

Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi

Development of PCR Methods and Their Applications in Oncological Research and Practice

Hrstka R., Kolářová T., Michalová E., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

PCR metoda se velmi krátce od svého objevení stala rutinní metodou molekulárně biologických výzkumných laboratoří a nepostradatelným nástrojem diagnostické medicíny. Za dobu svého využívání byla rozvinuta do řady variant, které specificky reagují na potřeby výzkumu a diagnostiky co do použitého vstupního materiálu a jeho množství, podmínek reakce a nově vyvinutých technologií. Předložená práce stručně shrnuje jednotlivé PCR přístupy s důrazem na jejich využití v onkologickém výzkumu a praxi.

Klíčová slova

polymerázová řetězová reakce (PCR) – PCR v reálném čase – digitální PCR – klinická onkologie

Summary

Since its discovery, PCR has become a conventional method of molecular biology research laboratories and an indispensable tool in diagnostic medicine. Multiple variants of the PCR technique were developed, which enable the analysis of different biological materials at different amounts and reaction conditions. This article briefly summarizes the PCR approaches and points out their applications in oncological research and practice.

Key words

polymerase chain reaction (PCR) – real-time PCR – digital PCR – clinical oncology

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), BBMRI_CZ (LM2010004), GAČR 13-00956S a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), BBMRI_CZ (LM2010004), GAČR 13-00956S and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Roman Hrstka, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: hrstka@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 10. 2. 2014

Přijato/Accepted: 1. 4. 2014

Úvod

Prvním zásadním krokem vedoucím k objevu a následnému zavedení polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) byla práce publikovaná na konci 60. let minulého století popisující nový druh termofilní bakterie tehdy nazvané *Thermus aquaticus*. Krátce na to byla z tohoto mikroorganismu izolována termostabilní polymeráza nazvaná „Taq polymeráza“ a v polovině 80. let minulého století pak americký chemik K. Mullis objevil PCR, za což byl v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou za chemii. Význam a originalitu tohoto objevu podtrhuje článek otištěný v amerických novinách The New York Times, který na základě tohoto objevu rozděluje biologii do dvou epoch – „před PCR“ a „po PCR“. Zavedení PCR do praxe tak odstartovalo obrovský rozmach molekulární biologie a významně rozšířilo do té doby relativně omezené portfolio molekulárně-biologických metod.

Polymerázová řetězová reakce je metoda umožňující amplifikaci (tj. zmnožení) specifického úseku nukleové kyseliny, přičemž využívá obecných rysů replikace DNA. Podstatou metody je mnohonásobná syntéza komplementárního řetězce pomocí příslušné DNA polymerázy, a to v rámci sekvence vymezené krátkými syntetickými oligonukleotidy (ssDNA, 15–30 b), tzv. primery, které jsou odvozeny od dané sekvence. Teoreticky lze z jedné molekuly templátu získat 2^n kopií dané sekvence při n cyklech. Toto zmnožení následně umožňuje vizualizaci amplifikovaného produktu, jenž nejčastěji probíhá s využitím agaróзовé gelové elektroforézy (obr. 1A). PCR reakce byla za dobu jejího využívání rozvinuta do řady variant, které specificky reagují na potřeby výzkumu a diagnostiky co do použitého vstupního materiálu a jeho množství, podmínek reakce a nově vyvinutých technologií.

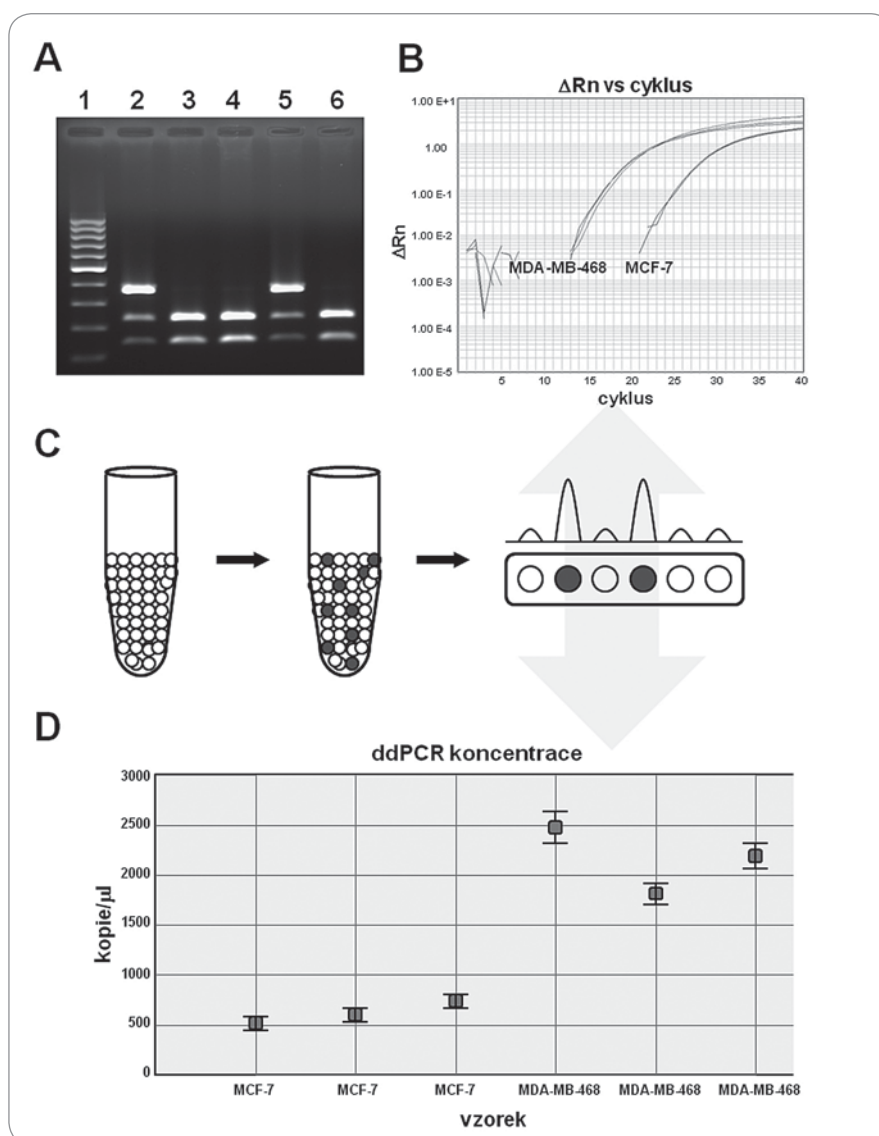
Využití PCR v onkologii

PCR je stejně jako mnoho dalších molekulárně-biologických analýz díky svým přednostem, jako je časová a materiálová úspora, možnost automatizace a dobrá reprodukovatelnost, využívána ve stále širším měřítku v rámci preventivních programů zaměřených na sta-

novení rizika vzniku onemocnění, při diagnostice patologických stavů i určení prognózy onemocnění. PCR se rovněž uplatňuje v rámci tzv. farmakogenetických vyšetření, při nichž je sledována genetická predispozice pro lékovou odpověď, tj. predikována bezpečnost či toxicita a účinnost terapeutické látky pro konkrétního pacienta.

PCR, obvykle ve spojení s dalšími molekulárně-biologickými technikami (elektroforéza, RFLP, sekvencování), umožňuje detekovat různé typy mutací spojené s vyšším rizikem vzniku ná-

doru a pomáhá tak zlepšit preventivní screeningové programy nádorových onemocnění či podrobněji charakterizovat typ nádoru pro následnou volbu účinnější terapie. Příkladem vyšetření prováděných v Masarykově onkologickém ústavu mohou být detekce mutací specifických genů spojených s genetickou predispozicí ke vzniku nádoru, kdy příslušná sekvence genu je nejprve amplifikována pomocí PCR a získané amplicony následně sekvencovány. Jedná se např. o geny *BRCA1*, *BRCA2* u hereditárního syndromu nádoru prsu a/nebo va-



Obr. 1. Přehled stěžejních PCR technologií.

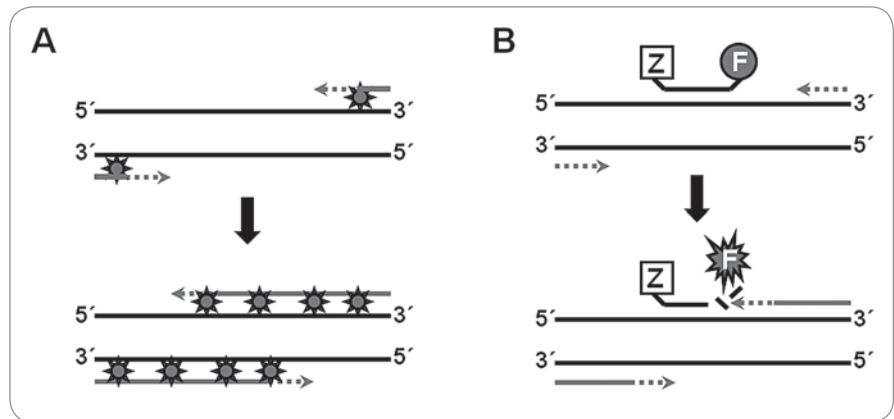
A. Tradiční PCR; B. PCR v reálném čase; C. digitální PCR – schematická ukázka frakcionace vzorku a následné vyhodnocení; D. konkrétní ukázka výsledků získaných pomocí digitální PCR (ddPCR), pro zajímavost tyto vzorky byly paralelně analyzovány pomocí PCR v reálném čase viz část B.

ječníku; geny *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* u hereditárního nepolypózního karcinomu tlustého střeva – tzv. Lynchova syndromu; transkripční varianty p16/INK4a a p14/ARF genu *CDKN2A* u familiárního maligního melanomu; gen *TP53* u Li-Fraumeniho syndromu; nebo gen *CDH1* u hereditární formy difúzního karcinomu žaludku. Dalším příkladem je vývoj metod detekce volných nádorových buněk v krevním řečišti či lymfatických uzlinách na principu PCR, který má zásadní význam pro hodnocení metastatického potenciálu buněk a vývoje onemocnění a tím i volby příslušné terapie. Analogicky se PCR případně RT-PCR (reverse transcription PCR) využívá při sledování minimální reziduální nemoci zejména u hematologických malignit, při níž se hodnotí počet přítomných nádorových buněk, např. detekcí transkriptu fúzního genu *bcl-abl* v případě chronické myeloidní leukemie (chronic myeloid leukaemia – CML). Kromě identifikace vlastních nádorových markerů je PCR, zejména pak kvantitativní PCR (viz dále), významným nástrojem při stanovení přítomnosti patogenních organismů u onkologických pacientů při septických stavech. Základem testu je amplifikace specifické sekvence patogenu v odebraném biologickém vzorku a oproti klasické mikrobiologické kultivaci představuje značnou časovou úsporu a pro pacienta tedy rychlejší nasazení účinné léčby.

V rámci experimentální onkologie se PCR využívá především při technikách klonování, tj. vnášení cizorodé DNA do vektorových systémů, kdy současně představuje i základní nástroj pro ověřování přítomnosti specifických sekvencí ve sledovaném genomu. PCR je využívána i v případě čipových technologií, při nichž je analyzována úroveň transkripce několika až stovek genů současně a sledovány reakce buněk na specifické podmínky indukci vybraných signálních drah, exprese specifických genů a syntézou specifických proteinů.

PCR v reálném čase (kvantitativní)

Dalším revolučním krokem bylo zavedení kvantitativní PCR (quantitative PCR – qPCR) neboli PCR v reálném čase



Obr. 2. Princip využití nespecifických a specifických sond při PCR v reálném čase.

A. Nespecifická proba (nejčastěji SYBR Green) se váže na dsDNA, čímž dochází k emisi fluorescence. B. Působením exonukleázové aktivity polymerázy dochází k rozštěpení probe navázané k cílové sekvenci a následnému uvolnění fluorescenčního signálu.

(real-time PCR). Oproti tradiční PCR, kdy konečný produkt (amplikon) je detekován až po ukončení reakce, PCR v reálném čase umožňuje stanovit tvorbu produktu v průběhu reakce, a to i v raných fázích, kdy přírůstek intenzity fluorescence je úměrný množství stanoveného templátu (obr. 1B). Právě měření kinetiky v brzkých fázích reakce představuje zásadní výhodu v porovnání s tradiční PCR. Postup tradiční PCR včetně jejího vyhodnocení je v porovnání s kvantitativní PCR časově náročnější a vyznačuje se nižší citlivostí detekce, amplifikované produkty jsou rozlišovány především na základě velikosti, a poskytují tak výsledky především kvalitativního charakteru. V případě qPCR je však potřeba počítat s podstatně vyšší pořizovací hodnotou přístrojového vybavení a vyššími náklady na analýzu vzorku.

Obecně lze průběh qPCR reakce rozdělit do tří fází. V první, tzv. exponenciální fázi, je reakce vysoce specifická, v případě 100% efektivity dochází k přesnému zdvojnásobení množství očekávaného produktu, data jsou tudíž maximálně přesná. Druhou fází označujeme jako lineární. Tato fáze může být poměrně variabilní, dochází při ní ke zpomalování reakce, spotřebě jednotlivých komponent reakce, může začít docházet i k degradaci vzniklých produktů. Ve třetí, tzv. plateau fázi, je reakce zastavena, nedochází k syntéze dalšího produktu, naopak může nastat jeho degradace. K přesné kvantifikaci jsou

využívány sondy obvykle značené fluorescenčním barvivem. Rozlišujeme dva hlavní typy sond: 1. nespecifické – typickým příkladem jsou fluorescenční kyaninová barviva SYBR Green, která fluoreskují při vazbě do menšího žlábků dsDNA, a 2. specifické, fluorescenčně značené sondy. Specifické sondy jsou navrženy tak, aby hybridizovaly s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery v místě vymezeném protisměrně orientovanými primery. Existuje řada variant specifických sond, nejčastěji se používají tzv. hydrolyzační (TaqMan) sondy, které nesou na svém 5' konci fluorescenční značku a na 3' konci tzv. zhášeč. Při hydrolyze sondy DNA-polymerázou dochází k oddělení fluorescenční značky od zhášeče a následné emisi fluorescence (obr. 2).

V praxi se nejčastěji využívají dvě základní vyhodnocovací metody. První varianta je absolutní kvantifikace, tzv. metoda absolutní standardní křivky, která umožňuje zjištění přesného množství kopií templátu ve vzorku. Získáváme tak výsledek v kopiích vzhledem k celkovému množství standardu (např. plazmidové DNA). Druhá varianta je relativní kvantifikace využívající buď relativní standardní křivku, nebo se provádí tzv. komparativní C_T metoda. Přístup založený na konstrukci relativní standardní křivky umožňuje zjištění změn množství templátu mezi vzorky vzhledem k interní kontrole (tzv. kalibrátoru). Komparativní C_T metoda využívá aritmetický

vzorec ($2^{-\Delta\Delta CT}$) definující množství cílového templátu normalizovaný na základě množství endogenních referenčních sekvencí a kvantifikovaný relativně, tedy vzhledem ke kalibrátoru (jinému vzorku – obvykle kontrole).

Využití PCR v reálném čase v onkologii

PCR v reálném čase patří mezi důležité diagnostické nástroje umožňující nejen kvantitativní analýzu zaměřenou na stanovení exprese vybraných genů, ale i kvalitativní, běžně používanou při stanovení mutací či polymorfizmů. V případě kvalitativních analýz (genotypizace) se velmi často používá vysokorozlišovací analýza křivek tání tzv. HRM (high resolution melting) analýza. V principu je tato metoda založena na heteroduplexní analýze, v rámci které jsou detekovány rozdíly v teplotách tání PCR disociačních křivek. Kromě stanovení rozdílů v analyzovaných sekvencích, především přítomnosti specifických mutací, lze HRM použít i k detekci metylací. Typickým příkladem využití HRM v onkologii je diagnostika hereditárních nádorových syndromů. Patří sem např. přímé vyšetření přítomnosti mutace v genech *BRCA1*, *BRCA2* (hereditární syndrom nádoru prsu a/nebo vaječníků); *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, Lynchův syndrom); *TP53* (Li-Fraumeniho syndrom) a řada dalších. Dále se PCR v reálném čase používá i k detekci mutací vzhledem k indikaci vhodné léčby. Klasickým příkladem je vyšetření na přítomnost bodové záměny v kodonech 12 a 13 genu *KRAS*, kdy se opět používá HRM analýza nebo se využívá technologie ARMS (amplification refractory mutation system), jenž spočívá v použití alelicky, v tomto případě mutant specifických primerů specificky rozpoznávajících jednotlivé mutanty. Není-li mutace genu *KRAS* prokázána, je vhodné nasadit biologickou léčbu založenou na aplikaci rekombinantních protilátek inhibujících EGFR (epidermal growth factor receptor). Vychází se z předpokladu, že v nádorech s *wild type KRAS* je exprese *KRAS* proteinu aktivována pouze přechodně signalizací prostřednictvím EGFR, zatímco v případech mutovaného genu *KRAS* do-

chází k jeho konstitutivní aktivaci a takové nádory vykazují výrazně sníženou odpověď na EGFR inhibici.

Jedním z nejvýznamnějších farmakogenetických vyšetření v případě hematologických malignit je stanovení polymorfismu a aktivity enzymu thiopurin S-metyltransferázy (TPMT), enzymu zásadního při odbourávání thiopurinových léčiv využívaných v onkologické terapii a jako imunosupresiv. Snížená aktivita enzymu je důsledkem řady polymorfizmů v kódující oblasti genu *TPMT* a vede k nežádoucím účinkům při léčbě thiopuriny, jako jsou neurotoxicita, hepatotoxicita atd. Stanovení nejčastějších typů polymorfizmů je prováděno pomocí kvantitativní PCR a je doprovázeno stanovením aktivity TPMT v erytrocytech pomocí HPLC.

Hlavní výhoda PCR v reálném čase v porovnání s klasickou (end-point PCR) však spočívá v možnosti kvantifikovat množství výchozího templátu podle dynamiky amplifikační reakce, především tedy stanovení exprese vybraných genů. Této skutečnosti lze využít i v experimentální onkologii při sledování hladin exprese vybraných genů na úrovni mRNA za definovaných podmínek. Jedním z možných příkladů praktického využití je predikce vhodnosti nasazení fluorovaných pirimidinů při léčbě nádorů gastrointestinálního traktu, a to v rámci paliativní i adjuvantní terapie. V těchto případech je vhodné stanovit hladinu mRNA pro thymidylát syntázu (TS), thymidin fosforylázu (TP) a dihydropyrimidin dehydrogenázu (DPD), tedy enzymů účastnících se v metabolismu 5-fluorouracilu (5-FU). mRNA může být izolována z biopsií primárního nádoru i metastázy pacienta. V případě zvýšené hladiny exprese genů lze předpokládat rezistenci nádoru k fluoropyrimidinovým cytostatikům.

Digitální PCR

Digitální PCR je někdy též označována jako tzv. třetí generace PCR (obr. 1C). Hlavní výhodou tohoto přístupu je absolutní kvantifikace, aniž musí být sestavena kalibrační křivka. V podstatě se jedná o „upgrade“ tradiční PCR umožňující klonální amplifikaci a přímou kvantifikaci nukleových kyselin. Je třeba si však uvědomit, že se nejedná o metodu zcela

nahrazující stávající PCR přístupy, ale spíše o komplementární metodu zaměřenou především na detekci vzácněji se vyskytujících cílových molekul.

Podstata digitální PCR spočívá v rozdělení analyzovaného vzorku, tedy i vlastních cílových sekvencí, do velkého množství dílčích vzorků. To se provádí buď pomocí miniaturních čipů, kdy je vzorek pomocí mikrokapilár rozdělen do řady malých segmentů (komůrek), nebo je ze vzorku vytvořena emulze olejových mikrokapek. Následně probíhá v každé mikrokapce či komůrce čipu standardní PCR, takže v závislosti na počtu mikrokapek/kapacitě čipu získáváme tisíce až několik desítek tisíc parciálních kvalitativních výsledků na bázi fluorescence (pozitivní/negativní) pro analyzovaný vzorek. Vzhledem k možné přítomnosti dvou a více cílových molekul současně (v jedné mikrokapce/segmentu čipu) je v rámci celkového vyhodnocování tato skutečnost brána v potaz a výsledky jsou korigovány na základě Poissonova rozdělení. Na rozdíl od tradiční PCR, kdy množství amplifikovaného produktu pouze přibližně odpovídá množství templátu a je značně ovlivněno počtem PCR cyklů, kvantifikace cílové sekvence v případě digitální PCR prakticky nezávisí na počtu amplifikačních cyklů, což významně eliminuje závislost na exponenciálním nárůstu množství výsledného PCR produktu, jako je tomu u konvenční PCR či PCR v reálném čase, a umožňuje tak zcela absolutní kvantifikaci (obr. 1D).

Mezi nejvýznamnější aplikace digitální PCR patří:

1. Detekce amplifikací genů spojených s maligní transformací. Genomové amplifikace jsou běžnou součástí genomu nádorových buněk. Tyto amplifikace často vedou ke zvýšené expresi specifických onkogenů a zásadním způsobem ovlivňují biologii nádoru. Přesná a citlivá detekce amplifikací je proto žádoucí v rámci diagnostiky nádorů a může mít prognostický a/nebo prediktivní význam. Tento přístup by mohl v budoucnu sloužit i jako alternativa k v současnosti prováděným FISH analýzám. Hlavní výhodou digitální PCR je robustnost, senzitivita a finanční nenáročnost v porovnání se standardně prováděnými FISH stanoveními.

Tab. 1. Přehled PCR přístupů.

	Tradiční PCR	PCR v reálném čase	Digitální PCR
celkový stručný přehled	stanoví celkové množství výsledného produktu (detekce probíhá až v tzv. fázi plateau, což může způsobovat značnou variabilitu výsledků)	stanoví množství vzniklého produktu v exponenciální fázi, což umožňuje přesnou kvantifikaci	kvantifikuje počet pozitivních a negativních frakcí daného vzorku, čímž umožňuje stanovení absolutního počtu kopií
výsledek	semikvantitativní	kvantitativní	kvantitativní
výhody a nevýhody	relativně nízké náklady × pracný způsob detekce výsledného produktu, nízká rozlišovací schopnost, dynamická škála < 2 log, diskriminace pouze na základě velikosti PCR produktu	širší dynamická škála, schopnost rozlišit méně jak dvojnásobný rozdíl, nárůst fluorescence je přímo úměrný množství vznikajících PCR ampliconů, rozštěpené sondy generují permanentní signál × nákladnější instrumentace i cena vlastního stanovení	bez nutnosti použít standardy, přímá úměra mezi počtem replikátů a přesností celkové kvantifikace, vhodná k analýze komplexních vzorků, stanovení počtu kopií v lineárním módu umožňuje detekci i nepatrných rozdílů × nákladnější instrumentace i cena vlastního stanovení
klíčové aplikace	PCR produkt vhodný pro klonování, genotypizaci, sekvencování, detekci patogenů atd.	kvantifikace genové exprese, detekce SNP, analýza miRNA, stanovení počtu kopií studovaného genu a další	absolutní kvantifikace NGS knihoven, detekce vzácných alel, absolutní kvantifikace standardů, absolutní kvantifikace virionů apod.

2. Detekce alterací nukleových kyselin přítomných ve vzorku s nízkou četností, tedy minoritně zastoupených v analyzovaném vzorku. Stanovení přítomnosti mutací v homogenních vzorcích je obecně snadno proveditelné a velmi dobře realizovatelné běžnými metodami, neboť se pracuje s velkým množstvím genetického materiálu a mutace je obvykle přítomna v 50 % všech cílových sekvencí (1 mutovaná alela ze 2). Situace se však komplikuje v případě zpracování heterogenního vzorku, v němž je přítomnost mutovaných sekvencí významně snižena. V onkologii jsou typickým příkladem punkční biopsie obecně obsahující velké množství normální/zdravé tkáně nebo krevní vzorky, kde jsou aberantní buňky značně naředěny.
3. Stanovení hladiny miRNA. Tento přístup umožňuje absolutní kvantifikaci miRNA a prokazuje vynikající reprodukovatelnost i v případě nízkých hladin miRNA. Digitální PCR je tedy ideální pro detekci cirkulujících miRNA jako potenciálních diagnostických biomarkerů poukazujících na přítomnost onkologického onemocnění.
4. Mezi další aplikace, pro něž je vhodné uvažovat o použití digitální PCR, patří

absolutní kvantifikace patogenů, detekce onkogenních alel ve vzorcích uchovávaných ve formě parafinových bloků, absolutní kvantifikace standardů pro další aplikace, kvantifikace vzorků v rámci jejich přípravy pro NGS (nová generace sekvencování; pro více informací viz článek Koubková et al v rámci tohoto Supplementa, str. 61–68) či validace výsledků NGS díky absolutní kvantifikaci.

Závěr

Polymerázová řetězová reakce se řadí mezi základní metody molekulární biologie a v dnešní době představuje nepostradatelný nástroj pro manipulaci s genetickou informací v mnoha oblastech biomedicínského výzkumu. S objevem PCR také došlo k obrovskému rozvoji molekulární diagnostiky, který byl ještě umocněn možností kvantifikace cílových molekul díky PCR v reálném čase a následně pak vývojem digitální PCR. Přehled jednotlivých PCR přístupů, jejich porovnání včetně výhod a nedostatků je pro větší přehlednost a srozumitelnost shrnut do tab. 1.

Literatura

1. Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* 1969; 98(1): 289–297.

2. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2003; 226: 3–6.
3. Wade N. Researchers claim embryonic cell mix of human and cow. *N Y Times Web* 1998; A1, A26.
4. Foretova L, Petrakova K, Palacova M et al. Genetic testing and prevention of hereditary cancer at the MMCI – over 10 years of experience. *Klin Onkol* 2010; 23(6): 388–400.
5. Goydos JS, Reintgen DS. A molecular technique useful in the detection of occult metastases in patients with melanoma: rt-PCR analysis of sentinel lymph nodes and peripheral blood. *Methods Mol Med* 2001; 61: 301–320. doi: 10.1385/1-59259-145-0:301.
6. Haferlach T, Bacher U, Kern W et al. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. *Ann Hematol* 2008; 87(1): 1–10.
7. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. *Cancer* 2008; 112(10): 2112–2118. doi: 10.1002/cncr.23427.
8. Klouche M, Schroder U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(7): 888–908. doi: 10.1515/CCLM.2008.157.
9. Tsalik EL, Jones D, Nicholson B et al. Multiplex PCR to diagnose bloodstream infections in patients admitted from the emergency department with sepsis. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1): 26–33. doi: 10.1128/JCM.01447-09.
10. Dubska L, Vyskocilova M, Minarikova D et al. Light-Cycler SeptiFast technology in patients with solid malignancies: clinical utility for rapid etiologic diagnosis of sepsis. *Crit Care* 2012; 16(1): 404. doi: 10.1186/cc10595.
11. Heid CA, Stevens J, Livak KJ et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10): 986–994.
12. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J et al. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(12): e103.
13. Holland PM, Abramson RD, Watson R et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'–3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*

- DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(16): 7276–7280.
14. Wilke K, Duman B, Horst J. Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by real-time PCR. *Hum Mutat* 2000; 16(5): 431–436.
15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25(4): 402–408.
16. Krypuy M, Ahmed AA, Etemadmoghadam D et al. High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5–8. *BMC Cancer* 2007; 7: 168.
17. Rouleau E, Lefol C, Bourdon V et al. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(6): 867–875.
18. Takano EA, Mitchell G, Fox SB et al. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. *BMC Cancer* 2008; 8: 59. doi: 10.1186/1471-2407-8-59.
19. Bando H, Yoshino T, Tsuchihara K et al. KRAS mutations detected by the amplification refractory mutation system-scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *Br J Cancer* 2011; 105(3): 403–406.
20. Franklin WA, Haney J, Sugita M et al. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *J Mol Diagn* 2010; 12(1): 43–50. doi: 10.2353/jmoldx.2010.080131.
21. Demlova R, Mrkvicova M, Sterba J et al. Augmenting clinical interpretability of thiopurine methyltransferase laboratory evaluation. *Oncology* 2014; 86(3): 152–158.
22. Aschele C, Lonardi S, Monfardini S. Thymidylate Synthase expression as a predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2002; 28(1): 27–47.
23. Mader RM, Muller M, Steger GG. Resistance to 5-fluorouracil. *Gen Pharmacol* 1998; 31(5): 661–666.
24. Zimmermann BG, Grill S, Holzgreve W et al. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenat Diagn* 2008; 28(12): 1087–1093. doi: 10.1002/pd.2150.
25. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods* 2013; 10(10): 1003–1005. doi: 10.1038/nmeth.2633.
26. Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R et al. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(11): 4255–4260.
27. Henrich TJ, Gallien S, Li JZ et al. Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR. *J Virol Methods* 2012; 186(1–2): 68–72. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.08.019.
28. Nadauld L, Regan JF, Miotke L et al. Quantitative and sensitive detection of cancer genome amplifications from formalin fixed paraffin embedded tumors with droplet digital PCR. *Transl Med (Sunnyvale)* 2012; 2(2): pii: 1000107.