

ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

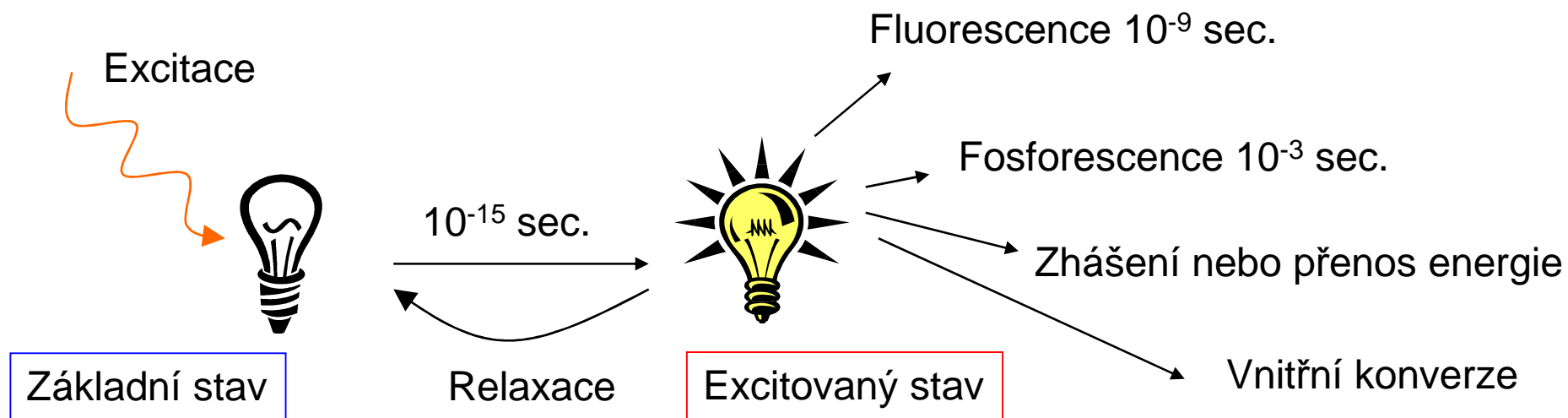


IV. Interkalační barviva a sondy

Fluorofor

(F)

Fluorofor – většinou heterocyklická nebo polyaromatická sloučenina, při přechodu z excitovaného do základního stavu fluoreskuje

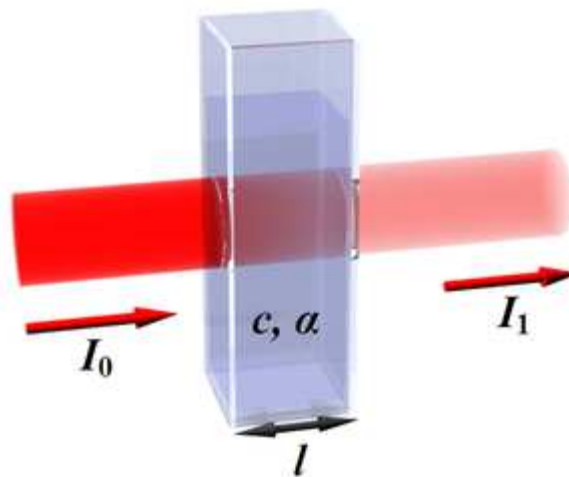


Fluorofor

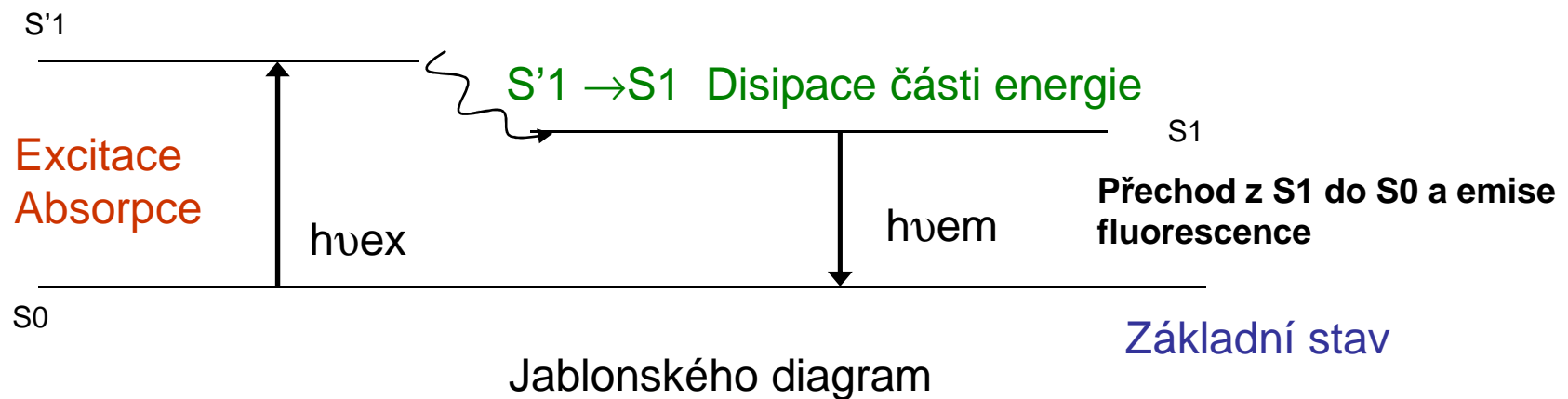
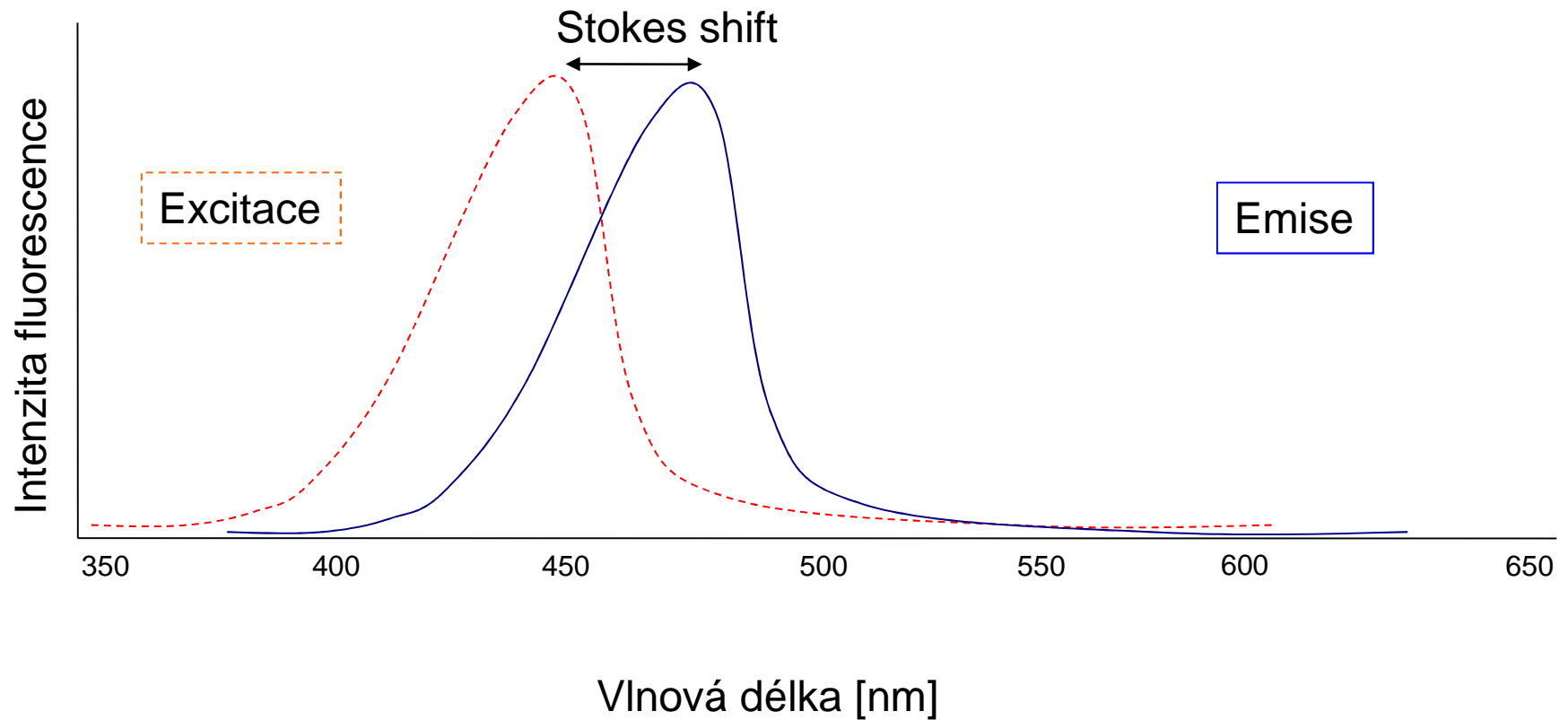
(F)

Fluorescenční kvantový výtěžek (Fluorescence quantum yield, QY) – poměr emitovaných fotonů k absorbovaným.

Molární extinkční (absorpční) **koeficient** – jak silně daná látka absorbuje světlo o dané vlnové délce $A = \epsilon c l$



Stokesův posun; Jablonského diagram



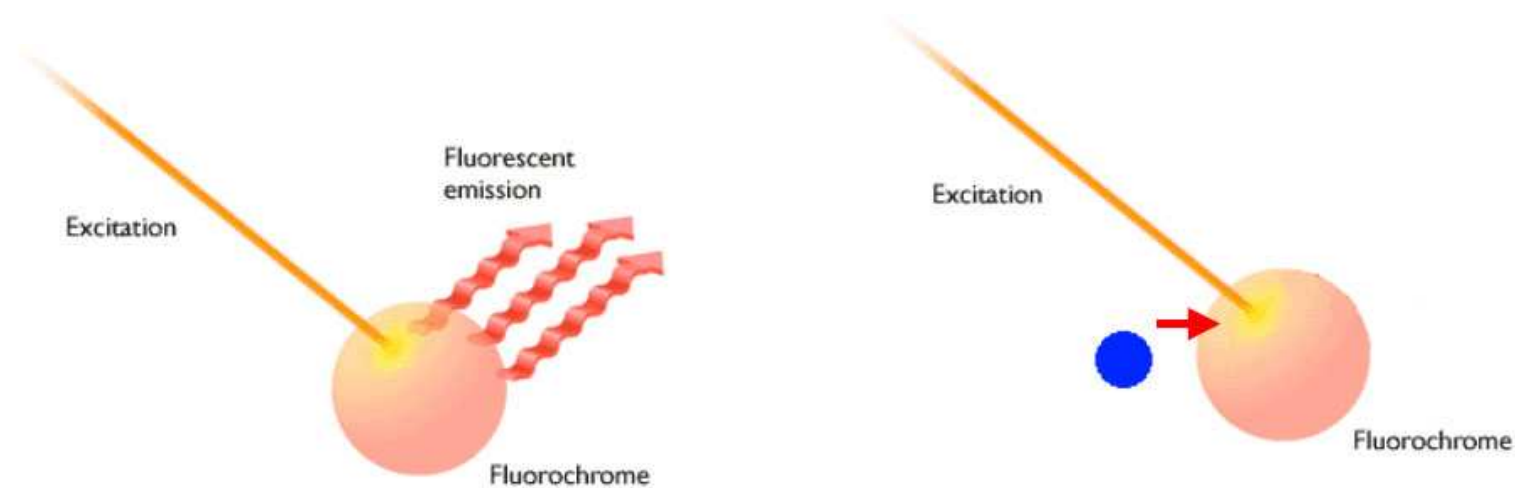
Quenchers – Zhášeeče (Q)

Zhášení – quenching

- Redukce QY v daném fluorescenčním ději
- Absorpce nebo disipace energie – návrat fluoroforu do základního stavu bez emise fluorescence

Proximální zhášení – kolizní quenching

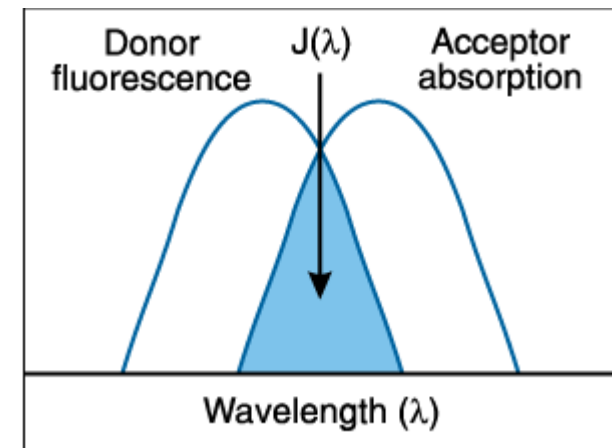
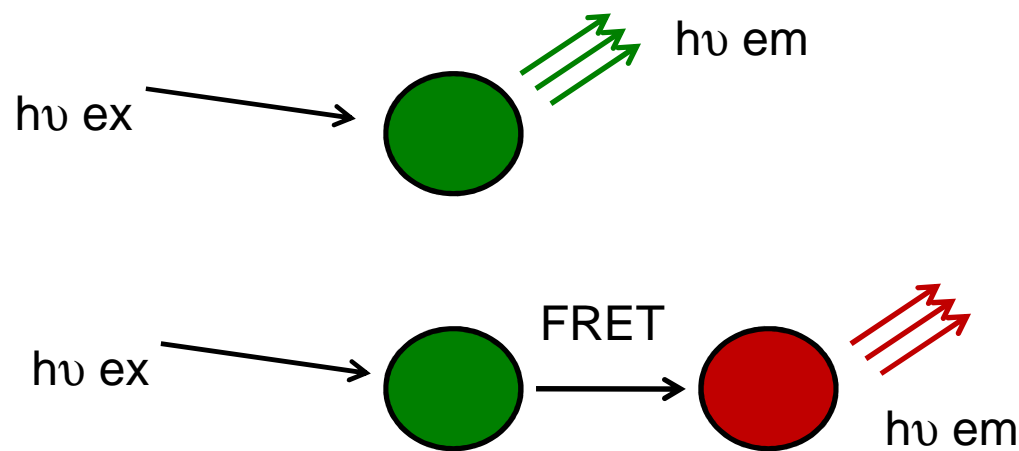
- Fluorofor velmi blízko zhášeeče – přenos energie z F na Q ve formě tepla – nenastane žádná fluorescence
- Proximální zhášeeče: molekulární kyslík, Cu^{2+} , Mn^{2+} , NO_3^-



Fluorescenční rezonanční energetický transfer (FRET)

Základ řady experimentálních metod v biochemii a molekulární biologii

- Přenos energie z donorové na blízkou akceptorovou molekulu, donor se vrací do základního stavu bez vyzáření fluorescence; akceptor vyzáří energii ve formě fluorescence
- Emisní a absorpční spektra se musí překrývat
- Főrsterova vzdálenost obv. 100\AA
- Energie, kterou donor vyzáří nebo předá musí být dostatečná k excitaci akceptoru
- Příklad: FAM-TAMRA, DABCYL, BHQ



Specifická vs. nespecifická detekce amplikonu

Nespecifická

- Interkalační barviva
- Quencher Labeled Primers
- LUX Primers
- Amplifluor

Specifická

Lineární sondy

- ResonSense, Angler Probes
- HyBeacons
- Light-up probes
- TaqMan sondy (Hydrolyzační sondy)
- Lanthanidové sondy
- Hybridizační sondy
- Eclipse
- Displacement Hybridization/Complex Probes

Strukturní sondy

- Molekulární majáky
- Scorpions
- Cyclicons
- Nanoparticle Probes
- Konjugované polymery a PNA sondy

Nespecifická detekce množství amplikonu

- Interkalační barviva
- Quencher labeled Primer
 - LUX Primers
 - Amplifluor

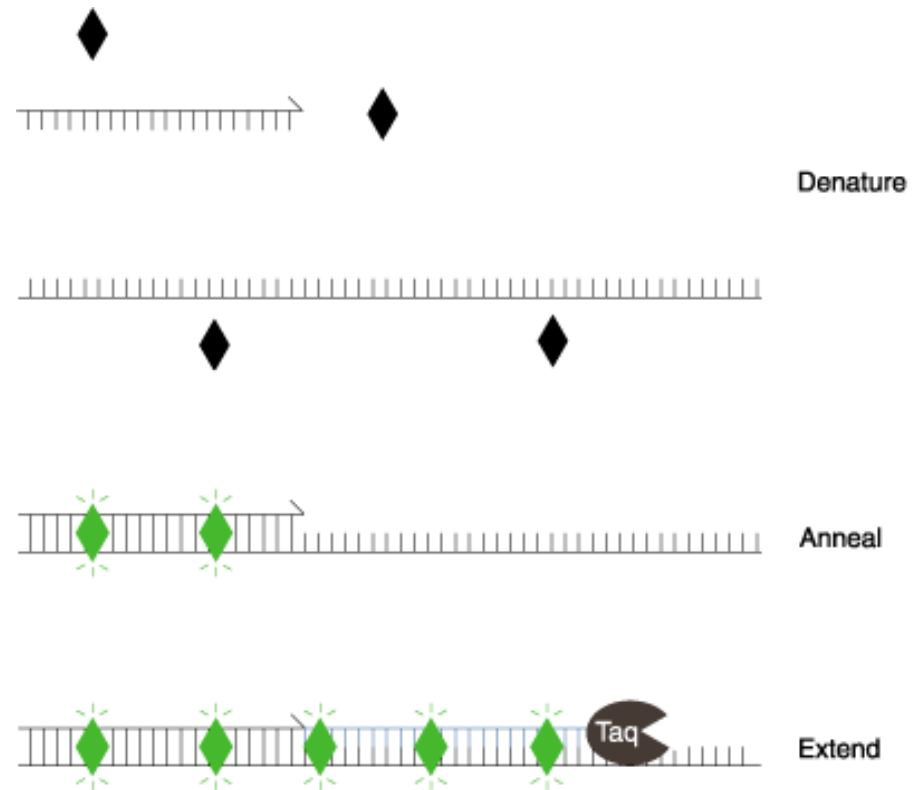
Interkalační barviva

Reverzibilní vazba na dsDNA

- Relativně levné
- Citlivé

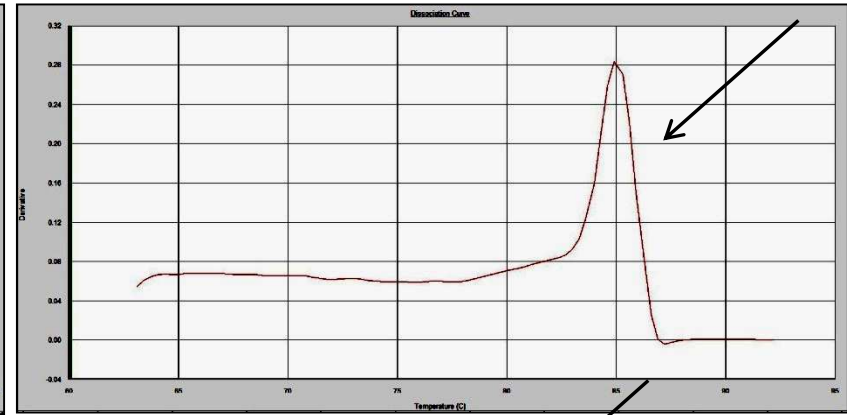
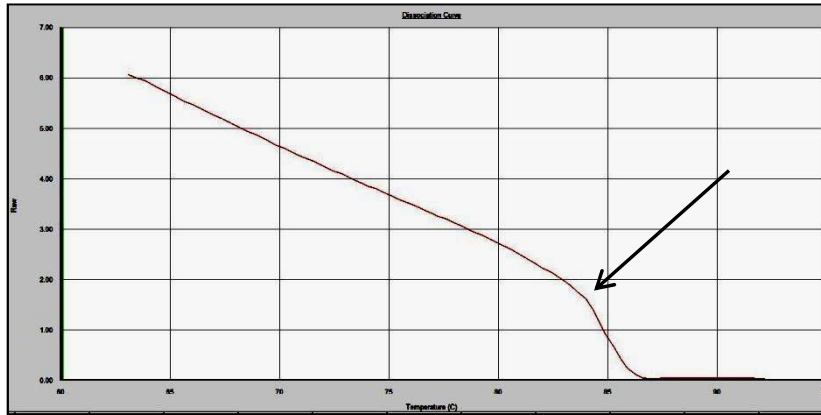
Nevýhody:

- Některá barviva se váží na ssDNA
- Nespecifická vazba na jakoukoli dsDNA (primer dimery, „mispriming“, atd.)
- Pečlivý návrh primerů a extenzivní validace, disociační křivky

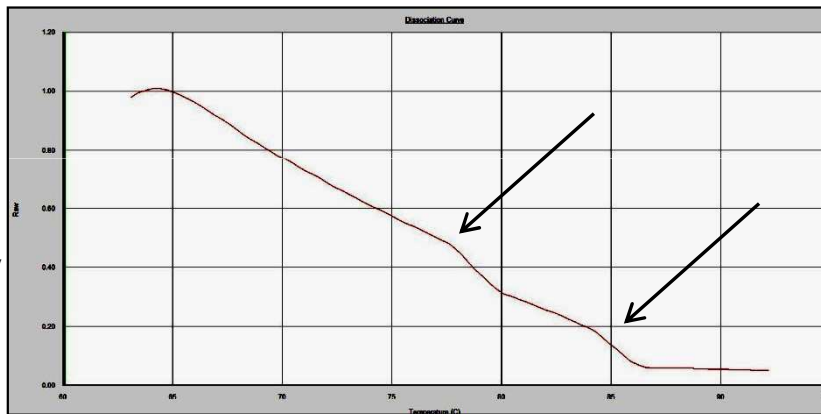


Disociační křivky – melting curves

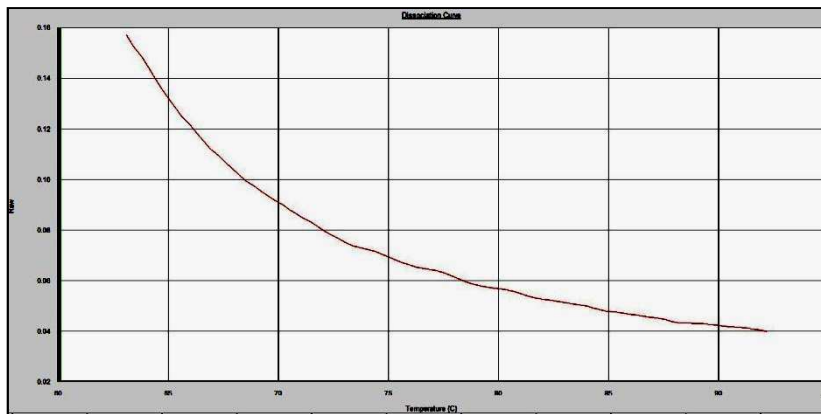
1 amplikon



2 amplikony



Žádná
amplifikace



Interkalační barviva

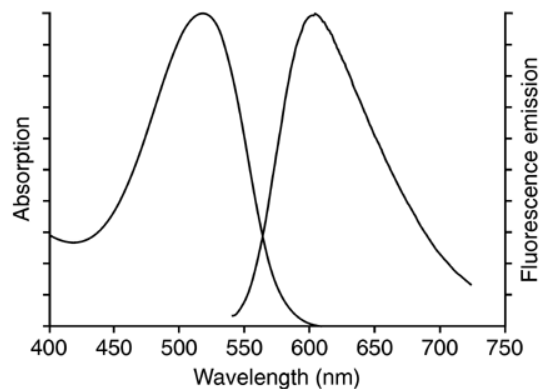
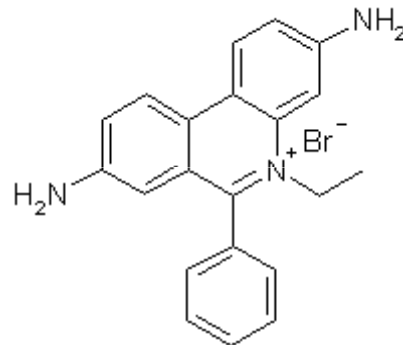
Ethidium bromid

30ti násobný nárůst fluorescence
po vazbě na dsDNA

Nepravidelná vazba na DNA

$Q_y = 0,15$

Mutagen ☠



SYBR Green

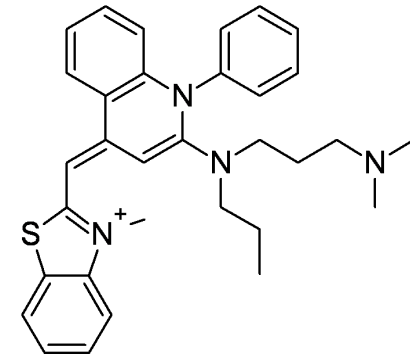
SYBR Green II

SYBR Gold

YO (Oxazole Yellow)

TO (Thiazole Orange)

PG (PicoGreen)

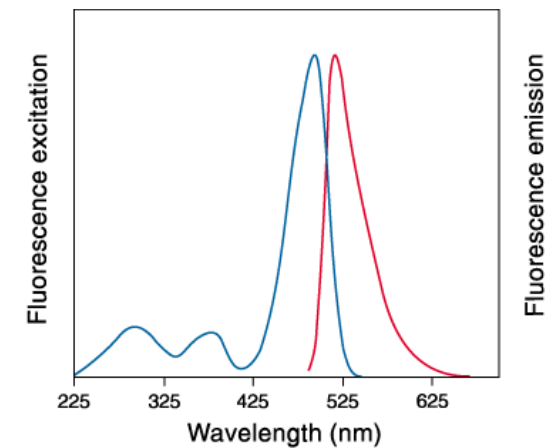


>1000 násobný nárůst
fluorescence

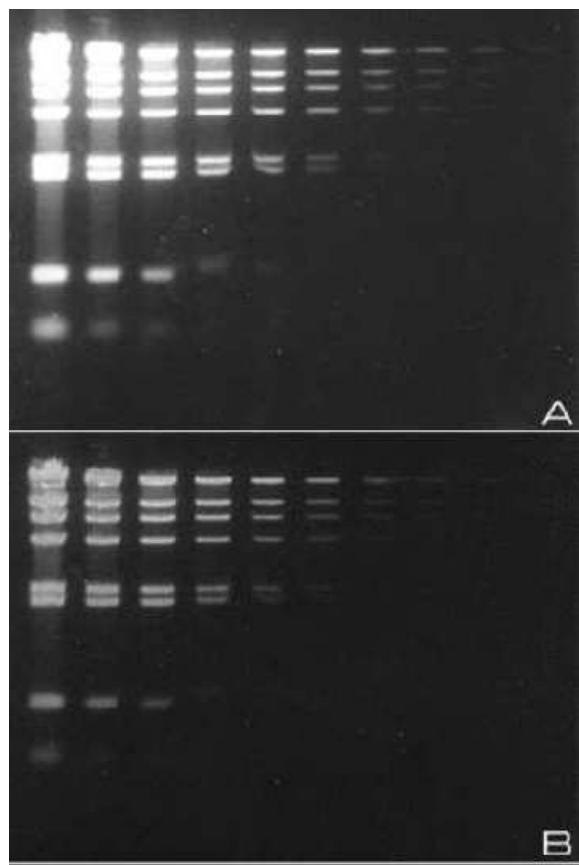
Rovnoměrná vazba na DNA

$Q_y = 0,60$

Bezpečný



Interkalační barviva



A) SYBR Green

B) Ethidium bromide

Použití dvou odlišných molekul

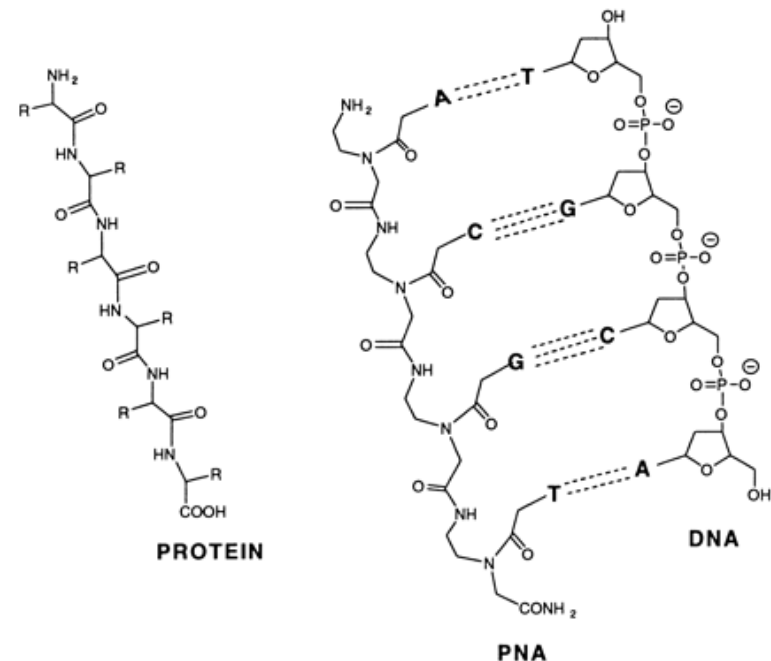
PNA (peptide nucleic acid) označenou na C konci zhášedčem DABCYL (Q-PNA)

+

Primer se specifickou sekvencí na 3' konci a fluoroforem a PNA komplementární sekvencí na 5' konci

$T_m \text{ primer/amplikon} > T_m \text{ Q-PNA/primer} > T_a \text{ primer}$

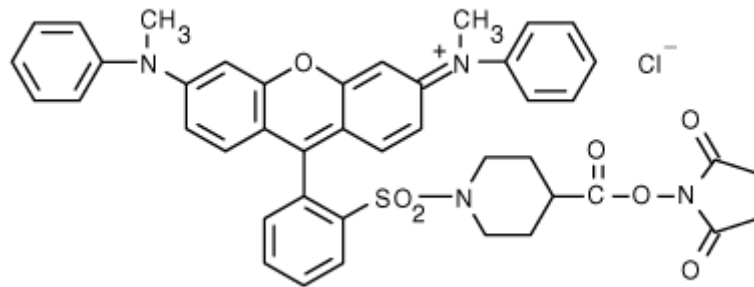
1. Nadbytek primerů je zhášen při T_a
2. Fluorescence měřená během T_a udává množství primerů hybridizovaných k templátu /amplikonu plus množství fluorescenčně označených dsDNA amplikonů
3. Real-time i end point



Primer >25bp se zhášečem na 5' konci (QSY 7, QSY 9), **Molecular Probes-Invitrogen**

QSY 7/QSY9 zháší fluorescenci interkalačního barviva (SYBR), které se může vázat na primer dimery nebo primer samotný
Po prodloužení řetězce není již fluorofor zhášený

Redukce pozadí/ nespecifických signálů



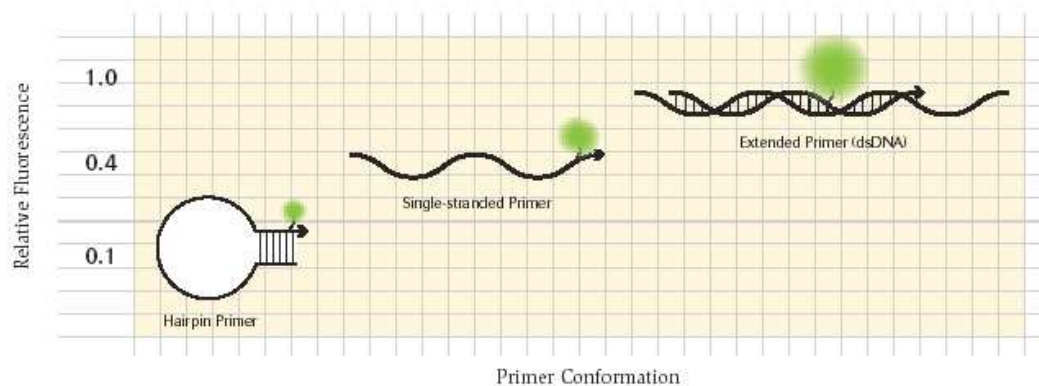
QSY 7

LUX Primery

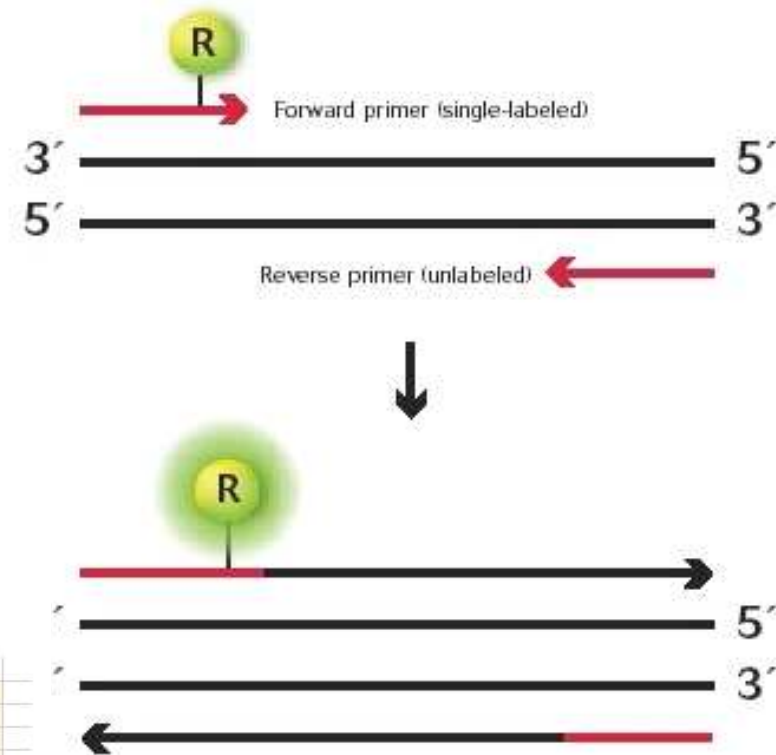
Light Upon eXtension – **Invitrogen**

- Reverse nebo forward primer označený fluoroforem.
- Ve vlásenkové konformaci zhasený. Druhý primer je neoznačený.
- Po inkorporaci do dsDNA je zhasení uvolněno a emitována fluorescence

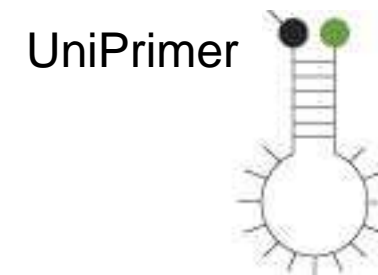
Figure 2 - The LUX™ (Light Upon eXtension) effect



LUX™ detection



- 3 typy primerů - Dva specifické pro amplifikovanou sekvenci a jeden tzv. UniPrimer
- Jeden ze specifických primerů obsahuje univerzální (Z) sekvenci na 5' konci, druhý není nijak modifikovaný
- 3'konec UniPrimeru je komplementární k Z sekvenci prvního primeru, zbytek směrem k 5'konci tvoří vlásenku označenou fluoroforem (FAM) a zhášedčem (DABSYL)
- výhoda: každá PCR může být snadno adaptována na Amplifluor PCR, začleněním Z sekvence na 5'konec jednoho z primerů
- možnost použít dva různě značené UniPrimery s konci komplementárními k odlišným Z sekvencím – SNP analýza/alelická diskriminace



Amplifluor

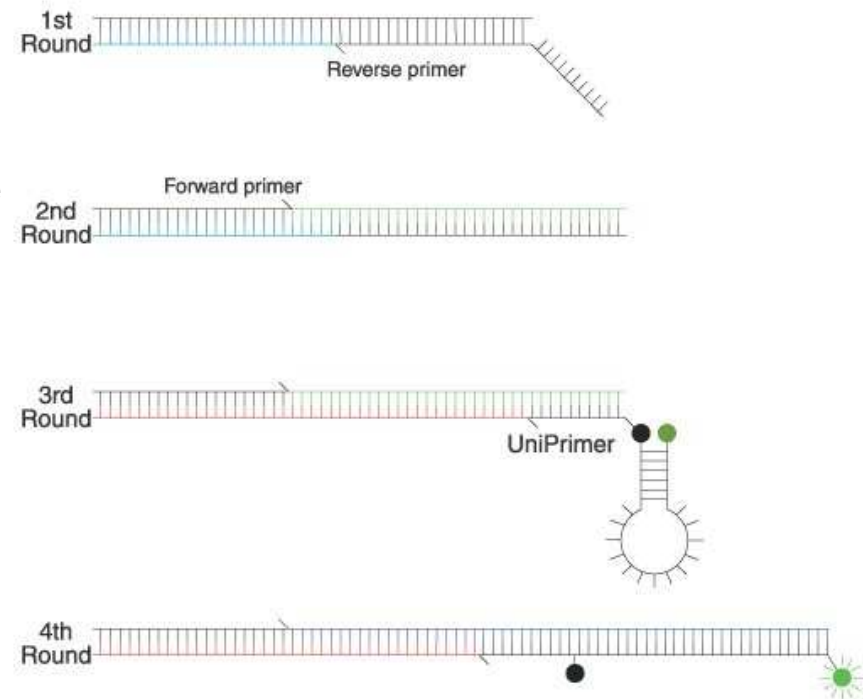
Cyklus 1: primer se Z sekvencí je inkorporovaný do nově syntetizovaného řetězce

Cyklus 2: polymerace z druhého primeru inkorporuje sekvenci komplementární k Z do druhého řetězce

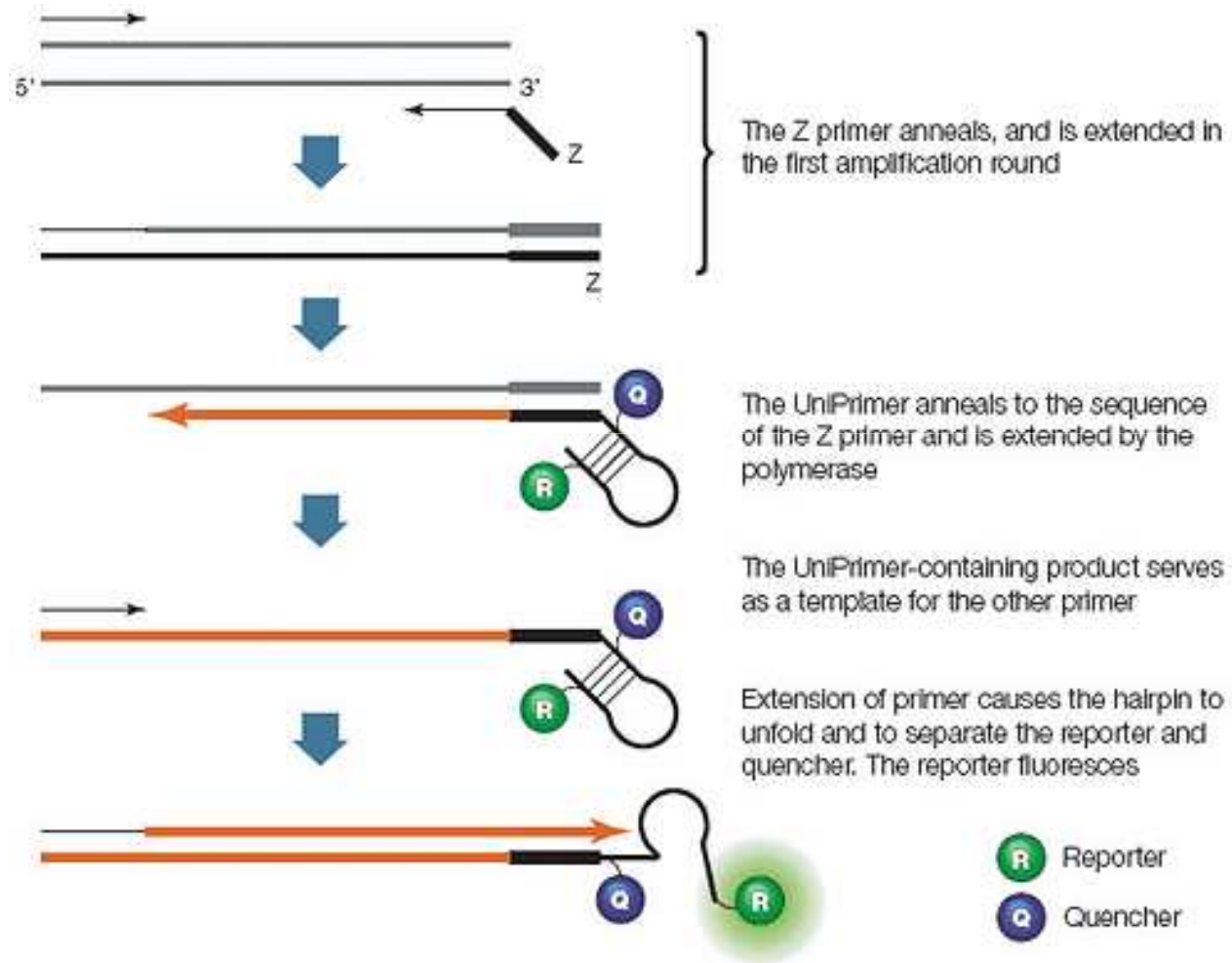
Cyklus 3: konec Uniprimera se komplementárně váže k Z sekvenci, poskytuje volnou OH skupinu polymeráze a je sám začleněn do nově vznikajícího řetězce – uvolňuje se vlásenková konformace

Cyklus 4: polymeráza uvolňuje vlásenkovou strukturu a celý Uniprimer se stává součástí nového řetězce. Zhášec je oddělen od fluoroforu a dochází k emisi fluorescence.

- Od tohoto cyklu je Uniprimer inkorporován do amplikonu
- Fluorescenční signál je generován v každém PCR cyklu (je snímán během annealingu) a koreluje s množstvím amplikonu.
- Nezačleněný Uniprimer tvoří vlásenku a nefluoreskuje.



Amplifluor



Specifická detekce množství amplikonu

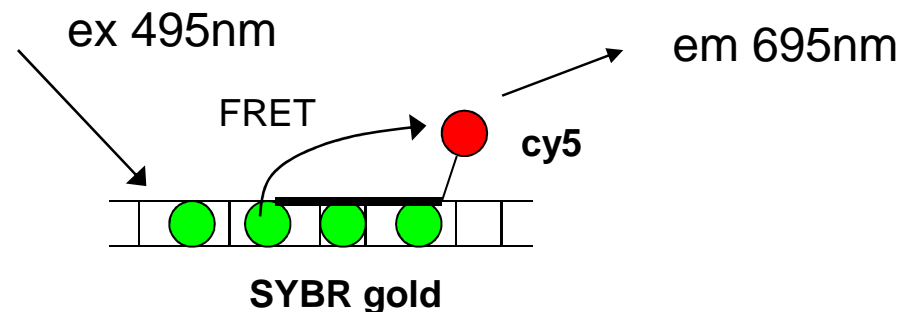
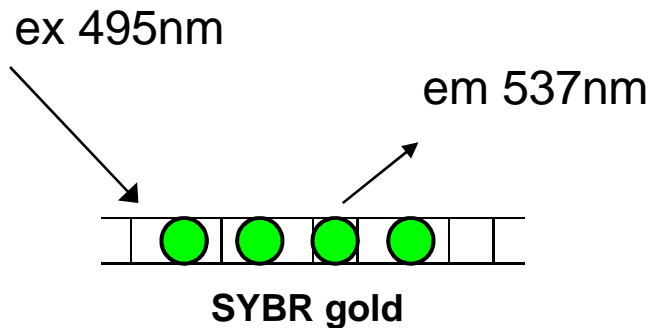
Lineární sondy

- ResonSense, Angler Probes
 - HyBeacons
 - Light-up probes
- TaqMan sondy (Hydrolyzační sondy)
 - Lanthanidové sondy
 - Hybridizační sondy
 - Eclipse
- Displacement Hybridization/Complex Probes

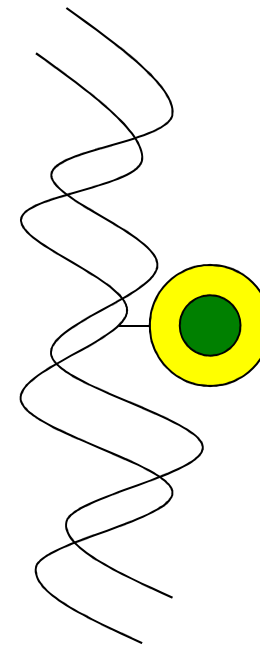
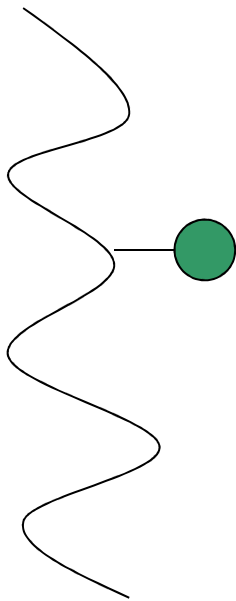
Strukturní sondy

- Molekulární majáky
 - Scorpions
 - Cyclicons
- Nanoparticle Probes
- Konjugované polymery a PNA sondy

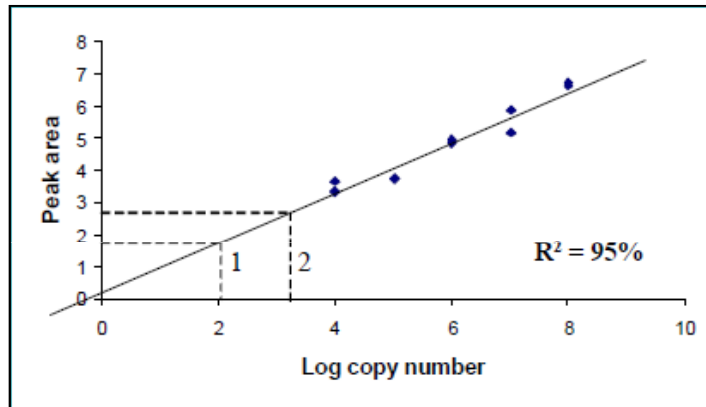
- urychlení qPCR - optimální fluorescenční signál již po 5 sec. v annealingovém kroku
- DNA interkalátor (SYBR Gold) – FRET donor + sonda specifická k jedinému amplikonu – FRET akceptor (Cy5 na 5'konci) – buď volně (**ResonSense**) nebo připojena k primeru linkerem (**Angler Probe**)
- DNA polymeráza bez exonukleázové aktivity v případě ResonSense
- Pokud není přítomná cílová sekvence, nebo během denaturace, není SYBR a Cy5 v dostatečné blízkosti aby došlo k FRET a emisi fluorescence
- kvantitativní PCR i alelická diskriminace (více různě značených sond)



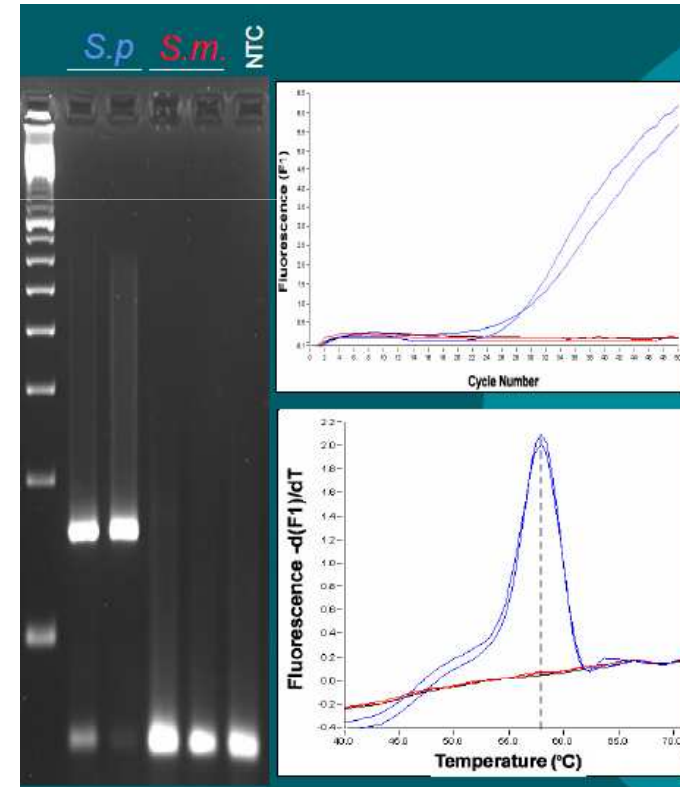
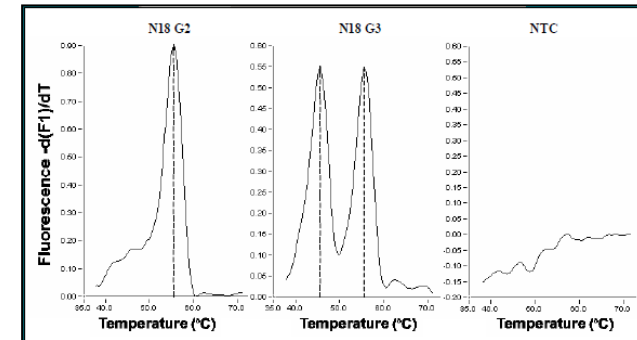
- Velmi jednoduchý princip i design
- Sonda emituje fluorescenci pouze v duplexu s DNA
- P na 3'OH konci – není volná OH skupina pro polymerázu
- Snímání fluorescence v annealingovém kroku
- Bez nutnosti FRET, návrhu sekundární struktury nebo enzymatického štěpení



HyBeacons

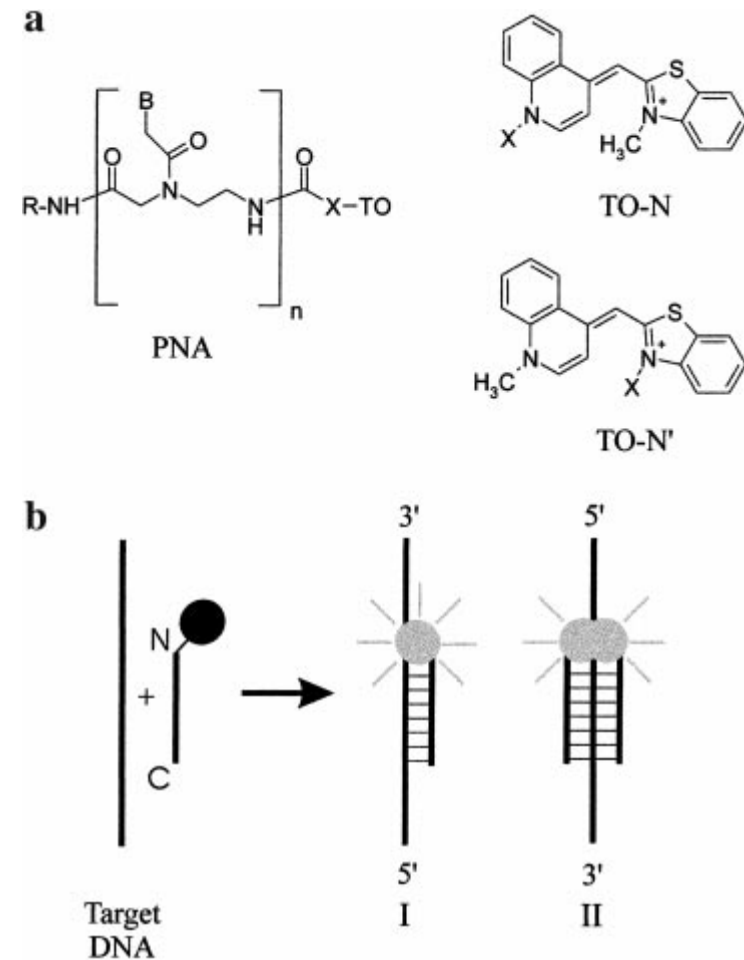


Rozlišení blízce příbuzných sekvencí na základě T_m umožňuje detekci SNP i kvantitativní analýzu

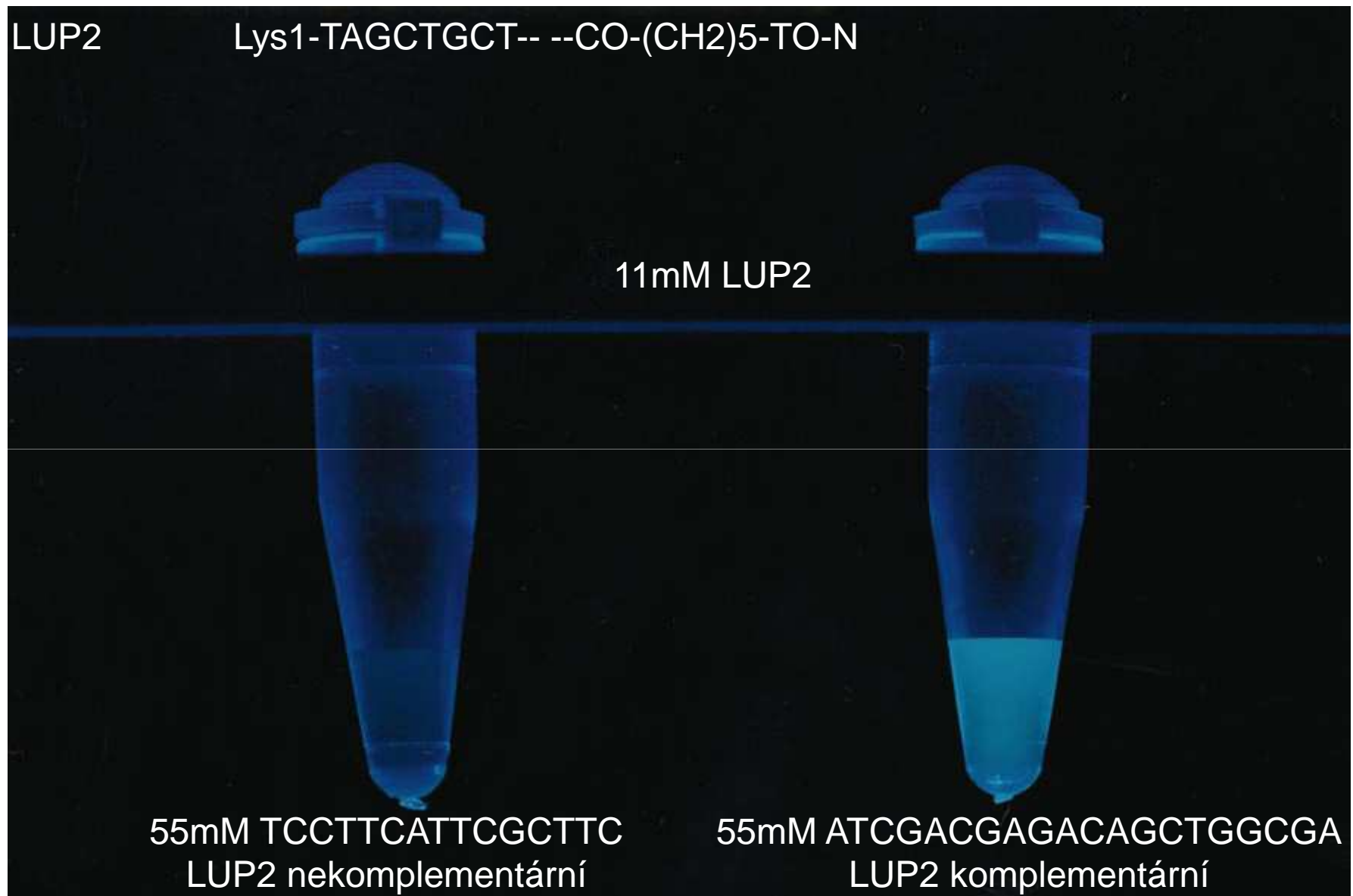


Light Up Probes

- Podobné HyBeacons
- PNA s konjugovanou thiazolovou oranží (asymetrické cyaninové barvivo)
- PNA neinterferuje s PCR
- Nízká fluorescence volné sondy – nárůst po vazbě k DNA (annealingový krok – snímání fluorescence)
- SNPs (jediná báze)



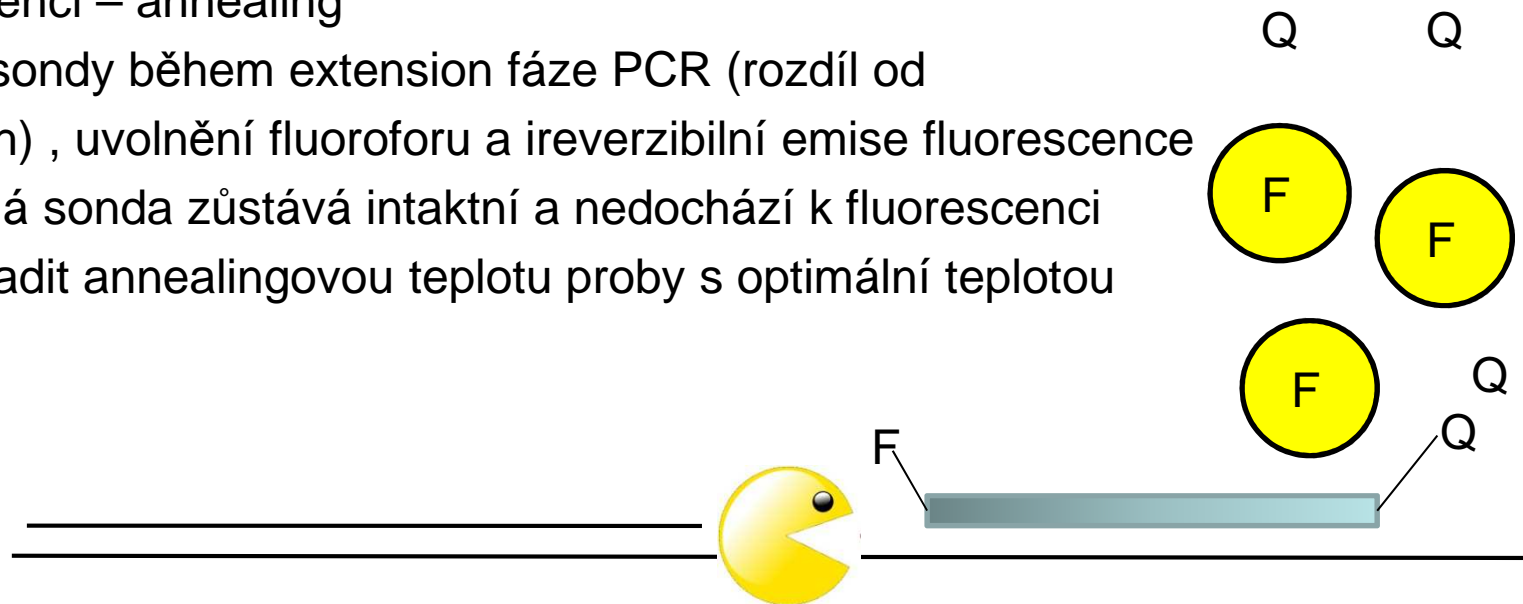
Light Up Probes



Svanvik et al. 2000. Light-Up Probes: Thiazole Orange-Conjugated Peptide Nucleic Acid for Detection of Target Nucleic Acid in Homogeneous Solution. *Analytical Biochemistry* 281, 26–35 .

Hydrolyzační sondy (TaqMan Probes)

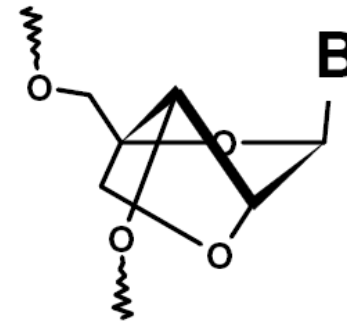
- 5' nuclease assay
- Velmi populární design a univerzální použití
- Fluorofor na 5', zhášec na 3' konci (snadná syntéza)
- 5'-3' ds exonukleázová aktivita DNA polymerázy
- F-Q – FRET (TAMRA) nebo emise tepla (BHQ)
- Pokud je přítomen templát, sonda se komplementárně váže na cílovou sekvenci – annealing
- Hydrolýza sondy během extension fáze PCR (rozdíl od předchodzích), uvolnění fluoroforu a ireverzibilní emise fluorescence
- Nenavázaná sonda zůstává intaktní a nedochází k fluorescenci
- Je nutné sladit annealingovou teplotu proby s optimální teplotou polymerázy



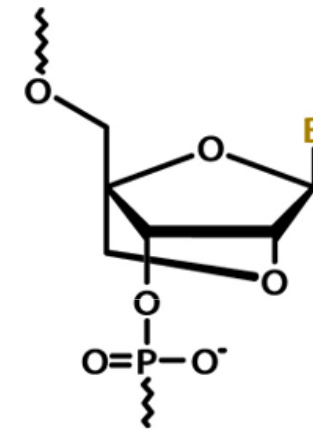
- Sloučení annealingového a extension kroku do jediného, obvykle 8-10°C pod T_m sondy (60-62°C)
- Kvantifikace, SNP, alelická diskriminace atd.
- Multiplexní reakce

UPL sondy

- Podobné TaqMan sondám
- Sekvenčně specifický pár primerů + semiuniverzální sonda - knihovna
- Do sekvence sondy začleněna Locked nucleic acid (LNA) – zvyšuje teplotní stabilitu – T_m



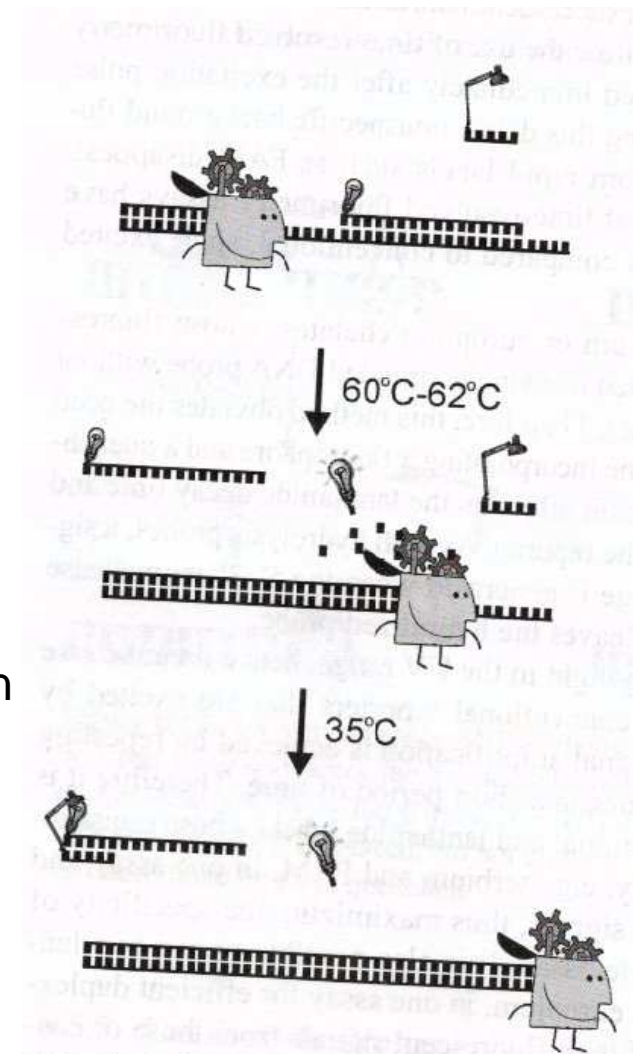
LNA Monomer
 β -D configuration



	Perfect Match	Single Mismatch	ΔT_m
 LNA 8-mer 5'-TGC I GGTG-3'	3'-ACG A CCAC-5' 71°C	3'-ACG G CCAC-5' 45°C	26°C
 DNA 8-mer 5'-TGC I GGTG-3'	35°C	25°C	10°C

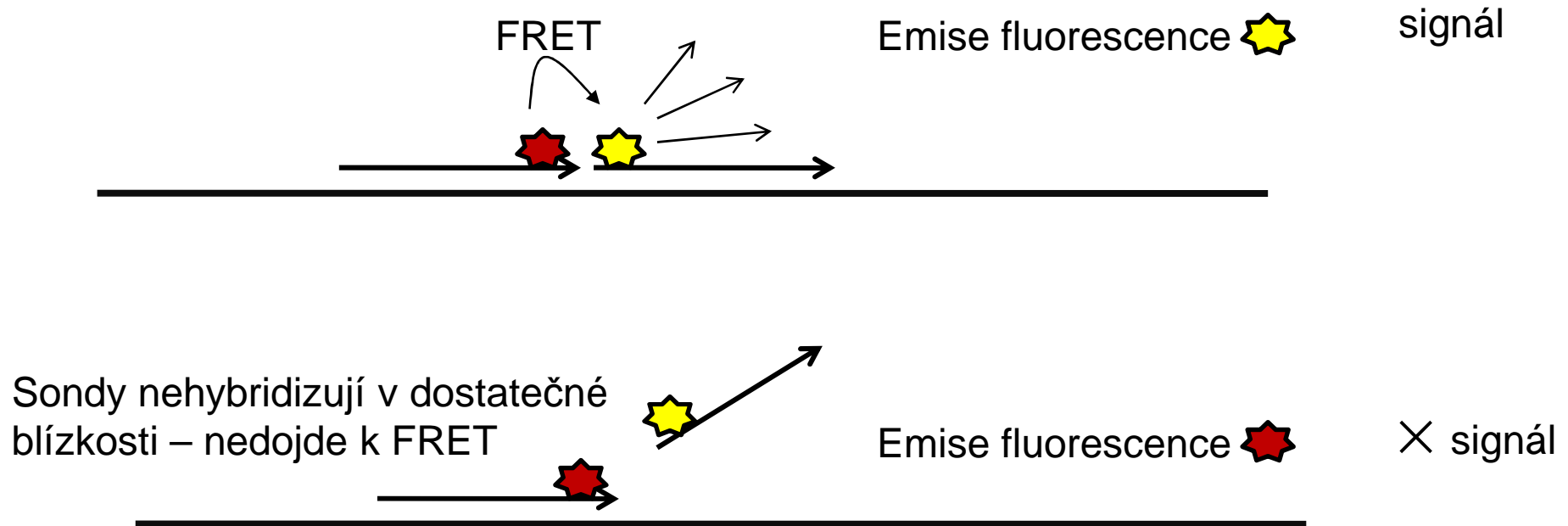
Lanthanidové sondy

- varianta hydrolyzačních sond (TaqMan)
- fluorescenční značka – lanthanidové cheláty (terbium, europium) s molekulami, schopnými absorpce UV – úzké emisní spektrum,
- zhášeny ssDNA – řádový nárůst fluorescence po hydrolýze sondy
- time resolved FRET – odečet fluorescence po určité době od excitačního pulzu – snížení fluorescence pozadí
- další snížení zbytkové nespécifické fluorescence pomocí krátké sondy se zhášecem – do cyklu je zařazen krok 35°C kdy se váže sonda se zhášecem na nenavázanou reportérovou sondu
- kombinace s klasickými fluorofory



Lightcycler - Hybridizační sondy

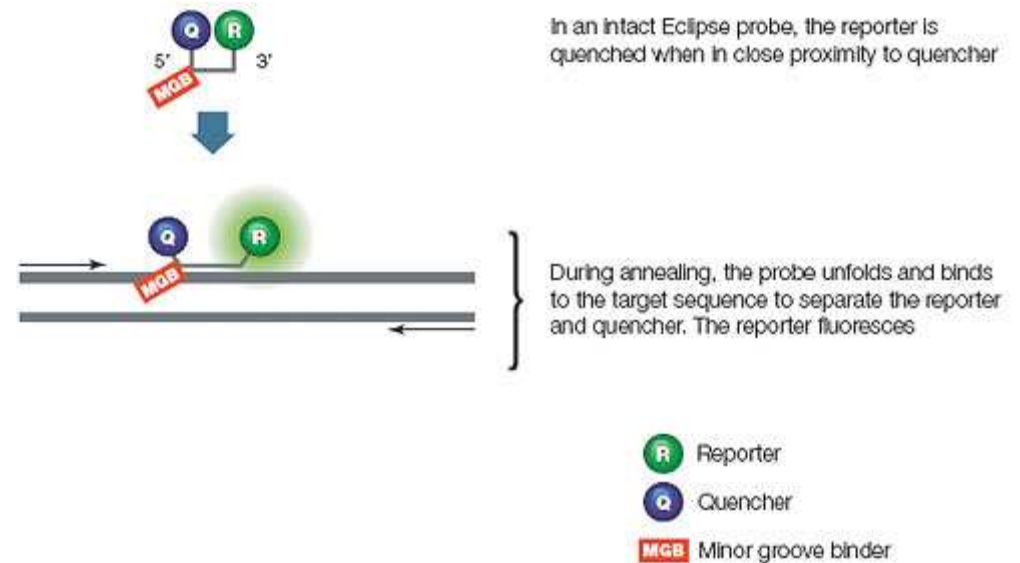
- dva oligonukleotidy, navržené tak, aby hybridizovaly na templátu vedle sebe
- fluorofory tvořící FRET pár
- pouze po úspěšné hybridizaci dojde k emisi fluorescence



- kvantifikace, genová exprese, SNP

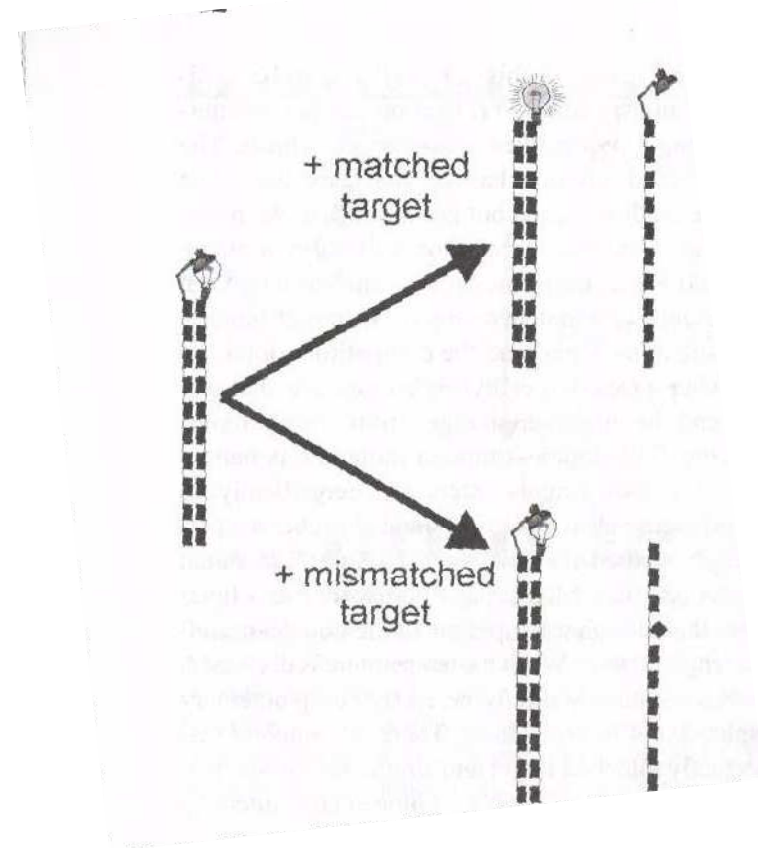
Eclipse

- Lineární sondy, podobné TaqMan
- 3' konec – fluorofor, 5' MGB protein a zhášec
- Nejsou hydrolyzovány Taq polymerázou
- Pokud není Eclipse sonda hybridizována k templátu, zaujímá konformaci, ve které jsou fluorofor a zhášec v těsné blízkosti
- Přítomnost MGB zvyšuje účinek zhášec – redukce fluorescence pozadí a umožňuje konstrukci kratších sond s vyšší T_m



Displacement Hybridization/Complex Probes

- v reakci kromě sondy a templátu je navíc kompetitor
- kompetitor blokuje nespecifickou hybridizaci sondy k podobným sekvencím, ale nezasahuje do hybridizace mezi přesně odpovídajícím templátem a sondou
- SNP – diskriminace rozdílu i v jediné bázi
- fluorescence se měří v annealingové fázi



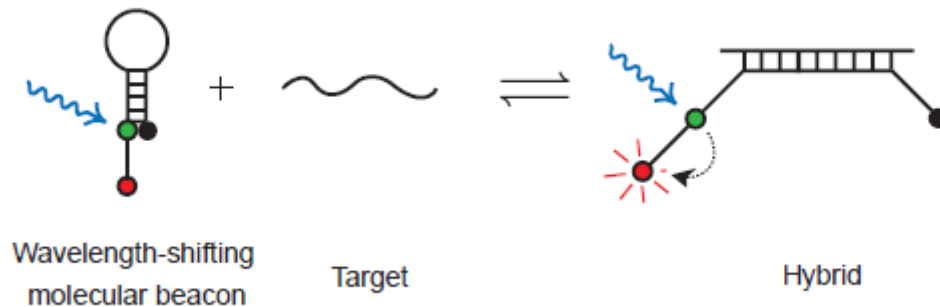
Molekulární majáky/ Molecular beacons



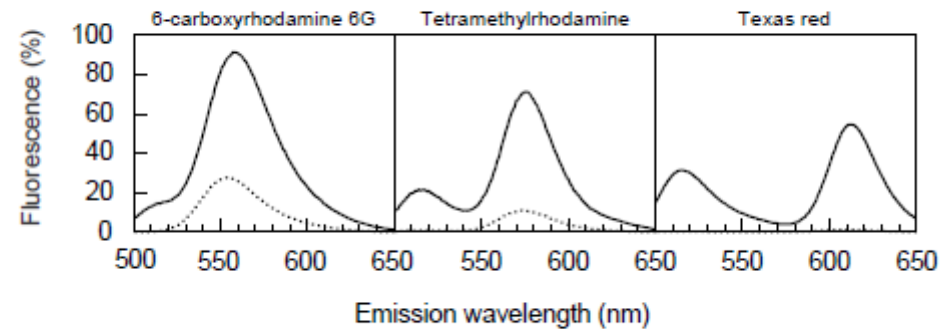
- vlásenková struktura, konce jsou vzájemně komplementární; smyčka je komplementární k cílové sekvenci
- konce označeny fluoroforem a zhášedem
- ve vlásenkové konformaci je fluorescence zhášena
- po vazbě na komplementární templát dochází k emisi fluorescence
- fluorescence je odečtena v annealingovém kroku
- po zvýšení na extenzní teplotu, sonda disociuje a nebrání polymeraci
- Stratagene

Molekulární majáky/ Wavelength shifting beacons

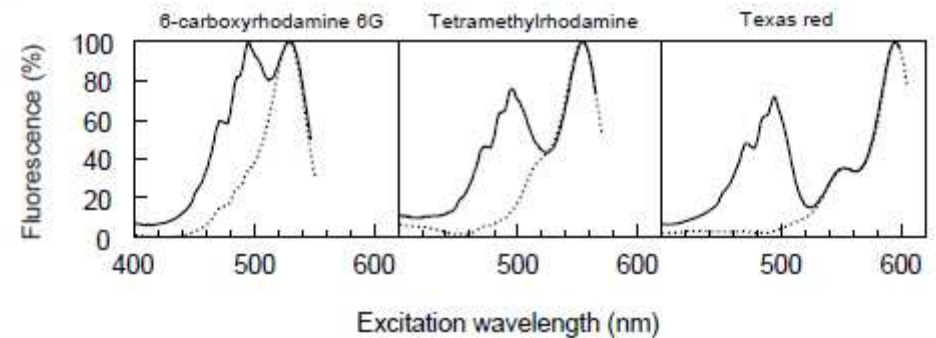
- sonda má na jednom konci navázané dva fluorofory – tzv. „harvester“ a „emitter“, na druhém konci zhášec
- harvester absorbuje světlo, emitter díky FRET fluoreskuje
- výrazně jasnější výstup než klasické majáky (v případě běžných zdrojů monochromatického světla)



A

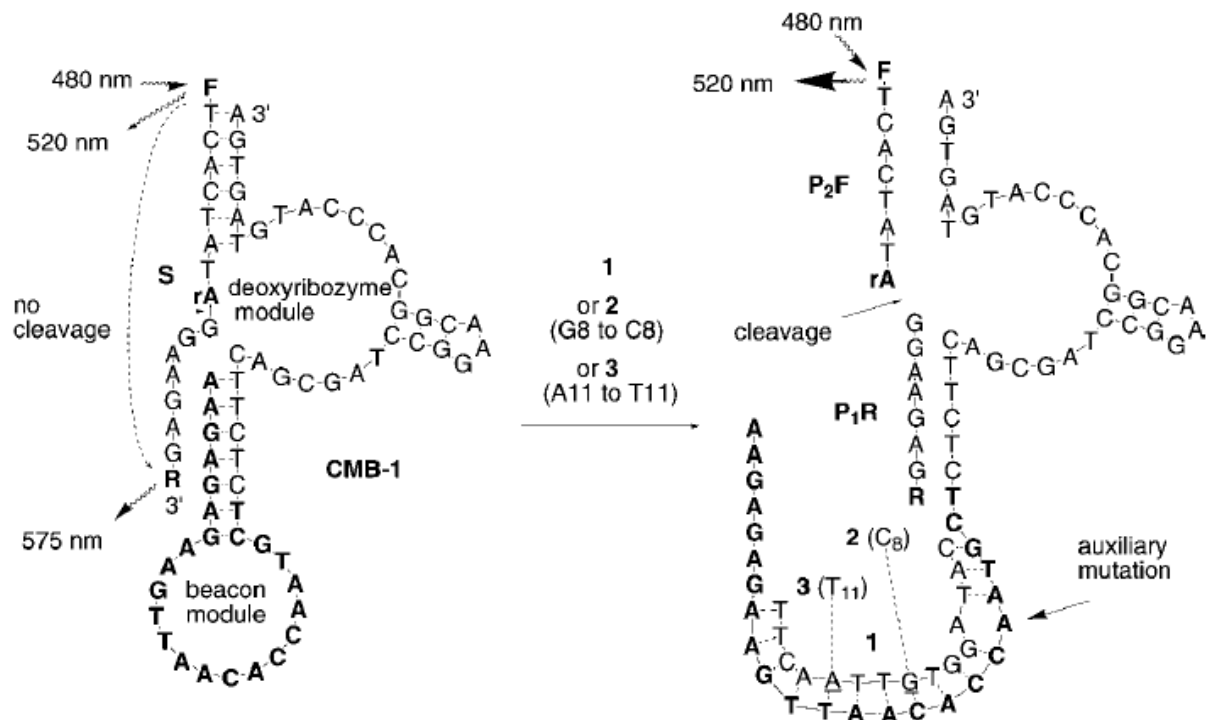


B

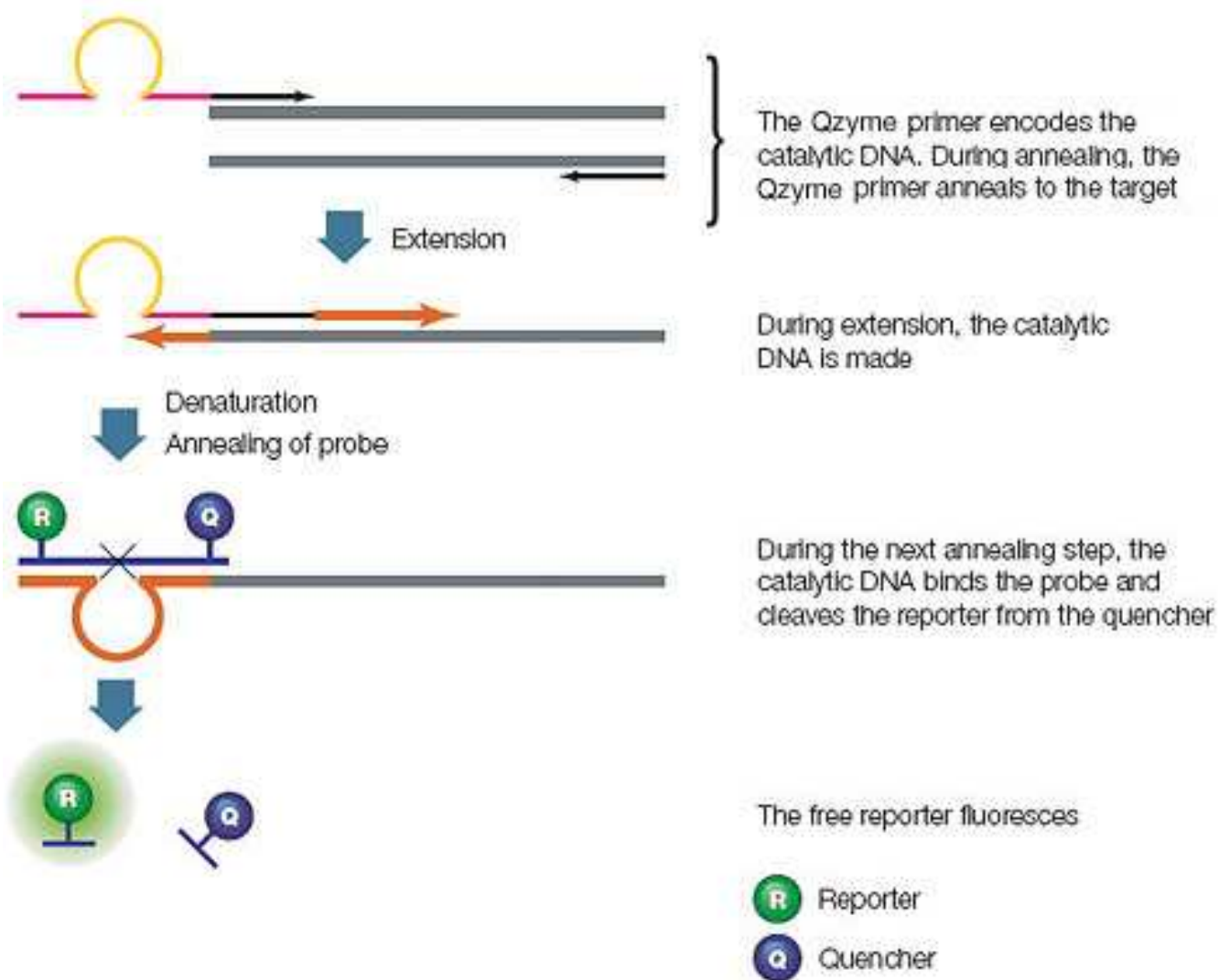


Katalytické molekulární majáky

- Molekulární maják je kombinovaný s DNAzymem
- Lineární oligonukleotid (sonda) značený fluoroforem a zhášěčem, intramolekulárně komplementární k DNAzymu
- Absence cílové sekvence – maják intramolekulárně hybridizuje s DNAzymem a alostericky inhibuje jeho aktivitu; sonda není štěpená
- V přítomnosti cílové sekvence DNAzym štěpí sondu, odděluje zhášěč a dochází k emisi fluorescence
- Modulární design umožňuje různé assaye

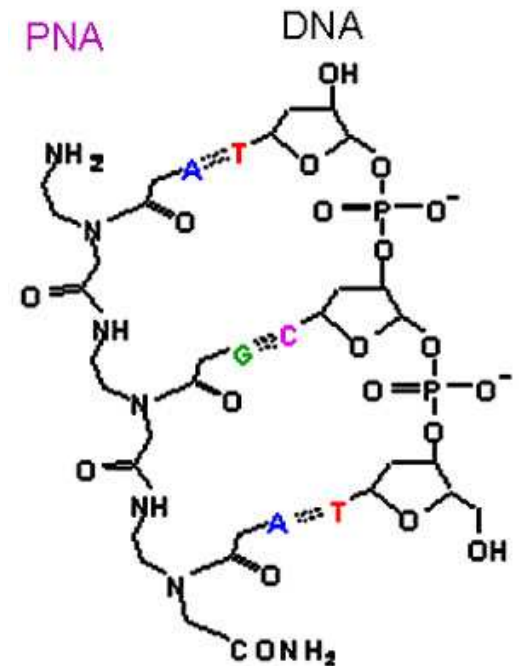
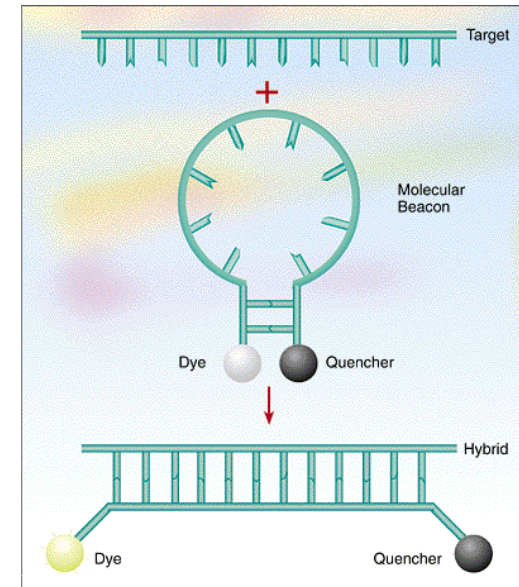


Katalytické molekulární majáky

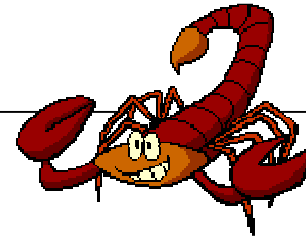


PNA Molekulární majáky

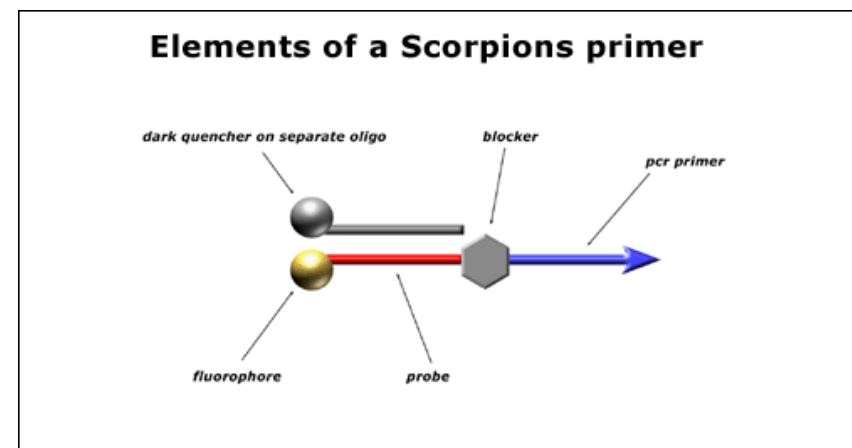
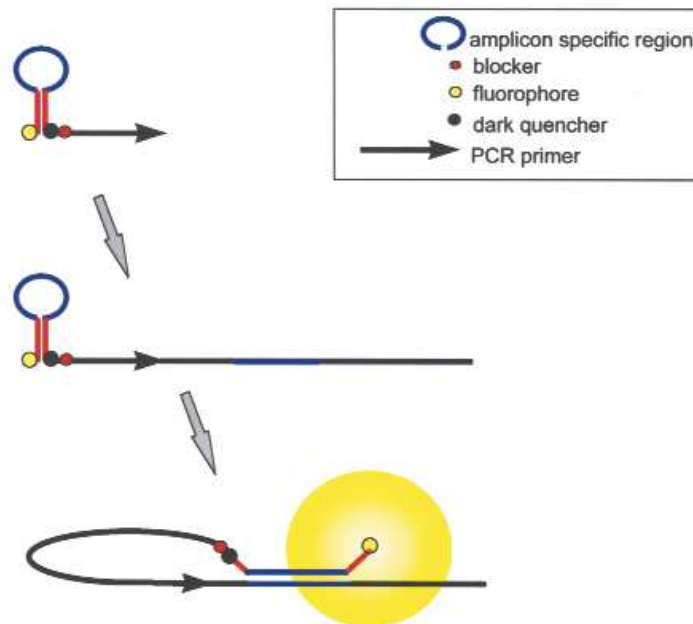
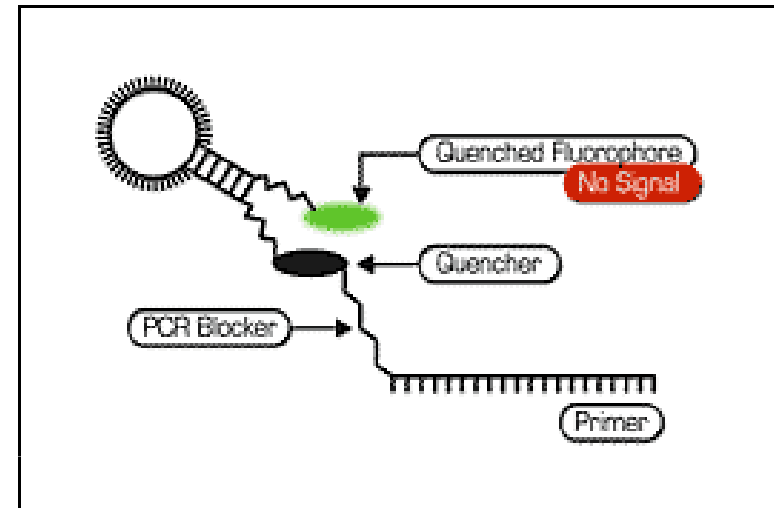
- Klasické majáky špatně hybridizují ke komplementární ssDNA v roztocích o nízké iontové síle, poměr signál/šum je různý, ale zvyšuje se s rostoucí iontovou silou
- „stemless“ majáky výborně hybridizují i za nízkých koncentrací solí, ale mají nízký poměr signál/šum
- PNA „stemless“ majáky kombinují výhody obou systémů
- Výhody:
 - Neobsahují jiné sekvence než komplementární k cílové molekule → výrazné urychlení kinetiky reakce
 - Rezistentní k nukleázám
 - Necitlivé k přítomnosti DNA vazebných proteinů
 - Účinné i v nízké iontové síle a při vyšších teplotách



Scorpion primers

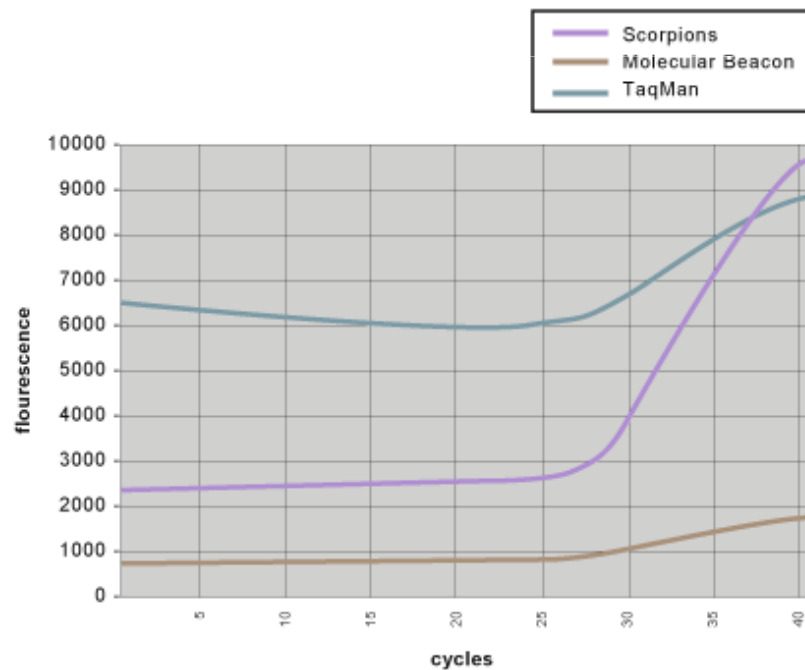


- kombinace sondy a primeru v jediné molekule
- nedochází k enzymatickému štěpení – rychlejší proces
- poměr ampliconů a hybridizovaných sond (tedy i fluorescence) 1:1
- vlásenková struktura - sonda (specifická sekvence) kovalentně vázaný primer
- PCR blocker – zabraňuje replikaci sekvence sondy a tedy i nespecifickému fluorescenčnímu signálu
- zhášení fluoroforu je zajištěno separátním oligonukleotidem



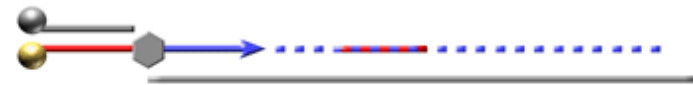
Scorpion primers

- Nízké pozadí
- Rychlá analýza
- Jednoduchý design
- SNP – vysoká citlivost
- Multiplex
- Jednoduchá příprava



The Scorpions reaction

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



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

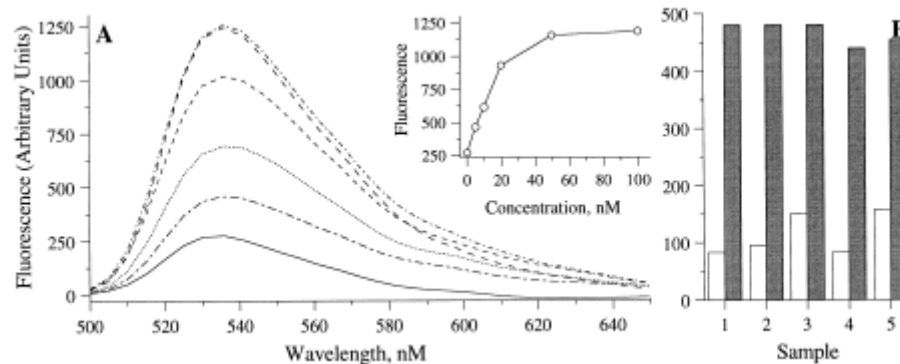
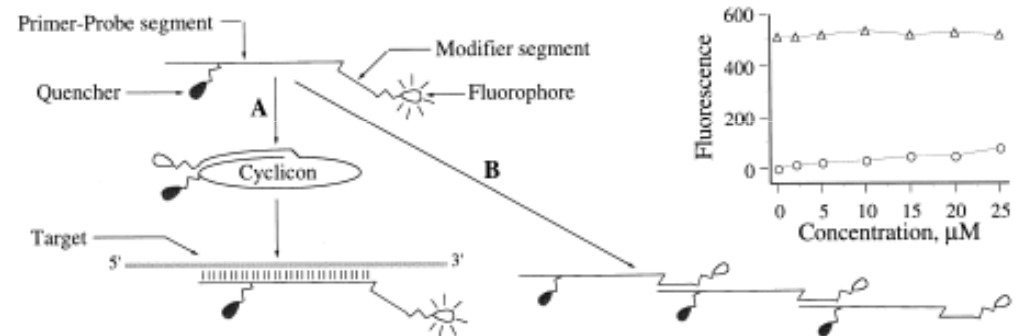


Step 3 - as it cools the extended Scorpion rearranges and begins to fluoresce in a target specific manner; unextended primer is quenched.



Cyclicons

- Pseudocyklické oligonukleotidy (PCO) – dva oligonukleotidy spojené v oblastech 3'-3' a 5'-5'
- Jeden segment je komplementární k cílové sekvenci
- Druhý segment 5-8 nukleotidů je komplementární k 3' nebo 5' antisense oligonukleotidu
- Pokud není přítomný templát, PCO tvoří intramolekulární pseudocyklické struktury,



Sondy založené na nanočásticích (nanoparticles probes)

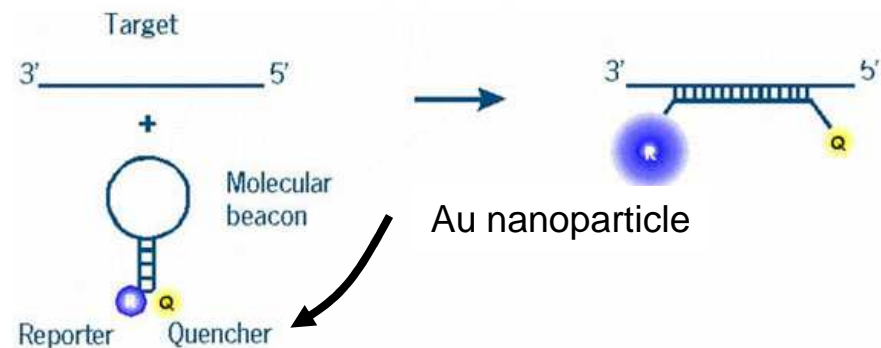
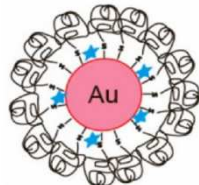
- Hybridní materiály složené z biomolekul (oligonukleotidy) a anorganických látek – např. zlaté koloidní nanočástice
- kovové clustery – efektivní zhášče
- hybridní konjugát – ssDNA oligonukleotid, 1,4nm zlatá nanočástice a fluorescenční barvivo
- 5' a 3' konce oligonukleotidu jsou vzájemně komplementární, struktura podobná molekulárnímu majáku

Výhody

- Au nanočástice zhášejí fluorescenci např. 100x účinněji než DABCYL a mají téměř 100% účinnost zhášení pro fluorofory absorbující v IR části spektra (Texas Red, Cy5)
- V přítomnosti cílové sekvence se vlásenka otvírá, odděluje se F a Q a dochází k emisi fluorescence

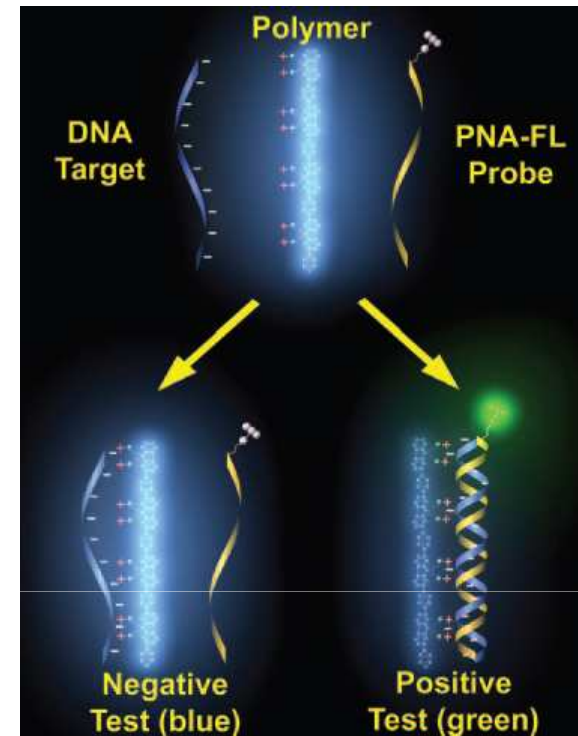
Nevýhody

- Nižší citlivost – řešení změna velikosti nanočástic, Surface plasmon resonance
- Změna absorpčního spektra v závislosti na vlnové délce
- Vazba Au-DNA



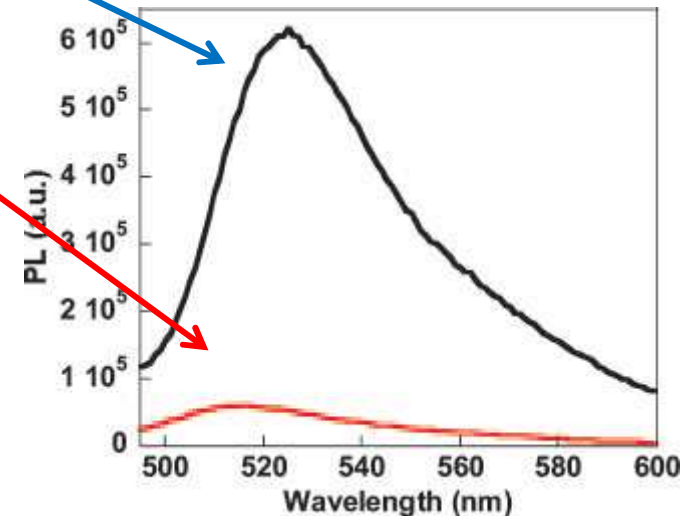
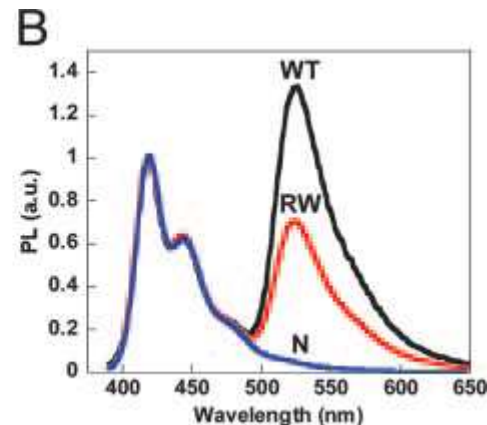
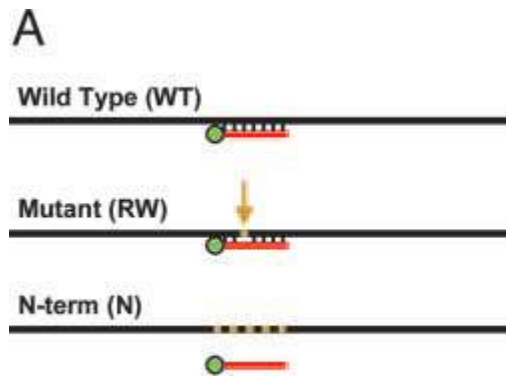
Konjugované polymery a PNA sondy

- Cíl – zjednodušení syntézy sond, zvýšení citlivosti
- Vývoj kationtových konjugovaných polymerů CCPs
- Delokalizovaná elektronová struktura, vazba na DNA
- PNA sonda s navázaným fluoroforem
- V případě tvorby ideálního duplexu DNA/PNA, se CCP dostává do blízkosti fluoroforu a dochází k FRET
- Pokud není cíl přítomný, CCP se váže pouze na DNA a dochází pouze k fluorescenci CCP, ne FRET
- Efektivní detekce SNP



Fluorescence po excitaci CCP komplexu

Fluorescence po přímé excitaci fluoresceinu



Shrnutí

- Princip fungování real-time termocykleru
- Základní principy excitace a emise fluorescence, FRET, zhášení
- Interkalační barviva
- Lineární a strukturní sondy
- Hydrolyzační sondy (Taq-Man)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

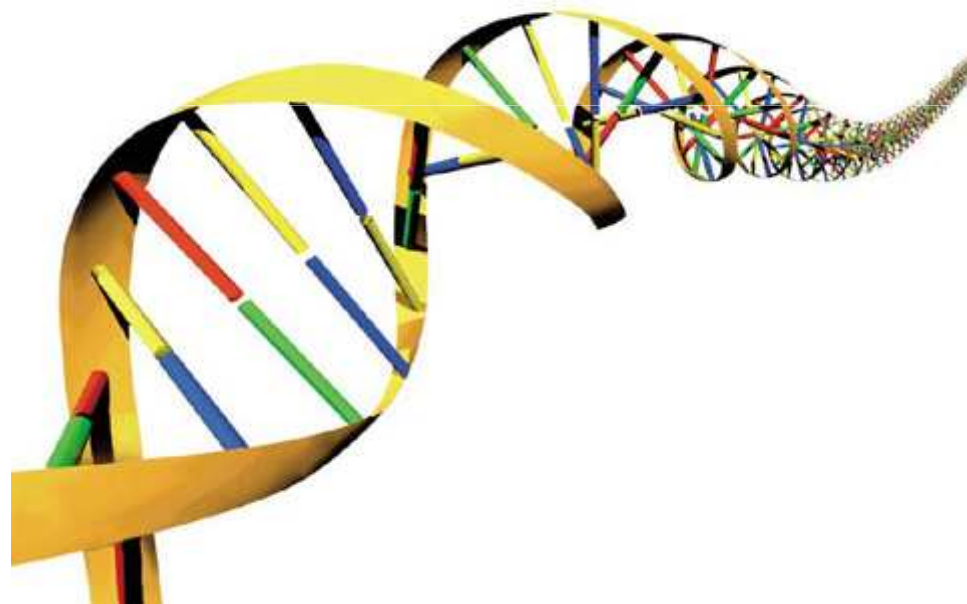
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

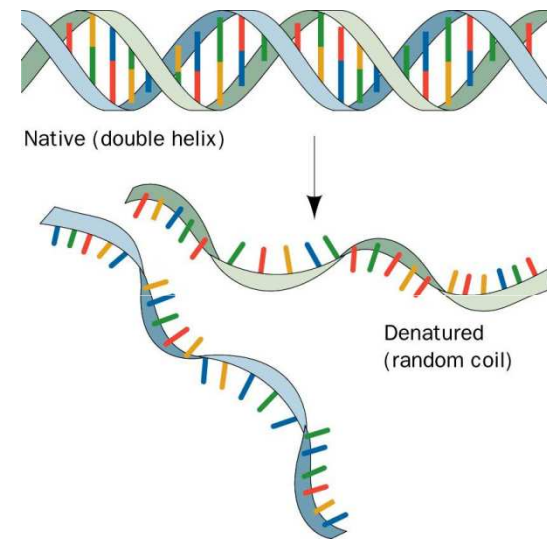
ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



V. Návrh primerů a sond

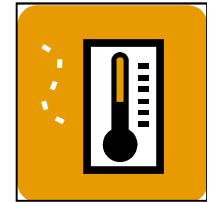
Hybridizace

- Úspěšný annealing sondy a primerů je kritický předpoklad úspěšné PCR
 - Sekvence
 - Koncentrace solí
 - Tvorba heterodimerických stabilních struktur
 - Párování bazí - nejen Watson a Crick
 - Sekundární struktura
 - Teplota tání DNA T_m



Design primerů a sond

Melting temperature T_m



- jeden z nejdůležitějších parametrů, determinující annealingovou teplotu
- T_m – teplota, při které je 50% daného oligonukleotidu denaturováno
- „cooperativní melting“ – usnadněná denaturace po disociaci prvního páru bazí
- Sekvence: $A=T < G \equiv C$
-
- Rychlost renaturace (a tedy i T_m) přímo úměrná délce řetězce a jeho koncentraci a nepřímo úměrná komplexitě molekuly (struktura)

- Elektrostatické interakce mezi fosfátovými molekulami
- kationty maskují + náboje fosfátů - vyšší iontová síla vede k vyšší T_m

Oligonukleotidy kratší než 20bp

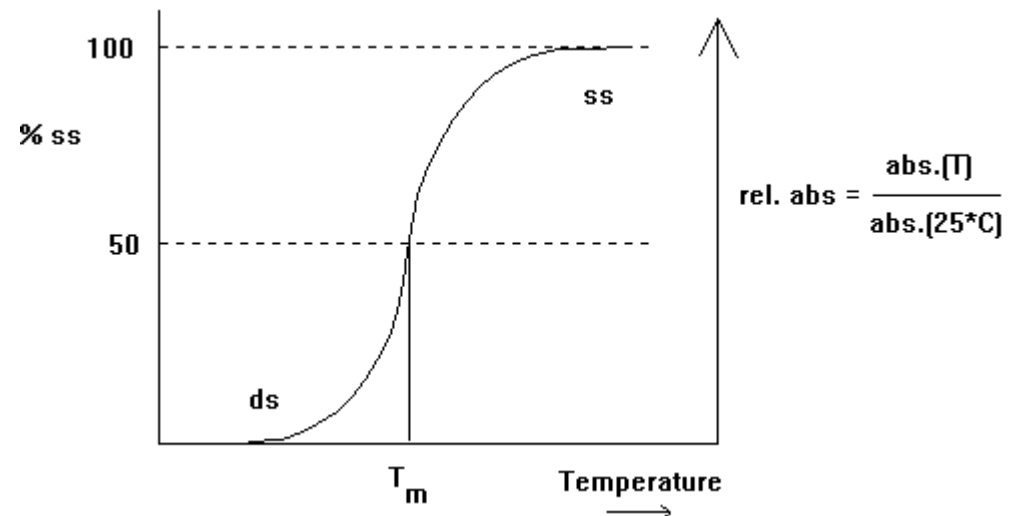
$$T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

Iontová síla, %GC a délka řetězce (N)

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+] + 0,41(\%GC)) - (625/N)$$

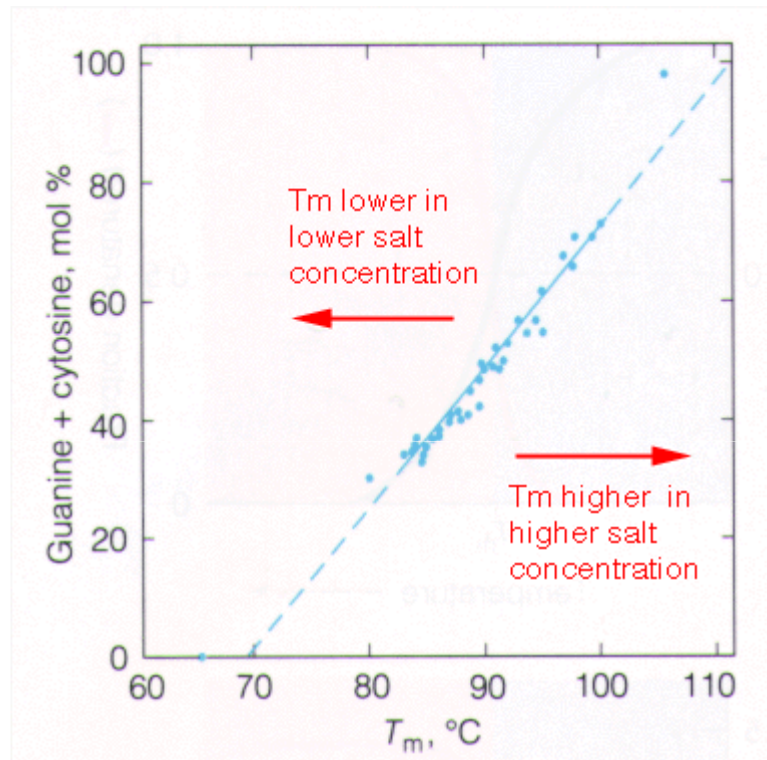
Web-based kalkulátory

<http://insilico.ehu.es/tm.php>



Design primerů a sond

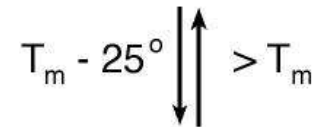
Melting temperature T_m



GCTATTCAACTGAAGAGGGCACAGC

+

CGATAAGTTGACTTCTCCCGTGTCG

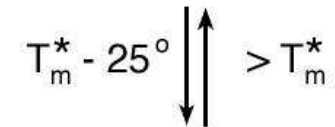


GCTATTCAACTGAAGAGGGCACAGC
CGATAAGTTGACTTCTCCCGTGTCG

GCTATTCAACTGGAGAGGGCACAGC

+

CGATAAGTTGACTTCTCCCGTGTCG



GCTATTCAACTG^GAGAGGGCACAGC
CGATAAGTTGAC_TTCTCCCGTGTCG

note: T_m^* is 4° lower than T_m

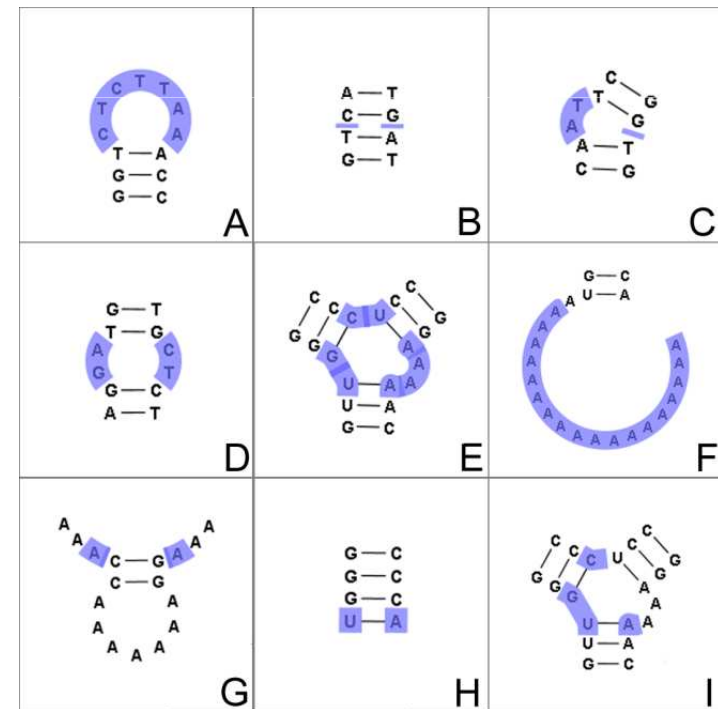
(In general, there is a 1° drop for every 1% mismatch)

Design primerů a sond

Gibbsova (volná) energie a její změna (ΔG , ΔG^0)



- Sekundární struktura DNA
- Na rozdíl od T_m , ΔG závisí na změně vnitřní energie a entropie
- Změna volné energie ΔG^0 (množství energie uvolněné nebo absorbované během reakce za stejné teploty a tlaku) - spontánní reakce - $\Delta G < 0$
- Znalost termodynamického příspěvku párování bazí, mismatches, volných konců, vlásenkových struktur a smyček – predikce parametrů hybridizace
- Predice sekundární struktury - *nearest neighbor*
 - *helix initiation factor* (GC/AT)
 - *helix propagation* energie nutná pro vytvoření následujícího hybridizačního páru
 - symetrie sekvence (duplexu)
 - *Loop regions* – smyčky, vlásenky, výdutě atd.



Design primerů a sond

Faktory ovlivňující stabilitu DNA DNA/RNA duplexu

1. Počet odpovídajících párů bází

- Kombinace vodíkových můstků a hydrofobních interakcí
- Pozice a typ neodpovídajícího páru (*mismatch*)

2. Sekvence – *nearest neighbor*

3. Sekundární struktura

- Charakter cílové sekvence
- Kompetice primeru nebo sondy s komplementárním řetězcem cílového duplexu

4. Volné konce

- Interakce mezi 5' a 3' konci hybridizovaného oligonukleotidu a nejbližší sousedící báze

- Příklad:

$$\Delta G^0 \text{ (GC)} -0,96 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G^0 \text{ (AT)} -0,50 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G^0 \text{ W-C (TA/AT)} -0,58 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G^0 \text{ W-C (GC/CG)} -2,24 \text{ kcal/mol}$$

GTAGACAATCTCCATCTCCTATCCTGATTAGAG

GTTAGAGGTAGAGGATAGGA

Faktory ovlivňující stabilitu DNA DNA/RNA duplexu

5. Iontová síla

- Koncentrace iontů, zejména Mg^{II+}
- Kationty kompenzují negativní náboj fosfátových skupin a usnadňují formování duplexu
- Stabilita duplexu (T_m) je úměrná koncentraci iontů

6. Teplota

- Se stoupající T je udržení duplexu energicky náročnější, po překročení určité T je preferována ssDNA – vyšší entropie celého systému

Není tedy nutná shodná T_m , ale shodná účinnost hybridizace obou primerů.

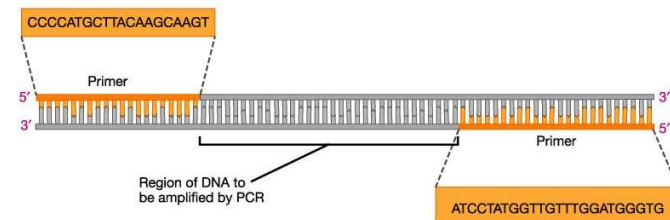
Primery se stejnou T_m , ale rozdílnou ΔG^0 , mohou vykazovat rozdílnou úspěšnost při tvorbě duplexu než primery s odpovídající ΔG^0 .

Design primerů a sond

Design primerů

- Optimálně: primery jejichž 5'konce tvoří stabilní duplex, $\Delta G^0 < 10$ kcal/mol/37°C
- Plynulý přechod ΔG^0 směrem k 3'konci až k cca -6kcal/mol.
- Eliminace misprimingu (vzniklého hybridizací pouze 3'konce)
- Vyloučení repetitivních oblastí, které mohou tvořit sekundární struktury
- Komplementarita primerů – primer dimery
- Specifita – hybridizace k jedinečnému místu v genomu (BLASTn)

Vliv reakčního prostředí – i ideálně navržené primery mohou měnit své vlastnosti v závislosti na použitém PCR pufru a dalších parametrech PCR – vždy je nutná optimalizace jednotlivých PCR



Design primerů a sond

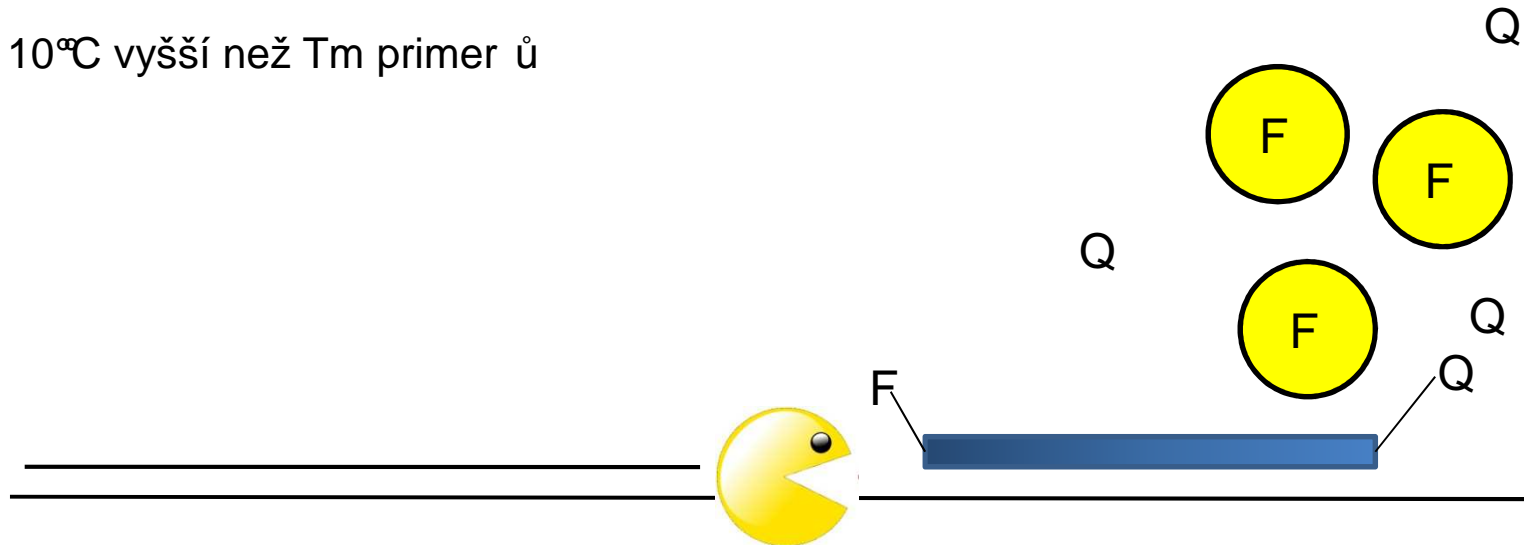
Design sond

- Různý design podle toho, zda je cílem kvantifikace DNA, mRNA nebo provedení alelické diskriminace nebo SNP
- Použitá chemie
- Detekce DNA, RNA nebo obou zároveň? Rozlišení HIV RNA od DNA začleněné do genomu
- Kombinace fluoroforu a zhášeče
- Modifikace sondy – LNA, PNA, MGB atd.
- Multiplex assay

Design primerů a sond

Design hydrolyzačních sond

- qPCR TaqMan - dvoukrokový proces – denaturace a annealing/extension
- Co nejnižší Ct a nejvyšší ΔR (ΔR_n)
- Umístění 5' konce sondy v rámci stanovované sekvence co nejbližše 3' konci jednoho z primerů – účinné štěpení sondy
- Optimální délka do 30 nukleotidů, obsah GC do 30%
- AT bohaté sekvence – začlenění LNA, PNA nebo MGP
- G – účinný quencher
- Minimum repeticí, zejména GGGG, začlenění inosinu do repetice řeší tento problém
- T_m probe od 10°C vyšší než T_m primerů

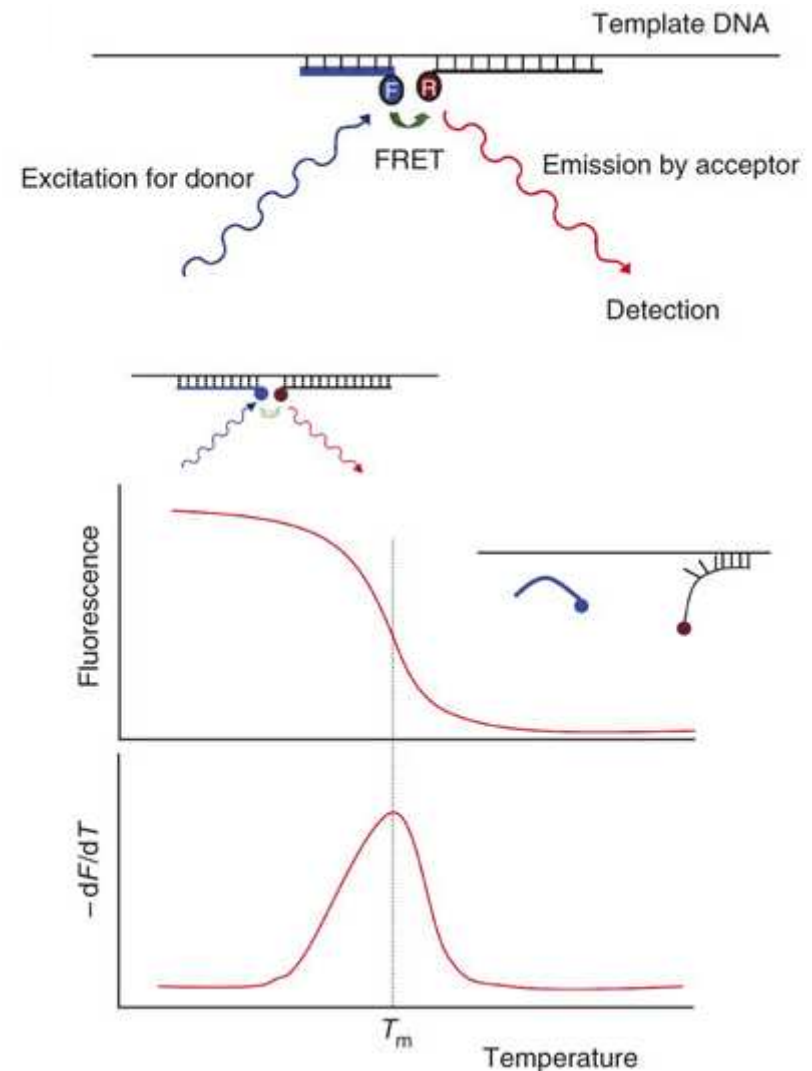


Design primerů a sond

Design hybridizačních sond

- Sondy by měly být umístěny co nejdál od primeru 5' – odečet fluorescence v annealingové fázi
- GC 50%
- Každá sonda má délku 23-35bp
- Sondy o stejné T_m – musí se vázat současně ; T_m sond o 5-10°C vyšší než T_m primerů
- 3' konec akceptorové sondy fosforylován
- Donor FAM, akceptor Cy5 nebo Lightcycler Red 640/705
- Vzdálenost mezi sondami 1-5 bází (zajištění FRET)

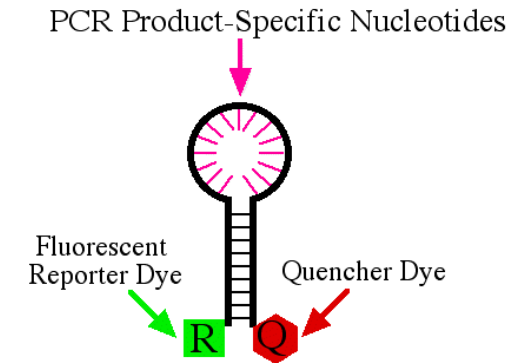
(Lightcycler probes)



Design primerů a sond

Design molekulárních majáků

- Vazba majáku ideálně uprostřed ampliconu
- T_m komplementárních ramen o 7-10°C vyšší než T_m primerů
- Délka do 39 bp - omezení sekundárních struktur

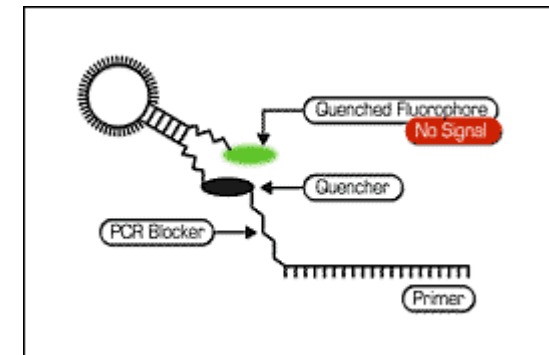


Design scorpion primers

Sonda připojena k 5' konci primeru a je komplementární k nově syntetizovanému řetězci

- vlastní hybridizace sondy je intramolekulární událost
- 17-27bp; T_m sondy $< T_m$ primeru
- Cíl sondy – 0-20bp od 3' konce primeru
- Hairpin struktura
- výpočet ΔG pro uzavřenou i hybridizovanou formu

– MFold <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>

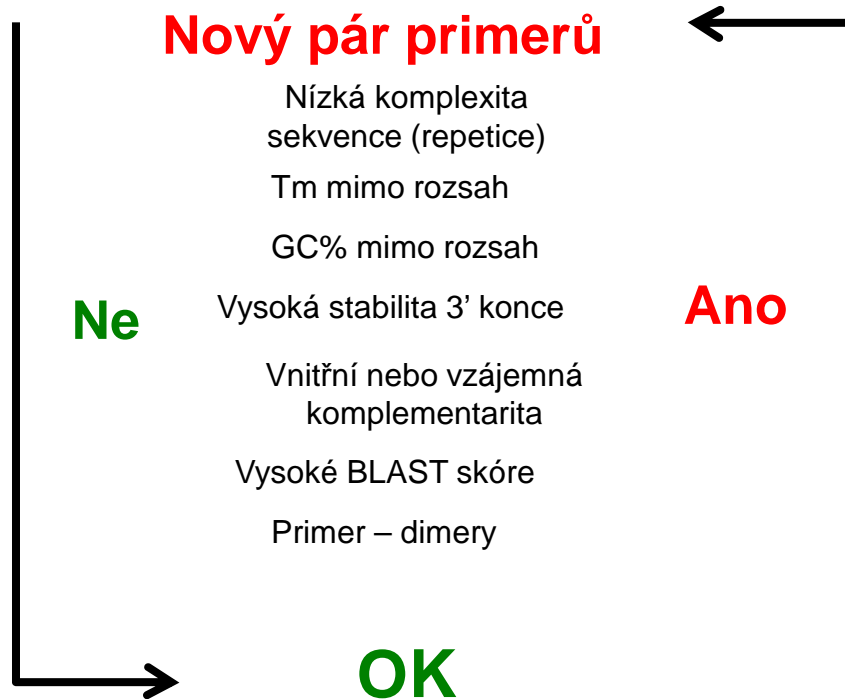


Design primerů

- Délka amplikonu, T_m , účinnost amplifikace i výtěžek
- Správná sekvence – BLASTn
- Sestřih – rozhraní exon/intron
- 3' konec – klíčový pro eventuální mispriming G/C
- Repetice (zejména GC)
- Sekundární struktura, intraprimer homology
- Obsah GC 35-65%
- Délka 15-25bp
- T_m 55-60°C
- ΔG do -10kcal/mol
- V případě převažujících AT – vhodné začlenění LNA
- Eventuální modifikace - na 5'konci

Design primerů a sond

Design primerů – web resources



Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
NM_005252.2	Homo sapiens v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), mRNA	40.1	40.1	100%	0.014	100%
XM_001718466.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100128918 (LOC100128918), mRNA	32.2	32.2	80%	3.5	100%
XM_001717510.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100128918 (LOC100128918), mRNA	32.2	32.2	80%	3.5	100%
XM_001716725.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100128918 (LOC100128918), mRNA	32.2	32.2	80%	3.5	100%
NM_017780.2	Homo sapiens chromodomain helicase DNA binding protein 7 (CHD7), mRNA	30.2	30.2	75%	14	100%
NM_182923.3	Homo sapiens kinesin light chain 1 (KLC1), transcript variant 2, mRNA	30.2	30.2	75%	14	100%
NM_005552.4	Homo sapiens kinesin light chain 1 (KLC1), transcript variant 1, mRNA	30.2	30.2	75%	14	100%
XM_001726819.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100131402 (LOC100131402), mRNA	28.2	28.2	70%	55	100%
XM_001725069.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100131402 (LOC100131402), mRNA	28.2	28.2	70%	55	100%
Genomic sequences [show first]						
NW_001838113.2	Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_11)	40.1	901	100%	0.014	100%
NT_026437.11	Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, reference assembly	40.1	3647	100%	0.014	100%
NW_001838847.2	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_110)	34.2	258	100%	0.89	100%

Design primeru a sond

Design primeru – web resources

- Primer Bank

<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>

- RTPrimerDB

<http://medgen.ugent.be/rtpriimerdb/>

- Real Time PCR Primer Set

<http://www.realtimeprimers.org/>

- QPPD

<http://web.ncifcrf.gov/rtp/gel/primerdb/default.asp>



Primer Bank

PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification

[Home/Search](#) [PCR Protocol](#) [Primer Statistics](#) [Comments](#) [Links](#) [Citation Policy](#) [Help/FAQ](#)

Primer Search

Search for PCR Primers

Search where:

Species:

For text:

You can blast your sequence against the primerbank sequence DB [here](#).

Order Oligos

You can have primers synthesized and PCR reaction products sequenced at:

DNA Core Facility

Center for Computational and Integrative Biology

Real Time PCR Primer Sets

Validated Primer Sets for Quantitative Real Time PCR

Are you normalizing gene expression to just one housekeeping gene?

Set of 10 Validated Housekeeping Gene Primer Sets - **Only \$79.95**
Available at www.realtimeprimers.com

Real Time PCR Primer Configure Sequence Detection Primers Online To Fit Your Needs. www.AppliedBiosystems.com
Real-Time PCR Training For Scientists and Professionals in Europe, USA and Asia. www.ataaa.com
Real Time PCR Assays For Scientists and Professionals. Custom designed for any gene. Highest quality validation process. www.primerdesign.co.uk
qPCR MasterMix qPCR MasterMix for Real-time PCR TaqMan and Sybergreen based assays. www.biocchain.com

[SYBR Green Primers](#) [Hybridization Probes](#) [Hydrolysis Probes](#)

[Molecular Beacons](#) [Submit Primers/Probes](#) [Links](#)

Quantitative PCR Primer Database

Q P P D

QPPD Home

Search Primer

Submit Primer

Design primerů a sond

Design primerů a sond– web resources

- Primer 3

<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3> www.cgi

- Primer Express

<http://www.appliedbiosystems.com>

- Premier Biosoft International

<http://www.premierbiosoft.com>

Primer3: WWW primer tool

pick primers from a DNA sequence

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Miyajima Library \(repeat library\)](#).

NOV:

Pick left primer or use left primer below | Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below | Pick right primer or use right primer below (5'→3' on opposite strand)

Science ID: A string to identify your output
Targets: E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the source sequence with [and] e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT... means that primers must flank the central CCCC.
Excluded Regions: E.g. 401,7,68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the source sequence with < and > e.g. ...ATCT-CCCC-TCAT... forbids primers in the central CCCC.

Product Size: Min: 100 Opt: 200 Max: 1000
Maxlen_TG_Bonus: Max_T_Slability:
Min_Mispriming: 12.00 Max_Mispriming: 24.00

General Primer Picking Conditions


Primer Size: Min: 18 Opt: 20 Max: 27
Primer Tm: Min: 57.0 Opt: 60.0 Max: 63.0 Max_Tm_Difference: 100.0
Product Len: Min: Opt: Max:
Primer GC%: Min: 20.0 Opt: Max: 80.0
Max Self-Complementarity: 0.00 Max 3' Self-Complementarity: 3.00
Max 5N's: Max Poly-X:
Inside-Target Primality: Outside-Target Primality: Set Inside-Target Primality to allow primers inside a target.
First Base Index: 1 CG Clamp: 0
Salt Concentration: 50.0 Annealing Oligo Concentration: 50.0 (Not the concentration of oligos in the reaction mix, but of those annealing to template.)



PREMIER Biosoft
International

HOME COMPANY PRODUCTS SERVICES DOWNLOAD ORDERING

Software to Accelerate Research in Life Sciences

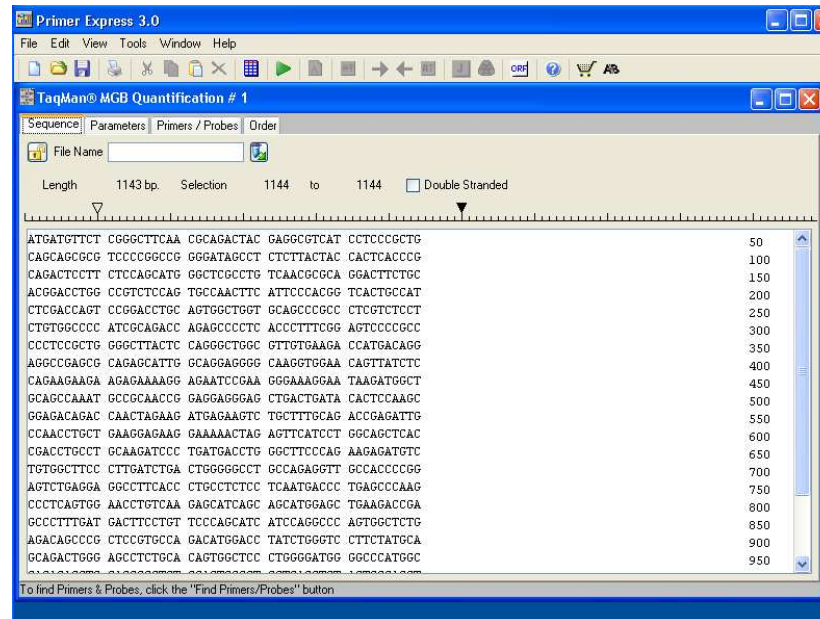
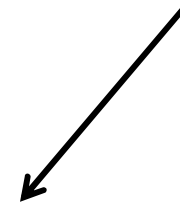
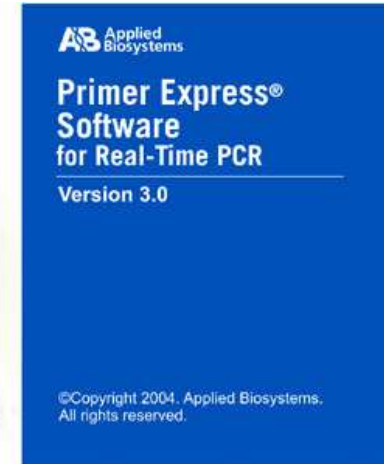
-  **AlleleID®** [Real Time PCR & Microarrays](#)
-  **Array Designer** [Microarrays](#)
-  **Beacon Designer™** [Real Time PCR Oligo Design](#)
-  **PrimerPlex** [Oligo Design for xMAP® Based Multiplex Systems](#)
-  **Primer Premier** [PCR Primer Design](#)
-  **SimGlycan™** [MS/MS Data Analysis](#)
-  **SimVector** [Draw Plasmid Maps & Plan Cloning Experiments](#)
-  **TMA Foresight** [Tissue Microarray Data Analysis](#)
-  **Xpression Primer** [Tagged Primer Design](#)

Design primerů a sond

Návrh primerů a TaqMan sond – Primer Express

```
STS /db_xref="UniSTS:477413"  
1090..>1143  
/gene="FOS"  
/gene_synonym="AP-1"  
/gene_synonym="C-FOS"  
/standard_name="BP25001511069"  
/db_xref="UniSTS:519218"  
  
ORIGIN  
1 atgatgttct cgggcttcaa cgcagactac gaggcgtcat cctcccgctg cagcagcgcg  
61 tccccggccg gggatagcct ctcttactac cactcaccgg cagactccct ctccagcagtg  
121 ggctcgccctg tcaacgcgca ggactctctg acggacctgg ccgtctccag tgccaacttc  
181 attccccagg tcactgccat ctccgacctg ccggacctgg agtggtggtt gcaagccggc  
241 ctgctctctc ctgtggcccc atcgcagacc agagcccttc acccttctgg agtccccggc  
301 cccctccgctg gggcttactc caggctgggc gttgtgaaga ccatgacagg aggcgcagcg  
361 cagagcattg gcaggagggg caaggtgga caagtatctc cagaagaaga agagaaaagg  
421 agaatccgaa gggaaaggaa taagatggct gcaagcaaat gccgcaaccg gaggaggggag  
481 ctgactgata cactccaagc ggagacagac caactagaag atgagaagtc tgctttgcag  
541 accgagattg ccaacctgct gaaggagaag gaaaaactag agtccactct ggcagctcac  
601 cgacctgctc gcaagatccc tgatgacctg ggcttcccag aagagatgtc tgtggcttcc  
661 cttgatctga ctgggggccc gccagaggtt gccacccggg agtctgagga ggccttcacc  
721 ctgctctccc tcaatgaccc tgagcccaag cctcagtggg aacctgtcaa gagcatcagc  
781 agcatggagc tgaagaccga gccctttgat gacttctctg tcccagcatc atccaggccc  
841 agtggctctg agacagcccg ctccgtgcca gacatggacc tatctgggtc ctctatgca  
901 gcagactggg agcctctgca cagtggctcc ctggggatgg ggcccatggc cacagagctg  
961 gagccccctg gcactccggt ggtcacctgt actcccagct gcactgctta caagtctcc  
1021 ttgctctca cctaccgccg ggctgactcc ttcccagct gtgcagctgc ccaccgcaag  
1081 ggcagcagca gcaatgagcc ttctctgac tgcctagct caccacagct gctggccctg  
1141 tga  
  
//
```

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)



Design primerů a sond

TaqMan® MGB Quantification # 1	
Sequence Parameters Primers / Probes Order	
Parameter	Value
<input type="checkbox"/> Primer Tm	
Min Primer Tm	58
Max Primer Tm	60
Max Difference in Tm of Two Primers	2
<input type="checkbox"/> Primer GC Content	
Min Primer %GC Content	30
Max Primer %GC Content	80
Max Primer 3' GC's	2
Primer 3' End Length	5
Primer 3' GC Clamp Residues	0
<input type="checkbox"/> Primer Length	
Min Primer Length	9
Max Primer Length	40
Optimal Primer Length	20
<input type="checkbox"/> Primer Composition	
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
<input type="checkbox"/> Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Primer Site Uniqueness	
Max % Match in Primer	75
Max Consec Match in Primer	9
Max 3' Consec Match in Primer	7
<input type="checkbox"/> Probe Tm	
Min Probe Tm	68
Max Probe Tm	70
<input type="checkbox"/> Probe GC Content	
Min Probe %GC Content	30
Max Probe %GC Content	80
<input type="checkbox"/> Probe Length	
Min Probe Length	13
Max Probe Length	25
<input type="checkbox"/> Probe Composition	
Max Probe G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Probe	0
No G at 5' End in Probe	<input checked="" type="checkbox"/>
Select Probe with more C's than G's	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Probe Secondary Structure	
Max Probe Consec Base Pair	4
Max Probe Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Amplicon	
Min Amplified Region Tm	0
Max Amplified Region Tm	85
Min Amplified Region Length	50
Max Amplified Region Length	150
<input type="checkbox"/> General	
Max Primers / Probes	50

Design primerů a sond

TaqMan® MGB Quantification # 1

Sequence Parameters Primers / Probes Order

Candidate Primers & Probes

#	Fwd Start	Fwd Stop	Fwd Len...	Fwd Tm	Fwd %GC	Fwd Seq	Rev Start	Rev Stop	Rev Len...	Rev Tm	Rev %GC	Rev Seq	Probe
1	162	181	20	58	55	CGTCTCCA...	217	199	19	58	63	GGTCCGGA...	183
2	161	180	20	59	60	CCGTCTCC...	217	199	19	58	63	GGTCCGGA...	182
3	161	180	20	59	60	CCGTCTCC...	217	199	19	58	63	GGTCCGGA...	183
4	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	809	790	20	59	55	TCAAAGGG...	765
5	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	809	790	20	59	55	TCAAAGGG...	765
6	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	809	790	20	59	55	TCAAAGGG...	765
7	800	822	23	60	48	AGCCCTTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	827
8	800	822	23	60	48	AGCCCTTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	828
9	800	822	23	60	48	AGCCCTTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	829
10	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	791	20	58	50	ATCAAAGG...	765
11	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	791	20	58	50	ATCAAAGG...	765
12	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	791	20	58	50	ATCAAAGG...	765
13	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	790	21	59	52	ATCAAAGG...	765
14	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	790	21	59	52	ATCAAAGG...	765
15	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	790	21	59	52	ATCAAAGG...	765
16	799	821	23	60	48	GAGCCCTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	827
17	799	821	23	60	48	GAGCCCTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	828
18	799	821	23	60	48	GAGCCCTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	829
19	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	811	792	20	58	55	CATCAAAG...	765
20	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	811	792	20	58	55	CATCAAAG...	765
21	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	811	792	20	58	55	CATCAAAG...	765
22	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	820
23	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	820
24	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	821
25	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	821
26	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	822
27	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	827
28	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	828
29	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	829
30	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	812	793	20	58	50	TCATCAA...	765
31	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	812	793	20	58	50	TCATCAA...	765

Click to show Locations
 Click to show Secondary Structures

Design primeru a sond

Name	Value
<input type="checkbox"/> Forward Primers	
Total primers tested:	35792
GC test passed:	35149
Ambiguity test passed:	963
Clamp test passed:	963
Tm test passed:	963
Avoid Excluded regions test passed:	963
Repeat test passed:	900
Self compare test passed:	741
Limit GC test passed:	214
Sequence compare passed:	84
Reverse sequence compare passed:	83

<input type="checkbox"/> Reverse Primers	
Total primers tested:	35296
GC test passed:	34657
Ambiguity test passed:	946
Clamp test passed:	946
Tm test passed:	946
Avoid Excluded regions test passed:	946
Repeat test passed:	861
Self compare test passed:	703
Limit GC test passed:	205
Sequence compare passed:	95
Reverse sequence compare passed:	95
<input type="checkbox"/> Primer Pairs	
Total pairs tested:	7885
Amplicon Length test passed:	691
Avoid Excluded regions test passed:	691
Tm Difference test passed:	691
Amplicon Tm test passed:	630

<input type="checkbox"/> TaqMan Probes	
Total probes tested:	14450
GC test passed:	14128
Ambiguity test passed:	1178
Tm test passed:	1178
Avoid Excluded regions test passed:	1178
Repeat test passed:	1126
Self compare test passed:	1076
Sequence compare passed:	475
Reverse sequence compare passed:	458
Probe start test passed:	351

Design primeru a sond

www.appliedbiosystems.com

Home Products Applications & Technologies Services Support Learning & Events Store Help

Log In or Register to see your product prices & to place orders. Enter search term All Categories

Products > Real-Time PCR > Gene Expression Assays, Plates & Arrays > Assays > TaqMan® Gene Expression Assays

TaqMan® Gene Expression Assays

Click a tab below to learn more about TaqMan Gene Expression Assays. To find and order assays, click the Search tab.

Ordering Information **Assay Search** Product Description Specifications Literature/Support Related Products

To begin, select a search method below

- **Keyword:** Search by gene symbol, gene name, public accession number, biological process, or molecular function.
- **Batch ID:** Search by uploading a file containing multiple assay IDs, RefSeq accession numbers, GenBank GI #s, LocusLink IDs, gene symbols, IMAGE Clone IDs, or species.

Keyword Search | Batch ID Search

Search for in

Disable wildcard search

[Advanced Keyword Search](#)

Choose Species

H. sapiens A. thaliana R. norvegicus D. melanogaster M. musculus C. elegans M. mulatta (Rhesus) C. familiaris (Canine) D. rerio (Zebrafish) B. taurus (Cow) G. gallus (Chicken) O. cuniculus (Rabbit) S. scrofa (Pig)

Filter by Amplicon Lengths

Amplicon length less than 70
 Amplicon length between 71 and 85
 Amplicon length between 86 and 100
 Amplicon length greater than or equal to 101

Choose Set Membership

Search All Assays (excludes Gene Copy Number Assays)
 Search Gene Copy Number Assays
 Limit Assay Sets to:

TARGET CLASS	ASSAY ATTRIBUTE	MICROARRAY VALIDATION	COLLABORATOR SETS
<input type="checkbox"/> Apoptosis	<input type="checkbox"/> Ambion siRNA	<input type="checkbox"/> 1700	<input type="checkbox"/> Immune Tolerance Network
<input type="checkbox"/> Fusion Transcripts	<input type="checkbox"/> Endogenous Controls	<input type="checkbox"/> 3' Most	<input type="checkbox"/> Mammalian Gene Collection

Ordering Information **Assay Search** Product Description Specifications Literature/Support Related Products

Your search for **C-Fos in All Text** returned 27 results. (Species: Homo sapiens Amplicon Length: ALL Set Membership: ALL) If you wish to refine your search results by product availability, click a radio button below, and then click Filter Results. To filter your results by other criteria, select from the categories list to the left of your results.

Previous | 1 | 2 | Next

View Results by Category

All Results/
Panther Classification:
 Panther Function (26)
 Panther Process (26)

Filter Results by availability

Inventoried Assays Made to order Assays Inventoried and Made to order Assays



Please Log In to add products to your Shopping Basket/Favorites, **configure a product**, or to view products available for purchase in your country.

25 items/page

Assay ID	Availability	Gene Symbol	Gene Name	Alias	RefSeq	GenBank mRNA	Species	Amplicon Length
1. Assay ID Details: Hs00170630_m1 Alignment Map siRNAs & Related Products	Inventoried	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	AP-1 C-FOS	NM_005252.2	5 GenBank mRNAs	Homo sapiens	77
2. Assay ID Details: Hs9999140_m1	Inventoried	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	AP-1 C-FOS	NM_005252.2	5 GenBank mRNAs	Homo sapiens	77

Assay ID	Availability	Gene Symbol	Gene Name	Alias	RefSeq	GenBank mRNA	Species	Amplicon Length
1. Assay ID Details: Hs00170630_m1 Alignment Map siRNAs & Related Products	Inventoried	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	AP-1 C-FOS	NM_005252.2	5 GenBank mRNAs	Homo sapiens	77
							Homo sapiens	78
							Homo sapiens	67


Design primerů a sond

Roche Applied Science  Czech Republic [Login](#) [Quick Order](#) [Shopping Cart](#) [Help](#) [Contact Us](#) 

[Home](#) [Products](#) [Special Interest Sites](#) [Support & Resources](#) [News](#)

[Home](#) > [Special Interest Sites](#) > [Genomic Systems](#) > [Real-Time PCR Systems](#) > **Universal ProbeLibrary System**

Universal ProbeLibrary



- Real-Time PCR Systems
 - LightCycler® Carousel-Based System
 - LightCycler® 480 System
 - Universal ProbeLibrary System**
 - System Description
 - Technology
 - Assay Design Center
 - User Statements and Application
 - Assay List
 - Performance
 - Product List
 - Support
 - Literature and References
 - Multimedia Presentations
 - Product Information and Pack Inserts

Gene Expression Quantification with Real-Time PCR - Simple and Fast

- ◆ Design real-time qPCR assays online in seconds.
- ◆ Rely on just 165 prevalidated probes for over five million qPCR assays for a large variety of organisms.
- ◆ Reduce the cost of gene expression analysis by performing multiplex qPCR assays with Universal ProbeLibrary Reference Gene Assays.

Universal ProbeLibrary for Human

Roche Applied Science

Specify your target(s):

[Advanced primer3 settings](#)

By sequence ID, gene name or keyword

e.g. ENST00000331789, NM_001101 or X00351 or beta-actin

or

By sequence

e.g.
>part of X00351 Human mRNA for beta-actin
CACGGCATCGTCACCACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCACACCTTCTACAAT
GAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCACCCCGTGTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCC
AAGGCCAACCCGAGAAAGATGACCCAGATCATGTTGAGACCTTCAACCCCCAGCCATG
TACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTACGCCTCTGGCCGTACCCTGSCATCGTG
ATGGACTCCGGTGACGGGGTACCCACACTGTGCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCCC

- Automatically select an intron spanning assay. Design multiplex PCR with reference gene.

www.universalprobelibrary.com

Design primeru a sond

Please choose the sequence(s) you would like to continue with. You can select up to 10 sequences.

- ▼ Real-Time PCR Systems
 - ▶ LightCycler® Carousel-Based System
 - ▶ LightCycler® 480 System
- ▼ Universal ProbeLibrary System
 - ▶ System Description
 - ▶ Technology
- ▼ Assay Design Center
 - ▶ Pack Inserts
 - ▶ Assay Design Guide
 - ▶ Quick Reference
 - ▶ Probe No. Conversion
 - ▶ Need Help?
 - ▶ User Statements and Application
 - ▶ Assay List
 - ▶ Performance
 - ▶ Product List
 - ▶ Support
 - ▶ Literature and References
 - ▶ Multimedia Presentations
 - ▶ Product Information and Pack Inserts

Name	Length	Description
<input type="checkbox"/> ENST00000400991.1	2669	AL139130.28-201 Clone_based_ensembl_transcri Transcriptional activator of the c-fos promoter CROC4 (CROC-4). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q8N964]
<input type="checkbox"/> ENST00000303562.2	2103	FOS-201 HOMO sapiens automatic transcript Proto-oncogene fos (G0/G1 phase) [Source:UniProt/SPTREMBL;Acc:Q8N964]
<input type="checkbox"/> ENST00000297904.2	2110	FIGF-001 HOMO sapiens endothelial growth factor (c-fos-inducible) [Source:UniProt/SPTREMBL;Acc:Q8N964]
<input type="checkbox"/> NM_003367.2	1732	Homo sapiens c-fos interacting protein 2 (USF2) transcript variant 1, mRNA.
<input type="checkbox"/> NM_207291.1	1531	Homo sapiens c-fos interacting protein 2 (USF2) transcript variant 1, mRNA.
<input type="checkbox"/> NM_003131.2	4343	Homo sapiens response element binding protein 1 (SRF), mRNA.
<input type="checkbox"/> NM_004469.2	2128	Homo sapiens vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), mRNA.
<input type="checkbox"/> AB022275.1	300	Homo sapiens partial cds.
<input type="checkbox"/> AB022276.1	700	Homo sapiens partial cds.
<input type="checkbox"/> AB209128.1	5672	Homo sapiens (c-fos serum) transcription factor 2 (USF2) transcript variant 1, mRNA.
<input type="checkbox"/> AF126533.1	238	Homo sapiens (c-fos serum) transcription factor 2 (USF2) transcript variant 1, mRNA.

ProbeFinder has designed the optimal real-time PCR assay for:

[NM_003367.2](#) Homo sapiens upstream transcription factor 2, c-fos interacting (USF2), transcript variant 1, mRNA.

Assay details:

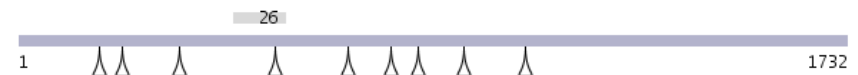
Use Universal ProbeLibrary probe: #26, cat.no. 04687574001

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	18	449 - 466	60	67	gtgacccaggtgggtgtg
Right Primer	21	540 - 560	59	43	tgaaggatttttgatcacag

Amplicon (112 nt)

```
gtgacccaggtgggtgtggaaggagccagcggggccccgcccgcctctgtg
ccccaggtcctgcagccctcccgctggtgatccaaatccctca
```

Transcript overview:



Detailed view:



Design primerů a sond



Po dnešní přednášce:

- Rozumíte vlastnostem primerů i základních typů sond a znáte faktory, které ovlivňují jejich hybridizaci a účinnost
- Umíte navrhnout optimální sekvenci primerů i hydrolyzační sondy pomocí dostupných programů a rozumíte parametrům designu

