

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

Detekce bakteriálních mikroorganismů  
metodou kvantitativní real-time PCR

Detection of bacterial microorganisms by  
quantitative real-time PCR

Lenka Hubálková

V Praze 2006

vedoucí práce  
RNDr. Michal Kroča, Ph.D.

## Abstrakt

Technologie real-time PCR se pro svou schopnost spolehlivě detekovat a kvantifikovat specifický úsek nukleové kyseliny stala neocenitelným nástrojem mikrobiální diagnostiky. Metoda je zdokonalením známé polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje mnohonásobnou amplifikaci jakékoliv známé nukleotidové sekvence DNA v komplexním vzorku nukleových kyselin. Real-time PCR navíc používá fluorescenčních barviv či sond specifických pro amplifikovaný produkt k monitorování průběhu amplifikace přímo během reakce (tzv. „v reálném čase“). Matematickou analýzou získaných amplifikačních křivek lze poměrně přesně vypočítat počet startovních kopií cílové sekvence DNA.

Oproti klasickým kultivačním metodám používaným k detekci bakteriálních mikroorganismů skýtá real-time PCR mnoho výhod. Za prvé je mnohem citlivější, specifičtější a rychlejší. Při pečlivé optimalizaci reakčních podmínek je schopna detekovat i jedinou cílovou molekulu nukleové kyseliny (tedy i jedinou bakteriální buňku) v komplexním vzorku DNA izolované ze zkoumaného materiálu. Detekce může být specificky zaměřena na určitý bakteriální kmen, lišící se třeba jen jedinou substituční mutací. Celý metodický proces včetně zpracování vzorků je možné uskutečnit během jedné až dvou hodin (provedení kultivačních metod oproti tomu často zabere i několik dní) a je možné jej z větší části automatizovat. Real-time PCR dále také umožňuje detekci obtížně kultivovatelných mikroorganismů, je méně náchylná na kontaminaci vzorků a dovoluje provést poměrně přesnou kvantifikaci v rozsahu až osmi řádů. Nevýhodou metody pro některé aplikace je její schopnost detekovat i neživotaschopné mikroorganismy.

Cílem mé bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o kvantitativní real-time PCR v souvislosti s aplikací této metody pro detekci bakteriálních mikroorganismů. Pro ucelenost práce dále uvádím některé dosažené výsledky své vlastní experimentální činnosti, která je zaměřena na optimalizaci real-time PCR detekční metody pro bakterii *Bacillus subtilis*. Svou práci vypracovávám v laboratořích Centra biologické ochrany AČR v Těchoníně na Orlickoústecku a je součástí projektu obranného výzkumu s názvem „Dálková detekce mikroorganismů“ financovaného Ministerstvem obrany ČR. *Bacillus subtilis* byl pro mou experimentální práci vybrán vzhledem ke své podobnosti se známým patogenem *Bacillus anthracis*, často používaným agens v bioterorismu.

## Seznam použitých zkratek

A	adenin
ABI	Applied Biosystems
AČR	Armáda České republiky“
<i>B. sub.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHQ	black hole quencher
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
C	cytosin
CFU	colony-forming unit
ČR	Česká republika
DMSO	dimethyl sulfoxide
EF Tu	elongation factor Tu
EtBr	ethidium bromid
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	double-strand deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
dUTP	deoxyuridine triphosphate
FAM	6-carboxy-fluorescein
FRET	fluorescence resonance energy transfer
G	guanin
HEX	hexachloro-6-carboxy-fluorescein
IS	insertion sequence
JOE	2,7-dimethoxy -4,5-dichloro-6-carboxy-fluorescein
LC	LightCycler
LED	light emitting diode
LNA	locked nucleic acid
NK	nukleová kyselina
O. D.	optická densita
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylenglycole

PNA	peptide nucleic acid
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RNA	ribonucleic acid
ROX	carboxy-X-rhodamine
RT-PCR	reverse transkriptase polymerase chain reaction
ssDNA	single-strand DNA
T	thymin
TAMRA	6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TET	tetrachloro-6-carboxy-fluorescein
<i>Tfl</i>	<i>Thermus flavus</i>
<i>Tma</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Tub</i>	<i>Thermus ubiquitatus</i>
T <sub>m</sub>	melting temperature
UV	ultra-violet

# Obsah

Abstrakt.....	2
Seznam použitých zkratk ..... 3	3
Obsah .....	5
1. Úvod.....	7
2. Základní principy real-time PCR.....	8
2.1. Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí.....	8
2.2. Real-time monitorování PCR.....	9
2.3. Varianty základního postupu.....	10
3. Kvantifikace pomocí real-time PCR.....	11
3.1. Absolutní kvantifikace pomocí externích standardů.....	11
3.2. Alternativní kvantifikační metody .....	14
3.3. Real-time PCR vs. konvenční PCR.....	16
3.4. Absolutní vs. relativní kvantifikace .....	16
4. Detekční systémy pro monitorování průběhu amplifikace .....	17
4.1. dsDNA specifická interkalační barviva .....	17
4.2. Sekvenčně specifické fluorescenčně značené sondy.....	18
5. Analýza křivky tání .....	22
5.1. Rozlišení specifických a nespecifických produktů PCR.....	23
5.2. Analýza křivky tání fluorescenčních sond .....	24
6. Příprava vzorků pro real-time PCR.....	24
6.1. Inhibitory polymerázové řetězové reakce .....	25
6.2. Separace bakteriálních buněk od ostatních komponent a lýza buněk .....	26

6.3. Extrakce nukleových kyselin .....	27
7. Optimalizace reakčních podmínek.....	27
7.1. Design primerů, sond a amplikonů .....	27
7.2. Složky reakční směsi.....	29
7.3. Optimalizace termocyklování .....	31
7.4. „Carry-over“ kontaminace .....	32
8. Technické vybavení pro real-time PCR.....	32
8.1. Srovnání nepoužívanějších komerčně dostupných „cyclersů“ .....	32
8.2. LightCycler systém .....	34
9. Vlastní experimentální práce .....	35
9.1. Experimentální protokol.....	36
9.2. Výsledky .....	38
10. Závěr a směřování další práce.....	40
11. Přílohy.....	41
12. Seznam použité literatury.....	43
12.1. Internetové zdroje.....	50
Poděkování.....	50

# 1. Úvod

Technologie real-time PCR umožňuje rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku nukleové kyseliny. Stala se tak proto neocenitelným nástrojem pro detekci specifických bakteriálních mikroorganismů v různých typech vzorků a diagnostiku infekčních onemocnění.

Při léčbě pacienta s bakteriální infekční chorobou je obvykle nutné rychle a přesně identifikovat původce onemocnění, stanovit účinnou léčbu a vyhnout se tak např. použití širokospektrálních antibiotik. Tradiční kultivační metody obvykle zahrnují dva kultivační kroky (namnožení kultury a poté selektivní kultivaci na mediu vhodného složení) a následnou identifikaci mikroorganismu pomocí morfologického, biochemického a imunochemického testování. Jsou proto často velmi pracné a časově náročné (až několik dní). Dále jsou také obtížně automatizovatelné, náchylné ke kontaminaci a znemožňují identifikaci pomalu rostoucích mikroorganismů nebo choulolistivých mikroorganismů neschopných růstu mimo hostitelský organismus (Mothershed *et al.* 2006).

Technologický průlom v mikrobiální diagnostice přišel s vyvinutím polymerázové řetězové reakce (PCR) Kary Mullisem a spolupracovníky v roce 1985, která umožňuje mnohonásobnou amplifikaci jakékoliv známé nukleotidové sekvence v komplexním vzorku nukleových kyselin a tím její detekci (Saiki *et al.* 1985). PCR poskytuje poměrně silný nástroj pro identifikaci mikroorganismů, jelikož umožňuje přímou detekci organismu ve vzorku bez předchozí kultivace a její provedení je mnohem rychlejší než u tradičních kultivačních metod (méně než 1 den). Avšak i konvenční PCR má jako detekční metoda nepříjemná omezení. Za prvé nelze provést přesnou kvantifikaci, protože konečné množství amplifikovaného produktu není závislé na počátečním množství cílové sekvence, a za druhé metoda vyžaduje analýzu produktů po ukončení reakce (např. gelovou elektroforézou), která bývá pracná, poměrně časově náročná a vnáší riziko falešných pozitivních výsledků díky kontaminaci při manipulacích se vzorkem (Higuchi *et al.* 1992).

Tyto problémy byly vyřešeny zavedením kvantitativní real-time PCR v roce 1992, kdy celá reakce i následná analýza produktů probíhá v jedné uzavřené nádobce (Higuchi *et al.* 1992) a průběh amplifikace je během reakce monitorován pomocí fluorescenčních barviv či sond (Wittwer *et al.* 1997). Matematickou analýzou získané amplifikační křivky je pak možné poměrně přesně vypočítat množství počátečních templátových molekul (Rutledge *et al.* 2003). Real-time PCR našla rychle uplatnění jako detekční metoda pro bakteriální i virové



mikroorganismy a pro studium změn v genové expresi. Ve srovnání s klasickými kultivačními metodami nebo konvenční PCR, je daleko citlivější, rychlejší (provedení jednoho real-time PCR testu zabere v průměru 1 hodinu), přesnější a méně náchylná na kontaminaci vzorků. Má také daleko širší rozsah kvantifikace (až 8 řádů) a umožňuje automatizaci a testování velkého množství vzorků najednou. Nevýhodou metody je schopnost detekce všech buněk přítomných ve vzorku, včetně buněk neživotoschopných (Lübeck *et al.* 2003).

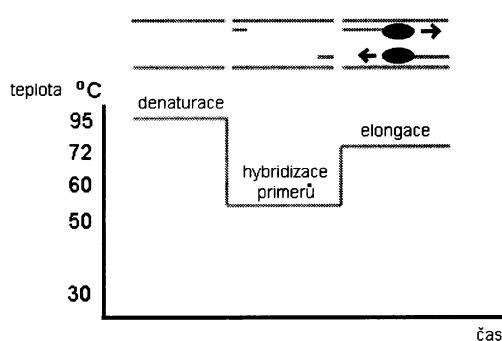
Cílem mé bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o kvantitativní real-time PCR v souvislosti s aplikací této metody pro detekci bakteriálních mikroorganismů. V následující kapitole se věnuji vysvětlení základních principů real-time PCR. Jelikož přesnost a spolehlivost detekce a kvantifikace pomocí této metody velmi závisí na jejím celkovém provedení, zabývám se proto v dalších kapitolách jednotlivými aspekty realizace real-time PCR jako používanými matematickými modely pro kvantifikaci, typy detekčních systémů pro monitorování amplifikace, správným zpracováním vzorků, optimalizací reakčních podmínek a volbou vhodného technického vybavení. Kapitola 5 popisuje tzv. analýzu křivky tání, což je sofistikovaná metoda používaná v některých real-time PCR testech k identifikaci produktů amplifikace. V kapitole 9 pak uvádím některé dosažené výsledky své vlastní experimentální práce.

## 2. Základní principy real-time PCR

### 2.1. Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí

PCR je prováděna na DNA templátě, kterým je obvykle dsDNA izolovaná ze zkoumaného mikroorganismu. V reakční směsi jsou dále obsaženy dva jednořetězcové oligonukleotidové primery ohraničující sekvenci DNA, která má být amplifikována, dNTP

jednotky, termostabilní DNA polymeráza a pufr s  $Mg^{2+}$  ionty (kofaktor DNA polymerázy). Reakce je prováděna procesem teplotního cyklování. Vysoká teplota (obvykle  $95^{\circ}C$ ) je použita pro oddělení řetězců templátové dsDNA. Poté je teplota snížena na hodnotu, která dovolu-



Obr. 1: Teplotní cyklus PCR. Teplota je nejprve zvýšena asi na  $95^{\circ}C$ , aby došlo k denaturaci templátové dsDNA. Poté je snížena na hodnotu umožňující hybridizaci primerů. Během elongační fáze je teplota nastavena asi na  $72^{\circ}C$  což je obvyklé teplotní optimum termostabilní DNA polymerázy. (upraveno podle Kubista *et al.* 2006)

hybridizaci primerů (většinou mezi 55 - 65°C), a nakonec je zvýšena nejčastěji na 72°C, což je optimum pro termostabilní DNA polymerázu, která prodlužuje primery podle komplementárního řetězce inkorporací dNTP jednotek. Vytvořené dvouřetězcové molekuly (amplikony) pak plní funkci templátu v dalším cyklu. Mnohonásobným opakováním tohoto postupu (obvyklý počet cyklů je asi 30-40) se počet amplikonů exponenciálně zvyšuje (Saiki *et al.* 1988).

Teoreticky by se měl počet amplikonů při 100% reakční účinnosti v každém cyklu zdvojnásobit. Prakticky však účinnost nedosahuje 100% a reálné výtěžky jsou nižší. Reakční účinnost je ovlivněna mnoha faktory, které zahrnují koncentraci DNA polymerázy, dNTP jednotek, MgCl<sub>2</sub>, templátové DNA a primerů, denaturační, hybridizační a elongační teploty, počet cyklů, časování fází cyklu a přítomnost inhibitorů nebo balastní DNA. Dále je známo, že reakční účinnost není v průběhu PCR konstantní, ale mění se (zpravidla klesá) cyklus od cyklu (Sachse 2003).

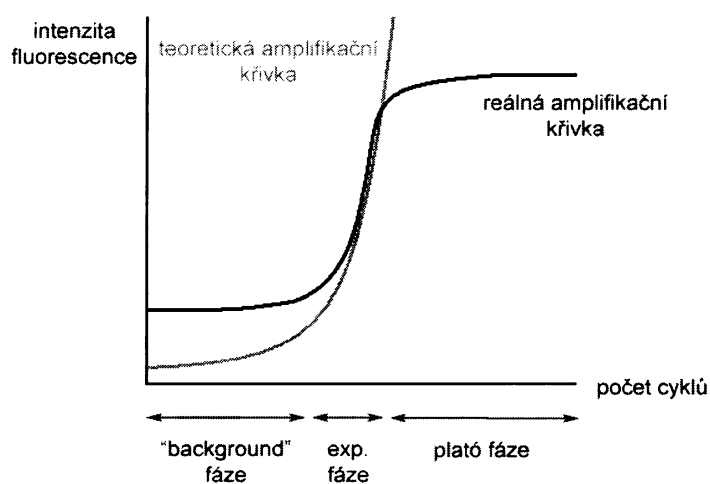
Pokud jde o výtěžek amplifikovaného produktu, může být každá PCR rozdělena do dvou částí: tzv. exponenciální fáze, kdy je přítomno dostatečné množství reakčních komponent a množství produktu roste exponenciální řadou, a plató fáze, kdy dochází k saturaci systému, vyčerpání jedné nebo více reagensů a zastavení amplifikace. Během exponenciální fáze existuje kvantitativní vztah mezi množstvím startovních templátových molekul a množstvím produktu PCR v určitém cyklu (Higuchi *et al.* 1993).

## 2.2. Real-time monitorování PCR

Real-time PCR se od konvenční PCR liší tím, že do reakční směsi je přidán detekční systém, který se váže k produktu, a podává zprávu o průběhu jeho amplifikace. Zpravidla se jedná o interkalační barviva, která fluoreskují po vazbě na dsDNA nebo fluorescenčně značené sondy, které se vážou ke specifické sekvenci uvnitř amplifikovaného regionu. V obou případech platí, že fluorescence je měřena na konci elongační fáze každého cyklu PCR, a její intenzita je přímo úměrná množství amplifikovaného produktu přítomného v reakční směsi (Wittwer *et al.* 1997).

Vynesením hodnoty fluorescence proti pořadovému číslu příslušného cyklu dostaneme amplifikační křivku, z jejíhož průběhu je možné určit počet startovních templátových molekul DNA. Typická amplifikační křivka má sigmoidální tvar a lze ji rozdělit na 3 části. Během počátečních cyklů PCR („background“ fáze) se hodnota fluorescence nemění, jelikož amplifikovaného produktu je málo, signál poskytovaný detekčními systémy je slabý a nepřekračuje hodnotu „background“ fluorescence systému. Jak množství amplifikovaného

produktu exponenciálně roste, signál v určitou chvíli překročí hodnotu „background“ fluorescence a křivka kopíruje tvar exponenciální funkce (exponenciální neboli log-lineární fáze). Poté v určité fázi PCR dochází k vyčerpání reakčních komponent a systém se dostává do plató fáze, kdy se množství amplifikovaného produktu již nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní.



Obr. 2: Amplifikační křivka real-time PCR. Na obrázku je znázorněna také teoretická amplifikační křivka v případě, že by nedocházelo k poklesu účinnosti amplifikace a neexistovala by „background“ fluorescence systému. Reálná amplifikační křivka má díky těmto dvěma faktorům sigmoidální tvar. (exp. fáze = exponenciální fáze)

#### Kvantitativní informace

je obsažena v exponenciální části křivky, která má rozsah pouze asi 4-8 cyklů. Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku (Higuchi *et al* 1993, Rutledge *et al.* 2003). Ráda bych upozornila, že během reakce dochází také ke vzniku určitého množství nespecifických produktů v důsledku nespecifické hybridizace primerů, vzájemné hybridizace ampliconů nebo vzniku tzv. „primer-dimerů“ (Sachse 2003). Důsledkem tohoto jevu je, že i při amplifikaci vzorku, který neobsahuje cílovou templátovou DNA, obdržíme amplifikační křivku. Pro tuto křivku je však charakteristické, že vstupuje do exponenciální fáze až v pozdních cyklech PCR (Morisson *et al.* 1998).

## 2.3. Varianty základního postupu

### 2.3.1. Multiplexní real-time PCR

Metoda multiplexní real-time PCR používá několik párů primerů s odlišnou specifitou v jedné reakci. Umožňuje simultánní detekci několika úseků nukleových kyselin jednoho nebo více druhů mikroorganismů, popř. zavedení interních kontrol do reakce (Sachse 2003).

### 2.3.2. Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR je metoda používaná k detekci a kvantifikaci molekul RNA. (např. při studiu genové exprese nebo detekci RNA virů). Od běžné real-time PCR se liší tím, že

před PCR je nutné provést reversní transkripci, neboli přepis RNA do DNA enzymem reversní transkriptázou. Vzhledem k tomu, že bakterie obsahují pouze DNA genom, drtivá většina real-time PCR testů detekujících bakterie je zaměřena na amplifikaci DNA (Mothershed *et al.* 2006). Nicméně, bylo publikováno i několik testů používajících RT-PCR (Nakaguchi *et al.* 2004). Použití RT-PCR může zvýšit citlivost detekce, protože RNA je v bakteriální buňce obvykle přítomna ve více kopiích, a nebo obejít problém detekce neživotaschopných buněk, jelikož RNA je mnohem méně stabilní než DNA a po smrti buněk je obvykle rychle degradována (Lübeck *et al.* 2003).

Vzhledem k omezenému použití real-time RT-PCR k detekci bakterií a zaměření své experimentální práce, nebudu možnosti provedení této metody dále podrobněji rozvádět.

### **3. Kvantifikace pomocí real-time PCR**

Kvantifikace, neboli stanovení startovního počtu templátových kopií na počátku PCR, je založena na vyhodnocení amplifikačních křivek získaných fluorescenčním monitorováním akumulace amplikonů v průběhu real-time PCR (Higuchi *et al.* 1993). Přesnost a spolehlivost kvantifikace je významně závislá na použitém matematickém modelu. Dnes existuje mnoho matematických přístupů, z nichž většina používá pro kvantifikaci exponenciální model. Nejrozsáhleji používaná je kvantifikace metodou externích standardů, která však má mnoho limitací. Dále byly publikovány alternativní metody, z nichž nejvýznamější modelují real-time PCR amplifikační křivku pomocí sigmoidální funkce (Liu *et al.* 2002).

#### **3.1. Absolutní kvantifikace pomocí externích standardů**

Metoda externích standardů (kinetická PCR) využívá skutečnosti, že během exponenciální fáze PCR existuje kvantitativní vztah mezi množstvím produktu a startovním počtem templátových molekul. Platí, že čím více je ve vzorku přítomno startovních templátových molekul, tím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný mezi „background“ a plató fází (Higuchi *et al.* 1993). Pokud tedy amplifikujeme neznámý vzorek společně se standardy o známé koncentraci, můžeme podle pořadových čísel cyklů, kdy jejich amplifikační křivky překročí tento fluorescenční práh, vypočítat startovní počet templátových kopií v neznámém vzorku (Rutledge *et al.* 2003).

Základní rovnice popisující amplifikaci pomocí PCR v exponenciální fázi reakce je:

$$N_C = N_0(1 + E)^C, \quad (1)$$

kde  $N_C$  je počet amplifikovaných molekul v C-tém cyklu,  $N_0$  je startovní počet templátových molekul a  $E$  je účinnost amplifikace („amplification efficiency“), přičemž platí, že  $0 \leq E \leq 1$ . Každý cyklus produkuje vzrůst v počtu amplifikovaných molekul ve vztahu k účinnosti amplifikace tak, že při  $E = 1$  (100 %) dochází v každém cyklu ke zdvojení amplifikovaných molekul, a při  $E = 0$  nedochází k amplifikaci (obvykle  $E = 0,9$ ). Množství produktu ( $N_C$ ) přítomné po určitém počtu cyklů ( $C$ ) je dále závislé na  $N_0$ . Matematická úprava rovnice (1) poskytuje vztah, na kterém je založena kvantifikace pomocí PCR:

$$N_0 = N_C / (1 + E)^C. \quad (2)$$

Ze známého množství  $N_C$  je tak možné vypočítat  $N_0$ , pokud známe účinnost amplifikace (Rutledge *et al.* 2003).

Real-time PCR poskytuje elegantní metodu pro stanovení  $N_0$ . Ukázalo se, že existuje lineární vztah mezi logaritmem startovního počtu templátů u jednotlivých vzorků a cyklem, kdy jejich amplifikační křivky překročí libovolný fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze PCR (Higuchi *et al.* 1993). Tento cyklus se nazývá prahový cyklus a značí se  $C_t$  („threshold cycle“), popř.  $C_P$  („crossing point“). Vynesem logaritmu startovních templátových koncentrací standardů proti  $C_t$  jejich amplifikačních křivek dostaneme s použitím lineární regresní analýzy tzv. standardní křivku („standard curve“), z jejíž rovnice je možné stanovit startovní koncentraci templátu u neznámého vzorku (Obr. 3) (Rutledge *et al.* 2003).

Lineární vztah mezi logaritmem koncentrace a  $C_t$  lze snadno odvodit. Po stanovení fluorescenčního prahu se  $N_C$  stává konstantou a rovnicí (2) lze upravit takto:

$$N_0 = N_{C_t} / (1 + E)^{C_t}, \quad (3)$$

kde  $C_t$  je prahový cyklus a  $N_{C_t}$  je počet ampliconů v prahovém cyklu. Matematický základ

standardní křivky je odvozen linearizací rovnice (3):

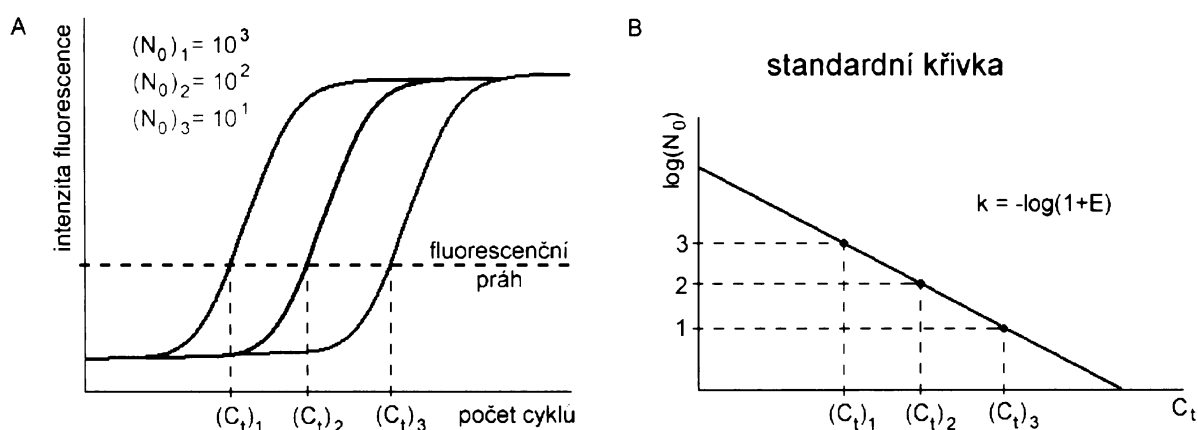
$$\begin{aligned} \log(N_0) &= \log(N_{C_t}) - \log(1+E)^{C_t} \\ \log(N_0) &= \log(N_{C_t}) - C_t \log(1+E) \\ \log(N_0) &= -C_t \log(1+E) + \log(N_{C_t}) \end{aligned} \quad (4)$$

Při použití kvantifikace pomocí externích standardů předpokládáme, že účinnost amplifikace se mezi jednotlivými vzorky neliší a je konstantní v průběhu amplifikace. Jak již bylo uvedeno,  $N_{C_t}$  je u všech porovnávaných vzorků také konstantní. Rovnice (4) je tedy lineární rovnicí se směrnici  $k = -\log(1+E)$ . Vynesením logaritmu známých  $N_0$  proti  $C_t$  příslušných vzorků získáme standardní křivku, z jejíž rovnice je možné určit  $N_0$  neznámého vzorku dosazením jeho  $C_t$  (Rutledge *et al.* 2003).

Pomocí směrnice lze dále odhadnout účinnost amplifikace (Rutledge *et al.* 2003):

$$E_S = 10^{-k} - 1, \quad (5)$$

Ve většině aplikací se však používá pouze standardní křivka jako kalibrační křivka pro odhadnutí startovních koncentrací neznámých vzorků (Ramakers *et al.* 2003).



Obr. 3: Schematické znázornění konstrukce standardní křivky. A: Amplifikační křivky fiktivní diluční série standardů se startovními templátovými koncentracemi  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$ . B: Standardní křivka.

Fluorescenční práh může být umístěn kdekoliv v exponenciální fázi amplifikačních křivek, aniž by docházelo k výraznější variabilitě výsledků. Počítačový software pro zpracování

real-time PCR dat zpravidla obsahuje algoritmy pro jeho stanovení, nebo jej umožňuje nastavit manuálně (<http://www.roche-applied-science.com>).

Jako standardy je vhodné použít např. DNA izolovanou z čisté bakteriální kultury detekovaného mikroorganismu o známé koncentraci nebo rekombinantní DNA (např. amplifikovanou sekvenci vloženou do plazmidů). Správná koncentrace standardů by měla být pečlivě kontrolována (Mackay *et al.* 2004).

Nevýhodou kalkulace pomocí externích standardů je předpoklad, že amplifikační účinnost během exponenciální fáze je konstantní v čase a má stejnou hodnotu ve všech studovaných vzorcích (Higuchi *et al.* 1993). Bylo však zjištěno, že amplifikační křivky se mezi jednotlivými vzorky diluční série liší (pravděpodobně díky vyředění inhibitorů PCR) (Ramakers *et al.* 2003) a kromě toho je známo, že účinnost amplifikace musí zákonitě klesat v průběhu cyklů, protože reakce vždy v určité fázi saturuje a dosahuje plató fáze.

Tyto nekonstantnosti v amplifikační účinnosti často zabraňují korektní kvantitativní interpretaci real-time PCR dat a je nutné konstruovat novou standardní křivku pro každý real-time PCR kvantifikační test (Liu *et al.* 2002).

I přesto je však kvantifikace pomocí externích standardů poměrně spolehlivá pokud pečlivě optimalizujeme reakční podmínky a zabráníme přítomnosti jakýchkoliv inhibičních látek v reakční směsi. Bylo prokázáno, že tato metoda je schopna odlišit i přítomnost jediné kopie cílové templátové molekuly od absence templátu (Morisson *et al.* 1998).

### 3.2. Alternativní kvantifikační metody

Za účelem vyřešení problému rozdílných účinností amplifikace mezi vzorky a nekonstantní účinnosti v průběhu amplifikace bylo publikováno několik alternativních matematických modelů.

Ramakers se spolupracovníky představili tzv. „assumption-free“ analýzu real-time PCR dat, která předpokládá nerovné účinnosti amplifikace mezi studovanými vzorky. Startovní počet templátových molekul je počítán přímo z amplifikační křivky studovaného vzorku a je vyjádřen v jednotkách intenzity fluorescence. Metoda je založena na linearizaci základní rovnice pro exponenciální amplifikaci PCR (1):

$$\log(N_{t.}) = C \log(1 + E) + \log(N_0). \quad (6)$$

V jednotkách intenzity fluorescence pak rovnice vypadá takto:

$$\log(F_C) = C \log(1 + E) + \log(F_0) \quad (7)$$

Hodnoty  $F_C$  a  $C$  je možné odečíst ze 4-6 bodů umístěných v tzv. „okně linearity“ amplifikační křivky, neboli v její exponenciální (log-lineární) fázi. Vynesem  $C$  proti  $\log(N_C)$  získáme přímku, jejíž směrnici je  $\log(1+E)$ , a která protíná osu  $y$  v bodě  $F_0$ , což je intenzita fluorescence odpovídající startovnímu počtu kopií templátové DNA (Ramakers *et al.* 2003).

Problém nekonstantní amplifikační účinnosti v průběhu reakce se pokusili vyřešit Liu a jeho kolegové, když jako první použili k modelování PCR amplifikace čtyřparametrovou sigmoidální funkci místo exponenciální:

$$F_C = \frac{F_{\max}}{1 + e^{-(C - C_{1/2})/k}}, \quad (8)$$

kde  $C$  je pořadové číslo cyklu,  $F_C$  je naměřená fluorescence v cyklu  $C$ ,  $F_{\max}$  je maximální reakční fluorescence v plató fázi,  $C_{1/2}$  je dílčí cyklus ve kterém fluorescence dosahuje poloviny  $F_{\max}$  a  $k$  je směrnice křivky. Model předpokládá, že amplifikační účinnost klesá kontinuálně v průběhu amplifikačního procesu a každý cyklus má unikátní amplifikační účinnost. Centrálním principem metody je její schopnost popsat každou individuální amplifikační křivku pouze parametry  $C$ ,  $C_{1/2}$ ,  $F_{\max}$  a  $k$ , které mohou být získány vyhodnocením amplifikačních křivek pomocí speciálního softwaru. Kvantifikaci lze snadno provést, pokud položíme  $C = 0$ :

$$F_0 = \frac{F_{\max}}{1 + e^{(C_{1/2}/k)}}, \quad (9)$$

kde  $F_0$  je počet startovních templátových molekul vyjádřený v jednotkách fluorescence (Liu *et al.* 2002). Nedávno byl presentován vylepšený sigmoidální model, kdy se z analýzy vypouštějí data z plató fáze (Rutledge *et al.* 2004). Bylo prokázáno, že sigmoidální model poskytuje velice silný nástroj pro kvantifikaci, který svou přesností předčí kvantifikaci pomocí externích standardů. Výhodou je dále skutečnost, že lze provést kvantifikaci bez předchozí znalosti amplifikační účinnosti, a že metoda je necitlivá k variacím mezi



amplifikačními účinnostmi jednotlivých reakcí. Kromě toho také poskytuje vynikající možnosti pro automatizaci.

Oba zmíněné alternativní modely kvantifikují  $N_0$  v jednotkách fluorescence. Relativní fluorescenční data mohou být snadno konvertována do absolutních s použitím jediného kalibračního standardu (Rutledge *et al.* 2004).

### 3.3. Real-time PCR vs. konvenční PCR

Detekce produktů v konvenční PCR je limitována použitím tzv. „end-point“ metody, kdy můžeme detekovat pouze množství produktu v cyklu, ve kterém ukončíme amplifikaci. Teoreticky vzato by bylo možné provést kvantifikaci s použitím vztahu (2), pokud bychom zastavili reakci v exponenciální fázi. Tato metoda však není příliš spolehlivá, protože i malá chyba v odhadu amplifikační účinnosti zapříčiní velké chyby ve výsledcích (Heid *et al.* 1996). Dále je obtížné určit, ve kterém cyklu zastavit amplifikaci tak, aby reakce ještě nebyla v plató fázi. Bylo prokázáno, že hlavní příčinou vstupu systému do plató fáze je akumulace určitého množství produktu, který se váže na DNA polymerázu, a tím ji inaktivuje (Kainz 2000). Množství produktu v plató fázi proto nezávisí na startovním počtu kopií templátové DNA.

Real-time PCR oproti tomu poskytuje možnost daleko přesnější kvantifikace prostřednictvím linearizace rovnice (2) a výpočtu startovních templátových koncentrací přímo z exponenciální fáze amplifikační křivky (Rutledge *et al.* 2003).

### 3.4. Absolutní vs. relativní kvantifikace

Na závěr této kapitoly bych ráda objasnila pojmy absolutní a relativní kvantifikace. Prakticky veškerá kvantifikace pomocí real-time PCR je relativní. Znamená to, že počet startovních kopií v neznámém vzorku vždy posuzujeme v relativním vztahu k něčemu, např. k použitým standardům. Pojem absolutní kvantifikace znamená, že jsme schopni určit počet templátových kopií v absolutních hodnotách, např. pokud známe koncentrace standardů.

Čtenář zajímavící se o kvantitativní real-time PCR může v literatuře často najít i různé metody zaměřující se na relativní kvantifikaci (např. Livak *et al.* 2001), kdy je sledována pouze změna množství nukleových kyselin ve vzorku. Tato informace je postačující třeba při studiu změn v genové expresi, tedy v případě, kdy je potřeba porovnat hladinu exprese určitého genu mezi jednotlivými tkáněmi a podobně. Pro kvantitativní detekci mikroorganismů je však nutné použít metody absolutní kvantifikace. Vzhledem k tématu své práce jsem real-time PCR metody relativní kvantifikace záměrně vynechala.

## 4. Detekční systémy pro monitorování průběhu amplifikace

Průběh amplifikace u real-time PCR je monitorován měřením intenzity fluorescence různých látek, které vážou amplifikovaný produkt a mění tak své fluorescenční vlastnosti. Používají se dsDNA specifická interkalační barviva nebo sekvenčně specifické sondy (Wittwer *et al.* 1997). Fluorescence je měřena během elongační fáze každého cyklu a její intenzita odpovídá koncentraci produktu.

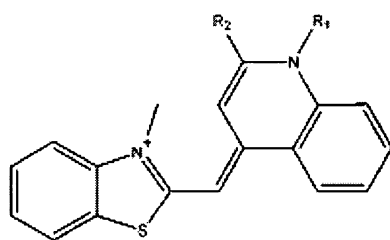
### 4.1. dsDNA specifická interkalační barviva

Interkalační barviva specifická pro dvouřetězcovou DNA představují nejlevnější a nejjednodušší způsob monitorování amplifikace během real-time PCR. Vyznačují se tím, že se specificky vážou k dsDNA (interkalací mezi štosy bází v dvoušroubovici DNA), přičemž výrazně zvyšují intenzitu své fluorescence (Nygren *et al.* 1998). Vzhledem k tomu, že během PCR vzniká dvouřetězcový produkt, jehož množství zpravidla výrazně převyšuje počáteční množství dsDNA, lze pomocí interkalačních barviv poměrně spolehlivě sledovat průběh amplifikace (Higuchi *et al.* 1992).

V prvních real-time PCR experimentech se k detekci amplifikované sekvence používal ethidium bromid (EtBr) (Higuchi *et al.* 1992). Ten však interferuje s PCR a proto se dnes převážně používají asymetrická kyanidová barviva, z nichž nejrozšířenější je SYBR Green I. Oproti EtBr váže dsDNA se 100-krát větší afinitou a poskytuje silnější fluorescenční signál (Wittwer *et al.* 1997). Jedná se o monomerní kyanidové asymetrické barvivo, které se váže na dsDNA s 11-krát větší účinností než na ssDNA. Fluorescence je po vazbě na dsDNA asi 1000-krát větší než u volného barviva. Barvivo se váže do malého žlábků dsDNA, což je příčinou určitých sekvenčně specifických změn v intenzitě fluorescence (u AT párů je intenzivnější než u GC párů). Barvivo je excitováno při 480 nm a emisní maximum má při 520 nm (blízké fluoresceinu) (Cosa *et al.* 2001). Ve vysokých koncentracích však inhibuje PCR (Wittwer *et al.* 1997).

Kromě SYBR Green I byla použita i další barviva s podobnou strukturou, jako např. YO-PRO 1 (Tseng *et al.* 1997) nebo BEBO (Bengtsson *et al.* 2003).

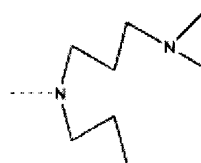
#### A. Společná jaderná struktura



#### B. SYBR Green I

R<sub>1</sub>: -fenyl

R<sub>2</sub>:



Obr. 4: Chemická struktura asymetrických kyanidových barviv.  
(upraveno podle Zipper *et al.* 2004)

Výhodou interkalačních barviv je jejich jednoduché a všeobecně aplikovatelné použití. Hlavní limitací je jejich schopnost detekovat jakoukoliv dsDNA včetně nežádoucích produktů amplifikace (Wittwer *et al.* 1997) a nízká citlivost detekce v přítomnosti vysokého množství balastní dsDNA, např. při detekci patogenů ve vzorcích DNA izolované z tkání (Higuchi *et al.* 1992). Tyto problémy lze obejít pečlivou optimalizací metody a použitím metod jako např. „hot start“ PCR nebo měření fluorescence při teplotě vyšší než je teplota tání nespecifických produktů, jelikož její hodnota je zpravidla výrazně nižší než teplota tání ampliconů (Morisson *et al.* 1998). Účinnou metodou pro odhalení nespecifických amplifikačních produktů je také analýza křivky tání (Ririe *et al.* 1997).

## 4.2. Sekvenčně specifické fluorescenčně značené sondy

Značené sondy se vyznačují tím, že se specificky vážou k určitému úseku uvnitř amplifikované sekvence a mění tak své fluorescenční vlastnosti. Změna fluorescenčních vlastností je založena na jevu zvaném FRET („fluorescence resonance energy transfer“).

Výhodou sekvenčně specifických sond je jejich mnohem vyšší specifita ve srovnání s interkalačními barvivy. Nevýhodou je složitá syntéza a nutnost pečlivé optimalizace designu sond a reakčních podmínek. Nejčastěji používané jsou 3 typy značených oligonukleotidových sond – TaqMan sondy, „Molecular beacons“ a FRET sondy. Dále bylo publikováno mnoho alternativních variant a typů sond, popř. značených primerů. Struktura některých z nich je založena na PNA („peptide nucleic acid“) nebo LNA („locked nucleic acid“).

### 4.2.1. FRET („fluorescence resonance energy transfer“)

„Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) je fotofyzikální jev, který nastává, pokud se dva fluorofory jejichž absorpční a emisní spektra se překrývají dostanou do těsné blízkosti. Energie excitovaného stavu donorového fluoroforu (tzv. „reporteru“) je přenesena

prostřednictvím rezonančních dipól–dipól interakcí na akceptorový fluorofor (tzv. „quencher“ – zhášec), jehož absorpční spektrum se překrývá s emisním spektrem donorového fluoroforu. Výsledkem je pokles intenzity fluorescence donorové molekuly (tzv. zhášení) a vyzáření energie zachycené akceptorovou molekulou v podobě tepla nebo fluorescenčního záření o jiné vlnové délce (Cardullo *et al.* 1988).

Fluorescenční sondy pro real-time PCR jsou obvykle značené dvěma fluorofory (donor-akceptorovým párem) a jsou designovány tak, že po hybridizaci s cílovou molekulou dojde buď k přiblížení donorového a akceptorového fluoroforu umožňujícímu FRET (FRET sondy), nebo k oddělení obou fluoroforů a inhibici zhášení (TaqMan sondy, „Molecular beacons“). Pro konstrukci sond se používá mnoho fluoroforů, jejichž stručný přehled je uveden v přílohách (Tabulka 3) (Marras *et al.* 2002).

Akceptorové fluorofory můžeme rozdělit do dvou typů – fluoreskující fluorofory, které absorbují energii z donorového fluoroforu a emitují záření o jiné vlnové délce, a nefluoreskující fluorofory (tzv. zhášec), které pouze absorbují energii donorového fluoroforu a inhibují tím jeho fluorescenci. Jako donorové fluorofory se vždy používají fluoreskující fluorofory (Marras *et al.* 2002).

Účinnost FRET je tím větší, čím větší je rozsah spektrálního překryvu obou fluoroforů a čím menší je jejich vzdálenost. Fluoroforové páry mají tendenci se přitahovat nebo odpuzovat. Tato skutečnost může výrazně ovlivnit termodynamické chování sond a je nutno ji zauvažovat při jejich designu (Marras *et al.* 2002).

Samotné nukleotidy mají také určitou zhášecí schopnost. Tato schopnost klesá v řadě (dle názvů příslušných bází) guanin, adenin, cytosin a thymin a je vždy menší než zhášecí schopnost běžně užívaných fluoroforů (Marras *et al.* 2002). Některé typy sond obsahující pouze jeden slabě fluoreskující fluorofor jsou založeny na zhášení prostřednictvím nukleotidů (Svanvik *et al.* 2000).

Sondy značené fluorofory s odlišnými emisními maximy se dají použít pro detekci produktů multiplexní PCR (Wittwer *et al.* 2001).

#### **4.2.2. TaqMan sondy (hydrolytické sondy)**

TaqMan technologie (Obr. 5) využívá 5'-3' exonukleázové aktivity DNA polymerázy ke štěpení značené neprodlužovatelné hybridizační sondy (Holland *et al.* 1991). TaqMan sondy jsou dnes nejpoužívanější detekční technikou real-time PCR. Jsou to oligonukleotidy značené na 5' konci „reporterem“ a na 3' konci nebo interně „quencherem“, které hybridizují s určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu. V intaktním stavu jsou fluorofory

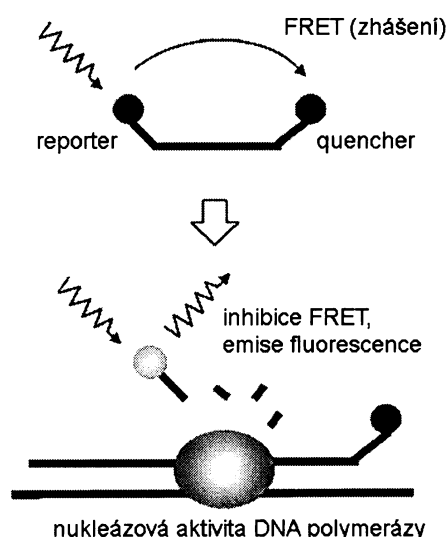
drženy v blízkosti umožňující zhášení. Pokud však sonda zhybridizuje s cílovou sekvencí, tak je během elongační fáze PCR štěpena prostřednictvím 5'-nukleázové aktivity DNA polymerázy, čímž dochází k vzájemnému oddělení obou fluoroforů a emisi fluorescenčního záření. Na 3' konci je sonda blokována fosfátem, aby nemohla sloužit jako primer (Lee *et al.* 1993). „Reporterem“ je obvykle fluorescein, „quencherem“ je často rhodamin (Heid *et al.* 1996).

Změna fluorescenční emise „reporteru“ je přímo úměrná množství akumulovaného produktu PCR. Emisní intenzita „quencheru“ zůstává během amplifikace relativně konstantní, takže se používá jako standard vůči kterému je normalizována emise „reporteru“. Software počítá hodnotu zvanou  $\Delta Rn$  užitím rovnice  $\Delta Rn = (Rn^+) - (Rn^-)$ , kde  $Rn^+$  je emisní intenzita „reporteru“/emisní intenzita „quencheru“ v jakémkoliv čase reakce a  $Rn^-$  je emisní intenzita „reporteru“/emisní intenzita „quencheru“ měřená před PCR amplifikací (Gibson *et al.* 1996).

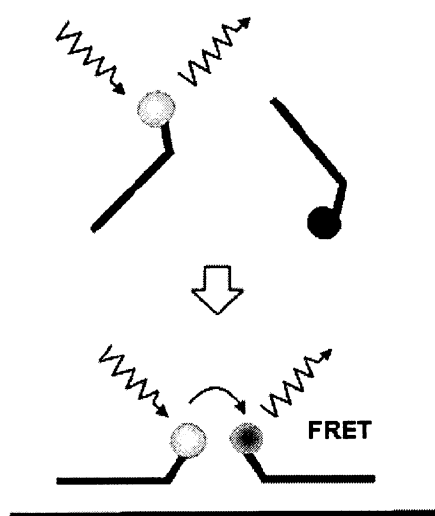
TaqMan sondy jsou schopny odlišit i sekvence lišící se substituční mutací jediného nukleotidu (Lee *et al.* 1993). Jejich nevýhodou je skutečnost, že emise fluorescence je ireversibilní, a tudíž nelze provést analýzu křivky tání.

#### 4.2.3. FRET sondy

FRET sondy (Obr. 6), neboli přilehlé hybridizační sondy, jsou detekční technikou vyvinutou speciálně pro přístroj LightCycler (Wittwer *et al.* 1997). Systém hybridizačních sond se skládá ze dvou fluorescenčně značených oligonukleotidů, z nichž jeden je značen na 3' konci fluoresceinem a druhý na 5' konci akceptorovým fluoroforem, např. LC Red 640. Sondy jsou designovány tak, aby hybridizovaly přilehle vedle sebe na templátové DNA a umožnily tak FRET fluoroforového páru. Fluorescein absorbuje světlo z modré LED diody přístroje LightCycler a emituje



Obr. 5: Mechanismus funkce TaqMan sond (upraveno podle Kubista *et al.* 2006)



Obr. 6: Mechanismus funkce FRET sond (upraveno podle Kubista *et al.* 2006)

energii, která se prostřednictvím FRET přenáší na LC Red 640. Ten pak emituje záření o vlnové délce 640 nm, které je měřeno detekční jednotkou přístroje (Caplin *et al.* 1999).

Použití FRET sond má tři hlavní výhody: fluorescence je přímým výsledkem hybridizace dvou nezávislých sond, což je příčinou vysoké specifity, jsou vhodné pro analýzu křivky tání a jejich design, optimalizace a syntéza jsou jednoduché (každý nukleotid má navázáno jen jedno barvivo) (Caplin *et al.* 1999).

#### 4.2.3. „Molecular beacons“

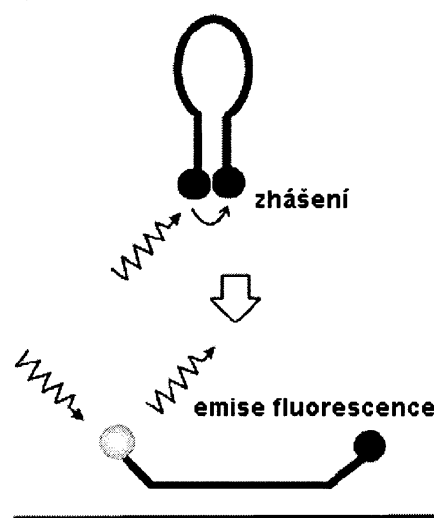
„Molecular beacons“ (Obr. 7) jsou jednořetězcové oligonukleotidové sondy s charakteristickou vlásenkovou strukturou. Smyčku vlásenky tvoří sekvence komplementární k určité sekvenci uvnitř amplifikovaného regionu. „Stonek“ vlásenky je tvořen navzájem komplementárními sekvencemi odlišnými od jakékoliv sekvence uvnitř amplifikovaného regionu. Na koncích jsou sondy značeny „reporterem“ a nefluoreskujícím „quencherem“ (Tyagi *et al.* 1996).

V nehybridizovaném stavu má sonda svou vlásenkovou strukturu a fluorescence reporteru je zhášena prostřednictvím quencheru, protože oba fluorofory jsou drženy v těsné blízkosti. Pokud sonda zhybridizuje s cílovou sekvencí, dojde k prostorovému oddělení obou fluoroforů a inhibici zhášení (Tyagi *et al.* 1996).

Výhodou hybridizačních sond je jejich vysoká specifita – dokonce i záměna nebo delece jediného nukleotidu vede k neúčinné hybridizaci (Tyagi *et al.* 1998). Jsou vhodné pro real-time PCR díky velice rychlé kinetice denaturace a reasociace (Tyagi *et al.* 1996).

#### 4.2.4. Alternativní typy sond a modifikované primery

Některé typy sond jsou založeny na struktuře DNA analogů jako jsou PNA („peptide nucleic acids“) nebo LNA („locked nucleic acids“). Peptidové nukleové kyseliny se skládají z nukleotidů propojených peptidovou vazbou místo fosfodiesterové (Egholm *et al.* 1993). Tzv. „Light-up“ sondy jsou peptidové nukleové kyseliny značené asymetrickým kyanidovým barvivem „thiazole orange“ (Svanvik *et al.* 2000). LNA jsou deriváty RNA s vysokou afinitou



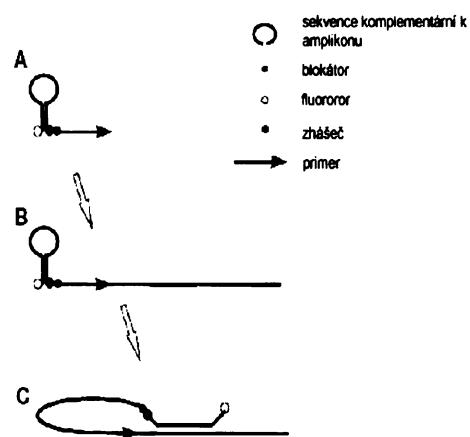
Obr. 7: Mechanismus funkce „Molecular beacons“ (upraveno podle Kubista *et al.* 2006)

ke komplementárním sekvencím (Braasch *et al.* 2001), které mohou být účinnými detekčními systémy real-time PCR (Costa *et al.* 2004).

Dále byly publikovány metody používající k detekci ampliconů molekuly kombinující funkci primeru a oligonukleotidové sondy. Výhodou těchto přístupů je nezávislost produkce hybridů sonda-templát na koncentraci sondy (Whitcombe *et al.* 1999).

„Sunrise“ primery jsou na koncích značeny párem „reporter-quencher“ a mají 5' terminální vlásenkovou strukturu, která drží oba fluorofory pohromadě. Po hybridizaci s templátovou molekulou a jednom cyklu PCR dochází k elongaci primeru a vzniku ampliconu značeného vlásenkou. Při dalším elongačním cyklu DNA polymeráza otevře vlásenkovou strukturu a dojde k inhibici zhášení (Nazarenko *et al.* 1997).

„Scorpion“ primery (Obr. 8) jsou primery, které mají na svém 5' konci navázanou vlásenkovou strukturu s donor-akceptorovým fluoroforovým párem a sekvencí „smyčky“ komplementární s určitým regionem uvnitř amplifikované sekvence. 5' koncová část primeru je s vlásenkou spojena přes hexyethylglykol, který blokuje její kopírování. Po prodloužení primeru podle komplementární templátové sekvence, vlásenka hybridizuje s produktem, čímž dojde k oddělení donorového fluoroforu a zhášeče. Oproti „sunrise“ primerům „scorpion“ primery netvoří primer-dimer artefakty (Whitcombe *et al.* 1999).



Obr. 8: Mechanismus funkce „Scorpion“ primerů (upraveno podle Whitcombe *et al.* 1999)

## 5. Analýza křivky tání

Jako tání DNA označujeme proces separace komplementárních řetězců dsDNA indukovaný zvyšováním teploty. Je způsobeno tím, že zvýšená teplota ruší vodíkové vazby mezi dusíkatými bázemi a dvoušroubovice DNA je destabilizována odpuzováním negativně nabitých fosfátových skupin. Tání DNA je kooperativní proces, kdy zhroucení jedné části molekuly rychle destabilizuje celý zbytek molekuly. Tento jev se prakticky projevuje tím, že DNA taje nejrychleji v určitém rozsahu teplot, blízcích se tzv. teplotě tání  $T_m$  („melting temperature“), která je definována jako teplota, kdy přesně polovina DNA ztratí svou dvouřetězcovou strukturu. Hodnota  $T_m$  je funkcí GC/AT poměru, délky a sekvence molekuly

DNA přičemž platí, že molekula bohatá na GC páry taje při vyšší teplotě než molekula bohatá na AT páry (Lodish *et al.* 2004).

Tání DNA můžeme monitorovat pomocí fluorescenčních dsDNA specifických barviv tak, že roztok dsDNA ochladíme na teplotu nižší než je očekávaná teplota tání produktů a postupně zvyšujeme teplotu na teplotu vyšší než je očekávaná  $T_m$ . Pokud vyneseme naměřenou intenzitu fluorescence proti příslušné teplotě, dostaneme tzv. křivku tání (Obr. 9), která náhle strmě klesá v okolí  $T_m$ . Teplota v inflexním bodě křivky se rovná  $T_m$  a lze ji snadno zjistit dvojím zderivováním křivky tání, kde se v grafu objeví jako vrchol lokálního maxima (Ririe *et al.* 1997).

Tání DNA můžeme využít k rozlišení specifických a nespecifických produktů PCR při použití dsDNA specifických interkalačních barviv a k detekci mutací nebo genotypizaci mikroorganismů při použití fluorescenčních sond.

### **5.1. Rozlišení specifických a nespecifických produktů PCR**

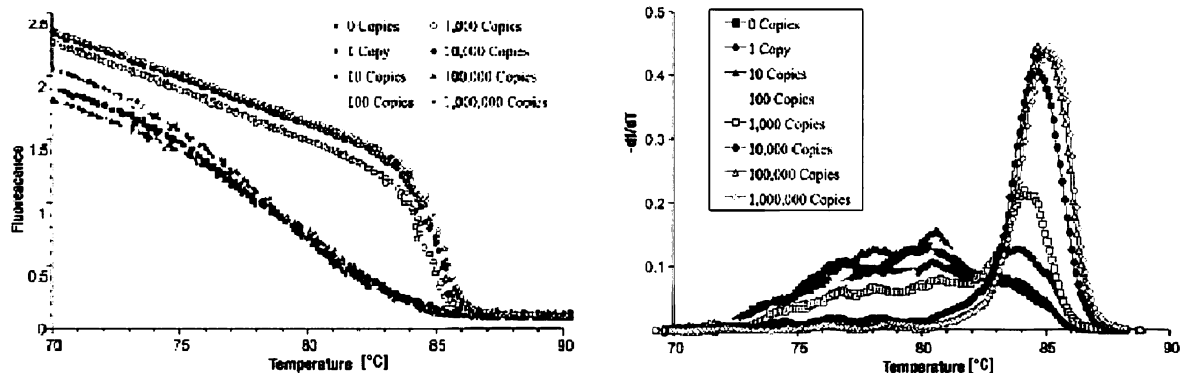
Nevýhodou použití dsDNA specifických interkalačních barviv pro monitorování real-time PCR je skutečnost, že tato barviva detekují všechnu dsDNA včetně nežádoucích produktů které mohou vznikat např. na počátku reakce při vysokém koncentračním přebytku primerů (primer-dimer artefakty) nebo při nedokonalé optimalizaci reakčních podmínek (pokud se primery nespecificky vážou mimo svá vazebná místa) (Sachse 2003). Tyto nežádoucí produkty lze odlišit od žádoucích pomocí analýzy křivky tání, protože jsou obvykle mnohem kratší, mají odlišné nukleotidové složení a tudíž odlišnou  $T_m$  (Wittwer *et al.* 1997). Křivku tání lze použít k rozlišení takových produktů PCR, které se liší svou  $T_m$  i o méně než 2°C (Ririe *et al.* 1997).

Tání produktů PCR lze monitorovat po ukončení reakce ochlazením reakční směsi a postupným zvyšováním teploty nad očekávanou hodnotu  $T_m$ . Pokud reakční směs obsahuje nespecifické produkty, obdržíme tzv. složenou křivku tání, jejíž druhá derivace má dvě lokální maxima. Integrací plochy pod lokálním maximem můžeme determinovat poměr žádoucího produktu, upravit podle něj amplifikační křivky a zvýšit tak citlivost detekce. (Ririe *et al.* 1997).

Bylo zjištěno, že pozice křivky tání závisí na koncentraci SYBR Green I a rychlosti teplotní změny. U obojího platí, že čím jsou větší, tím větší je naměřená  $T_m$  (Ririe *et al.* 1997).

Analýza křivky tání může být použita také k rozlišení produktů multiplexní PCR pokud použijeme odlišné  $T_m$  u amplifikovaných produktů (Al-Robaiy *et al.* 2001).





Obr. 9: Znárodnění typického výstupu dat při použití analýzy křivky tání. Vlevo: křivky tání. Vpravo: druhá derivace křivek tání. U koncentrací menších než 1000 kopií můžeme pozorovat akumulaci nespecifických produktů. (upraveno podle Rasmussen *et al.* 1998)

## 5.2. Analýza křivky tání fluorescenčních sond

Analýzou křivky tání fluorescenčních sond (FRET sond a „molecular beacons“) je možné identifikovat i jednonukleotidové substituční mutace, protože jediný nekomplementární nukleotid může snížit  $T_m$  sondy zhybridizované s templátem až o 7 °C. Metodu lze využít např. k detekci mutací udělujících některým bakteriálním kmenům resistenci na antibiotika (Piatek *et al.* 1998 , Garcia de Viedma *et al.* 2002).

## 6. Příprava vzorků pro real-time PCR

Biologické vzorky (klinické, environmentální či potravinářské) obvykle obsahují širokou škálu inhibičních substancí, které mohou snížit amplifikační účinnost nebo přímo blokovat PCR. Pečlivé zpracování vzorků před zahájením PCR je proto klíčovou součástí provedení metody. Preparační metody se výrazně liší podle typu vzorku a druhu mikroorganismu. V každém případě by však měly spolehlivě odstranit nebo zneškodnit inhibitory, dostatečně zkoncentrovat detekovaný mikroorganismus, zpřístupnit cílovou templátovou DNA reakčním komponentám PCR a zabránit její degradaci. Cílem je vytvořit z komplexních biologických vzorků vhodné substráty pro PCR (Rådström *et al.* 2003).

U „čistých“ vzorků, jako jsou např. čisté bakteriální kultury, obvykle stačí pouhé povaření, které rozruší buněčné stěny, způsobí lýzu buněk a současně degraduje škodlivé proteázy a nukleázy. U komplexnějších vzorků, jako jsou např. klinické vzorky (krev), je nutné nejprve separovat buňky od „matrix“ vzorku a popř. přímo extrahovat a purifikovat DNA (Wilson 1997).

Obecně platí, že čím pracnější a časově náročnější je preparační metoda, tím lepší substrát pro PCR lze získat.

## 6.1. Inhibitory polymerázové řetězové reakce

Inhibitory PCR působí třemi hlavními mechanismy – inhibují DNA polymerázu, degradují nebo zachycují DNA a interferují s buněčnou lýzou, přičemž DNA polymeráza je nejčastějším cílem. Inhibitory DNA polymerázy jsou obvykle proteolytické enzymy, denaturační činidla (močovina, organické a fenolické sloučeniny) a látky deaktivující enzym blokováním aktivního místa (sérové proteiny). Stejně látky také interferují s buněčnou lýzou prováděnou pomocí lytických enzymů. DNA je po uvolnění z buněk náchylná k degradaci nukleázami nebo k vazbě na různé proteiny, polysacharidy, zbytky lyzovaných buněk a cizorodou DNA, které brání navázání DNA polymerázy (Wilson 1997).

Zdrojem inhibitorů mohou být vzorky samotné, ale i laboratorní náčiní a kontaminace při zpracování vzorku. V klinických vzorcích jsou hlavními inhibičními látkami složky tělních tekutin jako hemoglobin, imunoglobulin G, laktoferrin, heparin a sérové proteiny v krvi, bilirubin, žlučové kyseliny, žlučové soli a komplexní polysacharidy ve stolici a močovina v moči. Bylo prokázáno, že obsah 0,004 % krve v reakční směsi totálně inhibuje amplifikaci. Inhibitory v environmentálních vzorcích mohou být organické a fenolické sloučeniny, huminové sloučeniny (v půdě) a těžké kovy. Huminové sloučeniny chelatují  $Mg^{2+}$  ionty, vážou DNA a proteiny a interferují s DNA polymerázou a lytickými enzymy. V potravinářských vzorcích škodí obvykle organické a fenolické sloučeniny, glykogen, tuky a ionty  $Ca^{2+}$  (v mléce), které inhibují DNA polymerázu kompeticí s  $Mg^{2+}$  ionty. Ve všech typech vzorků se mohou vyskytovat proteázy a nukleázy pocházející z mikroorganismů, které mohou být již přítomné ve vzorku, nebo se tam dostat kontaminací během jeho zpracování (ze vzduchu). Velké množství cizorodé DNA ve vzorku inhibuje PCR vyvázáním primerů. Pyl ze vzduchu obsahuje enzymy, které mohou degradovat důležité reakční komponenty (Wilson 1997).

Zajímavou část inhibičních látek tvoří inhibitory pocházející z laboratorního vybavení a zpracování vzorků. Bylo prokázáno, že polypropylenové mikrozkuřavky nebo celulóžové a nitrocelulóžové filtry obsahují reaktivní skupiny, které mohou vázat a inaktivovat reakční komponenty PCR. Pudr z rukavic nespecificky váže DNA a DNA polymerázu (obecně doporučované časté měnění rukavic se tak může stát příčinou inhibice reakce) (Wilson 1997).

Inhibiční látky se dají zneškodnit fyzickochemickou separací, inaktivací (povaření inaktivuje degradační enzymy), přidáním „inhibitorů inhibitorů“, kompetujících substancí (BSA poskytuje mnoho vazebných skupin s vysokou afinitou, které váží inhibitory s větší pravděpodobností než reakční komponenty PCR). Ihned po lýze buněk je třeba odstranit

buněčné zbytky a lytické enzymy (lze je zneškodnit teplem a proteázami). Často pomůže pouhé zředění vzorků (dojde k vyředění inhibitorů, ale PCR je dost citlivá na to, aby amplifikovala zbylou DNA). Kontaminaci lze předejít pečlivou aseptickou prací v laboratoři (práce v digestořích, desinfekce UV zářením) (Wilson 1997).

Inhibitorem PCR může být i samotná templátová DNA, pokud je přítomná ve vysokých koncentracích. Při vysoké koncentraci templátové DNA dochází k vzájemné hybridizaci amplikonů (snížení se počtu vazebných míst pro primery), snížení účinnosti denaturace (Lübeck *et al.* 2003) a inhibici DNA polymerázy (Kainz 2000).

Na závěr je třeba upozornit, že inhibiční mechanismy jsou velmi komplexní interakce, které nelze jednoduše kategorizovat. Některé substance mohou inhibovat i usnadňovat amplifikaci v závislosti na systému a na koncentraci. Inhibice nemusí vést k totální blokaci amplifikace, obvykle je pouze snížena citlivost PCR (Wilson 1997).

Pro determinaci přítomnosti či nepřítomnosti inhibitorů ve zkoumaném vzorku, je praktické zahrnout do reakční směsi tzv. interní amplifikační kontrolu, což je necílová DNA sekvence, která je amplifikována simultánně s cílovou sekvencí. Pokud není amplifikována interní kontrola, dochází k inhibici PCR. Interní kontroly mohou být buď kompetitivní, které jsou amplifikovány pomocí stejného páru primerů jako cílová DNA, nebo nekompetitivní, které používají odlišný pár primerů (multiplexní PCR). Kontrolní DNA může být nasyntetizována a přidána do vzorku (klonování do plazmidu), nebo to může být např. sekvence přítomná v genomu všech bakterií ve velkém počtu kopií (Hoorfar *et al.* 2004).

## **6.2. Separace bakteriálních buněk od ostatních komponent a lýza buněk**

V případě komplexních vzorků je obvykle nutné separovat bakteriální buňky od ostatních komponent a zkoncentrovat cílový mikroorganismus. Metody mohou být buď imunologické (imunomagnetické zachycení), jejichž výhodou je vysoká specifita, nebo fyzikální (izopyknická centrifugace, filtrace nebo vodní dvoufázové systémy), které jsou závislé na fyzikálních vlastnostech buněk. Někdy tyto metody zahrnují také předchozí kultivaci (Rådström *et al.* 2003).

Takto zpracovaný vzorek obvykle dále vyžaduje promytí a lýzu buněk. Lýza se provádí buď mechanicky (povařením, zmražením v tekutém dusíku) nebo pomocí detergentů. Vysoce resistantní buněčné membrány gram pozitivních bakterií jsou rozrušovány zpravidla enzymaticky (lysosym, lysostaphin). Je nutné dbát na to, aby po lýze nezůstaly ve vzorku inhibiční substance jako zbytky buněk, použité enzymy a detergenty (Wilson 1997).

### 6.3. Extrakce nukleových kyselin

Jako substrát pro PCR stačí obvykle pouhé lyzované buňky. Pokud je však potřeba vysoce sensitivní detekce, např. pokud předpokládáme velmi malé množství cílového mikroorganismu ve vzorku, je nutné provést přímo extrakci a purifikaci nukleových kyselin. Extrakce nukleových kyselin může být provedena manuálními, nebo automatizovanými metodami (Espy 2006).

Manuální metody zahrnují fenol-chloroformovou extrakci, precipitaci ethanolem a metody založené na vazbě nukleových kyselin na vhodnou matrix (silikagel, imunomagnetické zachycení). Mnoho výrobců vyvinulo manuální extrakční „kity“ pro použití v laboratořích. Mezi nejpoužívanější patří HighPure (Roche Applied Science; <http://www.roche-applied-science.com>), QIAamp, (Qiagen; <http://www.qiagen.com>), IsoQuick (Orca Research; <http://www.bioexpress.com>), IsoCode Stix (Schleicher & Schuell; <http://www.whatman.com>) nebo např. GenElute<sup>TM</sup> Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma; <http://www.sigma-aldrich.com>). Nevýhodou manuálních extrakčních metod je pracné a časově náročné provedení zahrnující mnoho kroků. Některé metody také používají reagentie, které mohou inhibovat PCR (fenol, ethanol), pokud nejsou pečlivě odstraněny (Espy 2006).

Na trh bylo uvedeno také několik přístrojů umožňujících automatizovanou extrakci. Zpravidla jsou založeny na zachycení nukleových kyselin magnetickými křemíkovými částicemi. Mezi nejpoužívanější patří MagNA Pure (<http://www.roche-applied-science.com>) a ABI Prism 6700 (<http://www.appliedbiosystems.com>) určené pro použití v tandemu s real-time PCR cyclery (Espy 2006).

## 7. Optimalizace reakčních podmínek

Pro spolehlivé kvantitativní výsledky pokrývající velký rozsah startovních templátových koncentrací musí být real-time amplifikace vysoce účinná a specifická. Je proto nutné pečlivě optimalizovat obsah reakčních komponent a parametry termocyklování. I malé změny jedné z těchto složek mohou vyústit ve velké změny v amplifikační účinnosti.

### 7.1. Design primerů, sond a ampikonů

Primery jsou syntetické sekvence ssDNA dlouhé asi 15-25 nukleotidů. Při jejich designu je nutné zajistit účinnou hybridizaci s templátem a zabránit nespecifické hybridizaci nebo vzniku primer-dimerů. Primery musí být perfektně komplementární s cílovou DNA, zejména na 3' konci, kde by se také nemělo vyskytovat více než dvě G+C v 5 posledních

nukleotidech. Neměly by obsahovat navzájem komplementární sekvence, nebo palindromické sekvence, které by mohly zapříčinit vznik vlásečkových struktur nebo primer-dimerů. Obsah G+C bází by se měl pohybovat okolo 50 %.  $T_m$  primerů by měla být v rozpětí 68-70 °C při použití TaqMan sond a 60-72 °C při použití „molecular beacons“ a FRET sond. Platí, že  $T_m$  každého člena z páru primerů by měla být podobná (neliší se více než o 1-2 °C). Dnes je dostupno mnoho počítačových programů pro designování primerů i sond. Programy jsou schopny identifikovat oligonukleotidové sekvence s vhodnou  $T_m$ , bez 3'-terminálních komplementárních sekvencí a palindromů (Arya *et al.* 2005).

Design FRET sond je poměrně jednoduchý a vyžaduje pouze dodržení specifického rozpětí  $T_m$ . SONDY by měly hybridizovat přilehle vedle sebe na řetězci produktu tak, aby došlo k přiblížení fluoroforového páru umožňujícímu FRET. Prostor mezi sondami je optimálně 1-5 bází. Teplota tání sond by měla být o 5-10 °C vyšší než  $T_m$  primerů. Obykle jsou 23-35 bází dlouhé s obsahem G+C v rozsahu 38-60 %. Je nutné se vyvarovat sekvencím, které by mohly způsobit vznik sekundárních struktur. Pro kvantifikaci by  $T_m$  obou sond měla být přibližně stejná (rozdíl nejvýše 2 °C) (Caplin *et al.* 1999).

Naproti tomu design a optimalizace TaqMan sond, „molecular beacons“, a značených primerů vyžaduje dodržovat příslušná doporučení, používat speciální software a bývá poměrně pracná a časově náročná (Arya *et al.* 2005). Pro účinnou hydrolýzu TaqMan sond je nutné, aby sonda byla kompletně zhybridizovaná s cílovou sekvencí ve chvíli, kdy k ní dorazí DNA polymeráza. SONDY by měly mít proto  $T_m$  o 8-10 °C vyšší, než je  $T_m$  primerů a PCR se obvykle provádí s elongační teplotou nižší než  $T_m$  sondy (okolo 60 °C). „Reporter“ a „quencher“ by měly být vzdáleny více než 6 nukleotidů (limit pro hydrolýzu DNA polymerázou). Na svém 3' konci by sondy neměly obsahovat guaninový nukleotid kvůli jeho zhášecímu efektu.  $\Delta R_n$  klesá se zvyšující se vzdáleností sondy od primeru nebo zvětšující se délkou amplikonu, popř. se snižující se koncentrací sondy (Lunge *et al.* 2002). Sonda značená na 3' konci poskytuje intenzivnější signál, než interně značená sonda, díky pravděpodobnosti štěpení DNA polymerázou u vzdálenějších fluoroforů (Livak *et al.* 1995). „Molecular beacons“ potřebují pečlivě optimalizovat design jako FRET sondy. Je nutné zajistit, aby hybrid sondy s templátem byl stabilnější než její intaktní vlásečková struktura a zároveň, aby v nepřítomnosti templátu nedocházelo k „rozvázání“ vlásečky a oddělení fluoroforů. (Tyagi *et al.* 1996)

Délka amplikonu by měla být tak malá, jak je to jen možné, obvykle 50-150 bp při užití s fluorescenčními sondami a do 300 bp při použití SYBR Green I. Kratší amplikony jsou

amplifikovány s větší účinností a jsou více tolerantní k reakčním podmínkám (nepodléhají tolik denaturaci) (Arya *et al.* 2005). Sekvence amplikonů by neměly obsahovat palindromy, neměly by být schopny navzájem hybridizovat mezi sebou a neměly by obsahovat mnoho guaninových nukleotidů (mohly by vznikat guaninové tetraplexní struktury) (Kubista *et al.* 2006).

### 7.1.1. Výběr amplifikované sekvence

Výběr genomového regionu pro amplifikaci od počátku determinuje specifitu detekce. Měl by být vybrán genomový DNA segment charakteristický pro určitý bakteriální druh nebo skupinu druhů, které chceme detekovat, a s co nejnižším stupněm homologie s ostatními druhy. Výběr je proto omezen na dobře osekvenované části bakteriálního genomu (Sachse 2003).

Nejpoužívanějším cílovým regionem jsou ribosomální RNA geny. Tento region reprezentuje všestranný mix od vysoce konzervovaných k vysoce variabilním sekvencím. Nejpoužívanější je gen pro 16S RNA, méně pak gen pro 23S RNA a 16S-23S intergenový „spacer region“ (Sachse 2003).

Výhodou proteinových genů je skutečnost, že jsou často specifické pro určitý druh. Nejlépe osekvenované a tudíž nejpoužívanější jsou toxinové geny. Dále se používají geny pro antigeny vnější membrány, transportery, buněčné enzymy, invasní faktory, různé virulentní faktory. Méně specifickou detekci poskytují geny pro „housekeeping proteis“ (Ef Tu, „DNA repair“ enzymy) (Sachse 2003).

Genom některých bakterií vlastní repetitivní sekvence či IS elementy, které jsou přítomné ve více kopiích. Poskytují proto dobrou možnost pro vyvinutí vysoce citlivých detekčních metod (Sachse 2003).

## 7.2. Složky reakční směsi

### 7.2.1. Termostabilní DNA polymeráza

První termostabilní DNA polymerázou používanou pro PCR byla *Taq* polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.* 1988). *Taq* a její deriváty (Ampli*Taq* Gold a Platinum *Taq* upravené pro hot-start PCR technologii) jsou dnes nejrozsáhleji používanými polymerázami díky vysoké procesivitě, přesnosti a optimálnímu teplotnímu rozmezí. Dalšími běžně užívanými polymerázami jsou *rTth* a *Tth* (*Thermus thermophilus*) a DyNzyme (*Thermus brockianus*) (Lübeck *et al.* 2003). *Taq* polymeráza je však inhibována

mnoha látkami přítomnými v komplexních biologických vzorcích, jako jsou proteinázy, denaturační činidla, detergenty a látky blokující aktivní místo. PCR je např. úplně blokována v přítomnosti 0,004 % krve (Wilson 1997).

Bylo prokázáno, že různé termostabilní DNA polymerázy projevují různé schopnosti resistance k inhibičním komponentám v biologických vzorcích. Polymerázy *HotTub* (*Thermus ubiquitatus*), *Pwo* (*Pyrococcus woesei*), *rTth* (*Thermus thermophilus*) a *Tfl* (*Thermus flavus*) jsou schopny amplifikace v přítomnosti 20 % krve. Polymeráza *Ultma* (*Thermotoga maritima*) je odolná proti některým inhibitorům přítomným v potravinách. Polymerázy *Ultma*, *Pwo* a *Tth* (*Thermus thermophilus*) jsou poměrně odolné k inhibitorům přítomným ve stolici (Al-soud *et al.* 1998). *Tth* polymeráza je schopná amplifikovat v přítomnosti 5 % fenolu a není tolik náchylná k nespecifické amplifikaci „background“ DNA jako *Taq* polymeráza (Lübeck *et al.* 2003).

Použití vhodné polymerázy může výrazně zvýšit výtěžky PCR a ulehčit přípravu vzorků (Lübeck *et al.* 2003). Je také možné použít směs dvou nebo více enzymů (Al-soud *et al.* 1998).

### 7.2.2. Další základní složky reakční směsi

Nepostradatelné reakční složky real-time PCR kromě templátové DNA a termostabilní DNA polymerázy představují primery, dsDNA vázající fluorofory nebo fluorescenčně značené sondy, dNTP molekuly a reakční pufr obsahující Tris-HCl (pH 7,3-8,9), KCl a MgCl<sub>2</sub> (Saiki 1988, Lübeck *et al.* 2003).

Mg<sup>2+</sup> ionty jsou kofaktorem DNA polymerázy a jsou klíčové pro úspěšnou polymeraci. Modifikací jejich koncentrace můžeme regulovat účinnost a výtěžek PCR. Nedostatek Mg<sup>2+</sup> redukuje výtěžky amplifikace, přebytek Mg<sup>2+</sup> naopak výtěžky zvyšuje může vyústit v amplifikaci nespecifických produktů. Mg<sup>2+</sup> ionty se vážou na volné dNTP molekuly a primery. Jejich optimální koncentrace musí být proto vypočítána samostatně pro každý real-time PCR protokol. Přebytek dNTP jednotek zvyšuje chyby DNA polymerázy (Lübeck *et al.* 2003).

### 7.2.3. Látky usnadňující amplifikaci NK

Kromě výše zmíněných reakčních komponent bylo nalezeno mnoho látek usnadňujících amplifikaci v různých podmínkách. Působí čtyřmi hlavními mechanismy: ovlivňují tepelnou stabilitu primerů a templátu (DMSO, formamid, glycerol), ovlivňují přesnost a procesivitu DNA polymerázy (BSA, PEG, neiontové detergenty Tween 20

a Triton X, glycerol, betain), zmírňující inhibiční účinky různých látek (BSA, PEG) (Sachse 2003). BSA se používá např. k ošetření polypropylenových mikrozkušavek a LightCycler kapilár (Wilson 1997).

### 7.3. Optimalizace termocyklování

#### 7.3.1. Teplotní schéma PCR reakce

V denaturační fázi cyklu by mělo dojít k účinné separaci řetězců a templátu, protože částečně denaturované struktury mají tendenci znovu hybridizovat. Vhodná denaturační teplota a trvání denaturační fáze závisí na délce a někdy sekvenci templátu, stejně tak jako na technologii použitého přístroje. Obvyklá denaturační teplota je 95 °C a při použití technik rychlého teplotního přenosu stačí několik vteřin. Během prvních cyklů by denaturační fáze měly trvat déle, protože originální templátová DNA ze vzorku je často mnohem delší než amplifikovaná DNA a má proto vyšší  $T_m$  (Kubista *et al.* 2006).

Hybridizační teplota závisí na designu primerů. Obvykle by měla být o několik °C nižší než  $T_m$  primerů, aby se primery specificky vázaly na určená místa (Kubista *et al.* 2006). „Touch-down“ PCR je metoda řešící problém nespecifické hybridizace primerů v časných fázích reakce, kdy jsou v nadbytku. Na začátku PCR je použita vyšší hybridizační teplota, která zajistí vyšší specifitu hybridizace primerů, pak je ale postupně snižována na správnou hodnotu, aby se zajistila účinná amplifikace (Hecker *et al.* 1996).

Obvyklá elongační teplota je 72 °C, což je teplotní optimum pro termostabilní DNA polymerázu (Kubista *et al.* 2006). Např. při použití TaqMan sond se však používají teploty nižší (asi 60 °C), jelikož po štěpení DNA polymerázou je nezbytné, aby sonda byla perfektně zhybridizovaná s templátem (Holland *et al.* 1991).

#### 7.3.2. „Hot-start“ PCR

Taq DNA polymeráza má slabou polymerační aktivitu i při pokojové teplotě, a může proto docházet ke vzniku nespecifických produktů ještě před zahájením PCR (Chou *et al.* 1992). Dnes se proto často používají tzv. „hot-start“ DNA polymerázy, které jsou při běžných teplotách inaktivní a jsou aktivovány až prvním cyklem PCR. Inaktivace je zajištěna buď protilátkami (Kellog *et al.* 1994) nebo rekombinantní polymerázou, která se aktivuje po vystavení vysoké teplotě (Birch *et al.* 1996).



## 7.4. „Carry-over“ kontaminace

PCR poskytuje veliké množství produktu, který může fungovat jako templát při další amplifikaci. Vzhledem k vysoké citlivosti PCR stačí kontaminace stopovými množstvími produktů z minulé PCR k falešným pozitivním výsledkům. Taková kontaminace se nazývá „carry-over“ kontaminace a je hlavním problémem použití real-time PCR v klinických diagnostických laboratořích (Aslanzadeh 2004). Může být kontrolována např. tak, že místo dTTP používáme dUTP nebo dáme dUTP do primerů. Každý vzorek pak před použitím ošetříme uracil DNA glykosylázou, která degraduje DNA produkty z předchozích amplifikací obsahující uracil (Longo *et al.* 1990).

## 8. Technické vybavení pro real-time PCR

Real-time PCR je složitá metoda, která může být prováděna pouze s použitím sofistikovaného vybavení. Od zavedení real-time PCR bylo na trh uvedeno mnoho přístrojů, tzv. „cyclers“, které se navzájem liší svými parametry, jako principem teplotní kontroly vzorků, kapacitou vzorků na jeden pracovní cyklus, podporovanými detekčními formáty, excitačními a detekčními vlnovými délkami a softwarem pro kvantifikaci. V následujících řádcích uvádím stručné srovnání nejpoužívanějších „cyclers“ jednotlivých firem a pro představu podrobnější rozbor funkce často používaného LightCycler systému firmy Roche Molecular Biochemicals.

### 8.1. Srovnání nejpoužívanějších komerčně dostupných „cyclers“

Každý real-time PCR přístroj se skládá ze dvou základních komponent – systému zajišťujícího teplotní cyklování a optické jednotky umožňující excitaci fluoroforů v reakční směsi a detekci jimi zpětně emitovaného fluorescenčního záření.

Pro kontrolu teplotního cyklování v reakčních nádobkách jsou běžně používány tři hlavní koncepty - tepelné bloky, cirkulace horkého vzduchu a nezávislá elektronická teplotní kontrola pro každou individuální reakční nádobku. Přístroje používající tepelné bloky (např. ABI Prism série, iCycler iQ) (<http://www.appliedbiosystem.com>, <http://www.bio-rad.com>) jsou odvozeny od tradičního vybavení pro konvenční PCR, ale mají navíc optickou jednotku pro měření fluorescenčního signálu. Jejich výhodou je vysoká kapacita vzorků (zpravidla 96) a použití levných standardních polypropylenových mikrozkušavek jako reakčních nádobek. Nevýhodou je pomalejší teplotní cyklování (provedení jedné PCR zabere asi 2 hod) a tendence k nedokonalé distribuci teplot mezi jednotlivými vzorky, což může výrazně ohrozit

přesnost kvantifikace vyžadující identické amplifikační účinnosti. Druhou generací přístrojů, které řeší tento problém nerovnoměrného rozložení teplot, jsou real-time PCR „cyclery“ s cirkulujícím horkým vzduchem (LightCycler) (<http://www.roche-applied-science.com>), nebo nezávislou individuální elektronickou teplotní kontrolou každé reakční nádobky (SmartCycler) (<http://www.cepheid.com>). Mají výhodu malých reakčních objemů a rychlého přenosu tepla a vyrovnaného rozložení teplot. Výsledkem je zvýšená citlivost real-time PCR a rychlé teplotní cyklování (provedení jedné PCR zabere asi 40 min), které těmto systémům daly název rychlé PCR („rapid-cycle PCR“). Jejich nevýhodou je nutnost používat speciální reakční nádobky umožňující rychlý teplotní přenos (výjimkou je RotorGene, který je kompatibilní se standardními mikrokumavkami) (<http://www.corbette-research.com>) a jejich malá kapacita.

Optické jednotky jednotlivých přístrojů se dále liší rozsahem svých excitačních a detekčních vlnových délek, což významně ovlivňuje rozsah podporovaných detekčních systémů. Všechny „cyclery“ jsou kompatibilní s užitím většiny interkalačních barviv a fluoroforů používaných pro TaqMan sondy a „molecular beacons“. Pouze některé přístroje však podporují FRET sondy, které používají odlišné fluorofory a jejich použití obvykle vyžaduje analýzu křivky tání po ukončení PCR (LightCycler). Většina přístrojů je schopna měřit více emisních vlnových délek najednou a dovoluje tak multiplexní PCR.

Dále je třeba poznamenat, že „cyclery“ se používají ve spojení s personálním počítačem a speciálním softwarem, který umožňuje obsluhu přístroje a analýzu dat. Jednotlivé softwarové formáty se liší užitými algoritmy pro kvantifikaci, nicméně všechny umožňují přímou determinaci  $C_t$  hodnot a konversi těchto hodnot do počtu počátečních templátových kopií bez nutnosti exportu dat.

Při provádění real-time PCR může mnoho času zabrat také příprava vzorků. Několik výrobců proto vyvinulo automatizované systémy pro extrakci nukleových kyselin určené k použití v tandemu s real-time PCR „cyclery“. Zahrnují např. MagNA Pure LC a MagNA Pure Compact pro použití s LightCycler systémem (<http://www.roche-applied-science.com>), GeneExpert pro použití se SmartCycler II systémem (<http://www.cepheid.com>) a ABI Prism 6700 pro použití s ABI Prism sérií (<http://www.appliedbiosystems.com>).

Při volbě real-time PCR přístroje je velice důležité pečlivě zvážit požadavky pro prováděnou real-time PCR analýzu a výhody a nevýhody každého „cycleru“. Je nutné zvážit nároky na přesnost a citlivost kvantifikace, použití vhodných detekčních formátů, očekávanou kapacitu vzorků, rychlost analýzy a personální požadavky na obsluhu a podle toho vybrat vhodný přístroj podle jeho parametrů. Neméně důležitá je samozřejmě cena přístroje. Stručný

souhrn nejdůležitějších specifikací často používaných „cyclersů“ uvádím v přílohách (Tabulka 2).

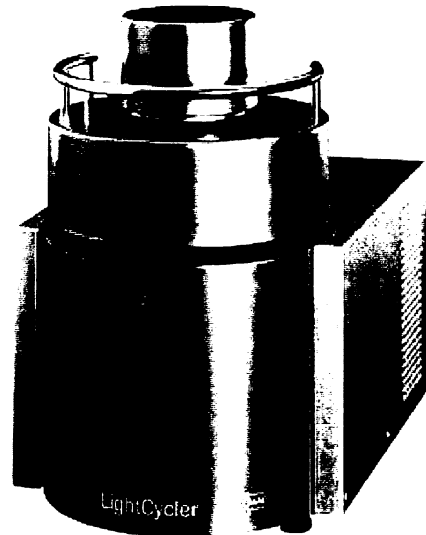
## 8.2. LightCycler systém

LightCycler je rychlý teplotní cycler s vestavěným fotometrem. Slouží k provádění rychlé PCR a jejímu kontinuálnímu monitorování sledováním fluorescence během amplifikace. Dále umožňuje charakterizaci produktu pomocí analýzy křivky tání (<http://www.roche-applied-science.com>).

Ke kontrole reakčních teplot využívá přístroj místo tradičních tepelných bloků vzduch. Ten je do přístroje nasáván z okolního prostředí a ohříván ve vyhřívací spirále. Homogenní distribuci teploty mezi vzorky zajišťuje větrák. PCR je prováděna ve speciálních reakčních nádobkách, kterými jsou mikroobjemové (5 – 20  $\mu$ l) skleněné kapiláry s vysokou hodnotou poměru povrch/objem, který zajišťuje mimořádně rychlý přenos tepla v reakční směsi. V důsledku použití vzduchu jako teplosměnného média a unikátní konstrukce kapilár přístroj dokáže termocyklovat s vysokou rychlostí (<http://www.roche-applied-science.com>).

Vzorky jsou umístěny v tzv. karuselu („carousel“ - kolotoč) s kapacitou 32 vzorků. Karusel se nachází v tepelné komoře a otáčí se s pomocí krokového motoru tak, že se špička jedné kapiláry nachází vždy přesně v ohnisku optiky fotometru. Kapiláry fungují také jako optický element pro sběr fluorescenčního signálu, který je veden a koncentrován do vrcholu kapiláry. Výsledkem je účinná iluminace a fluorescenční detekce i u mikroobjemových vzorků (<http://www.roche-applied-science.com>).

Fotometr přístroje se skládá ze dvou jednotek – excitační a detekční. Excitační jednotku tvoří modrá svítivá dioda (tzv. LED dioda) s emisním maximem 470 nm, která slouží jako energetický zdroj pro excitaci vzorku. Detekční jednotka se skládá ze tří detekčních kanálů, schopných měřit emitované světlo ve třech rozdílných vlnových délkách (530, 640 a 710 nm). Světlo vyzařované LED diodou je soustředěno na špičku kapiláry, v níž excituje fluorescenční barvivo. Fluorescenční záření zpětně emitované vzorkem je pomocí dichroického zrcadla odráženo do detekční jednotky fotometru, kde je nezávisle na vlnové



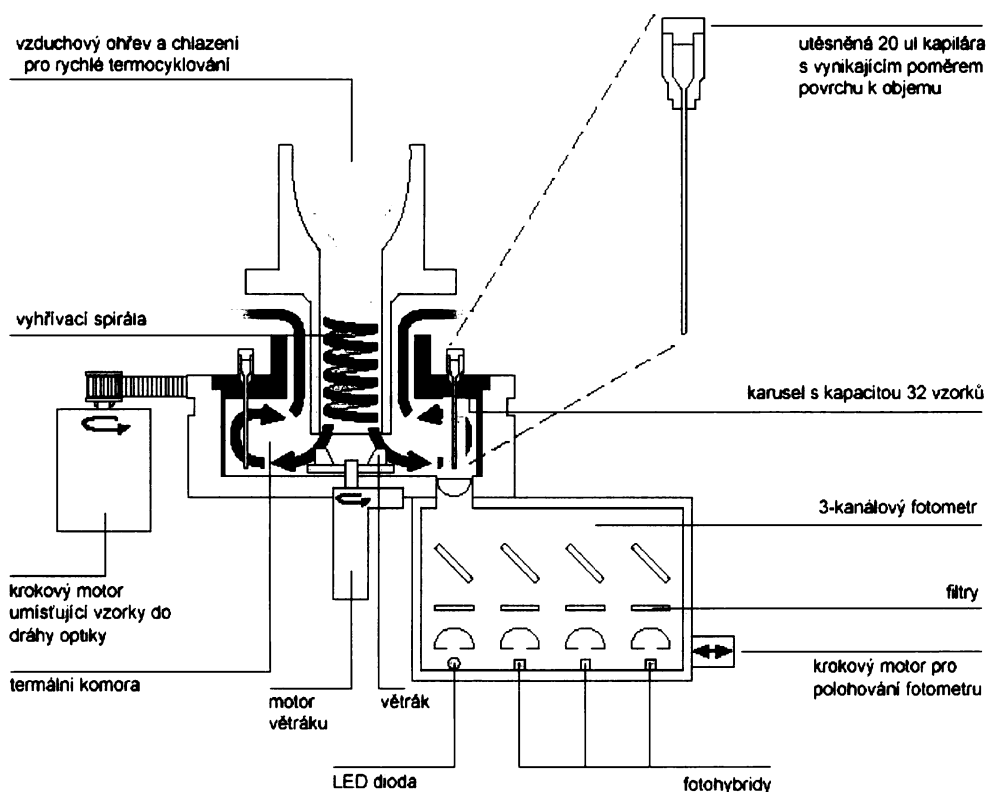
Obr. 10: LightCycler systém (fotografie)  
(<http://www.roche-applied-science.com>)

délce rozdělováno do jednotlivých detekčních kanálů a pomocí čoček soustředěno na fotohybridy (<http://www.roche-applied-science.com>).

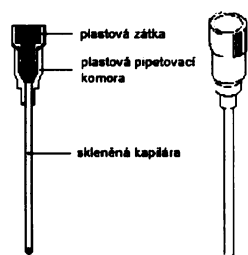
Přístroj měří fluorescenci buď na konci každého cyklu, nebo kontinuálně během analýzy křivky tání. Změření každé jednotlivé kapiláry trvá asi 20 ms a změření všech kapilár asi 5 s, během kterých krokový motor nastavuje jednotlivé vzorky v pozici nad fotometrem (<http://www.roche-applied-science.com>).

LightCycler je dále vybaven velmi přehledným a přátelským softwarem, který ukazuje naměřená fluorescenční data již během amplifikace (<http://www.roche-applied-science.com>).

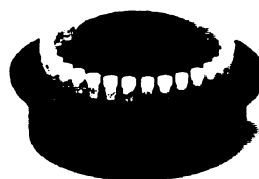
Velmi účinný systém teplotního cyklování ve spojení s použitím speciálních reakčních nádob dělá LightCycler jedním z nejrychlejších cyclerů na světě. Provedení 30-40 cyklů zabere asi 30 minut a následná analýza křivky tání několik dalších minut (<http://www.roche-applied-science.com>).



Obr. 11: Schematické znázornění LightCycler systému (<http://www.roche-applied-science.com>).



Obr. 12: Reakční nádobka (<http://www.roche-applied-science.com>)



Obr. 13: Karusel na vzorky (<http://www.roche-applied-science.com>)

## 9. Vlastní experimentální práce

Má vlastní experimentální práce je zaměřena na optimalizaci real-time PCR detekční metody pro bakterii *Bacillus subtilis*. Svou práci vypracovávám v laboratořích Centra biologické ochrany AČR v Těchoníně na Orlickoústecku a je součástí projektu obranného výzkumu s názvem „Dálková detekce mikroorganismů“ financovaného Ministerstvem obrany ČR. I přes to, že má bakalářská práce měla být zpočátku pouze teoretická, rozhodla jsem se pro její ucelenost uvést některé již dosažené výsledky.

*Bacillus subtilis* je gram pozitivní bakterie běžně žijící v půdě. Jako člen rodu *Bacillus* má schopnost tvořit tuhé ochranné endospory dovolující tolerovat extrémní podmínky prostředí. Mikroorganismus byl klasifikován jako obligátní anaerob a není považován za lidského patogena. *B. subtilis* se prokázal být velmi vhodným organismem pro genetické manipulace a proto se stal široce uznávaným modelovým organismem pro laboratorní studie. Je často používán jako gram pozitivní ekvivalent *Escherichia coli*. Druh *Bacillus subtilis* byl pro mou experimentální práci vybrán pro svou podobnost ze známým patogenem *Bacillus anthracis*, agens s vysokým potenciálem zneužití v bioterorismu. (<http://en.wikipedia.org>)

### 9.1. Experimentální protokol

**Kultivace:** Bakteriální kmen *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (dodavatel: Česká sbírka mikroorganismů, PřF MU Brno) byl kultivován na agarovém mediu B10 (pepton 5g, hovězí extrakt 3g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,005g, agar 20g, destilovaná voda 1000ml, pH 7,0) při 30 °C po dobu 12-18 hod. po masivním naočkování.

**Příprava templátové DNA pro real-time PCR:** Narostlá bakteriální kultura byla resuspendována v PBS tak, aby  $\text{O. D.} = 1.5$  (odpovídá  $10^8$  CFU/ml). Vzniklá bakteriální suspence byla podle potřeby naředěna. DNA byla uvolněna z buněk opakovaným povařením (dvakrát 5 min při 95 °C, mezitím vychlazeno 10 min při pokojové teplotě). Takto upravená suspence byla přímo použita do reakční směsi pro real-time PCR.

**Kontrolní vzorky:** Do každé amplifikované série byly přidány pozitivní a negativní kontrolní vzorky. Templátová DNA používaná jako pozitivní kontrola byla vyisolována s použitím SIGMA GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (v kombinaci s lysosyem) podle postupu doporučeného výrobcem. Jako negativní kontroly sloužily vzorky bez templátu (místo templátu byla použita deionizovaná voda).

**Design primerů:** Bylo použito 6 párů primerů amplifikujících sekvence genů *rac1*, *trpA* a *amy*. Primery byly designovány s použitím počítačového programu The LightCycler

primer & probe design. Sekvenční homologie amplifikovaných sekvencí s ostatními mikroorganismy byla vyloučena pomocí programu BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Hotové oligonukleotidy byly dodány firmou GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové. Sekvence použitých primerů jsou shrnuty v Tabulce 1.

**Tabulka 1: Sekvence použitých primerů**

gen	označení amplifikovaného regionu	označení primeru	sekvence
<i>rac</i>	rac1	BSrac1S	5´ - CAG TTG TGA AAG CAA ACG -3´
		BSrac1AS	5´ - CGC CAA GCA CCA ATA TAG -3´
	rac2	BSrac2S	5´ - GAG TAT GAC GTG ACC TTA AC -3´
		BSrac2AS	5´ - TCT GAA CTT CTT CCT CTG T -3´
<i>trpA</i>	trpA1	BStrpA1S	5´ - CCG TGA ACA GGT CAT AAA G -3´
		BStrpA1AS	5´ - GCC ATT GCA TAA TCC TCA AA -3´
	trpA2	BStrpA2S	5´ - CAG GAG TTT GAG GAT TAT GC -3´
		BStrpA2AS	5´ - ACA ACT TTA TTC AAG CCA TAT T -3´
<i>amy</i>	amy1	BSamy1S	5´ - GGT TTG TCA GAG CTG TTT ATT -3´
		BSamy1AS	5´ - GTT GCA CAT CAC GGA AGT A -3´
	amy2	BSamy2S	5´ - ACA GTT TTA CCG CTT CAC -3´
		BSamy2AS	5´ - TTG GGT ACA TGC CAT ATA AAG T -3´

**PCR amplifikace:** PCR amplifikace byla prováděna na přístroji LightCycler 1.5 firmy Roche Molecular Biochemicals. K detekci průběhu amplifikace bylo použito interkalační barvivo SYBR Green I a amplifikace byla prováděna „hot-start“ metodou.

**Reakční směs:** K přípravě reakční směsi byly použity reagenty firmy Roche: LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit (obsahující FastStart Taq DNA polymerázu, reakční pufr, mix dNTP jednotek s použitím dUTP místo dTTP, barvivo SYBR Green I a MgCl<sub>2</sub>) dle postupu doporučeného výrobcem. Do každé kapiláry bylo napipetováno: po 1 µl od každého primeru, 1 µl připraveného vzorku obsahujícího templátovou DNA, 4 µl směsi FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I a 13 µl deionizované vody (celkový objem = 20 µl).

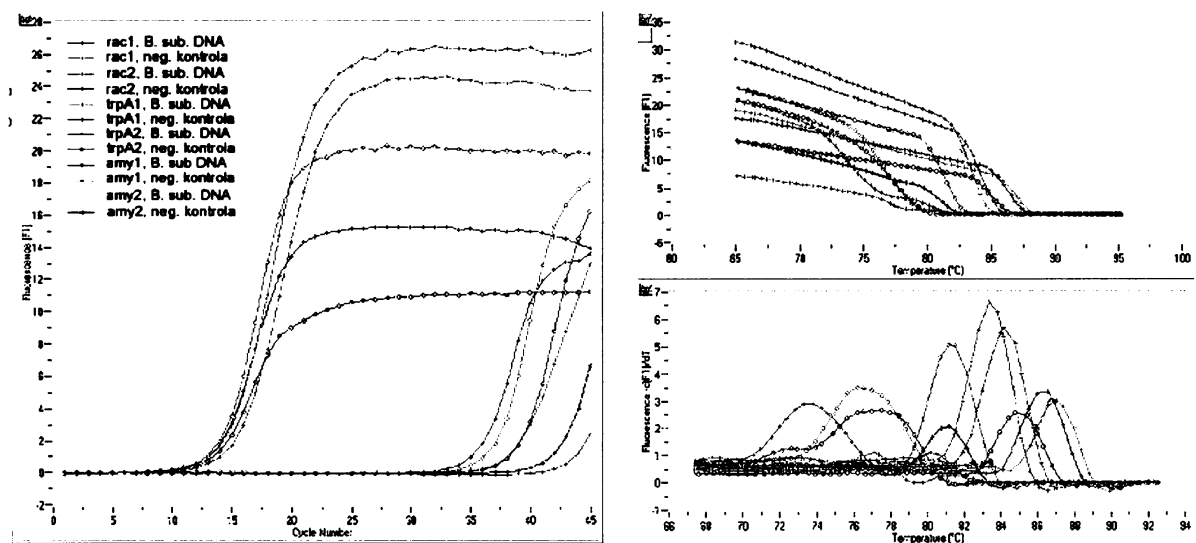
**Teplotní cyklování:** Po denuraci trvající 10 min při 95 °C bylo provedeno 45 cyklů s denurační fází trvající 10 s při 95 °C, hybridizační fází trvající 10 s při 51 °C a elongační fází trvající 15 s při 72 °.

**Analýza křivky tání:** Po ukončení amplifikace byla provedena analýza křivky tání. Reakční směs byla ochlazena na 65 °C a postupně vytemperována na 95 °C s rychlostí teplotní změny 0,15 °C/s.

## 9.2. Výsledky

**Test specifity jednotlivých párů primerů (Obr. 14):** Všech 6 párů primerů bylo použito simultánně v jednom pracovním cyklu real-time PCR. Každý pár primerů amplifikoval 2 typy templátu: vyisolovanou kontrolní DNA *B. subtilis* subsp. *subtilis* a negativní kontrolní vzorek neobsahující žádnou templátovou DNA.

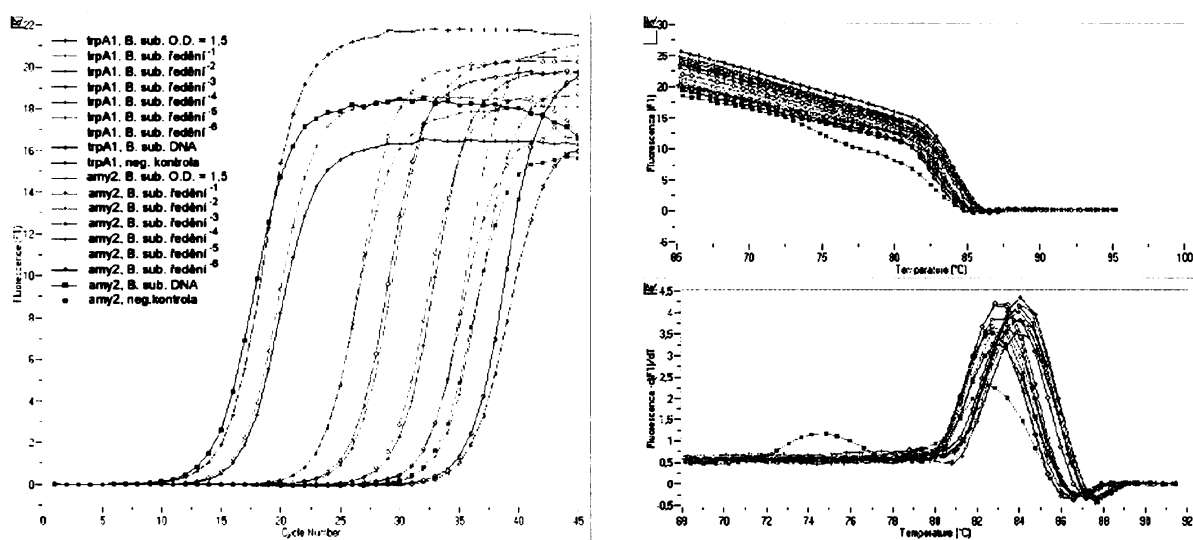
Z Obr. 14 je zřejmé, že všechny páry primerů byly schopny amplifikovat cílový region s podobnou reakční účinností. Pro další experimenty byly vybrány primery ohraničující regiony *trpA1* a *amy2* vzhledem k jejich nejnižší schopnosti amplifikovat nespecifické produkty (lze tak usuzovat z tvaru amplifikačních křivek a křivek tání negativních kontrolních vzorků, viz Obr. 14).



Obr. 14: Test specifity jednotlivých párů primerů. Vlevo: amplifikační křivky. Vpravo: analýza křivky tání. Amplifikační křivky negativních kontrol cílových regionů *trpA1* a *amy2* dosáhly nejpozději exponenciální fáze. Rovněž druhé derivace křivek tání produktů amplifikace těchto regionů neobsahují výrazná lokální maxima. Z toho lze usuzovat na nízkou míru amplifikace nespecifických produktů.

**Test citlivosti detekce v závislosti na startovní koncentraci templátové DNA (Obr. 15):** Dále byla provedena simultánní amplifikace diluční série templátové DNA. Suspense *B. subtilis* (O. D. = 1,5) byla 6-krát zředěna a jednotlivá ředění byla po úpravě použita jako templát pro amplifikaci pomocí primerů specifických pro regiony *trpA1* a *amy2*. Každý z obou párů primerů byl dále použit pro amplifikaci kontrolní vyisolované DNA *B. subtilis* (pozitivní kontrola) a vzorku bez templátu (negativní kontrola).

Optická densita 1,5 odpovídá přibližně koncentraci  $10^8$  bakteriálních buněk/ml (předem okalibrováno měřením O. D. a současným výsevem CFU). V 1  $\mu$ l nezředěné suspenze (množství pipetované do reakční směsi) je tedy obsaženo přibližně  $10^5$  bakteriálních buněk. Z Obr. 15 je zřejmé, že metoda byla schopna zjistit rozdíly startovních templátových koncentrací do 4. ředění, čili přibližně do startovního počtu kopií templátové DNA  $10^1$ .



Obr. 15: Test citlivosti detekce v závislosti na startovní koncentraci templátové DNA. Vlevo: amplifikační křivky. Vpravo: analýza křivky tání. Při zředění  $10^{-5}$  a větším ( $\leq 10^0$  buněk) dochází k amplifikaci nespecifických produktů a nelze detekovat rozdíly ve startovních templátových koncentracích mezi vzorky.

Metoda je tedy prozatím schopna kvantifikovat počet bakteriálních buněk přítomných ve vzorku s citlivostí  $10^1$  buněk, což lze považovat za poměrně nízký detekční limit při použití výše uvedeného experimentálního protokolu.



## 10. Závěr a směřování další práce

V předchozích kapitolách jsem nastínila problematiku detekce a kvantifikace bakteriálních mikroorganismů pomocí metody kvantitativní real-time PCR. Nesporný význam použití real-time PCR v mikrobiální diagnostice spočívá ve vysoké citlivosti, přesnosti a rychlosti detekce ve srovnání s klasickými kultivačními metodami a dalších výhodách jako je jednoduchost provedení, možnost automatizace a nižší riziko kontaminace. Pro dosažení spolehlivých a interpretovatelných výsledků je však třeba věnovat zvýšenou pozornost pečlivé optimalizaci metody a ověření spolehlivosti získaných dat. Každý krok real-time PCR experimentu musí být propracován a kontrolován, od přípravy vzorků po volbu vhodného detekčního systému, matematické kvantifikační metody, složení reakční směsi, parametrů termocyklování či vhodného real-time PCR přístroje.

Má vlastní experimentální práce zaměřená na optimalizaci real-time PCR detekční metody pro gram pozitivní bakterii *Bacillus subtilis* by se měla nadále věnovat vylepšení citlivosti této metody a pečlivému ověření korektnosti získaných výsledků. Dále bych se v rámci této experimentální činnosti také ráda zaměřila na možnosti použití sekvenčně specifických oligonukleotidových sond pro detekci *Bacillus subtilis* metodou kvantitativní real-time PCR.

## 11. Přílohy

Tabulka 2: Specifikace nejpoužívanějších komerčně dostupných „cyclérů“

Výrobce	Název přístroje	Princip teplotní kontroly	Kapacita vzorků	Podporované typy sond	Excitace (nm)	Detekce emise (nm)	Poznámka
Roche Applied Science ( <a href="http://www.roche-applied-science.com">http://www.roche-applied-science.com</a> )	LightCycler 1.0	horký vzduch	32	FRET sondy „molecular beacons“ TaqMan sondy	LED 470	530, 640, 710	speciální kyvety na vzorky, analýza křivky tání
	LightCycler 2.0	horký vzduch	32	FRET sondy „molecular beacons“ TaqMan sondy	LED 470	530, 555, 610, 640, 670, 710	speciální kyvety na vzorky, analýza křivky tání
Cepheid ( <a href="http://www.cephheid.com">http://www.cephheid.com</a> )	SmartCycler	individuální elektronická teplotní kontrola	16	„molecular beacons“ TaqMan sondy	LED 450-495 LED 500-550 LED 565-590 LED 630-650	510-527 565-590 606-650 670-750	nezávislé moduly pro každý vzorek pro měření fluorescence i teplotní kontrolu
Corbett Research ( <a href="http://www.corbetresearch.com">http://www.corbetresearch.com</a> )	Rotor-Gene	horký vzduch	72	„molecular beacons“ TaqMan sondy	LED 470 LED 530 LED 585 LED 635	510, 550, 580, 610, 660	standardní polypropylenové mikroskopumavky
ABI ( <a href="http://www.appliedbiosystems.com">http://www.appliedbiosystems.com</a> )	Prism 7700	tepelný blok	96	„molecular beacons“ TaqMan sondy	halogen 400-700	4 barvy 400-700	
BioRad ( <a href="http://www.biorad.com">http://www.biorad.com</a> )	iCycler iQ	tepelný blok	96	„molecular beacons“ TaqMan sondy FRET sondy	halogen 400-700	4 barvy 400-700	

**Tabulka 3: Nejpoužívanější fluorofory a jejich spektrální vlastnosti****(<http://www.proligo.com>):**

<b>1) Zhášedče</b>		
<i>Fluorofor</i>	<i>absorpční maximum (nm)</i>	<i>emisní maximum (nm)</i>
BHQ-1 Dark Quencher	535	nefluoreskuje
BHQ-2 Dark Quencher	579	nefluoreskuje
DABCYL Dark Quencher	453	nefluoreskuje
DABCYL-dT Dark Quencher	453	nefluoreskuje
TAMRA	550	576
<b>1) Fluoreskující fluorofory</b>		
<i>Fluorofor</i>	<i>absorpční maximum (nm)</i>	<i>emisní maximum (nm)</i>
6-FAM	495	517
Cy3	550	570
Cy5	650	667
Cy5.5	675	694
Fluorescein	495	520
HEX	537	553
JOE	520	548
LightCycler Red 610	590	610
LightCycler Red 640	625	640
LightCycler Red 670	650	670
LightCycler Red 705	680	705
Oregon Green 488	495	521
Oregon Green 500	499	519
Oregon Green 514	506	526
Rhodamine	564	603
Rhodamine 6G	524	557
Rhodamine Green	504	532
Rhodamine Red	570	590
ROX	581	607
TAMRA	550	576
TET	521	538
Texas Red	589	610

## 12. Seznam použité literatury

Al-Robayi S., Rupf S., Eschrich K., 2001, Rapid Competitive PCR Using Melting Curve Analysis for DNA Quantification, *Biotechniques*, 31, 1382-1386

Al-Soud W.A., Rådström P., 1998, Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3748-3753

Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R., 2005, Basic principles of real-time quantitative PCR, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5, 209-19

Aslanzadeh J., 2004, Prevention of PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 34, 389-96

Bengtsson M., Karlsson H.J., Westman G., Kubista M., 2003, A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR, *Nucleic Acids Research*, 31:e45

Birch D.E., Kolmodin J., Wong J., 1996, The use of thermally activated DNA polymerase PCR gives improved specificity, sensitivity and product yield without additives or extra process steps, *Nature*, 381, 445-446

Braasch D.A., Corey D.R., 2001, Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA; *Chemistry & biology*, 8, 1-7

Caplin B.E., Rasmussen R.P., Bernadr P.S., Wittwer C.T., 1999, The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection, *Biochemica*, 1, 5-8

Cardullo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C., Wolf D.E., 1988, Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 8790-8794

Chou Q., Russel M., Birch D.E., Raymond J., Bloch W., 1992, Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications, *Nucleic Acids Research*, 20, 1717-23

Cosa G., Focsaneanu K.S., McLean J.R.N., McNamee J.P., Scaiano J.C., 2001, Photophysical Properties of Fluorescent DNA-dyes Bound to Single- and Double-stranded DNA in Aqueous Buffered Solution, *Photochemistry and Photobiology*, 73, 585-589

Costa J.M., Ernault P., Olivi M., Gaillon T., Arar K., 2004, Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR, 37, 930-2

Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E., 1993, PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, *Nature*, 365: 566-8

Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblat J.E., Cockerill F.R., Smith T.F., 2006, Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing, *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 165-256

Garcia de Viedma D., del Sol Diaz Infantes M., Lasala F., Chaves F., Alcalá L., Bouza E., 2002, New real-time PCR able to detect a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 988-95

Gibson U.E.M., Heid C.A., Williams P.M., 1996, A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR, *Genome Research*, 6, 995-1001

Hecker K.H., Roux K.H., 1996, High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR, *Biotechniques*, 20, 478-85

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., 1996, Real-time Quantitative PCR, *Genome Research*, 6, 986-994

Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R., 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology*, 10, 413-417

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R., 1993, Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology*, 11, 1026-1030

Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H., 1991, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7276-7280

Hoorfar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M., Fach P., 2004, Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays; *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1863-1868

Kainz P., 2000, The PCR plateau phase – towards an understanding of its limitations, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494: 23-7

Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S., 1994, Taqstart Antibody<sup>TM</sup>: „Hot-start“ PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase, *Biotechniques*, 16, 1134-1137

Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N., 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspect of Medicine*, 27, 95-125

Lee G.L., Connell C.R., Bloch W., 1993, Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, *Nucleic Acids Research*, 21, 3761-3760

Liu W., Saint D.A., 2002, Validation of quantitative method for real time PCR kinetics, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 347-353

Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K., 1995, Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization, *PCR Methods Application*, 4, 357-62

Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, *Methods*, 25, 402-8

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., Darnell J., 2004, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company

Longo M.C., Berniger M.S., Hartley J.L., 1990, The use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, *Gene*, 93, 125-8

Lübeck P.S., Hoorfar J., 2003, PCR Technology and Applications to Zoonotic Food-Borne Bacterial Pathogens in PCR Detection of Microbial Pathogen, *Humanna Press*, 65-84

Lunge V.R., Miller B.J., Livak K.J., Batt C.A., 2002, Factors affecting the performance of 5'-nuclease assay for *Listeria monocytogenes* detection, *Journal of Microbiological Methods*, 51, 361-368

Mackay I. M., 2004, Real-time PCR in the microbiology laboratory, *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10, 190-212

Marras S.A.E., Kramer F.R., Tyagi S., 2002, Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Research*, 30, e122

Morisson T.B., Janis J., Wittwer W., Wittwer C.T., 1998, Quantification of Low-Copy Transkripts by Continuous SYBR Green I Monitoring during Amplification, *Biotechniques*, 24, 954-962

Mothershed E.A., Whitney A.M., 2006, Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory, *Clinica Chimica Acta*, 363, 206-220

Nakaguchi Y., Ishizuka T., Ohnaka S., Hayashi T., Yasukawa K., Ishiguro T., Nitshibuchi M, 2004, Rapid and Specific Detection of *tdh*, *trh1*, and *trh2* mRNA of *Vibrio parahaemolyticus* by Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction with an Automated System, Journal of Clinical Microbiology, 42, 4284-4292

Nazarenko I.A., Bhatnagar S.K., Hohman R.J., 1997, A closed tube format for amplification and detection based on energy transfer, Nucleic Acids Research, 25, 2516-21

Nygren J., Svanvik N., Kubista M., 1998, The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA, Biopolymers, 46, 39-61

Piatek A.S., Tyagi S., Pol A.C., Telenti A., Miller L.P., Kamer F.R., Alland D., 1998, Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, Nature Biotechnology, 16, 359-63

Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., Dahlenborg M., Löfström C., 2003, Pre-PCR Processing of Samples in PCR Detection of Microbial Pathogens, Humanna Press, 31-50

Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H.L., Moorman A.F.M., 2003, Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, Neuroscience Letters, 339, 62-66

Rasmussen R., Morisson T., Herrmann M., Wittwer C., 1998, Quantitative PCR by Continuous Fluorescence Monitoring of a Double Strand DNA Specific Binding Dye, Biochemica, 2, 8-11

Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T., 1997, Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction, Analytical Biochemistry, 245, 154-160

Rutledge R.G., Côté C., 2003, Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves, Nucleic Acid Research, 31, e93



Rutledge R.G., 2004, Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications, *Nucleic Acid Research*, 32, e178

Sachse K., 2003, Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assays in PCR Detection of Microbial Pathogens, Humanna Press, 3-30

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., 1985, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230, 1350-4

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A., 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239, 487-91

Svanvik N., Westman G., Wang D., Kubista M., 2000, Light-up Probes: Thiazole Orange-Conjugated Peptide Nucleic Acid for Detection of Target Nucleic Acid in Homogeneous Solution, *Analytical Biochemistry*, 281, 26-35

Tseng S.Y., Macool D., Elliot V., Tice G., Jackson R., Barbour M., Amorese D., 1997, An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella*, *Analytical Biochemistry*, 254, 207-12

Tyagi S., Kramer F.R., 1996, Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization, *Nature Biotechnology*, 14, 303-308

Tyagi S., Bratu D.P., Kramer F.R., 1998, Multicolor molecular beacons for allele discrimination, *Nature Biotechnology*, 16, 49-53

Whitcombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T., Little S., 1999, Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence, *Nature Biotechnology*, 17, 804-7

Wilson I.G., 1997, Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741-3751

Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P., 1997, Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification, *Biotechniques*, 22, 130-138

Wittwer C.T., Ririte K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A., Balis U.J., 1997, The LightCycler: A Microvolume Multisample Fluorimeter with Rapid Temperature Control, *Biotechniques*, 22, 176-181

Wittwer C.T., Herrmann M.G., Gundry C.N., Elenitoba-Johnson K.S., 2001, Real-time multiplex PCR assays, *Methods*, 25, 430-42

Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F., 2004, Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications, *Nucleic Acids Research*, 32, e103

## **12.1. Internetové zdroje**

<http://en.wikipedia.org>

<http://www.appliedbiosystems.com>

<http://www.bioexpress.com>

<http://www.bio-rad.com>

<http://www.cepheid.com>

<http://www.corbetresearch.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

<http://www.proligo.com>

<http://www.qiagen.com>

<http://www.roche-applied-science.com>

<http://www.sigma-aldrich.com>

<http://www.whatman.com>

## **Poděkování**

Na závěr bych ráda poděkovala mjr. RNDr. Michalu Kročovi, Ph.D. a Mgr. Lence Navrátilové za pomoc při experimentech a cenné rady a připomínky, které velmi přispěly ke zvýšení celkové úrovně této práce. Velký dík patří také Lence Polidarové za pečlivé pročtení práce a upozornění na případné překlepy či pravopisné chyby.