

KATARZYNA WIEDRO, EWA STACHOWSKA, DARIUSZ CHLUBEK

## ŁAŃCUCHOWA REAKCJA POLIMERAZY Z ANALIZĄ W CZASIE RZECZYWISTYM (RT-PCR)

### REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

Zakład Biochemii Katedry Biochemii i Chemii Medycznej  
Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie  
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*

#### Summary

The work present PCR (*Polymerase Chain Reaction*) with the real time analysis of the increase of product allowing quick detection, duplication and identification of even slight amounts of nucleic acids. Essential methods used in molecular diagnostics, based on marked probes and fluorescence phenomenon were discussed. Increased sensitivity of technology, the possibility of analysis and visualization of products during the time of reaction, enabled the progress of highly effective diagnostics applications.

**K e y w o r d s:** polymerase chain reaction – molecular probes – fluorescence.

#### Streszczenie

W pracy przedstawiono łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (*real-time PCR* – rt-PCR), która pozwala na szybkie wykrycie, powielenie i identyfikację nawet znikomych ilości kwasów nukleinowych. Omówiono podstawowe metody stosowane w diagnostyce molekularnej oparte na znakowanych sondach i zjawisku fluorescencji. Zwiększona czułość techniki, możliwość analizy i wizualizacji produktów jeszcze w czasie trwania reakcji umożliwiła rozwój wysoce skutecznych zastosowań diagnostycznych.

**H a s ł a:** łańcuchowa reakcja polimerazy – sondy molekularne – fluorescencja.

\*

Łańcuchowa reakcja polimerazy (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) to skuteczna technika biologii molekularnej, która pozwala na szybkie wykrycie, amplifikację i identyfikację znikomych ilości kwasów nukleinowych – nawet pojedynczych kopii badanej sekwencji [1, 2, 3, 4]. Choć stała się ona niezbędnym narzędziem badawczym w wielu dziedzinach nauki, niestety nie daje całkowicie precyzyjnych wyników ilościowych. Teoretycznie pula produktu powinna w czasie reakcji wzrastać wykładniczo, proporcjonalnie do początkowej ilości badanej sekwencji. W rzeczywistości jednak tak nie jest, dlatego do uzyskania wiarygodnych wyników stosuje się technikę, w której ilość kopii produktu jest monitorowana w każdym cyklu reakcji [4]. W porównaniu z klasycznym PCR, łańcuchowa reakcja polimerazowa z analizą w czasie rzeczywistym (*real-time PCR* – rt-PCR) zyskała szersze uznanie dzięki temu, że jest metodą mniej pracochłonną, szybszą, bardziej czułą i wiarygodną, a ryzyko zanieczyszczenia jest wysoce zminimalizowane [2, 5]. Zwiększona czułość techniki pozwala na zastosowanie znacznie mniejszych początkowych ilości analizowanej sekwencji DNA niż wymagają tego inne, stosowane powszechnie metody, jak np. Northern blot [6]. Do wykrywania produktów rt-PCR stosuje się niespecyficzne, wiążące się z DNA barwniki (fluorofory, fluorochromy) oraz specyficzne, znakowane fluoroforem oligonukleotydowe sondy. Możliwość analizy i wizualizacji produktów w trakcie trwania reakcji (a nie, jak w klasycznym PCR, dopiero po jej zakończeniu) zwiększa rolę rt-PCR jako techniki umożliwiającej rozwój wysoce skutecznych zastosowań diagnostycznych. Łańcuchowa reakcja polimerazowa

z analizą w czasie rzeczywistym rzuciła nowe światło na kinetykę PCR, wydajność różnych metod ekstrakcji kwasów nukleinowych oraz rolę niektórych związków chemicznych w hamowaniu reakcji amplifikacji [2].

Monitorowanie powstającego podczas rt-PCR produktu stało się możliwe dzięki znakowaniu starterów, sond oligonukleotydowych lub amplikonów cząsteczkami zdolnymi do fluorescencji. Powodują one zmianę w sygnale, będącą następstwem hybrydyzacji do amplikonu lub bezpośredniego, wzajemnego z nim oddziaływania. Sygnał zależy od ilości produktu w każdym cyklu i zostaje wzmocniony, kiedy ilość specyficznego amplikonu wzrasta. Znacznym udoskonaleniem wprowadzonym przez metodę rt-PCR jest wydajne skrócenie czasu zarówno jej przebiegu, jak i otrzymywania wyników. W dużej mierze jest to spowodowane ograniczeniem czasu trwania cyklu, usunięciem odrębnego procesu detekcji przeprowadzanego już po zakończeniu reakcji (*post-PCR*) oraz stosowaniem czułego sprzętu, co pozwala na wcześniejsze wykrycie produktu. Ponieważ sygnały fluorescencji są mierzone bezpośrednio w trakcie reakcji, rt-PCR jest często określany jako „system zamknięty” [2, 6].

Ujemną stroną stosowania rt-PCR zamiast klasycznego PCR jest niekompatybilność oprogramowania ze związkami emitującymi światło oraz względne ograniczenie multipleksowych zdolności systemów. Ponieważ większość popularnych związków używanych do rt-PCR wymaga hybrydyzacji sond do komplementarnej sekwencji na jednej z nici amplikonu, włączenie większej ilości starterów jest korzystniejsze dla wytwarzania zwiększonego sygnału fluorescencyjnego [2].

Do analizy przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym opracowano kilka metod opartych na fluorescencji. W podstawowych technikach stosuje się sondy DNA o sekwencji komplementarnej do badanego fragmentu cząsteczki DNA, znakowane związkiem fluorescencyjnym (zwanym również reporterem, fluorochromem), który emituje światło w odpowiednich warunkach. Inna metoda opiera się na prostym pomiarze fluorescencji po związaniu cząsteczki fluorochromu z dwuniciową cząsteczką DNA [4].

Najczęściej stosowane sondy opierają się na zjawisku transferu energii rezonansu magnetycznego (*Fluorescence Resonance Energy Transfer* – FRET) pomiędzy fluorochromami albo jednym fluorochromem a związkiem wygaszającym (*quencher*), który rozprasza energię w postaci ciepła, a nie fluorescencji. W mieszaninie reakcyjnej primery lub sondy zawierają cząsteczkę reportera fluorescencyjnego. W czasie reakcji następuje transfer energii z jednego fluorochromu absorbującego energię (I) na drugi, który z kolei emituje światło (II). Gdy oba fluorochromy znajdują się blisko siebie, fluorochrom II przechwytuje energię wzbudzenia fluorochromu I i dochodzi do emisji światła. Może także dochodzić do wygaszania emisji fluorochromu za pośrednictwem wygaszacza [2, 4].

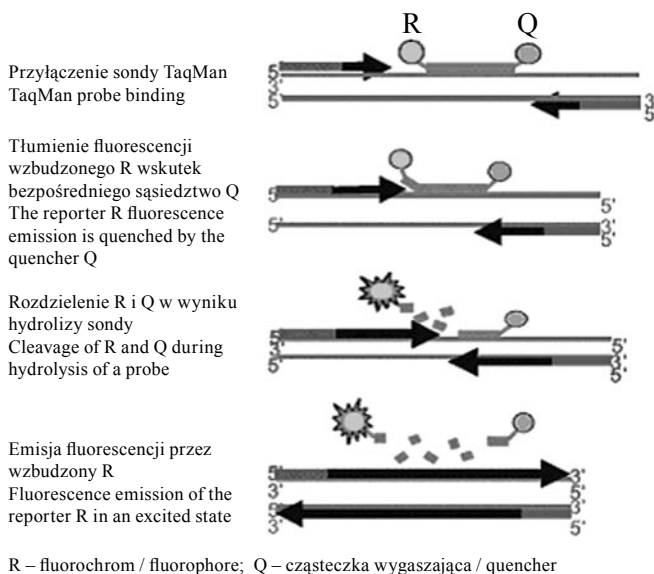
Najmniej skomplikowana metoda wykorzystuje dwie niewielkie sondy komplementarne do powielanej sekwencji.

Stosowanie pary przyległych, znakowanych fluorescencyjnie sond jest znane jako HybProbes. Podczas, gdy jedna z sond jest naznaczona fluorochromem na końcu 3', druga zawiera inną cząsteczkę fluorochromu na końcu 5' i kiedy dochodzi do hybrydyzacji sond do sekwencji komplementarnych, wówczas oba fluorofory znajdują się bardzo blisko siebie na duplesie DNA (w odległości około 10 nukleotydów). Tylko w takiej sytuacji fluorochrom 3' przy fali świetlnej o odpowiedniej długości ulega wzbudzeniu oraz emituje światło, które dociera do fluorochromu 5' i pobudza go. W konsekwencji dochodzi do fluorescencji, która jest wykrywana przez detektor i monitorowana. Sygnał fluorescencyjny jest emitowany dopóki oba fluorochromy znajdują się blisko siebie i zanika dopiero wtedy, gdy sondy zostaną odłączone od matrycy, co ma miejsce na etapie elongacji. Natężenie fluorescencji na etapie hybrydyzacji (*annealing*) jest tym silniejsze, im większa jest liczba kopii analizowanej sekwencji DNA na końcu wcześniejszego cyklu reakcji PCR [2, 4].

Technika sygnałów molekularnych (*molecular beacons*) jako pierwsza w rt-PCR wykorzystuje pojedynczą sondę o kształcie spinki do włosów, której część osiowa (*stem*) zawiera komplementarne do siebie odcinki, a pętla (*loop*) – sekwencje komplementarne do sekwencji DNA. Z sondą są związane dwie cząsteczki – fluorochrom znajdujący się na końcu 5' i wygaszacz zlokalizowany na przeciwnym końcu. Zamknięta struktura tej sondy utrzymuje je w bliskim sąsiedztwie, co powoduje, że przy odpowiedniej długości fali świetlnej nie dochodzi do emisji światła. Dzieje się tak, dlatego że wygaszacz, który znajduje się w bezpośredniej odległości od wzbudzonego fluorochromu przechwytuje jego energię, uniemożliwiając emisję. W obecności komplementarnej sekwencji na etapie *annealingu* sonda hybryduje i przechodzi konformacyjną zmianę z zamkniętej na otwartą. Fluorofor zostaje wówczas przestrzennie oddalony od wygaszacza i natężenie emitowanej przez niego fluorescencji może być monitorowane. Podobnie jak w HybProbes na etapie wydłużania, sonda zostaje usunięta z matrycy i sygnał zanika – natężenie emitowanego światła na etapie hybrydyzacji jest proporcjonalne do ilości kopii analizowanej sekwencji na końcu każdego cyklu reakcji PCR [2, 4, 7].

Najbardziej powszechną metodą detekcji produktu, opartą na pojedynczej sondzie podwójnie znakowanej, jest metoda hydrolizy sond (TaqMan), znana również jako technika 5' nukleazy. Tak długo, jak liniowa sonda posiadająca fluorochrom na końcu 5' (np. FAM) i cząsteczkę wygaszającą fluorescencję (np. TAMRA) na 3' pozostaje nietknięta, bezpośrednia bliskość obu cząsteczek tłumii fluorescencję wzbudzonego fluorochromu. Na etapie elongacji następuje degradacja (hydroliza) sondy przez polimerazę Taq posiadającą aktywność 5'-egzonukleazową, wskutek czego fluorofor zostaje odseparowany od wygaszacza i możliwa jest fluorescencja. Emisja światła fluorescencyjnego przez wzbudzony fluorochrom zachodzi więc wyłącznie na etapie wydłużania, po rozdzieleniu obu cząsteczek. Natężenie sygnału fluorescencyjnego mierzone podczas wykładniczej fazy reakcji PCR jest proporcjonalne do początkowej puli

analizowanej sekwencji DNA [4, 5, 6, 8]. Schemat przebiegu reakcji najczęściej stosowanej metody detekcji DNA przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Reakcja hydrolizy sond (TaqMan)  
Fig. 1. Probe hydrolysis reaction (TaqMan)

Modyfikacją TaqMan jest technika sond wiążących się z mniejszą bruzdą DNA (*Minor Groove Binding* – MGB) nazywana komercyjnie Eclipse. Fluorofor znajduje się na końcu 3' i w stanie niezwiązany sonda przyjmuje konfigurację przypadkowej spirali, której fluorescencja jest skutecznie tłumiona. Metoda ta pozwala stosować znacznie krótsze sondy (12–17-nukleotydowe) dzięki wzrostowi temperatury topnienia ( $T_m$ ) wynikającemu z wzajemnego oddziaływania sond MGB z helisą DNA. Sondy takie są idealne do wykrywania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów, ponieważ są one znacznie bardziej zdestabilizowane przez zmiany nukleotydów w miejscu hybrydyzacji w porównaniu z większymi sondami [2, 3, 5].

LightCycler składa się z pary jednoniciowych oligonukleotydów, z których pierwszy (oligo probe I) jest znakowany na końcu 3' donorem fluoroforu, a drugi (oligo probe II) na końcu 5' jednym z dwóch dostępnych akceptorów fluoroforu. Wolna grupa 3' hydroksylowa nukleotydu II musi być zablokowana grupą fosforanową, aby zapobiec reakcji wydłużania w wyniku działania polimerazy. Podczas etapu annealingu primery i sondy ulegają hybrydyzacji do specyficznych regionów, w następstwie czego donor i akceptor, które do tej pory były odseparowane, znajdują się w bliskim sąsiedztwie. Dochodzi wówczas do wzbudzenia donora i transferu energii rezonansu magnetycznego na akceptor, który zaczyna emitować światło. Znaczący wzrost natężenia fluorescencji jest proporcjonalny do ilości DNA [9, 10, 11].

Scorpions udostępnia dwie techniki: z pojedynczą sondą o strukturze spinki (*Scorpions uni-probe*) oraz z sondą podwójną (*Scorpions bi-probe*). W obu przypadkach reakcja prowadząca do generacji sygnału fluorescencji jest

wewnątrzcząsteczkowym zjawiskiem, które zachodzi przed jakimikolwiek innymi współzawodniczącymi reakcjami ubocznymi. Ta właściwość umożliwia sondom Scorpions zapewnienie silniejszego sygnału, krótszego czasu reakcji oraz lepszego rozeznania w porównaniu z innymi konwencjonalnymi mechanizmami dwucząsteczkowymi. Pozwala to również na bardziej wiarygodną konstrukcję sond [12, 13, 14, 15]. W technice *Scorpions uni-probe* sonda utrzymuje w stanie niezhybrydowanej konfiguracji spinki, której część osiowa (*stem*) zawiera odpowiadające sobie sekwencje komplementarne. Fluorofor (reporter) przymocowany do końca 5' jest tłumiony przez cząsteczkę wygaszającą (*quencher*) połączoną z końcem 3'. Odcinek 3' zawiera również sekwencję, która jest komplementarna do wydłużającego się produktu startera. Sekwencja ta jest związana z końcem 5' primera przez nieamplifikujący monomer, tzw. bloker (*stopper, blocker*), co zapobiega powielaniu sekwencji sondy podczas etapu polimeryzacji i otworzeniu struktury spinki podczas nieobecności specyficznej docelowej sekwencji. Na początku reakcji następuje wydłużenie primera przez polimerazę oraz synteza komplementarnej nici o specyficznej sekwencji docelowej. Podczas następnego cyklu, po wydłużeniu primera, specyficzna sekwencja sondy może wiązać się z jego amplikonem, umożliwiając otwarcie spinki. Dzięki zmianie konformacji sondy, tłumiony do tej pory sygnał fluorescencyjny wzbudzonego fluorochromu może być monitorowany. Scorpions przekształca primery i sondy o specyficznych sekwencjach w jednocząsteczkową strukturę, czyniąc etap emisji wyjątkowo szybkim w porównaniu z TaqMan, gdzie sygnał fluorescencyjny nie jest generowany, dopóki nie nastąpi hydroliza sondy przez polimerazę. Jednocząsteczkowa hybrydyzacja jest kinetycznie korzystna, ponieważ nie zależy od przypadkowego połączenia sondy (występującej przy stosunkowo małym stężeniu) z amplikonem, co pozwala na szybszy przebieg reakcji i znacznie silniejsze natężenie sygnału w porównaniu z TaqMan czy *molecular beacons*. Kolejną przewagą Scorpions nad techniką TaqMan jest możliwość przeprowadzania reakcji PCR w optymalnej dla polimerazy temperaturze zamiast w obniżonej, wymaganej do usuwania i niszczenia sondy przez 5' nukleazę [3, 5, 12, 13, 14, 15].

W standardowej metodzie *Scorpions uni-probe* tłumienie sygnału może czasami występować nawet przy otwartej konfiguracji sondy, ponieważ wygaszacz zawsze znajduje się blisko fluoroforu. Aby tego uniknąć zmodyfikowano Scorpions przez rozdzielenie fluorochromu i cząsteczki wygaszającej na oddzielnych oligonukleotydach. *Scorpions bi-probe* jest dupleksem dwóch komplementarnych nukleotydów dostarczających sygnał o większej intensywności niż struktura *uni-probe*. Specyficzny primer i bloker tworzą jeden oligonukleotyd znakowany reporterem na końcu 5', podczas gdy wygaszacz jest związany z końcem 3' drugiego nukleotydu całkowicie komplementarnego do sekwencji sondy. Mechanizm reakcji jest zasadniczo taki sam, jak w *Scorpions uni-probe*: podczas ilościowego real-time PCR reporter z końca 5' i wygaszacz z końca 3' są odseparowane

od siebie, prowadząc tym samym do znacznego natężenia emisji fluorescencji. Ponieważ taki układ zachowuje mechanizm sondy, jest on korzystniejszy i skutkuje silniejszym sygnałem niż tradycyjny „Scorpions”. Dodatkową zaletą tak zmodyfikowanej metody jest to, że jest ona prostsza do zaprojektowania i syntezy, ponieważ nie ma w niej struktury spinki i jedynym elementem wymagającym przyłączenia jest fluorochrom [3, 5, 12, 13, 14, 15].

Konfigurację spinki posiada również primer stosowany w technice LUX (*Light Upon Extension*). Wykazuje on szczególną właściwość samowygaszającą – przy braku specyficznego amplikonu, dzięki naturalnym zdolnościom wygaszającym, primer tłumi fluorescencję. Naturalny wygaszacz jest trzymany w bliskiej odległości od fluoroforu, a w obecności specyficznej sekwencji primer hybryduje, otwierając konfigurację spinki i pozwalając na emisję światła [2].

W systemie DzyNA-PCR fluorochrom i wygaszacz zostają odseparowane po wcześniejszym rozszczepieniu nukleotydów utrzymujących te cząsteczki w bliskim sąsiedztwie. Podczas rozdziału przeprowadzanego przez DNA-zyz uwalniany jest fluorofor, co pozwala na fluorescencję w identyczny sposób, jak w degradowanej sondzie TaqMan [2, 3].

Analiza Sunrise (zwana również Amplifluor) wykorzystuje primer zawierający 5' fluorofor i wygaszacz DABE-CYL. Cząsteczki te są odseparowane przez komplementarne odcinki, które tworzą część osiową (*stem*), kiedy primer jest w konfiguracji zamkniętej. Na końcu 3' znajduje się specyficzna, docelowa sekwencja startera, która jest powielana przez powstającą, komplementarną nić. W ten sposób część osiowa spinki zostaje zdestabilizowana, a wzbudzony fluorochrom może emitować energię, która jest następnie monitorowana. Wadą tego systemu jest możliwość niespecyficznej fluorescencji z powodu kopiowania sekwencji startera podczas formowania primeru – dimeru [3].

Produkty PCR mogą być wykrywane przy użyciu barwników emitujących światło fluorescencyjne, które niespecyficznym łączy się z cząsteczką dwuniciowego DNA. Najczęściej stosowanym niespecyficznym barwnikiem jest SYBR Green, który ulega wzbudzeniu przy 497 nm, a maksimum emisji wykazuje przy 520 nm. Technika SYBR Green stanowi czuły, najprostszy i najbardziej ekonomiczny sposób na detekcję i ilościowe oznaczenie produktów reakcji rt-PCR. Fluorochrom SYBR Green fluoryzuje po związaniu z dwuniciowym DNA (dsDNA) w wyniku ekspozycji na światło o odpowiedniej długości fal i w miarę akumulacji produktów sygnał fluorescencyjny nasila się. Można ją wykorzystać do analizy liczby kopii cząsteczek cDNA przepisanych z RNA, gdzie dsDNA będzie produktem reakcji PCR. Metoda ta nie wymaga stosowania skomplikowanej sondy, co znacznie obniża koszty, lecz jest bardziej podatna na błędy. Interpretacja wyników może tu być zafałszowana, ponieważ fluorochrom SYBR Green może łączyć się podczas reakcji z jakimkolwiek dsDNA, primerem w postaci dimeru czy też innym niespecyficznym produktem reakcji. Z tego względu

techniki tej nie stosuje się do analizy dsDNA w tkance, gdyż nadwyżka genomowego DNA fałszuje sygnał produktu reakcji wysokim sygnałem tła [3, 4, 8].

Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym wykorzystywana jest do analizy ilościowej kopii genu, transgenu oraz pomiaru ekspresji RNA w komórkach i tkankach. Jak już wcześniej wspomniano, ilość produktu powinna wzrastać wykładniczo z każdym cyklem reakcji. W rzeczywistości, w wyniku wyczerpywania się składników mieszaniny reakcyjnej, zmniejszaniem się aktywności polimerazy, a także konkurencją o matrycę pomiędzy primerami i produktem, wydajność reakcji spada. Każda PCR osiąga fazę plateau, kiedy ilość produktu nie ulega już zmianie z powodu zużycia primerów i nukleotydów. Bez względu na początkową pulę matrycy, końcowa ilość produktów będzie zbliżona. Z tego powodu reakcje różniące się wyjściowym stanem matrycy nie są rozróżniane przez końcową akumulację produktu, ale przez liczbę cykli, po których rozpoczyna się faza wzrostu wykładniczego. Podczas rt-PCR rejestrowana jest fluorescencja wygenerowana w przebiegu PCR, a wyniki są odnotowywane jako wartość progowa cyklu ( $C_T$ ) będąca numerem cyklu ( $C$ ), w którym wykryta fluorescencja przekracza próg ( $T$ ). Wartości  $C_T$  charakteryzują reakcje we wczesnej fazie wzrostu wykładniczego, kiedy niskie wartości wskazują na duże ilości materiału początkowego. Ponieważ w pierwszych cyklach ilość produktu jest niewystarczająca, aby mogła zostać wykryta, ustala się wartość progową fluorescencji ( $C_T$ ) będącą wyznacznikiem początkowej ilości matrycy. Wartość ta, którą wyznacza się niewiele powyżej zakresu detekcji analizatora fluorescencji, jest liczbą cykli, po których kinetyka reakcji wchodzi w fazę wzrostu wykładniczego. Im więcej kopii analizowanej cząsteczki kwasu nukleinowego na początku reakcji, tym mniej cykli jest potrzebnych do przekroczenia zdefiniowanego progu fluorescencji. Dane o początkowej liczbie kopii badanej sekwencji są uzyskiwane podczas podstawienia wartości  $C_T$  do krzywej kalibracyjnej wyznaczonej z pomiaru wskaźników  $C_T$  dla reakcji, w których znana jest ilość matrycy w mieszaninie reakcyjnej. W porównaniu z klasycznym PCR, gdzie określany jest tylko wynik końcowy, rt-PCR pozwala śledzić zmiany ilości produktu PCR podczas reakcji i dlatego początkowy punkt wykładniczego wzrostu może być precyzyjnie wyznaczony [4, 8].

## Piśmiennictwo

1. Van Gelder R.N.: Polymerase chain reaction diagnostics for posterior segment disease. *Retina*, 2003, 23, 445–452.
2. Mackay I.M.: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, 10, 190–212.
3. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, 1292–1305.
4. Winter P.C., Hickey G.I., Fletcher H.L.: Krótkie wykłady. Genetyka. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2004.

5. *Jebbink J., Bai X., Rogers B.B., Dawson D.B., Scheuermann R.H., Domiati-Saad R.*: Development of real-time PCR assays for the quantitative detection of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus, comparison of TaqMan probes, and Molecular Beacons. *J. Mol. Diagn.* 2003, 5, 15–20.
6. *Langmann T., Mauerer R., Zahn A., Moehle C., Probst M., Stremmel W. et al.*: Real-time reverse transcription – PCR expression profiling of the complete human ATP – binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin. Chem.* 2003, 49, 230–238.
7. *Bustin S.A.*: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 2002, 29, 23–39.
8. *Bubner B., Baldwin I.T.*: Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 2004, 23, 263–271.
9. *Bates J.A., Taylor E.J.A.*: Scorpions ARMS primers for SNP real-time PCR detection and qualification of *Pyrenophora teres*. *Mol. Plant Pathol.* 2001, 2, 275–280.
10. *Hart K.W., Williams O.M., Thelwell N., Fiander A.N., Brown T., Borysiewicz L.K. et al.*: Novel method for detection, typing and qualification of human Papillomaviruses in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 3204–3212.
11. *Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J., Brown T.*: Mode of action and application of Scorpions primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 3752–3761.
12. *Whitcombe D., Theaher J., Guy S.P., Brown T., Little S.*: Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 804–807.
13. *Kreuzer K.A., Lass U., Bohn A., Landt O., Schmidt C.A.*: LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res.* 1999, 59, 3171–3174.
14. *Nauck M.S., Gierens H., Nauck M.A., Marz W., Wieland H.*: Rapid genotyping of human platelet antigen 1 (HPA-1) with fluorophore – labelled hybridization probes on the LightCycler. *Br. J. Haematol.* 1999, 105, 803–810.
15. *Lachnik J., Ackerman B., Bohrsen A., Maass S., Diephaus C., Puncken A. et al.*: Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 3364–3373.