



PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji

Anna Studzińska¹, Jarosław Tyburski¹, Patrycja Daca²,
Andrzej Tretyn¹

¹Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

²Zakład Medycyny Sądowej, Collegium Medicum w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Real Time PCR. The idea of the method and strategies of reaction monitoring

Summary

Real-time PCR has become one of the most widely used methods of gene quantitation in molecular biology and medical diagnostics. This technique combines PCR amplification and the detection of the PCR product into a single step. In real-time PCR, the amount of product formed is measured during the course of the experiment by monitoring the fluorescence of dyes or probes introduced into the reaction. Fluorescence data are generated by the use of intercalating dyes such as SYBR Green I or molecular probes, the most important of which are: TaqMan, Molecular Beacons, Hybridization Probes, and Scorpion Probes. The real-time PCR reactions are characterized by the PCR cycle in which the target amplification is first detected. This cycle is referred to as a threshold cycle (C_t), at which fluorescence intensity becomes greater than background fluorescence. Consequently, the greater the quantity of target DNA in the starting material, the faster the significant increase in fluorescence intensity will appear, yielding lower C_t . The relation between C_t and the concentration of the target sequence allows for a precise quantitation of the genetic material in the sample.

Key words:

PCR, real-time PCR, molecular probes.

Adres do korespondencji

Jarosław Tyburski,
Zakład Biotechnologii,
Wydział Biologii i Nauk
o Ziemi,
Instytut Biologii Ogólnej
i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja
Kopernika,
ul. Gagarina 9,
87-100 Toruń;
e-mail:
tybr@uni.torun.pl

1. Wprowadzenie

Opracowana w 1983 r. przez Mullisa i wsp. reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*) umożliwia szybką (w ciągu kilku godzin) syntezę miliardów kopii dowolnej sekwencji genomowego DNA. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi matrycowy DNA, trifosforany deoksyrybonukleotydów, startery oraz termostabilna polimeraza DNA. Pierwszy cykl PCR rozpoczyna się od podgrzania wspomnianej mieszaniny do temperatury około 95°C, w której dochodzi do pęknięcia wiązań wodorowych występujących pomiędzy zasadami azotowymi DNA, a w konsekwencji do jego rozdzielenia się na dwa pojedyncze łańcuchy. Po obniżeniu temperatury, do wartości charakterystycznych dla danej pary starterów (mieszczącej się w granicach od 45 do 70°C) zachodzi ich przyłączanie się do matrycy. Po ponownym podwyższeniu temperatury mieszaniny reakcyjnej (do około 72°C) do matrycy z przyłączonymi do niej starterami wiąże się polimeraza DNA, która przeprowadza syntezę nici komplementarnej do matrycy. W celu uzyskania określonej ilości kopii powielanego odcinka DNA opisany cykl PCR powtarza się wielokrotnie (zazwyczaj od 30 do 40 razy).

Podczas przebiegu reakcji PCR można wyróżnić cztery fazy. Podczas **fazy wstępnej** startery odszukują w obrębie matrycy regiony komplementarne. Powielanie produktu jest powolne, co wynika z długiego czasu potrzebnego starterom na skanowanie matrycy DNA w poszukiwaniu komplementarnych sekwencji. Długość tej fazy jest powiązana z wyjściowym stężeniem DNA, który stanowi matrycę. Reakcja tym szybciej wchodzi w kolejną fazę, im więcej kopii powielanej sekwencji obecnych jest w środowisku reakcji. W **fazie wykładniczej** obserwuje się wykładniczy przyrost ilości produktu. W **fazie logarytmicznej** wydajność reakcji zaczyna maleć. W czwartej fazie zwanej **stacjonarną** (lub *plateau*) następuje dalsze spowolnienie jej tempa, aż do całkowitego zahamowania (1-9).

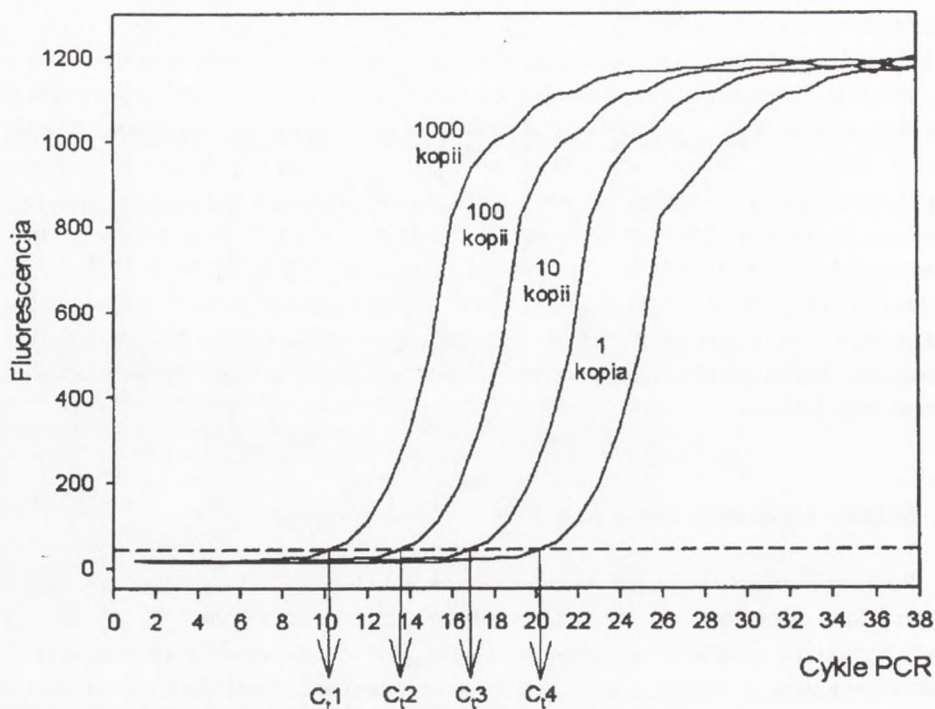
Tradycyjny PCR przewiduje analizę produktów reakcji po jej zakończeniu, a zatem w **fazie plateau**, kiedy nie jest zachowana proporcjonalna zależność pomiędzy stężeniem uzyskanego produktu i liczbą kopii powielanej sekwencji. W fazie stacjonarnej, ilości produktu PCR uzyskanego w wyniku powielania matryc o różnych początkowych stężeniach docelowej sekwencji są zbliżone, zatem oznaczanie poziomu produktu na tym etapie reakcji nie pozwala wnioskować o początkowej ilości docelowej sekwencji matrycy. Wykorzystanie PCR do analizy ilościowej wymaga zidentyfikowania tego jej etapu, w którym zachowana jest liniowa zależność pomiędzy liczbą kopii powielanej sekwencji DNA a określonymi parametrami kinetycznymi reakcji. Wyznaczenie tych parametrów wymaga zastosowania technik pozwalających na precyzyjne śledzenie przebiegu PCR (2-5,8,10,11).

W początkach lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia Higuchi i wsp. (12) opracowali technikę śledzenia w czasie rzeczywistym przebiegu PCR poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej bromku etydyny (EtBr) interkalującego do dwuniciowego DNA. Reakcje prowadzono w termocyklerze z wmontowanym źródłem światła

ultrafioletowego i kamerą rejestrującą zmiany fluorescencji próbek. Sprzężona z komputerem kamera rejestrowała intensywność fluorescencji produktu proporcjonalnej do stężenia emitowanej przez próbkę powielaną w kolejnych cyklach reakcji PCR. Wbudowujący się w DNA bromek etydyny wzbudzany światłem UV emitował fluorescencję, która wzrastała w kolejnych cyklach wraz ze stężeniem amplikonu (3,5). Dzięki temu zmiany stężenia produktu w mieszaninie reakcyjnej mierzone były na bieżąco podczas przebiegu reakcji (12). Opracowana przez Higuchi'ego i wsp. technika określona została mianem ilościowej PCR (QPCR) lub PCR w czasie rzeczywistym (5,9,12,13). W kolejnych latach udoskonalono metody śledzenia przebiegu PCR wykorzystując barwnik fluorescencyjny SYBR Green I lub wyznakowane fluorochromami sondy molekularne komplementarne do powielanych sekwencji (1,3,5-10,13-16).

2. Zasada śledzenia real-time PCR

Poziom fluorescencji emitowany przez barwniki interkalujące lub sondy molekularne jest uzależniony od stężenia amplikonu obecnego w próbach. W początkowych cyklach powolne powielanie produktu objawia się niskim poziomem emisji fluorescencji, która rejestrowana jest jako tło (ang. *background*) (3-5,8-9,11). W późniejszych etapach wzrastające stężenia produktów PCR powodują zwiększenie fluorescencji. Cykl, w którym fluorescencja przekracza poziom tła określany jest mianem cyklu progowego (C_t , ang. *threshold cycle* lub C_p , ang. *crossing point*). W tym cyklu badana matryca zostaje powielona odpowiednią liczbę razy, tak że emitowana fluorescencja osiąga wartość progową (F_t , ang. *fluorescence treshold*) (4,5,7-10,15,17,18). Od cyklu progowego rozpoczyna się wczesna faza logarytmiczna PCR. Im więcej kopii powielanej sekwencji obecnych jest w próbce w momencie rozpoczęcia reakcji, tym mniej cykli potrzeba, aby intensywność fluorescencji przekroczyła poziom tła. Wyznaczenie cykli progowych dla badanych próbek DNA pozwala na ich porównywanie pod kątem zawartości sekwencji rozpoznawanych przez startery wykorzystywane w PCR. Informacja o liczbie kopii analizowanej sekwencji w materiale genetycznym zastosowanym jako matryca odczytywana jest poprzez porównanie C_t próby badanej z krzywą wzorcową, skonstruowaną na podstawie wartości C_t uzyskanych dla szeregu prób zawierających różne, znane ilości badanej matrycy (1,3-5,9,11,19) (rys. 1).



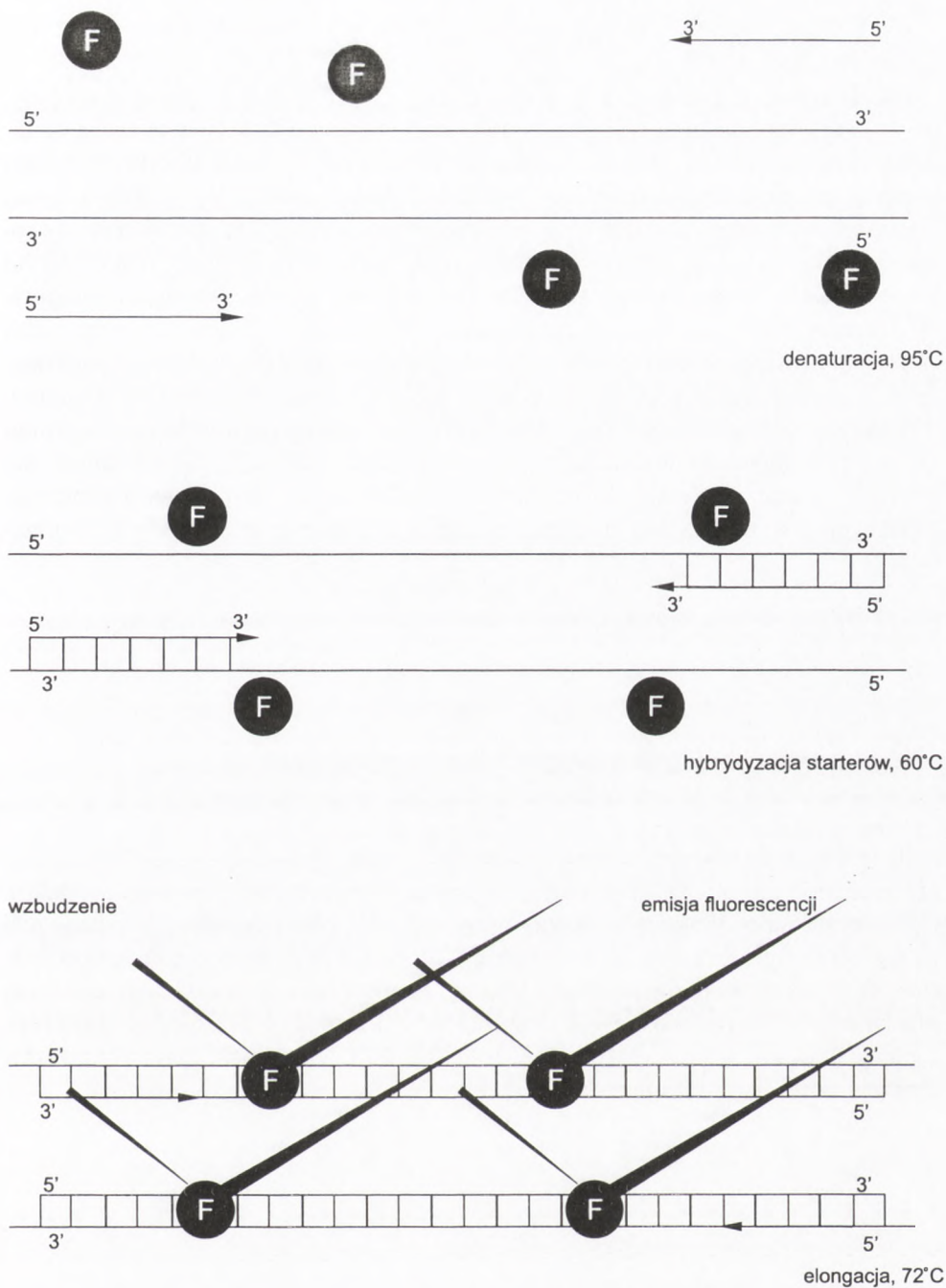
Rys. 1. Zależność pomiędzy kinetyką PCR a wyjściową liczbą sekwencji docelowej w powielanym DNA obecnym w mieszaninie reakcyjnej. Wyższe stężenia sekwencji matrycowej prowadzą do wcześniejszego rozpoczęcia fazy logarytmicznej. C_t : cykl progowy (ang. *threshold cycle*) w którym akumulacja produktu nabiera charakteru wykładniczego.

3. Strategie śledzenia nagromadzenia się produktu PCR

Do analizy przebiegu reakcji ilościowego PCR wykorzystywane są związki fluorescencyjne interkalujące do dwuniciowego DNA takie jak: SYBR Green I oraz komplementarne do powielanej sekwencji sondy molekularne wyznakowane fluorochromami: Molecular Beacons, TaqMan, Hybridization Probes i sondy typu Scorpion (3-5, 7-11, 15-17, 20-22).

3.1. Fluorochrom SYBR Green I

Fluorochrom SYBR Green I jest barwnikiem fluorescencyjnym interkalującym do mniejszej bruzdy dwuniciowego DNA. Niezwiązany SYBR Green po wzbudzeniu emituje słabą fluorescencję, której intensywność zostaje zwiększona o kilka rzędów wielkości po związaniu się barwnika z dwuniciowym DNA. Wraz ze wzrostem stężenia produktu PCR, wzrasta liczba cząsteczek fluorochromu związanego do dwuni-



Rys. 2. Wykrywanie produktu PCR za pomocą barwników wiążących się do dwuniciowego DNA. W każdym cyklu PCR po etapie wydłużania, obecny w mieszaninie reakcyjnej barwnik (SYBR Green I) – F interkaluje do powstałego produktu PCR. Pozwala to na rejestrację fluorescencji, której intensywność jest zależna od aktualnej ilości produktu PCR w mieszaninie reakcyjnej.

ciowego DNA, a tym samym rejestrowany jest wzrost poziomu fluorescencji (1,3,5, 7,8,10,11,15-17,19-23) (rys. 2).

Wadą systemu opartego na SYBR Green jest to, że podobnie jak bromek etydyny, barwnik ten, interkaluje do każdej dwuniciowej cząsteczki DNA, w tym także do dimerów starterów oraz niespecyficznych produktów reakcji. W celu wykrycia takich struktur, po zakończeniu procesu powielania, przeprowadza się analizę krzywej topnienia produktów powstałych w mieszaninie reakcyjnej. Zazwyczaj krzywa topnienia generowana jest poprzez powolne podgrzewanie mieszaniny reakcyjnej od 60 do 95°C i jednocześnie stałe śledzenie fluorescencji. Wraz ze wzrostem temperatury intensywność fluorescencji stopniowo zmniejsza się na skutek wzrostu ruchu cieplnego cząsteczek związanego barwnika. Jednakże, kiedy temperatura mieszaniny reakcyjnej osiągnie wartość, przy której nici DNA rozdzielają się, czyli temperaturę topnienia produktu PCR (T_m , ang. *melting temperature*), cząsteczki fluorochromu zostają uwolnione, a fluorescencja gwałtownie spada (3,5,8). Następnie oblicza się wartość ujemną pierwszej pochodnej krzywej topnienia. Jeśli krzywą topnienia oznaczymy jako funkcję wartości fluorescencji F zależną od temperatury T , to otrzymamy:

$$F = f(T),$$

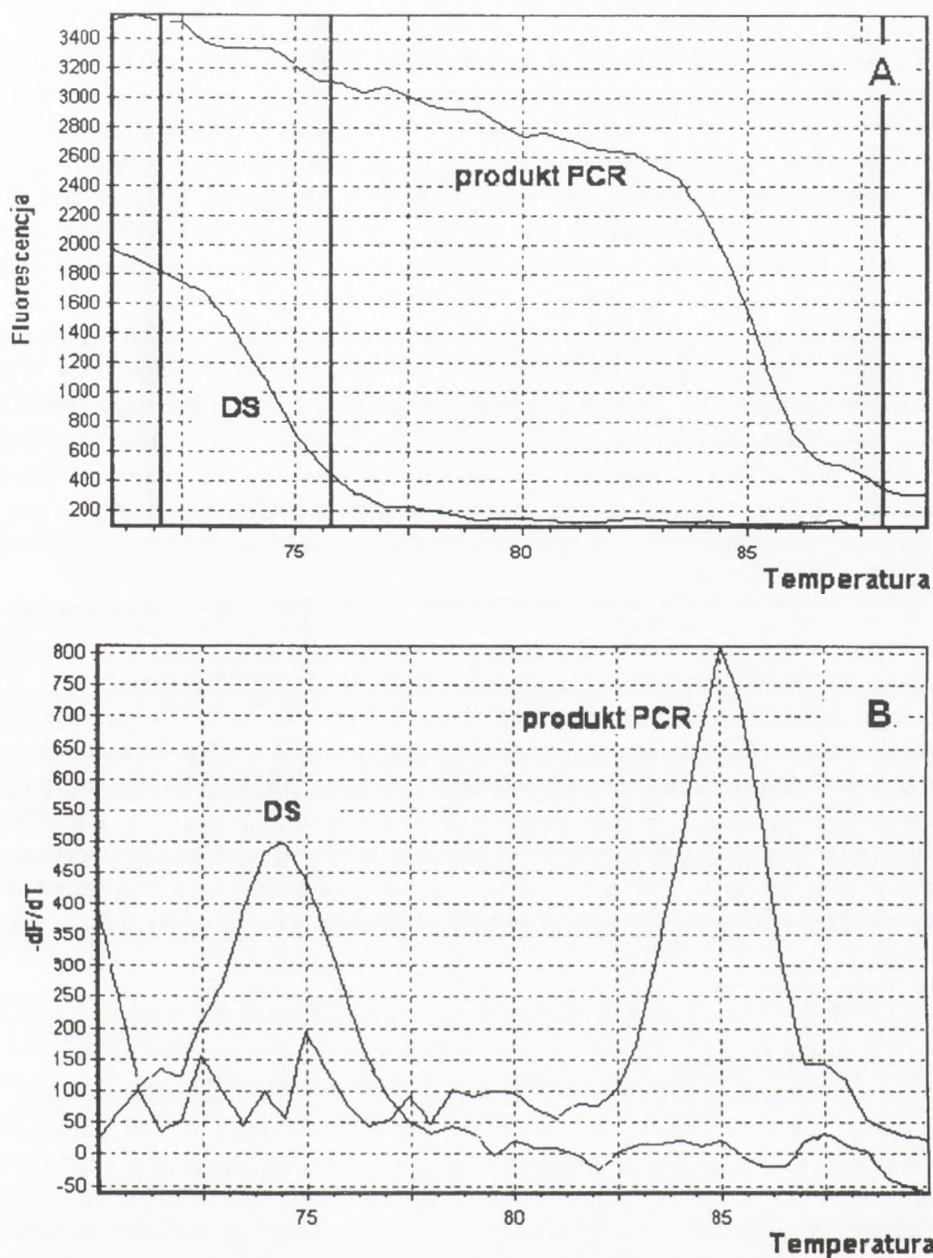
a jej pierwszą pochodną jako:

$$G = \frac{dF}{dT},$$

zatem wartość ujemna pierwszej pochodnej przyjmuje postać:

$$-G = -\frac{dF}{dT},$$

której maksimum pozwala precyzyjnie wyznaczyć temperaturę topnienia produktu. Produkty o różnej długości i o różnej sekwencji będą obserwowane jako różne piki na wykresie topnienia (rys. 3). Temperatury topnienia (T_m) poszczególnych produktów, są cennym źródłem informacji o specyficzności reakcji. Specyficzny dla danej reakcji amplikon, ma zwykle wyższą temperaturę topnienia niż dimery starterów, topnieje bowiem w temperaturze zbliżonej do 80°C. Natomiast dimery starterów topnieją poniżej tej temperatury (2-5).



Rys. 3. Krzywe topnienia dimerów starterów (DS) i właściwego produktu PCR (A) oraz ich pierwsze pochodne, których maksima pozwalają wyznaczyć temperatury topnienia produktu PCR oraz dimerów starterów (DS) (B). Dalszy opis w tekście.

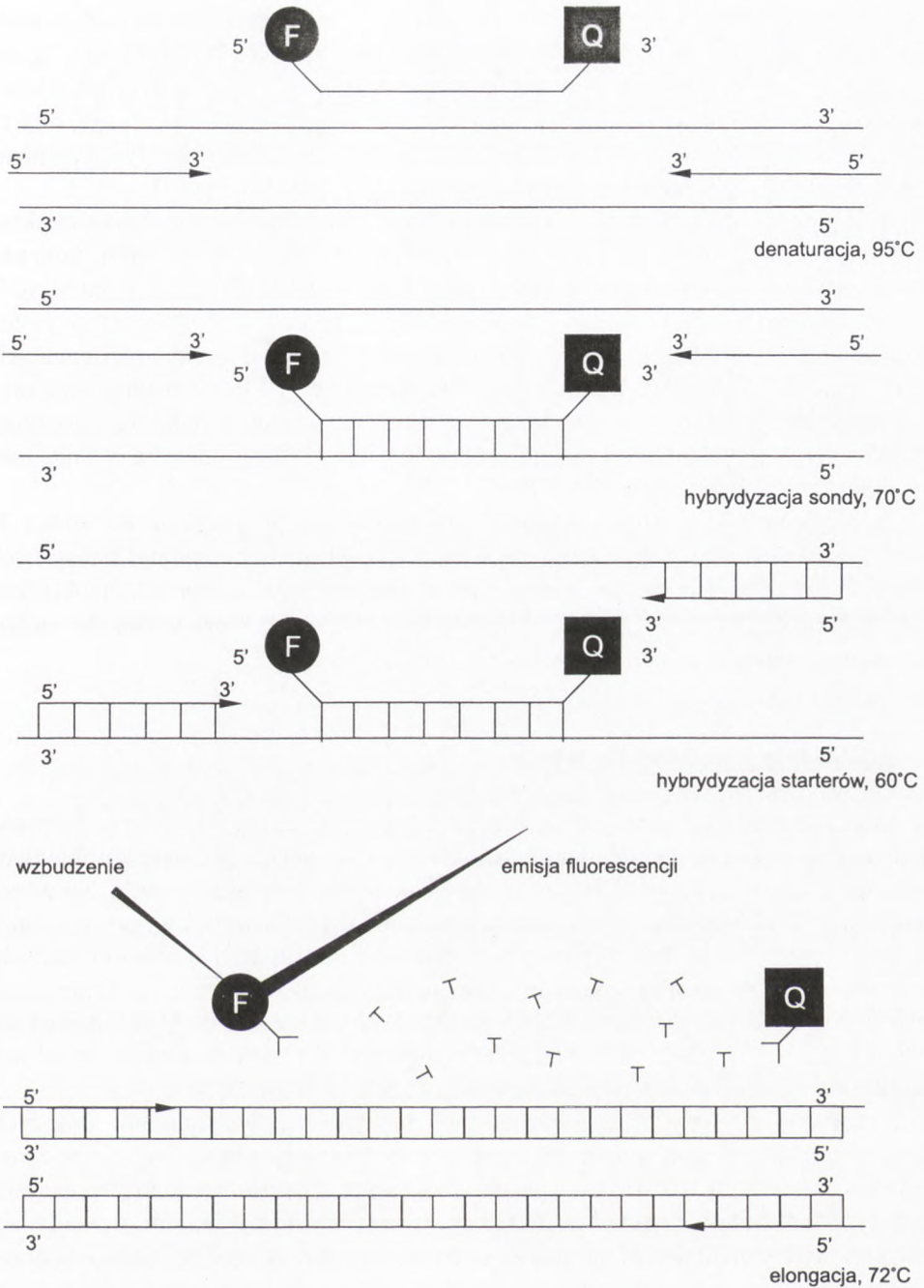
3.2. Sondy molekularne

Techniki stosowane do analizy przyrostu stężenia amplikonów, wykorzystujące sondy molekularne, oparte są na zjawisku bezpromienistego rezonansowego transferu energii (FRET, ang. *fluorescence resonance energy transfer*). Podczas tego procesu zaabsorbowana energia jest przenoszona z jednego fluorochromu na drugi. W efekcie dochodzi do emisji światła, bądź też następuje zmniejszenie fluorescencji, jeżeli energia stanu wzbudzenia zostaje przeniesiona na związek wygaszający (ang. *quencher*) (2-5,7,14). Powszechnie stosowanymi barwnikami do znakowania sond w QPCR są FAM (6-karboksylofluoresceina), TET (tetrachloro-6-karboksylo-fluoresceina) oraz VIC (nazwa zastrzeżona przez firmę ABI, USA). Wymienione związki pełnią rolę barwników reporterowych, których sygnał umożliwia śledzenie przebiegu PCR. Przykładami wygaszaczy są TAMRA (6-karboksylotetrametylorodamina) oraz DABCYL [kwas 4-(4'-dimetylo-aminofenyloazo)benzoowy]. Związki wygaszające są zwykle także barwnikami fluorescencyjnymi, lecz długości fal emitowanego przez nie światła są znacznie większe niż w przypadku barwników reporterowych (4,8,9,14). Niektóre wygaszacze natomiast, rozpraszają zaabsorbowaną energię świetlną w postaci ciepła (np. DABCYL) (8).

Sondy molekularne muszą charakteryzować się dużą specyficznością względem powielanego fragmentu DNA. Istotnym czynnikiem jest także dobór optymalnego stężenia starterów oraz sondy, od którego zależy poziom fluorescencji tła (7,17). W czasie powielania określonego fragmentu DNA, sondy (których stężenie jest znacznie niższe od stężenia starterów) konkurują z nimi o dostęp do komplementarnego fragmentu. Należy również pamiętać, że zaraz po przyłączeniu starterów do matrycy rozpoczyna się ich wydłużanie, a powstający produkt uniemożliwia przyłączenie sondy. Aby temu zapobiec wartość T_m sondy powinna być przynajmniej o 5°C wyższa od T_m starterów, co zapewni wcześniejszą hybrydyzację sondy do matrycy przed rozpoczęciem wydłużania starterów i nie zakłóci odczytu fluorescencji (3-5,17).

3.2.1. Sondy TaqMan

Sonda TaqMan (którą można nazwać „sondą degradacyjną”) jest oligonukleotydem (o długości ok. 20-30 pz) komplementarnym do powielanej sekwencji DNA oraz do produktu PCR. Na jego 5' końcu znajduje się barwnik fluorescencyjny, natomiast na 3' przyłączony jest wygaszacz (2-5,8-10,14,17,22). Jeśli sonda jest niezhybrydowana, to bliskość barwnika i wygaszacza blokuje fluorescencję. Podczas każdego cyklu PCR, sonda rozpoznaje komplementarny region matrycy DNA i wiąże się z nim pomiędzy miejscami przyłączania starterów. W analizach molekularnych wykorzystujących sondy TaqMan stosuje się termostabilne polimerazy mające aktywność egzonukleazową 5' → 3'. Dzięki tej właściwości, enzym degraduje sondę, przez co



Rys. 4. Detekcja produktu PCR za pomocą sondy TaqMan. Sonda wiąże się z komplementarnym fragmentem produktu PCR przed przyłączeniem starterów. Podczas etapu elongacji następuje degradacja sondy przez polimerazę Taq. W konsekwencji dochodzi do przestrzennego rozdzielania fluorochromu – F i wygaszacza – Q, co pozwala na rejestrację światła emitowanego przez fluorochrom.

następuje przestrzenne rozdzielenie fluorochromu i wygaszacza, co powoduje emisję fluorescencji (rys. 4). Pomiaru akumulującego się produktu PCR dokonuje się po zakończeniu etapu elongacji. Podczas fazy logarytmicznej PCR w każdym cyklu wraz ze wzrostem stężenia produktu hybryduje z nim więcej sondy. Podczas jej degradacji dochodzi do uwalniania fluorochromu, a w związku z tym w każdym kolejnym cyklu zwiększa się intensywność fluorescencji (2-5,10,14,17) (rys. 4).

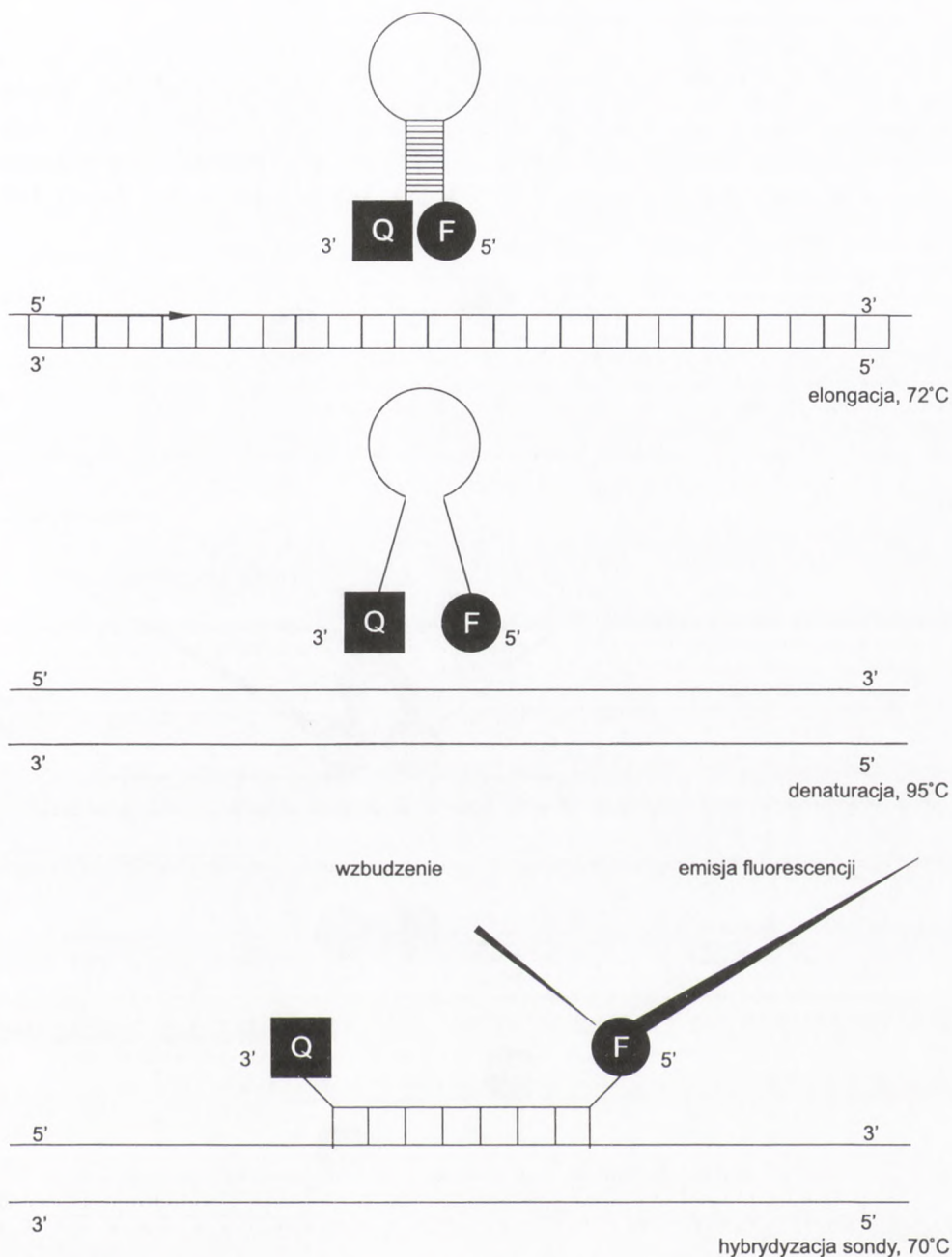
Podobnie jak jest to w przypadku innych sond, sondy TaqMan powinna charakteryzować T_m około 70°C , znacząco wyższa od T_m starterów. Dzięki temu, podczas etapu przyłączania i wydłużania starterów, który w układach eksperymentalnych wykorzystujących sondy TaqMan przebiega w 60°C , kompleks sonda-matryca pozostaje stabilny. W sytuacjach, w których projektuje się sondy dla sekwencji bogatych w AT uzyskanie T_m dupleksu sonda-matryca zbliżonej do 70°C jest trudne bądź niemożliwe. Jeżeli T_m dupleksu jest zbyt niska, sonda nie wiąże się stabilnie z matrycą. W takiej sytuacji polimeraza Taq zamiast trawić koniec 5' sondy, spycha ją z nici matrycowej (tzw. „zrzucanie sondy”) (8).

Zwiększenie temperatury topnienia uzyskać można przyłączając do końca 3' sondy TaqMan cząsteczkę wiążącą się do mniejszej bruzdy podwójnej helisy tworzonej przez kompleks sondy i matrycy (MGB, ang. *minor groove binder*). Przykładem jest cząsteczka DPI_3 (tripeptyd dihydrocyklopiroindolowy), która wnika do mniejszej bruzdy B-DNA i stabilizuje wiązanie sondy z matrycą (17).

3.2.2. Sondy *Molecular Beacons*

Molecular Beacons to sondy DNA tworzące strukturę szpilki do włosów. Sekwencje „pnia” sondy są do siebie komplementarne, zaś sekwencja pętli jest komplementarna do amplikonu. Końce sondy są znakowane: jeden fluorochromem, drugi wygaszaczem (1,3-5,10,17,22). Gdy struktura jest zamknięta, barwnik i wygaszacz znajdują się zbyt blisko siebie, aby mogła nastąpić fluorescencja, bowiem bliskość wygaszacza i wzbudzonego barwnika powoduje, poprzez rezonans, przeniesienie energii wzbudzenia z jednego związku na drugi. W obecności komplementarnej sekwencji matrycy sonda rozwija się i hybryduje do niej. Barwnik oddala się od wygaszacza co umożliwi emisję fluorescencji (3-5,7,10,17) (rys. 5).

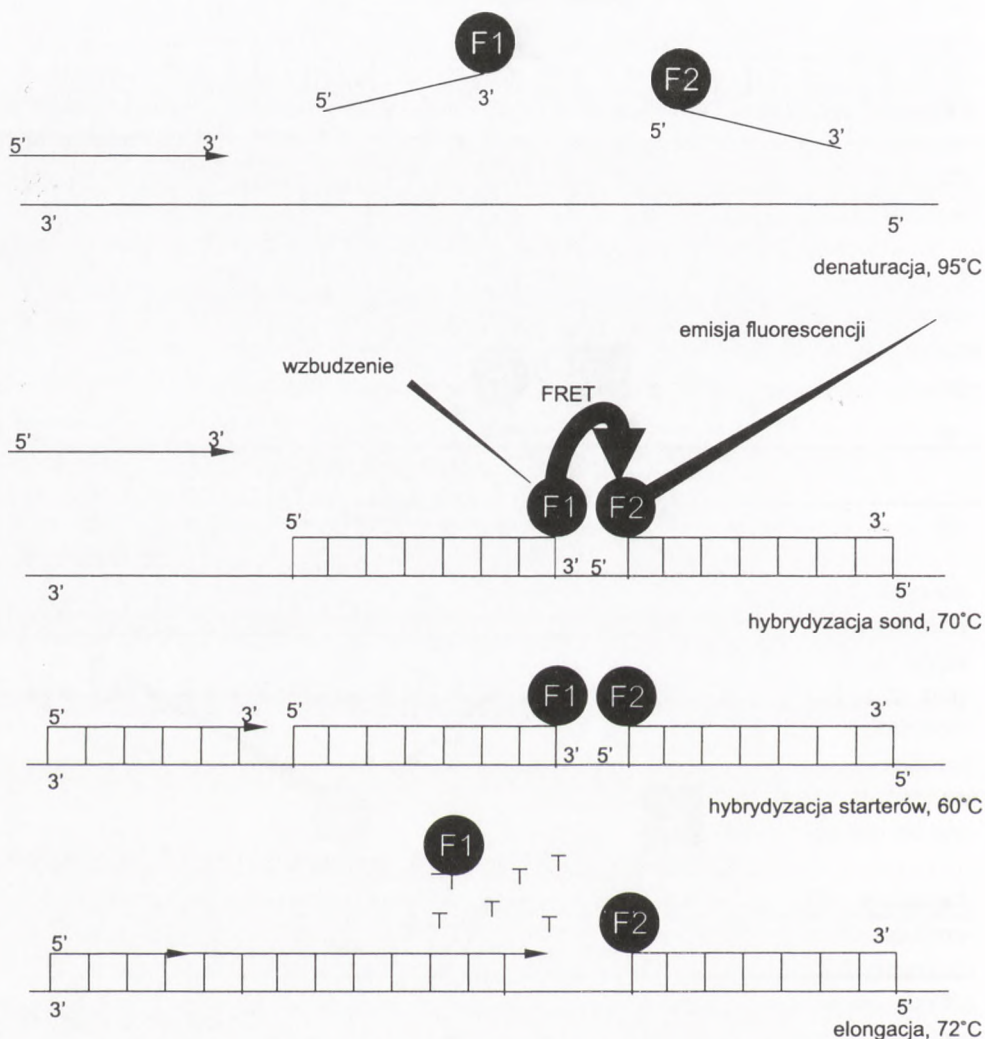
Sondy *Molecular Beacons* uznawane są za jedno z najczulszych narzędzi służących do wykrywania mutacji, ponieważ kompleks sonda-matryca musi być termodynamicznie stabilniejszy niż struktura spinki do włosów. Występowanie niedopasowań (ang. *mismatch*) pomiędzy sekwencją sondy a powielanym fragmentem prowadzi do znacznie większej destabilizacji dupleksu sonda-matryca, niż ma to miejsce w przypadku sond liniowych. Faworyzowane jest wtedy przyjmowanie przez sondę struktury szpilki do włosów. Duża specyficzność względem powielanego fragmentu czyni z sond *Molecular Beacons* idealne narzędzie do detekcji polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) (3-5,7,10,17).



Rys. 5. Detekcja produktu PCR za pomocą sondy *Molecular Beacon*. Podczas etapu denaturacji dochodzi do rozerwania struktury szpilki do włosów co (po obniżeniu temperatury mieszaniny reakcyjnej) umożliwia hybryzację sondy do komplementarnego fragmentu produktu PCR. Konsekwencją powstania duplesu sonda-matryca jest przestrzenne rozdzielenie fluorochromu – F i wygaszacza – Q, umożliwiające rejestrację fluorescencji.

3.2.3. Sondy *Hybridization Probes*

Hybridization Probes to dwie sondy wyznakowane fluorochromami. Obie sondy rozpoznając sąsiadujące sekwencje w obrębie produktu PCR hybrydują do nich w taki sposób, że koniec 5' jednej sondy położony jest w bezpośrednim sąsiedztwie końca 3' drugiej sondy (3-5,9) (rys. 6). W obecności światła o określonej długości fali



Rys. 6. Detekcja produktu PCR za pomocą sondy *Hybridization Probe*. Hybrydyzacja obydwu sond do komplementarnych regionów produktu PCR umożliwia zachodzenie zjawiska transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET) pomiędzy fluorochromami F1 i F2, którymi wyznakowane są sondy. Rejestracji fluorescencji dokonuje się po zhybrydowaniu sond z produktem PCR. Podczas etapu elongacji PCR sondy ulegają degradacji wskutek działania egzonukleazowej aktywności polimerazy Taq.

barwnik umieszczony na końcu jednej z nich ulega wzbudzeniu i uwalnia energię, która następnie jest przechwytywana przez fluorochrom znajdujący się na końcu drugiej sondy, emitując fluorescencję. Zatem do emisji fluorescencji może dobrać tylko, wówczas gdy fluorochromy znajdują się blisko siebie, a zatem na etapie hybrydyzacji obu sond do matrycy DNA, wtedy też rejestrowana jest fluorescencja (3-5,7,17).

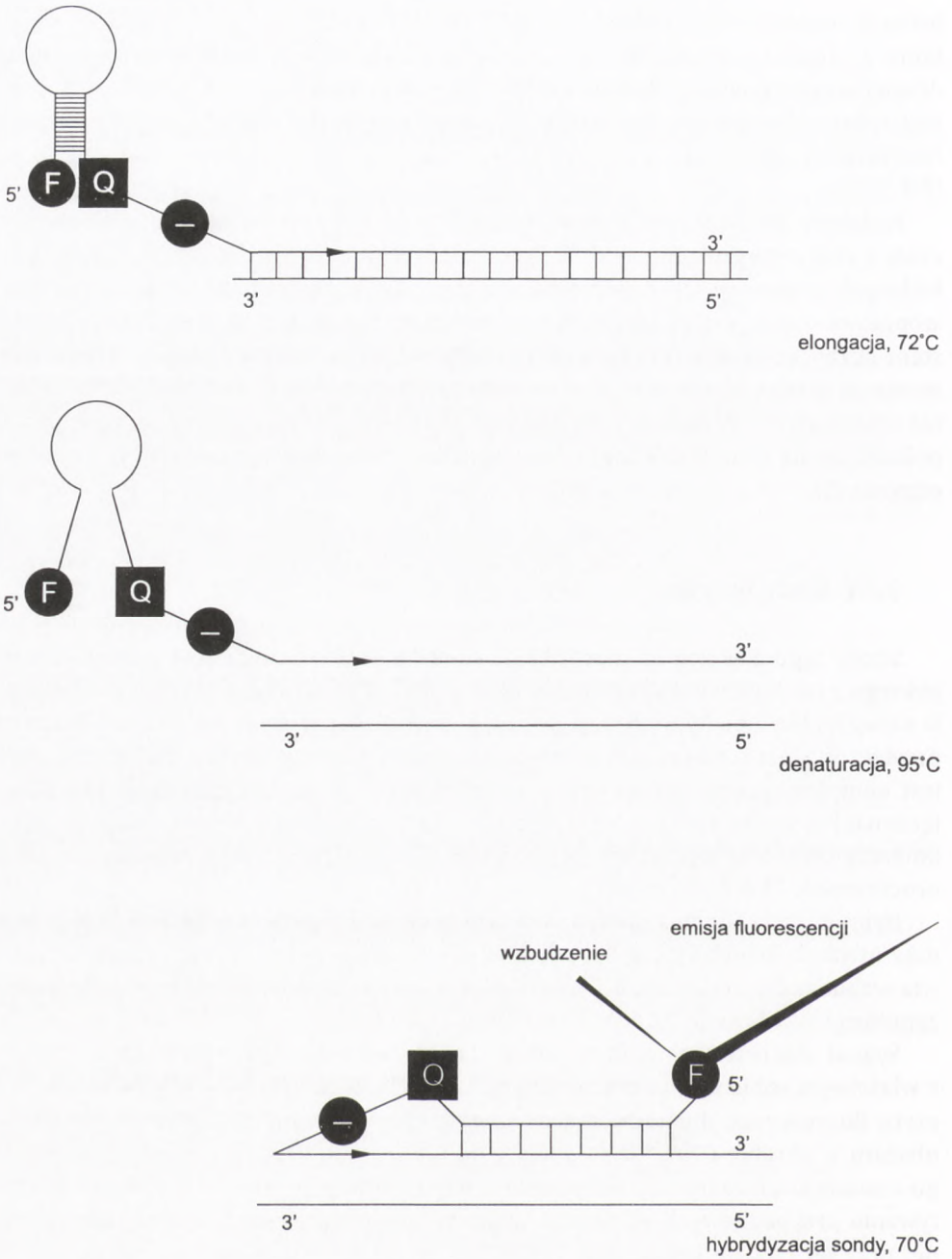
Podobnie jak *Molecular Beacons*, sondy hybrydujące uważane są za niezwykle czułe i charakteryzujące się wyjątkową specyficznością narzędzie do wykrywania badanych sekwencji DNA. Jednak wadą układów wykorzystujących te sondy jest stopniowe zmniejszenie intensywności fluorescencji obserwowane wraz ze wzrostem liczby komplementarnych nici amplikonu, które rehybrydując, odtwarzają strukturę dsDNA uniemożliwiając sondom przyłączenie się do rozpoznawanej przez nie sekwencji (3). W niektórych sytuacjach dochodzi także do degradacji sond przez polimerazę na skutek zależnej od sekwencji, endonukleolitycznej aktywności tego enzymu (3).

3.2.4. Sondy *Scorpion*

Sondy typu *Scorpion* są modyfikacją sond *Molecular Beacon*, z tą różnicą, że do jednego z ich końców dołączony jest starter PCR. Jego koniec 3' jest wolny i pozwala na wydłużanie po hybrydyzacji do komplementarnej matrycy. Do końca 5' startera przyłączona jest sonda molekularna o strukturze szpilki do włosów. Sekwencja pętli jest komplementarna do produktu elongacji startera, do którego sonda jest przyłączona. Pomiędzy końcem 5' startera i 3' sondy znajduje się element blokujący polimerazę DNA oraz wygaszacz fluorescencji. Koniec 5' sondy wyznakowany jest fluorochromem (3,4,7,10) (rys. 7).

Hybrydyzacja sondy z komplementarnym do niej regionem produktu PCR powoduje otwarcie struktury szpilki, oddalenie fluorochromu od wygaszacza, co umożliwia wzbudzenie i rejestrację fluorescencji. Element blokujący działanie polimerazy zapobiega wydłużaniu końca 3' produktu PCR (7).

Sygnal fluorescencji emitowany jest tylko, wówczas gdy sonda zhybryduje z właściwym sobie fragmentem matrycy i barwnik oddali się od wygaszacza. Do odczytu fluorescencji dochodzi zatem na etapie przyłączania sondy do powielanego obszaru w obrębie DNA. Ma to miejsce po wydłużeniu przez polimerazę związanego z sondą startera (rys. 7). Połączenie sondy z sekwencją startera zapobiega odczytywaniu przypadkowych sekwencji, znacznie zwiększając specyficzność prowadzonej przy jej udziale reakcji (3,4,7,10).



Rys. 7. Detekcja produktu PCR za pomocą sondy *Scorpion*. Sonda przyłączona jest do końca 5' startera PCR. W każdym cyklu PCR koniec 3' startera ulega wydłużeniu przez polimerazę Taq. Następnie w temperaturze 95°C dochodzi do denaturacji produktu PCR oraz sondy. Po obniżeniu temperatury mieszaniny reakcyjnej sonda hybryduje z komplementarnym do niej odcinkiem produktu PCR. F – oznacza fluorochrom, Q – wygaszacz fluorescencji, — — element blokujący aktywność polimerazy DNA.

4. Normalizacja pomiaru fluorescencji

W przebiegu reakcji wykorzystujących zarówno sondy jak i barwniki interkalujące często występują niepożądane niejednorodności w odczycie fluorescencji (2). W celu korekcji niejednorodności odczytu przez układy optyczne i niejednorodności pipetowania, do mieszaniny reakcyjnej wraz z barwnikami reporterowymi, dodawane są barwniki pasywne (ang. *passive reference fluorophore*), które nie wchodzi w interakcję z powielanym DNA, a intensywność ich fluorescencji utrzymuje się na stałym poziomie niezależnie od aktualnego stężenia produktu PCR w mieszaninie reakcyjnej. Najczęściej używanym barwnikiem pasywnym jest ROX (6-karboksy-N,N,N',N'-tetrametylo-rodamina). Normalizacja danych wyrażana jest jako stosunek intensywności fluorescencji barwnika reporterowego do intensywności fluorescencji barwnika pasywnego. Dla próby badanej (zawierającej matrycę) stosunek ten opisuje się jako R_{n+} . Dla próby kontrolnej (nie zawierającej matrycy) w taki sam sposób wyznaczany jest współczynnik R_{n-} . $\Delta R_n = R_{n+} - R_{n-}$ jest znormalizowaną wartością sygnału fluorescencyjnego generowanego w czasie reakcji QPCR (3-7).

Praca powstała podczas realizacji grantu pomostowego (552 CM/B) oraz grantu nr 525-B, ufundowanych przez rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Literatura

- O'Mahony J., Hill C., (2002), *J. Microbiol. Methods*, 51, 283-293.
- Pherson M. J., Moller S. G., (2000), *PCR. OUP*, Londyn.
- Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A., (2002), *Nucl. Acids Res.*, 30, 1292-1305.
- Mackay I. M., (2004), *Clin. Microbiol. Infect.*, 10, 190-212.
- Ginzinger D. G., (2002), *Exp. Hematol.*, 30, 503-512.
- Pfaffl M. W., (2003), *Livestock transcriptomics: quantitative mRNA analytics in molecular endocrinology and physiology*, rozprawa habilitacyjna. Technische Universität München – Weihenstephan (www.gene-quantification.de).
- Wong M. L., Medrano J. F., (2005), *BioTechniques*, 39, 75-85.
- Bubner B., Baldwin I. T., (2004), *Plant Cell Rep.*, 23, 263-271.
- Mocellin S., Rossi C. R., Marincola F. M., (2003), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 51, 301-313.
- Bonetta L., Tyagi S., Marras S. A., (2005), *Nat. Methods*, 4, 305-311.
- Freeman W. M., Walker S. J., Vrana K. E., (1999), *Biotechniques*, 26, 112-125.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., (1993), *Biotechnology*, 11, 1026-1030.
- Wilhelm J., Pingoud A., Hahn M., (2003), *Nucl. Acids Res.*, 31, 10, 1-6.
- Proudnikov D., Yuferov V., LaForge Y. Z. K., (2003), *J. Neurosci. Methods*, 123, 31-45.
- Mikula M., Dzwonek A., Jagusztyn-Krynicka K., Ostrowski J., (2003), *J. Microbiol. Methods*, 55, 351-359.
- Liu W., Saint D.A., (2002), *Anal. Biochem.*, 302, 52-59.
- Bustin S. A., (2000), *J. Mol. Endocrinol.*, 25, 169-193.
- Tichopad A., Didier A., Pfaffl M. W., (2004), *Mol. Cell. Probes*, 18, 45-50.
- Ramakers C., Ruijter J. M., Deprez R. H. L., (2003), *Neurosci. Lett.*, 339, 62-66.
- Peters I. R., Helps C. R., Hall E. J., (2004), *J. Immunol. Methods*, 286, 203-217.
- Ward C. L., Dempsey M. H., Ring C. J. A., (2004), *J. Clin. Virol.*, 29, 179-188.
- Schmittgen T. D., (2001), *Methods*, 25, 383-385.
- Pfaffl M. W., Geogieva T. M., Geogiev I. E., (2002), *Domest. Anim. Endocrinol.*, 22, 91-102.