

Sinteza DNA *in vitro*

Polimerne NA sintetiziramo z avtomatiziranimi napravami na trdnem nosilcu.



Sintetiziramo lahko DNA ali RNA, vključujemo pa lahko tudi modificirane baze (npr. fluoresc. barvila) in degenerirana mesta.

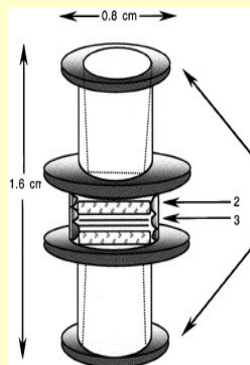
Metod za sintezo je več. V 50-tih letih so razvili fosfortriestrsko in fosfodiestrsko metodo; v zadnjem času se je najbolj uveljavila fosforamiditna metoda.

Ker je DNA s svojimi $-OH$, aminskimi in fosfatnimi skupinami zelo reaktivna molekula, sinteza poteka ob popolni zaščiti teh skupin, kar preprečuje nastanek neželenih produktov. Sinteza teče v brezvodnem okolju (kjer je DNA netopna). Prvi bazi, vezani na nosilec, dodajamo po 1 bazo v smeri od 3'- proti 5'-koncu.

Sinteza je ciklični proces, v katerem si zapored sledijo 4 faze: detritilacija / vezava / pokrivanje (capping) / oksidacija

Fosforamiditna metoda

Trdni nosilec predstavljajo steklo s kontroliranimi porami (CPG), polistiren ali celulozni filtri.

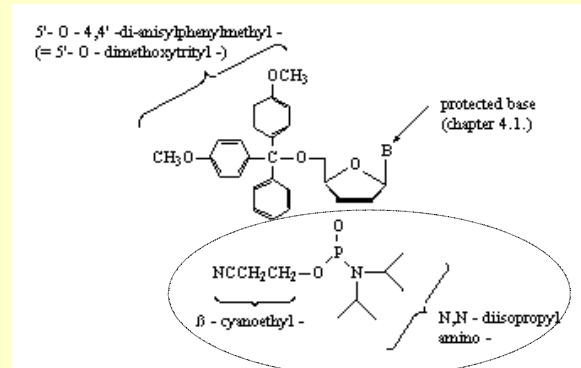
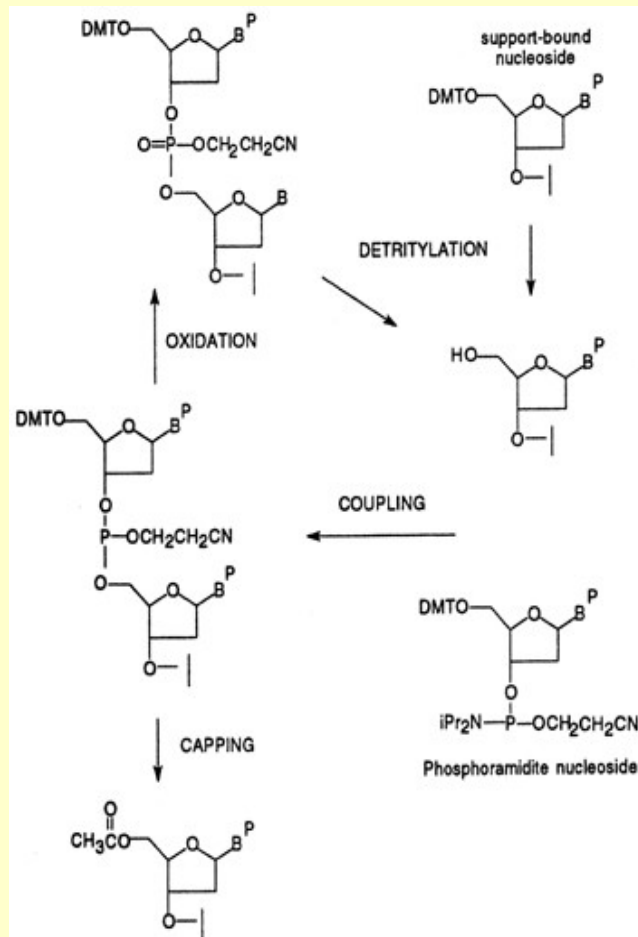


Prvi nukleozid je kovalentno vezan na nosilec.
Nukleozid je zaščiteno z dimetoksitritilno skupino (DMT).

DMT odstranimo s TCA → prosta 5'-OH skupina za vezavo naslednjega nukleozida. Ta v prisotnosti tetrazola vstopa v reakcijo v obliki fosforamidita in je prav tako na 5'-OH zaščiteno z DMT.

DMT:

fosforamidit:



Fosforamiditna metoda /2

Učinkovitost vezave vstopajočega mononukleozida je >98 %. Nezreagirane molekule odstranimo iz reakcije s pokrivanjem prostih 5'-OH skupin. To dosežemo z acetiliranjem.

Tako modificirane molekule ne morejo vstopati v naslednje reakcije.

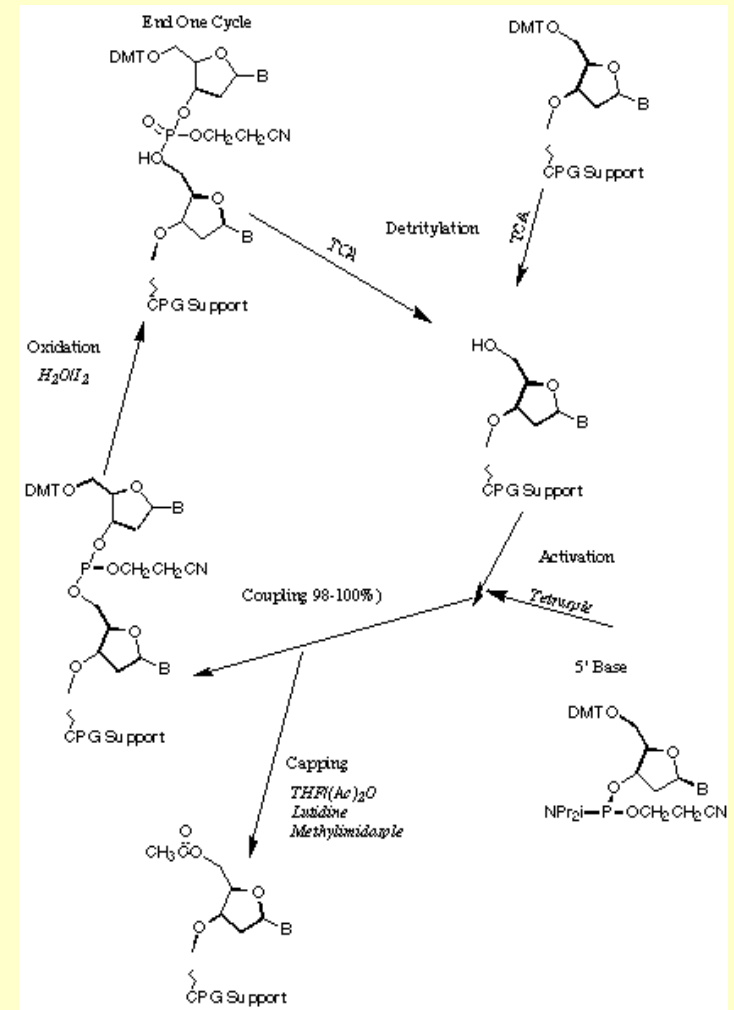
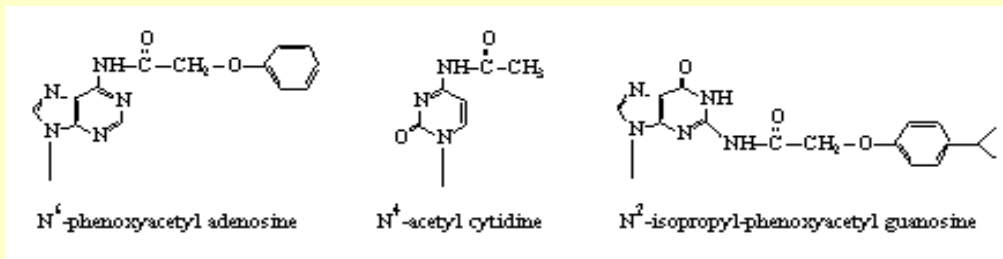
Na novo dodano bazo oksidiramo in jo tako pretvorimo iz fosfitne v stabilno fosfortriestrsko obliko.

V zadnji stopnji DMT ponovno odcepimo s TCA in začnemo nov cikel sinteze.

Po zadnjem ciklu oligonukleotid odcepimo z nosilca z amoniakom, ki odstrani tudi preostale zaščitne skupine (1 h 65°C).

Učinkovitost sinteze spremljamo spektrofotometrično preko količine sproščenega DMT v vsakem ciklu.

Pri sintezi RNA je potrebna dodatna zaščita 2'-OH:



Sinteza DNA: praktični vidiki

Če je učinkovitost vsakega cikla sinteze 99 %, je izplen pri sintezi 20-mera 82 %, 60-mera pa 55 %. Običajno sintetiziramo oligonukleotide dolžine <50 b.

Modifikacije NA:

fosforotioati (stabilnost – npr. pri protismerni DNA)

fluoresc. skupine (za določanje nukl. zaporedja, genske čipe)

Čiščenje: amoniak odparimo, NA oborimo in s tem odstranimo soli ('razsoljeno'), lahko pa očistimo s HPLC ali preko PAGE.

Obseg proizvodnje (standardi):

10 (25) nmol

40 (50) nmol (50-100 µg)

200 nmol (200-500 µg)

1 µmol (1-2 mg)

10 µmol (10 mg)

Približne cene v svetu za 50 nmol: ~0,6 EUR/bazo, 0,2 mmol: 1,1 EUR/bazo (razsoljeno)
+25 EUR/oligo za čiščenje preko HPLC; +40 EUR/oligo za čiščenje preko PAGE

modifikacije: biotinizacija: +45 EUR

vezava digoksinena: +100 EUR

vezava fluoresceina: +40 EUR

degenerirana mesta: 1,1 EUR/bazo

Sinteza genov

Gene lahko sestavimo iz sintetiziranih fragmentov

Agarwal, 1970: Ala-tRNA, 76 bp;

Khorana, 1976-79: supresorska Tyr-tRNA, 126 bp;

Ferretti, 1986: rodopsin, 1057 bp

Namen: priprava gena z ustrežnejšimi lastnostmi kot jih ima naravni gen/cDNA (raba kodona, restr. mesta, dodajanje oznak).

Postopek:

1. analiza naravnega zapisa (start, stop, RE-mesta) ali 'reverzna translacija'
2. določanje mest za izboljšavo (raba kodona, dodatna RE-mesta: 'tiha mesta', dodatna zaporedja)
3. sinteza oligonukleotidov za kodirajočo in nekodirajočo verigo (l=40-70 b), ki se prekrivajo z zamikom
4. fosforiliranje 5'-koncev
5. hibridizacija komplementarnih parov
6. ligiranje odsekov dsDNA

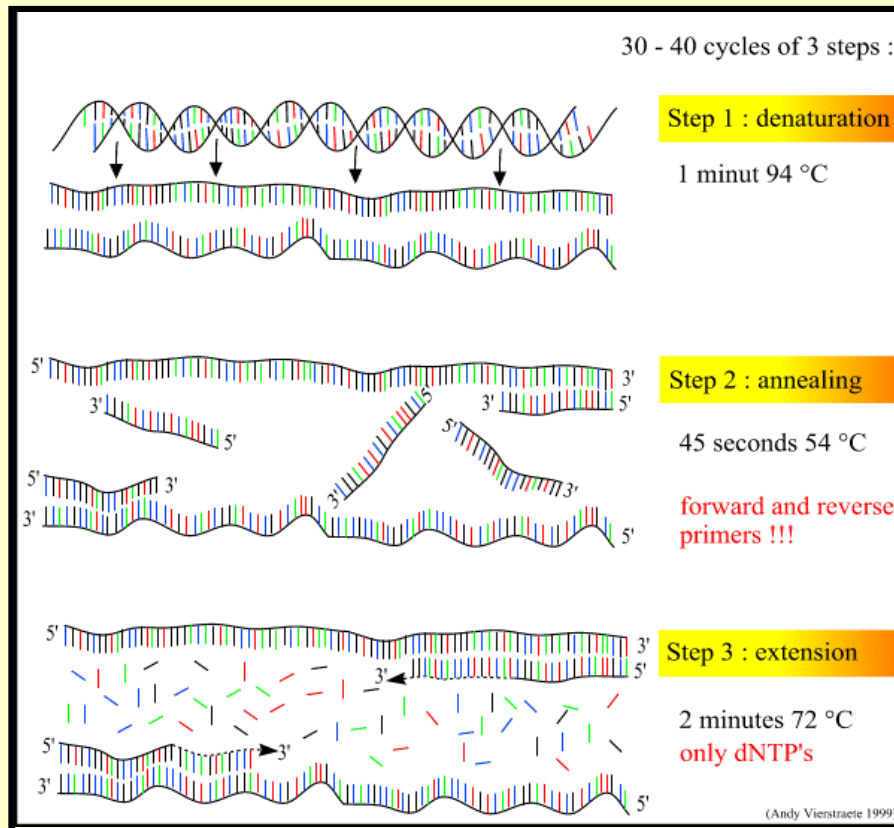
Sledi vnos v vektor, RE-analiza in preverjanje nukleotidnega zaporedja inserta.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR: Pomnoževanje območij DNA med dvema začetnima oligonukleotidoma s termostabilno polimerazo ob spreminjanju temperatur.

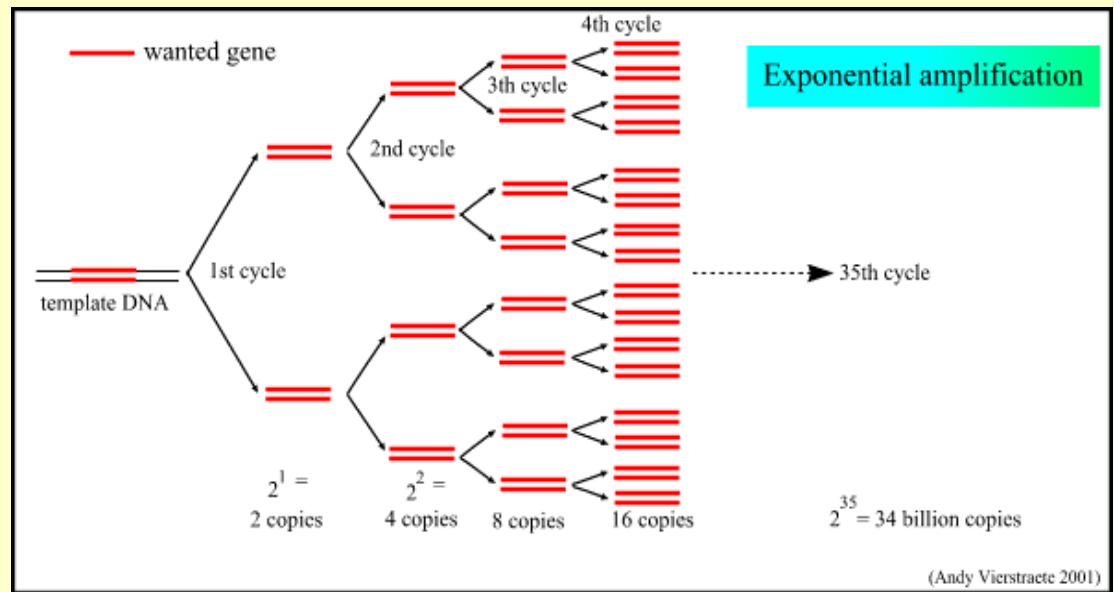
Pomnoževanje poteka v ciklih.

Ponavljajo se 3 stopnje: denaturacija / prileganje / podaljševanje

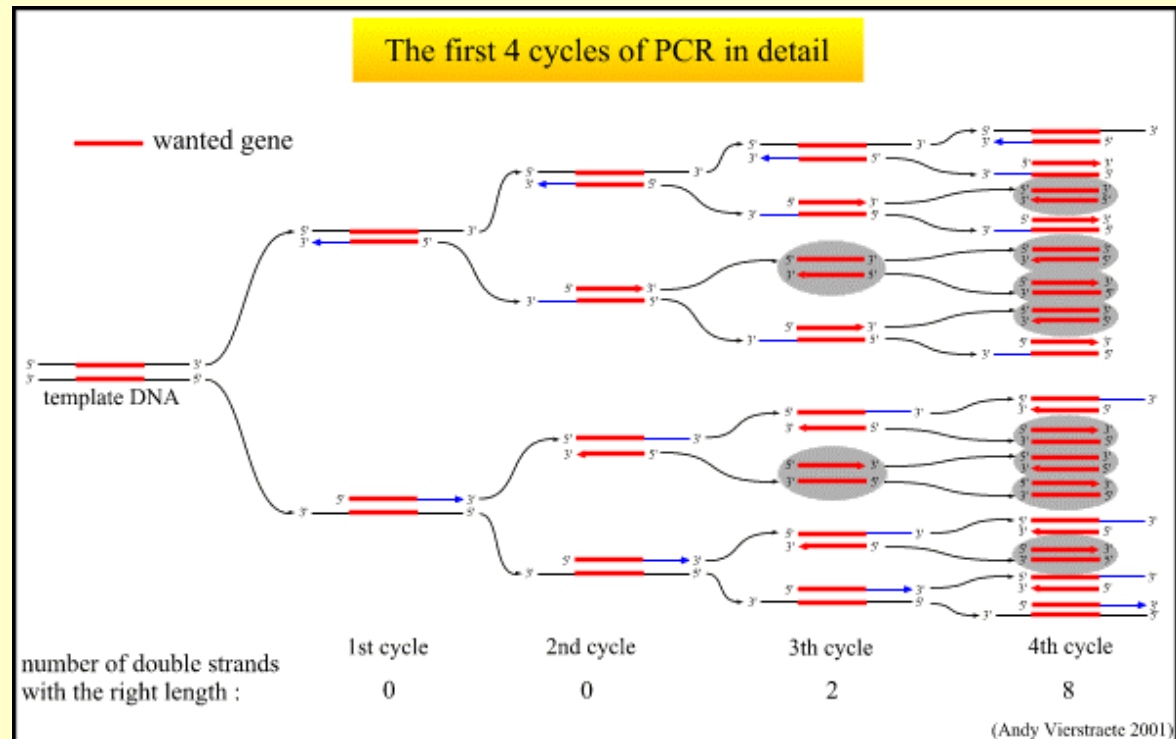


PCR: postopek

Pomnoževanje je eksponentno.



Produkt pričakovane dolžine nastaja postopno.
Produkt PCR = AMPLIKON.



PCR: potek poskusa

sestava standardne reakcijske mešanice (25 μ l):

<u>sestavina</u>	<u>volumen</u>	<u>končna konc.</u>
matrična DNA ~100 ng	1,0 μ l	4 ng/ml
začetni oligonukleotid 1 (5'-konec)	0,2 μ l	0,4 mM
začetni oligonukleotid 2 (3'-konec)	0,2 μ l	0,4 mM
mešanica dNTP (vsak 25 mM)	0,2 μ l	0,2 mM
reakcijski pufer (10x)	2,5 μ l	
dH ₂ O	20,7 μ l	
DNA-polimeraza (1 U)	0,2 μ l	
_____	25,0 μ l	

Cikli: (1 min 94 °C / 1 min 54 °C / 1-2 min 72 °C) x 30

PCR: aparature



Volumni: ploščice s 384 ali 96 vdolbinami
mikrocentrifugirke 0,2 ml ali 0,5 ml (za 25 -50 μ l ali 100 μ l reakcije)

Prekrivanje z oljem ni potrebno, če je termostatiran tudi pokrov.

Osnovna metoda ima desetine izvedenk (pomnoževanje neznanega zaporedja, sinteza cDNA [RT-PCR], vnos mutacij,...)

Kupiti je mogoče komplete reagentov, ki vsebujejo encim, pufer, posamezne dNTP in kontrolno DNA.

PCR: začetni oligonukleotidi

- Začetni oligonukleotidi so večinoma dolgi >20 b; uporabljamo lahko tudi daljše fragmente DNA (npr. produkte predhodnih PCR).
- Zelo pomembno je zaporedje začetnega oligonukleotida, saj je to odločilno za specifičnost dobljenih produktov in za izbiro delovnih temperatur.
- Za načrtovanje začetnih oligonukleotidov obstaja veliko programov, ki preverjajo tvorbo zank in dimerov znotraj posameznega zaporedja in med 2 zaporedjema.
- Napotki za načrtovanje oligonukleotidov:
 - nimajo naj previsokega deleža G/C (po možnosti <50 %)
 - na 3'-koncu naj ne bosta G ali C
 - znotraj zaporedja naj ne bo območij, ki bi se lahko hibridizirala
 - T_m obeh oligonukleotidov naj bo čimbolj podobna
 - oligonukleotid naj nima regij z >70 % homologijo z matrično DNA izven koncev, med katerimi pomnožujemo
- Boljše uspehe dosežemo z 'vročim startom': polimerazo dodamo po predhodnem segretju ostalih komponent na >95 °C.

PCR: modifikacije

- Pomnožujemo običajno regije <2000 bp; za **daljše regije** obstajajo optimizirani postopki z drugačno sestavo pufra & daljšimi časi posameznih faz
- Glede na rezultate prvega pomnoževanja je pogosto potrebna **optimizacija**: spreminjanje temperatur, uporaba alternativnih polimeraz, dodatki v reakciji, ...načrtovanje novih oligonukleotidov.
- Pri **sestavi reakcijske mešanice** lahko spreminjamo koncentracijo MgCl₂, lahko pa dodamo formamid, glicerol ali DMSO do 5 % vol., kar povzroči spremembe v intenziteti posameznih produktov reakcije. Dodatek BSA do 0,8 mg/ml lahko poveča učinkovitost polimeraze.
- **Izbor polimeraze**: za analitske poskuse uporabljamo *Taq*-polimerazo. Če je natančnost pomnoževanja nujna, uporabljamo polimeraze z eksonukleazno aktivnostjo (kontrolno branje), npr. *Pfu*, *Vent*,...
- Nekatero polimeraze imajo razen kontrolnega branja izboljšano tudi temperaturno obstojnost, zato so primernejše za poskuse z veliko cikli.
- Pogostost napak pri pomnoževanju je:

Taq (*Thermus aquaticus*): 0,2-2,1 x 10⁻⁴ napak/bp

Klen*Taq* (*Thermus aquaticus*): 5,1 x 10⁻⁵ napak/bp (N-končna delecijaska mutanta polimeraze *Taq*)

Vent (*Thermococcus litoralis*): 2,4-5,7 x 10⁻⁵ napak/bp

Vent(exo-) (*Thermococcus litoralis*): 1,9 x 10⁻⁴ napak/bp

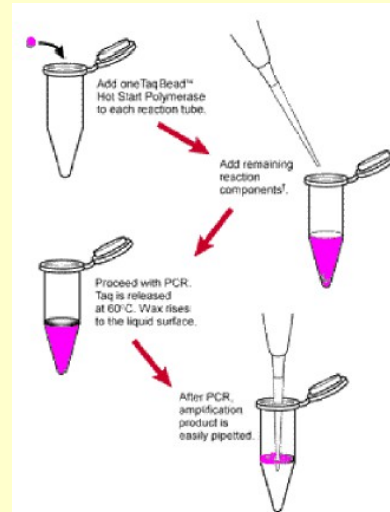
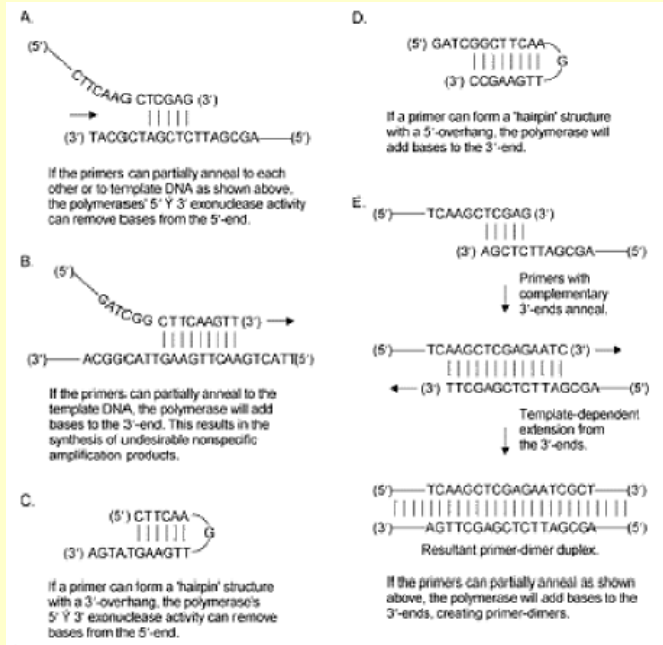
Pfu (*Pyrococcus furiosus*): 1,6 x 10⁻⁶ napak/bp

- Nevarno je predvsem, če do napake pride v prvih ciklih pomnoževanja.

Predvsem pri diagnostiki, forenzičnih analizah in delu s podobnimi zaporedji je treba preprečiti kontaminacijo s tujo DNA – posebni laboratoriji in oprema: ločene pipete, nastavki s filtri,...!

PCR: vroči start

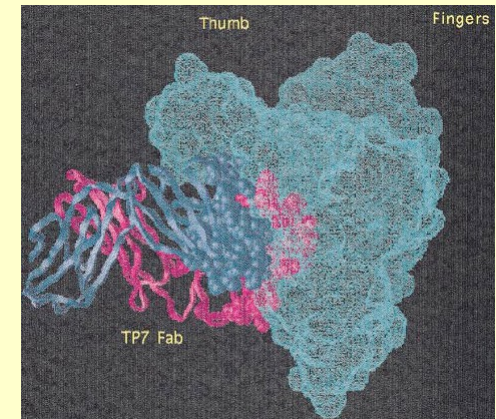
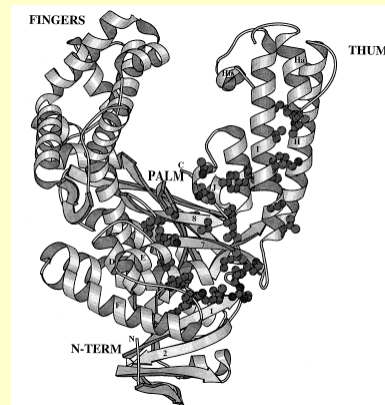
Neželene reakcije pri nižjih temperaturah => termolabilna inaktivacija polimeraze



Protein Engineering vol.11 no.2 pp.79–86, 1998

Structural studies on an inhibitory antibody against *Thermus aquaticus* DNA polymerase suggest mode of inhibition

R.Murali, M.Helmer-Citterich¹, D.J.Sharkey²,
 E.R.Scalice², J.L.Daiss², M.A.Sullivan² and
 H.M.Krishna Murthy^{3,4}



PCR: encimi (2)

Izboljšane polimeraze in predpripravljene mešanice reagentov:

- robustnost
- delujejo na še manjših količinah izhodne DNA
- velik razpon dolžin, ki jih lahko pomnožimo

npr. *TaqPlus Maxx* (Stratagene):

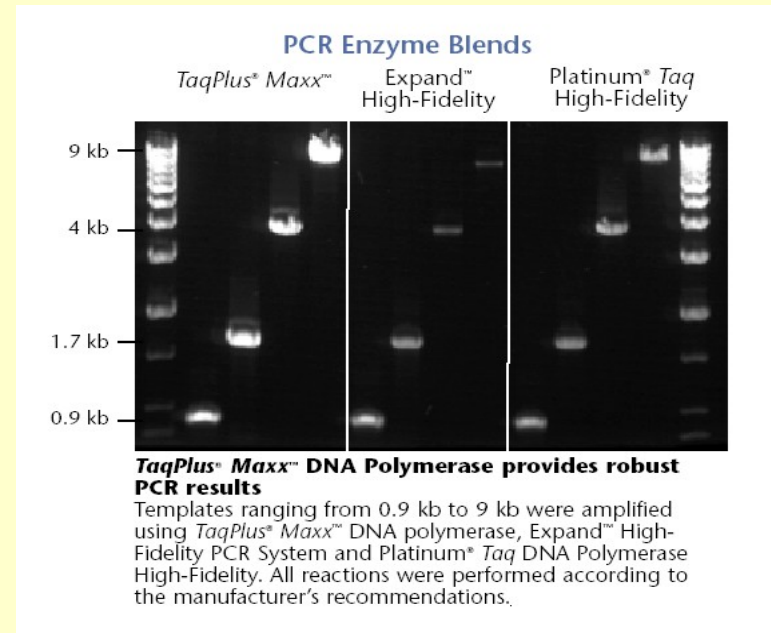
- mešanica DNA-polimeraz *Taq* in *Pfu*
- dodatek ojačevalnega faktorja (ArchaeMaxx)
- posebna sestava pufra

‘Ojačevalni faktor’ je v resnici dUTPaza

[dUTP + H₂O \rightleftharpoons dUMP + PPI], ki zavira efekt

‘zastupljanja PCR’. Zaradi visokih temperatur med

PCR namreč prihaja do deaminacije dCTP v dUTP, vgradnja dUTP pa zavira aktivnost polimeraz (arhejskih, ki imajo kontrolno branje - npr. *Pfu*).

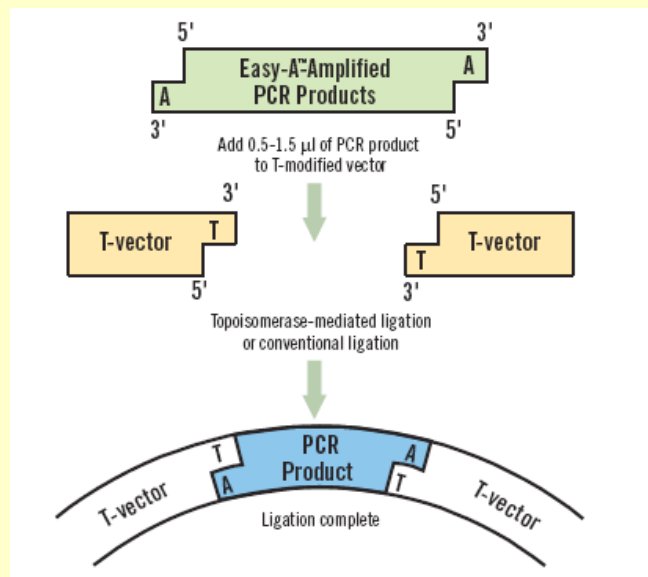


Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation

Holly H. Hogrefe*, Connie J. Hansen*, Bradley R. Scott, and Kirk B. Nielson

596-601 | PNAS | January 22, 2002 | vol. 99 | no. 2

Kloniranje produktov PCR

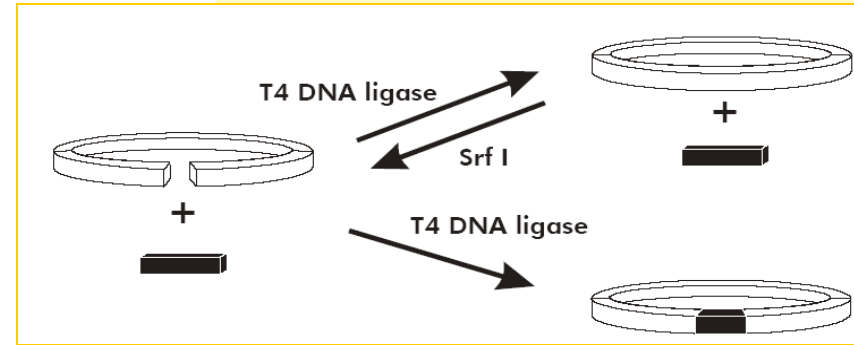
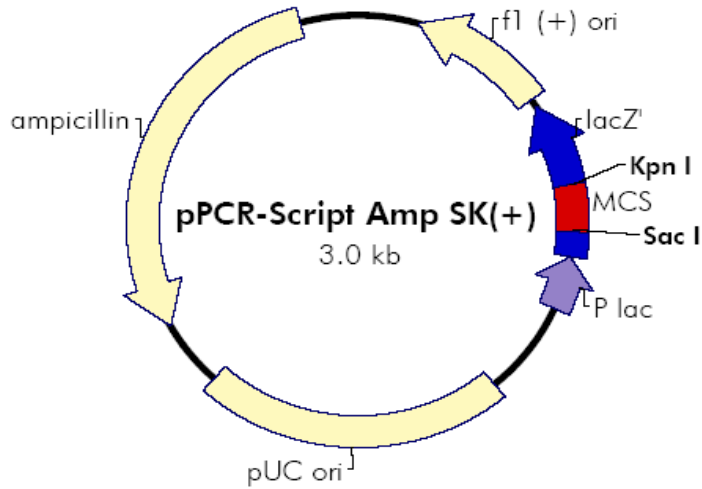


Nekatere polimeraze dodajajo na 3'-koncu dA - take produkte lahko vnašamo v vektorje, ki imajo na 3'-koncu dT. Če uporabimo polimerazo, ki ne dodaja dA, lahko po končani reakciji uporabimo tako polimerazo, ki jih dodaja in nastali produkt ligiramo v enak vektor kot zgoraj.

Lahko pa produkt preko topih koncev vstavimo v vektor, ki smo ga linearizirali z restriktazo, ki naredi tope konce. Če smo uporabili neustrezno polimerazo (in smo dobili podaljške dA), lahko konce 'obrusimo' z eksonukleazo, ki deluje na ssDNA.

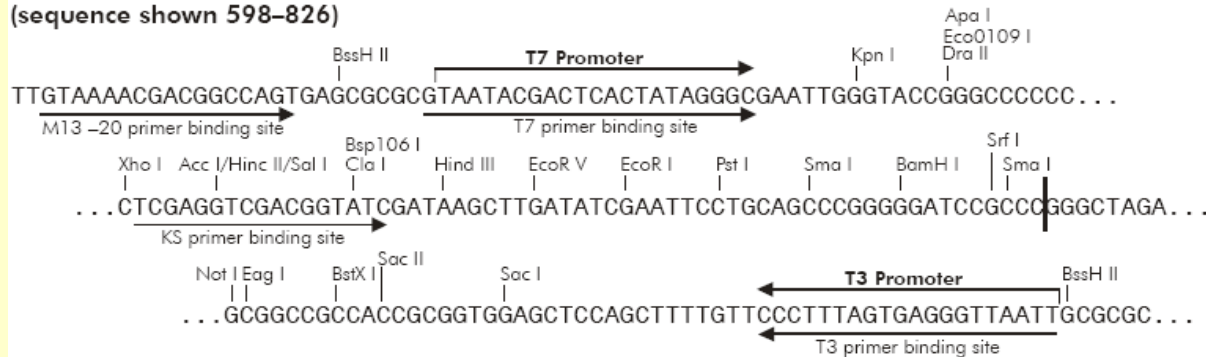
Kloniranje produktov PCR / 2

pPCR-Script™ Amp SK(+) Vector Map



SrfI: GCCC/GGGC

pPCR-Script Amp SK(+) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)



PCR: uporaba

- pomnoževanje fragmentov DNA z znanimi konci za nadaljnje analize
- diagnostika na osnovi DNA (zaznavanje prisotnosti povzročiteljev bolezni; mutacij, ki so značilne za določene bolezni)
- forenzične analize na osnovi sledov DNA
- paleontološke in arheološke raziskave
- taksonomija mikroorganizmov, živali, rastlin
- spreminjanje koncev fragmentov DNA (dodajanje restrikcijskih mest ipd.)
- mestno-specifična mutageneza
- zagotavljanje celovitosti cDNA in iskanje nadaljevanj mRNA na osnovi delnih zaporedij (*RACE: rapid amplification of cDNA ends*)

RACE

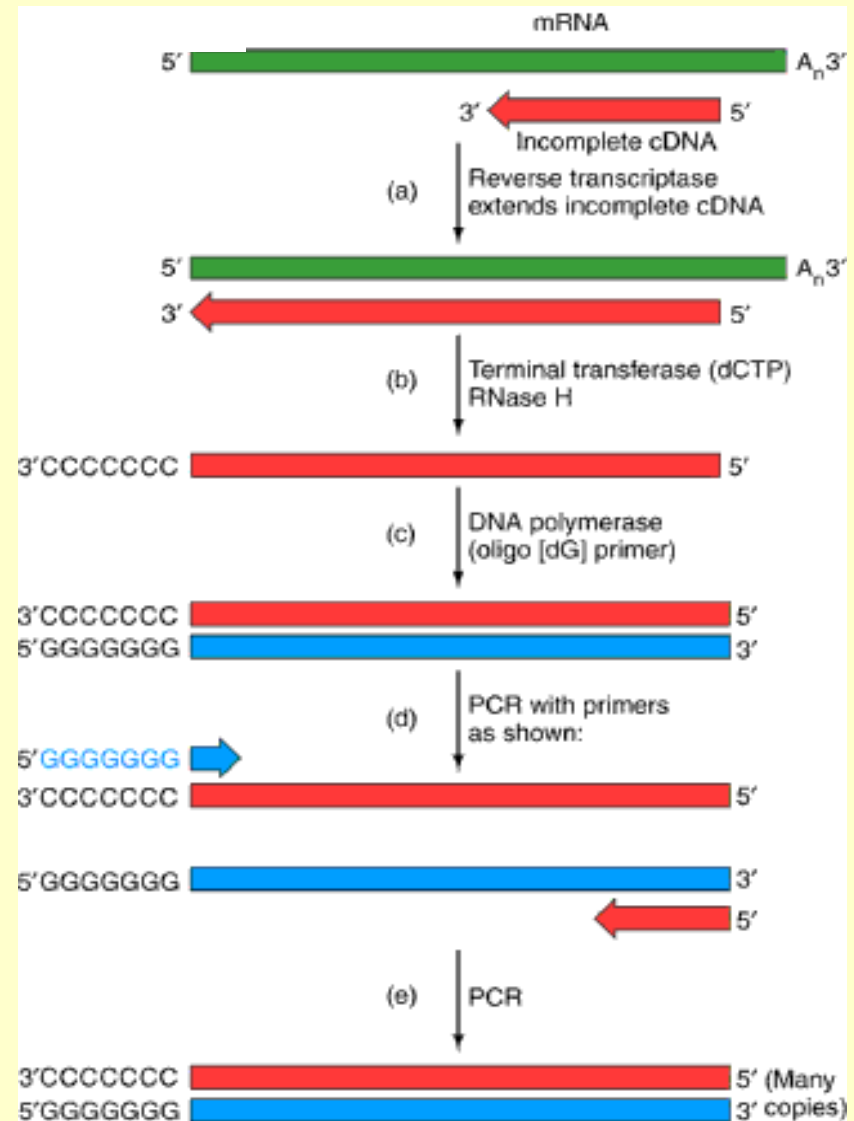
RACE = *hitro pomnoževanje koncev cDNA (rapid amplification of cDNA ends)*

Obstajata 5'-RACE in 3'-RACE, odvisno od tega, kateri (neokarakterizirani) konec cDNA želimo analizirati.

Enako imenujejo tudi postopek, s katerim specifično pomnožijo samo popolna zaporedja cDNA (ne pa fragmentov, nastalih zaradi poškodb mRNA, nečistoč v vzorcu in predčasno zaključene sinteze cDNA).

Pri **klasičnem 5'-RACE** poznamo 3'-konec zaporedja, ne vemo pa, kakšno je zaporedje na 5'-koncu. Pri sintezi 1. verige cDNA uporabimo začetni oligonukleotid, ki je komplementaren znanemu zaporedju 3'-konca.

Na 1. verigo vežemo npr. oligo-dC (terminalna transferaza), nato pa uporabimo oligo d-G kot začetni oligonukleotid na 5'-koncu.



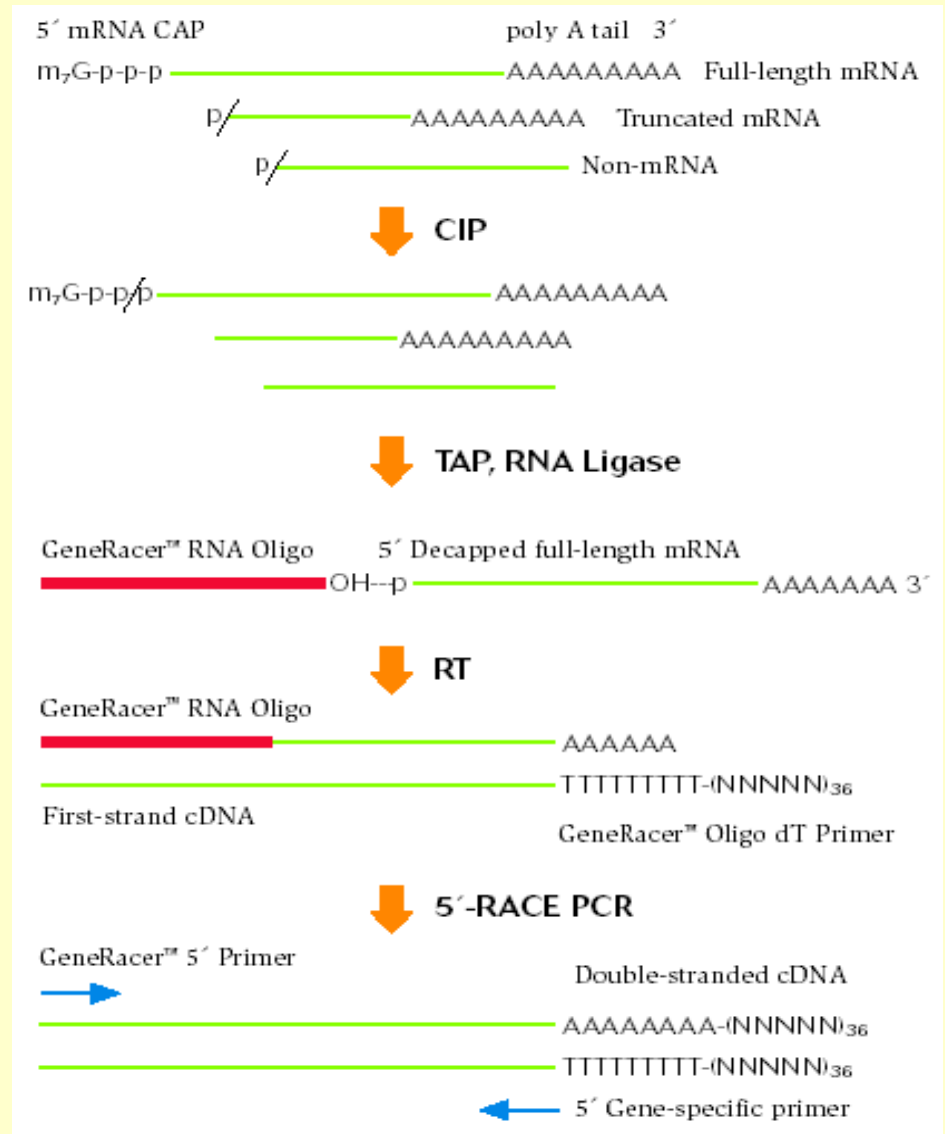
RACE: popolna zaporedja

Pomnožujemo samo zaporedja, ki izhajajo iz mRNA s kapo **IN** repom poli-A.

Uporabimo CIP (fosfatazo iz telečjih prebavil), ki odcepi končne fosfate z nezaščitenih RNA, nato TAP (alkalno fosfatazo iz tobaka), ki odstrani kapo, a pusti 1 fosfatno skupino na mRNA, nato pa pripravimo na 5'-konec RNA-oligonukleotid z znanim zaporedjem.

Z reverzno transkriptazo sintetiziramo 1. verigo cDNA, ki je podaljšana na 5'-koncu, vendar nam to omogoča, da nato izvedemo sintezo 2. verige s pomočjo PCR ob uporabi oligonukleotida, pripravljenega po zaporedju RNA-podaljška, ki smo ga uvedli pred tem.

Na 3'-koncu uporabimo začetni oligonukleotid oligo-dT ali takega, ki je specifičen za preiskovani zapis.



RT-PCR

obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo

Purpose: Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is similar to the PCR except it allows amplification of small amounts of ribonucleic acid (RNA). RT-PCR is used to detect viruses with an RNA genome and to detect RNA transcripts.

Method:



FIG. 1. RNA template. Prior to initiating reverse transcription the template RNA must be isolated from the sample to be tested. This figure shows a polyadenylated mRNA.

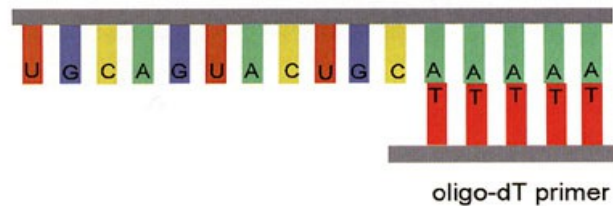


FIG. 2. Priming for reverse transcription. To generate cDNA using the enzyme reverse transcriptase (RT), a primer is annealed to the template RNA. The primer can be gene specific primers, random primers or oligo-dT primers for mRNA. In this example, oligo-dT primers are used to initiate cDNA synthesis from mRNA.

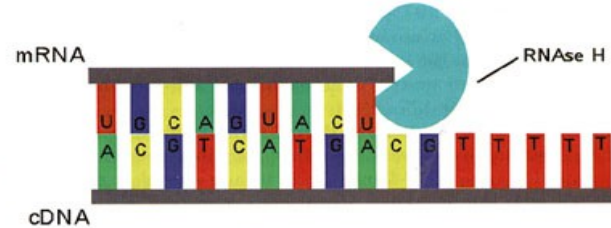
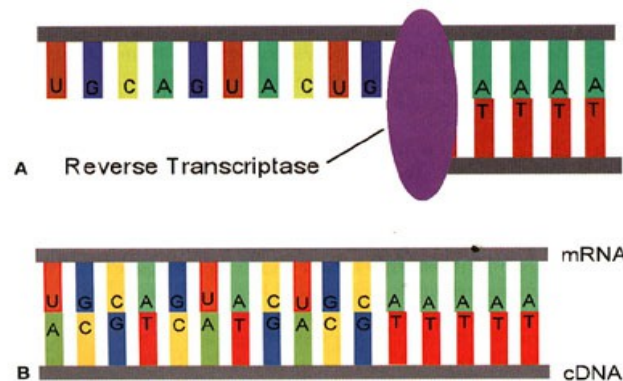


FIG. 4. Removal of RNA. The template strand of RNA is removed by treatment with RNase H. The cDNA can now be used for amplification by PCR.

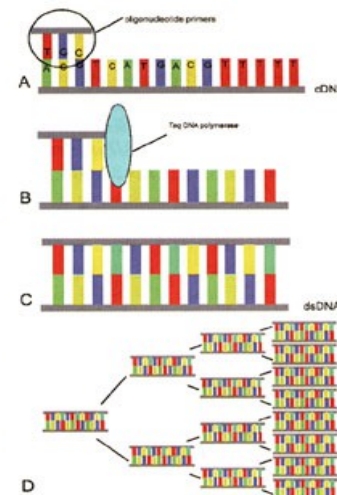


FIG. 5. The PCR reaction. The oligonucleotide primer is allowed to anneal to the template cDNA (A). *Taq* polymerase adds complementary nucleotides beginning at the primer annealing site (B). The resultant product is a double stranded cDNA (C). The three step process of denaturation, primer annealing and extension are repeated to yield a detectable PCR product (D). The product can be visualized on an ethidium bromide stained agarose gel following electrophoresis.

Alternative Techniques: Northern blot analysis, RNase Protection Assay

Advantages: 1) RT-PCR has high sensitivity due to exponential amplification of the template RNA. 2) RT-PCR is very specific when using gene specific primers in the synthesis of cDNA. 3) The RT-PCR technique can be completed in one to two working days providing rapid results.

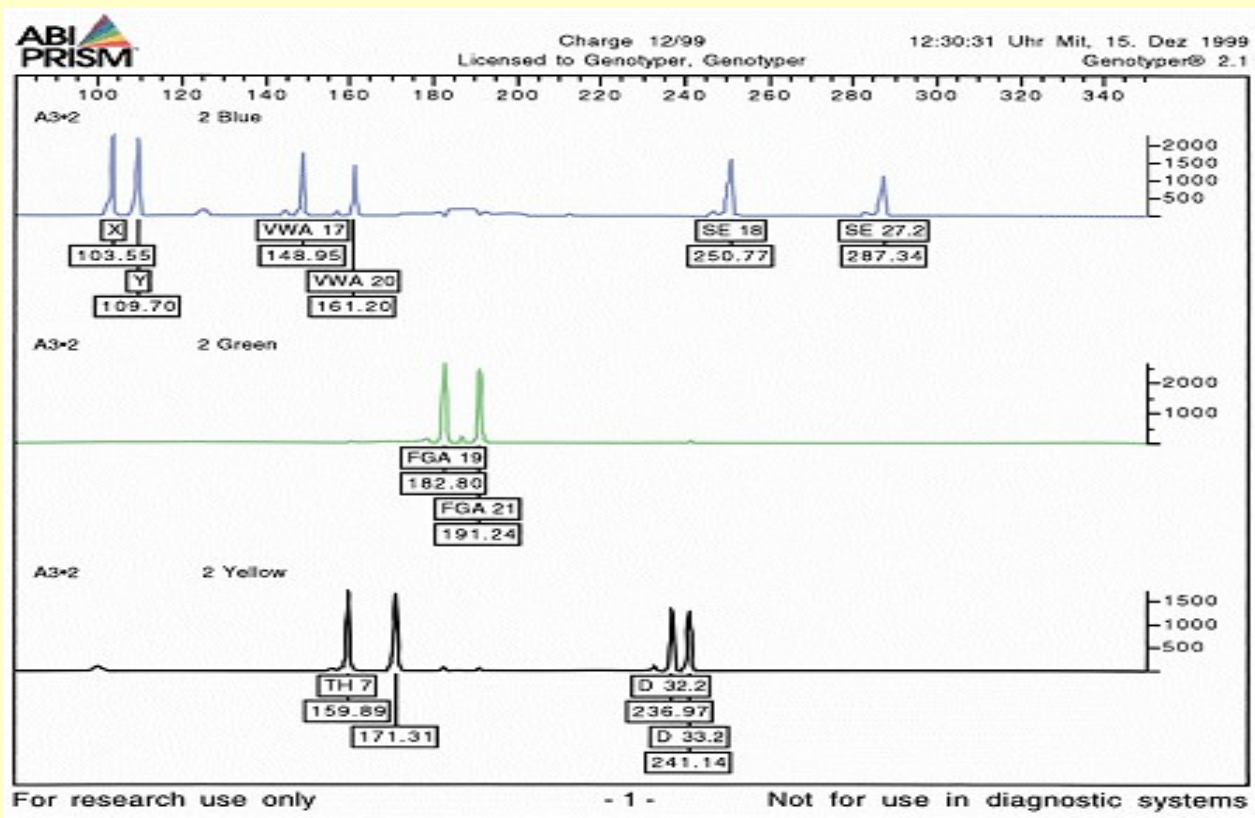
Disadvantages: 1) Similar to those seen with PCR. 2) RT-PCR detects transcripts, not functional protein.

Hkratni PCR

Pomnoževanje več fragmentov v 1 reakciji:

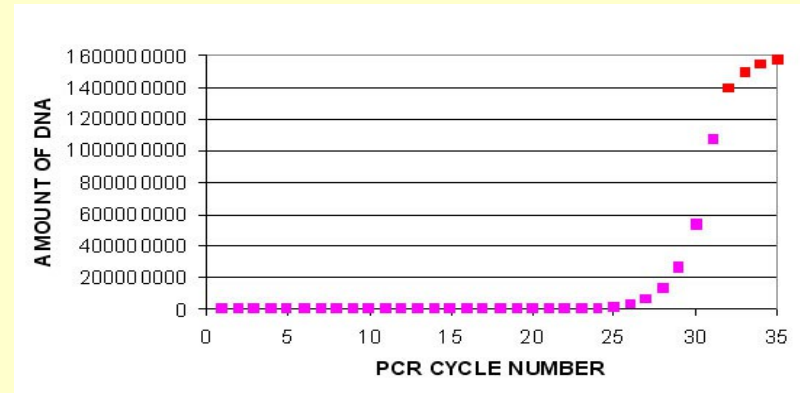
- produkti morajo imeti različne dolžine; *ali*
- produkti morajo biti različno označeni

Detekcija produktov: z gelsko ali kapilarno elektroforezo.

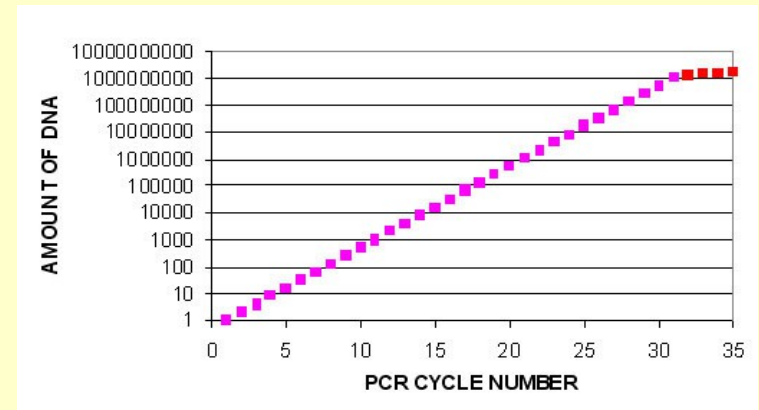


CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000

http://www.med.sc.edu:85/pcr/Nature_Of_PCR.gif



http://www.med.sc.edu:85/pcr/PCR_Reaction_graph1.jpg



http://www.med.sc.edu:85/pcr/PCR_Reaction_graph2.jpg

Kvantitativni PCR

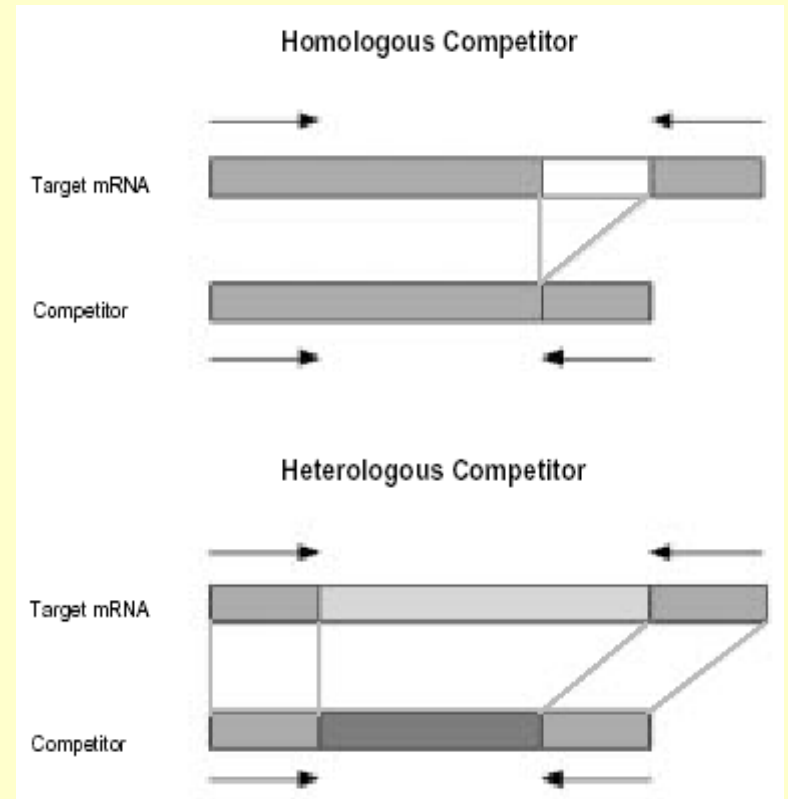
Količina produkta bi se morala z vsakim ciklom podvojiti, zato je mogoče določiti, koliko tarčne DNA je bilo prisotne v začetnem vzorcu. Ker pa reakcija ne poteče vedno kvantitativno, rabimo za reakcijo interni standard, kontrolno DNA, ki naj bi imela podobne lastnosti (dolžina, enaki začetni oligonukleotidi, čimbolj podobna sestava baz): *kompetitivno zaporedje*. Kontrolno reakcijo izvedemo pri enakih pogojih kot 'pravo' in ker smo v reakcijo dali znano količino kompetitivnega zaporedja, lahko določimo učinkovitost reakcije.

Kontrolno zaporedje je lahko v reakciji hkrati s tarčnim, vendar mora imeti v tem primeru produkt *drugačno dolžino*, da ju lahko razlikujemo.

Če imata podobno dolžino, pripravimo kontrolo tako, da ima vneseno mutacijo, ki uvede prepoznavno *mesto za restriktazo* - ko je reakcija končana, cepimo in analiziramo.

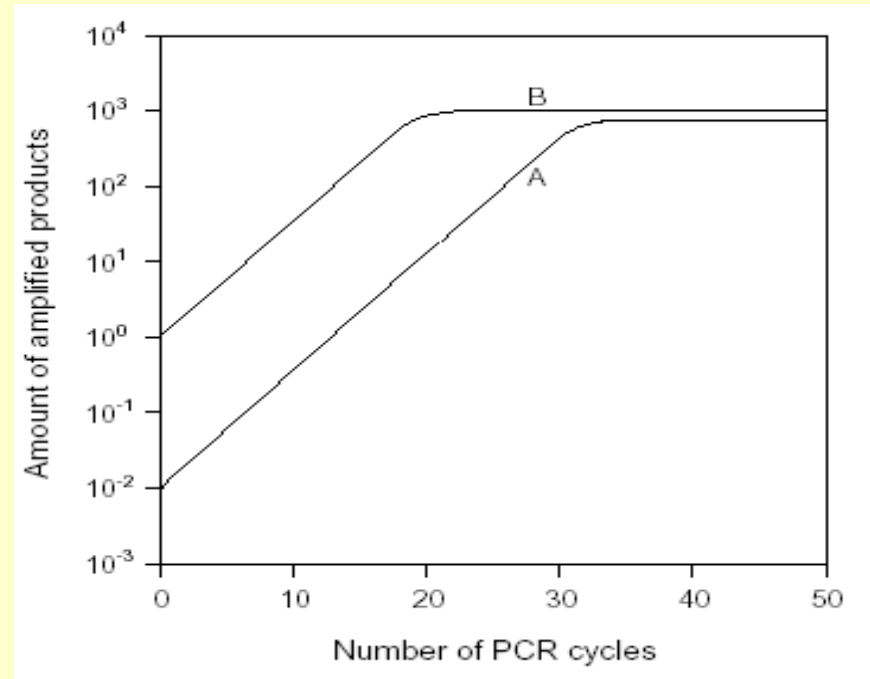
Problemi:

- kje dobiti najustreznejšo kontrolno matrico;
- pristop deluje samo znotraj določenega območja koncentracij tarčnih DNA;
- nevarnost kontaminacij s kontrolnim zaporedjem;
- zanesljivost določanja koncentracije končnega produkta.



Kvantitativni PCR / 2

Običajno izvedemo do ~20 ciklov, ko reakcija še poteka eksponentno. Pri več ciklih reakcije dosežejo plato (~10⁸ kopij produkta). Število ciklov je odvisno od začetnega števila kopij - izvedemo lahko tudi več kot 20 ciklov, če je začetnega materiala malo - sicer tudi težko detektiramo [3.200-51.200 kopij: 20 ciklov, 200-3.200 kopij: 25 ciklov; 10-40 kopij: 30 ciklov].



Ocenjevanje količin poteka po elektroforezi in barvanju produkta PCR (agarozna gelska elektroforeza - etidijev bromid ali PAGE - barvanje s srebrom), če pa so produkti označeni, lahko detektiramo signal na filmu ali s števci (izotopske ali fluorescenčne oznake) oz. v encimski reakciji (biotin/streptavidin, konjugiran z alkalno fosfatazo ali hrenovo peroksidazo). Signale na membrani ali filmu kvantificiramo denzitometrično. **Danes večinoma uporabljamo metodo z zaznavanjem koncentracije produkta v realnem času preko merjenja fluorescence.**

Kvantitativni PCR / 3

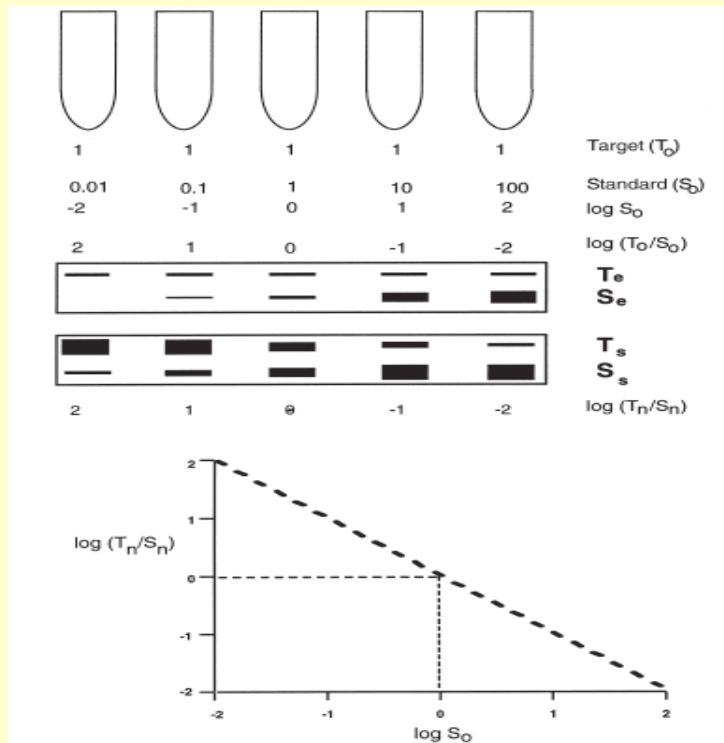


Fig. 1 Idealized overview of a competitive PCR experiment. A series of PCR tubes are spiked with the same but unknown copy number (in the example 1 relative unit) of target sequence (T_0) and with a dilution series in the example from 0.01 to 100 of a known copy number of the standard sequence (S_0). Schematic gel patterns of the PCR products are shown, obtained at the end of the exponential phase (T_e and S_e) and after saturation of the PCR (T_s and S_s). The graph shows the standard curve constructed from the quantified gel bands. The value of T_0 is equal to S_0 at the point of equivalence, i.e., where $\log (T_n/S_n) = 0$.

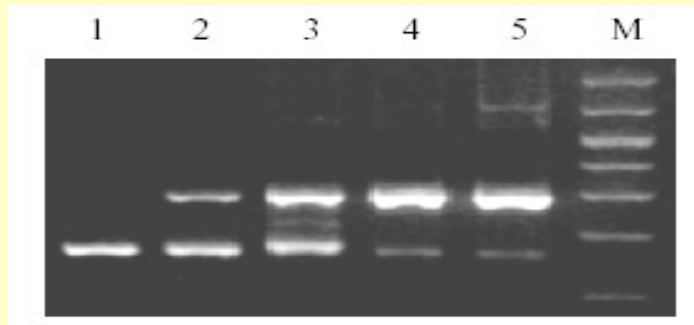


Fig.2. Quantitative analysis of TGF- β gene by QC-PCR. 1: PCR with 10^5 copies of TGF- β gene. 2: PCR with 10^5 copies of TGF- β gene plus 2×10^4 copies of TGF- β PCR Competitor. 3: PCR with 10^5 copies of TGF- β gene plus 2×10^5 copies of TGF- β PCR Competitor. 4: PCR with 10^5 copies of TGF- β gene plus 2×10^6 copies of TGF- β PCR Competitor. 5: PCR with 10^5 copies of TGF- β gene plus 2×10^7 copies of TGF- β PCR Competitor.

PCR v realnem času

Količino nastalega produkta določamo hkrati, ko reakcija še teče.

Uporabimo lahko različna fluorescenčna barvila ali označene sonde.

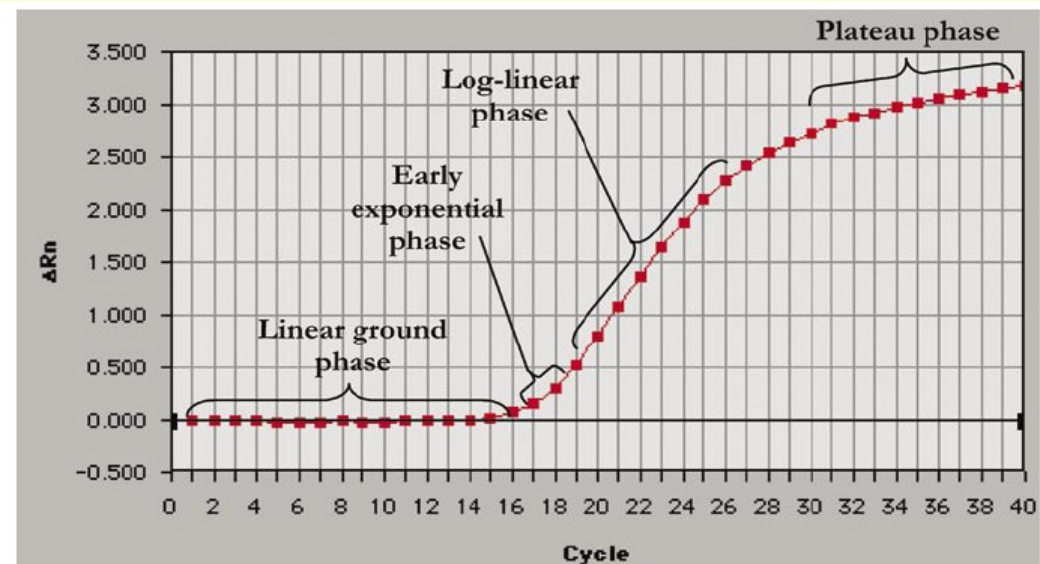
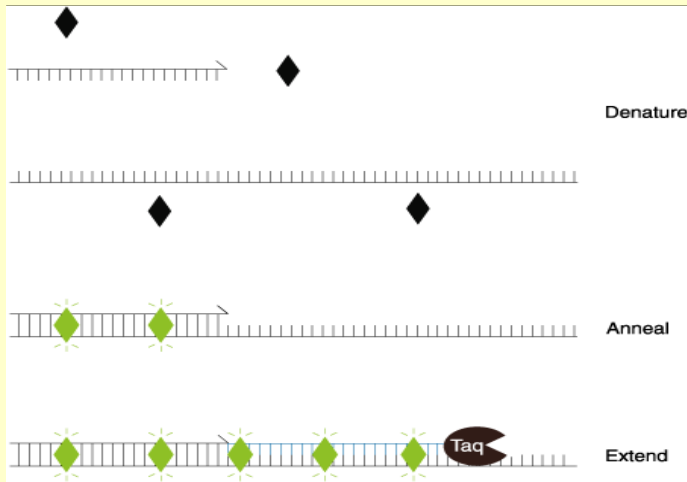


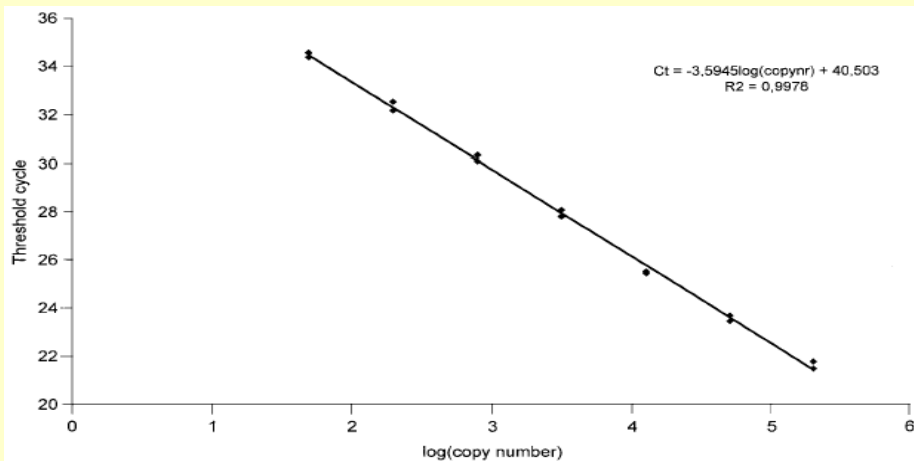
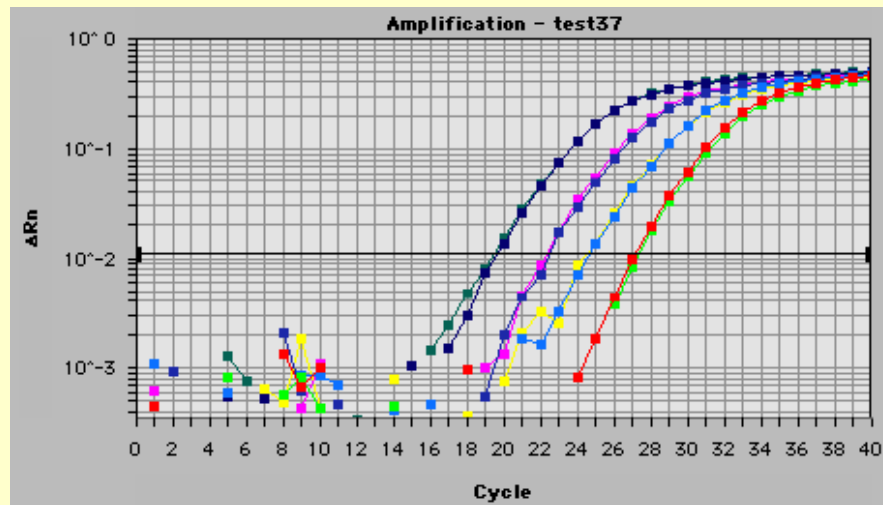
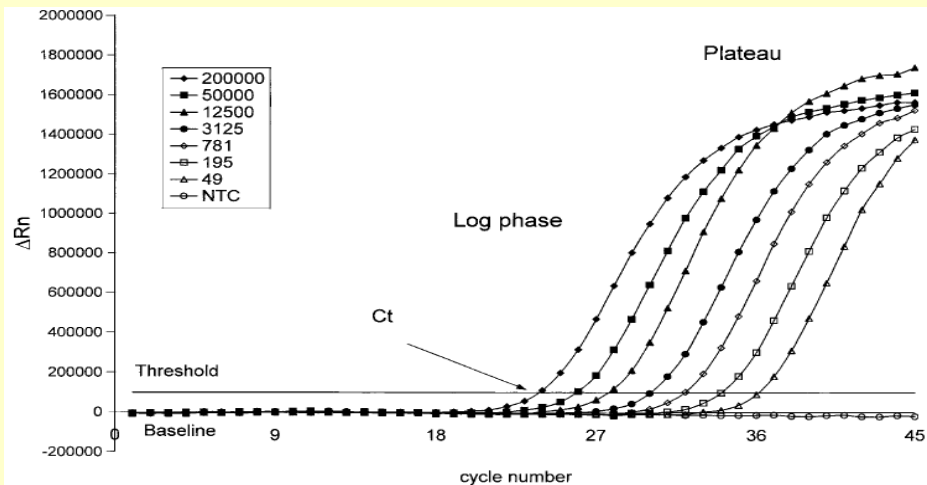
Figure 2. Phases of the PCR amplification curve. The PCR amplification curve charts the accumulation of fluorescent emission at each reaction cycle. The curve can be broken into four different phases: the linear ground, early exponential, log-linear, and plateau phases. Data gathered from these phases are important for calculating background signal, cycle threshold (C_t), and amplification efficiency. R_n is the intensity of fluorescent emission of the reporter dye divided by the intensity of fluorescent emission of the passive dye (a reference dye incorporated into the PCR master mix to control for differences in master mix volume). ΔR_n is calculated as the difference in R_n values of a sample and either no template control or background, and thus represents the magnitude of signal generated during PCR. This graph was generated with ABI PRISM SDS version 1.9 software (Applied Biosystems).

Real-time PCR for mRNA quantitation

Marisa L. Wong and Juan F. Medrano

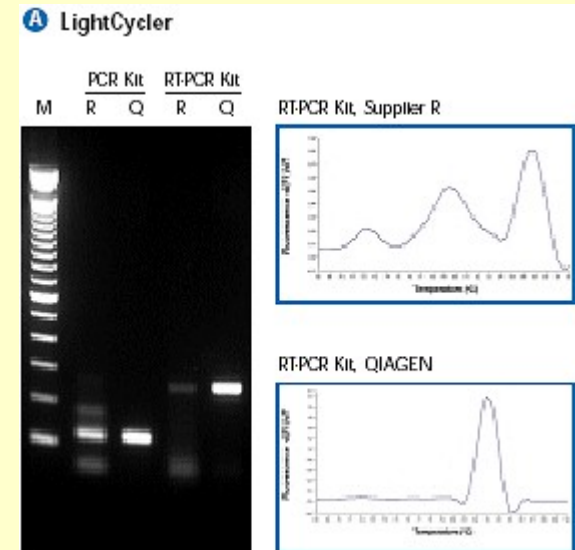
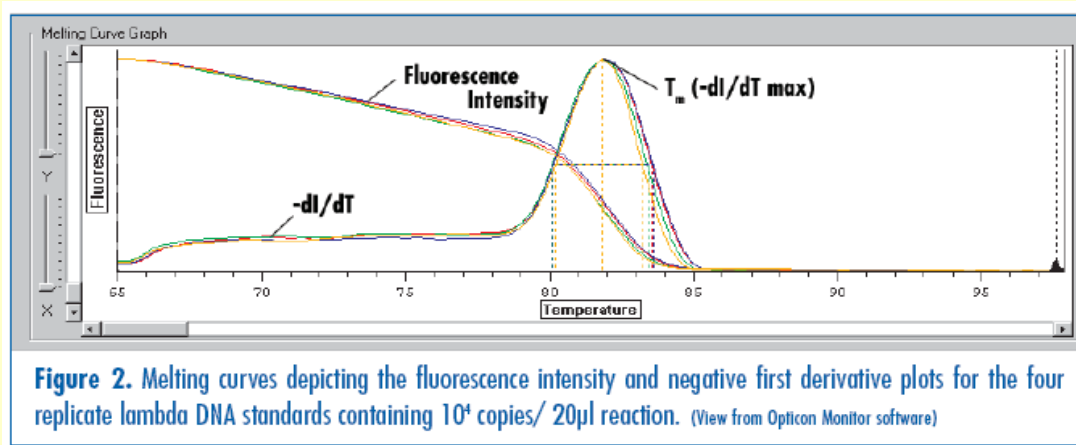
BioTechniques 39:75-85 (July 2005)

PCR v realnem času / 2

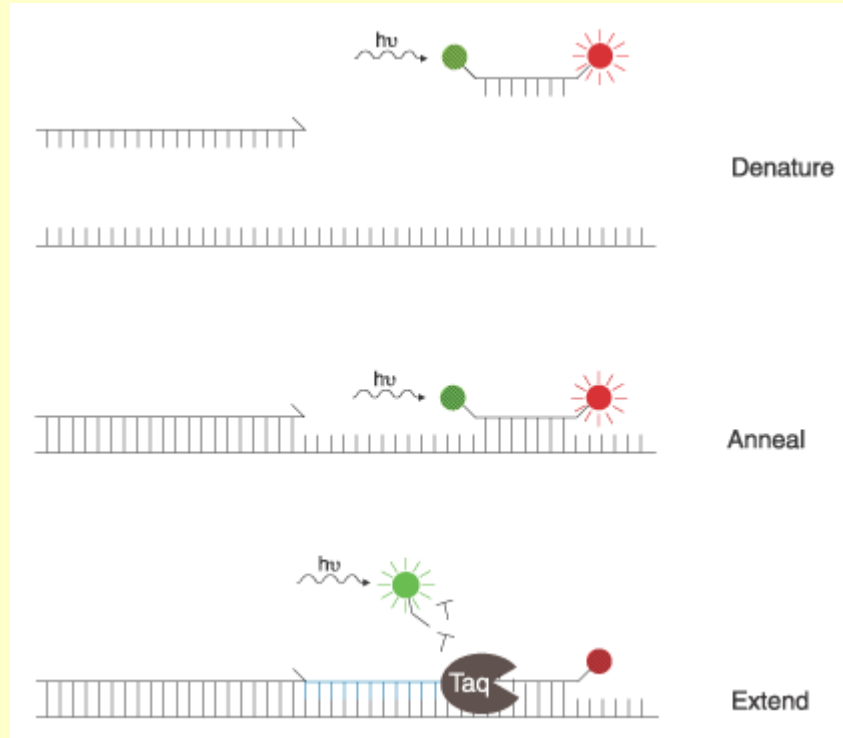


Analiza talilne krivulje

Talilna krivulja predstavlja podatek o homogenosti produkta PCR, ne da bi za to morali izvesti elektroforezo.



PCR v realnem času: hidrolitične sonde (Sistem TaqMan)

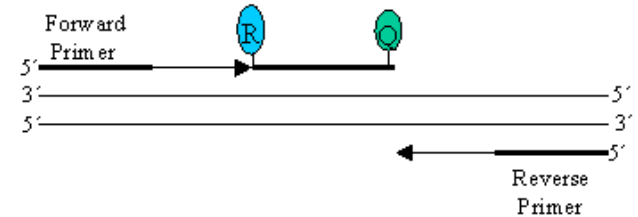


Postopek pri uporabi hidrolitičnih sond:

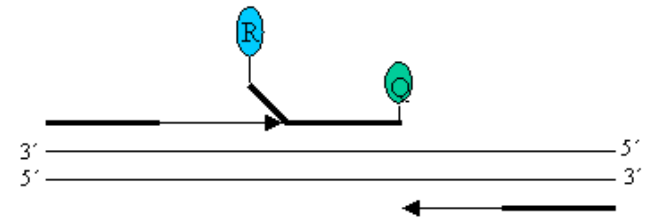
- (1) prileganje začetnih oligonukleotidov in sonde
- (2) podaljševanje začetnega oligonukleotida in odpiranje sonde
- (3) razgradnja sonde zaradi 5'→3'-eksonukleazne aktivnosti *Taq*-polimeraze
- (4) emisija fluorescence z reporterskega barvila (R) po ločbi od molekule dušilca (Q)

<http://www.ruhr-uni-bochum.de/homeexpneu/projekte/irmgards-projekt.html>

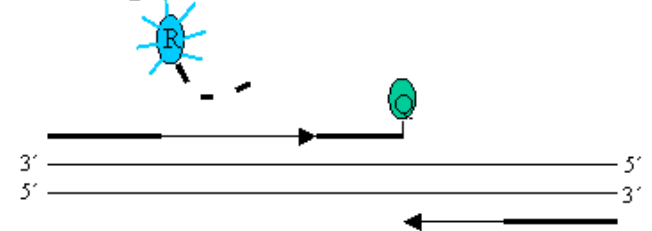
Polymerization



Strand Displacement



Cleavage



Polymerization Completed



<http://www.ukl.uni-freiburg.de/core-facility/taqman/taqindex.html>

PCR-rt: Sistem TaqMan MGB

Structure of Taqman MGB Probe

R : Reporter dye (4-dye set)
NFQ : Non-fluorescent quencher
MGB : Minor Groove Binder (T_m enhancer)

Taqman PCR Chemistry 1

Denaturation → Annealing

• Polymerization
A fluorescent report (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends respectively of a TaqMan probe

Taqman PCR Chemistry 3

• Cleavage
During each cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.

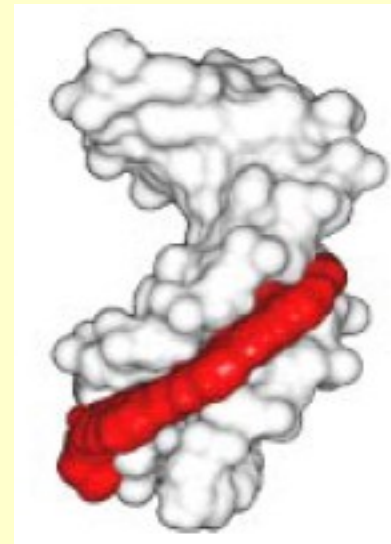
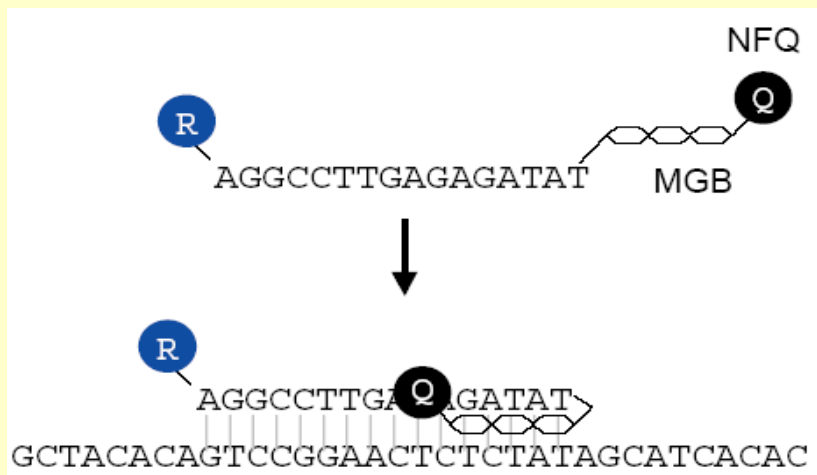
Taqman PCR Chemistry 2

• Strand displacement
When the probe is intact the report dye emission is quenched.

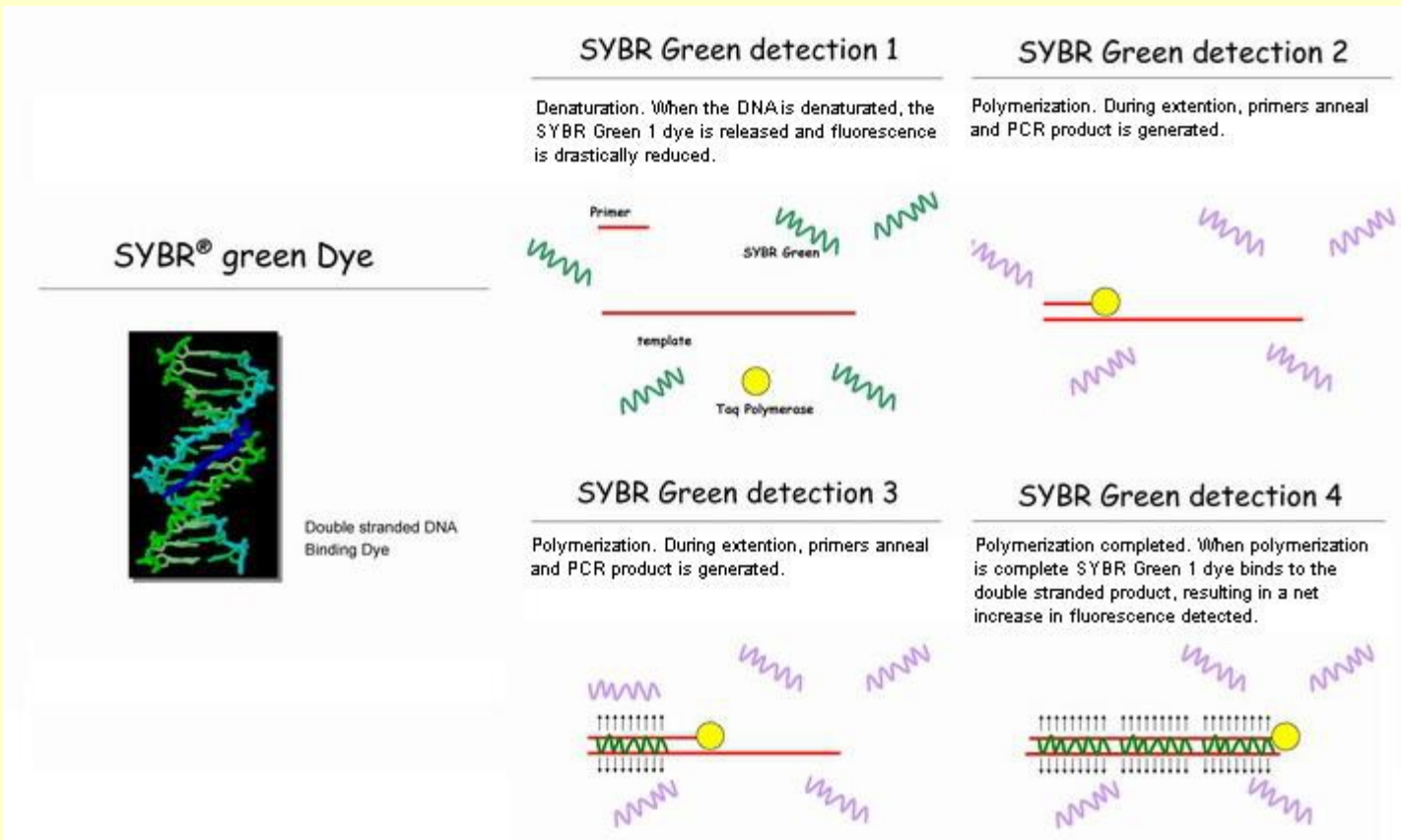
Taqman PCR Chemistry 4

• Polymerization completed
Polymerization completed. Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.

sonda ima nefluorescenčno dušilno barvilo + skupino za vezavo v mali žleb (MGB)
→ lažje razlikovanje spektrov in večja stabilnost dupleksa



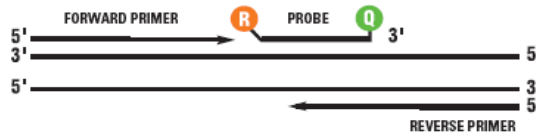
PCR v realnem času: vgradnja barvil



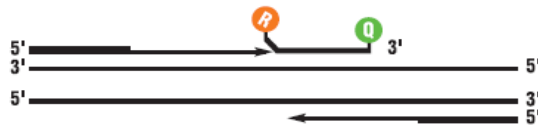
PCR-rt: primerjava detekcijskih sistemov

TaqMan® Probe-Based Assay Chemistry

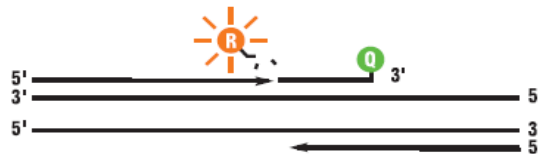
1. Polymerization: A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



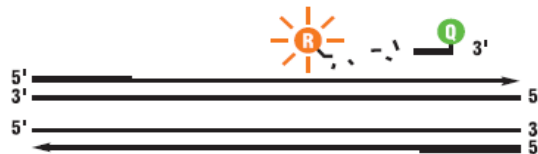
2. Strand displacement: When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. Cleavage: During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. Polymerization completed: Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.

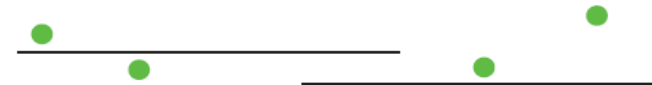


SYBR® Green I Dye Assay Chemistry

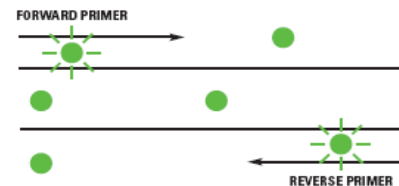
1. Reaction setup: The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



2. Denaturation: When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



3. Polymerization: During extension, primers anneal and PCR product is generated.



4. Polymerization completed: When polymerization is complete, SYBR® Green I Dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the 7900HT system.

