

## Streszczenie

Oznaczenia ilościowe są ważnym narzędziem diagnostyki molekularnej, znajdującymi szerokie zastosowanie w badaniach naukowych i diagnostyce. Zapotrzebowanie na nowe testy do diagnostyki opartej na RNA, DNA i immunodiagnostyki stale wzrasta. Takie testy są powszechnie używane do diagnostyki chorób genetycznych i zakaźnych, wykrywania patogenów, detekcji i monitorowania nowotworów, oraz badania pokrewieństwa. Takie zadania wymagają technik zapewniających precyzyjne i specyficzne ilościowe oznaczenie analitu w szerokim zakresie stężeń.

Ilościowa Łańcuchowa Reakcja Polimerazy (qPCR) jest podstawową metodą biologii molekularnej i znajduje powszechne zastosowanie w diagnostyce medycznej. Została opisana w formie PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) w 1991 roku przez Pamelę Holland i jej współpracowników z firmy Cetus [1]. Wykorzystuje ona stałe monitorowanie natężenia fizycznego sygnału (poziomu fluorescencji, zmiany mętności, i innych) związanego z narastaniem produktu (łańcuchów DNA) reakcji PCR. Ilość produktu (stężenie produktu  $C_p$ ) wzrasta geometrycznie wraz z numerem  $n$  cyklu PCR:  $C_p \propto q^n$ . Wyznaczenie początkowego stężenia analitu jest możliwe dzięki określeniu numeru cyklu, po którym sygnał osiągnął określony poziom, a następnie porównanie go z wynikami dla wystandaryzowanych próbek. Chociaż qPCR pozwala na określenie początkowego stężenia analitu w szerokim zakresie stężeń, precyzja i dokładność pomiaru mogą być zaburzone przez wiele czynników: jakość próbki i substratów reakcji, obecność inhibitorów reakcji, jakość obróbki termicznej i niezawodność systemów detekcji sygnału w urządzeniach do analiz qPCR.

Pomimo powyższych problemów, dzięki uproszczonej obróbce próbki (próbka nie musi być dzielona na kompartmenty), oraz powszechnie znanym metodom matematycznym pozwalającym na wyznaczenie początkowego stężenia analitu (porównanie do krzywej kalibracyjnej), PCR w czasie rzeczywistym jest uznawany za wzorcowy przykład ilościowej reakcji PCR.

Istnieje alternatywna forma ilościowej reakcji PCR, zwana również cyfrową reakcją PCR (dPCR). Protokół cyfrowy w oznaczeniach ilościowych został po raz pierwszy opisany w 1995 roku przez

M.H. McCrady'ego [2]. Opisał on rozcieńczeniowe oznaczenie ilościowe służące do określania liczby bakterii. Następnie, w 1992 roku, protokoły cyfrowe zostały zastosowane przez Pamelę Sykes i jej współpracowników w ilościowej reakcji PCR [3]. Pomysł ten został rozwinięty w 1999 roku przez Berta Vogelsteina i Kennetha Kinzlera [4], którzy zaproponowali podział próbki na identyczne kompartmenty, które dawały pozytywny ( $s = 1$ ) lub negatywny ( $s = 0$ ) sygnał w zależności od tego, czy w danym kompartmentcie znajdowała się przynajmniej jedna cząsteczka analitu. Oznaczenia cyfrowe zapewniają absolutne i niezawodne wyznaczenie początkowego stężenia [5, 6, 7], nie potrzebując przy tym kalibracji układu doświadczalnego. Oznaczenia te są zwykle precyzyjne i czułe.

Mimo tych zalet, oznaczenia cyfrowe wciąż nie są powszechnie stosowane, głównie ze względu na konieczność stosowania nowych urządzeń pozwalających na podział próbki na ogromną liczbę kompartmentów (tysiące lub miliony), a następnie poddanie ich obróbce cieplnej i odczytanie sygnałów. Te wymagania wymagają bardzo skomplikowanych, a przez to również kosztownych urządzeń.

W tej pracy zostaną zaprezentowane metody optymalizacji oznaczeń diagnostycznych wraz z ich opisem matematycznym. Algorytmy podziału próbki pozwalają na zmniejszenie wymagań oznaczeń cyfrowych dzięki ograniczeniu liczby kompartmentów, na które musi być podzielona próbka.

Ponadto zostaną zaprezentowane metody cyfrowo-analogowe, które w synergiczny sposób łączą zalety qPCR i dPCR i mogą być przeprowadzone z użyciem standardowych urządzeń do qPCR. Wszystkie protokoły opisane w tej pracy pozwalają na ograniczenie liczby kompartmentów, jednocześnie zapewniając absolutny pomiar. Co więcej, opisane oznaczenia diagnostyczne mogą być dostosowane do konkretnych wymagań dotyczących precyzji pomiaru i zakresu badanych stężeń.

W pierwszym rozdziale zawarty został opis projektu dotyczącego optymalizacji oznaczeń diagnostycznych. Rozdział drugi zawiera krótki wstęp do diagnostyki molekularnej, wraz z opisem reakcji PCR. W rozdziale trzecim zostały określone cele pracy, natomiast w rozdziale czwartym przedstawiono metody matematyczne, numeryczne i eksperymentalne, które pozwoliły na znalezienie równań analitycznych pozwalających określić optymalny podział próbki, oraz przetestowanie działania tak zaprojektowanych oznaczeń. Rozdziały piąty, szósty, siódmy i ósmy opisują wyniki analizy oznaczeń cyfrowych o identycznych i różnych kompartmentach, optymal-

nie zaprojektowane oznaczenia cyfrowe i analogowo-cyfrowe. Podsumowanie wyników i dyskusja są zawarte w rozdziale dziewiątym. Ponadto praca zawiera suplement podzielony na trzy części: A, B i C, które zawierają instrukcje pozwalające na zaprojektowanie własnego oznaczenia, oraz analizę jego działania.

Wyniki opisane w tej pracy zostały opisane w poniższej serii publikacji naukowych:

1. Debski, P.R., Gewartowski, K., Bajer, S., and Garstecki, P., *Calibration-free assays on standard real-time PCR devices.*, zgłoszone do publikacji
2. Debski, P.R., and Garstecki, P., *Designing and interpretation of digital assays: concentration of target in the sample and in the source of sample*, Biomolecular Detection and Quantification, dostępne online od 17 maja 2016
3. Debski, P.R., Gewartowski, K., Sulima, M., Kaminski, T.S., and Garstecki, P., *Rational design of Digital assays*, Analytical Chemistry, 2015, 87 (16), 8203-8209

oraz poniższych patentach i zgłoszeniach patentowych:

1. *Method for performing quantitation assays*, PCT/EP2013/000805 (patent przyznany w 2016; data zgłoszenia: 15 marca 2013)
2. *Method for performing quantitation assays*, PCT/EP2012/004792 (patent przyznany w 2016; data zgłoszenia: 19 listopada 2012)
3. *Sposób przeprowadzania cyfrowych oznaczeń analitycznych i diagnostycznych*, Polskie zgłoszenie patentowe P-399908 (data zgłoszenia: 11 lipca 2012)
4. *Sposób przeprowadzania cyfrowych oznaczeń analitycznych i diagnostycznych*, Polskie zgłoszenie patentowe P-399673 (data zgłoszenia: 26 czerwca 2012)
5. *Sposób przeprowadzania cyfrowych oznaczeń analitycznych i diagnostycznych*, Polskie zgłoszenie patentowe P-397026 (data zgłoszenia: 17 listopada 2011)
6. *Sposób przeprowadzania cyfrowych oznaczeń analitycznych i diagnostycznych*, Polskie zgłoszenie patentowe P-397027 (data zgłoszenia: 17 listopada 2011)
7. *Sposób przeprowadzania cyfrowych oznaczeń analitycznych i diagnostycznych*, Polskie zgło-

szenie patentowe P-397028 (data zgłoszenia: 17 listopada 2011).

## Literatura

- [1] Holland, P. M. and Abramson, R. D. and Watson, R., and Gelfand, D. H. *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88, 16, 7276–7280 (1991)
- [2] McCrady, M. H. *The Numerical Interpretation of Fermentation-Tube Results*. Journal of Infectious Diseases, 17, 1, 183–212 (1915)
- [3] Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J., and Morley, A. A. *Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution*. BioTechniques, 13, 3, 444–449 (1992)
- [4] Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. *Digital PCR*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 16, 9236–9241 (1999)
- [5] Kreutz, J. E., Munson, T., Huynh, T., Shen, F., Du, W., and Ismagilov, R. F. *Theoretical design and analysis of multivolume digital assays with wide dynamic range validated experimentally with microfluidic digital PCR*. Analytical chemistry, 83, 21, 8158–8168 (2011)
- [6] Shen, F., Du, W., Kreutz, J. E., Fok, A., and Ismagilov, R. F. *Digital PCR on a SlipChip*. Lab on a Chip, 10, 20, 2666–2672 (2010)
- [7] Shen, F., Sun, B., Kreutz, J. E., Davydov, E. K., Du, W., and Ismagilov, R. F. *Quantification of HIV and HCV viral load with large dynamic range using multivolume digital reverse transcription PCR on a rotational SlipChip*. Available online: [http://www.rsc.org/images/LOC/2011/PDFs/Papers/098\\_1151.pdf](http://www.rsc.org/images/LOC/2011/PDFs/Papers/098_1151.pdf)