

Real-Time-PCR

Einführung, Detektionssysteme



Basel-Stadt

GDCh – Gesellschaft Deutscher Chemiker, 25.-26. Nov. 2010, Freiburg
“Aktuelle Trends der Real-Time-PCR in der Lebensmittelanalytik”

Was ist PCR?

Die **Polymerase-Kettenreaktion** (englisch *Polymerase Chain Reaction*, **PCR**) ist eine Methode, um die Erbsubstanz DNA *in vitro* zu vervielfältigen.

Dargestellt in einem Film:

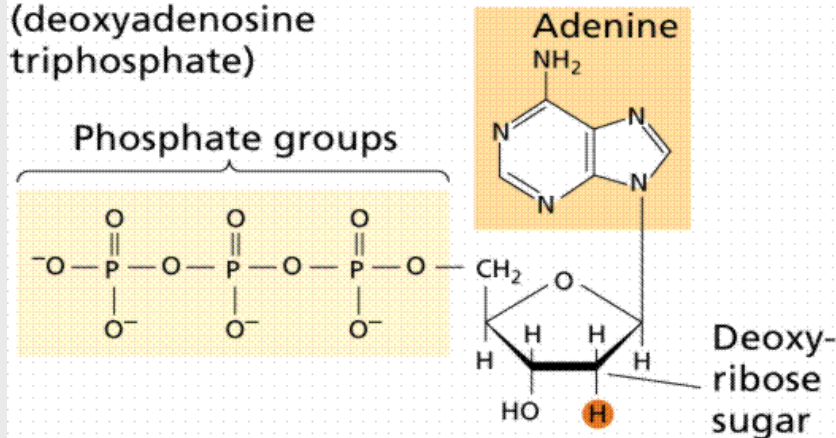
<http://www.youtube.com/watch?v=HMC7c2T8fVk&list=QL&playnext=1>



PCR – „Zutaten“

d-NTPs:

Deoxy-ATP
(deoxyadenosine
triphosphate)



Buffer

Templat

Taq DNA-Polymerase:

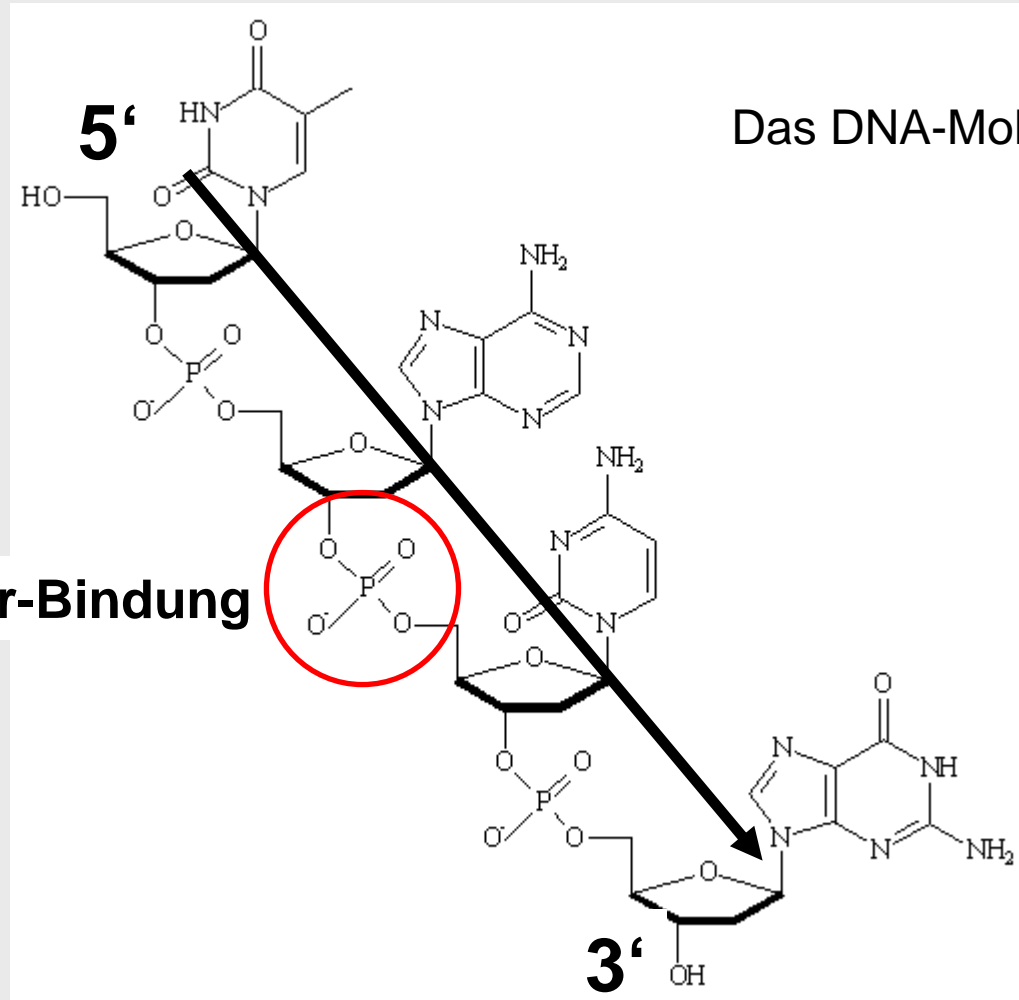
- 5'→3' DNA-Polymerase Aktivität
- Temperaturoptimum: 70-80°C
- pH-Optimum: zwischen 7 und 8
- Ionenabhängigkeit: 10 mM Mg²⁺
- Halbwertszeit: 130 Min. bei 92.5°C
- Polymerisationsgeschwindigkeit: 150 Nukl/sec.

→ Bufferbedingungen



Basel-Stadt

Phosphodiesterbindung



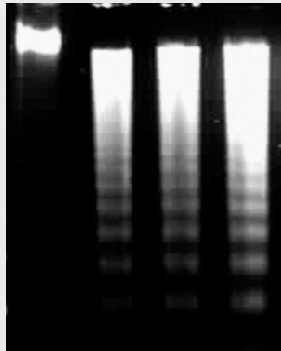
Das DNA-Molekül ist gerichtet!

Phosphodiester-Bindung



Templatqualität

- **Fragmentierung der DNA**



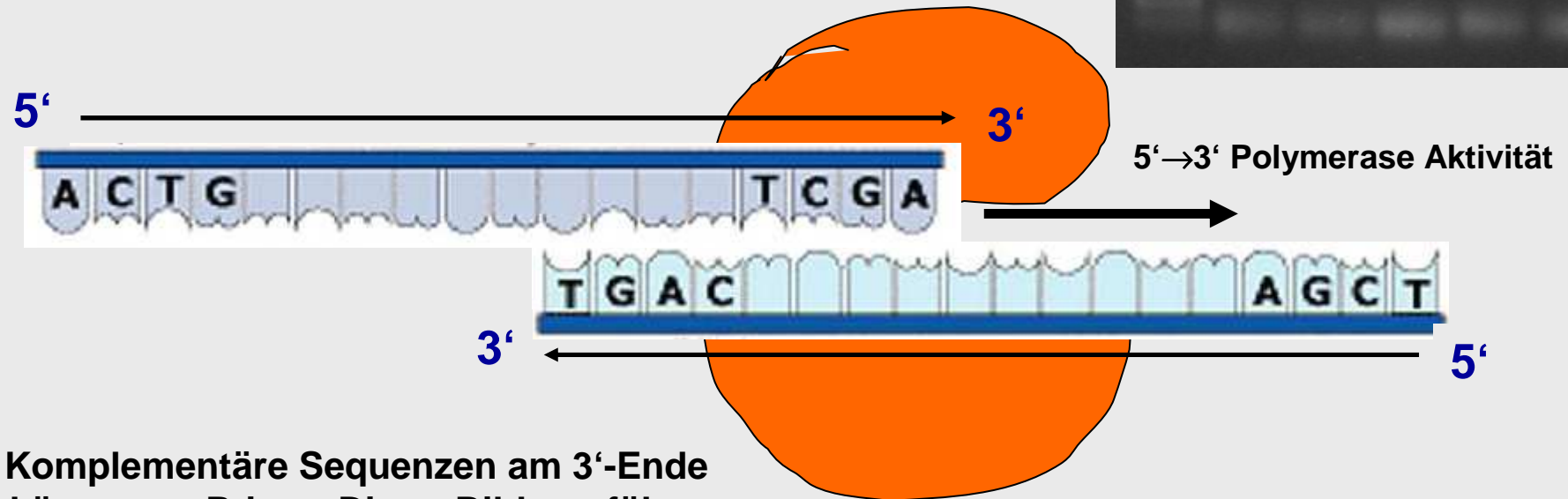
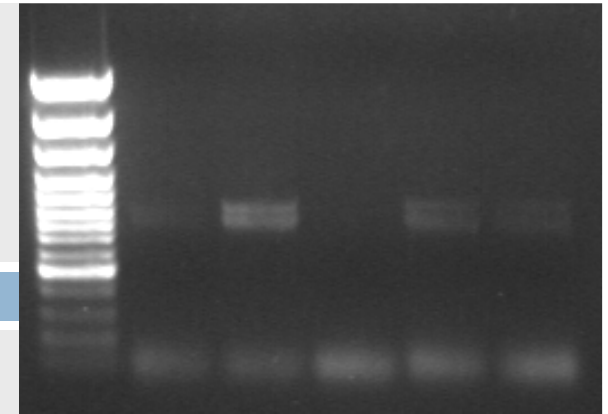
- **mögliche Inhibition**

- **absolute Menge der DNA**
(wenige pg bis max. 1 µg / rct)

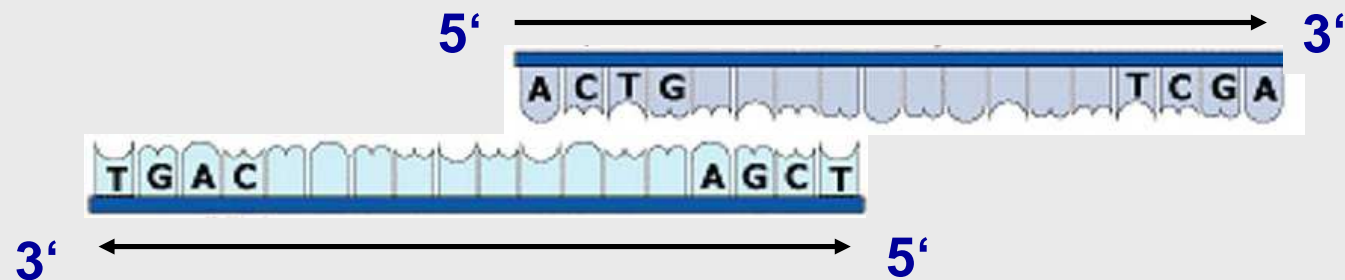
Liste bekannter PCR-Inhibitoren

Components	Inhibitory concentration
Bile salt	>0.075% (w/v)
Cacao	No concentration given
Carrageenan	>0.001% (w/v)
CTAB	>0.005% (w/v)
Cycloheximide	>0.02% (w/v)
Dextran sulfate	>0.1% (w/v)
EDTA	>0.5 mmole/l
Ethanol	>1% (v/v)
Gum ghatti	No concentration given
Heme	>0.1% (w/v)
Heparin	>0.15 i.U./ml
Humic acids	>0.01% (w/v)
Isopropanol	>1% (v/v)
KSCN	>5% (w/v)
LiCl	>0.3% (w/v)
MaCl ₂ 6H ₂ O	>0.8% (w/v)
Pectin	>0.1% (w/v)
Phenol	>0.2% (v/v)
Proteinases (in milk)	No concentration given
SDS	>0.0005% (w/v)
Sodium acetate	>5 mmole/l
Sodium chloride	>25 mmole/l
Sucrose	>10% (w/v)
Tannic acid	>0.01% (w/v)
Urea	>20 mmole/l
Xanthan	>0.1% (w/v)
Xylan	>0.0025% (w/v)

Primer-Dimer Bildung



⇒ Komplementäre Sequenzen am 3'-Ende können zu Primer-Dimer Bildung führen



⇒ Komplementäre Sequenzen am 5'-Ende führen nicht zu Primer-Dimer Bildung

Exponentielle Vermehrung während der PCR

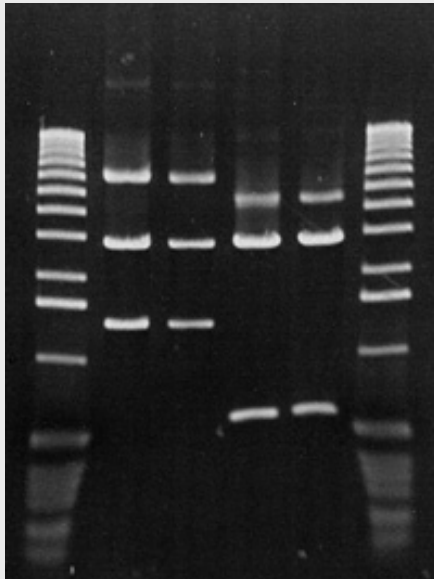
Zyklenzahl	Teilfragmente	PCR-Fragment
0	0	0
1	2	0
2	4	0
3	6	2

Teilfragmente = $2n$

PCR-Fragmente = $2^n - 2n$

9	18	494
10	20	1004
11	22	2026
12	24	4072
13	26	8166
14	28	16356
15	30	32738
16	32	65504
17	34	131038
18	36	262108
19	38	524250
20	40	1048536
	<i>linear</i>	<i>exponentiell</i>

Detektion der PCR-Fragmente



Gelelektrophorese
(5 ng)



eGene (Kapillarelektrophorese)
(0.5 ng)

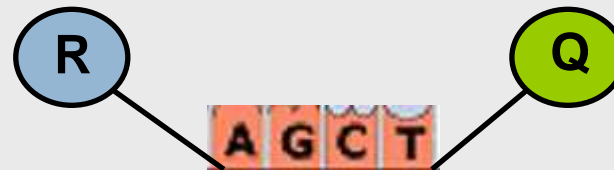
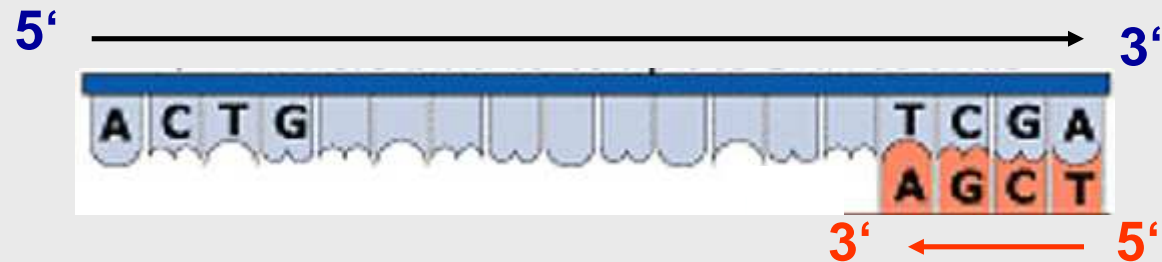


BioAnalyzer
(1 ng)

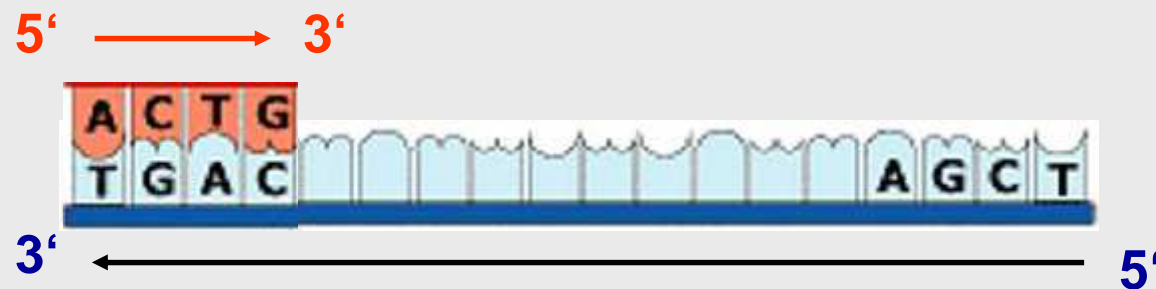
Real-time PCR

Die **Real-Time-quantitative-PCR** ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

Prinzip der Real-time PCR



TaqMan Sonde



TaqMan Sonde

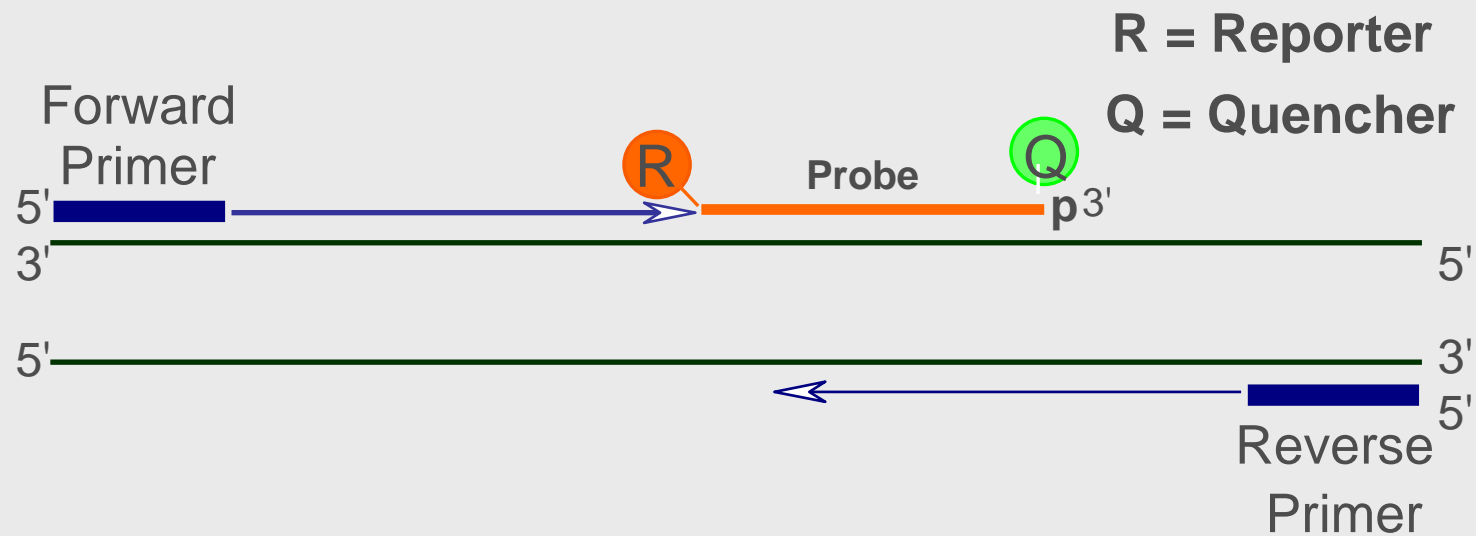


R = Reporter

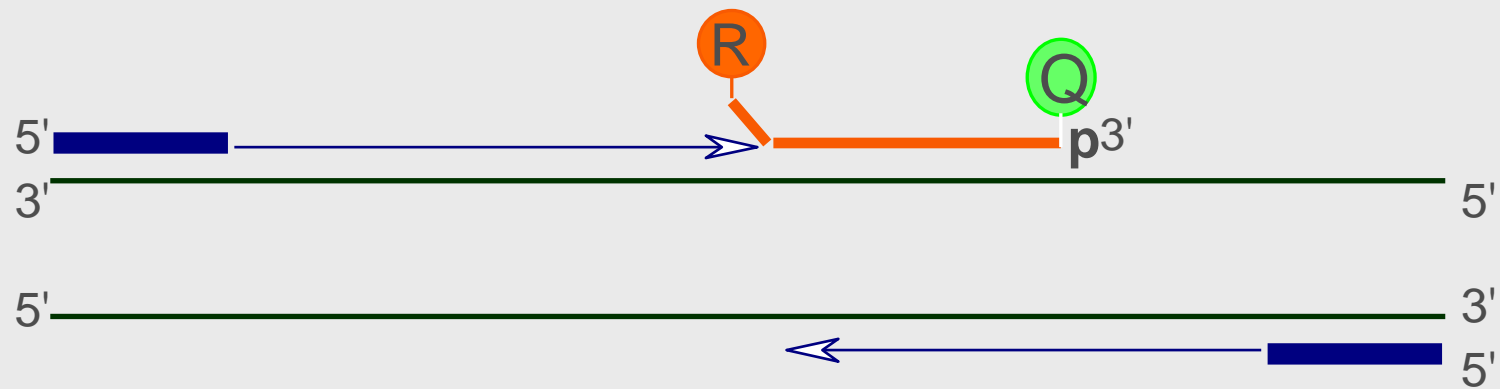
Q = Quencher

Wegen der räumlichen Nähe zum Quencher wird die Fluoreszenz unterdrückt (gequencht).

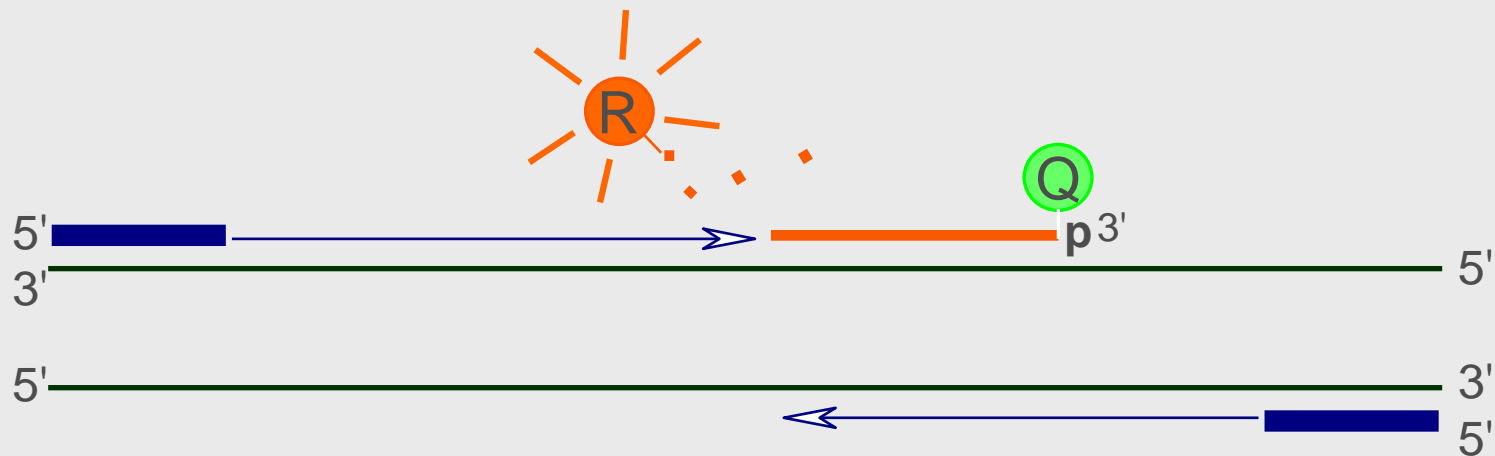
Polymerisation



Strang-Entfernung

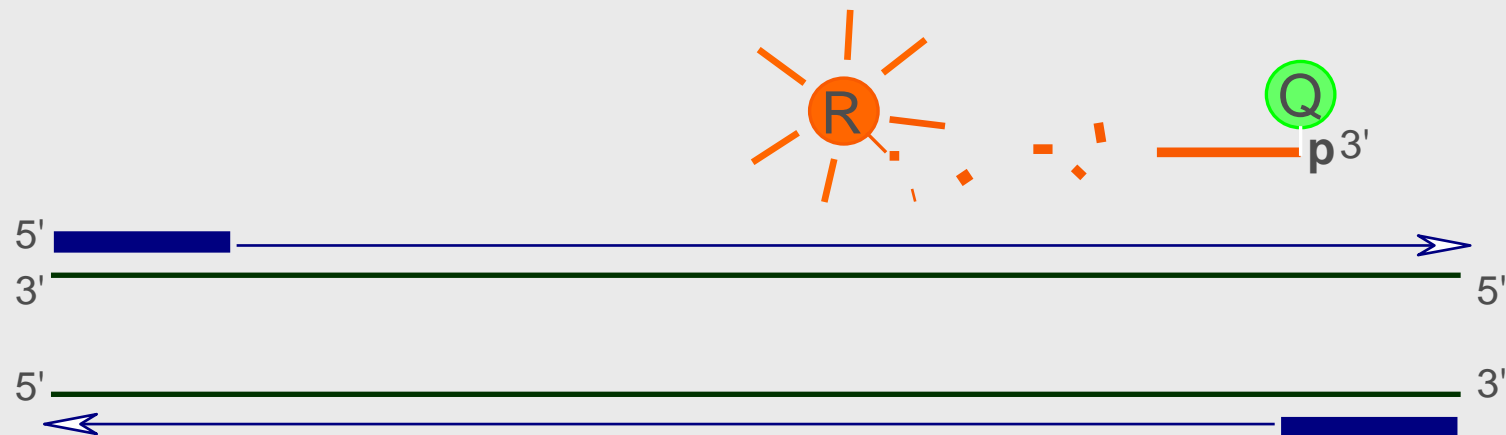


Schneiden der Sonde



5' zu 3' Exonuklease-Aktivität

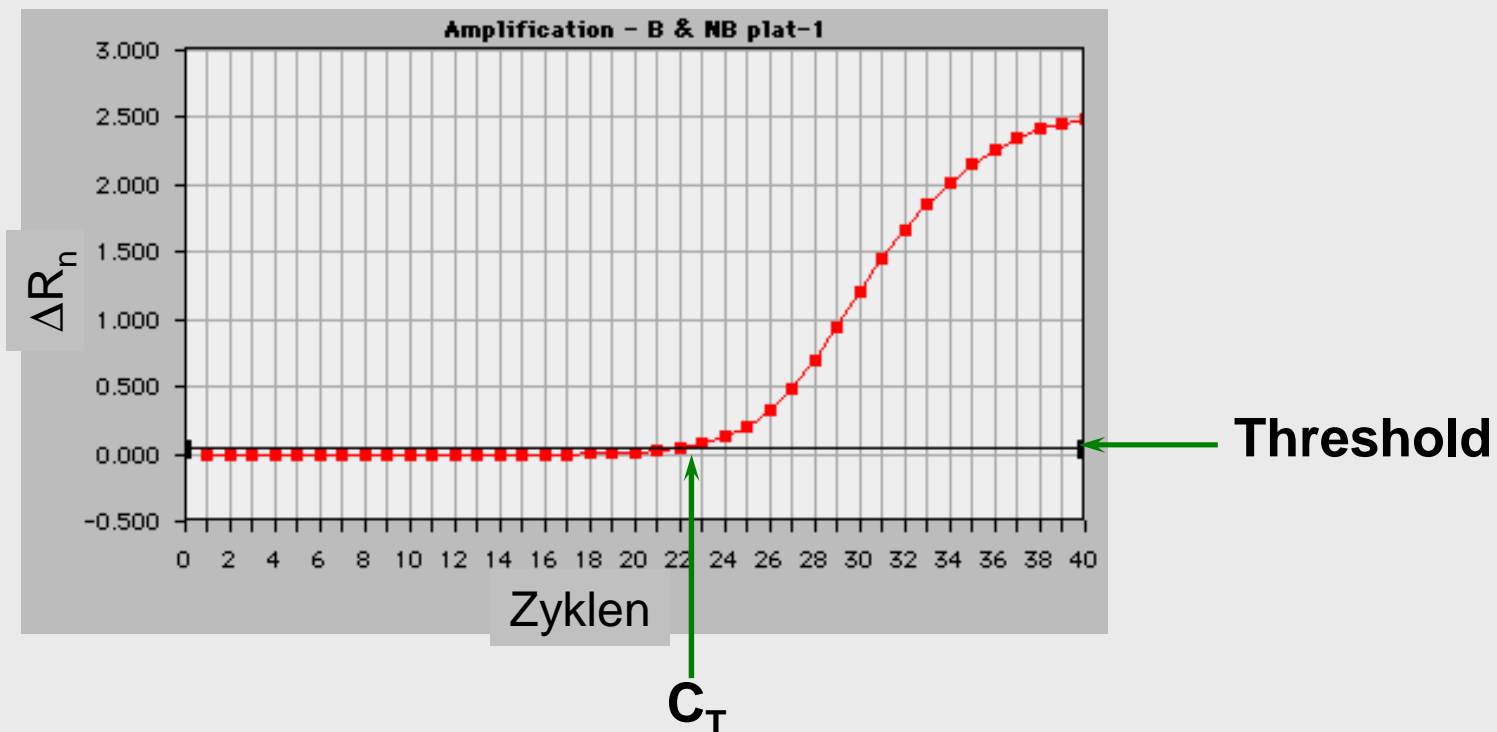
Polymerisation beendet



Wegen der nicht mehr vorhandenen räumlichen Nähe zum Quencher fluoresziert das Reportermolekül.

Amplifikationsplot

1. Normalisierung (z.B. von FAM gegen ROX bei ABI)
2. ΔR_n gegen die Anzahl Zyklen aufgetragen

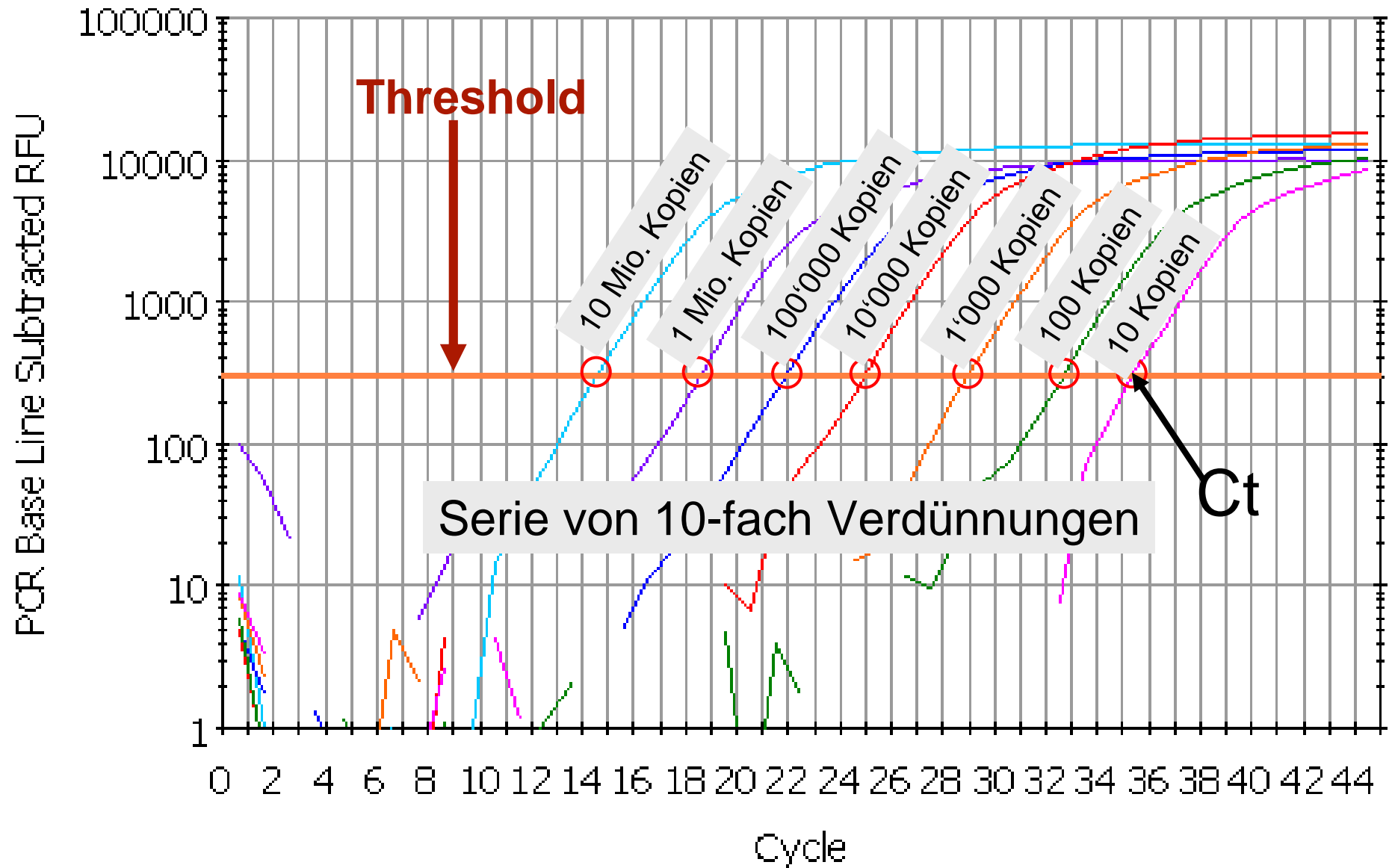


Quantifizierung mittels real-time PCR

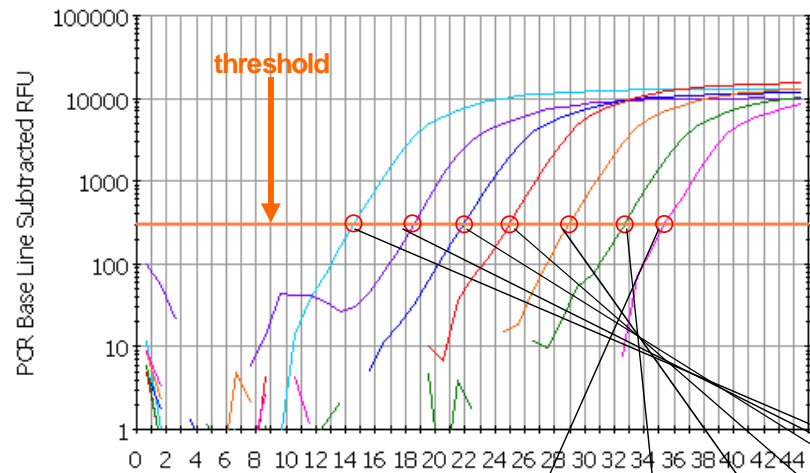


1. Absolute Quantifizierung mit Kalibrationsgerade
2. Relative Quantifizierung

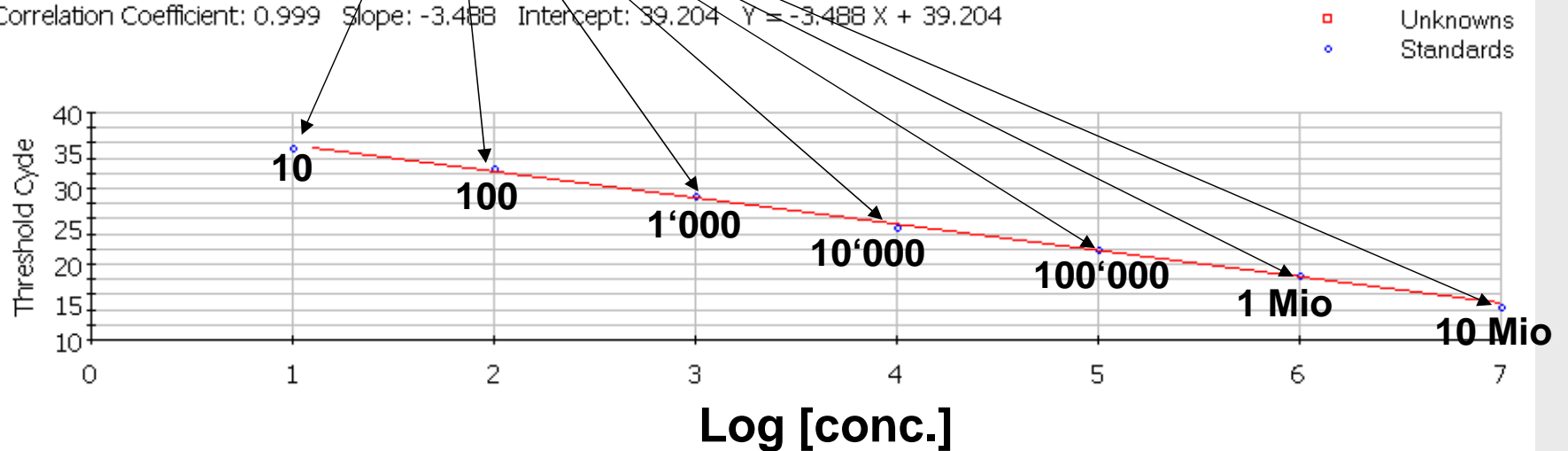
Erstellen einer Standardkurve



Erstellen einer Kalibrationskurve



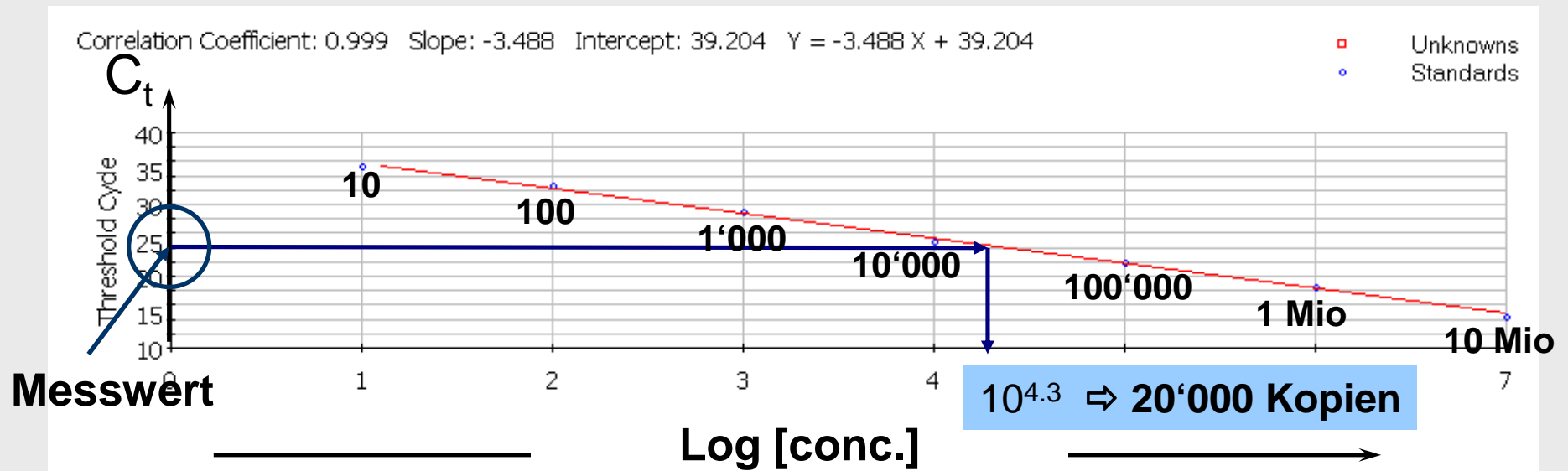
Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$



PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd

Berechnung eines Messwertes

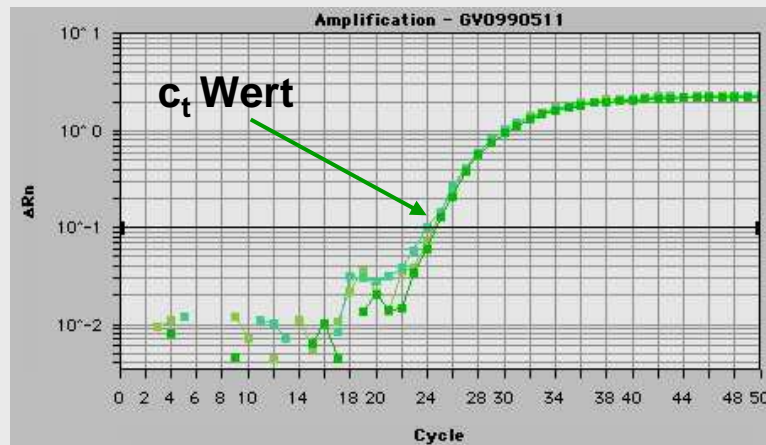
Einsetzen des Ct-Wertes der Proben in die Standardkurve und Ablesen der logarithmisierten Anfangskonzentration



Relative Quantifizierung

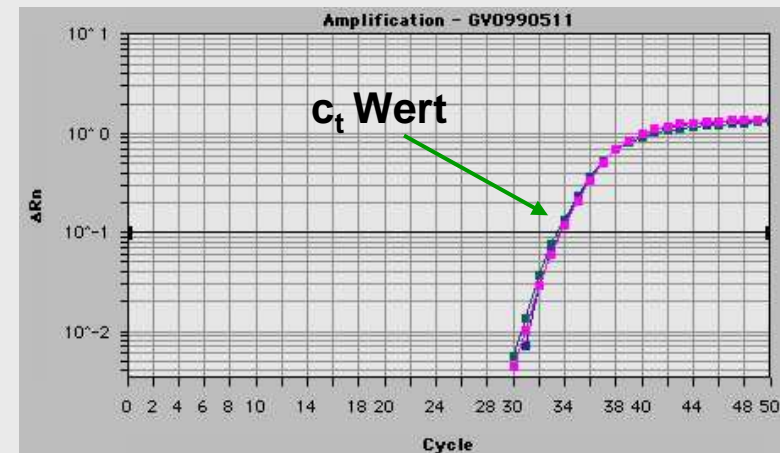
1. Messungen eines Standards (z.B. 1% GVO):

Lectin (Soja-Gen)



c_t (Lectin): 24.31

P-35S (GVO-Marker)



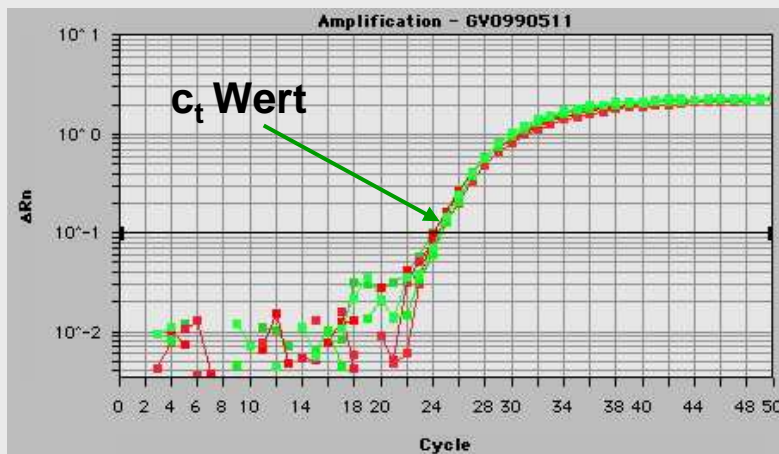
c_t (35S): 33.47

GVO = gentechnisch veränderte Organismen

Relative Quantifizierung

2. Messungen einer Probe:

Lectin (Soja-Gen)

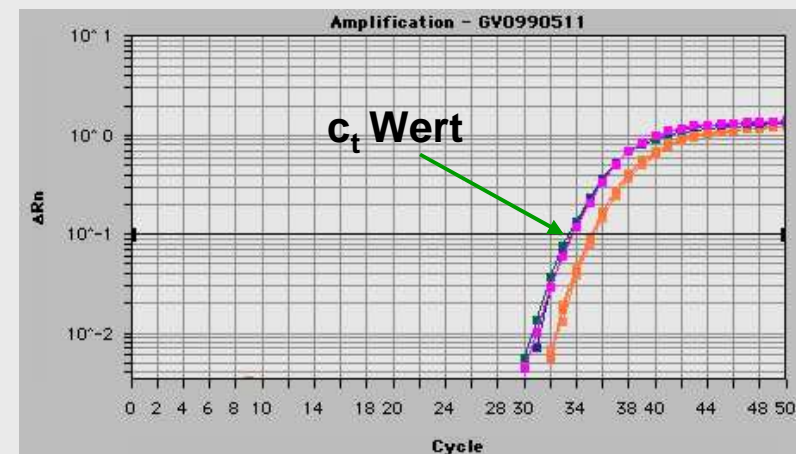


c_t (Lectin): 24.45

Δc_t (Lectin): 0.14 (24.45-24.31)

Etwa gleicher Sojagehalt

P-35S (GVO-Marker)



c_t (35S): 32.02

Δc_t (35S): -1.45 (33.47-32.02)

Mehr GVO als im Standard

Relative Quantifizierung

3. Berechnung des Gehaltes ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode):

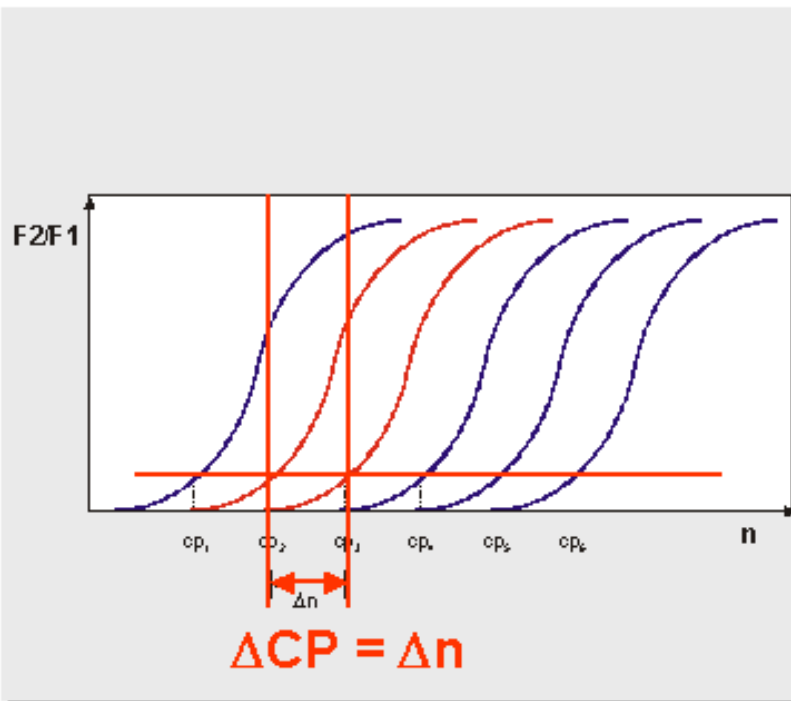
Bezeichnung	Ct lectin	35S	Mittelw ert	Mittelw ert	delta	delta	delta	GVO-Gehalt [in %]
			Ct (lectin)	Ct (35S)	Ct (lectin)	Ct (35S)	delta ct	
1% Fluka Referenzmaterial	24.31	33.47	24.31	33.47	0.00	0.00	0.00	1.0
	24.31	33.47						
Messprobe	24.45	32.02	24.45	32.02	0.14	-1.45	-1.59	3.0
	24.45	32.02						

$$\text{Messwert} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Berechnung der PCR-Effizienz

Calculation of real-time PCR efficiency

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \Rightarrow E = 10^{-1/-3.337} \Rightarrow E = 10^{0.299} \Rightarrow E = 1.99$$



$$N_2 = N_{0,2} \times E^{n_2} \quad N_3 = N_{0,3} \times E^{n_3}$$

For $N_2 = N_3$:

$$N_{0,2} / N_{0,3} = E^{(n_3 - n_2)} = E^{\Delta n}$$

For $N_{0,2} = 10 \times N_{0,3}$ (10-fold dilutions):

$$\Delta n = 1 / \log E \quad E = 10^{-1/\text{slope}}$$

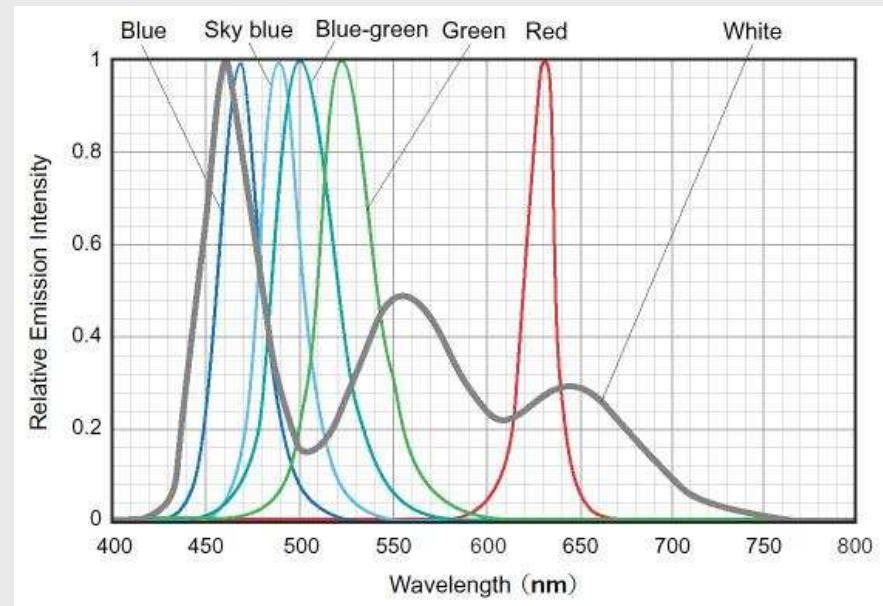
e.g.	$E = 2.0$	$\Delta n = 3.32$
	$E = 1.9$	$\Delta n = 3.58$
	$E = 1.8$	$\Delta n = 3.91$

Roche Diagnostics, LC rel. Quantification software, March 2001

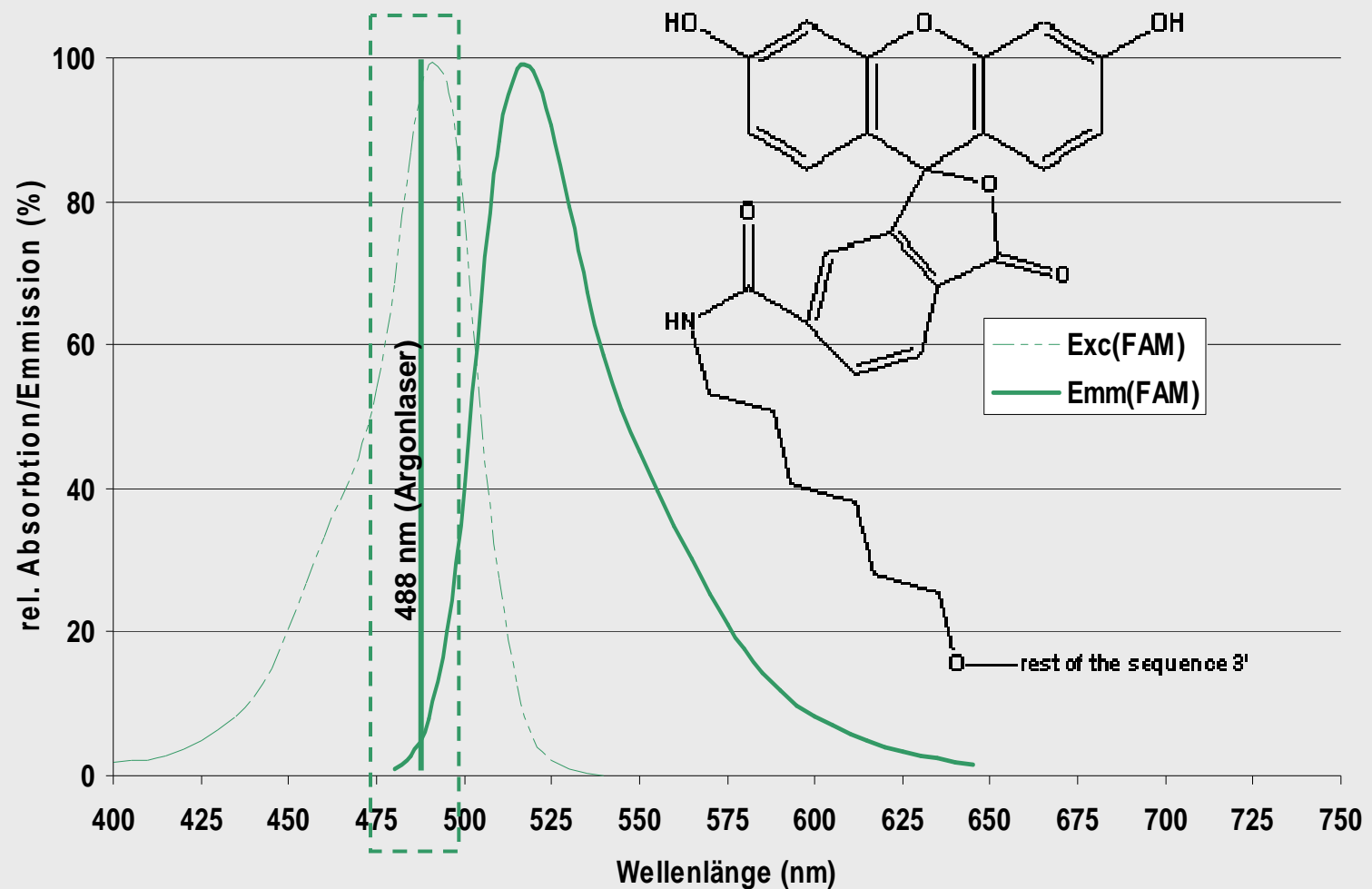
Rasmussen, R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds. Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg; page 21-34

Physikalische Messprinzipien der real-time PCR

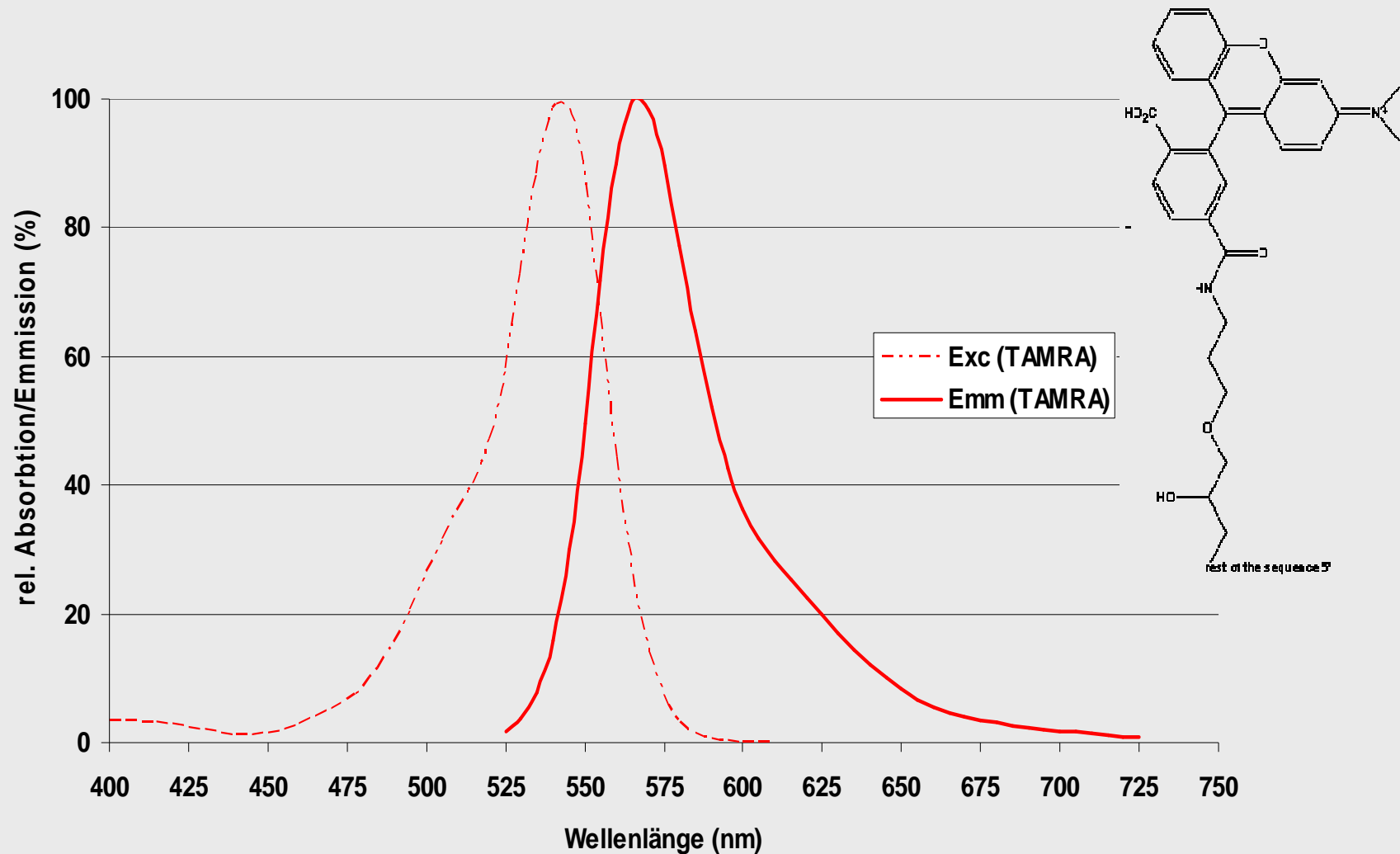
- Fluoreszenzfarbstoffe
- Optische Filter
- Lichtquellen
- PMT und CCD



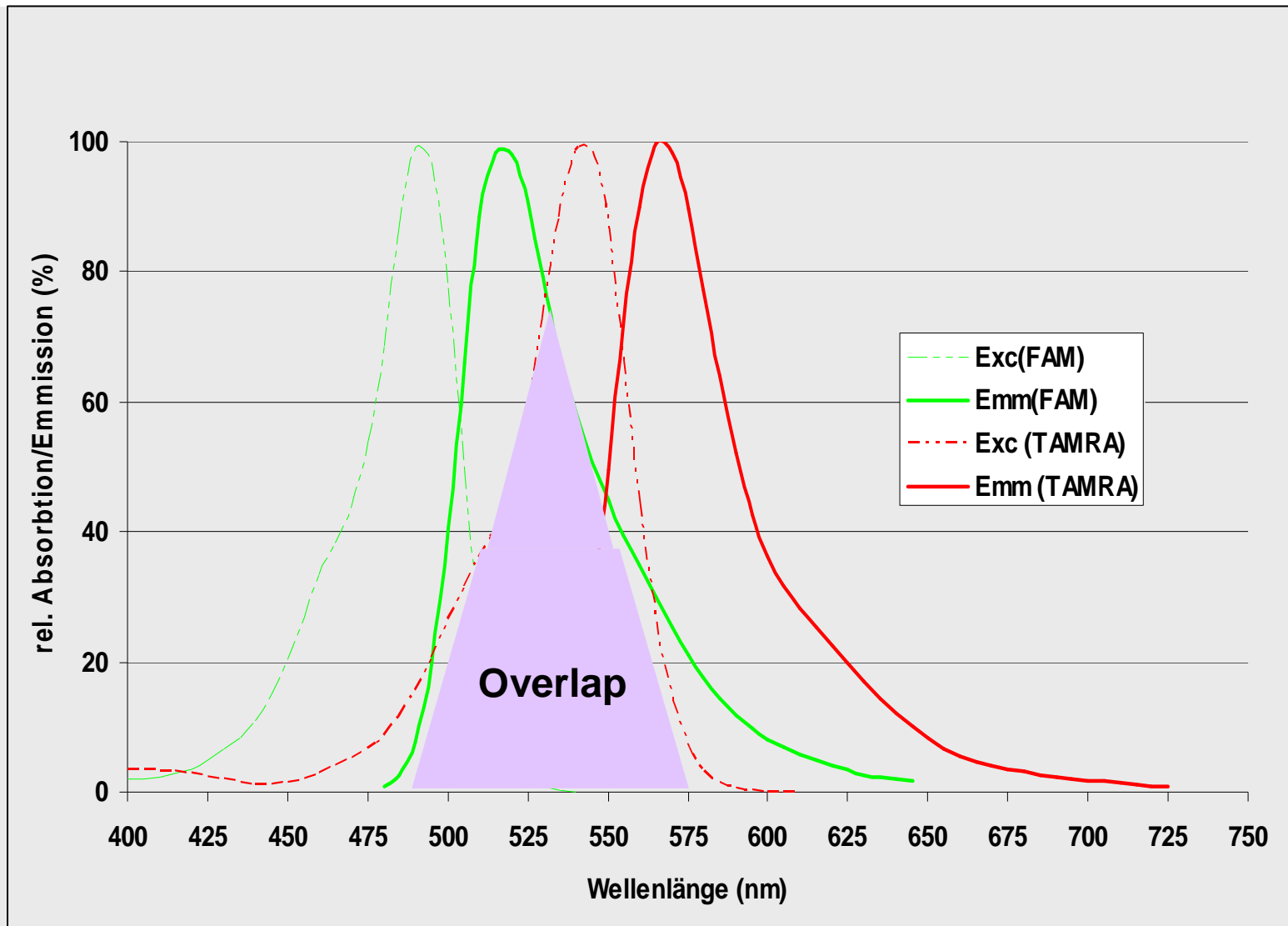
Fluoreszenzfarbstoffe: FAM



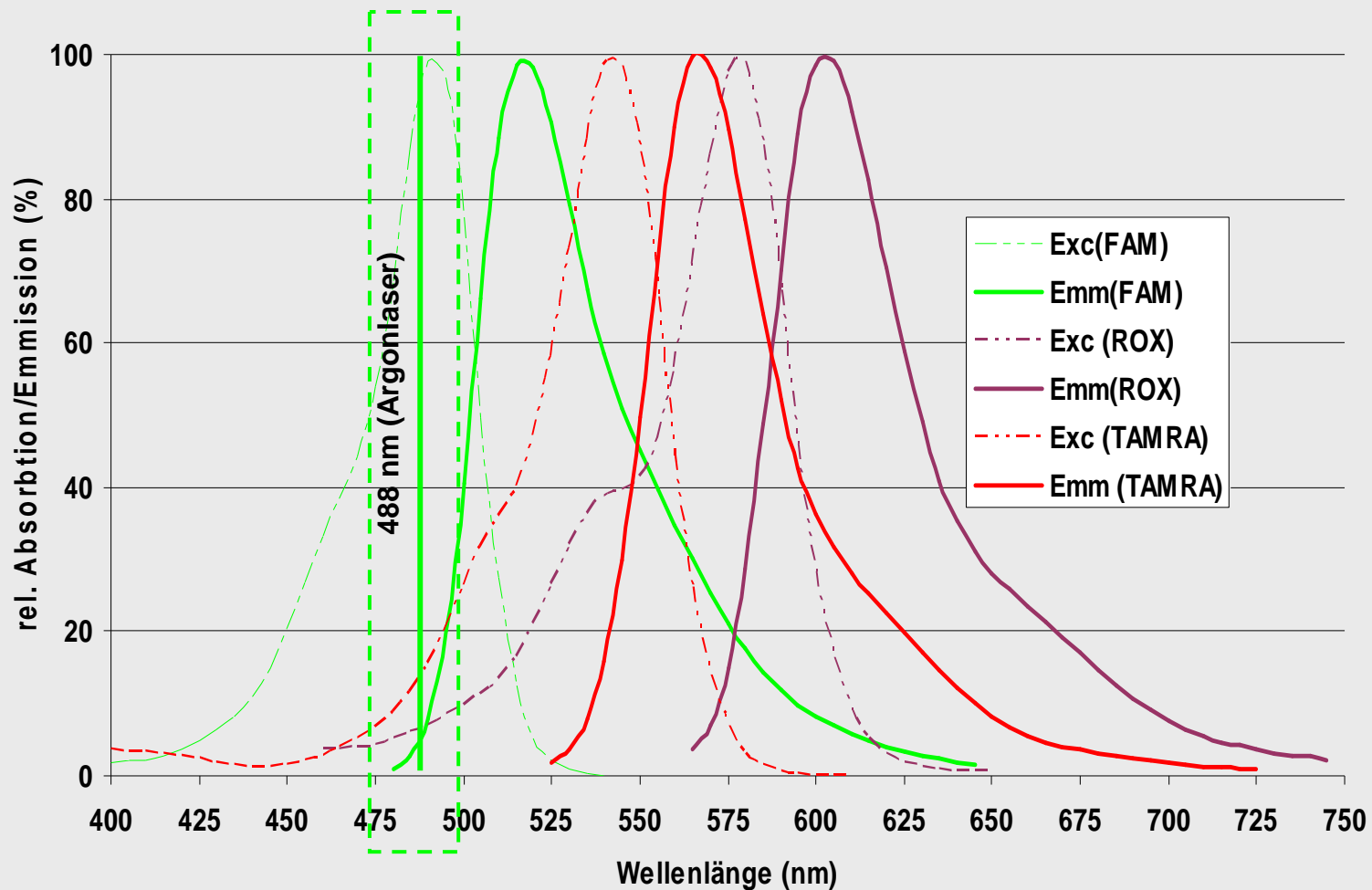
Fluoreszenzfarbstoffe: TAMRA



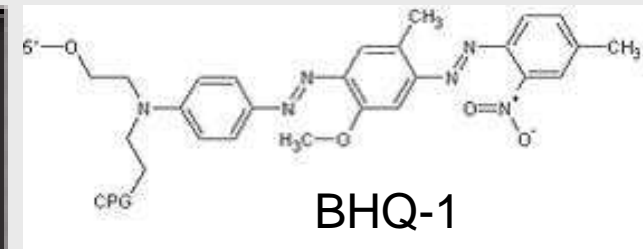
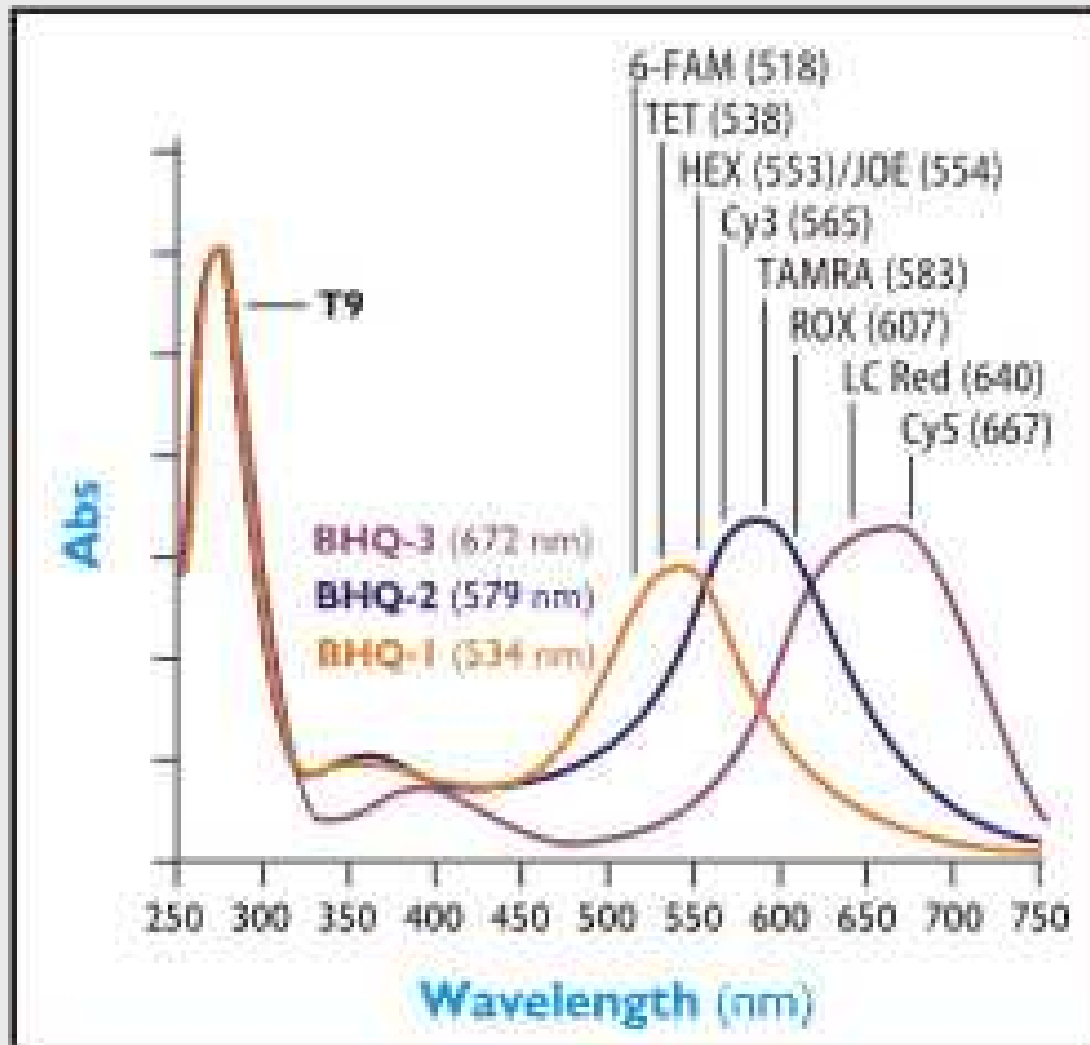
Fluoreszenzfarbstoffe: spektraler Overlap



Fluoreszenzfarbstoffe bei TaqMan-Methode

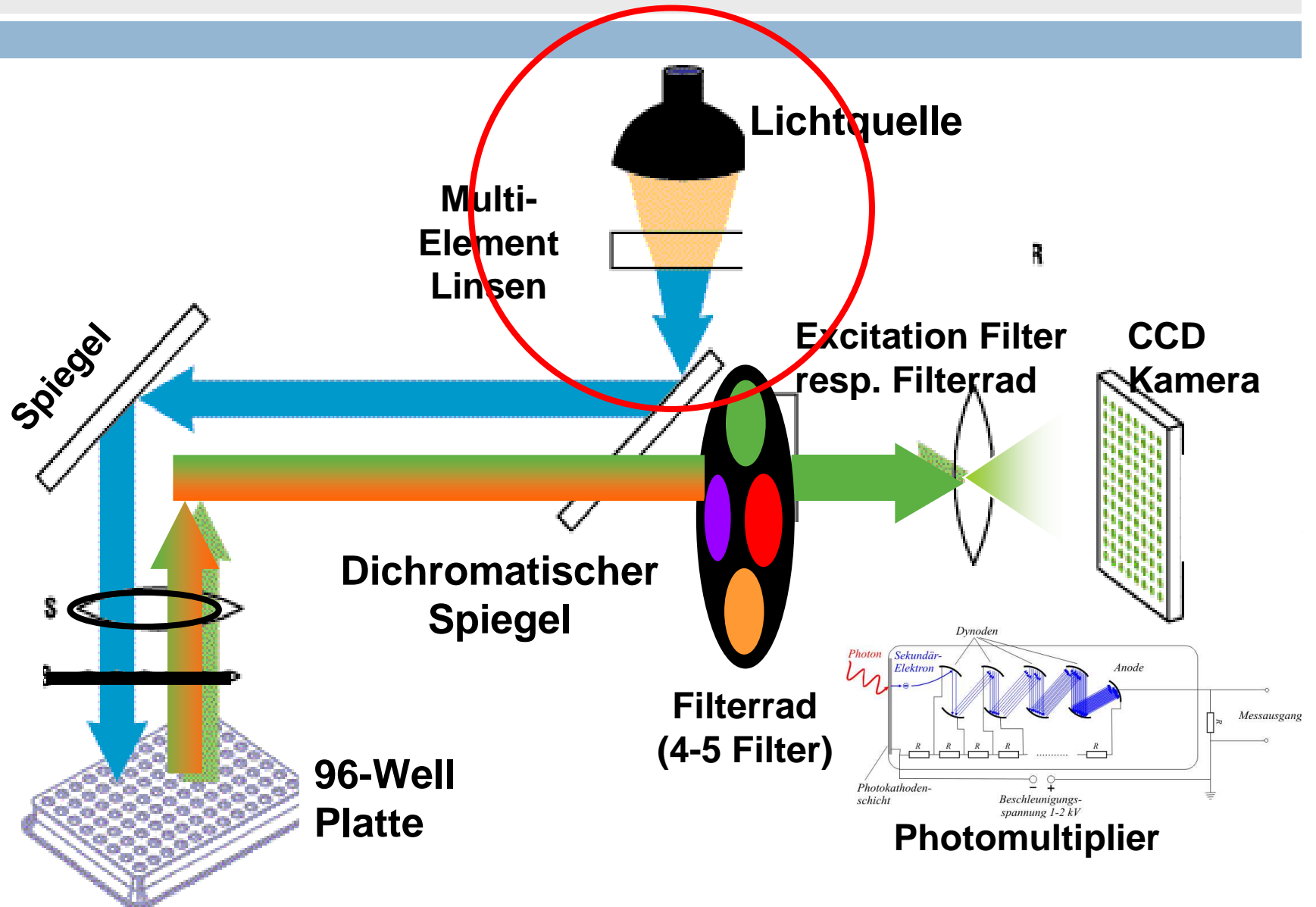


Fluoreszenzfarbstoffe mit Black hole Quencher

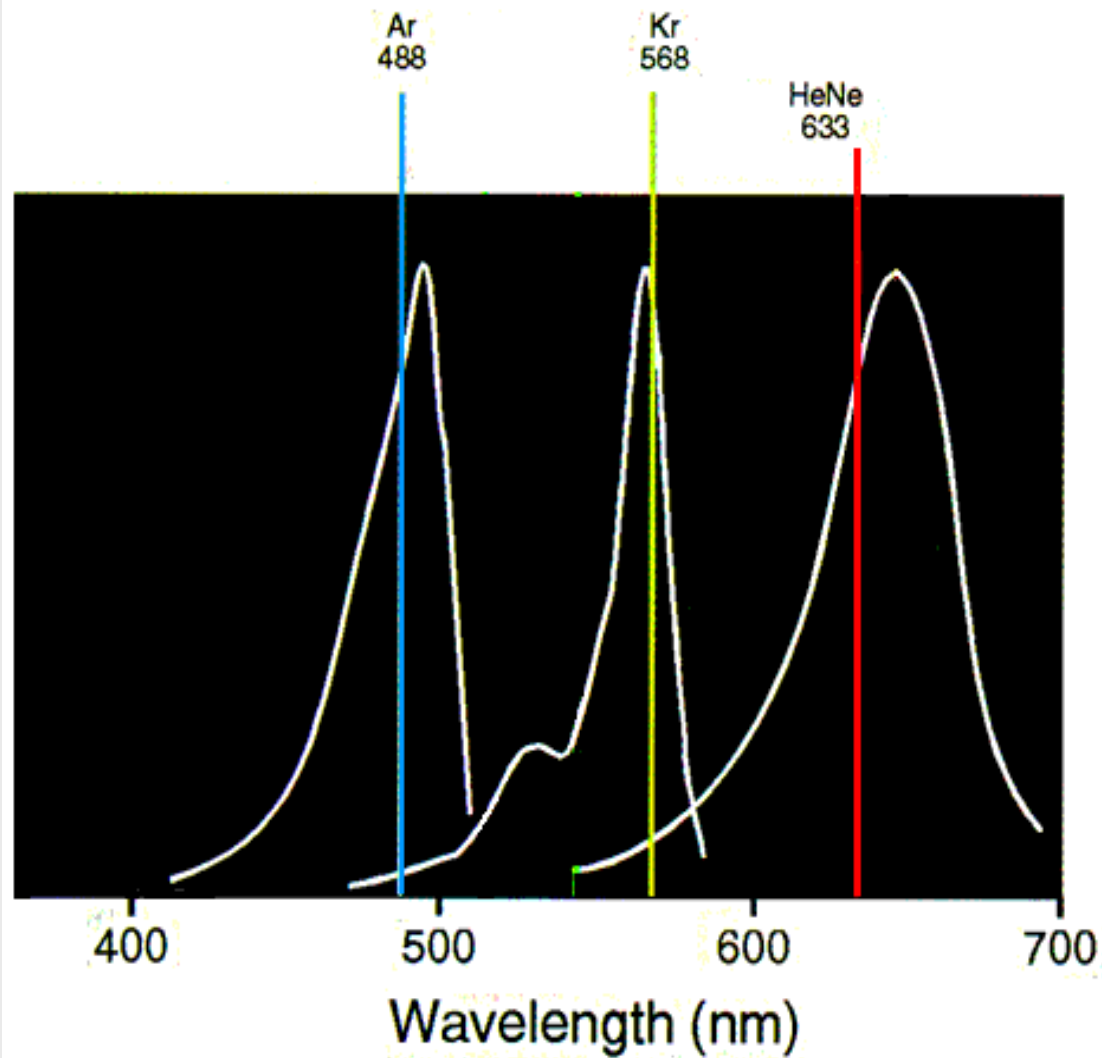


Absorptions-Spektren von
Black hole Quencher
Molekülen

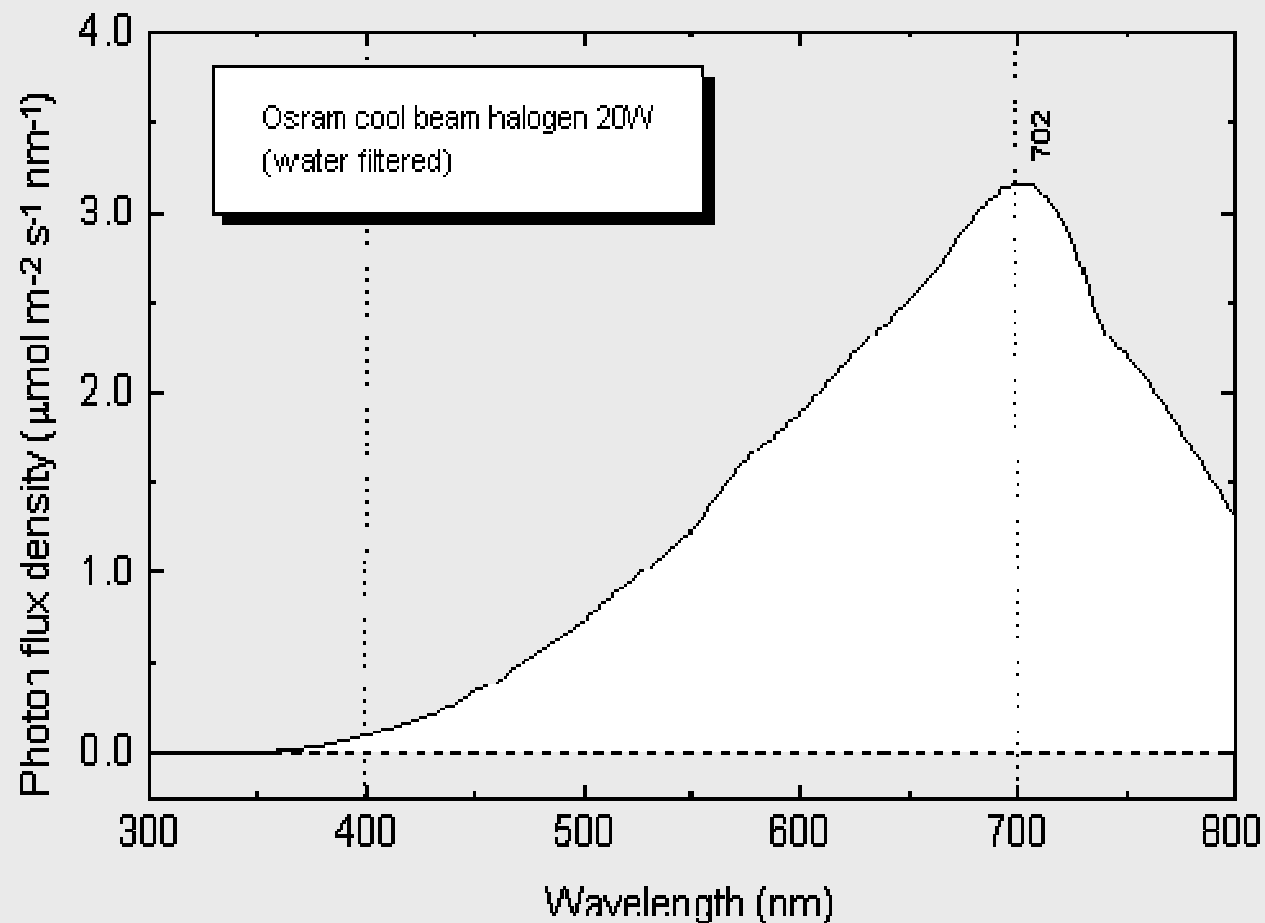
Technisches Prinzip / Lichtquelle



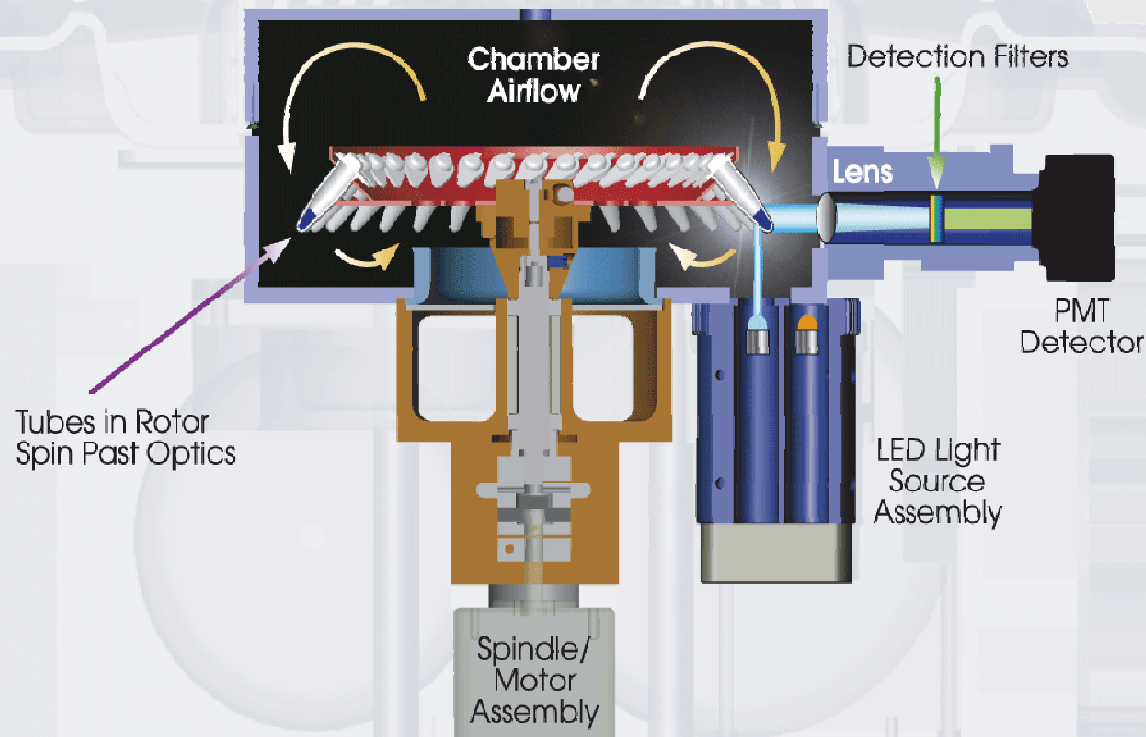
Emissionsspektren von LASER



Emissionsspektrum von Halogen (Wolfram)

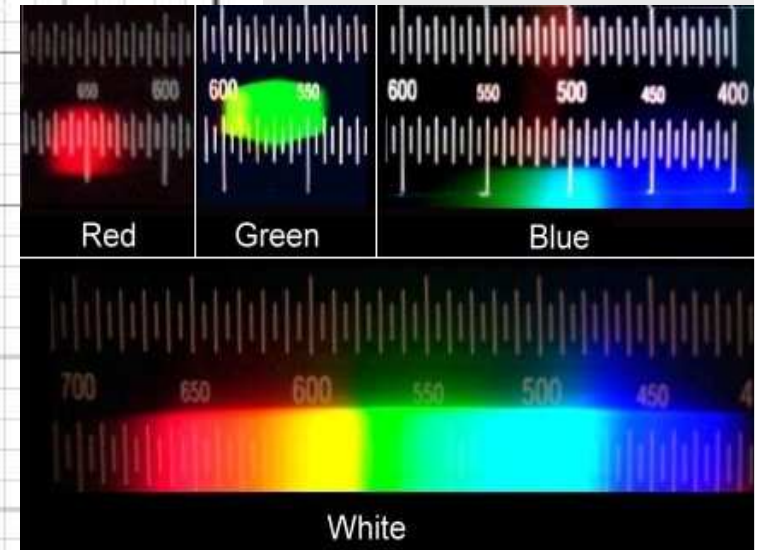
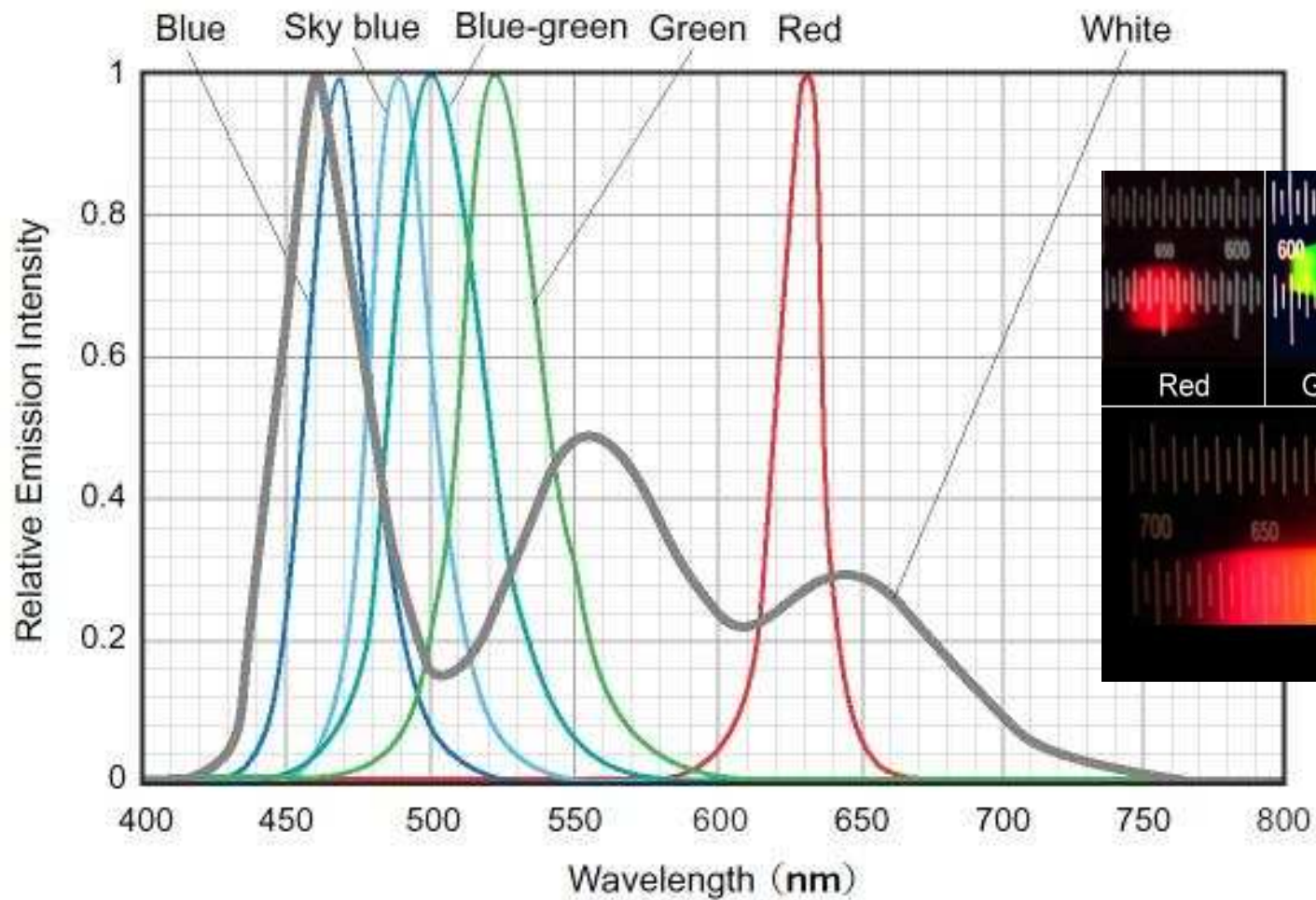


Funktionsweise Rotorgene Q

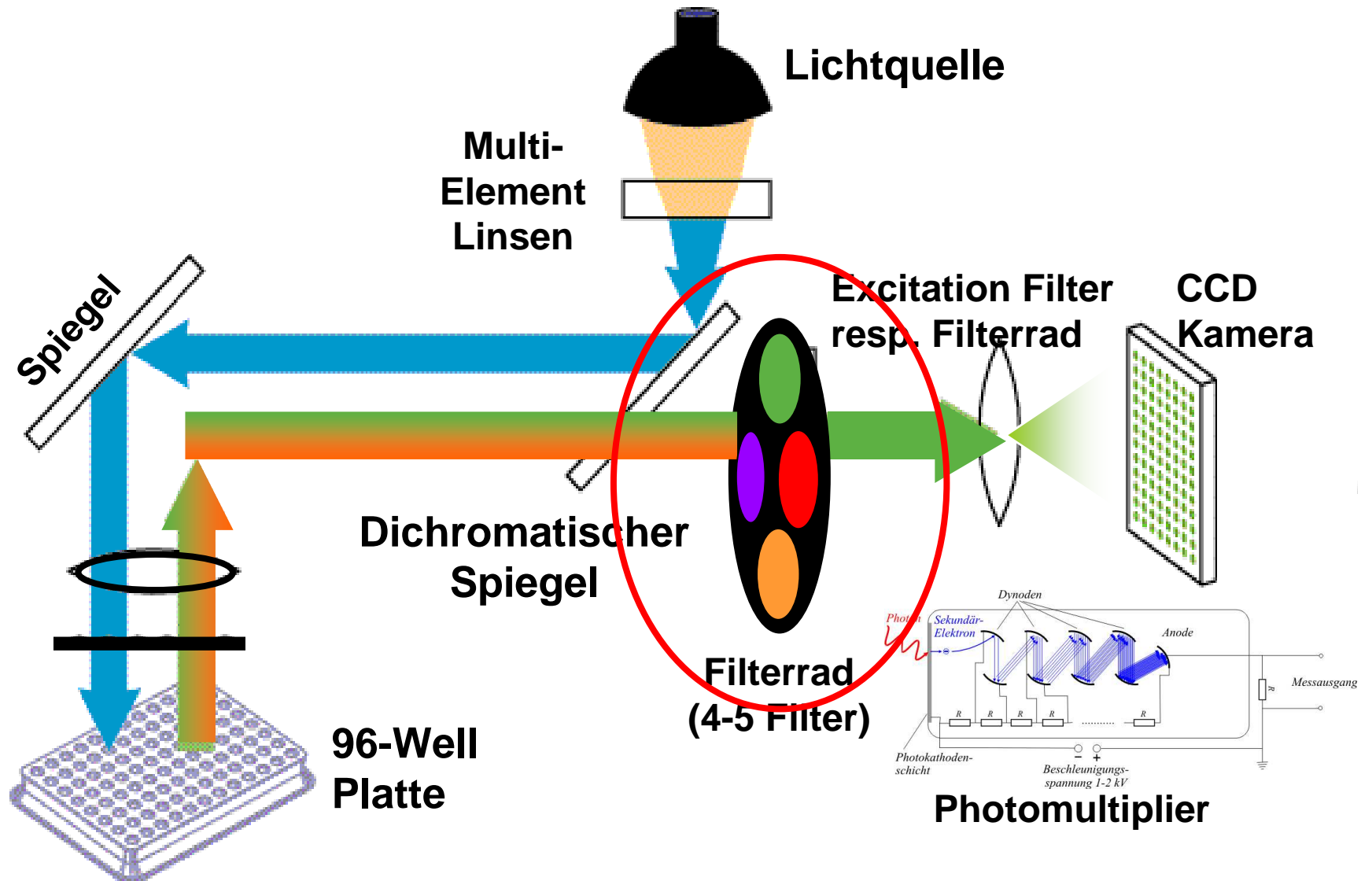


Leuchtdioden emittieren Licht in einem begrenzten Spektralbereich, das Licht ist nahezu monochrom. Deshalb sind sie beim Einsatz als Signallicht besonders effizient im Vergleich zu anderen Lichtquellen, bei denen Farbfilter den größten Teil des Spektrums herausfiltern.

Emissionsspektren von LED



Technisches Prinzip / Emissionsfilter



Multicolor Detection

Dyes:	SYBR[®] Green 1 Dye	528 nm
	FAM[™]	530 nm
	TET[™]	540 nm
	VIC[®]	554 nm
	JOE[™]	554 nm
	NED[™]	576 nm
	TAMRA[™]	582 nm
	ROX[™]	610 nm

Multicolor Detection



Filters	7500 Real-Time PCR System
	Dyes
A	SYBR [®] Green I, FAM [™]
B	VIC [®] , JOE [™]
C	NED [™] , TAMRA [™] , CY3 [™]
D	ROX [™] , Texas Red [®]
E	CY5 [™]

Detektion von verschiedenen Fluorophoren

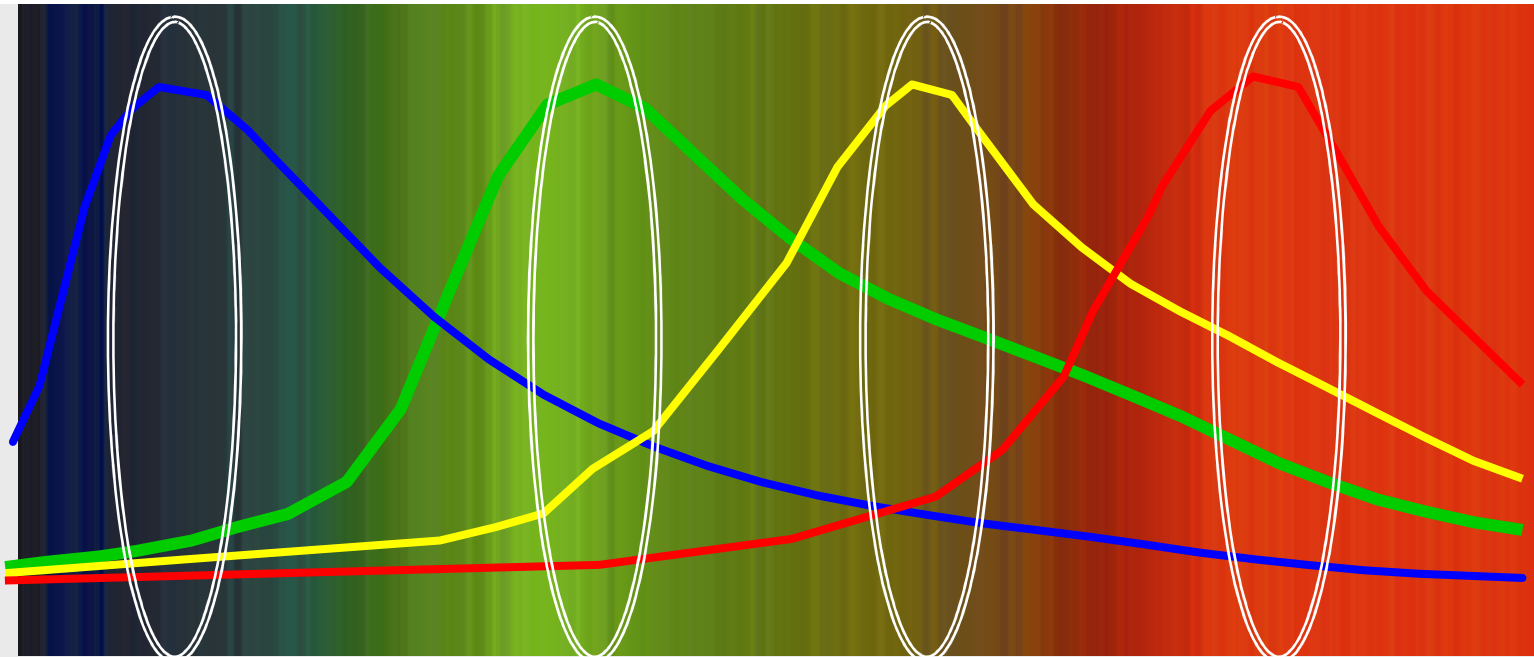
Colors	Excite/Detect [nm]	Some Example Fluorophores Detected
Blue	365/470	BiosearchBlue™, Marina Blue®, Bothell Blue®, Alexa Fluor® 350...
Green	470/510	FAM™, SYBR® Green 1, Fluorescein, EvaGreen™, Alexa Fluor® 488...
Yellow	530/555	JOE™, VIC™, HEX™, TET™, Yakima Yellow®, CAL Fluor® Gold 540...
Orange	585/610	ROX™, Cy®3.5, Redmond Red®, Alexa Fluor®568, CAL Fluor®Red 610...
Red	625/660	Cy®5, Quasar®670, LCRed650®, Texas Red®, CAL Fluor® Red 635...
Crimson	670/710	Quasar705™, LCRed705®, Alexa Fluor® 680
HRM	460/510 LP	SYTO®9, LC Green®, LC Green® Plus+, EvaGreen™...

Trennung von Fluoreszenz-Signalen

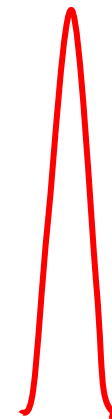
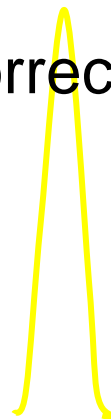
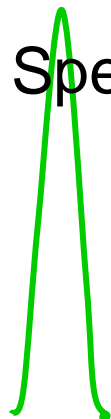
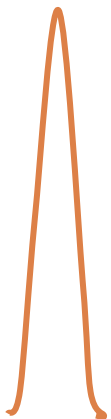
Die Trennung der Fluoreszenz-Signale erfolgt nicht nur über Filter, sondern auch via Algorithmen/Spektralkalibration

Black Box

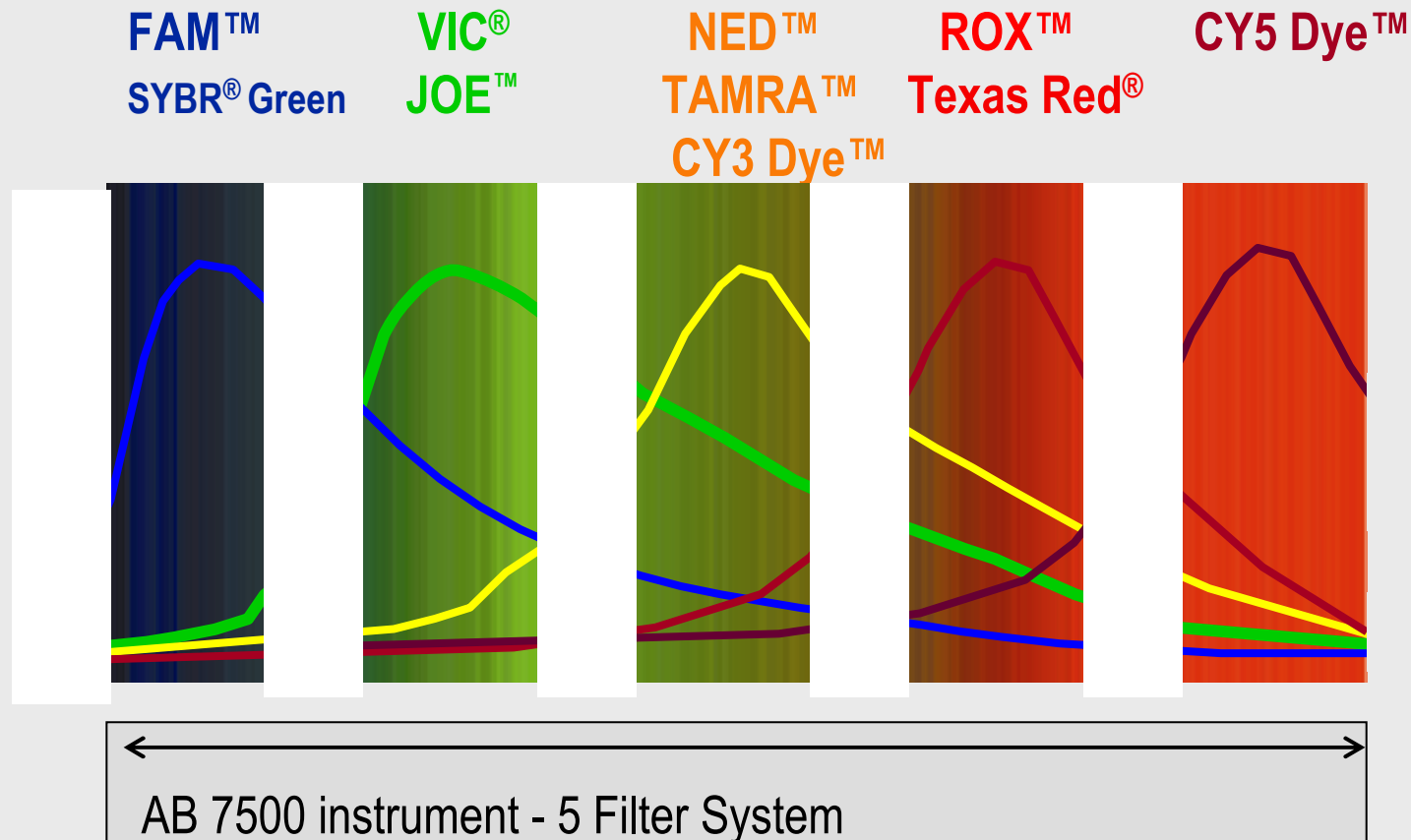
Spectral Overlap



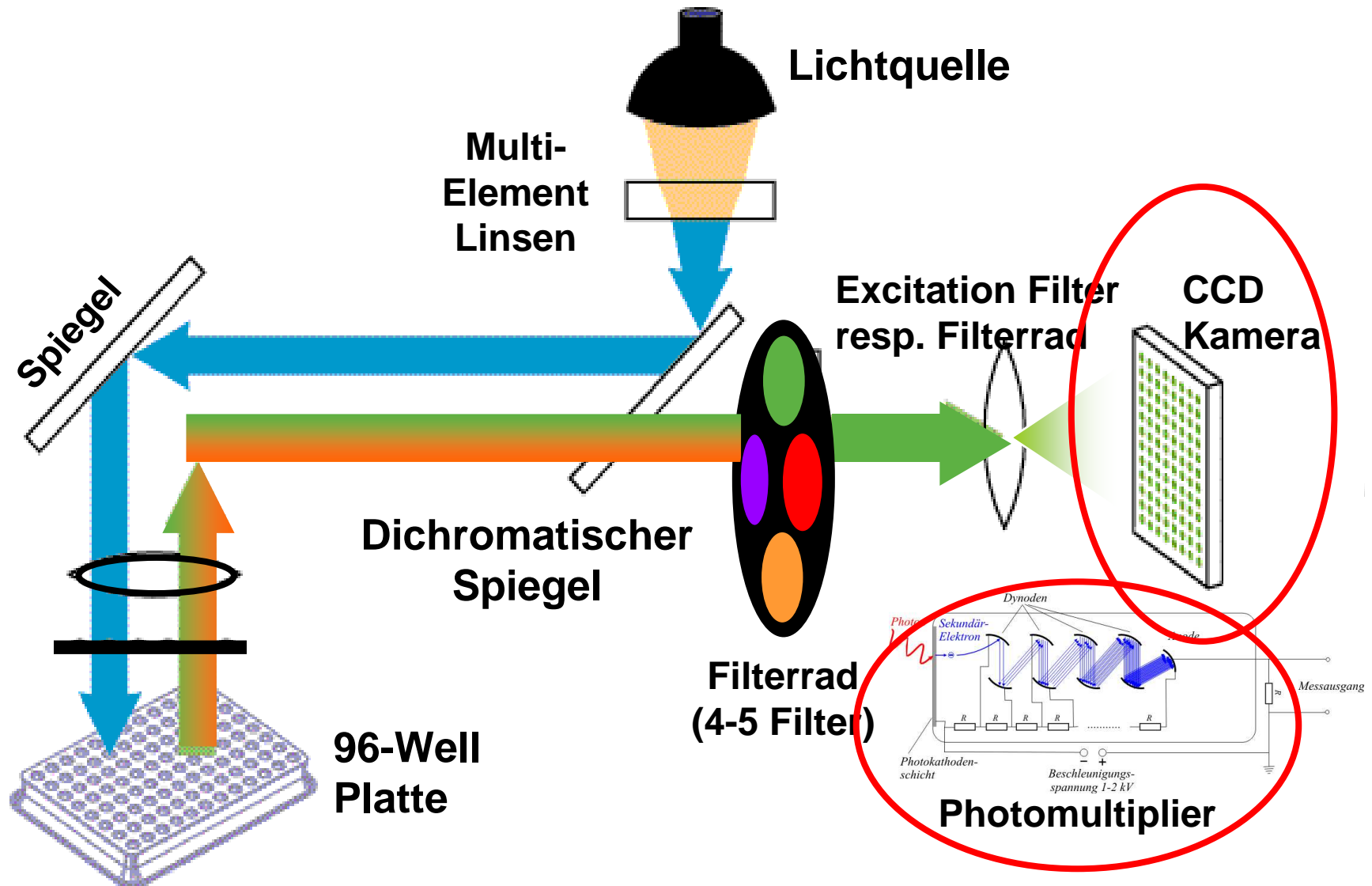
After Spectral correction



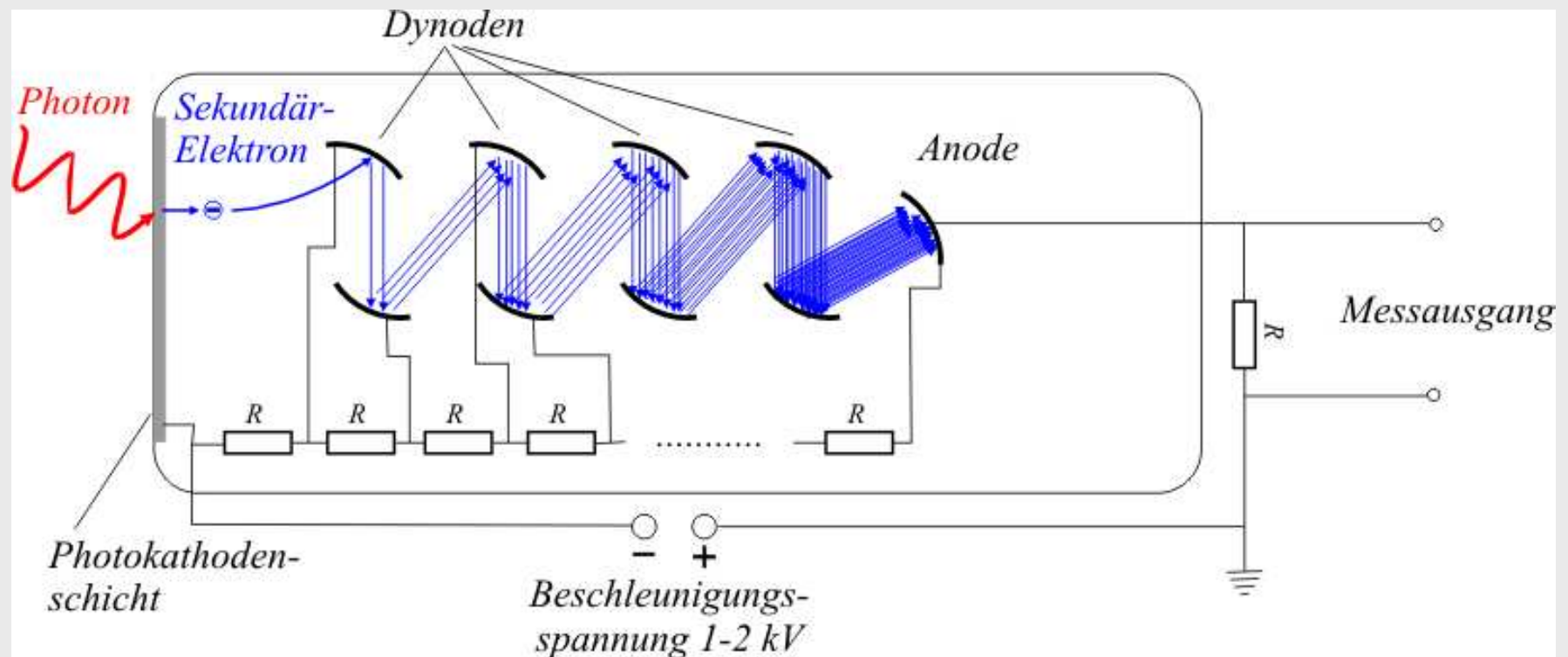
Fluoreszenzfarbstoffe und Filters



Technisches Prinzip / Detektion



Photomultiplier (aus Wikipedia)



Schematische Skizze eines Photomultipliers:

Photomultiplier sind spezielle Elektronenröhren um schwache Lichtsignale (bis hin zu einzelnen Photonen zu verstärken und in ein elektrisches Signal umzuwandeln. Ein Photomultiplier besteht aus einer Photokathode und einem nachgeschalteten **Sekundärelektronenvervielfacher**.

Funktionsweise eines Photomultiplier

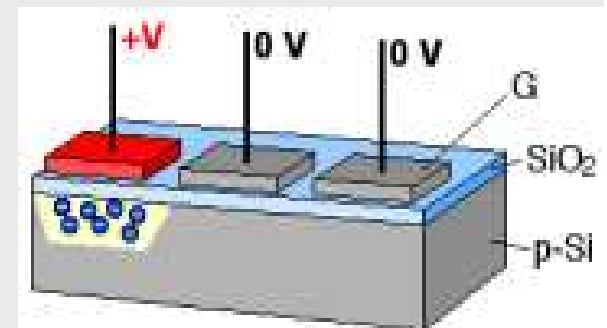
Die Photonen treffen auf die Photokathode und schießen so Elektronen aus deren Oberfläche (Photoemission bzw. Photoeffekt). Die freigesetzten Photoelektronen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und treffen auf weitere Elektroden (sog. Dynoden), aus deren Oberfläche jedes auftreffende Elektron mehrere Sekundärelektronen herausschlägt ($n = 3..10$). Somit nimmt die Anzahl der Elektronen von Dynode zu Dynode kaskadenartig zu. Damit das funktioniert, müssen die Dynoden auf zunehmend (im Schema von links nach rechts) positivem Potential liegen. Meist wird das realisiert, indem die ursprüngliche Hochspannung über eine Spannungs-kette heruntergeteilt wird. Zum Schluss treffen die Elektronen auf eine Anode und fließen zur Masse ab. Dabei erzeugen sie einen Spannungsabfall über dem eingezeichneten Widerstand. Dieses Signal wird ausgekoppelt.

Der Verstärkungsfaktor wächst exponentiell mit der Anzahl der Dynoden. Typische Multiplier haben ca. 10 Dynoden. Werden an jeder Dynode 5 Elektronen pro auftreffendem Elektron ausgeschlagen, so erhält man eine Verstärkung der Elektronenzahl (also des Stromes) um einen Faktor 5^{10} , was etwa 10 Mio entspricht. Die Anzahl der erzeugten Sekundärelektronen ist proportional zur Anzahl der eingestrahnten Photonen, solange eine Sättigungsschwelle nicht überschritten wird. Die Höhe der gemessenen Impulse ist keineswegs wellenlängen-unabhängig, da die Wahrscheinlichkeit, ein Elektron aus der Photokathode zu schlagen, sowie die Energie, welche ein solches Elektron hat, eine solche Abhängigkeit von der Wellenlänge aufweist. Will man also ein elektromagnetisches Spektrum bestimmen, so ist eine Kalibrierung nötig, aus der sich diese Abhängigkeit bestimmen lässt.

Charge-coupled device (CCD) / Funktionsweise

Das Bauteil besteht aus einer Matrix mit lichtempfindlichen Zellen, die **Pixel** genannt werden (vom Englischen "picture elements"). Das einfallende Licht überträgt seine Energie auf die Elektronen des Halbleiters. Durch den inneren photoelektrischen Effekt entstehen dabei gleichzeitig freie Elektronen (negativ) und positiv geladene „Löcher“, die räumlich von den Elektronen getrennt werden müssen.

Nach der Belichtung werden die Ladungen (engl. "charge") ähnlich einer Eimerkette schrittweise verschoben (daher der Wortbestandteil "coupled"). Damit wandern die Ladungsträger von einer Elektrode zur nächsten Elektrode, bis sie schließlich als Ladungspakete, eines nach dem anderen, den Ausleseverstärker erreichen. Es wird eine von der Ladung und somit der Lichtmenge abhängige elektrische Spannung ausgegeben.



CCD-Chip Charge-coupled device

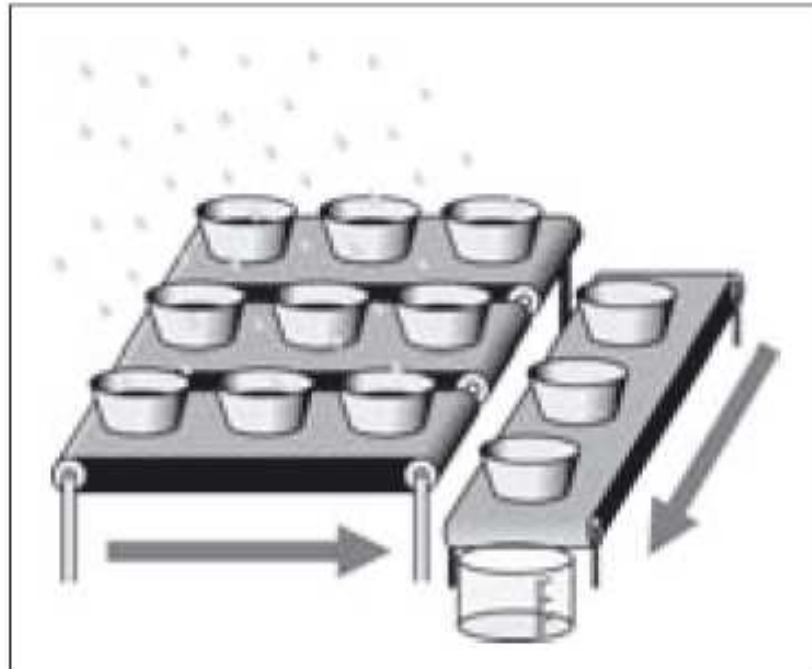
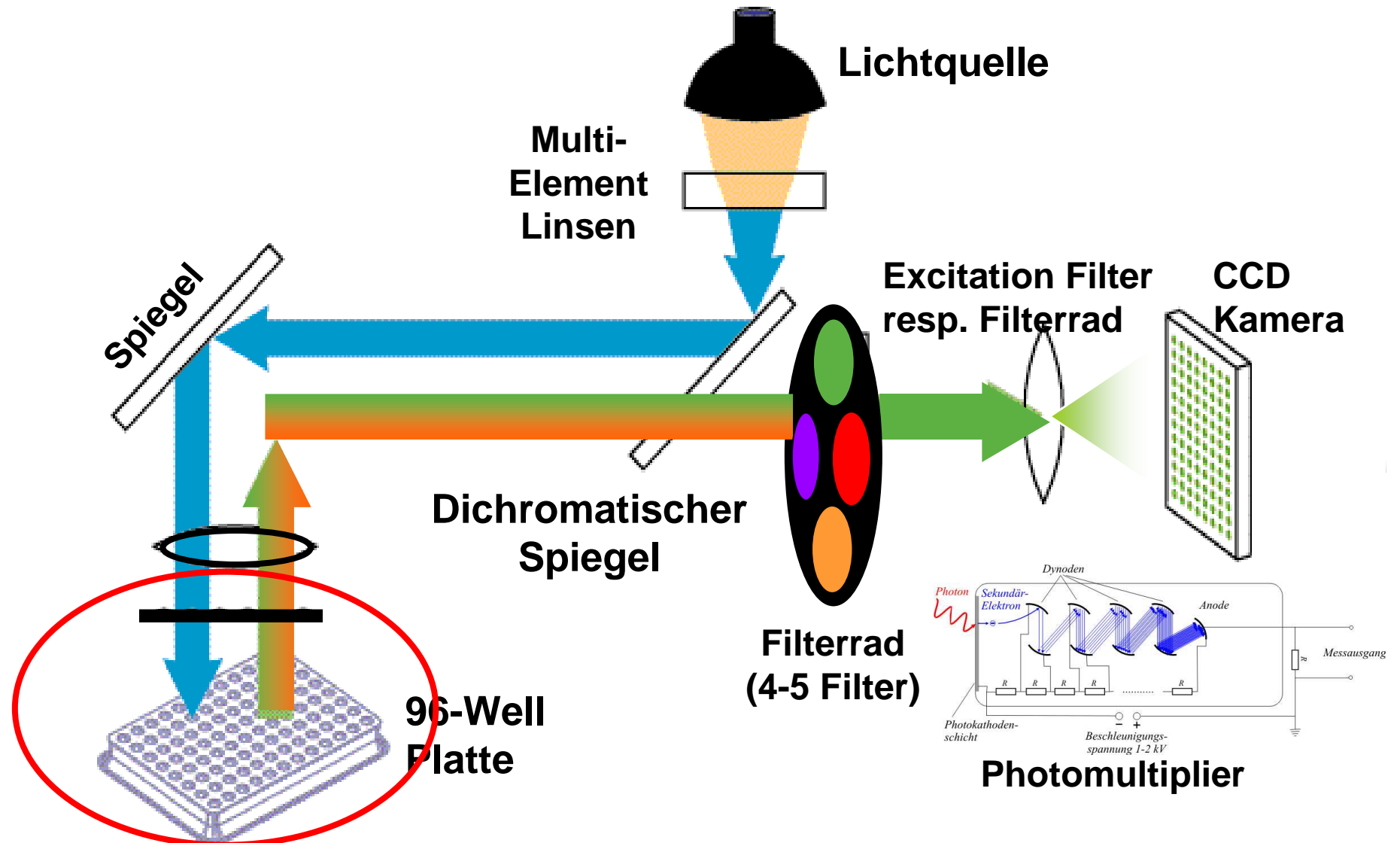
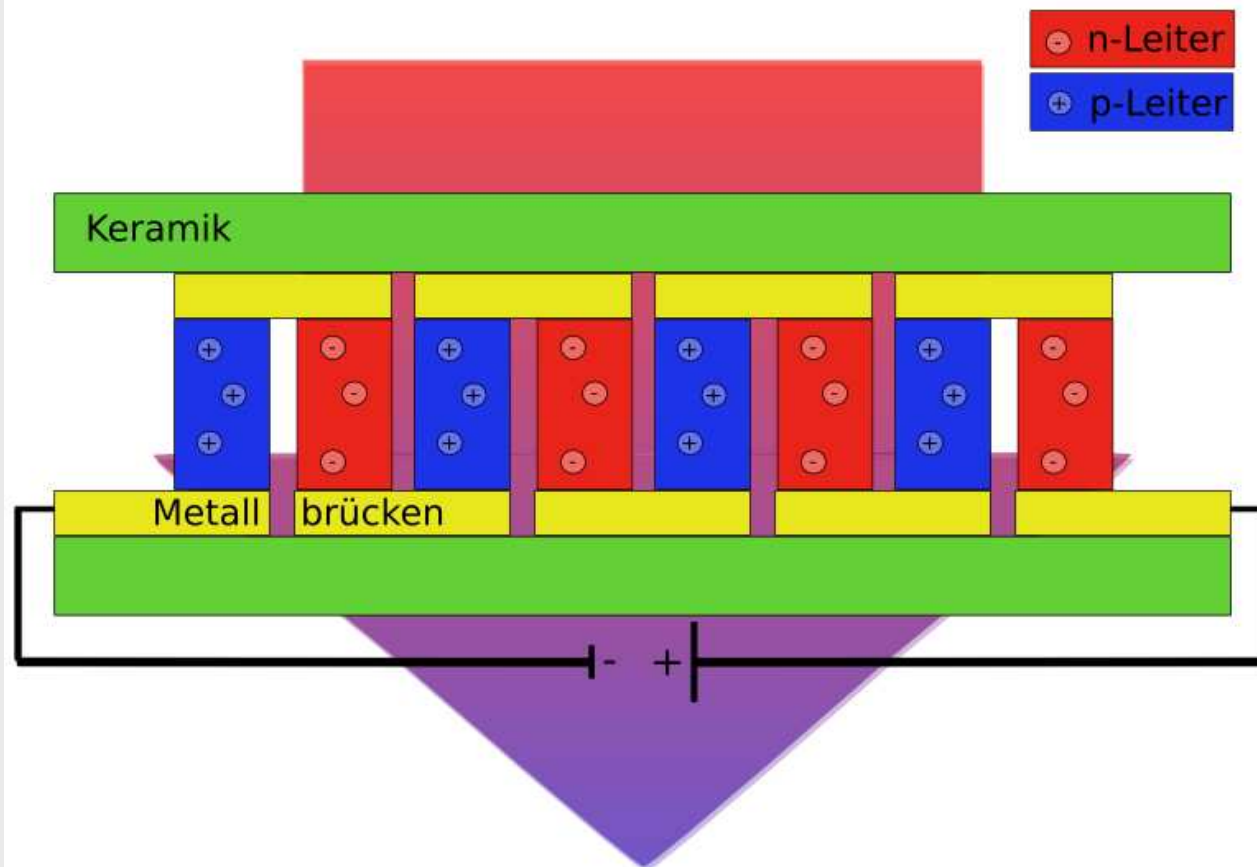


Abb. 1-3: Die Funktionsweise eines CCD-Chips kann grob mit diesem Eimermodell dargestellt werden: Nach dem Regen werden die Eimer mittels der Förderbänder zeilenweise in die auf dem »Ausleseband« angebrachten Eimer entleert. Hier werden sie nacheinander zur »Meßstation« befördert, wo dann ihr Füllstand bestimmt wird.

Technisches Prinzip / Thermocycler

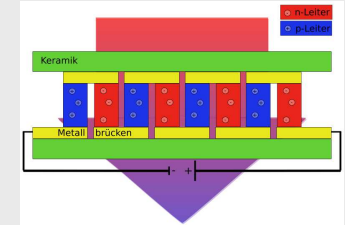


Peltier-Element



Ein **Peltier-Element** ist ein elektrothermischer Wandler, der basierend auf dem Peltier-Effekt bei Stromdurchfluss eine Temperaturdifferenz oder bei Temperaturdifferenz einen Stromfluss erzeugt.

Peltier-Element



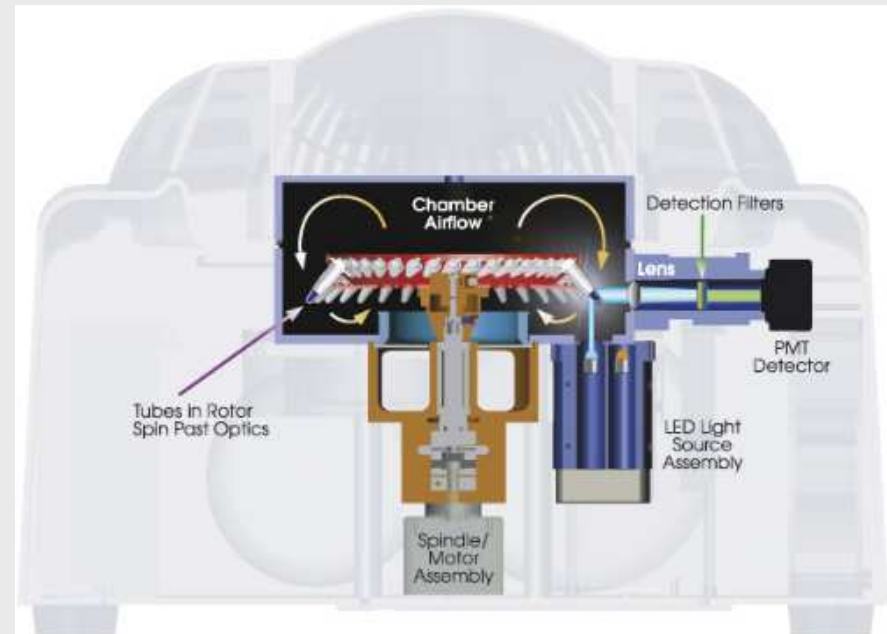
Grundlage für den Peltier-Effekt ist der Kontakt von zwei Halbleitern, die ein unterschiedliches Energieniveau (entweder p- oder n-leitend) der Leitungsbänder besitzen. Leitet man einen Strom durch zwei hintereinanderliegende Kontaktstellen dieser Materialien, so muss auf der einen Kontaktstelle Wärmeenergie aufgenommen werden, damit das Elektron in das energetisch höhere Leitungsband des benachbarten Halbleitermaterials gelangt, folglich kommt es zur Abkühlung. Auf der anderen Kontaktstelle fällt das Elektron von einem höheren auf ein tieferes Energieniveau, so dass hier Energie in Form von Wärme abgegeben wird.

Temperaturkonstanz durch Rotation



ABI 7500

Well-to-well variation below $\pm 0.25^{\circ}\text{C}$



Rotorgene

Well-to-well variation below $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$

Verschiedene real-time PCR Formate

- Schon bald nach der Einführung der ersten real-time PCR Assays wurden aus verschiedenen Gründen weitere Sondentechnologien entwickelt:
 - Analytische Vorteile
 - Umgehung von Lizenzen

Kriterien für die Sondenwahl

- Funktionsfähigkeit
- Einfachheit des Systemdesigns
- Flexibilität des Systemdesigns
- Möglichkeit eine Schmelzkurve zu bestimmen
- Synthese (schwierig/einfach?)
- Preis
- Fragmentlängen
- Spezifität (SNPs, etc)
- Weiteres

Detektion von doppelsträngiger DNA

SybrGreen

<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#sybrgreen>

EvaGreen™

<http://www.gene-quantification.de/evagreen-flyer.pdf>

BEBO dsDNA binding dye

http://www.tataa.com/files/documents/manual_bebo.pdf

SYTO® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains

<http://www.gene-quantification.de/syto-dyes.pdf>

LC green® Plus+

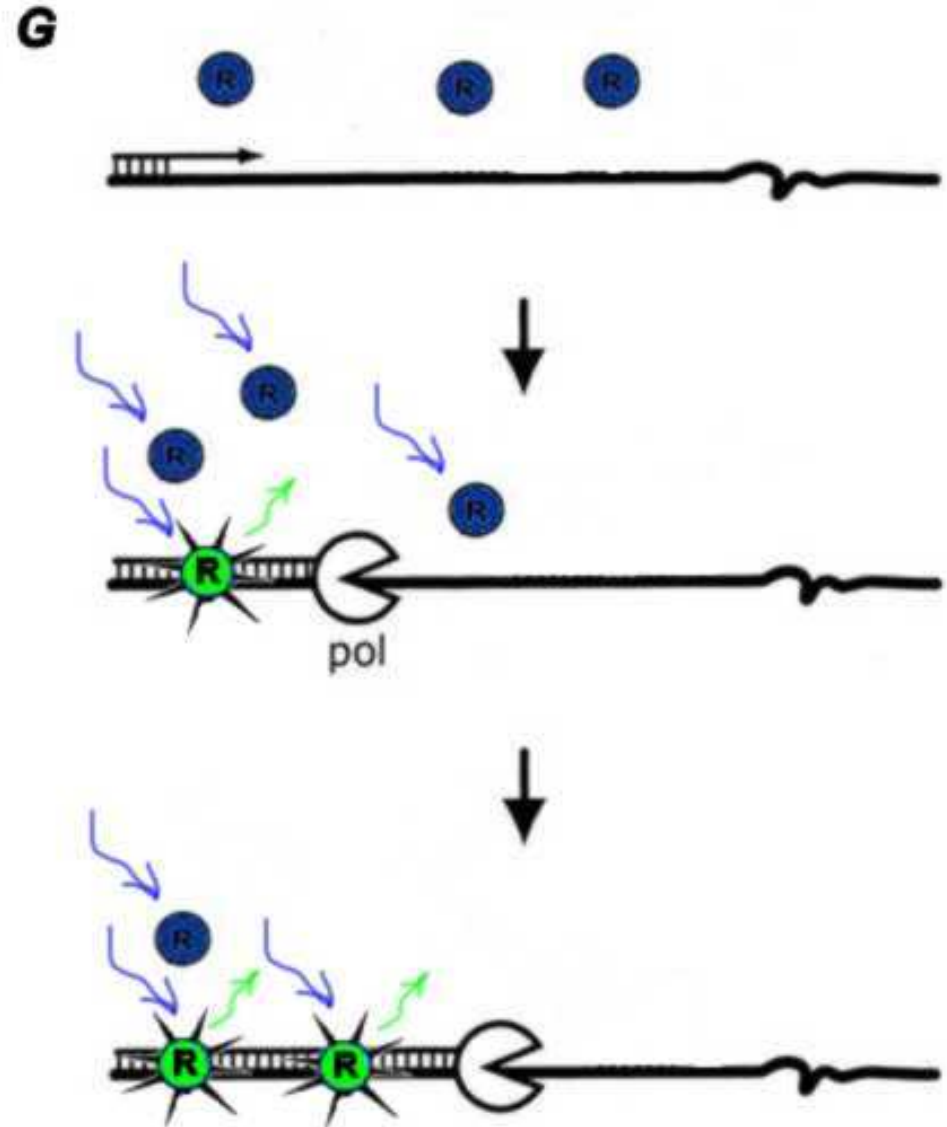
<http://www.gene-quantification.de/LC-Green-info.pdf>

Vergleich verschiedener, interkalierender Farbstoffe:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095797/pdf/gkm671.pdf>

SYBR Green-Assay

- SYBR Green I Farbstoff ist ein hoch sensibler Fluoreszenz-Farbstoff für den Nachweis von dsDNA und Oligonukleotiden.
- Das SYBR Green Fluoreszenz Signal ist stark verstärkt, wenn der Farbstoff an Nukleinsäure gebunden ist.
- SYBR Green zeigt eine exzellente Signal-to-Noise Ratio mit wenig Hintergrund Fluoreszenz.



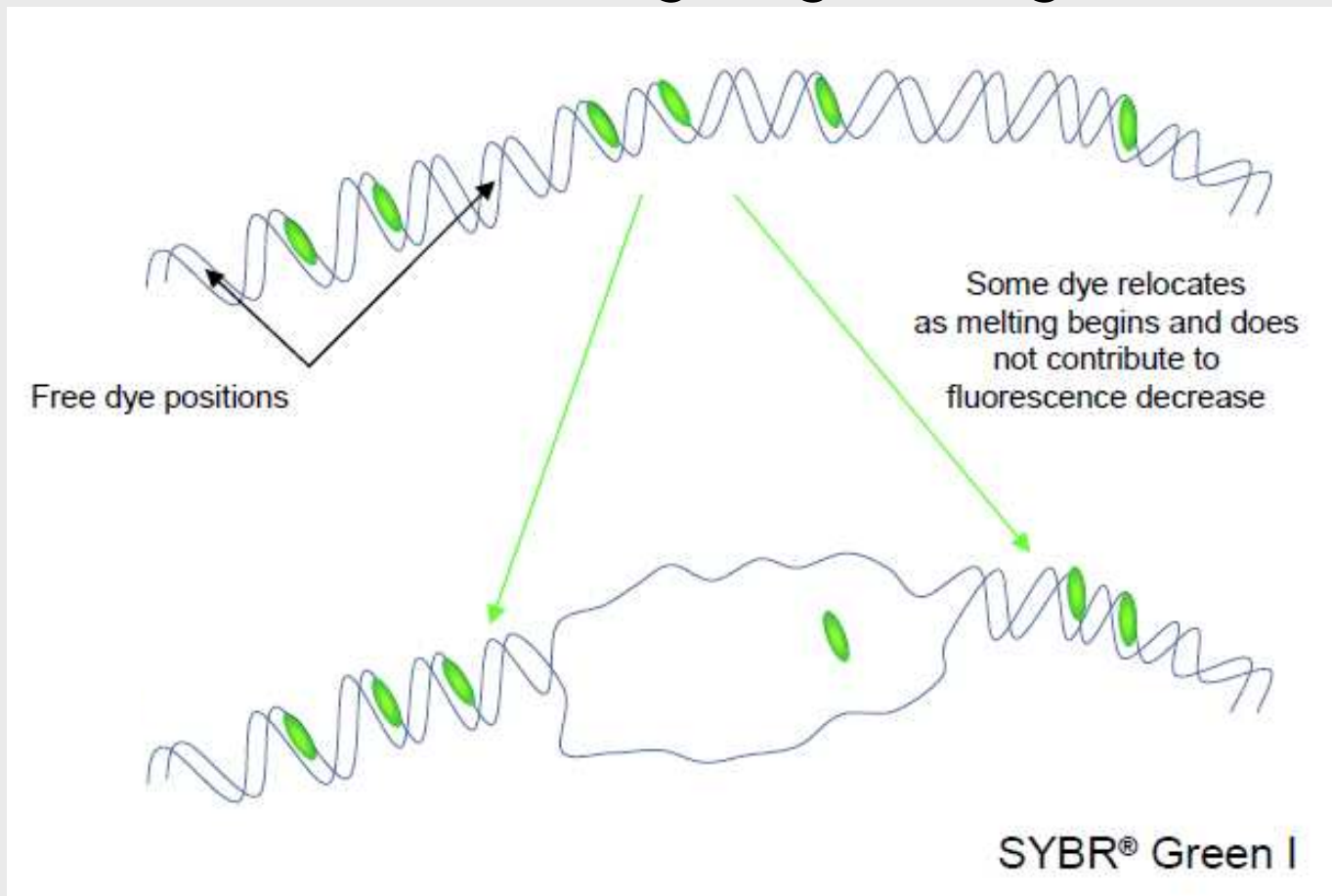
EvaGreen-Assay

- EvaGreen hat eine höhere relative Fluoreszenz als SYBR Green.



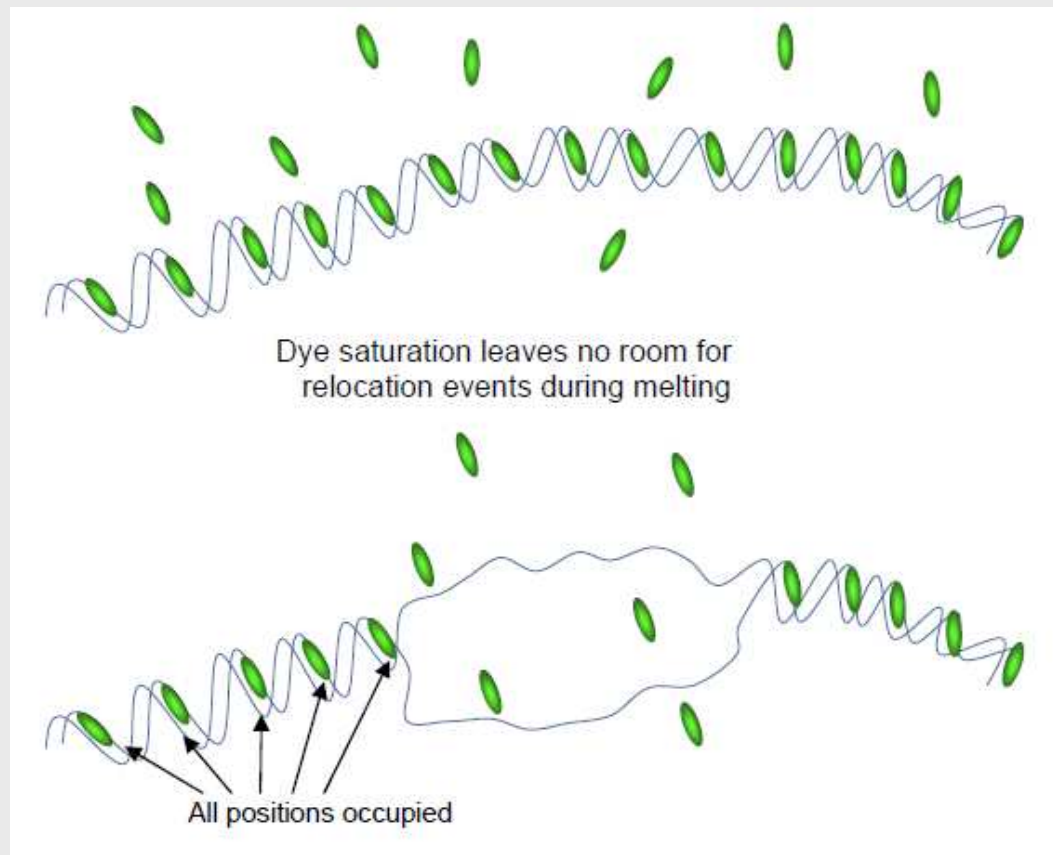
Alternativen zum SYBR Green Assay

- SYBR Green kann ist für die PCR toxisch und kann deshalb nur in relativ geringen Mengen verwendet



EvaGreen, SYTO9, BEBO und LCgreen

- Weil die Farbstoffe EvaGreen, SYTO9, BEBO und LCgreen weniger toxisch sind, können sie in höherer Konzentration verwendet werden.



⇒ Deshalb können bei der Messung der Schmelztemperatur kleinere Unterschiede festgestellt werden.

Detektion von PCR-Produkten

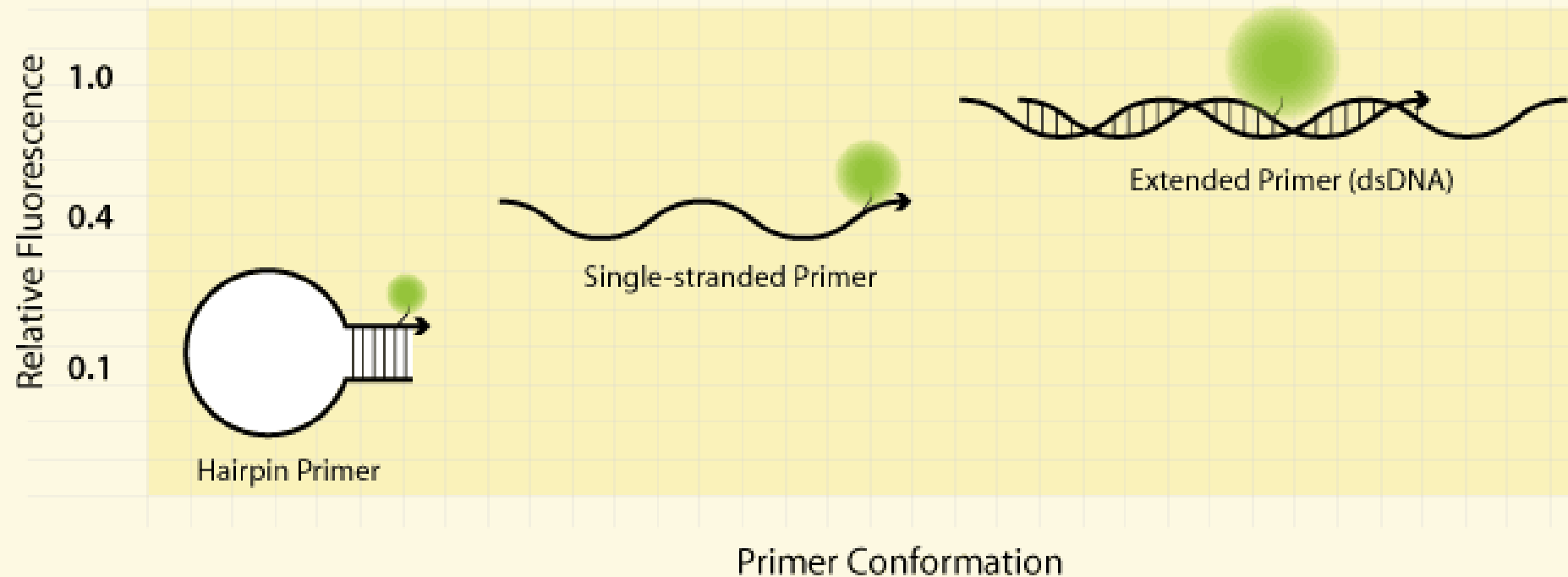
LUX-Primer

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Nucleic-Acid-Amplification-and-Expression-Profilng/qRT-PCR/qPCR/D-LUX-Assays.html>

Plexor™ System

http://www.promega.com/pnotes/92/13408_10/13408_10.pdf

LUX-Primer



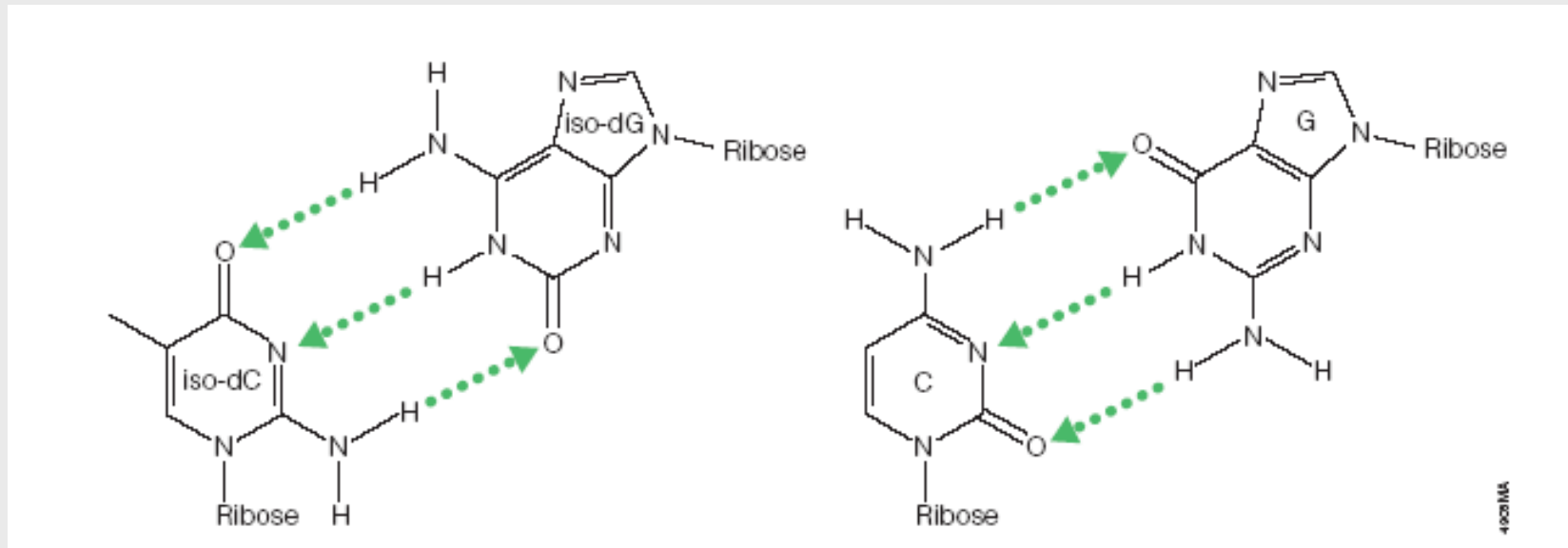
Die Fluoreszenz ist durch die Hairpin-Struktur gequencht.
Der zweite Primer ist nicht markiert.

LUX-Primer / Comparison of real-time detection platforms

Darstellung auf der Homepage von Invitrogen:

	TaqMan® Probes	Molecular Beacons	SYBR® Green 1	LUX™ Primers
Sensitivity	•	...
Dynamic range	•	...
Specificity	•	...
Multiplexing	••	••	N/A	...
Melting curve analysis	N/A	N/A
Ease of design	•	•
Cost	•	•

Plexor™-System

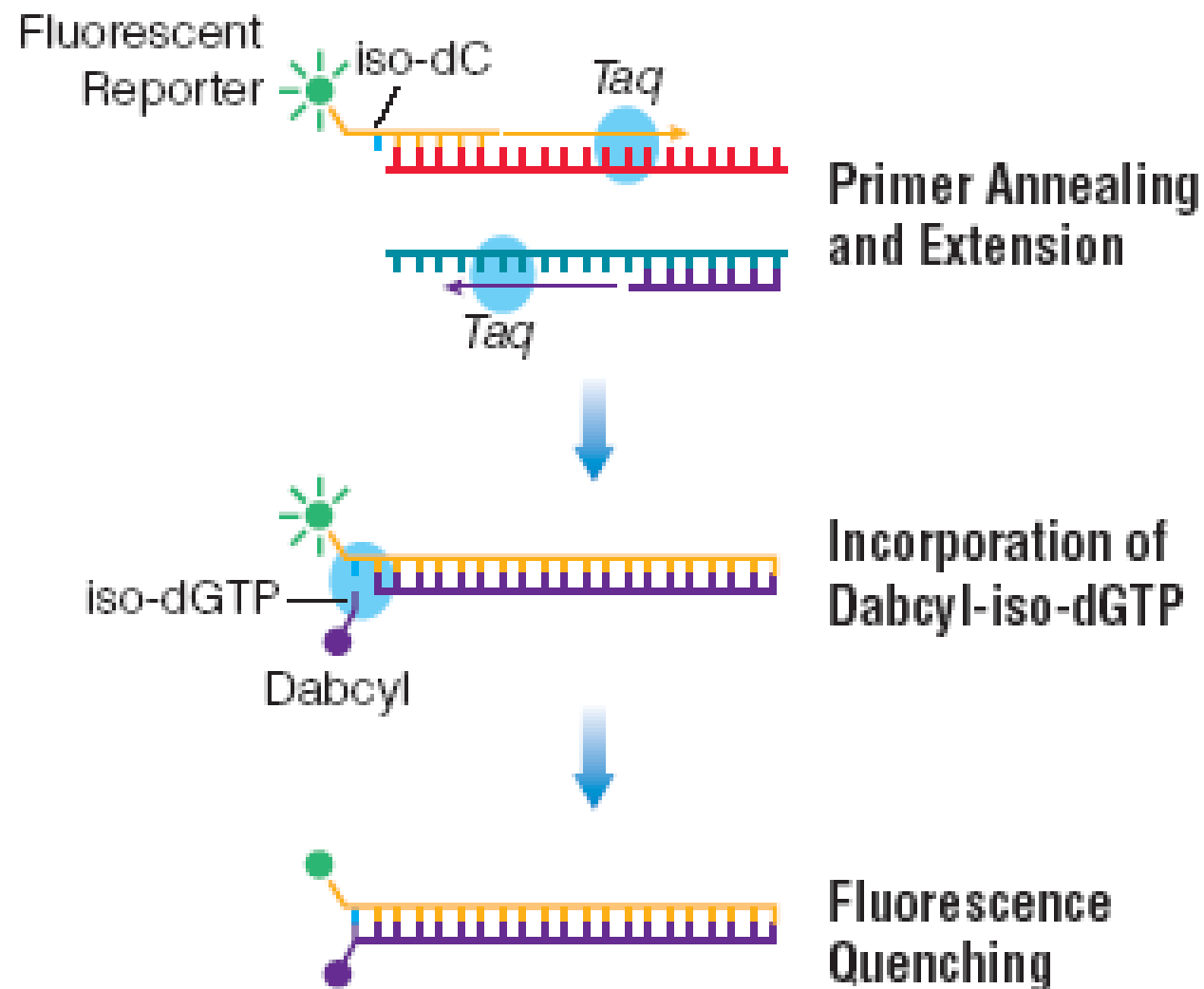


Iso-dG (Isoguanin) und iso-dC (5'- Methylisocytosin) bilden ein spezifisches Basenpaar, wenn in der dsDNA eingebaut.

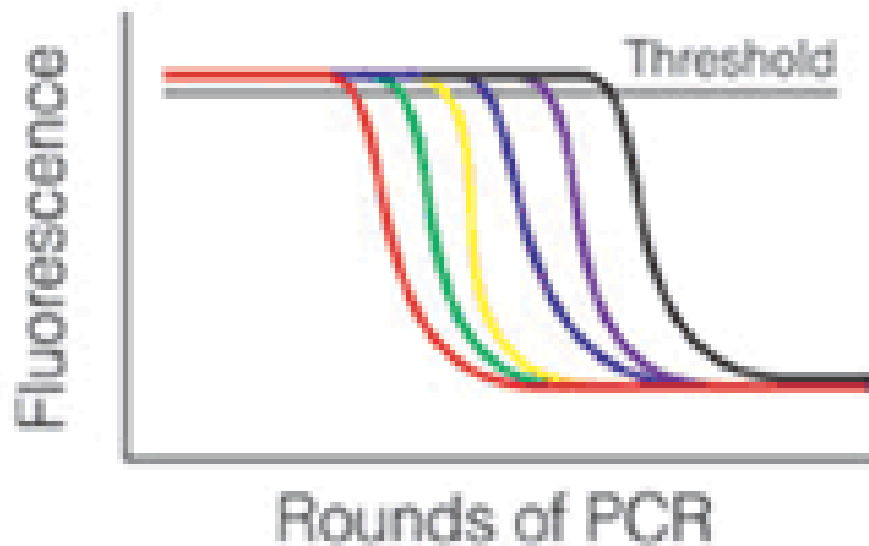
Plexor™-System

- Im Plexor-System ist ein Primer mit einer iso-dC Base und einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende markiert. Der zweite Primer ist nicht gelabelt.
- Iso-dGTP Nukleotide, die Dabcyl als Quencher enthalten, sind im 2xMM beigefügt.
- Iso-dGTP wird vorzugsweise komplementär zum iso-dC-Rest eingebaut.
- Die Fluoreszenz wird gequencht.

Plexor™-System



Plexor™-System



Durch den Einbau von iso-dGTP wird der Dabcyl-Quencher eingebaut; die Fluoreszenz wird immer mehr gequencht.

Detektion mit einer Sonde

TaqMan Sonde

Originalpublikation:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC52277/pdf/pnas01066-0386.pdf>

Broschüren:

http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html

http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm>

Lightcycler Sonde (FRET)

<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#LC>

Molecular Beacon

<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#beacons>

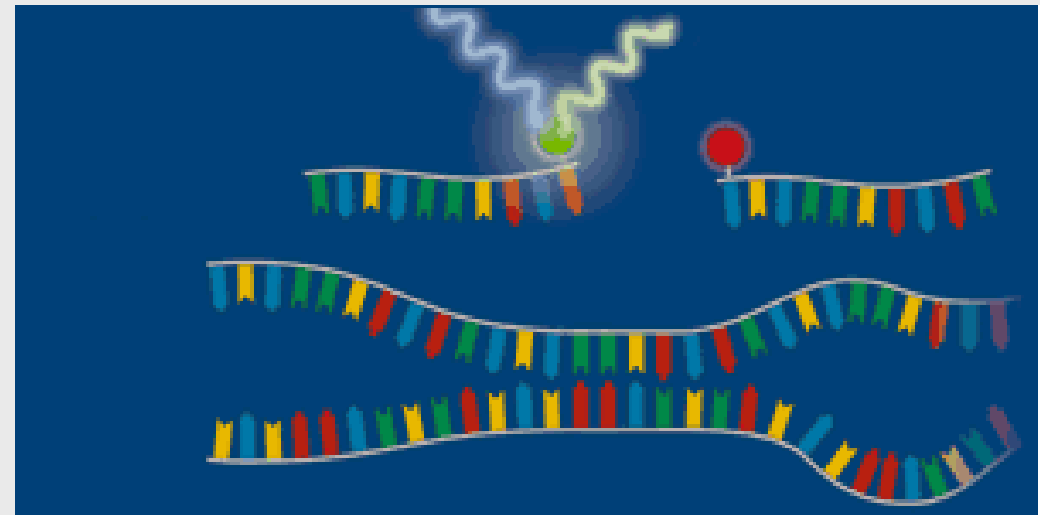
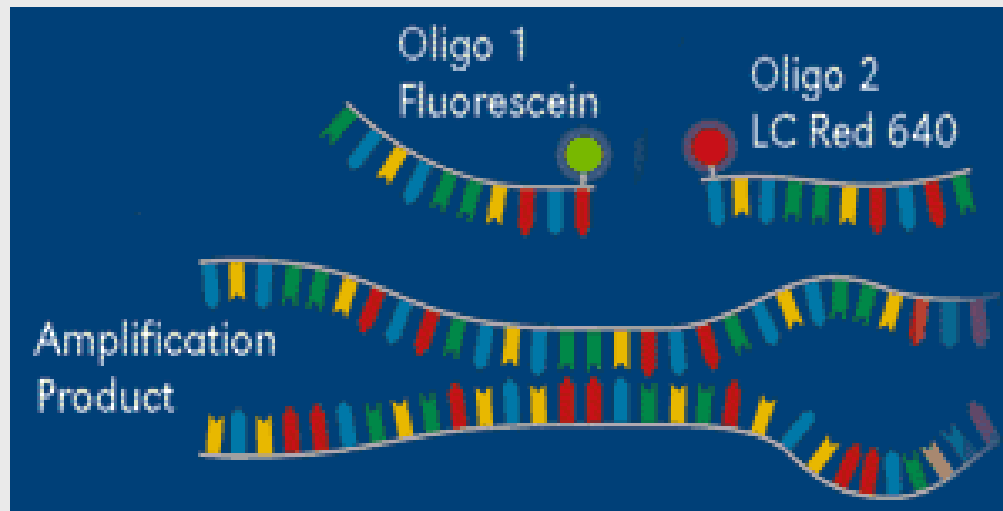
Scorpion[®] Probe

http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Scorpion.html

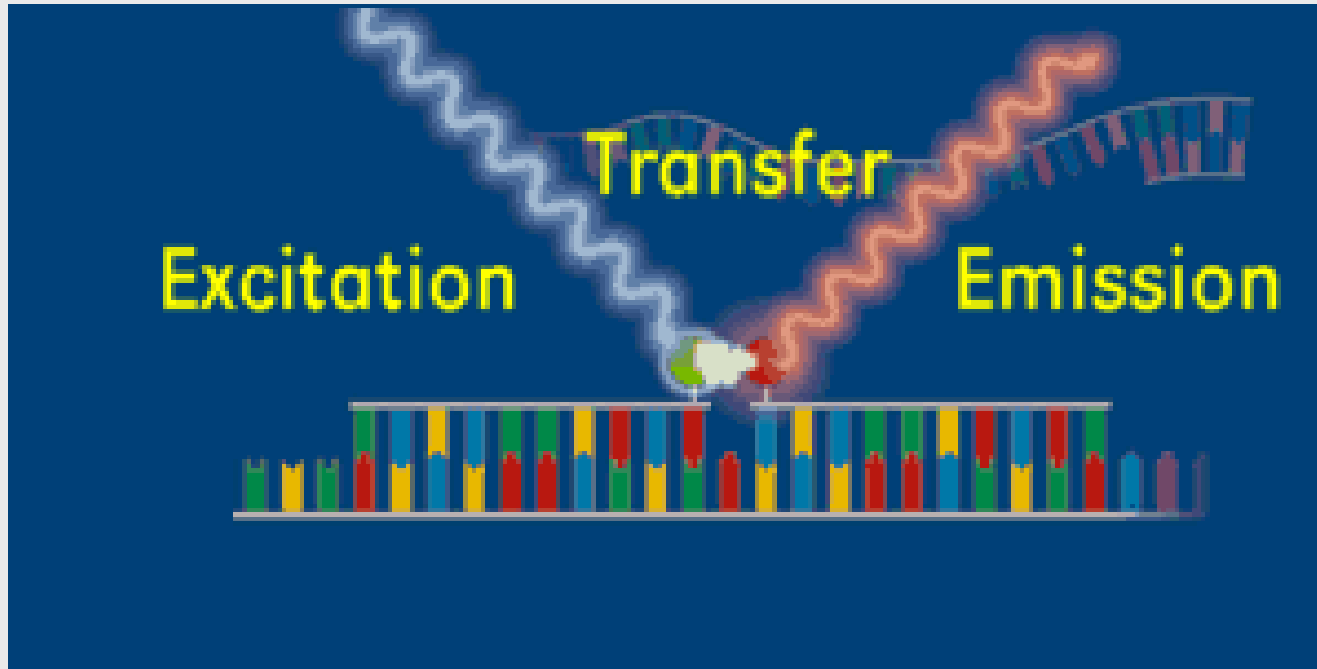
[http://www.dxsdiagnostics.com/\(S\(syg1du45vmulsi45xoz4me3y\)\)/Site/Content/dxs/TheScorpionsReaction.aspx?Z=18&AspxAutoDetectCookieSupport=1](http://www.dxsdiagnostics.com/(S(syg1du45vmulsi45xoz4me3y))/Site/Content/dxs/TheScorpionsReaction.aspx?Z=18&AspxAutoDetectCookieSupport=1)

<http://www.smd.qmul.ac.uk/surgery/events/talks/whitcombe.pdf>

Lightcycler Sonde (FRET)

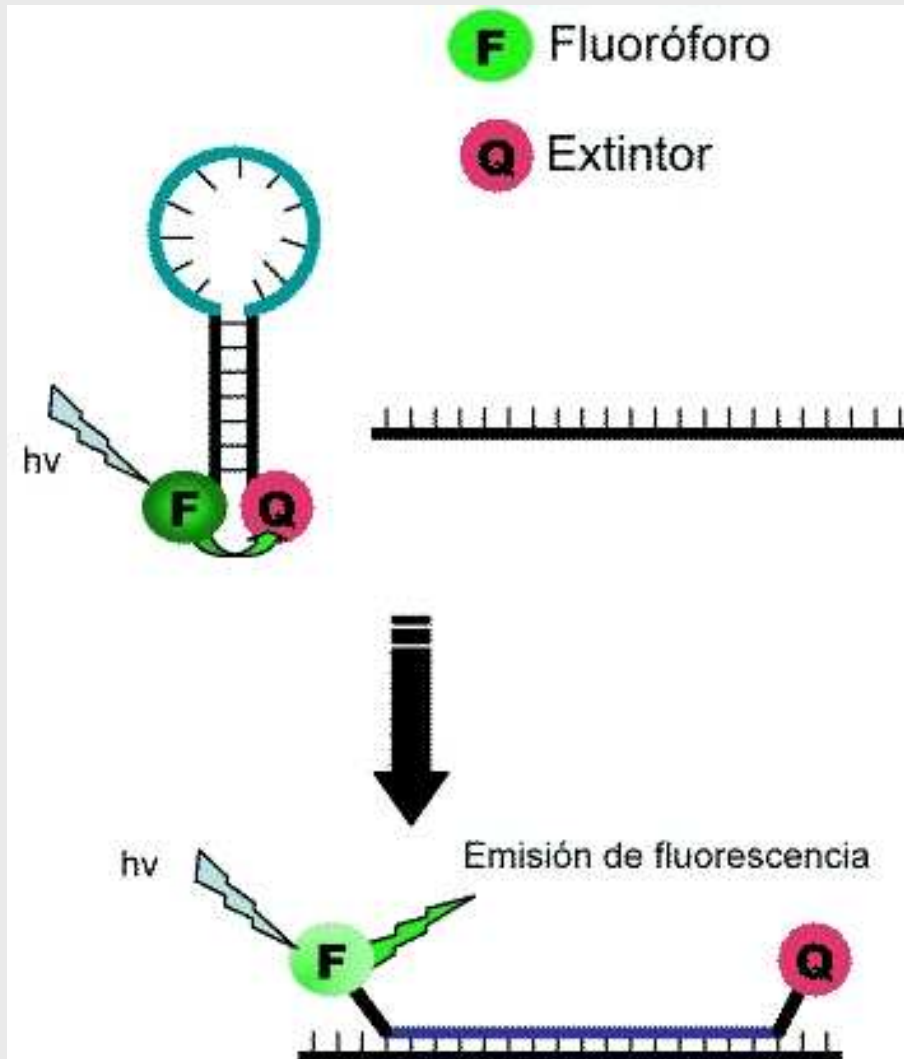


Lightcycler Sonde (FRET)



Die Fluoreszenz wird im längeren Wellenlängenbereich emittiert, wenn die beiden Sonden nebeneinander positioniert sind.

Molecular Beacon (FRET)



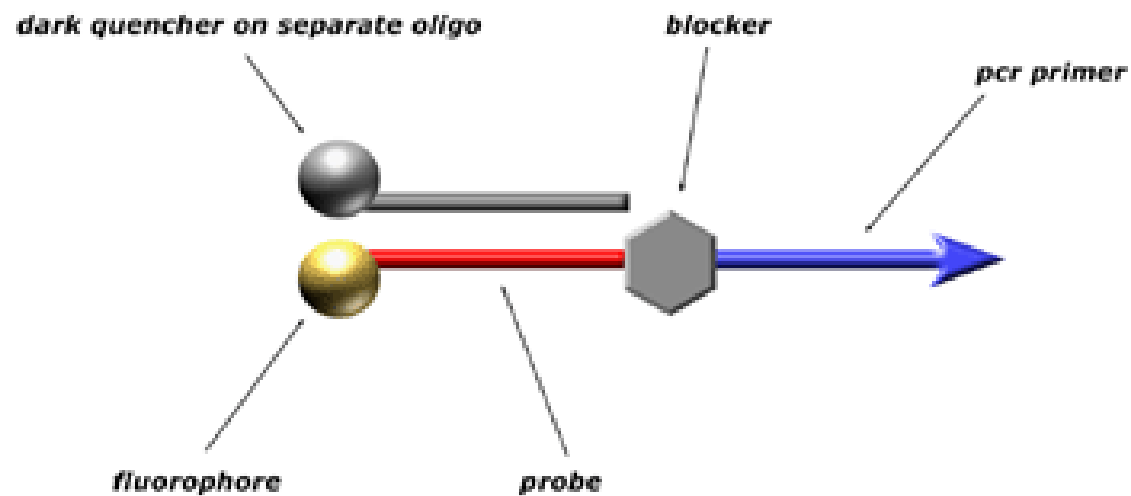
Die entstehenden PCR-Produkte können durch Molecular Beacons detektiert werden.

Durch eine Hairpin-Struktur der Sonde ist das Reporter und das Quencher-Molekül räumlich nahe beieinander und wird so gequencht.

Durch die Bindung an das PCR-Produkt geht der Quenching-Effekt verloren.

Scorpions (FRET)

Elements of a Scorpions primer



<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#scorpions>

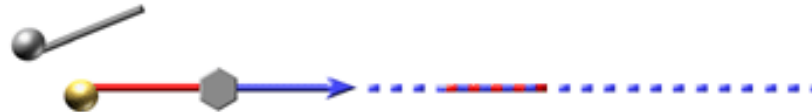
Scorpions

The Scorpions reaction

Step 1 - the Scorpions primer is extended on target DNA.



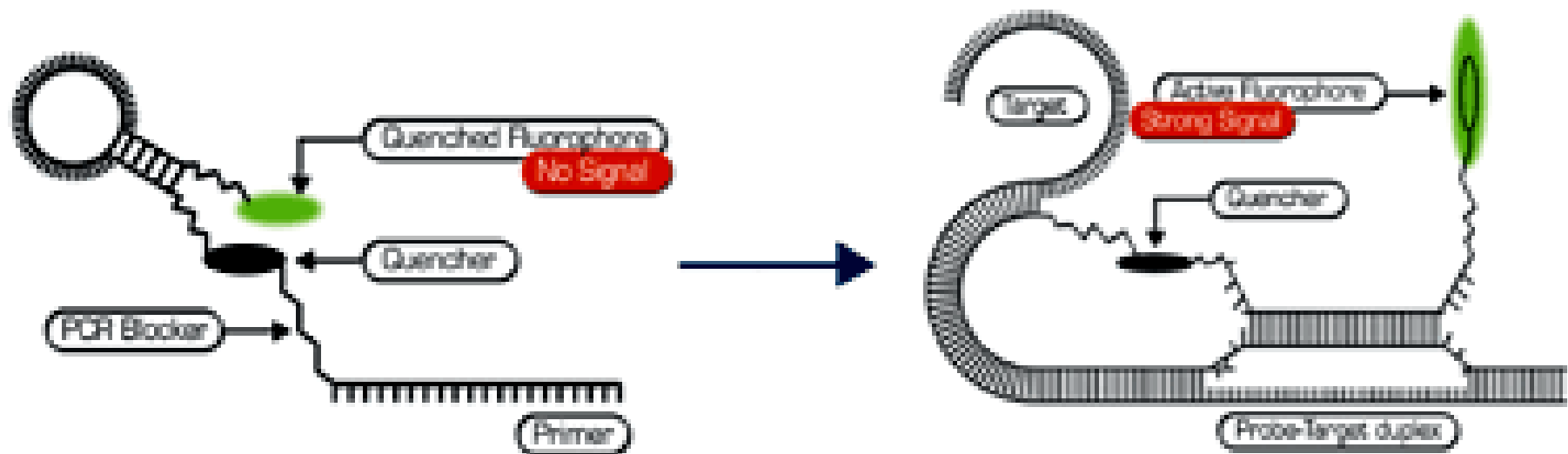
Step 2 - the extended primer is heat denatured - the quencher disassociates.



Step 3 - as it cools the extended Scorpion rearranges and begins to fluoresce in a target specific manner; unextended primer is quenched.



Scorpions (FRET)



Spezialgruppe

MGB-Sonde

Originalpublikation:

<http://nar.oxfordjournals.org/content/28/2/655.abstract>

LNA-Sonde

Originalpublikation:

<http://www.gene-quantification.de/latorra-et-al-2003.pdf> Sonstige

Informationen:

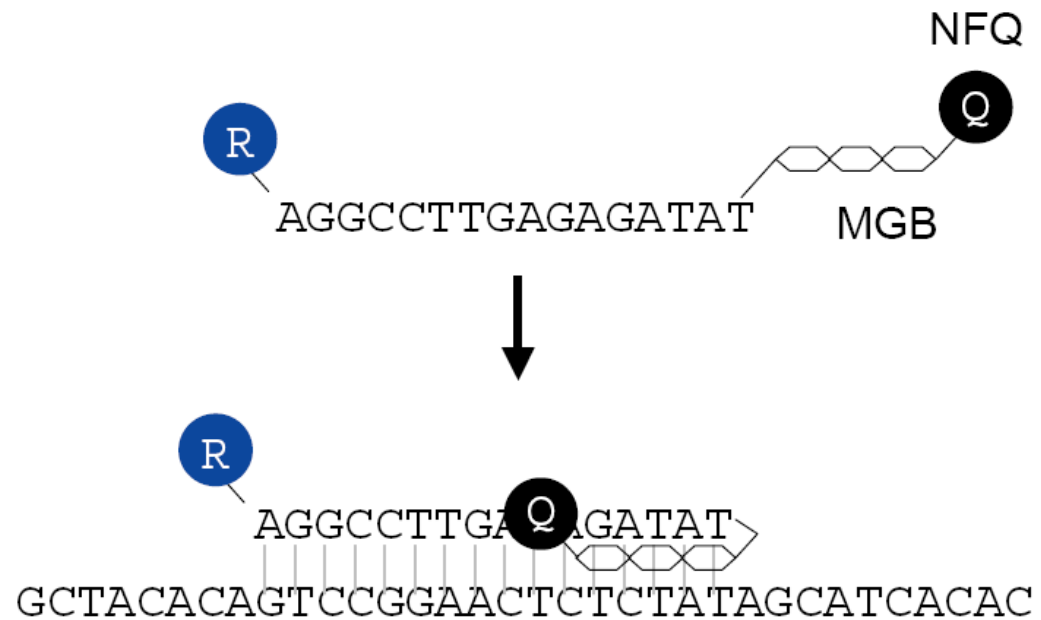
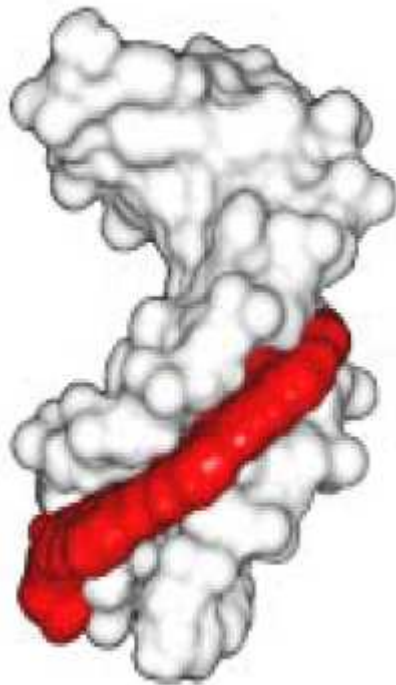
<http://www.exiqon.com/lna-technology>

Spezialgruppe



Um eine möglichst optimale Spezifität zu erreichen, wurden andere Sonden entwickelt, die durch eine Veränderung der DNA-Helix Konformation eine stärkere Bindung der Sonde an die Target-DNA ermöglicht. Derartige Sonden zeigen eine höhere Mismatch Diskriminierung.

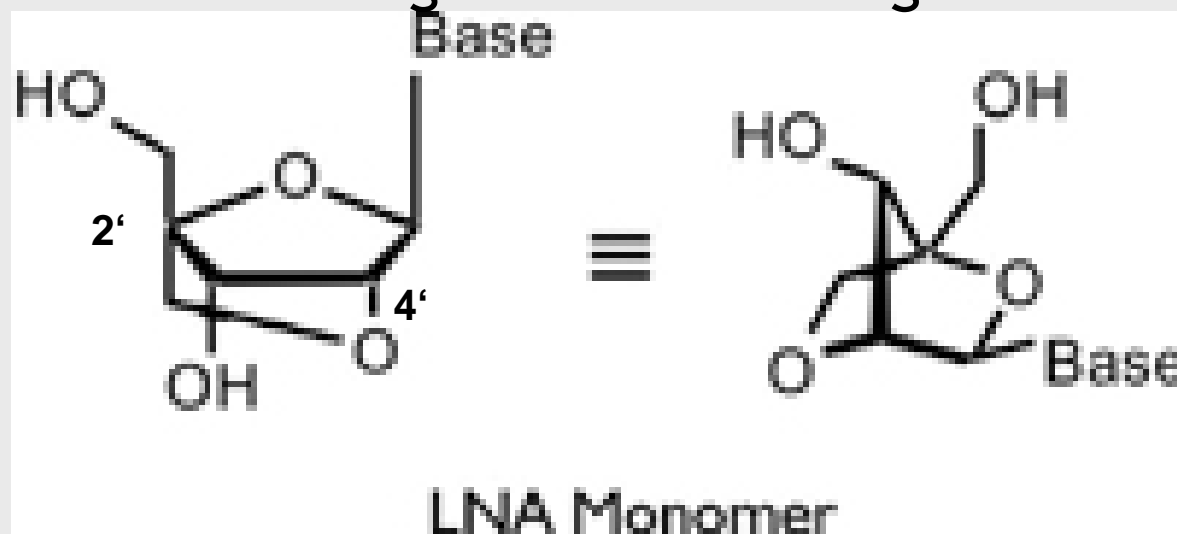
Minor Groove Binder (MGB) Sonde



- Verkürzte Sondensequenzen
- Erhöhte Spezifität

Locked Nucleic Acid (LNA) Sonde

LNA Probes sind ein neuer Typ von Nukleinsäure-Analog, welches eine 2'-O, 4'-C Methylenbrücke enthält. Diese Brücke - gebunden in einer 3'-Endo-Konformation - verhindert die Flexibilität des Ribofuranose-Rings und blockiert die Struktur in eine steife bicyclische Formation, welche eine erhöhte Hybridisierungs-Effizienz und ausserordentliche biologische Stabilität gewährleistet.





Basel-Stadt

Schlusswort / Fragen