



PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych

Jarosław Tyburski¹, Anna Studzińska¹, 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.

PCR in real time. The methods of data analysis

Summary

The accuracy of real-time PCR (RT-PCR) experiment is strongly dependent on the mathematical models of data analysis, on which the quantitative methods are based. In this review, we discuss the key steps of analysing data from real-time PCR experiments. These are the threshold cycle determination, estimation of real-time PCR amplification efficiency and amplicon quantification. The fit point method and the second derivative method are commonly used to determine a threshold cycle value, which is a cycle number in the early exponential phase of PCR that is used to calculate the initial amount of template DNA. The amplification efficiency calculation is usually based on the data collected from a standard curve. However, in the alternative methods, the amplification efficiency of an individual reaction is calculated from the kinetics of the reaction. Quantification of amplicon levels can be either absolute or relative. In absolute quantification method, the initial concentration of target template in unknowns, based on their cycle threshold values, and the construction of an absolute standard curve for each individual amplicon is required. Relative quantification can be done by the use of the relative standard curve method or the comparative method. In the first one, the initial amount of unknown samples is calculated from the standard curve of specific gene and normalized to the input amount of a reference gene which is also calculated from the standard curve. The comparative method is a mathematical model that is based on the differences in the normalized amplicon levels between the unknowns and control sample. There are also models that combine gene quantification and normalization into a single calculation.

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

Key words:

Real-time PCR, methods of detection the threshold cycle, efficiency of PCR, quantification in real-time PCR.

1. Wprowadzenie

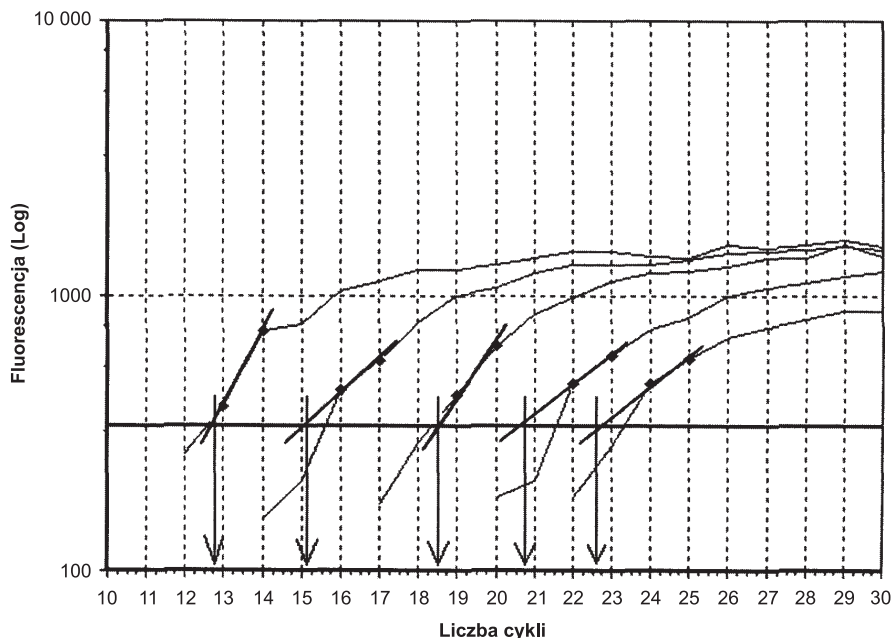
Zaletą ilościowej PCR (QPCR, ang. *quantitative PCR*) jest możliwość oszacowania w każdym cyklu reakcji ilości produktu powielonego przy użyciu specyficznych starterów. Uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych danych uzależnione jest nie tylko od zastosowanej metody śledzenia przebiegu reakcji i składu mieszaniny reakcyjnej, ale także od wyboru odpowiedniej metody analizy uzyskanych danych. Podstawowe etapy analizy danych to wyznaczanie cykli progowych reakcji, ocena wydajności PCR oraz oznaczanie poziomu powielanej sekwencji [1-10].

2. Wyznaczanie cyklu progowego reakcji

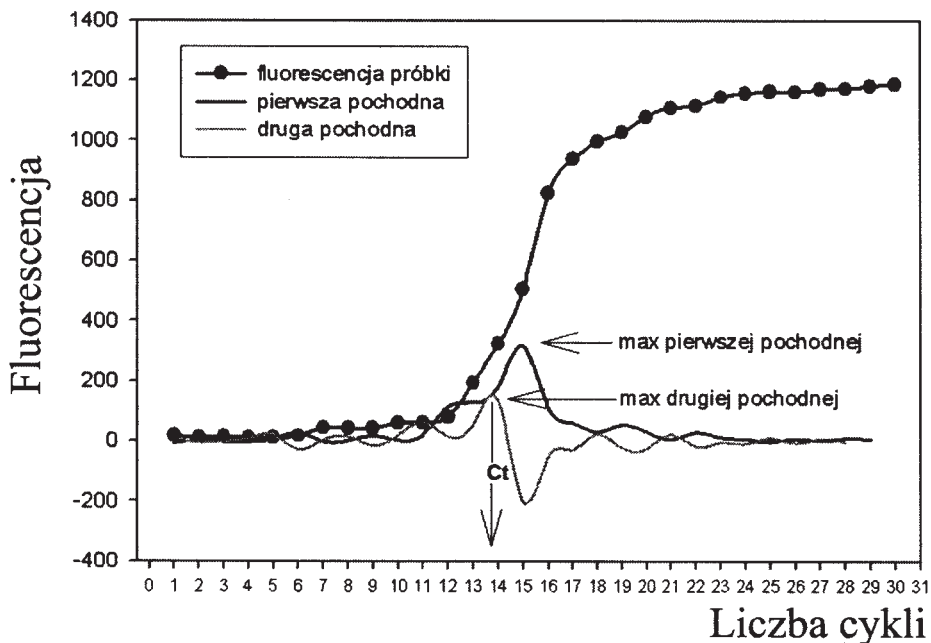
Stężenia sekwencji powielanych podczas PCR oznaczane są na podstawie liczby cykli reakcji wymaganych do zsyntetyzowania takiej liczby cząsteczek produktu, która generuje sygnał fluorescencyjny o intensywności osiągającej tzw. wartość progową (F_t , ang. *fluorescence threshold*). Liczba cykli, konieczna do przekroczenia tej wartości jest odwrotnie proporcjonalna do początkowego stężenia amplikonu w mieszaninie reakcyjnej. Cykl PCR, w którym przekroczony zostaje progowy poziom fluorescencji nosi nazwę cyklu progowego (C_t , ang. *threshold cycle*), rozpoczyna on etap wykładniczego nagromadzania się produktu PCR. W celu jego wyznaczenia stosuje się metodę analizy szumów (ang. *fit points*) lub metodę analizy maksimum drugiej pochodnej (ang. *second derivative maximum*) [11].

Wyznaczanie C_t metodą analizy szumów wymaga wykreślenia dodatkowej prostej, tzw. linii progowej (ang. *threshold line*), na wykresie zależności logarytmu fluorescencji od liczby cykli. Położenie linii progowej na wykresie wyznacza się rejestrując w kilku pierwszych cyklach reakcji fluorescencję tła i obliczając odchylenie standardowe (SD) uzyskanych wartości. Poziom intensywności fluorescencji równy przyjętej wielokrotności odchylenia standardowego tła (np. $10 \times SD$) przyjmuje się jako poziom linii progowej [12,13]. Położenie linii progowej powinno być tak dobrane, aby znajdowała się powyżej poziomu szumów i w obrębie fazy wykładniczej reakcji. Następnie, zmiany w obrębie dwóch do czterech punktów wykresu przyrostu fluorescencji, znajdujących się powyżej linii progowej interpoluje się za pomocą regresji liniowej. C_t definiuje się jako numer cyklu, przy którym linia regresji przecina linię progową [14] (rys. 1).

Wyznaczanie C_t za pomocą drugiej z wymienionych metod wymaga obliczenia pierwszej i drugiej pochodnej zależności intensywności fluorescencji od cykli PCR. Pierwsza pochodna tej zależności przyjmuje wartość 0 kiedy nie zachodzą zmiany fluorescencji, czyli w fazie pierwszych cykli oraz w fazie *plateau*. Wzrost wartości pierwszej pochodnej przypada na fazę wykładniczą PCR, kiedy przyrost fluorescencji jest najszybszy. Maksimum pierwszej pochodnej odpowiada punktowi przegięcia krzywej wzrostu fluorescencji, czyli przejściu z fazy wykładniczej do logarytmicznej.



Rys. 1. Wyznaczanie cykli progowych (C_t) metodą analizy szumów (ang. *fit points*). Strzałki wskazują numery cykli progowych poszczególnych reakcji.



Rys. 2. Wyznaczanie cyklu progowego PCR na podstawie analizy maksimum drugiej pochodnej (ang. *second derivative maximum*).

Niektóre procedury wyznaczania C_t ograniczają się do obliczenia maksimum pierwszej pochodnej i na podstawie jego położenia lokalizują poszukiwany parametr [15]. Opisaną metodę stosuje się rzadko. Zwykle, aby zlokalizować C_t , oblicza się drugą pochodną i jej maksimum, które wypada dokładnie w punkcie przegięcia gałęzi rosnącej wykresu pierwszej pochodnej, wyznaczającego początek fazy wykładniczej Q-PCR (rys. 2) [15].

3. Wyznaczanie wydajności PCR

Wydajność PCR zależy od szeregu czynników, z których najistotniejszymi są: jakość i ilość matrycy oraz stężenia starterów i chlorku magnezu w roztworze [2-7,10, 12,13,16-18]. Odchylenia stężeń wymienionych składników od optimum przyczyniają się do zmiany jakości procesu powielania, co rzutuje na dokładność badań i reprezentatywność uzyskanych wyników. Zbliżone wydajności reakcji we wszystkich próbach badanych w ramach danego eksperymentu stanowią istotne kryterium przy późniejszym porównywaniu poszczególnych prób. Jeżeli wydajność (E) reakcji jest stała, co ma miejsce w zoptymalizowanych układach, możliwe jest precyzyjne określenie początkowej liczby cząsteczek materiału genetycznego w próbce [10,12].

Powielanie produktu PCR można wyrazić wzorem [8]:

$$N_c = N_o(E + 1)^n, \quad (1)$$

w którym: N_c wyraża ilość powielonych fragmentów DNA; N_o – początkową liczbę kopii matrycy; E – wydajność reakcji; n – liczbę cykli. Obserwowana w idealnych warunkach 100% wydajność reakcji pozwala na podwajanie ilości produktu w każdym cyklu PCR. Przekształcenie tego równania pozwala wyznaczać na podstawie N_c początkową liczbę kopii matrycowego DNA, pod warunkiem, że znana jest wydajność PCR:

$$N_o = \frac{N_c}{(E + 1)^n}. \quad (2)$$

Śledzenie przebiegu reakcji pozwala na wyznaczenie cyklu, w którym poszczególne próby zawierają taką samą liczbę cząsteczek produktu PCR. Liczba ta odpowiada określonej, progowej wartości fluorescencji (F_t) zaś cykl, w którym analizowana próba osiąga F_t jest, jak napisano, cyklem progowym (C_t) reakcji. Każda reakcja ma własny cykl progowy (C_t). Równanie 2 można zatem przekształcić do postaci:

$$N_o = \frac{N_t}{(E + 1)^{C_t}}, \quad (3)$$

gdzie C_t oznacza cykl progowy, zaś N_t jest liczbą cząsteczek amplikonu odpowiadającą fluorescencji progowej (F_t).

Najczęściej stosowana metoda wyznaczania wydajności prowadzonej reakcji, opiera się na wygenerowaniu krzywej standardowej z serii rozcieńczeń matrycy. Zgodnie ze statystycznymi wymogami powinna być ona co najmniej czteropunktowa, a każde z wzorcowych stężeń nakładane przynajmniej w dwóch powtórzeniach. Równanie opisujące krzywą standardową można wyprowadzić logarytmując równanie (3):

$$\begin{aligned} \lg N_o &= \lg N_t - \lg (E + 1)^{C_t} , \\ \lg N_o &= \lg N_t - C_t \lg (E + 1), \\ \lg N_o &= [\lg (E + 1)]C_t + \lg N_t . \end{aligned} \quad (4)$$

Zakładając, że E i N_t są stałe, równanie (4) przyjmuje postać równania prostej regresji ($y=mx+b$). Zatem wykreślenie takiej prostej dla zależności $\lg N_o$ od C_t pozwala obliczać wydajność reakcji (E) na podstawie nachylenia prostej w oparciu na wzorze [19]:

$$\begin{aligned} \text{nachylenie} &= -\lg(E + 1), \\ E &= 10^{-\text{nachylenie}} - 1. \end{aligned} \quad (5)$$

Natomiast wykreślenie prostej dla zależności C_t od $\lg N_o$ (rys. 3) wymaga zmiany osi współrzędnych. Zależność $C_t=f(N_t)$ jest funkcją odwrotną do opisanej w równaniach (5). Przekształcony wzór wygląda wówczas następująco [12]:

$$C_t = \frac{1}{\lg(E + 1)} \lg N_o + \frac{N_t}{\lg(E + 1)},$$

stąd:

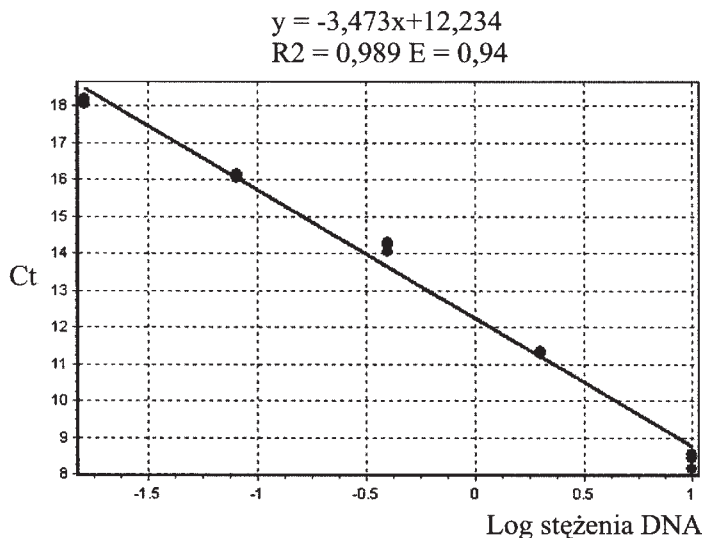
$$\text{nachylenie} = -\frac{1}{\lg(E + 1)},$$

zatem po przekształceniu otrzymujemy:

$$E = 10^{-1/\text{nachylenie}} - 1. \quad (6)$$

Jeżeli wydajność PCR wyliczona ze wzoru (6) wynosi 100%, wówczas wartość $E = 1$ i współczynnik kierunkowy prostej $C_t=f(\lg N_o)$ przyjmuje wartość -3,32, co świadczy o idealnie dobranych składnikach mieszaniny reakcyjnej i oznacza, że w każdym cyklu reakcji następuje podwojenie ilości produktu (rys. 3) [4,12].

Pamiętać należy, że wartość E obliczana na podstawie nachylenia krzywej wzorcowej jest wypadkową wydajności reakcji poszczególnych prób wykorzystanych do uzyskania krzywej wzorcowej. W konsekwencji strategia ta nie bierze pod uwagę różnic w wydajności PCR pomiędzy poszczególnymi próbami. W celu rozwiązania tego problemu opracowano alternatywne metody wyznaczania wydajności reakcji.



Rys. 3. Wyznaczanie efektywności PCR (E) na podstawie nachylenia krzywej standardowej wykreślonej w oparciu na wartości cykli progowych (C_t) uzyskanych dla określonych stężeń początkowych DNA (N_0). Powyżej znajduje się równanie krzywej oraz wartości współczynnika korelacji (R^2) i efektywności PCR (E).

Oparte są na analizie surowych danych pomiarów fluorescencji rejestrowanych podczas przebiegu QPCR. Kinetyka reakcji stanowi odzwierciedlenie jakości procesu, zatem dane pochodzące bezpośrednio z przebiegu i nachylenia krzywej opisującej przebieg reakcji w fazie wykładniczej, stanowią lepszą podstawę wyznaczania E [10,16,20].

Najczęściej stosowane metody obliczania E na podstawie nachylenia krzywej przyrostu fluorescencji opracowane zostały przez Liu i Saint [16] oraz Tichopada i wsp. [21]. Obie metody, pozwalają na wyznaczenie wydajności reakcji w indywidualnych próbach. W pierwszym etapie, wyznacza się zakres danych pomiarowych, w których przebieg reakcji ma charakter wykładniczy. Stosując metodę Liu i Saint eksperymentator na podstawie kształtu krzywej wzrostu fluorescencji, samodzielnie decyduje o tym, które dane mają charakter wykładniczy. Następnie w wyznaczonym zakresie danych arbitralnie wyznacza dwa punkty (A i B), którym odpowiadają określone wartości fluorescencji (R_{nA} i R_{nB}) przyporządkowane cyklom PCR: C_{TA} i C_{TB} . Dysponując podanymi danymi, wydajność PCR oblicza się według wzoru [17]:

$$E = \frac{R_{nA}}{R_{nB}}^{-(C_{TA} - C_{TB})} - 1. \quad (7)$$

Ponadto dysponując wszystkimi danymi z fazy wykładniczej można zastosować skalę logarytmiczną, następnie wykreślić prostą regresji dla logarytmu fluorescencji i cykli PCR, a wydajność reakcji wyliczyć na podstawie nachylenia prostej [16].

Metoda Tichopad i wsp. [21] w celu wyznaczenia fazy wykładniczej PCR przewiduje poddanie analizie statystycznej wszystkich danych pomiarów fluorescencji uzyskanych podczas całej reakcji począwszy od pierwszego cyklu, kończąc na ostatnim. Początek fazy wykładniczej wyznacza się metodą regresji prostoliniowej i wartości resztowych, natomiast za punkt graniczny pomiędzy fazą wykładniczą a logarymiczną uznaje się ostatni pomiar, który bezpośrednio poprzedza maksimum pierwszej pochodnej krzywej wzrostu fluorescencji. Wydajność oblicza się poprzez dopasowanie danych z obszaru wykładniczego do modelu wykładniczego [12,16,21].

4. Metody analizy ilościowej powielanych sekwencji

W celu oznaczenia stężeń badanej sekwencji w poszczególnych próbach stosuje się dwie metody: względną i bezwzględną. W metodzie bezwzględnej przewiduje się wykorzystanie krzywych wzorcowych sporządzonych w oparciu na seriach rozcieńczeń roztworu zawierającego znane stężenia powielanej sekwencji. W metodach względnych pozwala się wyrazić poziom tej sekwencji w próbach nieznanymi jako wielokrotność jej ilości w próbce referencyjnej, zwanej również kalibratorem. Rolę tę pełni zwykle próba stanowiąca wzorzec, punkt odniesienia do prowadzonych badań, nie poddawana żadnym manipulacjom eksperymentalnym [1,4,6,10,12,16,18].

Porównanie prób nieznanymi z kalibratorem zwykle poprzedza etap normalizacji poziomu ekspresji genu, która przeprowadzana jest w celu korekty różnic między porównywanymi próbkami. Różnice te wynikać mogą np. z odmiennych wydajności PCR poszczególnych prób lub błędów w pipetowaniu. W celu przeprowadzenia normalizacji, obok genu docelowego powiela się gen kontrolny. Poziom ekspresji genu kontrolnego powinien być stały w różnych tkankach, organizmach, czy wariantach doświadczenia, niezależnie od etapu rozwoju organizmu oraz stanu fizjologicznego tkanki. Nie powinien także ulegać zmianom w trakcie realizacji doświadczenia. Cechy te spełniają tzw. geny metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), które to wyrażane są na stałym poziomie we wszystkich typach komórek [2]. Wśród tych genów najczęściej wykorzystywane do normalizacji QPCR są: β -aktyna, GAPDH (dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego), cyklofilina, 18S rRNA, 28S rRNA, fosfoglicerokinaza, β 2-mikroglobulina oraz β -glukuronidaza [10].

4.1. Metody względne (relatywne)

W celu wyznaczenia względnego poziomu ekspresji badanego genu najczęściej stosuje się metodę z wykorzystaniem krzywej standardowej, tzw. metodę komparatywną ($\Delta\Delta C_t$), którą można także nazwać metodą porównawczą, oraz metodę Pfaffla [10].

Pierwsza z wymienionych metod oparta jest na generowaniu krzywej standardowej z serii rozcieńczeń matrycy. Stężenia standardów używanych do wygenerowania krzywej wyrażone są w jednostkach rozcieńczeń lub masy materiału wykorzystanego do izolacji kwasu nukleinowego. W przypadku badania ekspresji genów jako matrycę zastosować można np. cDNA o dokładnie wyznaczonym stężeniu. Wyniki dla prób badanych, odczytane z krzywej standardowej, wyrażone są w jednostkach względnych [1,4,12]. Jakość uzyskanych wyników zależy od zapewnienia takich samych warunków powielania kalibratora i próby badanej, tak aby wydajności reakcji (E) prób nieznanymi i próby referencyjnej były zbliżone. W każdej metodzie względnej ilość badanego genu wyrażana jest jako wielokrotność kalibratora. Jednak uzyskane wyniki wymagają normalizacji, dlatego konstruuje się zwykle dwie krzywe wzorcowe dla genu badanego i genu kontrolnego [1,4,12,16].

Metoda porównawcza (komparatywna) oparta jest na modelu matematycznym, który pozwala wyliczyć względną różnicę poziomu ekspresji badanego genu między próbami nieznanymi a próbą referencyjną. W pierwszym etapie wyznaczane są cykle progowe (C_t) reakcji powielania genów badanych i kontrolnych w próbach nieznanymi i w próbie referencyjnej. Kolejno, dla poszczególnych prób, wyliczane są różnice pomiędzy wartościami C_t PCR przebiegającej na matrycy genu badanego i genu kontrolnego (ΔC_t). Obliczenie przeprowadza się zarówno dla prób nieznanymi jak i kalibracyjnych [23]:

$$\begin{aligned}\Delta C_t (\text{próba nieznan}) &= C_t \text{ genu badanego} - C_t \text{ genu referencyjnego}, \\ \Delta C_t (\text{kalibrator}) &= C_t \text{ genu badanego} - C_t \text{ genu referencyjnego}.\end{aligned}$$

Następnie oblicza się $\Delta\Delta C_t$ dla każdej próby:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{próba nieznan}) - \Delta C_t (\text{kalibrator}).$$

Obliczanie znormalizowanej wartości względnego poziomu ekspresji badanego genu w próbie nieznanymi względem kalibratora przeprowadza się według wzoru [23]:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}. \quad (8)$$

Uzyskiwane w ten sposób wyniki wyrażane są jako wielokrotność próby kalibracyjnej. Wartość parametru R równa 1 oznacza, że poziom ekspresji lub liczba kopii genu w próbie kalibracyjnej i nieznanymi są jednakowe. Liczba mniejsza od jedności wskazuje na wyższy poziom ekspresji w próbie kalibracyjnej zaś większa, na wyższą ekspresję genu w próbie nieznanymi w porównaniu z próbą referencyjną [1,4,12,16].

Warunkiem stosowania metody komparatywnej są zbliżone efektywności reakcji powielania sekwencji genu badanego i genu referencyjnego. Dlatego zastosowanie tej metody poprzedza porównanie wydajności reakcji (E). W tym celu należy prze-

śledzić zmiany ΔC_t (różnica między wartościami C_t genu badanego i referencyjnego dla tej samej początkowej ilości matrycy) uzyskane dla serii rozcieńczeń matrycy. Jeżeli wydajność powielania dwóch amplikonów jest w przybliżeniu równa, nachylenie wykresu zależności ΔC_t od logarytmu stężenia matrycy będzie mniejsze od 0,1. Oznacza to, że obie reakcje charakteryzują się zbliżoną wydajnością i stosowanie metody $\Delta\Delta C_t$ jest dopuszczalne [1,4,12].

Wielokrotnie wykazano, że wydajności PCR genu badanego i kontrolnego nie są podobne, co wyklucza stosowanie metody $\Delta\Delta C_t$. Z myślą o takich sytuacjach badawczych opracowano metody, które przewidują korekcję danych pod kątem różnic w wydajności PCR. Jedną z takich metod jest model Pfaffla, w przypadku którego wzór matematyczny uwzględnia zarówno normalizację, jak i porównanie poziomu transkryptu w próbce nieznannej i kalibracyjnej [24]. Metoda ta wymaga wyznaczenia efektywności powielania genu badanego i referencyjnego. Jednak wydajności PCR genu badanego i referencyjnego nie muszą być podobne. Następnie wyznaczane są cykle progowe (C_t) PCR genu badanego i genu referencyjnego dla prób badanych i kalibratora. Autor modelu proponuje obliczanie względnego poziomu ekspresji badanego genu według wzoru [24]:

$$R = \frac{(E_{\text{gen badany}})^{\Delta C_p \text{ gen badany (kontrola-próba)}}}{(E_{\text{gen kontrolny}})^{\Delta C_p \text{ gen kontrolny (kontrola-próba)}}, \quad (9)$$

gdzie: R – poziom badanego transkryptu w próbce nieznannej wyrażony jako wielokrotność kalibratora; $E_{\text{gen badany}}$ – wydajność powielania genu badanego; $E_{\text{gen kontrolny}}$ – wydajność powielania genu kontrolnego; $\Delta C_p \text{ gen badany}$ – różnica cykli progowych wyznaczonych dla genu badanego w próbce kalibracyjnej i nieznannej; $\Delta C_p \text{ gen kontrolny}$ – różnica cykli progowych PCR genu kontrolnego między próbą kalibracyjną i nieznaną [24].

Liu i Saint opracowali metodę normalizacji poziomu ekspresji badanego genu względem genu kontrolnego w sytuacjach kiedy wydajności powielania obydwu genów są różne [16]. W celu wyprowadzenia wzoru na znormalizowany poziom transkryptu w badanej próbce autorzy proponują odpowiednie przekształcenie wzoru (1) opisującego przyrost produktu PCR w fazie wykładniczej. Ponieważ fluorescencja próby (R) jest proporcjonalna do stężenia amplikonu (N), aby wyrazić przyrost produktów powielania genu badanego i kontrolnego, wzór (1) można przekształcić do postaci:

$$R_{n,R} = R_{0,R}(E_R + 1)^n, \quad (10)$$

$$R_{n,T} = R_{0,T}(E_T + 1)^n, \quad (11)$$

gdzie: $R_{0,T}$ i $R_{0,R}$ – początkowa fluorescencja barwnika reporterowego dla genu badanego (T) i kontrolnego (R), a $R_{n,T}$ i $R_{n,R}$ – fluorescencja w cyklu n genu badanego

(T) i kontrolnego (R); E_T i E_R wydajność powielania sekwencji genu badanego (T) i kontrolnego (R), n – cykl należący do fazy wykładniczej PCR. Dysponując tymi danymi znormalizowany poziom powielanej sekwencji w próbce nieznanej ($R_{0,T}/R_{0,R}$) oblicza się według wzoru [16]:

$$\frac{R_{0,T}}{R_{0,R}} = \frac{R_{n,T} (1 + E_R)^n}{R_{n,R} (1 + E_T)^n} \quad (12)$$

4.2. Metoda ilościowa absolutna

Metoda absolutna, podobnie jak względna, oparta jest na porównaniu wartości cykli progowych próby badanej do referencyjnej, z tą różnicą, że stężenie tej drugiej jest znane i wyrażone w odpowiednich jednostkach, np. jako liczba kopii lub nanogramów sekwencji na jednostkę objętości (μ l). Reakcje z udziałem próby nieznanej i standardów prowadzone są w oddzielnych studzienkach. Uzyskana krzywa standardowa określana jest mianem krzywej zewnętrznej [1,4,12,16,20].

Do najczęściej stosowanych standardów należą: rekombinowane plazmidy, genomowy DNA, produkty PCR oraz syntetyczne oligonukleotydy [4,6]. W badaniach nad ekspresją genów jako standardu używa się często fragmentu cDNA wklonowanego w wektor. Taki insert uzyskiwany jest w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji z całkowitego RNA lub mRNA z udziałem starterów specyficznych dla badanego genu [2,4].

Najczęściej stosowaną metodą generowania krzywej standardowej, jest wklonowywanie w plazmidowy DNA produktu PCR. Zaletą tej metody jest możliwość produkcji dużej liczby kopii matrycy, które mogą zostać wykorzystane także w późniejszych reakcjach. Uzyskiwane standardy przed użyciem w QPCR muszą zostać zlinearyzowane, gdyż wydajność reakcji powielania cząsteczek o konformacji superzwiniętej (ang. *supercoiled*) często odbiega od form liniowych, a następnie spektrofotometrycznie zmierzone w celu oznaczenia ich stężenia [25]. Inna metoda uzyskiwania standardów przewiduje zastosowanie syntetycznych oligonukleotydów, których sekwencja jest taka sama jak produktu uzyskanego w wyniku powielania badanych fragmentów DNA [4].

W przypadku, gdy badana sekwencja DNA występuje w pojedynczej liczbie kopii w genomie badanego organizmu, wówczas jako standardu można użyć genomowego DNA. Jako standardu używać można także oczyszczonego produktu PCR. W celu przygotowania standardów stężenie produktu PCR oznacza się spektrofotometrycznie lub densytometrycznie [4,25].

Stosowanie absolutnej metody ilościowej z użyciem zewnętrznej krzywej standardowej nie pozwala na wykrywanie ewentualnych inhibitorów PCR obecnych w próbce, które redukując efektywność reakcji powielania badanego fragmentu matrycy, pośrednio wpływają także na jakość i dokładność wykonywanych oznaczeń. Dlatego w celu zweryfikowania danych uzyskiwanych w czasie reakcji ilościowego PCR stosowana jest

wewnętrzna kontrola (ang. *internal control*) [10]. W tym celu do próby badanej dodawane jest określone stężenie matrycy, której przyporządkowana jest znana wartość C_t . Jeżeli przy zastosowaniu wewnętrznej kontroli uzyskuje się C_t inny od spodziewanego, znaczy to, że w mieszaninie reakcyjnej obecne są inhibitory obniżające efektywność prowadzonej reakcji powielania. Sekwencja, która spełniać ma rolę kontroli powinna być powielana przy udziale tych samych starterów, co sekwencja docelowa (wyklucza to potrzebę stosowania dwóch par starterów) oraz mieć identyczną efektywność reakcji powielania. Wewnętrzna kontrola powinna generować produkt możliwy do odróżnienia od produktu powstającego na matrycy sekwencji docelowej. Różnica może dotyczyć długości produktu, a jeżeli PCR jest monitorowana za pomocą sond może polegać na nieznaczących różnicach w sekwencji produktów powstających na obydwu matrycach. Reakcje z udziałem wewnętrznej kontroli przeprowadzane są przy udziale dwóch sond molekularnych wyznakowanych różnymi barwnikami, tak by możliwa była detekcja i rozróżnienie sygnału fluorescencyjnego emitowanego przez sekwencje docelową i wewnętrzną kontrolę [10].

Praca powstała podczas realizacji grantu pomostowego (552 CM/13) oraz grantu nr 525-B, ufundowanych przez rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Literatura

1. Bubner B., Baldwin I. T., (2004), *Plant Cell Rep.*, 23, 263-271.
2. Bustin S. A., (2000), *J. Mol. Endocrinol.*, 25, 169-193.
3. Freeman W. M., Walker S. J., Vrana K. E., (1999), *BioTechniques*, 26, 112-125.
4. Ginzinger D. G., (2002), *J. Mol. Endocrinol.*, 30, 503-512.
5. Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A., (2002), *Nucl. Acid. Res.*, 30, 1292-1305.
6. Mackay I. M., (2004), *CMI*, 10, 190-212.
7. Mocellin S., Rossi C. R., Marincola F. M., (2003), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 51, 301-313.
8. Nebenführ A., Lomax T. L., (1998), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 16, 323-339.
9. Peters I. R., Helps C. R., Hall E. J., (2004), *J. Immunol. Meth.*, 286, 203-217.
10. Wong M. L., Medrano J. F., (2005), *BioTechniques*, 39, 1-11.
11. Luu-The V., Paquet N., Calvo E., Cumps J., (2005), *BioTechniques*, 38, 287-293.
12. Pfaffl M. W., (2003), *Live stock transcriptomics: quantitative mRNA analytics in molecular endocrinology and physiology*, rozprawa habilitacyjna. Technische Universität München – Weihenstephan. (www.gene-quantification.de).
13. Tichopad A., Didier A., Pfaffl M. W., (2004), *Mol. Cell. Probes*, 18, 45-50.
14. Wilhelm J., Pingound A., Hahn M., (2003), *Anal. Biochem.*, 318, 218-225.
15. www.techne.com/CatMol/quantica.html.
16. Liu W., Saint D. A., (2002), *Anal. Biochem.*, 302, 52-59.
17. Øvstbø R., Haug K. B., Lande K., (2003), *Clinical Chem.*, 49, 425-432.
18. Schmittgen T. D., (2001), *Methods*, 25, 383-385.
19. Rutledge R. G., Côte C., (2003), *Nucl. Acids. Res.*, 31, e93.
20. Ramakers C., Ruijter J. M., Deprez R. H. L., (2003), *Neurosc. Lett.*, 339, 62-66.
21. Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., (2003), *Nucl. Acid. Res.*, 31, e122.
22. Liu W., Saint D. A., (2004), *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 294, 347-353.
23. Livak K. J., Schmittgen T. D., (2001), *Methods*, 25, 402-408.
24. Pfaffl M. W., (2001), *Nucl. Acids Res.*, 29, 2002-2007.
25. O'Mahony J., Hill C., (2002), *J. Microbiol. Meth.*, 51, 283-293.