

Polymerázová reťazová reakcia ako metóda na analýzu potravín

TOMÁŠ KUČHTA

SÚHRN. Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je metóda, ktorá v nadväznosti na izoláciu DNA umožňuje analýzu zložiek potravín rastlinného, živočíšneho alebo mikrobiálneho pôvodu, a tiež identifikáciu mikroorganizmov v potravinách. V článku sa prezentuje charakteristika PCR a real-time PCR z hľadiska zloženia reakčnej zmesi, termocyklérov, protikontaminačných opatrení, spôsobov na zábranu inhibície a druhov amplifikačnej kontroly. Pozornosť sa venuje tiež PCR v usporiadaní multiplex a kvantitatívnej real-time PCR.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: polymerázová reťazová reakcia; DNA; analýza potravín

Hlavnými zložkami potravín sú zložky mikrobiálneho, rastlinného a živočíšneho pôvodu. Keďže tieto obsahujú bunkový materiál, je možné na ich analýzu použiť metódy analýzy DNA. K najrozšírenejším metódam analýzy DNA v súčasnosti patrí polymerázová reťazová reakcia (PCR) [1]. V poslednom čase sa táto metóda začína uplatňovať v analýze potravín, a to na rýchly dôkaz patogénnych mikroorganizmov [2], dôkaz a kvantifikáciu geneticky modifikovaných organizmov (GMO) [3] a na identifikáciu rôznych zložiek potravín v súvislosti s ich alergénnosťou [4] alebo autentifikáciou potravín [5].

Hoci využitie PCR na analýzu potravín je ešte len v začiatkoch, vzhľadom na svoj potenciál a na základe analógie s modernými inštrumentálnymi metódami chemickej analýzy potravín možno predpokladať, že možno už v blízkej budúcnosti sa zaradí k bežným a rozšíreným metódam analýzy potravín.

RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Oddelenie mikrobiológie a molekulárnej biológie, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.
E-mail: kuchta@vup.sk

V predkladanom článku sa prezentuje charakteristika PCR a real-time PCR, zloženia reakčnej zmesi a jednotlivých reakčných zložiek (termo-stabilná DNA polymeráza, priméry a sondy, horečnaté katióny, deoxyribonukleotidy), teplotného programu, termocyklérov pre klasickú PCR a pre real-time PCR, protikontaminačných opatrení vrátane uracil-DNA-glykozyázového protikontaminačného systému, spôsobov na zábranu inhibície PCR a druhov amplifikačnej kontroly. Pozornosť sa venuje tiež PCR v usporiadaní multiplex a kvantitatívnej real-time PCR, vrátane diskusie problematiky interných štandardov.

Princíp a základná charakteristika polymerázovej refazovej reakcie (PCR)

Klasická PCR

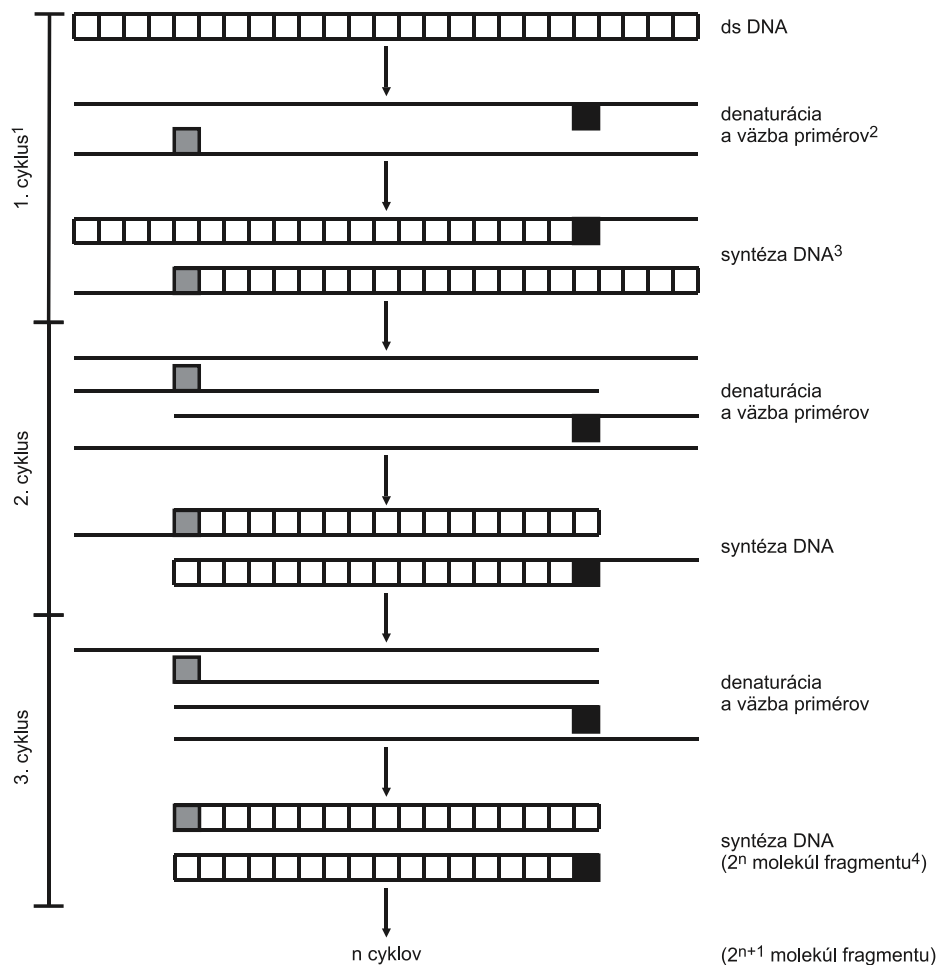
Polymerázová refazová reakcia (Polymerase Chain Reaction, PCR [6, 7]) je metóda na rozmnoženie (amplifikáciu) definovaného úseku DNA v podmienkach in vitro. Pomocou PCR je možné vytvoriť desiatky miliónov kópií úseku DNA v priebehu niekoľkých desiatok minút.

PCR pozostáva z opakujúcich sa cyklov, z ktorých každý sa skladá z nasledujúcich krokov prebiehajúcich pri definovanej teplote:

1. rozpletenie (denaturácia) DNA, t. j. konverzia dvojvláknovej DNA na jednovláknovú pri teplote 94–95 °C,
2. príľnutie (annealing) oligonukleotidových primérov k homologickým úsekom DNA pri teplote 37–70 °C,
3. dosyntetizovanie (polymerizácia) druhého vlákna DNA z nukleotidov pomocou termostabilnej DNA polymerázy pri teplote 60–72 °C.

Na amplifikáciu vybraného úseku DNA sa použijú dva oligonukleotidové priméry, z ktorých jeden je homologický k úseku jedného vlákna DNA a druhý je homologický k inému, vhodne vzdialenému (spravidla 70 bp až 3000 bp) úseku druhého vlákna DNA. Použitie takýchto primérov vedie v prvom cykle PCR ku vzniku dvoch druhov fragmentov DNA, ktorých vlákno začína jedným alebo druhým uvedeným primérom a dosahuje dĺžku niekoľko sto až niekoľko tisíc básových párov, akú sa podarí nasyntetizovať počas trvania polymerizácie. V druhom cykle PCR príľnú oligonukleotidové priméry okrem pôvodnej DNA aj na nové, kratšie fragmenty DNA, na ktorých polymerizácia skončí skôr a vzniknú fragmenty DNA začínajúce jedným primérom a končiace sekvenciou homologickou k druhému priméru (obr. 1) [8]. V ďalšom priebehu PCR sa ako templát uplatňujú prakticky výlučne

nové, krátke fragmenty DNA, v každom cykle sa ich počet zdvojnásobí, amplifikácia má exponenciálny charakter a počet fragmentov N_n v cykle n tejto časti PCR je možné vypočítať ako $N_n = N_0 \cdot 2^n$, kde N_0 je počet fragmentov DNA na začiatku exponenciálnej časti PCR [1].



OBR. 1. Schématické znázornenie prvých troch cyklov PCR.
V druhom a treťom cykle sú z dôvodu prehľadnosti znázornené len novovzniknuté kratšie fragmenty DNA.

FIG. 1. A scheme of the first three cycles of PCR.

For clarity reasons, only newly synthesized shorter DNA fragments are shown for the second and the third cycles.

1 - cycle, 2 - denaturation and binding of primers, 3 - DNA synthesis, 4 - molecules of the fragment.

PCR sa prakticky realizuje v programovateľnom termostate, termocykléri. V klasickej verzii sa vzorka DNA po ukončení PCR analyzuje elektroforézou v agarózovom géli a hodnotí sa prítomnosť alebo neprítomnosť fragmentu DNA určitej molekulovej hmotnosti.

Hlavnou aplikáciou PCR je rýchly (15 min až 2 h), vysokocitlivý (detekčný limit $\geq 10^0$ molekúl) a vysokoselektívny dôkaz určitého definovaného fragmentu DNA v zmesi s inými fragmentmi DNA, ktoré môžu byť vo veľkom ($\geq 10^5$ -násobnom) nadbytku. Pri analýze potravín sa PCR používa na dôkaz určitého druhu DNA, ktorý je charakteristickým komponentom určitého druhu mikroorganizmov, rastlín alebo živočíchov.

Real-time PCR

V posledných rokoch sa vo výskume a analytickej praxi čoraz viac používa tzv. real-time PCR, čo je PCR s priebežným monitorovaním fluorescence. Na rozdiel od vyššie opísanej klasickej, tzv. end-point PCR, sa pri tejto metóde prítomnosť amplifikovaných fragmentov DNA zisťuje na základe nárastu fluorescence počas PCR. Zdrojom fluorescence je komplex DNA s interkalačným farbivom SybrGreen I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), alebo rôzne fluorescenčne označené sondy alebo priméry. V prípade real-time PCR s farbivom SybrGreen sa v priebehu PCR nešpecificky sleduje množstvo všetkej DNA vo vzorke a po ukončení PCR sa vykoná analýza amplifikovaných fragmentov DNA na základe stanovenia závislosti fluorescence od teploty (melting curve analysis). Spomedzi viacerých navrhnutých spôsobov real-time PCR s fluorescenčne označenými sondami alebo primérami sa na základe prakticky overenej robustnosti najviac rozšírila tzv. 5'-nukleázová PCR [9]. Táto metóda využíva v PCR oligonukleotidové sondy tzv. typu TaqMan, ktoré sú homologické k časti amplifikovaného fragmentu. Sondy sú označené fluorescenčným farbivom naviazaným na 5'-konci, pričom na 3'-konci je naviazaný zhášač, ktorý zabezpečuje, že intaktná sonda v reakčnej zmesi nefluoreskuje v danej oblasti vlnových dĺžok. Sondy sa navrhujú tak, aby mali teplotu topenia o niečo vyššiu ako priméry a používa sa teplotný program PCR s dvojkrokovými cyklami. Prvým krokom každého cyklu je denaturácia, v druhom kroku dôjde najprv k prilnutiu sondy a následne k prilnutiu primérov i polymerizácii. Keď DNA polymeráza pri polymerizácii naďabí na naviazanú sondu, postupne ju „pred sebou“ hydrolyzuje, pričom sa do roztoku uvoľní fluorescenčné farbivo. Fluorometrické stanovenie tohoto farbiva umožňuje sledovať amplifikáciu počas PCR, pričom koncentrácia fluorescenčného farbiva je úmerná množstvu daných amplifikovaných fragmentov DNA. Použitie viacerých sond označených rôznymi fluorescenčnými farbivami umožňuje sledovať amplifikáciu viacerých fragmentov DNA súčasne [10].

Hlavnými výhodami real-time PCR je minimalizácia rizika kontaminácie laboratórneho prostredia amplifikovanými fragmentmi DNA vďaka uzavretosti systému, a možnosť kvantifikácie špecifického fragmentu DNA na základe priebehu amplifikačných kriviek (pozri ďalej).

Zložky reakčnej zmesi

Termostabilné DNA polymerázy

Predpokladom pre vykonanie PCR je použitie termostabilnej DNA polymerázy, ktorá si počas PCR a najmä počas denaturačných krokov zachováva aktivitu. Najčastejšie sa používa termostabilná DNA polymeráza izolovaná z termofilnej baktérie *Thermus aquaticus* a označuje sa ako *Taq* DNA polymeráza. Mierne odlišné vlastnosti môžu mať enzýmové preparáty pripravené z iných druhov tohoto rodu. Z technologických dôvodov sa enzým pripravuje v rekombinantnej *Escherichia coli* a len v špeciálnych prípadoch, keď by prípadná prítomnosť stôp DNA z *E. coli* mohla prekážať, sa používa enzým izolovaný z pôvodnej termofilnej baktérie.

Optimálna teplota pre aktivitu *Taq* DNA polymerázy je 65–72 °C a optimálne pH je okolo 9,0. Teplotná stabilita enzýmu je pri 100 °C približne 5 min, potom dochádza k inaktivácii enzýmu, ale pri 95 °C sa tento čas podstatne predlžuje. Pre svoju aktivitu vyžaduje *Taq* DNA polymeráza prítomnosť iónov Mg^{2+} .

Na analýzu potravín sa v súčasnosti rozšírilo používanie tepelne aktivovaných *Taq* DNA polymeráz, ktoré sú pri laboratórnej teplote neaktívne až do zahriatia na teplotu 94–95 °C na určenú dobu. Pri použití tepelne aktivovanej *Taq* DNA polymerázy sa silne obmedzuje amplifikácia nešpecifických fragmentov DNA s čiastočnou homológiou v oblasti primérov, ku ktorej inak môže dôjsť na začiatku PCR počas prípravy reakčnej zmesi i pri teplote 0–5 °C. Niektoré tepelne aktivované *Taq* DNA polymerázy sú uvedené v tab. 1.

Pre klasickú PCR sa odporúča používať *Taq* DNA polymerázu v množstve minimálne 1 U na jednu reakčnú dávku. Pre 5'-nukleázovú real-time PCR sa odporúča 1,25–2,5 U *Taq* DNA polymerázy na jednu reakčnú dávku.

Priméry, sondy

Selektivitu PCR určuje voľba oligonukleotidových primérov a v prípade 5'-nukleázovej real-time PCR aj voľba sondy. Tieto sa navrhujú na základe známych sekvencií DNA cieľového organizmu, pričom sa používa špecializovaný softvér, napr. Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) alebo Beacon Designer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Softvér

TAB. 1. Niektoré tepelne aktivované *Taq* DNA polymerázy.
 TAB. 1. Some temperature-activated *Taq* DNA polymerases.

Preparát ¹	Výrobca ²	Spôsob inaktivácie ³	Doba aktivácie ⁴
AmpliTaq Gold	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	chemická modifikácia ⁵	5–10 min
FastStart Taq	Roche Diagnostics, Mannheim, Nemecko	chemická modifikácia	2–4 min
HotMaster Taq	Eppendorf, Hamburg, Nemecko	reverzibilná väzba inhibítora ⁶	2 min
HotStar Taq	Qiagen, Hilden, Nemecko	chemická modifikácia	15 min
iTaq	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	väzba protilátky ⁷	3 min
Platinum Taq	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	väzba protilátky	0,5–2 min
TaKaRa Taq HS	TaKaRa, Shiga, Japonsko	väzba protilátky	0,5 min
Thermo-Start	AB Gene, Epsom, Veľká Británia	chemická modifikácia	10–20 min

1 - brand, 2 - producer, 3 - mode of inactivation, 4 - time of activation, 5 - chemical modification, 6 - reversible inhibitor binding, 7 - antibody binding.

pri navrhovaní primérov a sond zohľadňuje požiadavky na teplotu topenia, vylúčenie vnútromolekulových sekundárnych štruktúr, dimérov, guanidín na 5'-konci a ďalšie požiadavky. Selektivitu navrhnutých prajmerov a sond je potrebné overiť porovnaním v rámci databázy sekvencií DNA pomocou softvéru Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA).

Priméry sa v PCR používajú zvyčajne v koncentrácii 300–500 nmol.dm⁻³, ich množstvo je niekedy vhodné optimalizovať z hľadiska výťažku a selektivity amplifikácie. V 5'-nukleázovej real-time PCR sa sonda používa zvyčajne v koncentrácii 200 nmol.dm⁻³.

Horečnaté kationy

V klasickej PCR sa najčastejšie používajú Mg²⁺ v koncentrácii 1,5 mmol.dm⁻³. Zvýšenie tejto koncentrácie vedie k vzrastu výťažku amplifikácie na úkor zníženia selektivity. 5'-Nukleázová real-time PCR vyžaduje vyššiu koncentráciu Mg²⁺ (2,5–5 mmol.dm⁻³).

Deoxyribonukleotidy

Deoxyribonukleotidy (dNTP) ako monoméry pre polymerizačnú reakciu sa používajú vo forme ekvimolárnej zmesi dATP, dCTP, dGTP a dTTP v koncentrácii 200–400 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ každého.

Teplotný program

Aby sa dosiahla dôkladná denaturácia DNA na začiatku klasickej PCR, začína teplotný program spravidla úvodnou denaturáciou pri 94–95 °C počas 1–15 min. Potom nasleduje 30–40 cyklov pozostávajúcich z denaturácie pri 94–95 °C počas 15 s až 1 min, príľnutia pri optimalizovanej teplote počas 15 s až 1 min a polymerizácie pri 72 °C počas 30 s až 2 min. Trvanie jednotlivých krokov sa určuje hlavne podľa kvality termocykléra a podľa veľkosti amplifikovaného fragmentu DNA. Optimalizáciu teplotného programu je vhodné začínať s dlhšími časmi výdrže. Pri použití cykléra, ktorý presne dodržiava naprogramované hodnoty výdrže pri nastavenej teplote, je možné skúsiť výdrže skrátiť, čím sa skráti doba analýzy a môže sa aj zvýšiť výťažok, keďže sa zvýši životnosť DNA polymerázy.

Zvláštnou kapitolou optimalizácie teplotného programu zvyklo byť optimalizácia teploty príľnutia, pretože vypočítané teploty topenia sa zvyčajne nedajú priamo prakticky použiť. Tento problém je možné v súčasnosti riešiť použitím cykléra s tzv. gradientovým blokom, ktorý umožňuje v jednom behu cykléra nastaviť rôzne teploty príľnutia v jednotlivých riadkoch alebo stĺpcoch bloku.

Na konci teplotného programu sa zvykne zaradiť niekoľkominútová záverečná polymerizácia, ktorá v prípade dlhých amplikónov umožňuje dosyntetizovať všetky fragmenty a tým sa dosiahne zvýšenie homogenity produktu amplifikácie.

Počet cyklov sa odporúča v prípade mikrobiologickej aplikácie 30 až 35, v prípade iných aplikácií 35 až 40. Zvyšovanie počtu cyklov zlepšuje citlivosť (znižuje detekčný limit), avšak za cenu zníženia selektivity a zvýšenia nebezpečenstva falošne pozitívnych výsledkov. Odporúča sa radšej znížiť počet cyklov (t. j. použiť stredne citlivú PCR) a optimalizovať prípravu vzorky [11].

V 5'-nukleázovej real-time PCR sa uplatňuje tendencia používať univerzálny teplotný program, pozostávajúci z úvodnej denaturácie pri 94 °C počas doby, potrebnej na aktiváciu DNA polymerázy, a z 40–60 cyklov zahrňujúcich denaturáciu pri 94 °C počas 15 s a príľnutie pri 60 °C počas 1 min. Používaniu tohoto univerzálného teplotného programu sa podriadiuje opti-

malizácia zložiek reakcie. Velkou praktickou výhodou používania univerzálneho teplotného programu je možnosť vykonať rôzne analýzy v jednom behu cykléra.

Termocykléry

Termocykléry pre klasickú PCR

Technika termocyklérov sa v posledných rokoch značne zdokonalila a ustálili sa určité uprednostňované riešenia. V súčasnosti sú najrozšírenejšie termocykléry s 96-jamkovým termoelektrickým modulom (termoblokom). Dostupné sú už termobloky, ktorých technické parametre sa zachovávajú počas niekoľkoročného používania. Na základe meraní sa zistilo, že termocykléry firiem Applied Biosystems a Bio-Rad presne dodržiavajú nastavené hodnoty teplotného programu [12]. Termocykléry na princípe ohrevu tepelným žiarením a chladenia vzduchom, čo je najlacnejšie riešenie, vyžadujú na dosiahnutie dostatočnej účinnosti umiestnenie vzoriek v sklenených kapilárach. Toto technické riešenie vyniká rýchlosťou, ktorá je dôležitá pre ich pôvodné určenie na vojenské použitie. Rôznymi technickými úpravami ako je použitie strieborného alebo nízkeho (low-profile) termobloku je možné zrýchliť ohrev a chladenie aj v prípade termocyklérov s termoelektrickým ohrevom a chladením. Pri použití na analýzu potravín však rýchlosť PCR nie je prvoradá, keďže predchádzajúca príprava vzorky trvá niekoľko hodín alebo aj dní [2].

Termocykléry pre real-time PCR

Pre real-time PCR sú potrebné prístroje, v ktorých je integrovaný termocyklér s fluorometrom. Takéto prístroje sa vyrábajú a používajú už niekoľko rokov a tiež sa začínajú ušľachťovať určité efektívne technické riešenia. Pri použití v PCR na analýzu potravín treba nevyhnutne počítať s používaním interného štandardu (pozri ďalej), a teda je potrebný real-time cyklér s optickou časťou s minimálne dvoma čo najmenej interferujúcimi fluorometrickými kanálmi. Najdokonalejšie riešenie je snímať celé emisné spektrum, ako je to napríklad v prípade prístroja Prism 7900 (Applied Biosystems). To si však vyžaduje veľmi intenzívnu excitáciu, ktorá sa dosahuje použitím laseru a tým sa toto technické riešenie stáva veľmi drahým. Menej dokonalé, ale podstatne lacnejšie riešenie predstavuje použitie filrovej optiky s definovaným excitačným a emisným filtrom pre každý fluorometrický kanál. Použitie pomerne slabého excitačného zdroja (halogénovej lampy) vyžaduje použitie fotonásobiča alebo iného optického zosilnenia na detekciu emisie.

Ak sa použije silnejší excitačný zdroj (diódy emitujúce svetlo, LED), stačí na detekciu emisie najlacnejšie riešenie vo forme skenujúcich fotodiód.

Čo sa týka ohrevu a chladenia, väčšina prístrojov pre real-time PCR používa termoelektrický ohrev a chladenie. Kapilárny prístroj LightCycler (Roche, Indianapolis, IN, USA) s ohrevom žiarením a chladením vzduchom je síce veľmi rýchly, ale ako sa už spomenulo, v analýze potravín je vhodné uprednostniť presné a spoľahlivé riešenia, keďže trvanie PCR predstavuje len zlomok celkového času analýzy a rýchlosť PCR nie je prvoradá.

Prehľad niektorých termocyklérov pre real-time PCR uvádza tab. 2.

TAB. 2. Niektoré termocykléry pre real-time PCR.

TAB. 2. Some thermocyclers for real-time PCR.

Prístroj ¹	Výrobca ²	Spôsob excitácie ³	Spôsob detekcie ⁴
Chromo 4	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	diódy emitujúce svetlo ⁵	fotodióda ⁶
iCycler iQ	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	halogénová žiarovka ⁷	CCD-kamera ⁸
MX-3000P	Stratagene, La Jolla, CA, USA	halogénová žiarovka	fotonásobič ⁹
Prism 7500	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	halogénová žiarovka	CCD-kamera
Prism 7900	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	laser	spektrograf ¹⁰
Quantica	Techne, Cambridge, Veľká Británia	halogénová žiarovka	fotonásobič

1 - instrument, 2 - manufacturer, 3 - way of excitation, 4 - way of detection, 5 - light emitting diodes, 6 - photodiode, 7 - halogen lamp, 8 - CCD-camera, 9 - photomultiplier, 10 - spectrograph.

Protikontaminačné opatrenia

Základné pravidlá predchádzania kontaminácii

Vzhľadom na vysokú citlivosť PCR je veľmi dôležitou stránkou jej praktického použitia vykonávanie protikontaminačných opatrení. K nim patrí používanie jednorazového plastového materiálu kategórie čistoty „DNA-free“ vrátane špic k mechanickým pipetám s protiaerosolovým filtrom, práca so zásobnými roztokmi a vodou rozdelenými a skladovanými v malých

dávkach, príprava vzoriek a reakčných zmesí v oddelených priestoroch, ktoré sú dôkladne dekontaminované použitím UV-C-svetla a roztoku chlórnanu, a podobne pravidelná dekontaminácia laboratórnych pomôcok. Závažným zdrojom kontaminácie môže byť otváranie skúmaviek po PCR a ich pipetovanie do gélu pri elektroforetickej analýze. Táto práca sa musí vykonávať v oddelenom priestore a súčasným trendom je úplne sa otváraniu skúmaviek po PCR vyhnúť použitím real-time PCR alebo end-point fluorometrie [13].

Uracil-DNA-glykozylázový protikontaminačný systém

Ďalším opatrením, ktoré bráni kontaminácii novej reakčnej zmesi produktami predchádzajúcej PCR, je použitie uracil-DNA-glykozylázového systému. Jeho princípom je použitie dUTP v reakčnej zmesi namiesto dTTP, v dôsledku čoho sa v PCR syntetizujú fragmenty uracilovej DNA. Na začiatku každej PCR sa potom degraduje prípadná prítomná uracilová DNA použitím uracil-N-glykozylázy. Pri zahriatí počas prvej denaturácie v PCR stratí uracil-N-glykozyláza aktivitu a PCR ďalej prebieha zvyčajným spôsobom [14].

Zábrana inhibície PCR

Vzhľadom na komplexnosť potravinových matric nie je v niektorých prípadoch možné dosiahnuť, aby preparát DNA, ktorý sa pridáva do PCR, neobsahoval inhibítory PCR. Preto niektorí autori odporúčajú používať vybrané druhy termostabilných DNA polymeráz, ktoré sú odolnejšie voči inhibítorom, napríklad *Tth* DNA polymerázu [15] a doplniť reakčnú zmes PCR o látky, ktoré pomáhajú prekonať prípadnú inhibíciu PCR zložkami potravín, konkrétne o hovädzí sérumalbumín [16]. Účinok týchto protiinhibičných opatrení sa však v podmienkach nášho laboratória nepotvrdil a preto odporúčame vždy identifikovať amplifikovateľnosť preparátu DNA použitím amplifikačnej internej kontroly.

Amplifikačná kontrola

Na potvrdenie amplifikovateľnosti preparátu DNA a tým vylúčenie falošne negatívnych výsledkov kvalitatívnej PCR sa používa amplifikačná kontrola. Ako exogénna amplifikačná kontrola sa používajú rôzne plazmidy alebo baktériofág λ , ktoré sa pridávajú do PCR a detegujú sa pomocou samostatnej dvojice primérov a prípadne sondy (TaqMan Exogenous internal positi-

ve control, Applied Biosystems). Inou možnosťou je exogénna amplifikačná kontrola typu mimic, čo je špeciálne pripravený plazmid alebo fragment DNA, ktorý sa amplifikuje pomocou tej istej dvojice primérov a identifikuje sa na základe odlišnej veľkosti amplikónu alebo pomocou druhej sondy [17, 18]. Ďalšou možnosťou je použitie endogénnej amplifikačnej kontroly, t. j. sekvencie DNA, ktorá sa nachádza v každej vzorke prokaryotickej DNA [19] alebo eukaryotickej DNA [20]. Exogénna alebo endogénna amplifikačná kontrola sa môže použiť externe, t. j. PCR s kontrolou a so vzorkou sa robia v samostatných skúmavkách, alebo interne, keď sa kontrola analyzuje v tej istej skúmavke ako vzorka použitím PCR v usporiadaní duplex (pozri nižšie). Použitie internej amplifikačnej kontroly je vhodnejšie, keďže umožňuje identifikovať vzorky, v ktorých PCR neprebehla a správne vyhodnotiť PCR (tab. 3).

TAB. 3. Schéma vyhodnotenia PCR pri použití internej amplifikačnej kontroly.
TAB. 3. A scheme for the evaluation of PCR at the use of an internal amplification control.

Cieľový amplikón ¹	Interná kontrola ²	Výsledok ³
+	+	pozitívny ⁴
+	–	pozitívny
–	+	negatívny ⁵
–	–	neurčený ⁶

1 - target amplicon, 2 - internal control, 3 - result, 4 - positive, 5 - negative, 6 - undefined.

Špecifické usporiadania PCR

Multiplex PCR

Multiplex PCR je usporiadanie, keď sa niekoľko súprav primérov a prípadne sond použije v jednej skúmavke, čím sa umožní súčasný dôkaz viacerých sekvencií DNA. Takéto usporiadanie je síce rýchle a úsporné, avšak môže pri ňom dochádzať k interferencii medzi jednotlivými reakciami, ku kompetícii a v prípade poriadkovo odlišných množstiev jednotlivých templátov aj k falošne negatívnym výsledkom. Pre praktické účely sa odporúča použitie najviac dvoch súprav primérov a prípadne sond v jednej skúmavke (duplex PCR).

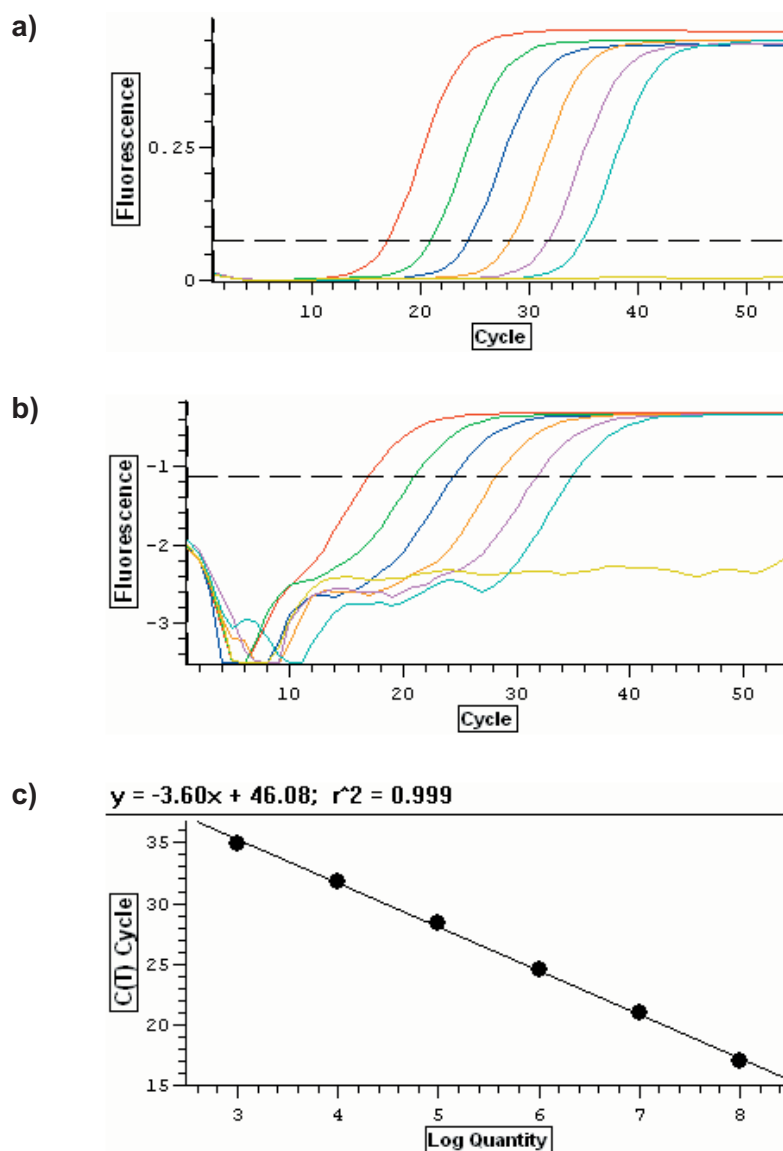
Kvantitatívna real-time PCR

Real-time PCR je možné použiť na kvantitatívnu analýzu potravín, pričom základom je kvantifikácia templátovej sekvencie DNA [21]. Využíva sa pritom skutočnosť, že od tretieho cyklu má PCR teoreticky exponenciálny charakter. V praktických podmienkach je na to potrebné splniť viacero technických a chemických podmienok, napríklad termocyklér musí presne dodržiavať teplotný program, citlivosť merania fluorescence musí byť dostatočne vysoká, reakčná zmes musí byť správne dimenzovaná tak, aby nedochádzalo k limitácii PCR vyčerpaním niektorého z komponentov atď. Napriek tomu sa exponenciálny charakter PCR spravidla podarí udržať len v prvej polovici amplifikácie.

Počiatočná koncentrácia templátovej sekvencie DNA sa zisťuje na základe extrapolácie kriviek závislosti fluorescence od času (obr. 2a). V praxi sa najčastejšie používa aproximácia založená na uplatnení tzv. prahového cyklu (threshold cycle, c_T). Vychádza sa pritom z kriviek závislosti logaritmu fluorescence od času (resp. prístrojového času v jednotkách poradového čísla cyklu), ktoré by mali byť zo začiatku amplifikácie lineárne a rovnobežné (obr. 2b). Prahový cyklus je hodnota prístrojového času v jednotkách poradového čísla cyklu, pri ktorej daná krivka dosiahne určitú zvolenú hodnotu logaritmu fluorescence. Táto hodnota sa nastavuje buď konštantne v rámci súboru experimentov, alebo sa volí na základe určitých požiadaviek, napríklad ako najnižšia hodnota fluorescence, pri ktorej sú všetky amplifikačné krivky lineárne.

V prípade real-time PCR realizovanej v podmienkach stopercentnej účinnosti dôjde počas každého cyklu k zdvojnásobeniu koncentrácie amplifikovaného fragmentu DNA, čo znamená že kalibračná čiara $c_T = f(\log c)$ má smernicu k (slope) rovnú $-3,322$ a q (posun na osi y, y intercept) sa líši v rôznych podmienkach merania v súvislosti s citlivosťou merania fluorescence a s nastavením prahovej hodnoty fluorescence pri odčítaní prahových cyklov. V praktických podmienkach sa pri real-time PCR akceptuje účinnosť 90–110 %, čomu zodpovedajú smernice $-3,1$ až $-3,6$, keď pre účinnosť E platí vzťah $E = 10^{(-1/k)} - 1$ (k je smernica kalibračnej čiary). Na určenie neznámej koncentrácie sekvencie templátovej DNA z údajov prahového cyklu sa v praktických podmienkach väčšinou používa kalibračná čiara (obr. 2c). Pritom si treba uvedomiť, že aj v ideálnom prípade je kvantifikácia touto metódou pomerne nepresná, keďže kalibračná čiara je plochá a to znamená, že už malé rozdiely v nameraných hodnotách c_T vedú k veľkým rozdielom v odčítaných hodnotách koncentrácie analytu.

Kvantitatívna real-time PCR je metóda veľmi citlivá na rozdiely v zložení reakčnej zmesi spôsobené nepresnosťou pipetovania jej zložiek v malých



OBR. 2. Ukážka záznamu analýzy desiatkových riedení kultúry *Salmonella enterica* použitím 5'-nukleázovej real-time PCR so sondou typu TaqMan.

Uvádza sa záznam fluorescence (a), logaritmu fluorescence (b) a príslušná kalibračná čiara (c).

FIG. 2. An illustrative record of the analysis of decimal dilutions of the *Salmonella enterica* culture by the 5'-nuclease real-time PCR with a TaqMan probe.

Records of fluorescence (a), logarithm of fluorescence (b) and the respective calibration line (c) are presented.

objemoch, a tiež na rozdiely v teplotnom programe spôsobené heterogenitou termobloku. Preto sa odporúča vykonávať analýzy so štyrmi paralelnými meraniami a výsledky primerane štatisticky spracovať. Napriek tomu, že niektoré prístroje umožňujú prenos kalibračných čiar medzi experimentami, odporúča sa zostrojiť v každom experimente (pri každom behu termocykléra) novú kalibračnú čiaru s tromi paralelnými meraniami. Analyzovaný preparát DNA sa odporúča nariediť tak, aby sa ho do reakčnej zmesi pridávalo minimálne 5 µl. Ďalšie zvýšenie presnosti je možné dosiahnuť pomocou štandardizácie s použitím exogénneho interného štandardu, ktorým je najčastejšie rekombinantný plazmid [22].

Pri použití kvantitatívnej real-time PCR na analýzu potravín však nestačí štandardizovať amplifikáciu, ale je potrebné štandardizovať celú metódu vrátane izolácie DNA [23]. Použitie rekombinantných molekúl DNA na tento účel však naráža na problémy s nízkou reprodukovateľnosťou a koncentračnou závislosťou účinnosti ich extrakcie z potravín [24]. Aby sa tieto metodické problémy obišli, uplatňuje sa v oblasti analýzy geneticky modifikovaných organizmov (GMO) v potravinách relatívna kvantifikácia s použitím endogénneho interného štandardu, ktorým je všeobecne prítomná sekvencia DNA. Týmto postupom sa však stanovuje iba relatívna koncentrácia analytu voči zložkám potravín, ktoré obsahujú endogénny interný štandard.

Literatúra

1. TURŇA, J. - STUHLÍK, S. - DRAHOVSKÁ, H. - GÁLOVÁ, Z. - TIMKO, J.: Techniky rekombinantných molekúl. Bratislava : Veda, 2004. 152 s.
2. KUCHTA, T.: Využitie polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) na dôkaz patogénnych baktérií v potravinách. Slovenský veterinársky časopis, 2005, v tlači.
3. KUCHTA, T.: Metódy identifikácie geneticky modifikovaných organizmov. In: TIMKO, J. - SIEKEL, P. - TURŇA, J.: Geneticky modifikované organizmy. Bratislava : Veda, 2004, s. 75-78.
4. KUCHTA, T.: Metódy na dôkaz alergénnych zložiek potravín polymerázovou refazovou reakciou. Slovenský veterinársky časopis, 29, 2004, č. 4, s. 29-30.
5. PÖPPING, B.: The application of biotechnological methods in authenticity testing. Journal of Biotechnology, 98, 2002, s. 107-112.
6. SAIKI, R. K. - SCHARF, S. J. - FALOONA, F. - MULLIS, K. B. - HORN, G. T. - ERLICH, H. A. - ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230, 1985, s. 1350-1354.
7. SAIKI, R. K. - GELFAND, D. H. - STOFFEL, S. - SCHARF, S. J. - HIGUCHI, R. - HORN, G. T. - MULLIS, K. B. - ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 1988, s. 487-491.
8. NOGVA, H. K. - RUDI, K.: Potential influence of the first PCR cycles in real-time comparative gene quantifications. BioTechniques, 37, 2004, s. 246-253.

9. LEVIN, R. E.: The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. *Food Biotechnology*, 18, 2004, s. 97-133.
10. LIVAK, K. J. - FLOOD, S. J. - MARMARO, J. - GIUSTI, W. - DEETZ, K.: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4, 1995, s. 357-362.
11. RIJSENS, N. - HERMAN, L.: Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *Journal of AOAC International*, 85, 2002, s. 984-995.
12. SCHODER, D. - SCHMALWIESER, A. - SCHAUBERGER, G. - KUHN, M. - HOORFAR, J. - WAGNER, M.: Physical characteristics of six new thermocyclers. *Clinical Chemistry*, 49, 2003, s. 960-963.
13. KUČHTA, T. - KACLÍKOVÁ, E. - ORAVCOVÁ, K.: Contained detection of food-borne pathogenic bacteria by 5'-nuclease polymerase chain reaction and end-point fluorimetry. In: RILEY, A. P.: Food policy, control and research. Haupauge : Nova Science Publishers, 2005, v tlači.
14. LONGO, M. C. - BERNINGER, M. S. - HARTLEY, J. L.: Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93, 1990, s. 125-128.
15. AL SOUD, W. A. - RADSTRÖM, P.: Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1998, s. 3748-3753.
16. AL SOUD, W. A. - LANTZ, P. G. - BACKMAN, A. - OLCEN, P. - RADSTRÖM, P.: A sample preparation method which facilitates detection of bacteria on blood cultured by the polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 1998, s. 217-224.
17. THISTED LAMBERTZ, S. - BALLAGI-PORDÁNY, A. - LINDQVIST, R.: A mimic as internal standard to monitor PCR analysis of food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 1998, s. 9-11.
18. PANGALLO, D. - KUČHTA, T. - DRAHOVSKÁ, H.: Preparazione di un controllo interno mimic per una multiplex PCR per la rivelazione di *L. monocytogenes*. *Industrie Alimentari*, 40, 2001, s. 152-154.
19. GREISEN, K. - LOEFFELHOLZ, M. - PUROHIT, A. - LEONG, D.: PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1994, s. 335-351.
20. ALLMANN, M. - CANDRIAN, U. - HÖFELEIN, C. - LÜTHY, J.: Polymerase chain reaction (PCR). A possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 196, 1993, s. 248-251.
21. HEID, C. A. - STEVENS, J. - LIVAK, K. J. - WILLIAMS, P. M.: Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 1996, s. 986-994.
22. PARDIGOL, A. - GUILLET, S. - PÖPPING, B.: A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. *European Food Research and Technology*, 216, 2003, s. 412-420.
23. BERTHEAU, Y. - DIOLEZ, A. - KOBILINSKY, A. - MAGIN, K.: Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. *Journal of AOAC International*, 85, 2002, s. 801-808.
24. PIKNOVÁ, L. - KUČHTA, T. - DRAHOVSKÁ, H. - PANGALLO, D.: Determinazione del tasso di recupero del DNA dagli alimenti. *Industrie Alimentari*, 43, 2004, s. 1129-1132.

Do redakcie došlo 13. 4. 2005.

Polymerase chain reaction as a method of food analysis

KUCHTA, T.: Bull. potrav. Výsk, 44, 2005, p. 1-16.

SUMMARY. Polymerase chain reaction (PCR) is a method which, in connection to DNA isolation, facilitates the analysis of food components of plant, animal or microbial origin, as well as identification of microorganisms in food. In the article, PCR and real-time PCR are characterized in terms of the reaction mixture composition, thermocyclers, anticontamination measures, precautions to avoid PCR inhibition and various types of amplification control. Attention is paid also to multiplex PCR and to quantitative real-time PCR.

KEYWORDS: polymerase chain reaction; DNA; food analysis