

# Postęp w rozwoju techniki cyklicznej polimeryzacji DNA in vitro – Real-Time PCR<sup>\*)</sup>

TOMASZ STADEJEK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Stadejek T.

## Recent developments in polymerase chain reaction – Real-Time PCR

### Summary

Polymerase chain reaction (PCR) has for many years been regarded as the new standard procedure in detecting the genes of microorganisms, plants and animals. Detecting the reacting products is reliant upon agarose gel electrophoresis, ethidium bromide staining, ultraviolet irradiation and comparing the size to a DNA size marker. This has slowed progress in adopting the PCR method in diagnostic laboratories. Developing new methods of PCR product detection without opening a reaction tube has opened new possibilities in applying this technique during routine diagnosis. Monitoring PCR product accumulation as amplification progresses is possible through using labeled primers and/or oligonucleotide probes or DNA binding fluorophores. Real-Time PCR methods can be subdivided into two groups: sequence dependent or sequence independent DNA detection. All of these involve using fluorophores linked to oligonucleotides or their presence in the reaction mixture. Their common feature is measuring fluorescence in each PCR cycle and calculating the threshold cycle that corresponds to the DNA copy number in that sample.

**Keywords:** PCR

Reakcja polimeryzacji łańcuchowej (PCR) (14) od wielu lat uznawana jest za nowy standard wykrywania genów drobnoustrojów, roślin i zwierząt. W metodzie tej wykorzystuje się pary oligonukleotydów (startery), z których każdy hybryduje do jednej z nici podwójnego łańcucha DNA, i które ograniczają fragment ulegający powieleniu w wyniku cyklicznej reakcji polimeryzacji (amplifikacji) DNA. Oligonukleotydy są substratem dla polimerazy DNA, która na zasadzie komplementarności do budowuje do nich kolejne nukleotydy, tworząc kopię nici DNA, z którą związał się starter. Całość procesu PCR opiera się na wielokrotnym (25-45 cykli) powtarzaniu trzech etapów: denaturacji (95°C), hybrydyzacji (annealing) (50-65°C) i wydłużania startera (72°C). W trakcie kolejnych cykli amplifikacji można wyróżnić fazę logarytmiczną, w trakcie której w warunkach idealnych dochodzi do podwajania się liczby kopii DNA w każdym cyklu, fazę przejściową, w czasie której obserwuje się hamujący wpływ niedoboru polimerazy, starterów oraz nagromadzonych produktów PCR, przez co amplifikacja stopniowo staje się coraz mniej efektywna, oraz fazę plateau, w której nie dochodzi już do powielania DNA.

W tradycyjnej metodzie identyfikacja produktu PCR wykonywana jest po zakończeniu reakcji. Podstawową metodą jest tu elektroforeza w żelu agarozowym i wizualizacja DNA w promieniach UV po barwieniu, np. bromkiem etydy (19). Widoczny w żelu prążek DNA porównuje się do wzorca wielkości i na tej podstawie wynik reakcji uznaje się za dodatni lub ujemny.

Niestety, wynik badania niedostatecznie zoptymalizowaną metodą PCR może być obarczony dużym błędem wynikającym z amplifikacji nieswoistego DNA o wielkości zbliżonej lub identycznej z produktem swoistym. Dodatkowym elementem weryfikującym specyficzność produktu PCR może być przeniesienie uzyskanego DNA na membranę lub inne podłoże stałe i wykonanie hybrydyzacji z sondą molekularną (oligonukleotyd znakowany enzymatycznie komplementarny do amplifikowanego fragmentu DNA). Jedną z możliwości jest wykonanie transferu Southerna, czyli przeniesienia DNA z żelu na membranę nylonową po przeprowadzeniu elektroforezy produktu PCR (19). Inną stanowi PCR-ELISA, czyli przeniesienie produktów PCR syntetyzowanych przy użyciu znakowanych starterów do dołków mikropłytki opłaszczonych sondą (11). W każdym przypadku należy wykonać barwienie immunoenzymatyczne.

<sup>\*)</sup> Badania wykonane w ramach projektu badawczego KBN 6 P06K 029 21.

## Reakcja Real Time PCR

Tradycyjne metody wykrywania i identyfikacji produktu PCR sprawiają, że metoda ta z trudem toruje sobie drogę do laboratoriów diagnostycznych ze względu na pracochłonność oraz łatwość, z jaką dochodzi do kontaminacji laboratorium. Pojawienie się możliwości detekcji produktów PCR w każdym cyklu reakcji (w czasie rzeczywistym – Real-Time) bez konieczności otwierania próbki stanowiło przełom w zastosowaniu PCR w diagnostyce (8, 9). Monitorowanie akumulacji produktu reakcji w trakcie jej trwania możliwe jest dzięki wykorzystaniu znakowanych starterów, sond lub użyciu substancji fluoryzujących w obecności amplikonów (barwniki interkalujące). Możliwość wykrywania produktów w przebiegu reakcji PCR zredukowała również całkowity czas niezbędny do jej wykonania oraz umożliwiła zastosowanie PCR na większą skalę. Metody PCR, w których produkty wykrywa się fluorescencyjnie w czasie trwania amplifikacji DNA bez konieczności otwierania próbki, noszą nazwę Real-Time PCR.

Metody Real-Time PCR można, w zależności od sposobu wykrywania produktu PCR, podzielić na dwie zasadnicze grupy: niezależne od sekwencji matrycy (nieswoiste) i zależne od sekwencji matrycy (swoiste). We wszystkich używa się barwników fluorescencyjnych (fluoroforów) związanych z oligonukleotydowymi

mi sondami lub/i starterami PCR (metody swoiste) lub obecnych w stanie wolnym w roztworze, w którym przebiega PCR (metody nieswoiste). Wspólną cechą obu grup jest pomiar fluorescencji w każdym cyklu PCR i określanie cyklu, w którym poziom fluorescencji próbki wzrasta ponad poziom tła. Cykl ten określane jest skrótem Ct (threshold cycle) i odzwierciedla początkową liczbę kopii DNA w mieszaninie PCR (ryc. 1).

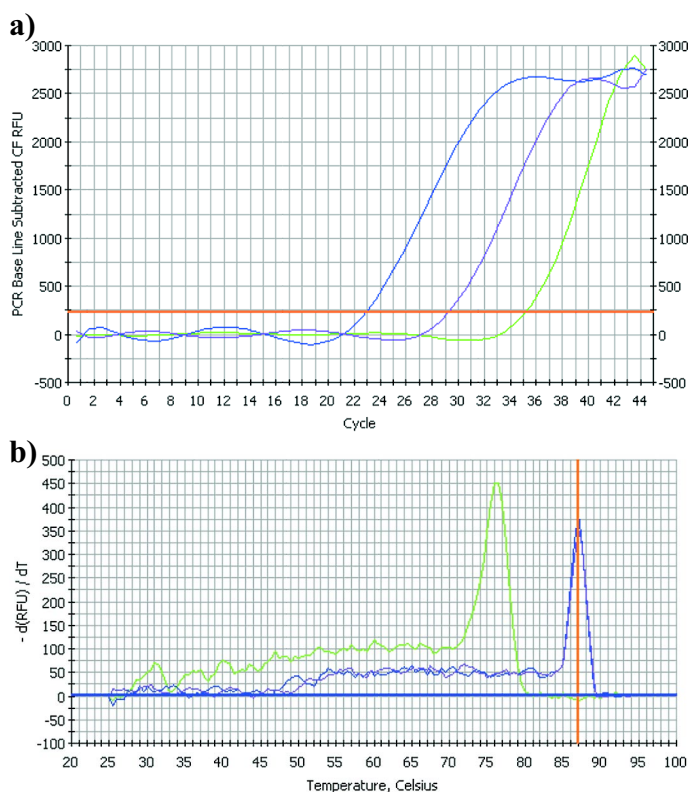
## Ilościowe oznaczenia w Real-Time PCR

Dotychczas stosowane w laboratoriach diagnostycznych tradycyjne metody PCR umożliwiają niemal wyłącznie oznaczenia jakościowe, a więc dają odpowiedź na pytanie, czy w badanym materiale znajduje się poszukiwany gen. Rozwój metod Real-Time PCR sprawił, że oznaczenie liczby kopii genów lub drobnoustrojów stało się znacznie łatwiejsze do wykonania. Liczba drobnoustrojów obecna w badanej próbce wyrażona wartością Ct może być porównana do ich liczby w materiale pobranym z innego organu wewnętrznego lub w próbkach pobranych w różnym czasie po zakażeniu. Możliwe jest również określenie bezwzględnej liczby drobnoustrojów w próbce. Zwykle oznacza to porównanie wartości Ct w badanym materiale z krzywą standardową określaną w trakcie tego samego eksperymentu przez amplifikację serii próbek zawierających znaną liczbę kopii oznaczanego DNA (16).

Precyzja oznaczeń ilościowych w Real-Time PCR wynika z dużej dynamiki czułości (dynamic range) sięgającej 8 log<sub>10</sub> kopii DNA (2). Osiągnięcie tak wysokiego parametru jest możliwe dzięki temu, że dane odnośnie do ilości produktu PCR zbierane są w trakcie fazy logarytmicznej amplifikacji, kiedy warunki reakcji są optymalne i nie obserwuje się jeszcze hamującego wpływu niedoboru polimerazy, starterów, nasycenia mieszaniny swoistymi i nieswoistymi produktami i działania innych inhibitorów, co jest przyczyną osiągnięcia fazy plateau. Ilość produktu oznaczana na tym etapie PCR (elektroforeza po zakończeniu reakcji) nie odzwierciedla początkowej liczby kopii w próbce.

## Nieswoiste metody wykrywania produktów Real-Time PCR

Podstawą nieswoistych metod detekcji produktów w Real-Time PCR jest zastosowanie substancji, które wykazują zdolność fluorescencji po związaniu się z dwuniciowym DNA i wzbudzeniu falą o określonej długości. Najszerzej znanym barwnikiem tego typu jest bromek etydyny wykorzystywany do barwienia DNA po elektroforezie w żelu (9). Inną substancją najczęściej stosowaną w metodach Real-Time PCR jest SYBR Green 1 (13). Metody Real-Time PCR z wykorzystaniem SYBR Green 1 nie wymagają korzystania ze specjalnych starterów ani sond DNA, a więc teoretycznie każda wcześniej opracowana metoda PCR



Ryc. 1. Krzywa amplifikacji DNA (a) oraz krzywa topnienia (denaturacji) produktów PCR (b). Linia w kolorze pomarańczowym oznacza poziom fluorescencji tła (a) lub temperaturę topnienia swoistego produktu PCR (b). Reakcje wykonano w obecności barwnika interkalującego SYBR Green 1 przy użyciu aparatu iCycler (Biorad)

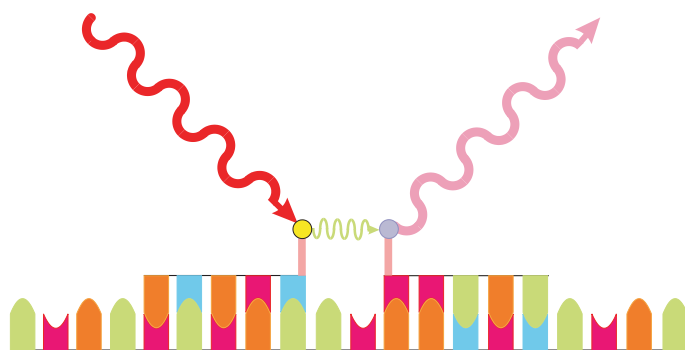
może być zaadaptowana do formatu Real-Time PCR. Niestety, barwnik SYBR Green 1 wiąże się również z nieswoistymi produktami PCR (dimery starterów, produkty nieswoistej amplifikacji), co często może prowadzić do błędnej interpretacji wyniku reakcji. Problem ten może być niekiedy rozwiązany przez określenie temperatury denaturacji produktów PCR (18) (ryc. 1b). W tym celu po zakończeniu PCR próbki stopniowo podgrzewa się, dokonując jednocześnie pomiaru fluorescencji. Gwałtowny spadek poziomu fluorescencji oznacza denaturację podwójnej nici DNA. Temperatura, w której ma to miejsce, jest w największym stopniu uzależniona od długości łańcucha DNA a więc stosunkowo krótkie dimery starterów będą ulegały denaturacji w niższej temperaturze niż produkt swoisty (ryc. 1).

### Swoiste metody wykrywania produktów Real-Time PCR

Podstawą swoistej detekcji produktów PCR jest wykorzystanie sond oligonukleotydomowych o sekwencjach komplementarnych do sekwencji DNA syntetyzowanego w trakcie reakcji. Sondy te znakowane są fluorescencyjnie w sposób umożliwiający emisję światła o określonej długości wyłącznie w obecności swoistej matrycy. W metodach tych wykorzystuje się następujące rodzaje sond: liniowe, nukleolityczne, typu szpilka do włosów, a także samoidentyfikujące się amplikony przy udziale sondy DNA związanej na stałe ze starterem PCR.

Wszystkie wymienione metody swoistego wykrywania produktów PCR opierają się na przekazywaniu energii fluorescencji między dwoma cząsteczkami fluoroforu – donorem i akceptorem (fluorescence resonance energy transfer – FRET). Jest to proces, w którym energia jest przekazywana bezpromieniście, bez emisji fotonu, między cząsteczkami oddalonymi o 10-100 Å, i których zakresy emisji i absorpcji pokrywają się (6). Efektywność transferu energii jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości między donorem i akceptorem (7). W zależności od konstrukcji sondy o swoistej amplifikacji i obecności produktu PCR świadczy fluorescencja donora lub akceptora. W takiej sytuacji fluorofor ten nazywany jest reporterem.

**Sondy liniowe (linear oligo probes, LightCycler probes, HybProbes, kissing probes).** Sondy liniowe są to zwykle układy dwóch oligonukleotydów komplementarnych do tej samej nici DNA produktu PCR, które hybrydują w bezpośrednim sąsiedztwie, w odległości około 10 nukleotydów od siebie (5). Oligonukleotydy te znakowane są pojedynczo na końcach, którymi są do siebie zwrócone. Na przykład, jedna sonda może być znakowana fluoresceiną (donor) na końcu 3', a druga np. fluoroforem LightCycler Red 640 (akceptor) na końcu 5' (10). W obecności swoistej matrycy DNA (swoistej amplifikacji) dochodzi do hybrydyzacji obu sond i zbliżenia cząsteczek fluoroforu. Po



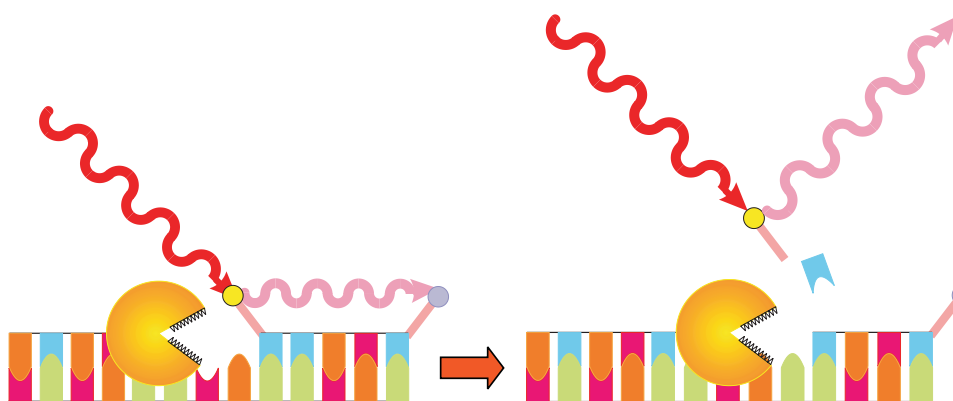
Ryc. 2. Schemat działania układu dwóch sond liniowych hybrydujących do nici swoistego produktu PCR. Dochodzi wówczas zbliżenia cząsteczek fluoroforów. Po oświetleniu próbki promieniami o długości fali 490 nm cząsteczka fluoresceiny (kolor żółty) emituje energię, która wzbudza emisję fali o długości 680 nm przez cząsteczkę akceptora (kolor szary) służącego jako reporter. Światło reportera jest mierzone przez układ optyczny aparatu do Real-Time PCR

oświetleniu próbki promieniami o długości fali 490 nm wzbudzona cząsteczka fluoresceiny emituje energię, absorbowaną przez cząsteczkę akceptora służącego jako reporter, która emituje falę o długości 680 nm (ryc. 2). Światło reportera jest mierzone przez układ optyczny aparatu do Real-Time PCR.

Metoda umożliwia również wykrywanie mutacji w obrębie regionów hybrydyzacji sond przez określenie temperatury ich topnienia (20). W temperaturze tej, podobnie jak w metodzie z barwnikiem SYBR Green 1, dochodzi do zaniku fluorescencji. W przypadku sond liniowych temperatura ta zależy jednak od stopnia komplementarności sondy i matrycy, a nie, jak we wcześniej opisanym metodzie, od długości produktu PCR (20).

Odmianą tej techniki stanowi metoda wykorzystująca transfer energii między donorem zlokalizowanym na końcu 5' startera, a akceptorem znajdującym się na oligonukleotydomowej sondzie (PriProET – Primer-Probe Energy Transfer) (17). Metoda ta jest szczególnie przydatna w wykrywaniu genów o zmiennych sekwencjach, gdyż wymaga krótszego niż w przypadku dwóch sond fragmentu konserwatywnego. Niedogodnością jest natomiast większa odległość między donorem i akceptorem, co w pewnym stopniu ogranicza możliwości wykorzystania fluoroforów i aparatów do Real-Time PCR.

**Sondy nukleolityczne (TaqMan®).** Sondy nukleolityczne znane są najszerzej pod nazwą TaqMan®. Są to oligonukleotydy komplementarne do jednej z nici produktu PCR, których końce 3' i 5' znakowane są dwoma różnymi fluoroforami, np. fluoresceiną (koniec 5') (reporter) i TAMRA (koniec 3') (quencher – wygaszacz fluorescencji) (12). Naświetlenie mieszaniny reakcyjnej PCR zawierającej sondę, lecz nie zawierającej komplementarnego do niej produktu PCR promieniami o długości fali 490 nm wywoła wzbudzenie cząsteczki fluoresceiny, której energia zostanie jednak pochłonięta przez znajdującą się na drugim



Ryc. 3. Schemat działania sond nukleolitycznych TaqMan®. Są to oligonukleotydy znakowane fluorescencyjnie fluoroforem FAM (donor-reporter, kolor żółty) i TAMRA (akceptor-wygaszacz fluorescencji, kolor szary). W obecności produktu PCR sonda hybryduje do niego, a następnie ulega hydrolizie w wyniku działania polimerazy DNA wydłużającej starter komplementarny do tej samej nici, co sonda TaqMan®. W wyniku tego fluorescencja FAM nie jest tłumiona przez cząsteczkę TAMRA i może być zmierzona

końcu oligonukleotydu cząsteczkę TAMRA i fluorescencja nie będzie wykryta przez układ optyczny aparatu do Real-Time PCR. W przypadku obecności w roztworze DNA swoistego produktu PCR sonda będzie hybrydowała do jednej z nici, a następnie ulegnie hydrolizie w wyniku działania polimerazy DNA wydłużającej starter. Napromieniowanie takiej mieszaniny wywoła fluorescencję reportera, ponieważ jego energia nie będzie pochłaniana przez cząsteczkę TAMRA i zostanie wykryta oraz zmierzona (ryc. 3).

Niestety w trakcie PCR dochodzi niekiedy do samoistnego rozpadu sondy TaqMan® co uwidacznia się wzrostem fluorescencji w późnych cyklach PCR i co może być przyczyną błędnego rozpoznania wyniku reakcji (2). W tym przypadku nie ma możliwości weryfikacji uzyskanego wyniku przez określenie temperatury denaturacji produktu ani topnienia sondy.

#### Sondy o kształcie szpilki do włosów (hairpin oligoprobes, molecular beacons).

Sondy te są oligonukleotydami znakowanymi na obu końcach, podobnie jak sondy TaqMan. Jak wskazuje nazwa, tego typu sondy mają kształt szpilki do włosów, gdyż skrajne fragmenty są do siebie wzajemnie komplementarne, tworząc wydłużony fragment dwuniciowy (stem), natomiast fragment środkowy, który jest komplementarny do sekwencji produktu PCR i decyduje o swoistości sondy, ma kształt jednoniciowej pętli (loop) (21).

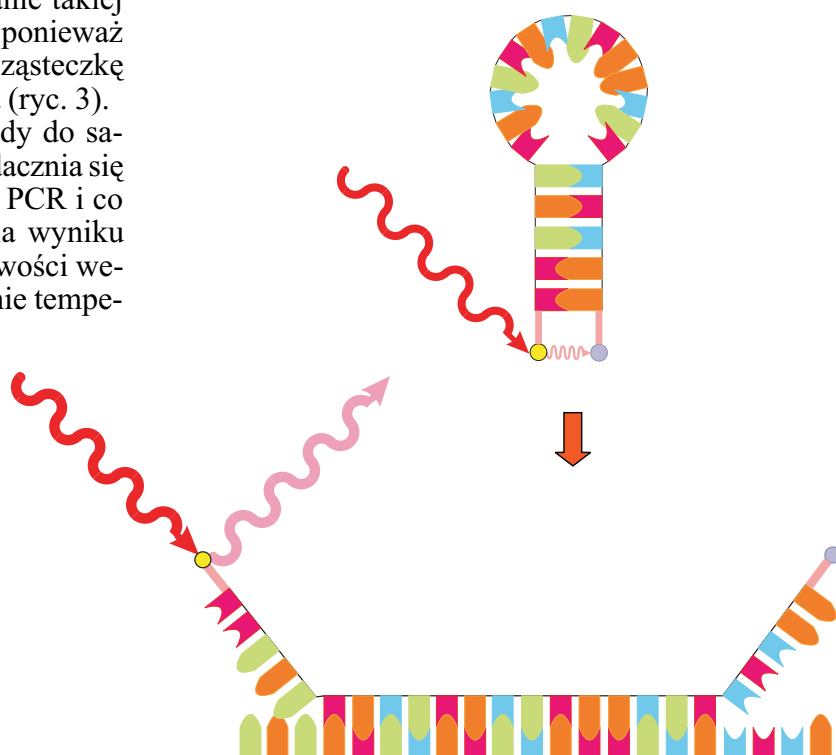
Opisany kształt sonda przybiera w temperaturze niższej od temperatury denaturacji wydłużonego fragmentu struktury (stem). W takich warunkach przy braku specyficznej sekwencji DNA oba fluorofory znajdują się w bezpośredniej bliskości i energia wzbudzonego światłem o odpow-

wiedniej długości fali donora jest pochłaniana przez akceptor. W obecności swoistej sekwencji DNA, po denaturacji sondy, a następnie obniżeniu temperatury dochodzi do jej hybrydyzacji do matrycy DNA, a w efekcie rozdzielenia cząsteczek donora i akceptora, dzięki czemu można wykryć fluorescencję (21) (ryc. 4).

Uważa się, że mutacje punktowe w obrębie fragmentu produktu PCR, do którego hybryduje sonda, mają silniejszy wpływ destabilizujący na dimer sonda-produkt PCR niż w przypadku sond liniowych ze względu na to, że wydłużony fragment struktury szpilki stanowi stabil-

ną alternatywną konformacją oligonukleotydu. Sondy tego typu są więc bardziej specyficzne (1).

**Samoidentyfikujące się amplikony.** Zasada działania tego typu detekcji amplikonów opiera się na strukturze powstałej z połączenia sondy DNA o kształcie szpilki do włosów z sekwencją startera, który jest do-



Ryc. 4. Schemat działania sondy o kształcie szpilki do włosów (molecular beacon). Końce sondy są wzajemnie komplementarne i w temperaturze pokojowej tworzą wydłużony fragment dwuniciowy (stem). Środkowy fragment jest komplementarny do sekwencji produktu PCR i ma kształt jednoniciowej pętli (loop). W obecności swoistej sekwencji DNA, po denaturacji sondy, a następnie obniżeniu temperatury dochodzi do jej związania z matrycą DNA, a w efekcie oddalenia cząsteczek donora (reportera, kolor żółty) i akceptora (wygaszacza fluorescencji, kolor szary), dzięki czemu można wykryć świecenie reportera

łączony do końca 3' sondy. Barwnik fluorescencyjny sondy jest więc wbudowywany w sekwencję produktu reakcji amplifikacji. W metodach tego typu wykorzystuje się startery „sunrise” (sunrise primers, Amplifluor hairpin primers™) i startery „skorpion” (scorpion primers) (23). W obecności swobodnego produktu PCR komplementarny do niego fragment sondy „sunrise” (fragment działający jako starter PCR) hybryduje do matrycy i jest wydłużony przez polimerazę DNA w trakcie pierwszego cyklu PCR. Produktem tego cyklu jest więc nić DNA zakończona pętlą pochodzącą z sondy. Na tym etapie emisja energii reportera jest pochłaniana przez cząsteczkę wygaszacza fluorescencji. W kolejnym cyklu z nowo zsyntetyzowaną nicią łączy się drugi, nieznakowany starter, a polimeraza, wydłużając go, destabilizuje wydłużony fragment pętli sondy i dobudowuje nić komplementarną. Sekwencja nukleotydowa produktu PCR zawiera więc fragment pochodzący z amplifikowanego genu oraz sondy. W ten sposób cząsteczka reportera uwalnia się spod wpływu wygaszacza fluorescencji i świecenie reportera może być wykryte (15).

Podobną budowę posiadają startery skorpion, z tym, że wbudowaniu w produkt PCR ulega tylko fragment sekwencji startera „skorpion”, a sonda podobnie do odwłoka skorpionia „wygina się”, hybrydując do sekwencji amplikonu zlokalizowanej w pewnej odległości od końca 3' startera, dzięki czemu dochodzi do fluorescencji (23).

### Podsumowanie

Ostatnio obserwowany jest intensywny rozwój w zakresie opracowywania nowych fluoroforów, nowych metod znakowania DNA oraz nowych metod wykrywania produktów PCR. Także instrumenty wykorzystywane w Real-Time PCR stają się coraz bardziej precyzyjne, szybsze i – co niezmiernie ważne – umożliwiają adaptację wszelkich dostępnych technik detekcji. To wszystko sprawia, że mimo intensywnego rozwoju technik wykorzystujących mikromacierze DNA (DNA microarrays) w najbliższym czasie należy się spodziewać dalszej ekspansji PCR. Możliwość szybkiej detekcji kilku drobnoustrojów w czasie pojedynczej reakcji PCR przy jednoczesnej możliwości oznaczenia ilościowego wykrytych fragmentów sprawia, że Real-Time PCR staje się standardową techniką w wielu laboratoriach diagnostycznych (3, 4, 22, 24).

### Piśmiennictwo

1. *Abravaya K., Huff J., Marshall R., Merchant B., Mullen C., Schneider G., Robinson J.*: Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41, 468-474.
2. *Alexandersen S., Oleksiewicz M. B., Donaldson A. I.*: The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 747-755.
3. *Belak S., Thoren P.*: Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2001, 1, 434-443.
4. *Cai H. Y., Archambault M., Gyles C. L., Prescott J. F.*: Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. *Anim. Health Res. Rev.* 2003, 4, 73-93.

5. *Cardullo R. A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P. C., Wolf D. E.*: Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 8790-8794.
6. *Clegg R. M.*: Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Meth. Enzymol.* 1992, 211, 353-388.
7. *Didenko V. V.*: DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001, 31, 1106-1121.
8. *Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M.*: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996, 6, 986-994.
9. *Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R.*: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992, 10, 413-417.
10. *Jackwood D. J., Sommer S. E.*: Identification of infectious bursal disease virus quasiespecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. *Virology* 2002, 304, 105-113.
11. *Legeay O., Bounaix S., Denis M., Arnaud C., Hutet E., Cariolet R., Albina E., Jestin A.*: Development of a RT-PCR test coupled with a microplate colorimetric assay for the detection of a swine Arterivirus (PRRSV) in boar semen. *J. Virol. Meth.* 1997, 68, 65-80.
12. *McGoldrick A., Lowings J. P., Ibata G., Sands J. J., Belak S., Paton D. J.*: A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). *J. Virol. Meth.* 1998, 72, 125-135.
13. *Morrison T. B., Weis J. J., Wittwer C. T.*: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998, 24, 954-962.
14. *Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.*: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 1992, 24, 17-27.
15. *Nazarenko I. A., Bhatnagar S. K., Hohman R. J.*: A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 2516-2521.
16. *Orlando C., Pinzani P., Pazzagli M.*: Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998, 36, 255-269.
17. *Rasmussen T. B., Utenthal A., de Stricker K., Belak S., Storgaard T.*: Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* 2003, 148, 2005-2021.
18. *Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T.*: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 1997, 245, 154-160.
19. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.*: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nowy Jork 1989.
20. *Schalasta G., Arents A., Schmid M., Braun R. W., Enders G.*: Fast and type-specific analysis of herpes simplex virus types 1 and 2 by rapid PCR and fluorescence melting-curve-analysis. *Infection* 2000, 28, 85-91.
21. *Tyagi S., Bratu D. P., Kramer F. R.*: Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology* 1998, 16, 49-53.
22. *van Rijn P. A., Wellenberg G. J., Hakze-van der Honing R., Jacobs L., Moonen P. L., Feitsma H.*: Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative Real-Time PCR technology. *J. Virol. Meth.* 2004, 120, 151-160.
23. *Whitcombe D., Theaker J., Guy S. P., Brown T., Little S.*: Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology* 1999, 17, 804-807.
24. *Zarlenga D. S., Higgins J.*: PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* 2001, 101, 215-230.

Adres autora: doc. dr hab Tomasz Stadejek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: stadejek@piwet.pulawy.pl