi.org/10.1177/2472630317705680>
28. *Ramakrishnan R., Qin J., Jones R.C., Weaver S.L.* Integrated fluidic circuits (IFCs) for digital PCR. *Methods Mol. Biol.*, 2013, 949, 423–431.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-134-9_27
29. *Blow N.* Microfluidics: the great divide. *Nat. Methods*, 2009, 6(9), 683–686.
<https://doi.org/10.1038/nmeth0909-683>
30. *M. Schena.* DNA Microarrays: A Practical Approach. Oxford University Press, 1999, 209 pp.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/48.1.211>
31. *Kim H., Vishniakou S., Faris G.W.* Petri dish PCR: laserheated reactions in nanoliter droplet arrays. *Lab. Chip.*, 2009, 9(9), 1230–1235.
<https://doi.org/10.1039/B817288A>
32. *Baker M.* Digital PCR hits its stride. *Nat. Methods*, 2012, 9(6), 541–544.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2027>
33. *Day E., Dear P.H., McCaughan F.* Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods*, 2013, 59(1), 101–107.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.08.001>
34. *Marx V.* PCR: paths to sensitivity. *Nat. Methods*, 2014, 11(3), 241–245.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2849>
35. *Qin D., Xia Y., Whitesides G.M.* Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nat. Protoc.*, 2010, 5(3), 491–502.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.234>
36. *Qi Z., Ma Y., Deng L., Wu H., Zhou G., Kajiyama T., Kambara H.* Digital analysis of the expression levels of multiple colorectal cancer-related genes by multiplexed digital-PCR coupled with hydrogel bead-array. *Analyt.*, 2011, 136(11), 2252–2259.
<https://doi.org/10.1039/C0AN00976H>
37. *Williams R., Peisajovich S.G., Miller O.J., Magdassi S., Tawfik D.S., Griffiths A.D.* Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nat. Methods*, 2006, 3(7), 545–550.
<https://doi.org/10.1038/nmeth896>
38. *Hudecova I.* Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin. Biochem.*, 2015, 48(15), 948–956.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.03.015>
39. *White R.A., Quake S.R., Curr K.* Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus. *J. Virol. Methods*, 2012, 179(1), 45–50.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.017>
40. *Huggett J.F., Cowen S., Foy C.A.* Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin. Chem.*, 2015, 61(1), 79–88.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221366>

41. Liao P., Huang Y. Digital PCR: endless frontier of divide and conquer. *Micromachines*, 2017, 8(8), 231–237. <https://doi.org/10.3390/mi8080231>
42. Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 1997, 22(1), 130–138. <https://doi.org/10.2144/97221bi01>
43. Dong L., Meng Y., Sui Z., Wang J., Wu L., Fu B. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 13174. <https://doi.org/10.1038/srep13174>
44. Conte D., Verri C., Borzi C., Suatoni P., Pastorino U., Sozzi G., Fortunato O. Novel method to detect microRNAs using chip-based QuantStudio 3D digital PCR. *BMC Genomics*, 2015, 16(1), 849–849. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2097-9>
45. Feng Q., Gai F., Sang Y., Zhang J., Wang P., Wang Y., Liu B., Lin D., Yu Y., Fang J. A comparison of QuantStudio™ 3D digital PCR and ARMS-PCR for measuring plasma EGFR T790M mutations of NSCLC patients. *CMAR*, 2018, 10, 115–121. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S148134>
46. Jiang L., Lin R., Gallagher S., Zayac A., Butchbach M.E.R., Hung P. Development and validation of a 4-color multiplexing spinal muscular atrophy (SMA) genotyping assay on a novel integrated digital PCR instrument. *Sci. Rep.*, 2020, 10(1), 19892. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55872-7>
47. Dueck M.E., Lin R., Zayac A., Gallagher S., Chao A.K., Jiang L., Datwani S.S., Hung P., Stieglitz E. Precision cancer monitoring using a novel, fully integrated, microfluidic array partitioning digital PCR platform. *Sci. Rep.*, 2019, 9(1), 19606. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55872-7>
48. Dhillon H.S., Johnson G., Shannon M., Greenwood C., Roberts D., Bustin S. Homogeneous and digital proximity ligation assays for the detection of *Clostridium difficile* toxins a and B. *Biomol. Detect. Quantif.*, 2016, 10, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.06.003>
49. Ley B., Newton C.A., Arnould I., Elicker B.M., Henry T.S., Vittinghoff E., Golden J.A., Jones K.D., Batra K., Torrealba J., Garcia C.K., Wolters P.J. The MUC5B promoter polymorphism and telomere length in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis: an observational cohort-control study. *Lancet Respir. Med.*, 2017, 5(8), 639–647. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30216-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30216-3)
50. Low H., Chan S.-J., Soo G.-H., Ling B., Tan E.-L. Clarity™ digital PCR system: a novel platform for absolute quantification of nucleic acids. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, 409(7), 1869–1875. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0131-7>
51. Wu X., Tay J.K., Goh C.K., Chan C., Lee Y.H., Springs S.L., Wang D.Y., Loh K.S., Lu T.K., Yu H. Digital CRISPR-based method for the rapid detection and absolute quantification of nucleic acids. *Biomaterials*, 2021, 274, 120876. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120876>
52. Yarimizu K., Sildever S., Hamamoto Y., Tazawa S., Oikawa H., Yamaguchi H., Basti L., Mardones J.I., Paredes-Mella J., Nagai S. Development of an absolute quantification method for ribosomal RNA gene copy numbers per eukaryotic single cell by digital PCR. *Harmful Algae*, 2021, 103, 102008. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102008>
53. Tan S.Y.H., Kwek S.Y.M., Low H., Pang Y.L.J. Clarity Plus™ digital PCR: A novel platform for absolute quantification of SARS-CoV-2. medRxiv, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.05.30.21256718>
54. Lee S.-S., Park J.-H., Bae Y.-K. Comparison of two digital PCR methods for EGFR DNA and SARS-CoV-2 RNA quantification. *Clin. Chim. Acta*, 2021, 521, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.06.016>
55. Baret J.-C. Surfactants in droplet-based microfluidics. *Lab. Chip.*, 2012, 12(3), 422–433.
56. Holtze C., Rowat A.C., Agresti J.J., Hutchison J.B., Angilè F.E., Schmitz C.H.J., Köster S., Duan H., Humphry K.J., Scanga R.A., Johnson J.S., Pisignano D., Weitz D.A. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab. Chip.*, 2008, 8(10), 1632–1632.
57. Thorsen T., Roberts R.W., Arnold F.H., Quake S.R. Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Phys. Rev. Lett.*, 2001, 86(18), 4163–4166.
58. Anna S.L., Bontoux N., Stone H.A. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Appl. Phys. Lett.*, 2003, 82(3), 364–366. <https://doi.org/10.1063/1.1537519>
59. Sugiura S., Nakajima M., Iwamoto S., Seki M. Interfacial tension driven monodispersed droplet formation from microfabricated channel array. *Langmuir*, 2001, 17(18), 5562–5566. <https://doi.org/10.1021/la010342y>
60. Joensson H.N., Svahn H.A. Droplet microfluidics—a tool for single-cell analysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51 (49), 12176–12192. <https://doi.org/10.1002/anie.201200460>
61. Baret J.-C., Surfactants in Droplet-Based Microfluidics. *Lab. Chip.*, 2012, 12 (3), 422.
62. Holt D.J., Payne R.J., Chow W.Y., Abell C. Fluorosurfactants for microdroplets: interfacial tension analysis. *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, 1, 350(1), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.06.036>
63. Holtze C., Rowat A.C., Agresti J.J., Hutchison J.B., Angilè F.E., Schmitz C.H.J., Köster S., Duan H., Humphry K.J., Scanga R.A., Johnson J.S., Pisignano D., Weitz D.A. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab. Chip.*, 2008, 8 (10), 1632–1639. <https://doi.org/10.1039/B806706F>
64. Guo M.T., Rotem A., Heymanab J.A., Weitz D.A. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab. Chip.*, 2012, 12 (12), 2146. <https://doi.org/10.1039/C2LC21147E>
65. Theberge A.B., Courtois F., Schaerli Y., Fischlechner M., Abell C., Hollfelder F., Huck W.T.S. Microdroplets in Microfluidics: An Evolving Platform for Discoveries in Chemistry and Biology. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010,

- 5846–5868.
<https://doi.org/10.1002/anie.200906653>
66. Dangla R., Kayi S.C., Baroud C.N. Droplet microfluidics driven by gradients of confinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(3), 853–858.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1209186110>
67. Dutra L., Franz O., Puupponen V.-M., Tirola M. DNA recovery from Droplet Digital™ PCR emulsions using liquid nitrogen. *BioTechniques*, 2020, 69(6), 450–454.
<https://doi.org/10.2144/btn-2020-0076>
68. Hatch A.C., Fisher J.S., Tovar A.R., Hsieh A.T., Lin R., Pentoney S.L., Yang D.L., Lee A.P. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. *Lab. Chip.*, 2011, 11(22), 3838–3838.
<https://doi.org/10.1039/C1LC20561G>
69. Demeke T., Holigroski M., Eng M., Xing J. Absolute quantification of genetically engineered traits with droplet digital PCR: Effect of DNA treatments and spiking with non-target DNA. *Food Control*, 2016, 68, 105–111.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.007>
70. Chang M.Y., Ahn S., Kim M.Y., Han J.H., Park H.-R., Seo H.K., Yoon J., Lee S., Oh D.-Y., Kang C., Choi B.Y. One-step noninvasive prenatal testing (NIPT) for autosomal recessive homozygous point mutations using digital PCR. *Sci. Rep.*, 2018, 8(1), 2877.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21236-w>
71. Madic J., Zocovic A., Senlis V., Fradet E., Andre B., Muller S., Dangla R., Droniou M.E. Three-color crystal digital PCR. *Biomol. Detect. Quantif.*, 2016, 10, 34–46.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.10.002>
72. Borsu L., Intrieri J., Thampi L., Yu H., Riely G., Nafa K., Chandramohan R., Ladanyi M., Arcila M.E. Clinical Application of Picodroplet Digital PCR Technology for Rapid Detection of EGFR T790M in Next-Generation Sequencing Libraries and DNA from Limited Tumor Samples. *J. Mol. Diagn.*, 2016, 18(6), 903–911.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.07.004>
73. Powell E.A., Babady N.E. Digital PCR in the clinical microbiology laboratory: another tool on the molecular horizon. *Clin. Microbiol. Newsl.*, 2018, 40(4), 27–32.
<https://doi.org/10.1016/J.CLINMIC-NEWS.2018.01.005>
74. Rutsaert S., Bosman K., Trypsteen W., Nijhuis M., Vandekerckhove L. Digital PCR as a tool to measure HIV persistence. *Retrovirology*, 2018, 15(1), 16–16.
75. Jones G.M., Busby E., Garson J.A., Grant P.R., Nastouli E., Devonshire A.S., Whale A.S. Digital PCR dynamic range is approaching that of real-time quantitative PCR. *Biomol. Detect. Quantif.*, 2016, 10, 31–33.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.10.001>
76. Košir A.B., Divieto C., Pavšič J., Pavarelli S., Dobnik D., Dreo T., Bellotti R., Sassi M.P., Žel J. Droplet volume variability as a critical factor for accuracy of absolute quantification using droplet digital PCR. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, 409(28), 6689–6697.
<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0625-y>
77. Sanders R., Mason D.J., Foy C.A., Huggett J.F. Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification. *PLoS One*, 2013, 8(9), e75296.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075296>
78. Sanders R., Huggett J.F., Bushell C.A., Cowen S., Scott D.J., Foy C.A. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal. Chem.*, 2011, 83(17), 6474–6484.
<https://doi.org/10.1021/ac103230c>
79. Devonshire A.S., Honeyborne I., Gutteridge A., Whale A.S., Nixon G., Wilson P., Jones G., McHugh T.D., Foy C.A., Huggett J.F. Highly reproducible absolute quantification of Mycobacterium tuberculosis complex by digital PCR. *Anal. Chem.*, 2015, 87(7), 3706–3713.
<https://doi.org/10.1021/ac5041617>
80. Bhat S., Curach N., Mostyn T., Bains G.S., Griffiths K.R., Emslie K.R. Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Anal. Chem.*, 2010, 82(17), 7185–7192.
<https://doi.org/10.1021/ac100845m>
81. Corbisier P., Pinheiro L., Mazoua S., Kortekaas A.-M., Chung P.Y.J., Gerganova T., Roebben G., Emons H., Emslie K. DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, 407(7), 1831–1840.
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8458-z>
82. Dreo T., Pirc M., Ramšak Ž., Pavšič J., Milavec M., Zel J., Gruden K. Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, 406(26), 6513–6528.
<https://doi.org/10.1007/s00216-014-8084-1>
83. Jones M., Williams J., Gärtner K., Phillips R., Hurst J., Frater J. Low copy target detection by droplet digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, “definetherain”. *J. Virol. Methods*, 2014, 202(100), 46–53.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.020>
84. Strain M.C., Lada S.M., Luong T., Rought S.E., Gianella S., Terry V.H., Spina C.A., Woelk C.H., Richman D.D. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS One*, 2013, 8(4), e55943.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055943>
85. Sedlak R.H., Cook L., Cheng A., Magaret A., Jerome K.R. Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, 52(8), 2844–2848.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00803-14>
86. Majumdar N., Wessel T., Marks J. Digital PCR modeling for maximal sensitivity, dynamic range and measurement precision. *PLoS One*, 2015, 10(3), e0118833.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118833>
87. Liao P., Huang Y. Digital PCR: Endless Frontier of ‘Divide and Conquer’. *Micromachines (Basel)*, 2017, 8(8), 231.
<https://doi.org/10.3390/mi8080231>

State-of-the-Art Digital PCR Platform

Yu. L. Lebedeva^{a, #}, E. A. Cherkashin^a, and V. G. Akimkin^a

^a*Federal Budget Institution of Science “Central Research Institute for Epidemiology” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Russian Federation, Moscow, 111123 Russia*

[#]*e-mail: j_kuzmina@pcr.ms*

Abstract—The traditional quantitative real time polymerase chain reaction is the gold standard among molecular diagnostic methods and is used both for the identification of pathogens of various diseases, and for genotyping and standartization of the NGS library. The digital polymerase chain reaction technology is an upgraded version of the polymerase chain reaction, and over the past 5 years has proven to be more sensitive, specific and accurate. This article provides an overview of the modern digital polymerase chain reaction platform and their comparative analysis. Special features, uses and possible applications are selected.

Keywords: quantitative real-time polymerase chain reaction, molecular diagnostics, digital polymerase chain reaction