

DIGITÁLNÍ PCR: PRINCIP A APLIKACE

ELIŠKA FIALOVÁ^{a,b}, KAMILA ZDEŇKOVÁ^a,
EVA JABLONSKÁ^a, KATEŘINA DEMNEROVÁ^a
a JAROSLAVA OVESNÁ^b

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^b Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6
fialovae@vscht.cz

Klíčová slova: kvantitativní PCR, digitální PCR, mnohonásobná PCR, identifikace a kvantifikace DNA

Obsah

1. Úvod
2. Digitální polymerasová řetězová reakce
 - 2.1. Typy
 - 2.2. Mnohonásobná digitální polymerasová řetězová reakce
 - 2.3. Aplikace
 - 2.3.1. Biomedicínské aplikace
 - 2.3.2. Detekce patogenů
 - 2.3.3. Druhová identifikace rostlin a analýza geneticky modifikovaných organismů
 - 2.3.4. Autentizace a falšování potravin
3. Závěr

1. Úvod

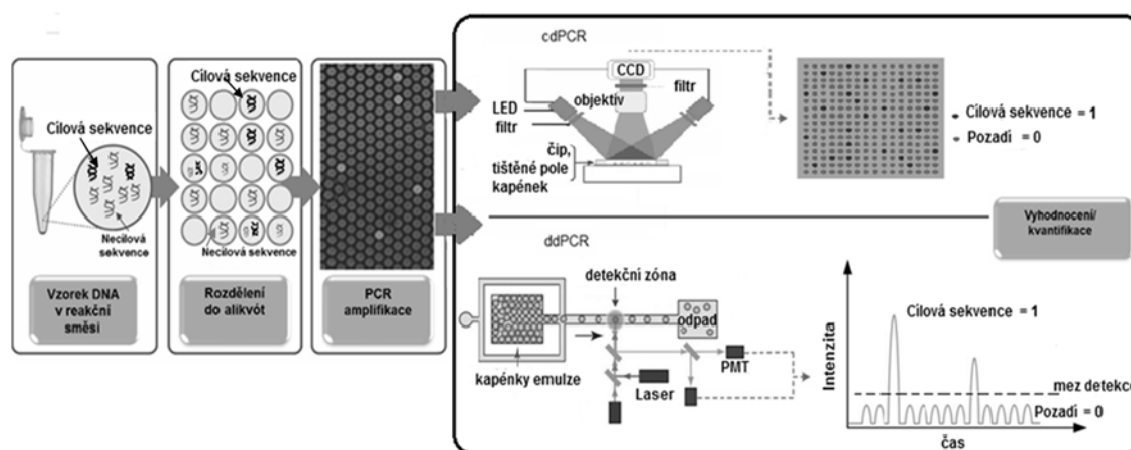
Polymerasová řetězová reakce (PCR) je jednou z hlavních metod molekulární biologie. Využívá se pro enzymovou replikaci specifické sekvence nukleové kyseliny *in vitro*. Od roku 1983, kdy byla metoda popsána americkým biochemikem K. B. Mullisem^{1,2}, prošla značným vývojem. Dnes rozlišujeme tři typy: (a) konvenční PCR, (b) kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase – qPCR a (c) digitální PCR – dPCR (cit.^{2,3}). V současné době se rozvíjí dPCR, která umožňuje, v porovnání s předchozími typy PCR, preciznější kvantifikaci bez nutnosti použití kalibrační křivky. Uplatnění této metody je široké a zasahuje do řady oblastí, např. do biomedicínských aplikací, forenzní genetiky, autentizace rostlin nebo analýzy potravin.

2. Digitální polymerasová řetězová reakce

Princip dPCR spočívá v rozdělení reakční směsi s analyzovaným vzorkem do velkého množství alikvót (reakčních podílů), ve kterých proběhne vlastní amplifikace. Přívlástek „digitální“ dostala metoda na základě individuálního sběru dat v každém odděleném prostoru a jejich vyhodnocení systémem „jedniček a nul“. Pozitivní výsledek, tedy naměření fluorescence v roztoku, značí přítomnost analyzované DNA v reakčním podílu a v daném vyhodnocovacím systému se značí hodnotou 1. Negativní výsledek, tedy signál pod nastavenou mezí detekce, se značí číslem 0 (obr. 1).

Reakční směs obsahuje DNA polymerasu, pufr, chlorid hořečnatý, primery a nukleotidy, dále pak fluorescenčně značenou sondu nebo interkalační fluorescenční barvivo. Objem reakční směsi v jedné alikvotní části bývá od několika pikolitrů do desítek nanolitrů. Rozdělení molekul templátu do alikvót lze dosáhnout dvěma způsoby: pomocí mikročipu nebo vytvořením emulze olejových kapiček. V obou případech posléze probíhá klasická amplifikace. Kapacita čipu (počet komůrek), popř. počet kapiček, a objem jednotlivých reakčních oddílů ovlivňují detekční limit metody dPCR. Pro přesnou kvantifikaci je zcela zásadní náhodná distribuce templátu do jednotlivých alikvót. Při vyhodnocování se nejčastěji využívá korekce na základě tzv. Poissonova rozdělení zohledňující možnou přítomnost více cílových molekul v reakčním podílu^{3,4,5,6}. Je-li v N reakčních podílech náhodně rozděleno M molekul, lze průměrné množství cílových molekul v jednom podílu (λ) vyjádřit jako M/N . Pokud je počet reakčních podílů velký, je možné odhad počáteční koncentrace cílové sekvence ve vzorku vyjádřit jako $-\ln(1 - N_{\text{neg}}/N)$, kdy N_{neg} je počet negativních reakčních podílů. U podílů s větším objemem je vyšší riziko přítomnosti více cílových molekul, což by mohlo vést k nesprávné kvantifikaci. Proto je lepší volit uspořádání s více podíly o menším objemu^{7,8}. Pro výpočet koncentrace cílových molekul je nutné znát počet a objem reakčních podílů a dále množství negativních, popř. pozitivních, podílů^{4,7,9}. Zjištěný počet kopií templátové DNA lze snadno přepočítat na množství v analyzovaném vzorku⁴. Předpokladem je volba vhodné koncentrace DNA tak, aby systém nebyl zcela saturován, tzn., aby byly přítomné i negativní reakční podíly. Na konci dPCR je stanoven počet cílových molekul z naměřených hodnot pozitivních a negativních signálů^{3,10}. Jones a spol.¹¹ uvádí pro výpočet koncentrace rovnici (1).

$$c = -\ln\left(\frac{N_{\text{neg}}/N}{\text{objem reakčního oddílu}}\right) \quad (1)$$



Obr. 1. **Princip dPCR.** cdPCR = čipová dPCR, ddPCR = kapková dPCR, CCD = elektronická součástka používaná pro snímání obrazové informace, PMT = laserem indukovaný dvoubarevný detektor. Přepřacováno podle cit.^{4,13,68}

Kvantifikace nukleových kyselin je díky digitálnímu formátu velice přesná i při nízkých koncentracích templátu, což umožňuje mnoho aplikací vyžadujících vysokou citlivost a/nebo majících omezené množství vzorku^{9,11}. Jinou výhodou dPCR je, ve srovnání s PCR a qPCR, samotné rozdělení do alikvót, díky čemuž není potřeba technických replikátů. Amplifikace jednotlivých molekul DNA v oddělených prostorech – jamkách mikrotitrační destičky, sektoru čipu nebo v kapce olejové emulze – zároveň snižuje jejich kompetici o reagenty. V porovnání s konvenční PCR je dále velkou výhodou dPCR absence post-amplifikační analýzy, nejčastěji prostřednictvím horizontální agarosové elektroforézy, kvantifikace i malých rozdílů v množství cílových úseků, možnost výběru použití fluorescenčně značených sond (přesnější, finančně náročnější) nebo interkalačního barviva (levnější, specifita obdobná jako u qPCR). Odečet fluorescence také zjednodušuje provedení i vyhodnocení multiplexních analýz. V porovnání s qPCR je výhodou nižší vliv inhibitorů reakce na správné vyhodnocení kvantifikace; nevýhodou je pak nákladnější instrumentace^{3,8,12}.

2.1. Typy

Koncept dPCR byl poprvé popsán v 90. letech minulého století^{5,9}, od té doby došlo k jeho značnému rozvoji. V současné době existuje několik typů dPCR, liší se především způsobem rozdělení vzorku do alikvót. Rozdělení je založeno na vytvoření emulze (kapek), průtoku kanálky na čipu, kapilární síle v mikrojankách, tvorbě hydrogelových perliček nebo tisku kapek na substrát¹³. Disperze vzorku může být ovlivněna velikostí reakčního oddílu, který má vliv na detekční limit a nejistotu měření. Dalšími parametry ovlivňujícími disperzi vzorku jsou např. rychlost disperze či počet reakčních podílů na vzorek. Při výběru způsobu disperze vzorku je tak třeba zohlednit nejen ekonomické aspekty, ale především technické parametry přístrojů a vlastnosti analyzovaného vzorku. Například vzorek

nefragmentované DNA se nemusí amplifikovat v malých reakčních objemech^{4,9,13,14}. Srovnání jednotlivých disperzních metod je uvedeno v tab. I. Jednotlivé typy dPCR se mimo způsobu disperze liší kapacitou a cenou. Baker¹⁵ uvádí, že pořizovací cena přístrojů pro kapkovou dPCR (Bio-Rad Laboratories, RainDance) je 89–100 tisíc dolarů, pro čipovou dPCR (Fluidigm Corporation, Life Technologies) 90–250 tisíc dolarů v závislosti na vybraném přístroji. Odlišné jsou také ceny za reakci; levnější vychází reakce u kapkové dPCR, která rovněž poskytuje rozdělení vzorku do více reakčních podílů.

Jednou z prvních představených forem dPCR byla kapková digitální PCR (ddPCR). Vzorek v reakční směsi je před samotnou PCR nutné smíchat s olejem a chemickými stabilizátory. Emulgace vzorku probíhá v tzv. generátoru kapek (aliquót), který směs rozptýlí do velmi drobných kapek (v řádu nanolitřů). Ty jsou přeneseny do mikrotitračních destiček a poté je provedena emulzní PCR v klasickém termocykleru. Přítomnost templátové DNA je následně vyhodnocena v tzv. čtečce kapek. Jedná se o mikrofluidní zařízení, v němž jsou nejprve všechny kapky z jamky mikrotitrační destičky shromážděny v jedné nádobě, následně jsou od sebe oddělovány dělicí tekutinou a za konstantního tlaku jsou posouvány k detektoru (např. laserem indukovaný dvoubarevný detektor, PMT) rychlostí cca 1000 kapek za sekundu. Data jsou zaznamenávána zobrazovacím softwarem; vyhodnocuje se množství naměřených fluorescenčních signálů obdobně jako u průtokové cytometrie^{4,13,17,18}. Schéma průběhu ddPCR je znázorněno na obr. 1.

Na principu emulgace funguje rovněž dPCR založená na disperzi vzorků do hydrogelových kuliček, kdy je povrch kapek PCR směsi rovnoměrně obalen agarosovým gelem poskytujícím ochranu proti vzájemné kontaminaci mezi kapkami. Jiný formát emulzní dPCR, tzv. BEAMing, využívá magnetické kuličky s navázanými biotinylovanými primery. Po PCR jsou magnetické kuličky jednoduše izolovány, přečištěny a následně jsou pomocí fluorescen-

Tabulka I
Porovnání disperzních metod vzorku^{9,13,20,28}

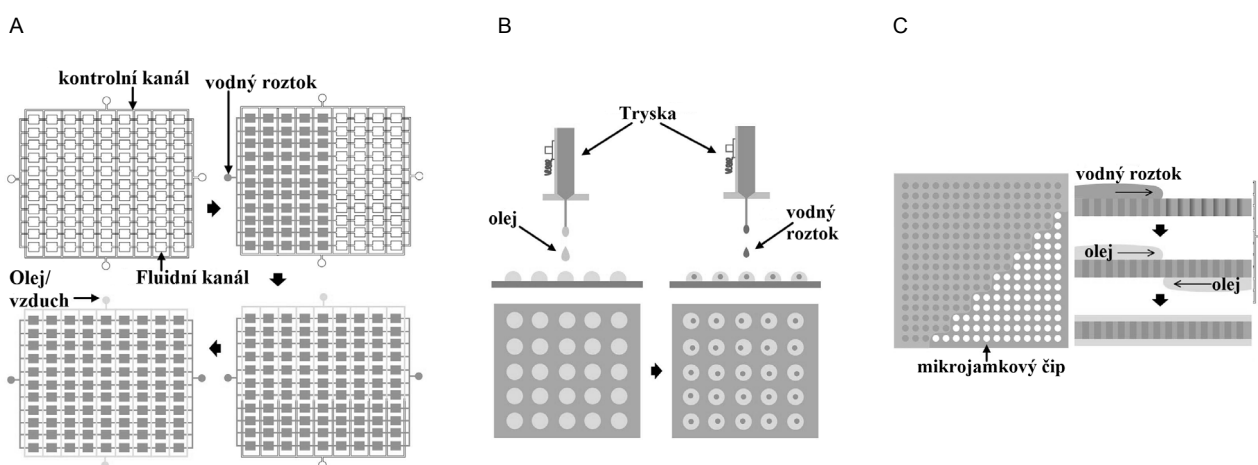
Disperzní metoda	Disperzní parametry				Citlivost [%]	Falešně pozitivní výsledky ^a	Přesnost ^a	Rychlost ^a
	velikost reakčního podílu [m]	objem kompartmentu [l]	počet alikvót na vzorek	rychlost rozptýlu [min ⁻¹]				
Kapky	10 ⁻⁴ –10 ⁻⁵	0,001–1·10 ⁻⁹	20 000–10 000 000	~2000	≤0,01	****	**	*
Hydrogelové kapky	10 ⁻⁴ –10 ⁻⁵	–	10 000 000	~3 000 000	1	**	**	**
Mikrojamky	10 ⁻⁵ –10 ⁻⁶	0,8–1·10 ⁻⁹	20 000 na čip (každý kanál)	~60 000	0,005	*	***	****
Kanálky	10 ⁻⁴ –10 ⁻⁵	6,3·10 ⁻⁹	765	~10 000	0,01	***	****	***
Tisknutí	10 ⁻⁴	0,8·10 ⁻⁹	400 (každý experiment)	~100	–	**	*	**
Krystaly	10 ⁻⁶	0,4·10 ⁻⁹	25 000–30 000	–	0,03	–	–	–

^a Vyšší počet hvězdiček (*) je přiřazen vyšší hodnotě parametru

čně značených sond rozlišeny kuličky s PCR produkty. Kvantifikace probíhá pomocí průtokové cytometrie¹⁹.

Druhou variantou dPCR je čipová dPCR (cdPCR). Cao a spol.¹³ popisují tři různé způsoby disperze vzorku na čip, a to kanálovou, tiskovou a na bázi mikrodestiček. V případě kanálové disperze (obr. 2A) je vzorek z hlavního průtokového kanálu mikrofluidního čipu rozdělen rozvodnými kanálky do mnoha (stovek až desítek tisíců) komůrek po celé ploše čipu, a to za využití tlaku vzduchu nebo oleje vychylujícího membrány mezi kanálky a komůrkami v čipu. V komůrkách se poté amplifikují cílové molekuly¹⁴. U tiskové disperze (obr. 2B) dochází k natištění pole olejových kapek na chemicky modifikovaný substrát a poté je do každé kapky vtištěna mikrokapka

vodného roztoku DNA a PCR reakční směsi. Poslední možnost disperze je založena na bázi mikrodestiček (obr. 2C). Nejprve je nutné vytvořit mikrotitrační pole čipu postavením řady mikroskopických průchozích otvorů na křemikový čip a následnou úpravou povrchu na hydrofobní nebo hydrofilní, čímž dojde k vytvoření reakčních komůrek (mikrojamek), ve kterých dochází k amplifikaci jednotlivých molekul. Vzorek je v průchozích komůrkách udržen díky kapilární síle a hydrofilní modifikaci vnitřní stěny otvoru. Ihned po disperzi vzorku do komůrek je na obě strany čipu nanesen těsnící olej, aby nedocházelo k odpařování vzorku nebo křížové kontaminaci během teplotního cyklu PCR.



Obr. 2. Schéma disperzních metod cdPCR: A – kanálová disperze, B – tisková disperze, C – disperze na bázi mikrodestiček. Přepřacováno podle cit.¹³

Další formou cdPCR, popsanou v práci Madic a spol.²⁰, je tzv. krystalová dPCR. Tato varianta využívá 2D uspořádání čipových forem s tvorbou monodisperzních kapek. Reakční směs je pipetována do jamek speciálně navrženého mikrofluidního Sapphirova čipu, kde protéká sítí mikrokanálů a rozdělí se do pole kapek, zvaných též dropletové krystaly. Ty se poté uvnitř čipu spontánně organizují do struktury podobné uspořádání atomů v krystalu. Po jejich vzniku je zahájena PCR amplifikace^{20,21}.

V závislosti na vybraném přístroji může u této platformy analýza probíhat jak v koncovém bodě (tzv. endpoint) PCR, tak i v reálném čase¹⁴. Výhodou cdPCR je možnost zopakování odečtu fluorescence z čipu, pokud se prvotní čtení jeví jako špatné. Naopak nevýhodou v porovnání s ddPCR je rozdělení vzorku do méně reakčních oddílů^{12,22}.

V odborných publikacích je nejčastěji popsáno použití ddPCR a cdPCR s disperzí prostřednictvím kanálků, méně pak cdPCR s distribucí prostřednictvím Sapphirova čipu či metoda BEAMing. Morisset a spol.²³ porovnávali parametry qPCR, cdPCR a ddPCR metodiky s genomovou DNA geneticky modifikované (GM) kukuřice a uvádí, že dynamický rozsah cdPCR je nižší (2–3 log) než u ddPCR (5 log). Absolutní limit kvantifikace genu kukuřice *MON810* byl při analýze cdPCR 15–56 kopií, zatímco při analýze prostřednictvím ddPCR 18 kopií. Absolutní limit detekce metod byl v rozmezí 1–10 kopií haploidního ekvivalentu genomu kukuřice *MON810* pro cdPCR a 6 kopií pro ddPCR. Dong a spol.⁹ porovnávali ddPCR a cdPCR při měření počtu kopií certifikovaného referenčního plasmidu *pNIM-001*. Prokázali, že testované platformy mají, při použití linearizovaného plasmidu, srovnatelnou kvantifikaci počtu kopií.

2.2. Mnohonásobná digitální polymerasová řetězová reakce

V současné době je dostupných minimálně 6 komerčních platform dPCR (cit.⁹). Všechny umožňují provedení mnohonásobné (multiplex) dPCR (mdPCR), která využívá více párů primerů v jedné reakci. Její výhodou je kratší čas potřebný pro analýzu vzorku, menší potřeba chemikálií a tedy i nižší cena za reakci. mdPCR je vhodným řešením pro analýzu vzácných vzorků a/nebo vzorků dostupných jen v malém množství^{24,25}. Přítomnost či nepřítomnost cílových sekvencí je detegována odečtem fluorescence každého reakčního podílu. Mnohonásobná reakce je možná díky označení jednotlivých cílových molekul fluorofory s různými emisními spektry a/nebo vyhodnocením intenzity fluorescence stejné barvy s využitím odlišných amplitud. Tyto postupy je rovněž možné kombinovat a navýšit tak množství odlišitelných produktů v reakci^{14,24,26–28}. Nejdostupnější platformy umožňují detekci dvou emisních vlnových délek, a to obvykle 520 a 550 nm odpovídajících kombinaci barev FAM a VIC (např. systém RainDrop od RainDance Technologies nebo QX100 či QX200 ddPCR od společnosti Bio-Rad)^{17,29}. Dobnik a spol.²⁴ použili systém kvadruplex, kde kombino-

vali oba výše zmíněné postupy – v každém ze dvou fluorescenčních kanálů (fluorofory FAM, VIC) dokázali díky odlišným koncentracím primerů a sond detegovat dva odlišné produkty. Zhong a spol.²⁸ publikovali metodu penta-plexu umožňující simultánní detekci počtu kopií genů důležitých pro stanovení spinální muskulární atrofie, a to za využití pouze dvou fluoroforů. Rovněž společnost Fluidigm uvádí pro svůj systém Biomark™ možnost kvantifikovat až čtyři cílové úseky ve vzorku najednou, pro přístroje s integrovaným fluidním obvodem (např. EP1) pak uvádí možnost využití 5 barev pro detekci 5 cílových úseků. Některé platformy detegující dva fluorofory umožňují úpravou koncentrací primerů a sond odlišit až 10 různých cílů. Systém založený na odlišné amplitudě však nemusí být v přítomnosti inhibitorů nebo v případě použití nukleové kyseliny špatné kvality spolehlivý. Robustnější metodou pro detekci a/nebo kvantifikaci tak je přiřazení jednoho amplikonu cílové sekvence na jeden fluorescenční kanál. Krystalová dPCR (Naica system, Stilla Technologies) pracuje s třemi fluorescenčními kanály (modrým, zeleným a červeným)^{4,15,20,24,30}. Pro přesnou kvantifikaci je vždy potřeba optimalizace podmínek. Důležitá je vazba na cílovou sekvenci, specifita sond a zamezení vzájemnému ovlivňování primerů a sond²⁵.

2.3. Aplikace

dPCR je robustní a citlivá metoda. Díky svým vlastnostem našla uplatnění v lékařské diagnostice, při identifikaci druhů rostlin i živočichů, v potravinářství, ale i ve forenzní genetice, mikrobiologii a dalších oborech (cit.^{3–7,14,23,30,31}). Využívá se především u náročných analýz pro detekci minoritních, vzácných cílů a také pro analýzu počtu kopií^{6,9,17}. Přímá a absolutní kvantifikace, kterou dPCR nabízí, je atraktivní technologií rovněž pro rutinní analýzu složení vzorků potravin a krmiv či pro detekci a kvantifikaci obsahu geneticky modifikovaných organismů (GMO)^{23,24,32}. S výhodou se dPCR používá i pro absolutní kvantifikaci genové exprese³³. Představuje tak efektivní, flexibilní a ekonomické řešení pro celou řadu aplikací.

2.3.1. Biomedicínské aplikace

Perkins a spol.³⁴ uvádějí, že pro efektivní charakterizaci genetických a epigenetických změn v onkologii, virologii či prenatální diagnostice nebyly konvenční metody dostačující. dPCR tak díky své vysoké citlivosti a specifitě umožnila překonat limitace konvenčních metod a je velmi vhodná pro analýzy tekutých biopsií. Sefrioui a spol.³⁵ prokázali, že není nutné izolovat cirkulující tumorovou DNA ze vzorků plazmy pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem před samotnou analýzou při použití dPCR. Míra detekce DNA byla nižší o 5 % v porovnání se vzorky po izolaci. Andersen a Jakobsen³⁶ použili systém mdPCR pro screening 31 mutací ve 4 onkogenech (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*) u vzorků plazmy pacientů s cholangiokarcinomem. Celkem bylo použito osm multiplexů, každý detegoval 3–5 mutací. Pozitivní vzorky byly

ověřeny duplexní dPCR. Kromě zmíněné detekce specifických sekvencí nachází dPCR uplatnění i v testování variability počtu kopií (CNV). CNV je definována jako úsek DNA o délce 1 kbp až 5 Mbp (některými autory jako úsek delší než 1 kbp), který je přítomen v jiném počtu než u referenčního genomu³⁷. CNV tvoří asi 12 % lidského genomu³⁷ a asi polovina z nich spadá do oblastí kódujících proteiny³⁸. Mnoho CNV nemá vliv na fenotyp, některé CNV jsou asociovány s různými onemocněními. CNV může přímo ovlivnit genovou expresi a tím způsobit genetické onemocnění³⁹. Nejznámějšími příklady vlivu rozdílů v CNV jsou variabilita v metabolismu léčiv vlivem CNV genu *CYP2D6*, citlivost vůči infekci HIV vlivem CNV genu *CCL3L1* (cit.⁴⁰) a predispozice k autoimunitním⁴¹, neurodegenerativním či nádorovým onemocněním⁴². Metody studia CNV zahrnují cytogenetické techniky (fluorescenční *in situ* hybridizace), pokud se jedná o CNV většího rozsahu, hybridizační techniky zaměřené na celý genom (komparativní genomové hybridizace na čipu) a techniky specifické pro určitý lokus⁴³. V současné době se používají zejména techniky založené na amplifikaci⁴⁴, mezi něž patří i qPCR a dPCR. Pro studium CNV má dPCR oproti qPCR výhodu vyšší přesnosti bez nutnosti amplifikace velkého množství replikátů a bez obav o efektivitu amplifikace, a to zejména v situaci, kdy je třeba rozlišit jednotlivé stavy při vyšším počtu kopií, např. odlišit čtyři kopie od pěti přítomných kopií^{45,46}. Například vyšší počet kopií genu *HER2* je spojen s agresivnější formou rakoviny plic a prsu, ale také s lepší odpovědí na biologickou léčbu protilátkami proti tomuto receptoru a je proto cílem diagnostiky. Belgrader a spol.⁴⁷ provedli srovnání analýzy počtu kopií *HER2* pomocí tradičních technik a pomocí ddPCR ve fixovaných vzorcích tkáně a shodují se, že ddPCR je přesnější a méně pracnou technikou než mikroskopie. Gevensleben a spol.⁴⁸ použili ddPCR pro analýzu počtu kopií *HER2* v plazmě a v porovnání s qPCR uvádějí lepší shodu s výsledky z biopsie.

Aneuploidie, tedy přítomnost abnormálního počtu chromosomů, může být považována za CNV velkého rozsahu. Dalším příkladem využití dPCR ve zdravotnictví je prenatální screening trisomie 21. chromosomu. Lee a spol.⁴⁹ stanovili přesnost detekce trisomie ve vzorcích plazmy těhotných žen na 99,7 %. Detekcí chromosomální aneuploidie se dále zabývali také Lo a spol.⁵⁰, El Khattabi a spol.⁵¹ nebo Xu a spol.⁵².

Dalším nástrojem diagnostiky je analýza genové exprese. Taylor a spol.³³ ukázali, že analýza genové exprese pomocí ddPCR je v porovnání s qPCR přesnější a výsledky jsou méně ovlivněné přítomností inhibitorů. Seo a spol.⁵³ s úspěchem použili ddPCR pro stanovení hladiny mRNA v moči pro diagnostiku časného odmítnutí štěpu při transplantaci ledvin. Wang a spol.⁵⁴ kvantifikovali miRNA související s rakovinou plic s využitím ddPCR na mikrofluidním čipu.

2.3.2. Detekce patogenů

Metodu dPCR lze využít také pro analýzu nukleových kyselin mikroorganismů a jejich absolutní kvantifikaci.

Stále častěji je takto zjišťována přítomnost patogenů, a to nejen v medicíně, ale i v potravinářském průmyslu. Například Klančnik a spol.⁵⁵ využili dPCR pro kvantifikaci DNA *L. monocytogenes*. Shen a spol.³¹ publikovali slibnou metodu pro detekci RNA viru hepatitidy C a HIV, a to využitím dPCR s reverzní transkripcí (RT-dPCR). Na analýzu virů s využitím RT-dPCR se zaměřili také Fraise a spol.⁵⁶, kteří kvantifikovali virus hepatitidy A a noroviry v ovoci. Ve své práci porovnávali RT-dPCR a RT-qPCR. Kvantifikace u dPCR byla výrazně méně ovlivněna přítomností inhibitorů. Menší náchylnost dPCR k inhibici potvrdili ve své práci také Wang a spol.⁵⁷, kteří porovnávali dPCR a qPCR při detekci *S. typhimurium* v mléce.

2.3.3. Druhá identifikace rostlin a analýza genetiky modifikovaných organismů

dPCR je používána pro analýzu vzorků potravin, potravinářských surovin a krmiv. Hlavní oblast použití je identifikace rostlinných a živočišných druhů při odhalování falšování potravin. Mnoho laboratoří rutinně používá dPCR rovněž k detekci a kvantifikaci GMO. Přítomnost GMO v potravinách a krmivech je regulována v mnoha zemích. Evropská unie (EU) zavedla prahovou hodnotu pro označení produktů obsahujících více než 0,9 % povolených GMO a v krmivech 0,1 % příměsi GMO^{24,58}, u kterého probíhá postup povolování nebo u nějž uplynula v EU platnost povolení. Je tedy nutné mít k dispozici citlivé metody použitelné pro přesnou kvantifikaci jednotlivých složek. dPCR vykazuje velký potenciál pro určení absolutního počtu kopií vloženého úseku DNA v GM plodinách⁹. Nejvíce citovaná je metodika popsána v práci autorů Morisset a spol.²³, kde byla použita ddPCR pro kvantifikaci GM kukuřice *MON810* a bylo dosaženo citlivosti 5 kopií ekvivalentu haploidního genomu kukuřice. Kvantifikace kukuřice *MON810* byla provedena také prostřednictvím Fluidigm cdPCR, kdy Burns a spol.⁵⁸ získali nejpřesnější výsledky při kvantifikaci 200–700 kopií. Při vyšším množství kopií cílového úseku v analyzovaném vzorku získali nadhodnocené výsledky, naopak podhodnocené výsledky získali při analýze nižšího počtu kopií.

Prostřednictvím dPCR jsou rovněž prováděny screeningové analýzy přítomnosti a množství GMO ve vzorcích obsahujících sóju, rýži či brambor^{59–61}. V oblasti kvantifikace GMO jsou novější publikace zaměřeny hlavně na multiplexní formáty. Studie autorů Dobnik a spol.²⁴ popisuje multiplexní metodiku pro kvantifikaci všech 12 v té době v EU registrovaných linií GM kukuřice. Kvůli vysoké podobnosti některých sekvencí byly použity dva samostatné multiplexní testy (kvadruplex a dekaplex), sondy pro transgeny byly značeny jedním fluoroforem (FAM) a pro referenční gen kukuřice (*hmgA*) druhým (HEX). Oba multiplexní testy poskytly přesné výsledky. Limit kvantifikace, opakovatelnost a správnost byly v souladu s mezinárodními doporučeními pro metody kvantifikace GMO. Studie autorů Köppel a spol.⁶² porovnává použití multiplexních qPCR a ddPCR a prokazuje vhodnost pro rutinní diagnostiku GMO.

2.3.4. Autentizace a falšování potravin

Státní zemědělská a potravinářská inspekce každoročně odhalí velké množství případů falšování potravin a klamání spotřebitele⁶³. V roce 2018 byly zjištěny např. jakostní prohřešky u medů, máků nebo masných konzerv. Proto je potřeba vyvíjet metody umožňující detekci a kvantifikaci složek (i nedeklarovaných) ve výrobcích. Například Floren a spol.³² úspěšně použili ddPCR pro identifikaci a kvantifikaci DNA skotu, koně a prasete v masných výrobcích. Cai a spol.⁶⁴ použili ddPCR pro přesnou kvantifikaci obsahu kuřecího a vepřového masa. Zabývali se rovněž vztahy mezi hmotností syrového masa, hmotností DNA a počtem kopií DNA. V roce 2017 publikovali navazující studii zabývající se kvantifikací hovězího a vepřového masa⁶⁵. K průkazu rostlinné DNA lze použít metodiku používanou pro detekci a kvantifikaci GMO. Pro správnou kvantifikaci obsahu GMO je nutné znát přesný počet referenčních úseků, kterými jsou specifické sekvence pro konkrétní druh rostliny. Pro sóju, kukuřici, rýži, brambory a další jsou tedy v literatuře popsány podmínky dPCR použitelné pro jejich průkaz v analyzované potravine^{23,24,58,60}. Pro jiné komodity, např. potravinářský mák, metoda zatím publikována není. dPCR se jeví jako vhodná a spolehlivá metoda také pro detekci alergenů arašídů a sójových bobů. Pierboni a spol.⁶⁶ ve své práci potvrdili, že použití dPCR umožňuje detekci lektinu s vyšší citlivostí než qPCR. Analýzy alergenu arašídů *Arah2-MGB* vykazovaly přibližně stejnou citlivost. dPCR analýza byla aplikována i pro kvantifikaci DNA olivového oleje⁶⁷.

3. Závěr

Digitální PCR umožňuje stanovit absolutní počet kopií cílové DNA bez použití externích standardů. Získané kvantitativní výsledky jsou tak přesnější než u qPCR. Výhodou je rovněž možnost statistické analýzy díky binárnímu charakteru získaných dat. Díky svým vlastnostem nachází dPCR široké analytické uplatnění v mnoha oblastech, což napomáhá k jejímu dalšímu vývoji. V současné době existuje několik platforem, které se liší především způsobem disperze vzorku do jednotlivých alikvót. Nejnížší citlivost poskytuje disperze do hydrogelových kapiček. Ostatní uváděné disperzní metody mají citlivost $\leq 0,01$ %. dPCR zajišťuje rozdělení vzorku do nejvíce alikvót, přičemž jednotlivé reakční oddíly mají objem menší než 10 nL. U všech platforem tak pro analýzu stačí velmi malé množství DNA. Všechny platformy umožňují multiplexní analýzy, a to na základě použití odlišně značených sond a/nebo různé koncentrace sond značených jednou fluorescenční barvou. To umožňuje snížit finanční i časové nároky na analýzu jednoho vzorku. Digitální PCR je rychle přijímána pro kontrolu dodržování legislativních požadavků označování potravin, detekci patogenů nebo pro biomedicínské aplikace. Přehled těchto aplikací je shrnut v tomto článku.

Práce byla podpořena z projektů MZE (NAZV) QK1720263 a QJ1530272.

Seznam použitých zkratk

EU	Evropská unie
PCR	polymerasová řetězová reakce
dPCR	digitální PCR
cdPCR	čipová dPCR
ddPCR	kapková dPCR
mdPCR	mnohonásobná dPCR
qPCR	kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase
RT-dPCR	dPCR s reverzní transkripcí
CNV	variabilita počtu kopií
GM	geneticky modifikovaný
GMO	geneticky modifikované organismy

LITERATURA

1. <https://www.karymullis.com/pcr.shtml>, staženo 26. 9. 2017.
2. Rahman M. T., Uddin M. S., Sultana R., Moue A., Setu M.: *AKM MC J.* 4, 30 (2013).
3. Hrstka R., Kolářová T., Michalová E., Vojtěšek B.: *Klin. Onkol.* 27, 569 (2014).
4. Beránek M., v knize: *Molekulární genetika pro bioanalytiku*, kapitola 14, str. 100. Karolinum, Praha 2016.
5. Vogelstein B., Kinzler K. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9236 (1999).
6. Pohl G., Shih I.-M.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4, 41 (2004).
7. Lievens A., Jacchia S., Kagkli D., Savini C., Querci M.: *PLoS One* 11, e0153317 (2016).
8. Weaver S., Dube S., Mir A., Qin J., Sun G., Ramakrishnan R., Jones R. C., Livak K. J.: *Methods* 50, 271 (2010).
9. Dong L., Meng Y., Sui Z., Wang J., Wu L., Fu B.: *Sci. Rep.* 5, 13174 (2015).
10. Pfaffl M., Vandesompele J., Kubista M., v knize: *Real-time PCR: current technology and applications* (Logan J., Edwards K., Saunders N., ed.), kapitola 5, str. 65. Caister Academic Press, Norfolk 2009.
11. Jones M., Williams J., Gärtner K., Phillips R., Hurst J., Frater J.: *J. Virol. Methods* 202, 46 (2014).
12. <https://www.thermofisher.com>, staženo 26. 9. 2017.
13. Cao L., Cui X., Hu J., Li Z., Choi J. R., Yang Q., Lin M., Ying Hui L., Xu F.: *Biosens. Bioelectron.* 90, 459 (2017).
14. <https://www.fluidigm.com>, staženo 6. 10. 2017.
15. Baker M.: *Nat. Methods* 9, 541 (2012).
16. Hindson C. M., Chevillet J. R., Briggs H. A., Gallichotte E. N., Ruf I. K., Hindson B. J., Vessella R. L., Tewari M.: *Nat. Methods* 10, 1003 (2013).
17. <http://www.bio-rad.com/>, staženo 20. 9. 2017.
18. Hindson B. J. a 37 spoluautorů: *Anal. Chem.* 83, 8604 (2011).

19. Dressman D., Yan H., Traverso G., Kinzler K. W., Vogelstein B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8817 (2003).
20. Madic J., Zocevic A., Senlis V., Fradet E., Andre B., Muller S., Dangla R., Droniou M. E.: *Biomol. Detect. Quantif.* 10, 34 (2016).
21. <http://www.stillatechnologies.com>, staženo 6. 10. 2017.
22. Pinheiro L. B., Coleman V. A., Hindson C. M., Herrmann J., Hindson B. J., Bhat S., Emslie K. R.: *Anal. Chem.* 84, 1003 (2012).
23. Morisset D., Štebih D., Milavec M., Gruden K., Žel J.: *PLoS One* 8, e62583 (2013).
24. Dobnik D., Štebih D., Blejec A., Morisset D., Žel J.: *Sci. Rep.* 6, 35451 (2016).
25. Whale A. S., Huggett J. F., Tzonev S.: *Biomol. Detect. Quantif.* 10, 15 (2016).
26. <http://www.idtdna.com/>, staženo 20. 9. 2017.
27. <http://raindancetech.com/idt-decoded-digital-pcr-simplifying-quantitative-pcr/>, staženo 26. 4. 2018.
28. Zhong Q., Bhattacharya S., Kotsopoulos S., Olson J., Taly V., Griffiths A. D., Link D. R., Larson J. W.: *Lab Chip* 11, 2167 (2011).
29. <http://raindancetech.com/>, staženo 20.10.2017.
30. Day E., Dear P. H., McCaughan F.: *Methods* 59, 101 (2013).
31. Shen F., Sun B., Kreutz J. E., Davydova E. K., Du W., Reddy P. L., Joseph L. J., Ismagilov R. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 133, 17705 (2011).
32. Floren C., Wiedemanna I., Brenig B., Schütz E., Beck J.: *Food Chem.* 173, 1054 (2015).
33. Taylor S. C., Laperriere G., Germain H.: *Sci. Rep.* 7, 2409 (2017).
34. Perkins G., Lu H., Garlan F., Taly V.: *Adv. Clin. Chem.* 79, 43 (2017).
35. Sefrioui D., Beaussire L., Perdrix A., Clatot F., Michel P., Frebourg T., Di Fiore F., Sarafan-Vasseur N.: *Clin. Biochem.* 50, 963 (2017).
36. Andersen R. F., Jakobsen A.: *Clin. Chim. Acta* 458, 138 (2016).
37. Redon R. a 42 spoluaautorů: *Nature* 444, 444 (2006).
38. Sebat J. a 20 spoluaautorů: *Science* 305, 525 (2004).
39. Feuk L., Carson A. R., Scherer S. W.: *Nat. Rev. Genet.* 7, 85 (2006).
40. Ouahchi K., Lindeman N., Lee C.: *Pharmacogenomics* 7, 25 (2006).
41. Schaschl H., Aitman T. J., Vyse T. J.: *Clin. Exp. Immunol.* 156, 12 (2009).
42. Fanciulli M., Petretto E., Aitman T. J.: *Clin. Genet.* 77, 201 (2010).
43. Lee J. H., Jeon J. T.: *Cytogenet. Genome Res.* 123, 333 (2008).
44. Ceulemans S., van der Ven K., Del-Favero J.: *Methods Mol. Biol.* 838, 311 (2012).
45. Whale A. S., Huggett J. F., Cowen S., Speirs V., Shaw J., Ellison S., Foy C. A., Scott D. J.: *Nucleic Acids Res.* 40, e82 (2012).
46. Harmala S. K., Butcher R., Roberts C. H.: *Methods Mol. Biol.* 1654, 135 (2017).
47. Belgrader P., Tanner S. C., Regan J. F., Koehler R., Hindson B. J., Brown A. S.: *Clin. Chem.* 59, 991 (2013).
48. Gevensleben H., Garcia-Murillas I., Graeser M. K., Osin P., Parton M., Smith I. E., Ashworth A., Turner N. C.: *Clin. Cancer Res.* 19, 3276 (2013).
49. Lee S. Y., Kim S. J., Han S., Park J. S., Choi H. J., Ahn J. J., Oh M., Shim S. H., Cha D. H., Hwang S. Y.: *Clin. Chim. Acta* 476, 75 (2018).
50. Lo Y. M. D., Lun F. M. F., Chan K. C. A., Tsui N. B. Y., Chong K. C., Lau T. K., Leung T. Y., Zee B. C. Y., Cantor C. R., Chiu R. W. K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13116 (2007).
51. El Khattabi L. A., Rouillac-Le Sciellour C., Le Tessier D., Luscan A., Coustier A., Porcher R., Bhourri R., Nectoux J., Sérazin V., Quibel T.: *PloS One* 11, e0155009 (2016).
52. Xu S., Zou B., Xiang Z., Miao M., Song Q., Huang H., Wu H., Zhou G.: *Anal. Methods* 8, 2138 (2016).
53. Seo J.-W., Moon H., Kim S.-Y., Moon J.-Y., Jeong K. H., Lee Y.-H., Kim Y.-G., Lee T.-W., Ihm C.-G., Kim C.-D.: *PloS One* 12, e0180045 (2017).
54. Wang P. a 10 spoluaautorů: *Biosens. Bioelectron.* 74, 836 (2015).
55. Klančnik A., Toplak N., Kovač M., Marquis H., Jeršek B.: *J. Microbiol. Methods* 118, 37 (2015).
56. Fraisse A., Coudray-Meunier C., Martin-Latil S., Hennechart-Collette C., Delannoy S., Fach P., Perelle S.: *Int. J. Food Microbiol.* 243, 36 (2017).
57. Wang M. a 10 spoluaautorů: *Int. J. Food Microbiol.* 266, 251 (2018).
58. Burns M., Burrell A., Foy C.: *Eur. Food Res. Technol.* 231, 353 (2010).
59. Kluga L., Folloni S., Kagkli D., Bogni A., Foti N., Savini C., Mazzara M., Van den Eede G., Van den Bulcke M.: *Food Anal. Methods* 6, 361 (2013).
60. Iwobi A., Gerdes L., Busch U., Pecoraro S.: *Food Control* 69, 205 (2016).
61. Debode F., Zdeňková K., Janssen E., Tizolova A., du Jardin P., Berben G., Demnerová K.: *Food Anal. Methods* 11, 2172 (2018).
62. Köppel R., Bucher T., Frei A., Waiblinger H.-U.: *Eur. Food Res. Technol.* 241, 521 (2015).
63. <http://www.szpi.gov.cz/>, staženo 20. 8. 2018.
64. Cai Y., Li X., Lv R., Yang J., Li J., He Y., Pan L.: *BioMed Res. Int.* 2014, 810209 (2014). doi: 10.1155/2014/810209.
65. Cai Y., He Y., Lv R., Chen H., Wang Q., Pan L.: *PloS One* 12, e0181949 (2017).
66. Pierboni E., Rondini C., Torricelli M., Ciccone L., Tovo G. R., Mercuri M. L., Altissimi S., Haouet N.: *Food Control* 92, 128 (2018).
67. Scollo F., Egea L. A., Gentile A., La Malfa S., Dorado G., Hernandez P.: *Food Chem.* 213, 388 (2016).
68. Fialová E., Zdeňková K., Demnerová K.: *Bioprospect* 4, 91 (2017).

E. Fialová^{a,b}, K. Zdeňková^a, E. Jablonská^a, K. Demnerová^a, and J. Ovesná^b (^a *Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague*, ^b *Crop Research Institute, Prague*):
Digital polymerase chain reaction: Principle and Applications

Polymerase chain reaction (PCR) is one of the main techniques of molecular biology. Currently, there is a boom of digital PCR which allows precise, sensitive and reproducible quantification without using a calibration curve. Due to its features, digital PCR has a wide analytical application in many areas (e.g. biomedical applications or food analysis). Presently, there are several types of digital PCR that differ from each other particularly in the way

of dispersing the sample into many aliquots of very small volumes. All platforms allow multiplex analyses based on the use of differently labelled probes and/or different concentrations of probes labelled with one fluorescent color. This can reduce the financial and time requirements for a single sample analysis. The advantages and disadvantages of each type of digital PCR are summarized in this article.

Keywords: quantitative PCR, digital PCR, multiplex PCR, DNA identification and quantification

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (NAZV) (Grant numbers: QK1720263 a QJ1530272).