

"" 7700 SDS Workshop ""

Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie

Vers. 2.1

**Dr. Thomas A. Schild
Applied Biosystems GmbH
Weiterstadt**

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung in die TaqMan™ PCR	04
2. Kriterien für die Auswahl von TaqMan™ PCR Sonden	08
2.1 Chemische Grundlagen	08
2.2 Sonden-Design	09
2.2.1 Platzierung des Quenchers	09
2.2.2 Quenching	10
2.2.3 Hybridisierung	11
2.2.4 Platzierung der Sonde	12
2.2.5 Die Sondauswahl in Stichworten	12
3. Das TaqMan™ PCR Assay	13
3.1 Spezifität	13
3.2 Reaktionsbedingungen	13
3.3 Strategien zur Optimierung einer TaqMan® PCR	15
3.3.1 Quantifizierungsstrategien	17
3.3.2 Optimierung einer quantitativen TaqMan® PCR	36
3.3.3 Optimierung der Allel-Differenzierung	47
3.4 Positiv/Negativ-Analysen	56
4. Die ABI PRISM™ Sequence Detection Produktlinie	60
4.1 Das ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System	60
4.2 Das ABI PRISM™ 7200 Sequence Detection System	62
4.3 Software und Dateninterpretation	62
4.3.1 Begriffe und Definitionen	62
4.3.2 Von der Fluoreszenzemission zur Datenaufnahme	63
4.4 ABI PRISM™ Sequence Detection Software (Vers. 1.6)	64
4.4.1 Setup View	66
4.4.2 Analysis View	72
4.5 Anwendung des Plattentypus Allelic Discrimination	84
4.5.1 Der Weg von den Rohdaten zur Allel-Bestimmung	89
4.6 Plus/Minus Analysen	91
4.7 Schnellprotokoll zum Starten des 7700 SDS	95
4.8 Schnellprotokoll zur Datenanalyse	98
4.9 Der Event-Log	101

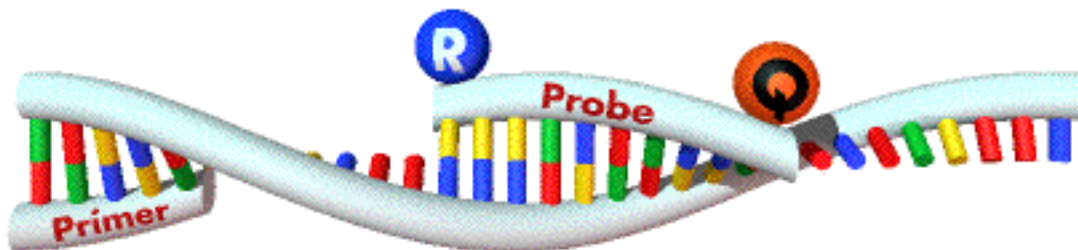
5.	Tips & Tricks	102
5.1	Schnellbefehle über Tastenkombinationen	102
5.2	Verwendung von TAMRA als Passive Referenz	103
5.3	Abnahme der Passiven Referenz	104
5.4	Einsatz der Spektralen Kompensation	104
5.5	Probleme durch erhöhten Hintergrund	105
5.6	Exportieren von Daten	106
5.7	Troubleshooting Guide	107
6.	Quantitative β-Actin TaqMan™ PCR	114
7.	Literatur	118

1. Einführung in die TaqMan™ PCR

Die Mitte der Achtziger Jahre entwickelte Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und sehr sensitive Methode in der DNA-Analytik (1). Es handelt sich dabei um eine durch spezifische Primer-definierte enzymatische in vitro Replikation, bei der durch sich wiederholende Zyklen eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht wird. Trotz der wesentlichen Erleichterungen in der täglichen Laborarbeit, die diese verhältnismäßig leicht zu automatisierende Methode mit sich gebracht hat, bedeutet der sensitive, reproduzierbare und spezifische Nachweis der PCR-Produkte noch immer einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand: Methoden, wie Southern-, Dot- und Reverse Dot Blotting (2, 3, 4) bestehen aus mehreren Fixierungs- und Waschschritten. Andere Techniken wiederum, wie z.B. Restriktionsanalysen, erfordern zusätzliche Inkubations- sowie Gelelektrophoretische Arbeiten. Neben dem hohen Zeitaufwand dieser und anderer Techniken, sind außerdem zum Teil sehr hohe Reagenzienkosten sowie die Gefahr der Carry-Over Kontamination zu berücksichtigen.

Um das Automatisierungsniveau der PCR zu erhöhen, war man deshalb schnell bemüht, ein sogenanntes homogenes Assay zu entwickeln, bei dem Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden.

Abb.1: Einfluß der 5´-3´-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase auf eine Fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan™ PCR.

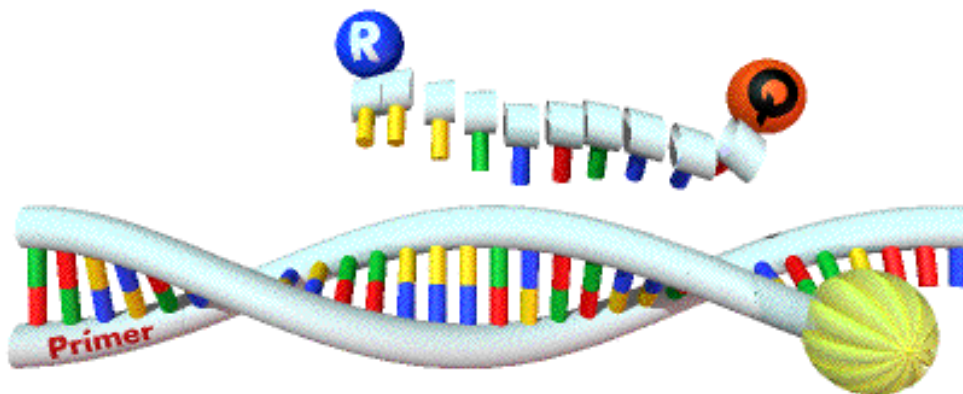


1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer (Abbildung zeigt die Anlagerung des Forward Primers)

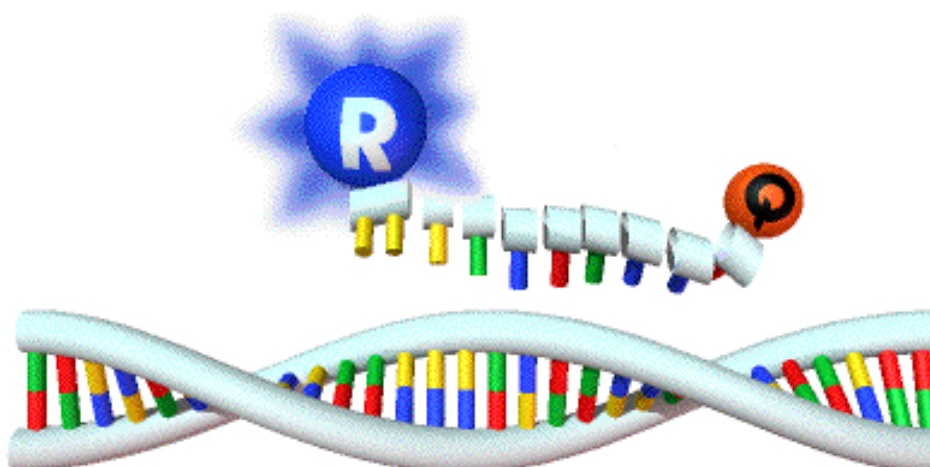
Abb.1: Einfluß der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase auf eine Fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan™ PCR (Fortsetzg.)



2. Primer-Extension und Sondenhydrolyse



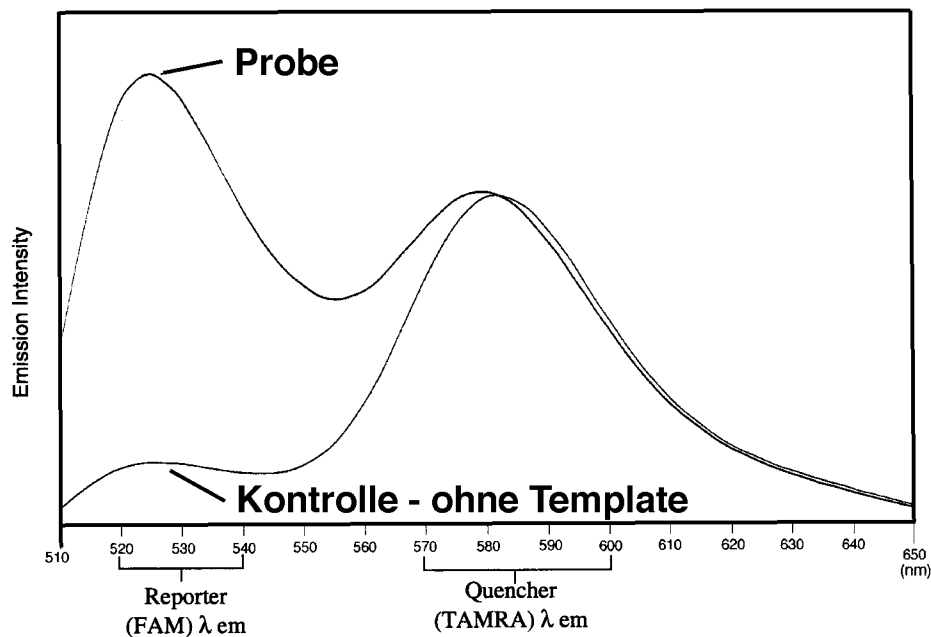
3. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt



4. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle wächst das Reporter-Signal

Dies gelang erstmals 1991 mit dem von HOLLAND et al. (5) beschriebenen 5' Nuclease PCR Assay unter Ausnützung der 5'-Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase zur Detektion der Sequenz-spezifischen Amplifikation. Allerdings erforderte diese Technik ein aufwendiges Post-PCR-Processing. So wurden ^{32}P -markierte Sonden verwendet und Sondenfragmente von intakten Sonden mittels Dünnschichtchromatographie im Anschluß an die Reaktion unterschieden. Erst mit den von Lee et al. 1993 (6) bei Applied Biosystems entwickelten fluorogenen Sonden wurde es möglich, den Abbau der Sonde ohne aufwendige Post-PCR-Schritte zu detektieren. Dieses sogenannte TaqMan™ PCR Assay basiert auf dem ursprünglichen 5'-Nuclease-Assay und macht sich zunächst ebenfalls die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase zu Nutze (s. Abb. 1). Hierfür wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluorescein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist.

Abb. 2: Überlagerung der Emissions-Scans von Proben mit und ohne Template, post-PCR.



Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt (s. Abb. 2). Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert und

die Sonde geschnitten wird. Freie, nicht-hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Kommt es jedoch zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche Nähe - und damit auch der FRET - zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters also mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht 100 %ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase aktiviert wird. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe wird mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfaßt.

2. Kriterien für die Auswahl von TaqMan™ PCR Sonden

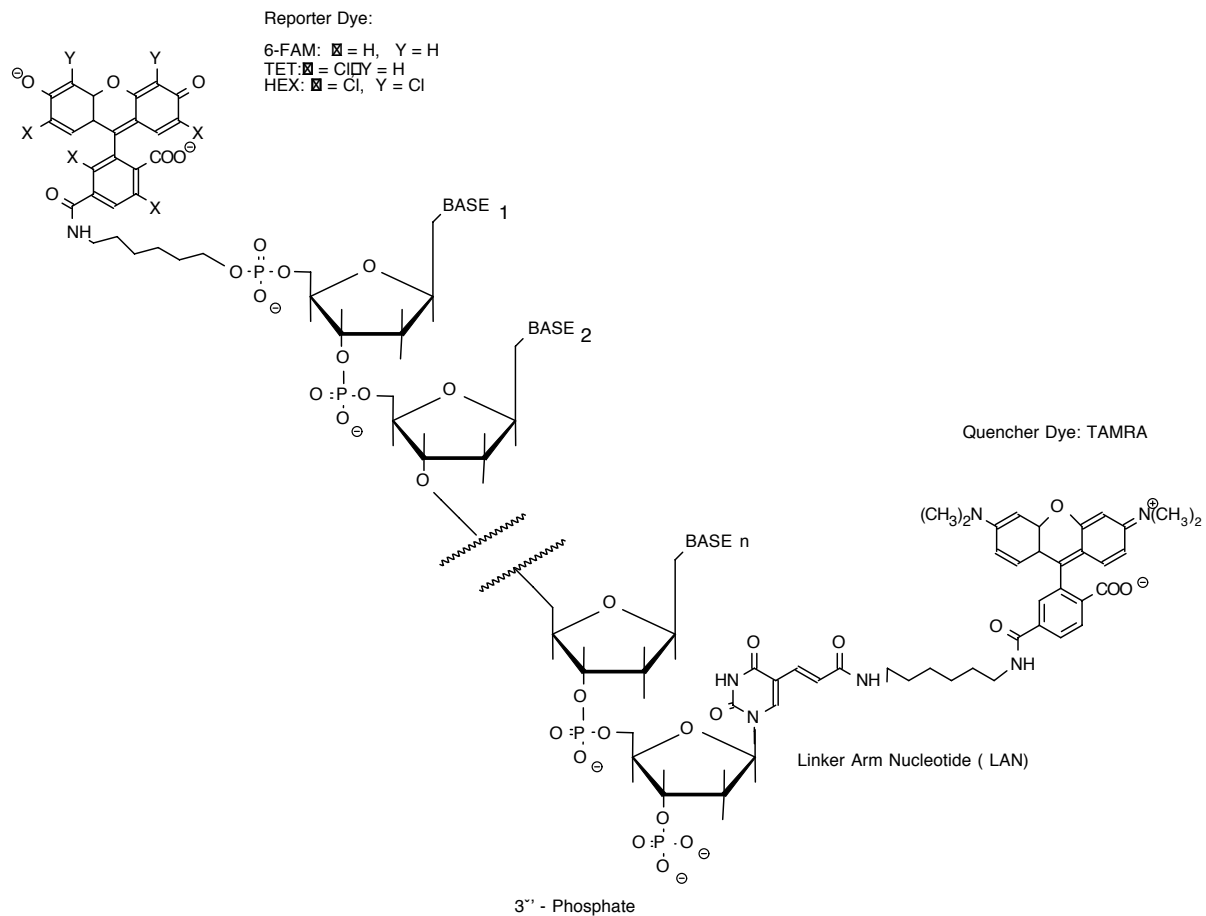
2.1 Chemische Grundlagen

Wie bereits beschrieben, besitzt eine TaqMan PCR Sonde die folgenden Charakteristika:

- 5'-Reporter-Farbstoff,
- 3'-Quencher-Farbstoff,
- 3'-OH-blockierendes Phosphat.

Der fluoreszente Reporterfarbstoff ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Standardmäßig wird FAM als Reporter eingesetzt. Weitere Farbstoffoptionen können Tab. 1 entnommen werden. Den verschiedenen Reporterfarbstoffen (Multiplex-Anwendung des TaqMan™ PCR Systems sind also möglich) steht jeweils der Quencher-Farbstoff TAMRA gegenüber. TAMRA wird über ein Linker-Arm-modifiziertes- Nukleotid (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden (s. Abb. 3). Schließlich wird die Sonde noch chemisch phosphoryliert, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden.

Abb. 3: Darstellung der chemischen Struktur einer TaqMan™ PCR Sonde.



Tab. 1: Zusammenfassung der Daten der fluoreszenten Farbstoffe, die bei der TaqMan™ PCR eingesetzt werden (R = Reporter, Q = Quencher, P = Passiver Referenzfarbstoff).

Farbstoff	chemische Bezeichnung	Typ	Anregung [nm]	Emission [nm]
FAM	6-Carboxy-Fluorescein	R	488	518
TET	Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein	R	488	538
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein	R	488	554
HEX	Hexachloro-6-carboxy-fluorescein	R	488	556
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	P	488	602
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin	Q	488	582

Ausgangsmaterial für die 5'-Markierung der Sonde ist das Standard DNA-Phosphoramidit 6-FAM. LAN-TAMRA wird als Ersatz eines 3'-terminalen T bzw. zusätzlich zur Sondensequenz angefügt. Das 3'-Ende der Sonde wird mittels „Phosphalink“ blockiert. Die Synthese kann z.B. auf dem ABI 394 DNA Synthesizer (Applied Biosystems) durchgeführt werden.

2.2 Sonden-Design

Um eine möglichst optimale TaqMan™-Sonde auszuwählen, müssen zunächst drei entscheidende Faktoren berücksichtigt werden, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

2.2.1 Platzierung des Quenchers

Durch die räumliche Nähe von Reporter- und Quencher-Fluorophor kommt es nach Förster (7) zu einem FET. Die Effizienz des FET ist dabei umgekehrt proportional zur 6. Potenz des Abstands der beiden Farbstoffe. Deshalb ging man in ersten Arbeiten zur TaqMan™ PCR davon aus, daß es ratsam wäre den Quencher möglichst nahe bei dem mit dem Reporter markierten 5'-Ende des Oligonukleotids zu platzieren, um einen ausreichenden FET zu erzielen. Nachfolgende Untersuchungen (8) haben jedoch gezeigt, daß der Quencher direkt an das 3'-Ende der Sonde geknüpft werden kann. Dieser Sondenbau besitzt einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu einem intern platzierten Quencher: Sitzt der Quencher intern, so wird eine Sondenhydrolyse nur dann nachweisbar, wenn die Hydrolyse auch tatsächlich zwischen den beiden Farbstoffen erfolgt. Da der erste Schnitt endonukleolytisch

erfolgt (meist nach den Basen 1-3 der Sonde), an welcher Position innerhalb der Sonde jedoch nicht vorhergesagt werden kann, stellte die interne Quencher-Plazierung tatsächlich ein großes Problem bei der Reaktionsoptimierung dar. Bei einem am 3'-Ende plazierten Quencher ist hingegen stets gewährleistet, dass der erste, endonukleolytische Schnitt auch wirklich detektiert wird. Dieser Sondaufbau stellt daher sicher, dass die Bildung des PCR-Produkts in vollem Umfang nachgewiesen werden kann.

Ein weiterer Vorteil eines 3'-Quenchers ist eine verbesserte Hybridisierungs-effizienz der Sonde. Wie bereits beschrieben, wird TAMRA post-synthetisch über ein LAN an die Sonde gekoppelt. Ein LAN (Linker Arm Nucleotide) ist ein Thymin mit einem C₆-Linker Arm, der an die 4'-Position des Thymin-Rings geknüpft ist. Diese Konstellation verschlechtert jedoch die Basenpaarungseigenschaften des Thymins, weshalb ein niedriger T_m sowie eine verschlechterte Hybridisierungs-effizienz zu befürchten sind. Die möglichen Probleme sind bei einer Plazierung des Quenchers am 3'-Ende der Sonde am geringsten. Dadurch verbindet dieser Sondaufbau ein ausreichendes Quenching mit bester Hybridisierungs- und Hydrolyse-Effizienz. Dabei ist es nicht einmal erforderlich, dass die ausgesuchte Sequenz mit einem T endet!

Eine Ausnahme hierzu kann jedoch die Allel-Typisierung mittels TaqMan™ PCR sein. Dabei wird der die Hybridisierung auflockernde Effekt einer Basenfehlpaarung ausgenutzt. Ziel ist es, nur die korrekt angelagerte Sonde zu hydrolysieren, während die zum anderen Allel passende zweite Sonde von der AmpliTaq DNA Polymerase verdrängt wird noch bevor es zu einer Hydrolyse durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität kommt (6, 9). Eine Plazierung des Quenchers am 3'-Ende der Sonde birgt daher bei der Allel-Typisierung die Gefahr einer Hydrolyse trotz Basenfehlpaarung in sich. Für diesen Ansatz kann eine interne Plazierung des Quenchers von Fall zu Fall vorteilhafter sein. Der destabilisierende Effekt einer Punktmutation ist am stärksten, wenn sich diese in der Mitte des Oligonukleotids befindet.

2.2.2 Quenching

Den wohl größten Einfluß darauf, ob der Quenching-Effekt noch ausreichend ist oder nicht, hat der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren. Je weiter Reporter und Quencher voneinander entfernt sind, desto stärker gewinnt die Mg²⁺-Ionenkonzentration an Einfluß auf das Quenching (8). Wahrscheinlich nehmen Sonden in einer Mg²⁺-armen Reaktionsumgebung aufgrund elektrostatischer Abstoßung der negativen Ladungen der Phosphatreste des Moleküls eine gestreckte Form an. Dadurch würde der negative Einfluß des Abstands zwischen den Fluorophoren auf den Quenching-Effekt zunehmen. Durch Bindung von Mg²⁺ können diese Abstoßungskräfte neutralisiert werden. Somit gewinnt die Sonde wieder an Flexibilität und kann sich falten. Dadurch gelangen 5'- und 3'-Ende der Sonde wieder relativ zueinander in Nähe und ein Quenching wird möglich. Typische MgCl₂-Konzentrationen liegen bei der TaqMan™ PCR daher zwischen 3,5 und 6 mM. Die Sondenflexibilität wird außerdem von Sekundärstrukturen oder Selbstkomplementarität (Hairpins, etc.) der Sonde beeinflusst. Gerade diese schwer zu kontrollierenden Einflüsse können die Auswahl einer optimalen Sonde erschweren.

Neben der Sondenflexibilität besitzen weitere sekundäre Faktoren ebenfalls einen Einfluß auf das Quenching. So sollte z.B. ein G am 5'-Ende der Sonde vermieden werden, da es selbst nach der Sondenhydrolyse noch in der Lage ist, den daran gebundenen Reporter in gewissem Umfang zu quenchen. Schließlich ist noch die Reinheit der Sonde von entscheidender Bedeutung, da Reporter-markierte Sonden denen der Quencher fehlt z.B. die Fluoreszenz des Reporters so stark erhöhen könnten, daß eine Veränderung der Reporter-Intensität nach der PCR kaum noch meßbar werden könnte.

2.2.3 Hybridisierung

Damit es zu einer Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase kommen kann, muß die Sonde zuvor stabil an die Zielsequenz hybridisiert haben. Um dies zu erreichen, können die bekannten Regeln zur Auswahl von Sonden angewandt werden. So sollte der GC-Gehalt der Sonde etwa 50 % betragen (20-80 % repräsentieren die untere- bzw. obere Grenze), mehr als drei Nukleotide eines Typs in Folge vermieden werden (hierbei sind insbesondere Poly(G)-Bereiche zu vermeiden!) und auch keine Komplementarität zu den beiden PCR-Primern bestehen.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist, daß das Sonden-Template-Hybrid im Gegensatz zum Primer-Template-Hybrid nicht zur Extension kommt und daher auch nicht von der AmpliTaq DNA-Polymerase stabilisiert wird. Um diese höhere Stabilität der Primer-Template Anbindung zu kompensieren, sollte der nach der Nearest Neighbour Methode (10) bestimmte T_m der Sonde um ca. 5-10°C über dem der PCR-Primer liegen.

Die Bestimmung der T_m s von Primern und Sonden sollte nach der Nearest-Neighbour-Methode erfolgen, da diese Formel zur Zeit die wohl genaueste Schätzung des tatsächlichen T_m s ermöglicht. Diese Formel liegt auch dem Programm „Primer Express“ (Applied Biosystems) zugrunde, das erstmals die Auswahl von 3 korrespondierenden Oligonukleotiden - also vollständiger TaqMan® Systeme - ermöglicht.

Um eine ausreichende Spezifität zu erzielen, sollte die Länge der Sonden ca. 20-30 Nukleotide betragen, wobei die optimale Länge zwischen 24 und 30 Nukleotiden liegt. Die obere Grenze für die Sondenlänge scheint bei 35 Nukleotiden zu liegen, da

- längere Sonden aufgrund von Sekundärstrukturausbildungen bei der Hybridisierung Probleme verursachen,
- die Kontrolle der Hybridisierungstemperatur aufgrund der hohen T_m s bei längeren Sonden kaum noch möglich ist,
- die Kosten für längere Sonden aufgrund der schlechteren Ausbeute unverhältnismäßig steigen.

Bei Amplicons mit sehr hohem G/C-Gehalt wurden jedoch auch bereits Sonden von nur 15 Basen Länge erfolgreich eingesetzt.

2.2.4 Platzierung der Sonde

Es ist prinzipiell möglich, die Sonde überall innerhalb des Amplicons zwischen den beiden Primer-Sequenzen zu plazieren. Es sollte der Strang ausgewählt werden, der mehr Cs als Gs (innerhalb der Sondensequenz) enthält. Das 5'-Ende der Sonde sollte idealerweise relativ nahe beim 3'-Ende des PCR-Primers liegen. Einen Mindestabstand zwischen der Sonde und dem korrespondierenden Primer gibt es nicht, d.h. beide Sequenzen dürfen direkt aneinander grenzen, sich jedoch nicht überlappen. Gute Erfahrungen wurden bei einer Entfernung von < 50 bis maximal 60 Basen gemacht, was in etwa der Prozessivität der AmpliTaq™ DNA Polymerase entspricht. Dadurch wird sichergestellt, das möglichst schon das erste an der Extension des Primers beteiligte Enzymmolekül auf die hybridisierte Sonde trifft und sie hydrolisieren kann.

2.2.5 Die Sondenauswahl in Stichworten

Folgende Punkte sollten bei der Sondenauswahl berücksichtigt werden:

1. Lage: Das 5'-Ende der Sonde sollte sich in relativer Nähe des 3'-Endes des PCR-Primers befinden
2. Länge: 20-30 Basen
3. GC-Gehalt: 40-60%
4. T_m : Primer- T_m um ca. 5-10°C unter dem Sonden- T_m
5. Position des Quenchers: Generell am 3'-Ende, jedoch bei Allel-spezifischer TaqMan™ PCR gegebenenfalls auch innerhalb der Sonde
6. Das LAN-TAMRA entweder anstelle eines 3'-terminalen T oder als Sequenzzusatz anfügen
7. Am 5'-Ende der Sonde kein G!
8. Nie mehr als 3x die selbe Base hintereinander (insbesondere keine Poly-Gs)
9. Falls bei einer gegebenen Sondensequenz auch der komplementäre Strang verwendet werden kann, sollte der C-haltigere Strang ausgewählt werden
10. Keine Komplementarität zwischen Sonde und PCR-Primern
11. Möglichst keine auffälligen Sekundärstrukturen im Zielbereich, sowie bei Primern und der Sonde!

PE Applied Biosystems bietet für die automatische Sondenauswahl die Software „**Primer Express**“ an, die obige Parameter berücksichtigt.

3. Das TaqMan™ PCR Assay

3.1 Spezifität

Da eine Hydrolyse der TaqMan™-Sonde durch die 5´-3´-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase nur dann erfolgen kann, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Template kommt, wird das Fluoreszenz-Signal nur generiert, falls es zu einer Amplifikation der Zielsequenz kommt. Das bedeutet andererseits, daß unspezifische Nebenprodukte nicht detektiert werden. Durch die in die PCR integrierte Sondenhybridisierung erreicht das TaqMan™ PCR Assay das Spezifitätsniveau konventioneller Hybridisierungstechniken, jedoch ohne zusätzliche Post-PCR -Schritte. Da der Anstieg der Fluoreszenz der Anreicherung an Amplifikat somit direkt proportional ist, liefert das TaqMan™ PCR System hervorragende quantitative Ergebnisse.

3.2 Reaktionsbedingungen

Die Hybridisierung der Sonde wird im Gegensatz zu den PCR-Primern während der Extensionsphase nicht zusätzlich durch die AmpliTaq DNA Polymerase stabilisiert . Dies hat folgende Konsequenzen für die TaqMan™-Reaktion:

- der T_m der Sonde sollte mindestens 5°C über dem der PCR-Primer liegen,
- möglichst keinen 72°C-Extensionsschritt, sondern besser 2-Schritt-PCR mit kombiniertem Annealing/Extensions-Schritt (>55°C) bei einer Temperatur unter dem T_m der Sonde,
- höhere MgCl₂-Konzentrationen (3,5-6 mM), um die Anbindung der Sonde zu stabilisieren und so die Anwendung höherer Temperaturen beim kombinierten Annealing/Extensions-Schritt (höhere Extensionsrate der AmpliTaq DNA Polymerase) zu ermöglichen.

Es empfiehlt sich den tatsächlichen T_m , bei dem optimale Ergebnisse erzielt werden, empirisch zu bestimmen (wobei größere Abweichungen vom berechneten T_m auftreten können).

Die **TaqMan™-Sonde** wird üblicherweise in Konzentrationen im Bereich von 50-200 nMol/50 µl Reaktion eingesetzt. Die optimale Sondenkonzentration ist vom Fluoreszenz-Hintergrund sowie der Primer-Konzentration abhängig. Das Reporter-Fluoreszenz-Signal der Ohne-Template-Kontrollen sollte mindestens dreimal so hoch sein, wie das Signal einer Puffer-Leerprobe.

Für die Auswahl der **PCR-Primer** gelten die allgemein gültigen Regeln:

- Länge 18-30 Basen
- G+C-Gehalt: ca. 20-80 %
- möglichst keine Poly(T)-Bereiche (unspezifische Bindungen)
- möglichst keine palindromischen Sequenzabschnitte

- keine 3´-Komplementarität (Primer-Dimer-Gefährdung)
- T_m nach PrimerExpress: 58-60°C
- Amplicon-Länge: optimal ca. 75-150 bp (jedoch sind auch längere Amplifikate möglich)
- HPLC-Aufreinigung

Übliche Primerkonzentrationen in der TaqMan™ PCR liegen bei 0,2 bis 0,5 µM. Es empfiehlt sich jedoch die tatsächliche optimale Konzentration durch Austesten der Primer im Bereich von 0,05 bis 0,9 µM zu ermitteln (Primer-Matrix, s. S. 44).

Von der Menge der zu Beginn der PCR eingesetzten **Matrizen-Moleküle** hängt die Zahl der **PCR-Zyklen** ab, die benötigt werden um ein ausreichendes Signal zu erhalten. Etwa 10.000 Startkopien und 25-30 Zyklen sind für den Beginn einer Optimierung ausreichend.

Abb. 4: Single-copy Gen Kopienzahl in der DNA verschiedener Organismen.

1 µg humane DNA	3x10⁵ Kopien
10 ng Hefe DNA	3x10⁵ Kopien
1 ng E. coli DNA	3x10⁵ Kopien

Als Faustregel können die in Tab. 2 in Abhängigkeit der Matrizen-Zahl beschriebenen Zyklenzahlen angewendet werden.

Tab. 2: PCR-Zyklenzahl in Abhängigkeit von den zu Beginn der Reaktion eingesetzten Matrizen-Moleküle.

Kopienzahl	PCR-Zyklenzahl
10 ⁵	20-25
10 ⁴	25-30
10 ³	30-35
1-100	40

Bei der TaqMan™ PCR kommt dem **MgCl₂** neben seiner Funktion als essentiellm Co-Faktor der AmpliTaq DNA Polymerase-Enzymfunktion eine weitere Bedeutung für die Höhe eines positiven Signals zu, da es einen großen Einfluß auf die effiziente Anbindung der TaqMan-Sonden während der Annealing/Extensions-Reaktion besitzt (s.o., s. Kapitel 2.2.3). Selbstverständlich kann es dabei zu einer Zunahme unspezifischer Produkte kommen, die jedoch durch die Sonden-abhängige Detektion kein Problem der Analyse darstellen. Im Gegenteil werden in vielen Fällen deutlich bessere Signale bei höheren Mg²⁺-Konzentrationen gemessen, da die Sonde

während der Reaktion stabiler anbindet und somit ein höheres Reporter-Signal erzielt werden kann. Es empfiehlt sich daher verschiedene Mg^{2+} -Konzentrationen im Bereich von 2-6 mM, in manchen Fällen sogar bis 10 mM auszutesten. Veränderungen in der DNA- und Primer-Konzentration, insbesondere jedoch der dNTP-Konzentration haben einen Einfluß auf die Konzentration des freien Magnesiums und sollten berücksichtigt werden. Ebenfalls sollte beachtet werden, ob durch z.B. anders aufgearbeitetes DNA-Material eine höhere Konzentration von Chelatoren wie z.B. EDTA in den PCR-Ansatz gelangt.

3.3 Strategien zur Optimierung einer TaqMan® PCR

Es gibt eine Reihe von Parametern, die in der TaqMan® PCR einen Einfluß auf die Signalintensität besitzen, wie z.B. die Mg^{2+} -Konzentration (s.o). Darüber hinaus besitzt jedoch der Aufbau des TaqMan® PCR Programms selbst einen signifikanten Einfluß auf die erfolgreiche Umsetzung eines geplanten Assays.

1. Denaturierung

Es empfiehlt sich vor der PCR eine einleitende Denaturierung von ≥ 1 min bei 94-96°C durchzuführen, um sicherzustellen, daß die DNA auch tatsächlich aufgeschmolzen wird. Dies erübrigt sich, wenn AmpliTaq Gold verwendet wird. Dies gilt insbesondere dann, wenn ein hoher GC-Gehalt der DNA-Doppelhelix zusätzliche Stabilität verleiht. In diesem Fall kann es sogar nützlich sein in den ersten PCR-Zyklen eine Denaturierungstemperatur von 95°C oder 96°C zu wählen, um sicherzustellen, daß die Strangtrennung effizient verläuft. Nach wenigen Zyklen sollte die Denaturierungstemperatur jedoch wieder auf $\leq 94^\circ\text{C}$ reduziert werden, da dann genügend PCR-Produkt angereichert worden ist, welches kürzer ist als die genomische DNA und daher auch effizienter denaturiert. Ein weiterer Grund hierfür ist, daß die Halbwertszeit der Taq DNA Polymerase bei 95°C 40 min beträgt und bei 97,5°C sogar auf nur 10 min sinkt. Eine zu hohe Denaturierungstemperatur über die ganze PCR würde also die Effizienz der Reaktion und damit auch die Signalintensität negativ beeinflussen. Für die Amplifikation GC-reicher Sequenzen sollten daher folgende Punkte berücksichtigt werden:

1. Erhöhte Denaturierungstemperatur in den ersten PCR-Zyklen.
2. Höhere Annealing-Temperaturen ($\geq 65^\circ\text{C}$)
3. Einsatz von PCR-Additiven wie Glycerin und/oder Formamid
4. u.U. Einsatz von 7-Deaza-2'-desoxy-GTP neben dGTP

Wird zum Schutz vor Carryover-Kontaminationen vor der PCR Uracil N-Glykosylase (AmpErase™ UNG) angewandt (11), so ist der PCR eine 2-minütige Inkubation bei 50°C vorzuschalten, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 95°C, um zum einen die nach dem Verdau durch UNG abasischen Carryover-Moleküle zu zerstören

und zum anderen UNG zu inaktivieren. Dabei wird die Template-DNA in den meisten Fällen ausreichend denaturiert und außerdem das empfohlene PCR-Enzym, AmpliTaq Gold, aktiviert.

AmpliTaQ Gold ist eine modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq DNA Polymerase. Das Enzym wird inaktiv geliefert und erst durch eine 9-12 minütige Inkubation bei 95°C irreversibel aktiviert. In seiner aktivierten Form entsprechen die Eigenschaften und Leistungsdaten dieses Enzyms denen der AmpliTaq DNA Polymerase, wodurch alte PCR-Protokolle übertragbar werden. Ein weiterer Vorteil der AmpliTaq Gold ist, daß ohne vorherige Aktivierung (Enzym besitzt keine Aktivität) komplette Master-Mixe ohne Gefahr von Primer-Dimer-Bildung vorpipettiert werden können, was die Automatisierung - insbesondere bei hohem Probendurchsatz - erleichtert. Solche Master-Mixe können über mehrere Tage hinweg im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

2. Annealing-Temperatur

Für die TaqMan™ PCR gilt, daß mit höheren Annealing-Temperaturen (>55°C) generell spezifischeres Produkt generiert werden kann. Die Annealing Temperaturen der Primer sowie der Sonde sollten zunächst nach der Nearest-Neighbour-Methode (10) bestimmt werden. Bei der Optimierung der Reaktion kann die tatsächliche Annealing-Temperatur dann in z.B. 2°C-Intervallen empirisch ermittelt werden.

3. Extensions-Temperatur

Die Dauer der Extension ist von der Länge des zu generierenden PCR-Produkts abhängig: Die Extensionsrate der AmpliTaq Gold beträgt zwischen 2000 und 4000 Basen pro Minute bei Temperaturen von 70°C bis 80°C.

Bei der Extension muß berücksichtigt werden, daß nicht nur die PCR-Primer stabil hybridisieren, sondern auch insbesondere die TaqMan™-Sonde. Aus diesem Grund sollte der T_m der Sonde um $\geq 5^\circ\text{C}$ dem T_m der Primer liegen (s. Kapitel 2.2.3). Eine höhere Mg-Ionenkonzentration wirkt stabilisierend auf die Hybridisierung der Sonde. Soll eine 3-Schritt-PCR etabliert werden, so empfiehlt es sich die Extensions-Temperatur $\leq 70^\circ\text{C}$ zu wählen, um die Hybridisierung der Sonde nicht zusätzlich zu destabilisieren und somit höhere $R_{\eta+}$ -Werte zu erzielen.

4. 2-Schritt PCR

Da die AmpliTaq Gold bereits bei Temperaturen von >55°C eine signifikante Aktivität besitzt (12), bietet es sich an Annealing und Extension zu einem gemeinsamen Schritt zusammenzufassen und somit auf eine separate Extension bei 72°C zu verzichten. Neben einer höheren Spezifität der PCR bei der Wahl von höheren Annealing-Temperaturen, hat die 2-Schritt PCR im Falle der TaqMan™ PCR noch

einen weiteren Vorteil: Da die Extension bei einer Temperatur <72° C durchgeführt wird, hat dies einen positiven Einfluß auf die Bindung der Sonde, so daß ihre Hydrolyse durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq® DNA Polymerase effizienter verlaufen kann. Als Ergebnis kann oftmals ein Anstieg des Sequenz-spezifischen Fluoreszenz-Signals verzeichnet werden. Für Amplicons < 1 kb genügt erfahrungsgemäß bereits ein 1-minütiger kombinierter Annealing-Extensions-Schritt bei 55°C!

5. Allel-spezifische TaqMan PCR

Aufgrund der Multiplexfähigkeit im Sonden-Design können mit Hilfe der TaqMan PCR auch Allele unterschieden werden. Dies gilt sogar für Punktmutationen, wobei das Standard-Sondendesign - die 5'-3'-Sondenmarkierung - beibehalten werden kann, wenn folgende Punkte berücksichtigt werden:

1. Die Platzierung der Punktmutation innerhalb der Sondensequenz sollte möglichst in der Mitte der Sonde erfolgen, da dort der destabilisierende Effekt einer Fehlpaarung am stärksten ist.
2. Falls der Polymorphismus in einer der Sonden eine Abnahme des G/C-Gehalts bewirkt, so empfiehlt es sich die betroffene Sonde um ein bis zwei Basen zu verlängern, um den niedrigeren T_m dieser Sonde zu kompensieren.
5. Bei der Optimierung eines Allel-spezifischen TaqMan-Assays sollten unterschiedliche Annealing/Extensions-Temperaturen verglichen werden.

niedrigere Temperaturen: Ergeben höhere ΔR_n -Werte, jedoch kann es passieren, daß zwei Allele nicht mehr unterschieden werden können.

höhere Temperaturen: Verbesserte Allel-spezifische Antwort, jedoch oft auch schwächeres Gesamtsignal. Ein Teil des Signalverlust kann durch Anwendung höherer PCR-Primerkonzentrationen kompensiert werden.

3.3.1 Quantifizierungsstrategien

Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer 100 %igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Sie kann daher mathematisch wie folgt beschrieben werden:

$$(1) \quad Y = X (1+E)^n$$

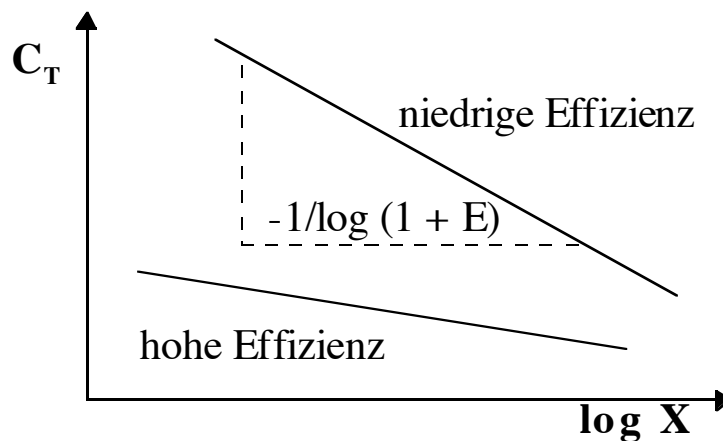
Dabei ist **Y** die Menge an hergestelltem Amplifikat, **X** die Startkopienzahl zu Beginn der PCR, **E** die Effizienz der Reaktion und **n** die Anzahl der PCR Zyklen.

Zur Erstellung einer Standardkurve wird diese Gleichung in ihre logarithmierte Form umgeschrieben:

$$(2) \quad \log Y = \log X + n \log (1+E)$$

Die graphische Darstellung erfolgt demnach mittels eines Graphen des C_T -Wertes (s. S. 63) über dem \log der Startkopienzahl ($\log X$):

Abb. 5: Graphische Darstellung des C_T -Wertes über dem \log der Startkopienzahl



Die Steigung (s) der Geraden leitet sich daraus wie folgt ab:

$$(3) \quad s = -1/(\log 1 + E)$$

Diese Gleichung kann mit den von der SDS-Software bei Erstellung der Standardkurve gelieferten Daten zur Berechnung der Effizienz (E) der Reaktion herangezogen werden:

$$\log (1 + E) = 1/s$$

$$1 + E = 10^{1/s}$$

$$(4) \quad E = 10^{1/s} - 1$$

Die Effizienz der PCR liegt umso höher, je kürzer das zu bildende Amplifikat ist. Deshalb werden für eine Quantifizierung mit dem 7700 SDS Amplifikatlängen von 75 - 150 bp empfohlen, obwohl auch mit längeren PCR-Produkten (< 400 bp) noch gute Ergebnisse erzielt werden.

Mit konventionellen Endpunktmethoden bestimmten ROLFS et al. 1992 (13) die Effizienzen für verschieden lange Amplifikate:

Tab. 3: Effizienz der PCR in Abhängigkeit von der Amplifikatlänge

Amplifikatlänge [bp]	Effizienz
606	0,48
388	0,49
286	0,57
106	0,76

Nach FERRE (14) liegt die Effizienz der Reaktion - ebenfalls mit Endpunktmethoden ermittelt - vom 15. bis zum 30. Zyklus und abhängig von der Startkopienzahl bei 70-80 %.

Diese, mit Endpunktmethoden bestimmten Reaktionseffizienzen, stellen jedoch nur eine Näherung an den tatsächlichen Reaktionsverlauf dar. Die kontinuierliche Erfassung der Reaktionsdaten mit Hilfe des 7700 SDS ermöglicht einen wesentlich detaillierteren Einblick in die Geschehnisse während der Amplifikation. Es zeigt sich, dass die Reaktionseffizienz bei den oben empfohlenen, sehr kurzen Amplifikatlängen, zum Zeitpunkt der Quantifizierung (C_T -Wert) zumeist deutlich über 90 % liegt.

Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Kapitel zur Quantifizierung sollen an dieser Stelle zunächst verschiedene Termini definiert werden:

Standard: Zur Erstellung einer Standardkurve verwendete Probe bekannter Konzentration.

Referenz: Signal, welches zur Normalisierung der experimentellen Ergebnisse verwendet wird. Man unterscheidet passive und aktive Referenzen.

Kalibrator: Probe, die als Grundlage für die Erstellung vergleichender Ergebnisse dient.

Ein Beispiel für eine aktive Referenz ist eine **endogene Amplifikationskontrolle**, z.B. die Co-Amplifikation eines sogenannten Housekeeping Gens, um bei der Quantifizierung von mRNA auf Unterschiede in der Gesamtmenge an RNA zu normalisieren. Ein weiteres Beispiel für eine aktive Referenz ist eine **exogene Amplifikationskontrolle**, d.h. eine vorcharakterisierte RNA oder DNA, die dem Probenmaterial in einer definierten Konzentration zugesetzt wird. Hierbei handelt es sich zumeist um ein in vitro Konstrukt. Eine solche Amplifikationskontrolle kann zum einen dazu verwendet werden, als **Interne Positivkontrolle (IPC)** PCR-Inhibitoren zu erfassen. Zum anderen kann über eine solche Kontrolle - wenn bereits vor der Nukleinsäureextraktion zugesetzt - auch die Effizienz der Nukleinsäureaufarbeitung erfaßt werden. Schließlich kann mit Hilfe dieser Kontrolle im Falle einer RT-PCR der Schritt der reversen Transkription kontrolliert werden. Unabhängig davon ist bei der

von uns empfohlenen Durchführung der TaqMan® PCR der Farbstoff ROX stets als passive Referenz enthalten.

Die Qualität einer quantitativen TaqMan® PCR steht und fällt mit den für die Quantifizierung gewählten Standards. Welch ein Aufwand bei der Herstellung eines Standards betrieben werden muß, zeigt sehr gut die Publikation von COLLINS et al. (15). Ein großes Problem ist es z.B. oftmals, den Standard als eine reine Spezies zu isolieren - d.h. frei von kontaminierender DNA bzw. RNA, durch die das Ergebnis der A_{260} -Messung fälschlich erhöht werden und somit letztlich auch eine zu hohe Kopienzahl pro Volumeneinheit bestimmt würde. Die Quantifizierung erfolgt **relativ** zu dem gewählten Standard, d.h. das Ergebnis (z.B. in Startkopienzahl einer definierten Sequenz) ist ein Zahlenwert, der das gemessene Signal einer unbekannt Probe im Vergleich zu den Werten vorquantifizierter Standards widerspiegelt. Prinzipiell unterscheidet man dabei zwei unterschiedliche Strategien:

1. Absolute Quantifizierung:

Ziel der absoluten Quantifizierung ist es, dem gemessenen Signal eine bestimmte Startkopienzahl oder Konzentration zuzuordnen. Bei einer absoluten Quantifizierung besitzt der Standard möglichst die gleiche Sequenz, wie die zu quantifizierende Zielsequenz: Gleiche Basenabfolge, identische Länge des Amplifikats und Verwendung der selben PCR-Primer stellen sicher, das die Effizienz der Amplifikation von Zielsequenz und Standards möglichst identisch verläuft.

Bei einer konventionellen Endpunktquantifizierung werden interne Standards verwendet, die im gleichen Reaktionsgefäß wie die zu quantifizierende Zielsequenz kompetitiv coamplifiziert werden und sich folglich in der Basenabfolge von dieser unterscheiden müssen. Durch die Echtzeit-Datenaufnahme mit Hilfe des 7700 SDS und der damit verbundenen automatischen Bestimmung der exponentiellen Phase ist es erstmals möglich, auch externe Standards für eine genaue und reproduzierbare Quantifizierung heranzuziehen.

Die zu quantifizierende Sequenz kann daher einfach (ohne Einfügung von Mutationen) amplifiziert und anschließend in einen Vektor eingebracht und kloniert werden. Enthalten die Vektoren geeignete Phagenpromotoren (z.B. T7 Promoter), so kann auch ein RNA-Standard (cRNA) wie er für die Quantifizierung von RNA erforderlich ist, in ausreichenden Mengen präpariert werden.

2. Relative Quantifizierung:

Bei dieser Form der Quantifizierung soll die Zielsequenz relativ in ihrer Expression zu einer zweiten, nicht verwandten Sequenz bestimmt werden. Dabei wird die unbekannte Menge der Zielsequenz semiquantitativ bezogen auf das Signal der zweiten Sequenz abgeschätzt. Als Standards dienen oftmals sogenannte Housekeeping-Gene wie das β -Actin. Die Erstellung von Standardkurven für eine relative Quantifizierung ist einfacher, als bei der absoluten Quantifizierung. Es empfiehlt sich die Quantifizierung relativ zu einem Standardprobenmaterial/-gewebe (= Kalibrator) durchzuführen. Für die experimentellen Proben wird nun die Ausgangsmenge der Zielsequenz über die Standardkurve bestimmt und dann durch die Ausgangskopienzahl des Kalibrators dividiert. Der Kalibrator wird dadurch sozusagen zum 1x-Wert und die unbekannt Proben werden als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator bestimmt. Da dabei die Probenstartkopienzahl

durch die Startkopienzahl des Kalibrators dividiert wird, fällt die Einheit heraus. Somit wird von den Standards nur eine exakte Angabe der Verdünnungsstufe, nicht aber eine absolute Startkopienzahl benötigt. Für eine relative Quantifizierung kann deshalb jede Stammlösung von RNA/DNA, in der die Zielsequenz enthalten ist, zur Herstellung der Standards verwendet werden. Es ist nur wichtig, dass diese Stammlösung akkurat verdünnt wird. Die Einheitsbezeichnung der Verdünnungsstufen ist also irrelevant.

Beispiel: Von einer Gesamt-RNA-Isolation aus einer Kontroll-Zelllinie soll über 2-fach Verdünnungen eine Standardkurve generiert werden. Als Einheiten können z.B. die Verdünnungsstufen selbst definiert werden: $1 \Rightarrow 0,5 \Rightarrow 0,25 \Rightarrow 0,125, \dots$

Von der Stammnukleinsäurelösung sollte ausreichend Material vorhanden sein, um für mehrere Mikrotiterplatten eine relative Quantifizierung durchführen zu können und so vergleichbare Daten zu erhalten. Wenn angenommen werden kann, dass die Effizienz der Reversen Transkription in allen Proben gleich ist, dann ist es sogar möglich RNA relativ zu einer DNA-Standardkurve zu quantifizieren.

Bei einer Quantifizierung, die über eine endogene Kontrolle normalisiert werden soll, werden Standardkurven für die endogene Referenz sowie die Zielsequenz erstellt. Dann werden von diesen für die einzelnen Proben die Menge an Zielsequenz und endogener Referenz berechnet. Anschließend werden die Zielsequenzwerte normalisiert, indem sie durch die Menge an endogener Referenz dividiert werden. Ein Probenmaterial wird wiederum als Kalibrator definiert, d.h. auf 1 gesetzt. Schließlich werden die normalisierten Zielsequenzwerte noch durch den normalisierten Zielsequenzwert des Kalibrators dividiert, um so ein relatives Expressionsniveau auszudrücken.

Da beide Reaktionen auf dem 7700 SDS parallel mit dem gleichen Programm ablaufen, sollten Primer und Sonden beider Systeme möglichst ähnliche T_m s besitzen und auch die Länge der Amplifikate vergleichbar sein. Voruntersuchungen müssen zeigen, dass das Expressionsniveau des Housekeeping-Gens konstant ist (z.B. auch für verschiedene zu untersuchende Gewebe) und nicht koreguliert wird.

Die quantitative Aussagekraft dieses Ansatzes ist jedoch in soweit umstritten, da unverwandte Sequenzen theoretisch mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert werden. Trotzdem bietet diese Methode ein leicht zu etablierende Strategie von großer Aussagekraft, um die Expression verschiedener Gene relativ zueinander abzuschätzen, wenn man die genannten Probleme bei ihrer Etablierung entsprechend berücksichtigt. Ein Beispiel soll die Vorgehensweise verdeutlichen:

Ziel: Nachweis von Expressionsunterschieden bei humaner c-myc mRNA

Endogene Kontrolle: Humane Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase mRNA (GAPDH)

A. Zielsequenz und endogene Kontrolle werden in getrennten Reaktionsgefäßen amplifiziert (Standardkurvenmethode).

Es werden Verdünnungen einer Gesamt-RNA Isolation aus Raji-Zellen zur Erstellung der Standardkurven von c-myc und GAPDH hergestellt.

c-myc-Sonde: FAM-markiert

GAPDH-Sonde: JOE-markiert (aus TaqMan® GAPDH Control Reagents, Best.# 402869)

Unbekannte Proben: Gesamt-RNA aus humanem Hirn-, Nieren-, Leber- und Lungengewebe

1a.) Programmieren des FAM-Farbniveaus:

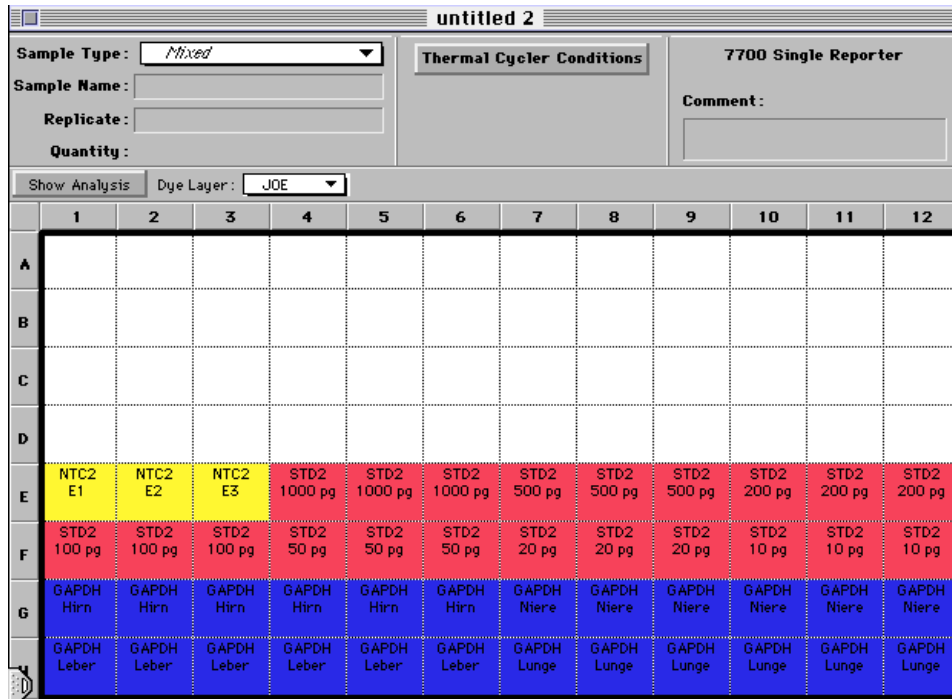
In den Reihen A-D wurden Standards und Proben für den c-myc-spezifischen Nachweis programmiert (nicht belegte Positionen als **not in use** kennzeichnen).

Abb. 6: Programmieren des FAM-Farbniveaus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC A1	NTC A2	NTC A3	STND 1000 pg	STND 1000 pg	STND 1000 pg	STND 500 pg	STND 500 pg	STND 500 pg	STND 200 pg	STND 200 pg	STND 200 pg
B	STND 100 pg	STND 100 pg	STND 100 pg	STND 50 pg	STND 50 pg	STND 50 pg	STND 20 pg	STND 20 pg	STND 20 pg	STND 10 pg	STND 10 pg	STND 10 pg
C	cmyc Hirn	cmyc Hirn	cmyc Hirn	cmyc Hirn	cmyc Hirn	cmyc Hirn	cmyc Niere	cmyc Niere	cmyc Niere	cmyc Niere	cmyc Niere	cmyc Niere
D	cmyc Leber	cmyc Leber	cmyc Leber	cmyc Leber	cmyc Leber	cmyc Leber	cmyc Lunge	cmyc Lunge	cmyc Lunge	cmyc Lunge	cmyc Lunge	cmyc Lunge
E												
F												
G												

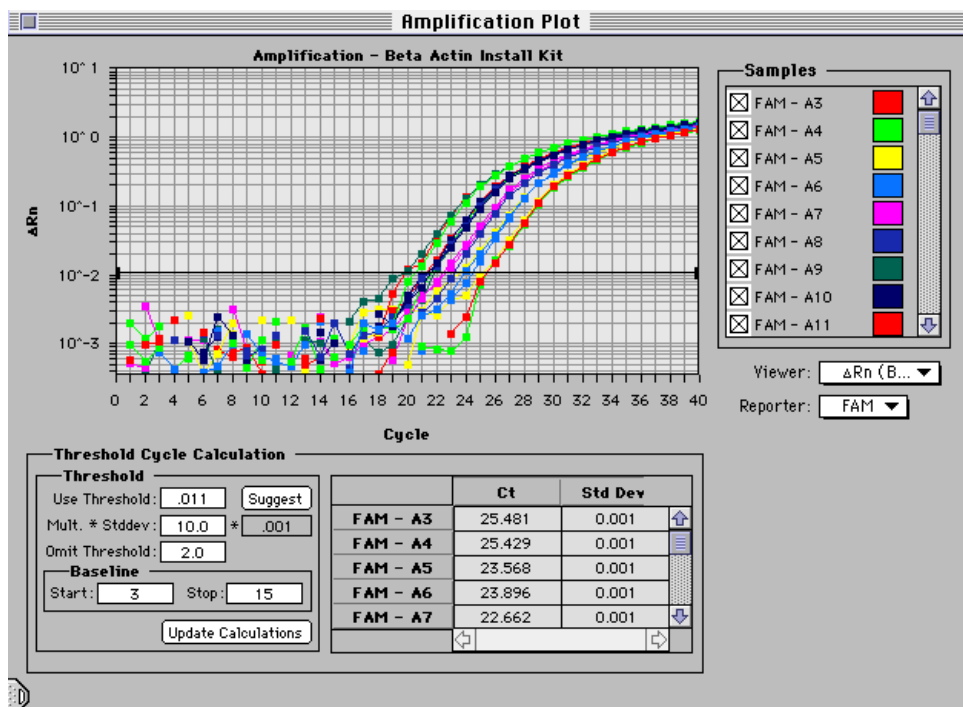
In den Reihen E-H wurden Standards und Proben für den GAPDH-spezifischen Nachweis programmiert (nicht belegte Positionen als **not in use** kennzeichnen).

Abb. 7: Programmieren des JOE-Farbniveaus



2.) Im Anschluß an die PCR im **Analysis-Menü** den Befehl **Analyze** aktivieren. Für beide Farbniveaus müssen jetzt die Schwellenwerte für die C_T -Berechnung in der erscheinenden log-Darstellung festgelegt werden.

Abb. 8: Setzen der Schwellenwerte in der Semi-log Darstellung der Amplification Plots (Bsp. FAM-Niveau)



3.) Die 1.6 Version der SDS-Software erstellt eine Standardkurve für eine Mikrotiterplatte. Soll eine zweite berechnet werden, so müssen die Daten des Laufs in **Excel** analysiert werden. Hierzu im **File-Menü** den Befehl **Export** aufrufen und die Option **Results** wählen.

Der exportierte File besteht aus Spalten mit der Positionsbezeichnung, Probenbeschreibung, Standardabweichung, ΔR_n - sowie dem C_T -Wert. Von diesen Parametern ist der C_T -Wert für die Quantifizierung von Bedeutung. Erstellen Sie Sich Spalten, die wie in Abbildung 9 die Anfangskonzentration der Proben für die Standardkurve (ng), den log dieser Anfangskonzentration (log ng) und den C_T -Wert (Ct) beinhalten. Zur Erstellung der Standardkurve werden die Daten aus log ng und Ct markiert und kopiert.

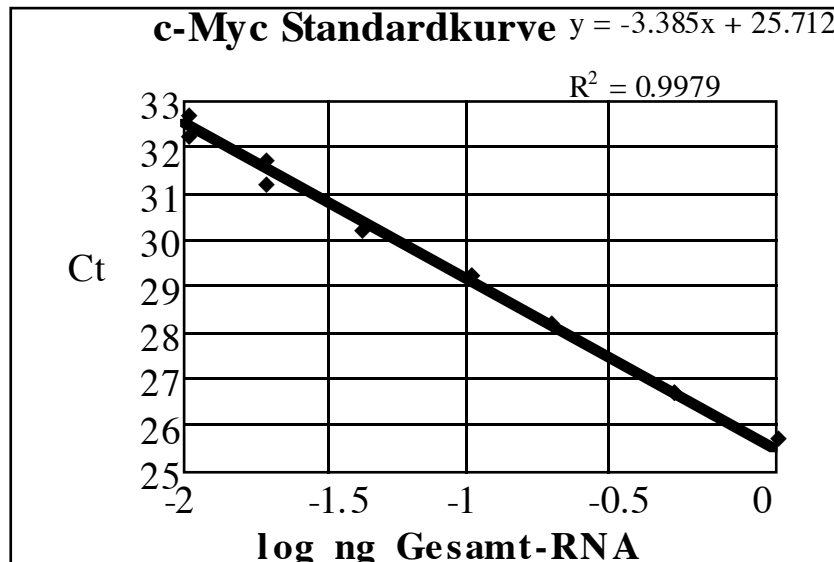
Abb. 9: Auswahl der für die Erstellung der Standardkurve relevanten Daten in Excel

G	H	I	J
Sample	ng	log ng	Ct
NTC			36.61
NTC			35.89
NTC			40.00
Raji-1	1	0	25.63
Raji-1	1	0	25.56
Raji-1	1	0	25.59
Raji-0.5	0.5	-0.30103	26.83
Raji-0.5	0.5	-0.30103	26.80
Raji-0.5	0.5	-0.30103	26.67
Raji-0.2	0.2	-0.69897	28.20
Raji-0.2	0.2	-0.69897	28.13
Raji-0.2	0.2	-0.69897	28.10
Raji-0.1	0.1	-1	29.29
Raji-0.1	0.1	-1	29.20
Raji-0.1	0.1	-1	29.04
Raji-0.05	0.05	-1.30103	30.14
Raji-0.05	0.05	-1.30103	30.11
Raji-0.05	0.05	-1.30103	30.17
Raji-0.02	0.02	-1.69897	31.35
Raji-0.02	0.02	-1.69897	31.34
Raji-0.02	0.02	-1.69897	31.63
Raji-0.01	0.01	-2	32.55
Raji-0.01	0.01	-2	32.33
Raji-0.01	0.01	-2	32.37

Mit der Excel Diagrammfunktion (Scatter-Graph) kann mit den markierten Daten die Standardkurve erstellt werden. Die x-Achse wird als „log input“, die y-Achse als „Ct“ definiert. Um die einzelnen Punkte mit einer Linie verbinden zu können, klicken Sie zunächst auf einen Datenpunkt. Dann öffnen Sie das **Insert-Menü** und wählen den Befehl **Trendline**. Auf der Seite **Type** wählen Sie **Linear**. Kreuzen Sie auf der Seite

Options die Optionen **Display Equation on Chart** sowie **Display R-squared Value on Chart** an. Sie erhalten dann eine Standardkurve für die Amplifikation der mit der FAM-markierten Sonde detektierten c-myc Sequenz ähnlich Abbildung 10.

Abb. 10: c-Myc Standardkurve



Die Gleichung für die von Excel gezogene Gerade wird verwendet, um die Anfangskonzentration von c-myc in den untersuchten Proben (UNKN) zu bestimmen. Für die Eichgerade in Abbildung 10 wird der log der Ausgangskonzentration durch die Eingabe folgender Formel berechnen:

$$\log \text{Ausgangskonzentration} = [(Zelle \text{ mit } C_T\text{-Wert}) - 25.712] / -3.385$$

Die Ausgangskonzentration läßt sich daraus durch Eintragung der folgenden Formel in die benachbarte Zelle berechnen:

$$\text{Ausgangskonzentration} = 10^{[Zelle \text{ mit } \log \text{Ausgangskonzentration}]}$$

Die Einheit der berechneten Ausgangskonzentration ist dieselbe, wie bei der Erstellung der Standardkurve: ng Gesamt-Raji-RNA. Erhält man z.B. für eine der UNKN 0.23 ng, so bedeutet dies das die Probe dieselbe Menge an c-myc RNA enthält, wie sie in 0.23 ng der Raji Kontroll-Gesamt-RNA gefunden werden.

Mit der gleichen Vorgehensweise wird nun die Standardkurve der endogenen Referenz erstellt (C_T-Werte für die mit JOE detektierten Positionen).

Die in diesem Experiment erhaltenen Ausgangskonzentrationen für c-myc und GAPDH in den verschiedenen untersuchten Geweben sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Da beide Sequenzen in getrennten Reaktionsgefäßen amplifiziert wurden, werden die Durchschnittswerte aus den Wiederholungen pro Probe zunächst separat berechnet. Dann wird für jedes Gewebe ein normalisierter c-myc-Wert (= c-myc_N) gebildet, indem der Durchschnittswert von c-myc durch den für GAPDH dividiert wird. Man erhält so eine Zahl, über die man die relative

Ausgangskonzentration für verschiedene Proben miteinander vergleichen kann. Die Standardabweichung dieses Quotienten wird von den Standardabweichungen der beiden Mittelwerte von c-myc und GAPDH nach folgender Formel berechnet:

$$(5) \quad cv^2 = \sqrt{(CV_1^2 + CV_2^2)}$$

$$\text{es gilt: } cv = \frac{s}{\bar{X}} = \frac{\text{Std.abw.}}{\text{Mittelw.}}$$

Tab. 4: Ergebnis der relativen c-myc-Quantifizierung nach der Standardkurvenmethode

Gewebetyp	c-myc [ng Gesamt Raji-RNA]	GAPDH [ng Gesamt Raji-RNA]	c-myc _N (norm. auf GAPDH)	c-myc _N (rel. zu Hirn)
Hirn	0.033	0.51		
	0.043	0.56		
	0.036	0.59		
	0.043	0.53		
	0.039	0.51		
	0.040	0.52		
∅	0.039 ± 0.004	0.54 ± 0.034	0.07 ± 0.008	1.0 ± 0.12
Niere	0.40	0.96		
	0.41	1.06		
	0.41	1.05		
	0.39	1.07		
	0.42	1.06		
	0.43	0.96		
∅	0.41 ± 0.016	1.02 ± 0.052	0.40 ± 0.025	5.5 ± 0.35
Leber	0.67	0.29		
	0.66	0.28		
	0.70	0.28		
	0.76	0.29		
	0.70	0.26		
	0.68	0.27		
∅	0.70 ± 0.036	0.28 ± 0.013	2.49 ± 0.173	34.2 ± 2.37
Lunge	0.97	0.82		
	0.92	0.88		
	0.86	0.78		
	0.89	0.77		
	0.94	0.79		
	0.97	0.80		
∅	0.93 ± 0.044	0.81 ± 0.041	1.15 ± 0.079	15.7 ± 1.09

Ein Vergleich des c-myc-Expressionsniveaus in verschiedenen Geweben kann jetzt z.B. dadurch durchgeführt werden, das man eines der Gewebe als Kalibrator

definiert. In obigem Fall wurde Hirngewebe als 1 gesetzt und die c-myc Expression in den anderen Geweben relativ dazu verglichen. Hierzu werden einfach die $c\text{-myc}_N$ Werte der einzelnen Gewebe durch den Hirn $c\text{-myc}_N$ Wert dividiert. Da dies eine Division durch eine Konstante ist, ist der cv dieser Berechnung der selbe, wie der cv von $c\text{-myc}_N$. In unserem Beispiel besitzt z.B. Lungengewebe eine 34,2fache c-myc Expression im Vergleich zu Hirn.

B.) Vergleichende C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Ableitung der Formeln

Die Grundgleichung der PCR (Formel 1) läßt sich zum Zeitpunkt des Überschreitens des Schwellenwerts (C_T -Wert) für die Zielsequenz (c-myc) wie folgt beschreiben:

$$(6) \quad X_T = X_O * (1 + E_x)^{C_{T,x}} = konst.$$

X_T = Anzahl der hergestellten Zielsequenzmoleküle beim C_T -Wert
 X_O = Startkopienzahl Zielsequenzmoleküle
 E_x = Effizienz der Zielsequenz-Amplifikation
 $C_{T,x}$ = Thresholdwert für die Zielsequenz

Dementsprechend lautet sie für die endogene Referenz:

$$(7) \quad R_T = R_O * (1 + E_R)^{C_{T,R}} = konst.$$

R_T = Anzahl der hergestellten Referenzmoleküle beim C_T -Wert
 R_O = Startkopienzahl Referenzmoleküle
 E_R = Effizienz der Referenz-Amplifikation
 $C_{T,x}$ = Thresholdwert für die Referenz

Wenn man X_T durch R_T dividiert, erhält man die folgende Gleichung (wobei K eine Konstante ist):

$$(8) \quad \frac{X_T}{R_T} = \frac{X_O * (1 + E_x)^{C_{T,x}}}{R_O * (1 + E_R)^{C_{T,x}}} = K$$

Die Werte für X_T und R_T hängen von einer Vielzahl von Faktoren ab, weshalb diese Konstante nicht 1 betragen muß:

- Reporterfarbstoffe
- Sondensequenz/-länge beeinflussen die Fluoreszenz
- Aufbau der Zielbereiche
- Effizienz der Sondenhydrolyse
- manuelles Festlegen des Schwellenwerts im Amplifikationsgraphen

Wenn die Effizienzen der beiden Reaktionen gleich sind ($E_x = E_R = E$) dann gilt:

$$(9) \quad \frac{X_O}{R_O} * (1 + E)^{C_{T,x} - C_{T,R}} = K$$

oder:

$$(10) \quad X_N * (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

$X_N = X_O/R_O$ d.h. normalisierter Wert der Zielsequenz
 $\Delta C_T = C_{T,x} - C_{T,R}$ d.h. der Unterschied an Thresholdzyklen für Zielsequenz und Referenz

Diese Gleichung läßt sich wie folgt zur Berechnung des normalisierten Zielsequenzwertes umstellen:

$$(11) \quad X_N = K * (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

Schließlich muß noch X_N für jedes Gewebe (= x) durch den X_N -Wert des Kalibrators (= kb) dividiert werden:

$$(12) \quad \frac{X_{N,x}}{X_{N,kb}} = \frac{K * (1 + E)^{-\Delta C_{T,x}}}{K * (1 + E)^{-\Delta C_{T,kb}}}$$

$$\boxed{\frac{X_{N,x}}{X_{N,kb}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}}$$

wobei: $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,x} - \Delta C_{T,kb}$

Für die empfohlene Amplifikatgröße von <150 bp liegt die Effizienz der Reaktion sehr nahe bei 100 %. Deswegen läßt sich die Konzentration der Zielsequenz, normalisiert mit einer endogenen Referenz und relativ zu einem Kalibrator näherungsweise wie folgt berechnen:

$$(13) \quad X_{N,kal} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Relative Effizienz von Zielsequenz und Referenz

Um die $\Delta \Delta C_T$ -Berechnung anwenden zu können, muß die Effizienz der Zielsequenz wie auch der Referenzreaktion nahezu identisch sein. Eine sehr empfindliche Methode um zu überprüfen ob die Effizienzen zweier Amplicons gleich sind, bietet ein Vergleich des ΔC_T bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Matrizen. Die hierzu benötigten Daten liefern in unserem Beispiel die oben verwendeten Standardkurven für c-myc und GAPDH. Tabelle 5 faßt die durchschnittlichen C_T -Werte für c-myc und GAPDH bei verschiedenen Konzentrationen zusammen.

Tab. 5: ΔC_T -Berechnung zur relativen Quantifizierung

Startkonzentration [ng Gesamt-RNA]	c-myc [durchschn. C_T]	GAPDH [durchschn. C_T]	ΔC_T [c-myc-GAPDH]
1	25.59±0.04	22.64±0.03	2.95±0.05
0.5	26.77±0.09	23.73±0.05	3.04±0.10
0.2	28.14±0.05	25.12±0.10	3.02±0.11
0.1	29.18±0.13	26.16±0.02	3.01±0.13
0.05	30.14±0.03	27.17±0.06	2.97±0.07
0.02	31.44±0.16	28.62±0.10	2.82±0.19
0.01	32.42±0.12	29.45±0.08	2.97±0.14

Abbildung 11 zeigt den dazugehörigen Graphen: log Startkonzentration über ΔC_T . Sind die Effizienzen für beide Amplicons ungefähr gleich, so nähert sich die Steigung der Geraden 0. Mit Hilfe dieses Vorexperiments kann bei Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode gezeigt werden, daß die Effizienzen beider Reaktionen von Zielsequenz und Referenz ungefähr gleich sind. Dabei sollte der absolute Wert der Steigung des Graphen <0.1 sein. Kann dies gezeigt werden, so kann die $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung angewandt werden, ohne das eine Standardkurve generiert werden muß. Ist dies nicht der Fall, so sollte die Standardkurven-Methode vorgezogen werden. Selbstverständlich können für das weniger effiziente System auch neue Primer ausgetestet werden, um so gleiche Effizienzen zu erreichen.

Abb. 11: Vergleich der relativen Effizienzen von c-myc und GAPDH

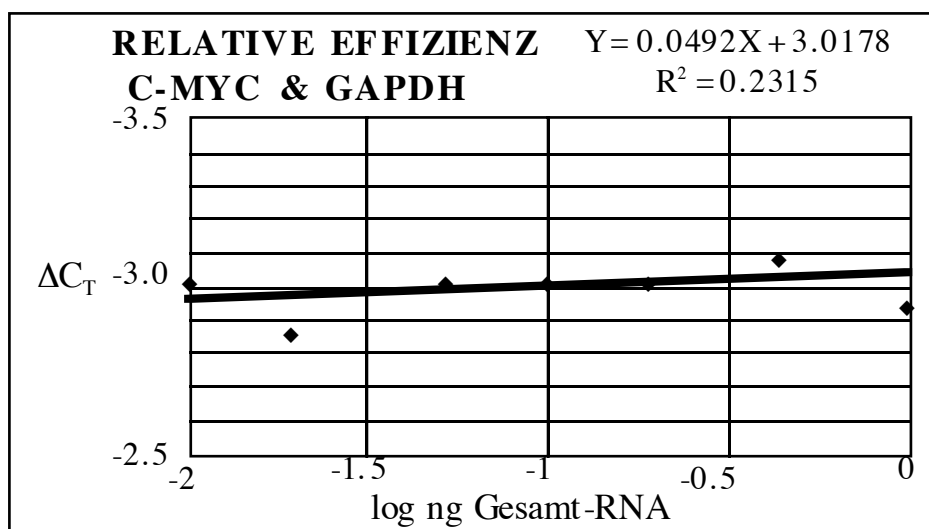


Tabelle 6 zeigt die durchschnittlichen C_T -Werte für verschiedene Gewebe und wie davon der ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ sowie die relative Konzentration der c-myc mRNA abgeleitet werden.

Tab. 6: Relative Quantifizierung über die vergleichende C_T -Methode

Gewebe	c-myc [$\emptyset C_T$]	GAPDH [$\emptyset C_T$]	ΔC_T [c-myc- GAPDH]	$\Delta\Delta C_T$ [$\Delta C_T - \Delta C_{T,Hirn}$]	c-myc _N [rel. zu Hirn]
Hirn	30.49±0.15	23.63±0.09	6.86±0.17	0.00±0.17	1.0 (0.9-1.1)
Niere	27.03±0.06	22.66±0.08	4.37±0.10	-2.50±0.10	5.6 (5.3-6.0)
Leber	26.25±0.07	24.60±0.07	1.65±0.10	-5.21±0.10	37.0 (34.5-39.7)
Lunge	25.83±0.07	23.01±0.07	2.81±0.10	-4.05±0.10	16.5 (15.4-17.7)

Der ΔC_T -Wert wird durch Subtraktion des GAPDH- C_T -Mittelwerts vom Mittelwert des c-myc- C_T erhalten. Die Standardabweichung (s) der Differenz wird aus den Standardabweichungen der c-myc- und der GAPDH-Werte nach folgender Formel berechnet:

$$(14) \quad s^2 = \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$$

Zur Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Werts wird - wie bei der Ableitung der Formeln gezeigt - jeweils der ΔC_T -Wert des Kalibrators von dem der Zielsequenz abgezogen. Es zeigt sich, dass diese Methode der Standardkurvenmethode (A) in ihrem Ergebnis sehr ähnlich ist.

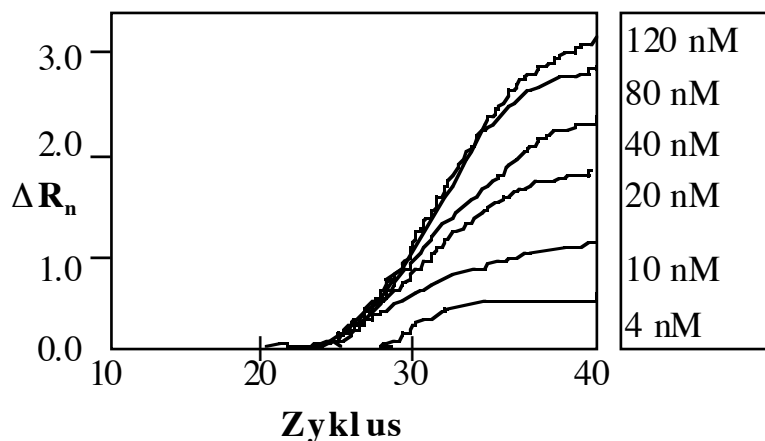
C. Quantifizierung mittels Multiplex-PCR

Die dritte Methode der Quantifizierung macht sich die Verfügbarkeit verschiedener Reporterfarbstoffe für die Markierung fluorogener Sonden zu Nutze. Die zur Zeit anwendbaren Farbstoffe sind in Tabelle 1, Seite 9 zusammengefasst. Die SDS-Software ist über einen mathematischen Algorithmus (Multikomponentenanalyse) in der Lage, die Anteile der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe aus dem komplexen Analysespektrum herauszurechnen, indem auf Reinfarbenspektren zurückgegriffen wird. Aufgrund der experimentellen Unterschiede bei der Messung der Referenzspektren und der Proben, bringt die Multikomponentenanalyse einen gewissen Fehler in die Bestimmung der Anteile der einzelnen Farben hinein. Dieser Fehler variiert, je nachdem wie gut die verschiedenen Farben spektral voneinander unterschieden werden können: Je größer die spektrale Überlappung, desto größer der Fehler.

Werden also Sonden im selben Reaktionsgefäß eingesetzt, so ist eine um so genauere Quantifizierung möglich, je weiter die verwendeten Reporterfarbstoffe in ihrem Emissionsmaximum voneinander entfernt liegen (wie bei FAM und JOE). Wird z.B. die JOE-markierte Sonde aus den GAPDH Kontrollreagenzien (Best# 402869) verwendet, so empfiehlt es sich die eigentliche Sequenz mit FAM zu detektieren.

Werden zwei Amplifikate in demselben Reaktionsgefäß amplifiziert, so führt die Konkurrenzreaktion um die gemeinsam verwendeten Reagenzien oft zu Problemen: Liegen beide Zielsequenzen in unterschiedlichen Startkopienzahlen vor, so kann die in höherer Kopienzahl vorliegende Spezies die gemeinsam verwendeten Reagenzien so sehr in Anspruch nehmen, daß die Amplifikation der selteneren Spezies beeinflusst bzw. unterdrückt wird. Daher ist es für eine genaue Quantifizierung von entscheidender Bedeutung, das die beiden Reaktionen nicht miteinander konkurrieren. Eine Möglichkeit dies zu verhindern, ist z.B. die Limitierung der verwendeten Primerkonzentrationen.

Abb. 12: Einfluß limitierender Primerkonzentrationen auf den ΔR_n - sowie den C_T -Wert



In Abbildung 12 wird der Einfluß abnehmender Primerkonzentrationen deutlich: Während bei 120 und 80 nM die Primer noch nicht limitierend sind (ähnlicher Verlauf der Amplifikationskurven), zeigt sich bei weiter abnehmenden Primerkonzentrationen eine stetige Abnahme des Plateaus am Ende der Reaktion. Der C_T -Wert wird jedoch nur bei einer Primerkonzentration von 4 nM beeinflusst.

Dies kann man sich zunutze machen, indem man bei einer Multiplexreaktion die Primerkonzentration für die Amplifikation der in höherer Kopienzahl vorliegenden Spezies soweit limitiert, daß zwar der C_T -Wert nicht beeinflusst, jedoch ihre Amplifikation gestoppt wird, bevor die zweite Spezies in ihrer Amplifikation durch die Limitierung der gemeinsam benötigten Reagenzien gehemmt wird. So wird es z.B. möglich selbst rRNAs als endogene Referenzen zu verwenden, die in einem großen Überschuß im Vergleich zur Ziel-mRNA im Reaktionsansatz vorliegen. Wird wie in unserem Beispiel GAPDH als endogene Referenz verwendet, so kann es u.U. notwendig sein für beide Amplicons limitierende Konzentrationen zu verwenden, da

man je nach Zielsequenz nicht vorhersagen kann welche Spezies im Überschuß vorliegt.

Um limitierende Primerkonzentrationen für ein Amplicon zu definieren, wird eine Matrix der Konzentrationen beider Primer durchgeführt, z.B. folgende 4x4-Matrix: 20 nM - 30 nM - 40 nM - 80 nM. Es wird die Primerkonzentrations-Kombination gesucht, bei der der C_T -Wert nicht beeinflusst, jedoch der ΔR_n -Wert deutlich reduziert wird. Im Falle der GAPDH-Kontrolle aus unserem Beispiel wurden diese Bedingungen bei 30 nM für beide Primer optimal erfüllt. Um einen Puffer für nicht vorhersehbare experimentelle Variationen zu haben, wurden die beiden Primer jedoch in den weiteren Experimenten 40 nM eingesetzt. In einem ähnlichen Experiment wurden für die c-myc Amplifikation 50 nM als limitierende Konzentration bestimmt. Es ist bei diesem Vorexperiment besonders wichtig, das Puffer- wie auch die PCR-Bedingungen für die beiden Reaktionen, die im späteren Assay als Multiplexreaktion ablaufen sollen, identisch gewählt werden. In diesem Fall kann es leichter sein ein Zwei-Schritt RT-PCR-Protokoll (s.S. 40) zu wählen, da so die PCR-Bedingungen von der Reversen Transkription unabhängig optimiert werden können. Ist es nicht möglich limitierenden Konzentrationen zu finden, so empfehlen sich die Assaytypen A bzw. B oder aber die Auswahl neuer PCR-Primer (um ein oder zwei Basen längere Primer auswählen, die eine höheren T_m besitzen), um so doch noch limitierende Bedingungen zu finden.

Werden in unserem Beispiel also c-myc und GAPDH in demselben Reaktionsgefäß in einer Multiplexreaktion amplifiziert, so hat dies zunächst den Vorteil eines erhöhten Probendurchsatzes pro Platte. Es ist zwar erneut erforderlich zwei Farbniveaus zu programmieren, doch diesmal werden nur die Reihen A-D der Mikrotiterplatte für das Quantifizierungsexperiment belegt.

Werden zwei Reporter in demselben Reaktionsgefäß eingesetzt, so sollte die **spektrale Kompensation** bei der Analyse verwendet (s. S. 104) werden. Es handelt sich dabei um eine Verstärkung des Multikomponentenanalyse-Algorithmus, durch den eine bessere Auflösung zwischen den einzelnen Positionen der Mikrotiterplatte erzielt wird.

Die weitere Vorgehensweise - Setzen der Grundlinie, exportieren der Daten in Excel und Generieren einer Standardkurve - entspricht Fall A bzw. B, da beide Quantifizierungsstrategien auch auf das Multiplexexperiment übertragbar sind. Der einzige Unterschied ist die Methode, wie Replikate gemittelt werden: Da bei Wiederholungen einer Probe Pipettierfehler von Reaktionsgefäß zu Reaktionsgefäß auftreten können, ist es sinnvoll die Zielsequenzkonzentration für jedes einzelne Reaktionsgefäß zunächst durch die jeweilige Referenzkonzentration zu dividieren und erst dann zu mitteln (s. Tab. 7).

Tab. 7: Relative Quantifizierung im Multiplex-Experiment unter Anwendung der Standardkurven-Methode

Gewebe	c-myc [ng Raji- Gesamt-RNA]	GAPDH [ng Raji- Gesamt-RNA]	c-myc _N [norm. auf GAPDH]	c-mycN [rel. zu Hirn]
Hirn	0.031	0.618	0.05	
	0.038	0.532	0.07	
	0.032	0.521	0.06	
	0.038	0.550	0.07	
	0.032	0.577	0.06	
	0.037	0.532	0.07	
∅			0.06 ± 0.008	1.0 ± 0.14
Niere	0.365	1.049	0.35	
	0.338	1.035	0.33	
	0.423	1.042	0.41	
	0.334	1.086	0.31	
	0.334	1.021	0.33	
	0.372	1.139	0.33	
∅			0.34 ± 0.035	5.4 ± 0.55
Leber	0.477	0.255	1.87	
	0.471	0.228	2.06	
	0.535	0.258	2.07	
	0.589	0.241	2.44	
	0.539	0.264	2.04	
	0.465	0.227	2.05	
∅			2.09 ± 0.186	33.3 ± 2.97
Lunge	0.853	0.085	0.97	
	0.900	0.084	0.88	
	0.956	0.082	1.00	
	0.900	0.093	0.87	
	0.996	0.112	0.87	
	0.859	0.090	0.84	
∅			0.90 ± 0.062	14.4 ± 0.99

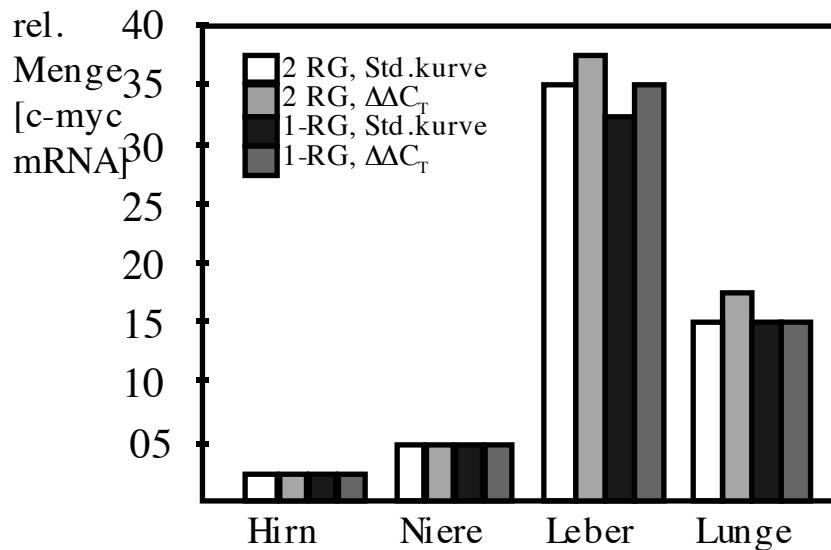
In Tabelle 8 sind die Daten des Multiplex-Experiments nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet.

Tab. 8: Relative Quantifizierung im Multiplex-Experiment unter Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Gewebe	c-myc [C _T]	GAPDH [C _T]	ΔC_T [c-myc-GAPDH]	$\Delta\Delta C_T$ $\Delta C_{T,durch} - \Delta C_{T,Hirn}$	
Hirn	32.38	25.07	7.31		
	32.08	25.29	6.79		
	32.35	25.32	7.03		
	32.08	25.24	6.84		
	32.34	25.17	7.17		
	32.13	25.29	6.84		
∅			6.93 ± 0.16	0.00 ± 0.16	1.0 (0.9-1.1)
Niere	28.73	24.30	4.43		
	28.84	24.32	4.52		
	28.51	24.31	4.20		
	28.86	24.25	4.61		
	28.86	24.34	4.52		
	28.70	24.18	4.52		
∅			6.47 ± 0.14	-2.47 ± 0.14	5.5 (5.0-6.1)
Leber	28.33	26.36	1.97		
	28.35	26.52	1.83		
	28.16	26.34	1.82		
	28.02	26.44	1.58		
	28.15	26.31	1.84		
	28.37	26.53	1.84		
∅			1.81 ± 0.13	-5.12 ± 0.13	34.8 (31.9-38.0)
Lunge	27.47	24.55	2.92		
	27.39	24.33	3.06		
	27.30	24.43	2.87		
	27.39	24.32	3.07		
	27.24	24.18	3.06		
	27.46	24.34	3.12		
∅			3.02 ± 0.10	-3.92 ± 0.10	15.1 (14.1-16.2)

Abbildung 13 zeigt einen Vergleich der Strategien zur relativen Quantifizierung und der dabei erzielten Ergebnisse. Dabei zeigt sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Quantifizierung in zwei getrennten oder einem bzw. zwischen der Standardkurven- und der Vergleichenden-C_T-Methode festzustellen ist.

Abb. 13: Vergleich der Ergebnisse für verschiedene Strategien zur relativen Quantifizierung (RG = Reaktionsgefäß/e)



Dies bedeutet, dass sich die Auswahl der geeigneten Quantifizierungsstrategie nicht danach richten muß, welche Strategie die besten Ergebnisse liefert, da alle vergleichbare Ergebnisse liefern. Eine kurze Zusammenfassung dieses Kapitels mag dennoch helfen, sich für die eine oder die andere Strategie zu entscheiden:

1. Amplifikation von Zielsequenz und Standard in 2 getrennten Reaktionsgefäßen mit der Standardkurven-Methode:
 - geringster Optimierungsaufwand
2. Amplifikation von Zielsequenz und Standard in 2 getrennten Reaktionsgefäßen mit der vergleichenden C_T -Methode:
 - Validierungsexperiment erforderlich, das zeigt, daß die Effizienzen der beiden getrennten Reaktionen praktisch gleich sind.
 - Vorteile: keine Standardkurve mehr erforderlich und entsprechend höherer Probendurchsatz. Desweiteren keine Fehler mehr, die bei der Herstellung der Verdünnungstufen der Standards entstehen können.
3. Verwendung eines internen Standards (Multiplex-PCR Ansatz):
 - Vorexperiment, um limitierende Primerkonzentrationen zu finden, durch die der C_T -Wert nicht beeinflusst wird.
 - Vorteil: Höherer Probendurchsatz, da 2 Reaktionen in 1 Reaktionsgefäß ablaufen
 - Mögliche Fehlerquelle: Multikomponentenanalyse.

3.3.2 Optimierung einer quantitativen TaqMan® PCR

Hat man sich also für eine Quantifizierungs-Strategie entschieden, so empfiehlt es sich bei der Etablierung des Assays wie folgt vorzugehen:

- 1) Auswahl einer geeigneten Zielsequenz.
- 2) Design der Sonde sowie der beiden PCR-Primer mit Hilfe der **Primer Express Software**. Dabei darauf achten, dass mit der ausgewählten Sonde mehrere Primerpaarkombinationen korrespondieren, um im Falle einer nicht-optimalen Reaktion auf alternative Primer ausweichen zu können. Dies ist günstiger, als eine neue Sondensynthese.
- 3) Bestellen der Primer, der Sonde und der anderen benötigten Reagenzien sowie Verbrauchsmaterialien.

Tab. 9: Ausgesuchte PE Applied Biosystems Verbrauchsmaterialien für die TaqMan® PCR

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer
MicroAmp® Optical 96-Well reaction Plate (10 Stück)	N801-0560
MicroAmp® Optical Tubes (2000 Stück)	N801-0933
MicroAmp® Optical Caps (300 x 8er-Streifen)	N801-0935

Tab. 10: Ausgesuchte TaqMan® PCR Reagenzien von PE Applied Biosystems

TaqMan® PCR Reagenzien	Bestellnummer
TaqMan™ PCR Reagent Kit	N808-0230
TaqMan™ PCR Core Reagents	N808-0228
TaqMan™ PCR Core Reagents, 10er-Pack	402930
TaqMan™ EZ RT-PCR Kit	N808-0235
TaqMan™ EZ RT-PCR Core Kit	N808-0236
TaqMan™ EZ RT-PCR Core Kit, 10er Pack	403028
20 % Glycerin	402929

- 4) Nach Erhalt der Primer und der Sonde: Exakte Konzentrationsbestimmung über eine UV-spektrometrische Messung
- a) Absorptionsmessung von 1:100 Verdünnungen der einzelnen Oligonukleotide bei 260 nm in TE-Puffer bzw. H₂O_{Bidest}
- b) Berechnen der verschiedenen Konzentrationen in µM mit Hilfe von Tab. 11

Tab. 11: Berechnung der Konzentration fluoreszenz-markierter Sonden (Beispiel: FAM-markierte Sonde)

Base/Farbstoff	Extinktions-Koeffizient	Anzahl	Beispiel	Summe
A	15.200	?	1	15.200
C	7.050	?	6	42.300
G	12.010	?	5	60.050
T	8.400	?	6	50.400
FAM	20.958	?	1	20.958
TAMRA	31.980	?	1	31.980
TET	16.255	?	0	0
Summe	-	?	-	220.888

Das Ergebnis in folgende Formel einsetzen:

$$A_{260} = \sum_{\text{Ext.koeffizienten}} \times \text{Küvettenweglänge} \times \text{Konzentration}/100$$

Beispiel:

$$0,13 = 220.888 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0,3 \text{ cm} \times C/100$$

$$C = 196 \text{ µM}$$

5) Für eine quantitative PCR wird ein Reaktionsvolumen von 50 µl (min. 25 µl) empfohlen. Vor der Optimierung als TaqMan® PCR kann es sinnvoll sein zunächst eine konventionelle PCR - aber mit erhöhter Mg²⁺ (3,5-4,5 mM) - durchzuführen und das Ergebnis gelelektrophoretisch überprüfen. So kann man sicherzustellen, dass ein Produkt gewünschter Länge gebildet wird, bevor die Sonden-synthese in Auftrag gegeben wird. Für eine Quantifizierung sollte nach Möglichkeit nur eine Bande im Gel beobachtet werden. Wird die TaqMan® PCR anschließend durchgeführt, so ist eine weitere Überprüfung der Reaktionen im Gel nicht mehr erforderlich, da eine interne Sondenhybridisierung mit der PCR kombiniert wird: Das heißt nur bei spezifischer Sondenanbindung wird auch ein Fluoreszenzsignal freigesetzt.

Die nachfolgenden Standard-Thermocycler-Programme sind bei Abweichungen der Annealing-Temperatur entsprechend abzuändern. Bei der Optimierung der Reaktion bieten sich zunächst folgende Endkonzentrationen in Abhängigkeit des Assay-Typs an:

Quantitative- + TaqMan® PCR, DNA:

H ₂ O _{Bidest}	-
10x TaqMan Puffer A	1x
25 mM MgCl ₂ -Lösung	? mM
dATP	200 µM
dCTP	200 µM
dGTP	200 µM
dUTP	400 µM
Primer 1	300 nM
Primer 2	300 nM
Sonde	200 nM
AmpliTaQ Gold (5 U/µl)	1,25 U
AmpErase UNG	0,50 U
DNA	ca. 10.000 Startkopien

Programm:

UNG-Verdau	50°C für 2 min
AmpliTaQ Gold-Aktivierung	95°C für 10 min
40 Zyklen	95°C, 15 sec 60°C, 1 min

Quantitative- + TaqMan® PCR, RNA:

a) EZ-Protokoll:

RNase-freies H ₂ O _{Bidest}	-
5x TaqMan EZ Puffer	1x
25 mM Mn(OAc) ₂ -Lösung	? mM
dATP	300 µM
dCTP	300 µM
dGTP	300 µM
dUTP	600 µM
Primer 1	200 nM
Primer 2	200 nM
Sonde	100 nM
rTth DNA Polym. (2,5 U/µl)	5,00 U
AmpErase UNG	0,50 U

RNA ca. 10.000 Startkopien (< 100 ng RNA !)

Programm:

UNG-Verdau	50°C für 2 min
Reverse Transkription	60°C für 30 min
UNG-Inaktivierung	95°C für 5 min
40 Zyklen	94°C, 20 sec 60°C, 1 min

b) Gold RT-PCR:

1. Ein-Schritt Protokoll:

RNase-freies H ₂ O _{Bidest}	-
10x TaqMan Puffer A	1x
25 mM MgCl ₂ -Lösung	5,5 mM
dATP	300 µM
dCTP	300 µM
dGTP	300 µM
dUTP	600 µM
Primer 1	100 nM
Primer 2	100 nM
Sonde	100 nM
AmpliAq Gold (5 U/µl)	1,25 U
MuLV-RT	12,50 U
RNase-Inhibitor	20,00 U
RNA	ca. 10.000 Startkopien (<200 ng RNA)

Programm:

Reverse Transkription	48°C für 30 min
AmpliAq Gold-Aktivierung	95°C für 10 min
40 Zyklen	95°C, 15 sec 60°C, 1 min

2. Zwei-Schritt Protokoll:

a) Reverse Transkription (10 µl Volumen)

RNase-freies H ₂ O _{Bidest}	-
10x TaqMan Puffer A	1x
25 mM MgCl ₂ -Lösung	5,5 mM
dATP	500 µM
dCTP	500 µM
dGTP	500 µM
dUTP	500 µM
Reverser Primer *)	200 nM
MuLV-RT	12,5 U
RNase-Inhibitor	40,00 U
RNA	ca. 10.000 Startkopien (<200 ng RNA)

*) bei Zufallshexamer- bzw. Oligo d(T)₁₆-Anwendung diese in einer Endkonzentration von 2,5 µM einsetzen. Es ist dann folgender zusätzlicher Inkubationsschritt erforderlich:

Preinkubation 25°C für 10 min

Programm:

Reverse Transkription 48°C für 30 min

RT-Inaktivierung 95°C für 5 min

b) Amplifikation (50 µl Volumen)

H ₂ O _{Bidest}	-
10x TaqMan Puffer A	1x
25 mM MgCl ₂ -Lösung	5,5 mM
dATP	200 µM
dCTP	200 µM
dGTP	200 µM
dUTP	400 µM
Primer 1	100 nM
Primer 2	100 nM
Sonde	100 nM
AmpliTaq Gold (5 U/µl)	1,25 U
AmpErase UNG	0,50 U
RT-Ansatz	-

Programm:

UNG-Verdau	50°C für 2 min
AmpliTaQ Gold-Aktiveringung	95°C für 10 min
40 Zyklen	95°C, 15 sec
	60°C, 1 min

6) Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit zu erzielen, sollten Konzepte erarbeitet werden, die die Zahl der Pipettierschritte auf ein Minimum reduzieren. Zunächst sind die Komponenten des Reaktionsansatzes zu einem ersten Master-Mix zusammenzufassen, die für alle Proben gleich sind. Ausgehend von diesem Master-Mix können dann Sub-Mixe erstellt werden, die z.B. Replikate einer Probe repräsentieren. Der Pipettierfehler sollte in die Berechnungen mit einbezogen werden. Das Fließdiagramm in Abb. 14 soll diese Vorgehensweise verdeutlichen:

Abb. 14: Pipettierstrategie am Beispiel des β -Actin-Assays (s. S. 114)

1. Für wieviele Reaktionen muß eine Master-Mix erstellt werden?

Sub-Mix	Probenzahl (Wiederholungen)	Summe Reaktionen (+1 für Pipettierfehler)
Ohne-Template Kontrollen (NTC)	4	5
Standard 1	4	5
Standard 2	4	5
Standard 3	4	5
Standard 4	4	5
Standard 5	4	5
Unbekannte 1	36	37
Unbekannte 2	36	37
Gesamt	96	114
+1 für Master-Mix	-	115



2. Welche Komponenten sind in allen Ansätzen gleich?

10x Puffer A] MASTER-MIX
25 mM MgCl ₂	
Primer 1+2	
Sonde	
dNTPs	
Bidest-Wasser	
UNG	
AmpliTaQ Gold	



Abb. 14: Pipettierstrategie am Beispiel des β -Actin-Assays (Forts.)

3. Pipettieren des Master-Mixes für 115 Reaktionen



4. Verteilen des Master-Mixes auf die 8 Sub-Mixe



5. Zugabe der Nukleinsäure bzw. von Wasser (NTC) zu dem jeweiligen Sub-Mix; dabei GUT Mischen!



6. Pipettieren der Sub-Mixe in die Mikrotiterplatte (Bildung von Blasen vermeiden)

Bei Replikaten empfiehlt es sich, die Nukleinsäure nur einmal zum Sub-Mix hinzu zu geben und diesen gut zu mischen, anstelle den Sub-Mix erst zu verteilen und die Nukleinsäure dann einzeln in jedes Reaktionsgefäß zu pipettieren.

7) Die Optimierung der Reaktion beginnt für die Assay-Typen (s.o.), bei denen ein “?” bei der Konzentration des Cofaktors steht, mit dessen Titration:

- quantitative TaqMan® DNA-PCR: $MgCl_2$ in 0,5 mM-Schritten von 2,0 - 6,0 mM
- TaqMan® EZ-RT-PCR: $Mn(OAc)_2$ in 0,5 mM-Schritten von 2,0 - 5,0 mM

Es wird die Konzentration verwendet, die den niedrigsten C_T -Wert ergibt, wobei der ΔR_n -Wert möglichst hoch sein sollte.

Bei den verbleibenden Assay-Typen wird zuerst eine TaqMan® PCR mit den Standard-Reaktionsbedingungen ausgetestet.

Die ΔR_n -Werte liegen bei DNA-Assays im Allgemeinen höher, als für RNA-Assays: Während bei DNA-Assays bereits zu Beginn der Optimierung ΔR_n -Werte >1 zu erwarten sind, können sie für RNA-Assays deutlich darunter liegen (0,2 - 0,8). Ziel ist es für 10.000 Startkopien im Verlauf der folgenden Optimierungsschritte ΔR_n -Werte von ca. 1 bei einem möglichst niedrigen C_T -Wert zu erhalten. Bei DNA-Assays werden oftmals ΔR_n -Werte von 2 bis 10 erreicht.

a) eine weitere Verbesserung des Signals kann dadurch erreicht werden, das in einem zweiten Experiment die 3 besten $MgCl_2$ -Konzentrationen bei einem $T_m \pm 2^\circ C$ ausgetestet werden.

Tips & Tricks, 1. Optimierungsstufe:

- kein Amplifikationssignal bzw. sehr schwaches Signal:

Wurde der Ansatz korrekt pipettiert, so kann die Ursache für ein fehlendes Amplifikationssignal an zu stringenten Reaktionsbedingungen liegen. Primer Express liefert im Allg. eine sehr exakte Annäherung an den tatsächlichen T_m . Sollte trotzdem kein Signal generiert werden, bitte die Reaktionsansätze auf ein Gel auftragen und überprüfen, ob ein PCR-Produkt gebildet wurde. Falls ja, liegt die Temperatur des Annealing/Extensions-Schritts zu hoch, um noch eine effiziente Sondenhydrolyse zu gewährleisten. Dann das Experiment bei $T_m - 2^\circ\text{C}$ wiederholen!

- hohe Schwankungen des Fluoreszenzsignals in den frühen Zyklen der PCR

Während der ersten 3 Zyklen der PCR sind oftmals starke Schwankungen des ΔR_n -Werts zu beobachten, weshalb die Software der Sequence Detection Systeme als Vorgabe die Grundlinie erst ab Zyklus 3 berechnet. Dies ist auf eine unterschiedlich schnelle Stabilisierung des Fluoreszenzsignals der Sonde in der neuen Pufferumgebung des Reaktionsmix zurückzuführen. Bei manchen Sonden variiert das Signal sogar noch bis Zyklus 5, was unter Umständen den Schwellenwert für die C_T -Berechnung nach oben treiben kann. Deshalb in solchen Fällen die Berechnung der Grundlinie (Baseline) in der Tabelle „Threshold Cycle Calculation“ der graphischen Darstellung des Amplifikationssignals auf z.B. Start: 5 setzen oder aber der Sonde bei Raumtemperatur etwas mehr Zeit lassen, sich an die neuen Pufferbedingungen zu gewöhnen.

Für die Berechnung der Grundlinie werden die NTCs herangezogen. Hierzu sind die Fluoreszenzdaten von **mindestens 2 Zyklen** erforderlich. Rauscht eine der NTCs sehr stark, ist es sinnvoller, diese in der Setup View „Not in Use“ zu setzen und anschließend die Daten ein zweites Mal zu analysieren.

- schlechte Standardkurve

Standardkurven mit einem Korrelationskoeffizienten von ≥ 0.98 geben im Allgemeinen sehr gute Ergebnisse. Nach Möglichkeit sollten 5 oder mehr Standardstufen (in 2-4 Wiederholungen) pipettiert werden, die zumindest Verdoppelungsstufen repräsentieren. Zu wenig Standardstufen ergeben:

- schlechten Korrelationskoeffizient
- ungenaue Bestimmung der UNKNs (insbesondere der Wiederholungen)

- Thresholdcycle (C_T)-Probleme

Die Quantifizierung erfolgt über den C_T -Wert, weshalb eine korrekte Bestimmung desselben besonders wichtig ist:

- liegt der C_T -Wert zu nah an der Grundlinie, so geht das Grundrauschen zum Teil in die Berechnung mit ein, was eine erhöhte Standardabweichung zur Folge hat
- ist der C_T -Wert zu weit von der Grundlinie entfernt, wird andererseits die Berechnung der Startkopienzahl weniger genau

- Kontrolle der NTCs: Wird den NTCs eine Startkopienzahl zugeordnet, so kann dies (neben einer Kontamination: Überprüfen der Multikomponenten-Darstellung für die betroffene Position) auf eine ungenaue Bestimmung des C_T -Werts zurückzuführen sein. Kann eine Kontamination ausgeschlossen werden, so muß der C_T -Wert in der Log-Darstellung des Amplification-Plots nach oben hin korrigiert werden. Hierzu den horizontalen Balken so nach oben verschieben, daß er über dem Grundrauschen liegt. Bitte darauf achten, daß Wiederholungen einer Probe dort, wo der horizontale Balken liegt, auch einander überlagern und nicht nur parallel verlaufen).

8) **Primer-Matrix:** Die zweite Optimierungsstufe ist besonders wichtig, da sie Unterschiede im Hybridisierungsverhalten der beiden Primer bei den gewählten Reaktionsbedingungen kompensiert. Dabei werden im Allgemeinen die deutlichsten Verbesserungen des Signalbilds erzielt.

Hierzu werden verschiedene, auch asymmetrische Konzentrationskombinationen der beiden Primer ausgetestet. Es wird überprüft bei welcher Kombination der niedrigste C_T - und der höchste ΔR_n -Wert erhalten werden. Dazu wird unter der Anwendung der besten Reaktionsbedingungen aus dem ersten Experiment folgende 3 x 3-Matrix (bitte jeweils 4 Wiederholungen pro Kombination) erstellt:

Tab. 12: Primer-Matrix

Reverse Primer [nM]	Forward Primer [nM]		
	50	300	900
50	50/50	50/300	50/900
300	300/50	300/300	300/900
900	900/50	900/300	900/900

Durch die Anwendung asymmetrischer Primer-Konzentrationen wird eine Veränderung der programmierten Annealing-Temperatur um $\pm 2^\circ\text{C}$ simuliert, also für jeden Primer ein Temperatur-bereich von 4°C überprüft. Die Mikrotiterplatte wird hierzu wie folgt belegt:

Tab. 13: Belegungsschema für die Primer-Matrix (50 µl Reaktionen)

Pos.	Master-Mix [µl]	10 µM Sonde [µl]	Matrize [µl]	20 µM F-Primer [µl]	20 µM R-Primer [µl]	ddH ₂ O [µl]	Gesamt-Vol. [µl]
A1-4	40	0.5	5.0	0.125	0.125	4.25	50
A5-8	40	0.5	5.0	0.125	0.75	3.625	50
A9-12	40	0.5	5.0	0.125	2.25	2.125	50
B1-4	40	0.5	5.0	0.75	0.125	3.625	50
B5-8	40	0.5	5.0	0.75	0.75	3.0	50
B9-12	40	0.5	5.0	0.75	2.25	1.5	50
C1-4	40	0.5	5.0	2.25	0.125	2.125	50
C5-8	40	0.5	5.0	2.25	0.75	1.5	50
C9-12	40	0.5	5.0	2.25	2.25	0	50
D1-4 (NTC)	40	0.5	0.0	2.25	2.25	0	50
D5-8 (NAC)*	40	0.5	5.0	2.25	2.25	0	50

*) Zugabe von 1 µl einer 0.5 %igen SDS-Lösung zu jeder NAC-Reaktion

Im Anschluß an den On-Line-Lauf wird der File analysiert. Die Farbintensitäten der einzelnen Positionen (je heller, desto mehr Amplifikat wurde gebildet) geben einen ersten Eindruck über den Einfluß der unterschiedlichen Primer-Konzentrationen. Sie können die Daten des On-Line Laufes ($R_n + C_T$) in Excel exportieren (**results**, s.u.) oder aber sich einen schnellen Überblick mit Hilfe des C_T -Displays des Amplification Plots verschaffen.

Für eine exakte Analyse auf dem 7200 SDS führen Sie eine Endpunktmessung der Mikrotiterplatte durch:

- gehen Sie in das **File menu** und öffnen Sie **New Plate**
- es erscheint die „New Plate“-Dialogbox. Aktivieren Sie dort unter **Run** die **Plate Read**-Funktion
- schreiben Sie die folgende Maske:
A1-C12 = UNKN
D1-4 = NTC
D5-8 = NAC
- führen Sie den Plattenlesevorgang aus und speichern Sie den Lauf unter demselben Namen wie das On-Line Dokument ab, jedoch mit der Extension **.read**.

- gehen Sie in das **Instrument-Menü**, wählen dort den Befehl **Diagnostics** und aktivieren darunter **Advanced Options**. In der nun erscheinenden Dialogbox inaktivieren Sie **Use Spectral Compensation for Endpoint** und bestätigen mit OK. Die nun erscheinende Fehlermeldung können Sie ignorieren.
- Anschließend den Befehl **Analyze** aktivieren, um die Auswertung zu starten.
- um das Ergebnis in Excel zu importieren, aktivieren Sie das **File-Menü**, darunter die Funktion **Export** und schließlich **Results**.
- es erscheint eine Dialogbox, in der Sie u.a. aufgefordert werden den File zu benennen. Geben Sie den Daten die Endung **.result** und definieren Sie, wohin die Daten abgespeichert werden sollen. Anschließend können Sie die SDS-Software verlassen.
- öffnen Sie den File in Excel und fassen Sie die R_n -Werte tabellarisch zusammen. Wählen Sie die Primer-Kombination aus, bei der der höchste R_n -Wert erreicht wird.

Sollten Sie unterschiedliche Ergebnisse für die NTCs und die NACs erhalten, so überprüfen Sie bitte:

- a) mögliche Kontaminationsquellen
- b) das Design Ihrer Oligonukleotide (gegebenenfalls Neudesign eines der beiden Primer)

9) Weitere Optimierungsmöglichkeiten bestehen in folgenden Experimenten:

- a) Austesten der Sonden-Konzentration (50-200 nM): Ziel ist es zum einen die Sensitivität weiter zu steigern, zum anderen jedoch - falls möglich - die Kosten pro Reaktion zu senken.

- b) Annealing-Temperatur $\pm 2^\circ\text{C}$: Ist eine weitere Senkung des C_T - bzw. Steigerung des ΔR_n -Werts möglich? Aufgrund der Primer-Matrix sind jedoch nur noch schwache Veränderungen zu erwarten.

10) Jetzt kann bereits eine erste Quantifizierung gegen die eigenen Standards erfolgen. Damit eine Standardkurve erstellt werden kann, sind mindestens 5 Verdünnungsstufen erforderlich, z.B. 10, 100, 1000, 10^4 , 10^5 , und 10^6 Kopien. Natürlich können die Standards auch enger gefaßt werden, wenn nur wenige Kopien der Zielsequenz im Probenmaterial erwartet werden. Es sollte von der Verwendung von Verdünnungen <10 Kopien Abstand genommen werden, da der Nachweis so niedriger Kopienzahlen bereits ein statistisches Problem darstellt. So liegt die Wahrscheinlichkeit, das eine einzige Kopie nicht nachgewiesen werden kann (weil sie nicht in dieser Verdünnungsstufe enthalten ist), bei ca. 37 %!

Um die Variation des RT-Schritts zu erfassen, sollten Standards wie auch Proben jeweils in Triplikaten untersucht werden. Als Test auf DNA-Kontaminationen kann bei Anwendung der Gold RT-PCR eine „Ohne RT-Kontrolle“ einbezogen werden, indem das Enzym MuLV Reverse Transkriptase weggelassen wird.

Bewertung der Qualität des Assays:

1) Standardabweichung der C_T-Werte:

Die Standardabweichung der C_T-Werte für Wiederholungen sollte ≤ 0.16 betragen. Die häufigste Ursache für eine hohe Standardabweichung liegt in der Pipettiergenauigkeit (empfohlene Pipettierstrategie s. Abb. 14).

2) C_T-Werte der Standardkurve:

Bei einer Verdopplung der Startkopienzahl sollte der C_T-Wert um einen Zyklus abnehmen - bitte die pipettierten Standards daraufhin überprüfen!

3) MSE:

Die MSE (Mean Squared Error)-Linie in der Multikomponenten-Ansicht („Multicomponent View“) sollte über den Verlauf der PCR flach verlaufen und kleiner 200 sein.

4) Best Fit:

In der Rohdaten-Ansicht („Raw Spectra View“) repräsentiert „Best Fit“ für die gewählte Position die zugehörigen Reinfarben-Spektren. „Best Fit“ sollte deshalb dem Verlauf der Rohdatenkurve möglichst ähnlich sein. Hierzu unter „Advanced Options“ „Best Fit“ in der Dialogbox ankreuzen und unter „View“ „Raw Spectra“ aufrufen.

Falls der Verlauf von „Best Fit“ der Rohdatenkurve nicht entspricht, kann es dafür zwei Gründe geben:

- die Komponenten der Reinfarbenkalibrierung von der Installation passen nicht zum Farbsignal für diese Position.
- dem Probenotyp im „Plate Document“ wurde der falsche Reporterfarbstoff in der „Sample Type Setup“-Dialogbox zugeordnet.

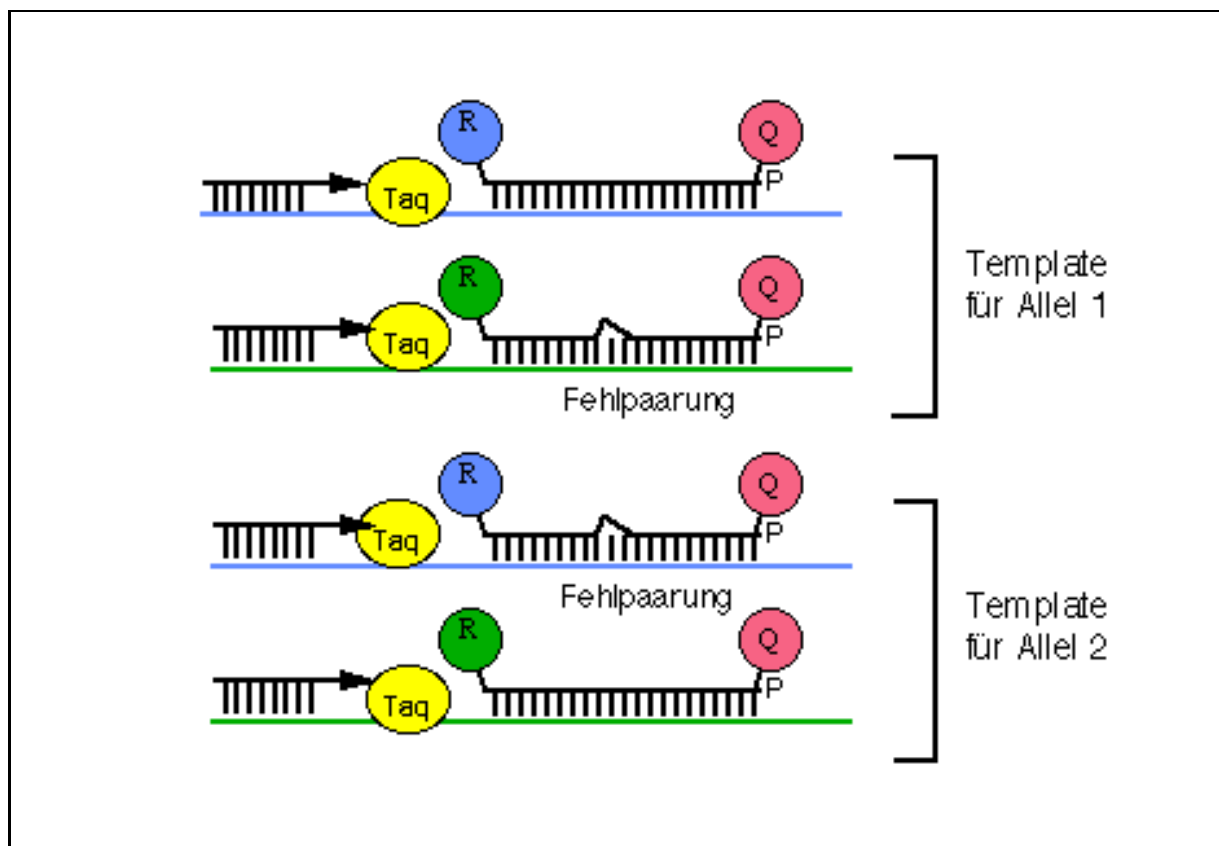
3.3.3 Optimierung der Allel-Differenzierung

Die TaqMan® PCR kann auch dazu verwendet werden, Allele zu differenzieren (AD-TaqMan® PCR). Ziel ist es, die Reaktionsbedingungen zu ermitteln, bei denen die Hybridisierung einer exakt passenden Sonde im Vergleich zu der einer Sonde mit Fehlpaarung favorisiert wird. Hierzu werden folgende Unterschiede im Hybridisierungsverhalten der beiden Allel-spezifischen Sonden ausgenutzt:

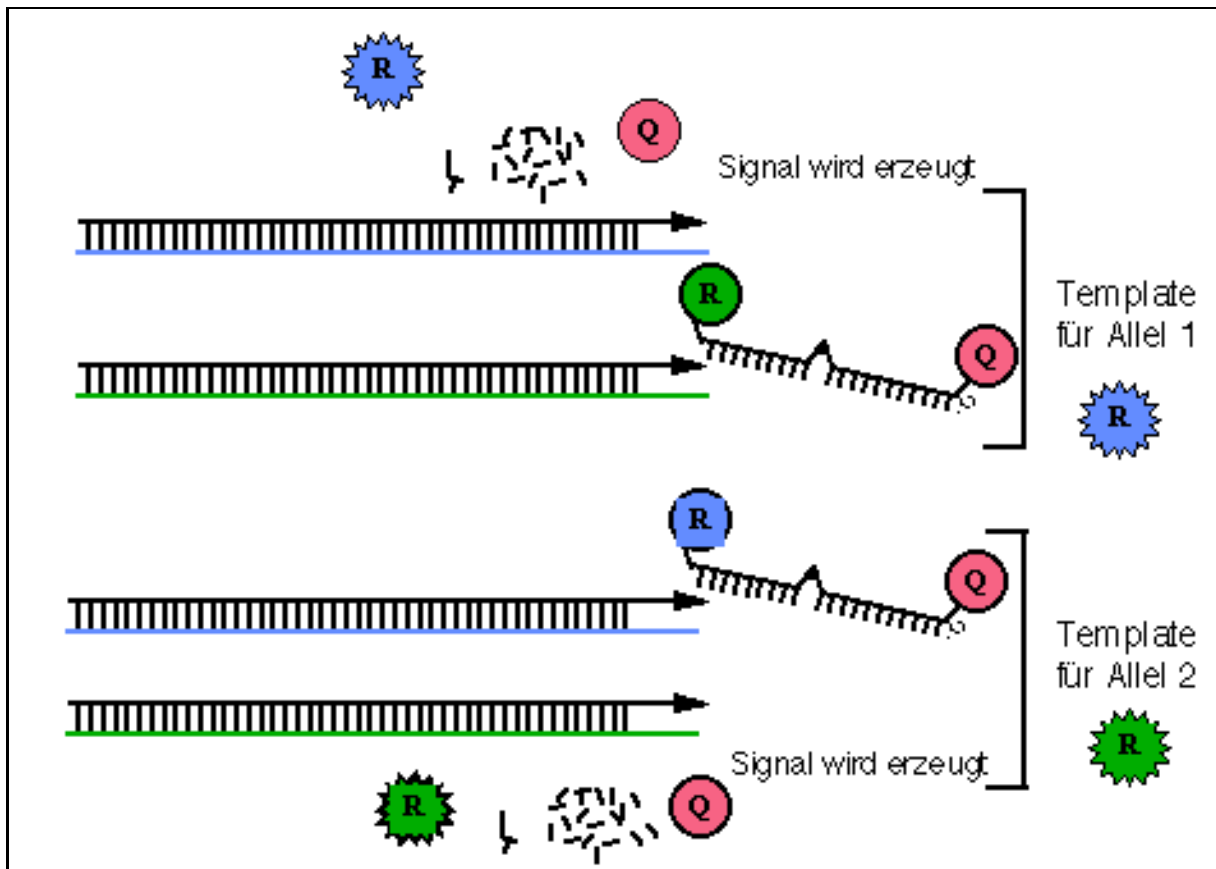
- der auflockernde Effekt einer Fehlpaarung in der Sonde wirkt thermodynamisch negativ auf ihren T_m , d.h. eine Sonde mit Fehlpaarung besitzt einen niedrigeren T_m , als die 100 %ig passende Sonde.
- die Reaktion verläuft unter kompetitiven Bedingungen, d.h. eine Allel-Differenzierung wird u.a. dadurch erreicht, das die stabil anbindende (da 100 %ig passende) Sonde die Hybridisierung der fehlgepaarten Sonde blockiert.
- die Sonde muß zunächst von der Taq Polymerase verdrängt werden, so daß deren 5'-Exonukleaseaktivität eine y-förmige Struktur erkennen kann. Dabei genügt bereits eine Verdrängung von 1-3 Basen am 5'-Ende (16) der Sonde! Die vollständige Verdrängung der Sonde erfolgt jedoch im Falle einer Sonde mit Fehlpaarung schneller, so daß für die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase weniger Zeit bleibt die Sonde zu schneiden.

Abb. 15: Allel-Differenzierung mittels TaqMan® PCR

a) Kompetitive Anlagerung der Sonden



- b) 100 %ig passende Sonde wird hydrolisiert und gibt das entsprechende Fluoreszenzsignal, während die andere verdrängt wird



Bei der Allel-Differenzierung kommt der Sondenauswahl eine ähnliche Bedeutung zu, wie den Standards bei der Quantifizierung. Die Sondenauswahl ist insbesondere dann schwierig, wenn durch die Punktmutation der G/C-Gehalt der Sonde beeinflusst wird, weshalb nachfolgend näher auf die notwendige Vorgehensweise eingegangen werden soll.

Die folgenden Schritte sind bei der Optimierung der Reaktion durchzuführen:

- 1) Auswahl der Zielsequenz.
- 2) Design der Sonde sowie der beiden PCR-Primer mit Hilfe der Primer Express™ Software. Dabei sollten folgende allgemeine Hinweise beachtet werden:

Sonden-Design:

- berechneter T_m von 65-67°C
- Kein G am 5'-Ende der Sonde
- Mutationsstelle möglichst in der Mitte der Sonde plazieren, da sie dort den größten destabilisierenden Effekt auf die Hybridisierung besitzt
- die Sondensequenz sollte mehr C's als G's besitzen

- die Sondenlänge anpassen, damit beide Sonden den gleichen T_m besitzen
- die Sonde für das Allel 1 mit TET, die für das Allel 2 mit FAM markieren

Primer-Design:

- berechneter T_m von 58-60°C
- Primer sollen relativ schwach anbindende 3'-Enden haben, um unspezifische Primerbindungen zu reduzieren („3'-Instabilität“): Deshalb nur 1 bzw. 2 G's oder C's innerhalb der letzten 5 Basen am 3'-Ende der Primer
- beide Primer so nah wie möglich an der Sonde positionieren: Kurze Amplikons (75-150 bp)

3) Bestellen der Primer, der Sonde und der anderen benötigten Reagenzien sowie Verbrauchsmaterialien (s. 3.3.2).

4) Nach Erhalt der Primer und der Sonde: Exakte Konzentrationsbestimmung über eine UV-spektrometrische Messung (s. 3.3.2).

5) **Primer-Matrix:** Für eine AD- TaqMan® PCR wird ein Reaktionsvolumen von 25-50 µl empfohlen. Das nachfolgende Standard-Thermocycler-Programm stellt den Ausgangspunkt für die Optimierung der Reaktion dar. Falls Sie zunächst einmal austesten wollen, ob überhaupt ein Amplifikationssignal detektiert wird, setzen Sie die Primer bitte je 300 nM ein. Es sollten folgende Ausgangs-Endkonzentrationen im Ansatz verwendet werden:

a) Standardprotokoll:

H ₂ O _{Bidest}	-
20 % Glycerin	8 %
10x TaqMan Puffer A	1x
25 mM MgCl ₂ -Lösung	5,0 mM
dATP	200 µM
dCTP	200 µM
dGTP	200 µM
dUTP	400 µM
Primer 1	50-900 nM
Primer 2	50-900 nM
Sonde Allel 1	100 nM
Sonde Allel 2	100 nM
AmpliTaQ Gold (5 U/µl)	1,25 U
AmpErase UNG	0,25 U
DNA	ca. 10.000 Startkopien

b) Problem-Assays

H ₂ O ^{Bidest}	-
20 % Glycerin	8 %
2 % Gelatine	0,05 %
Tween 20	0,01 %
10x TaqMan Puffer A	1x
25 mM MgCl ₂ -Lösung	5,0 mM
Deaza-dATP	200 µM
dCTP	200 µM
Deaza-dGTP	200 µM
dUTP	400 µM
Primer 1	50-900 nM
Primer 2	50-900 nM
Sonde Allel 1	100 nM
Sonde Allel 2	100 nM
AmpliAq Gold (5 U/µl)	1,25 U
AmpErase UNG	0,25 U
DNA	ca. 10.000 Startkopien

Programm:

UNG-Verdau	50°C für 2 min
AmpliAq Gold-Aktiveringung	95°C für 10 min
40 Zyklen	95°C, 15 sec 60°C, 1 min

Als erstes Experiment der AD-Optimierung wird eine 3x3 Primer-Matrix von [50 nM] bis [900 nM] in je 4 Wiederholungen durchgeführt (s. S. 44). Das Pipettierprotokoll aus Tab. 13 kann übernommen werden. Bei Durchführung der Primer-Matrix eines AD-Assays verwenden Sie bitte nur die TET-markierte Sonde und DNA des dazu passenden Genotyps! Wählen Sie die Primerkombination, die den höchsten R_n-Wert ergeben hat.

6) **Sonden-Matrix:** Das zweite Experiment soll das unterschiedliche Hybridisierungsverhalten der kompetitiv eingesetzten Sonden kompensieren bzw. einen Abgleich der Fluoreszenz der beiden Sonden erzielen.

Hinweis: **Dieses Experiment kann aufgrund der unterschiedlichen Optik von 7200 SDS und 7700 SDS zwischen beiden Systeme zu unterschiedlichen Ergebnissen führen!**

Ein Abgleich der Fluoreszenz der beiden Sonden kann wie nachfolgend beschrieben durchgeführt werden, ohne das dazu eine PCR erforderlich wird:

Zunächst muß eine 2x Test-Stammlösung wie folgt hergestellt werden (Lagerung bei 2-6°C):

Tab. 14: Herstellung von 5 ml 2x-Teststammlösung für die Sonden-Matrix

Reagenz	Volumen [μ l]	Konz. in der Stammlösung
10 % Tween 20	10	0.02 %
10x TaqMan Puffer A	1000	2x
25 mM MgCl ₂	2000	10 mM
ddH ₂ O	1990	-

Je nachdem, welches der beiden Systeme Sie in Ihrem Labor verwenden, bereiten Sie anschließend eine Mikrotiterplatte entsprechend Tab. 15 bzw. 16 vor.

Tab. 15: Vorbereitung der Mikrotiterplatte zur Durchführung einer Sonden-Matrix auf dem 7200 SDS

Pos.	2x Test Lsg. [μ l]	1 μ M FAM- Sonde [μ l]	1 μ M TET- Sonde [μ l]	ddH ₂ O [μ l]	Gesamt- Vol. [μ l]	End.konz. FAM- Sonde [nM]	End.konz. TET- Sonde [nM]
A1-4	125	12.5	12.5	100	250	50	50
A5-8	125	12.5	25	87.5	250	50	100
A9-12	125	12.5	37.5	75	250	50	150
B1-4	125	12.5	50	62.5	250	50	200
B5-8	125	12.5	62.5	50	250	50	250
B9-12	125	12.5	75	37.5	250	50	300
C1-4	125	12.5	87.5	25	250	50	350

Tab. 16: Vorbereitung der Mikrotiterplatte zur Durchführung einer Sonden-Matrix auf dem 7700 SDS

Pos.	2x Test Lsg. [μ l]	1 μ M FAM- Sonde [μ l]	1 μ M TET- Sonde [μ l]	ddH ₂ O [μ l]	Gesamt- Vol. [μ l]	End.konz. FAM- Sonde [nM]	End.konz. TET- Sonde [nM]
A1-4	125	12.5	50	62.5	250	50	200
A5-8	125	25	25	75	250	100	100
A9-12	125	25	50	50	250	100	200
B1-4	125	50	12.5	62.5	250	200	50
B5-8	125	50	25	50	250	200	100

1. Programmieren Sie Ihr System entsprechend der Belegung der dazugehörigen Tabelle: Stellen Sie hierzu unter **New Plate** den Plattentypus **Allelic Discrimination** sowie den **Plate Read**-Laufotyp ein. Definieren Sie die belegten Positionen als **UNKN** und die freien als **Not in Use**.

2. Stellen Sie die fertige Mikrotiterplatte in das System und starten Sie die Endpunktmessung durch Betätigung des **Post PCR Read** Knopfes.

3. Speichern Sie den Lauf.

4. Achten Sie bei Verwendung eines 7200 SDS darauf, das unter **Advanced Options (Instrument-Menü)** die spektrale Kompensation inaktiv ist. Bei Einsatz des 7700 SDS schalten Sie diese Funktion hingegen bitte hinzu!

5. Analysieren Sie den Lauf und schauen Sie sich das Ergebnis unter **Allelic Discrimination (Analysis-Menü)** an.

6. Gehen Sie anschließend ins **File**-Menü, wählen Sie die **Export**-Funktion und darunter **Multicomponent**, um die relevanten Daten in Excel zu exportieren.

7. Wählen Sie die Sondenkonzentrations-Kombination aus, bei der die FAM- und TET-Multikomponentenwerte am ähnlichsten sind (falls bei Verwendung eines 7200 SDS keine balancierten Fluoreszenzen erzielt werden können, verwenden sie für die TET-Sonde bitte 350 nM).

Es ist auch möglich eine geeignete Sondenkombinations-Konzentration mit Hilfe einer PCR zu ermitteln und so zusätzlich das Hybridisierungsverhalten der Sonden zu kompensieren. Von jeder Sonden-Kombination (50-300 nM) werden wiederum 4 Wiederholungen pipettiert. Die Matrix wird jedoch zweimal durchgeführt, also 2x 36 Proben: Zum einen gegen DNA, homozygot Allel 1 und zum anderen gegen DNA, homozygot Allel 2.

Definieren Sie den Lauf bei Anwendung eines 7700 SDS als Single Reporter Real-Time und für den 7200 SDS als Single Reporter Lauf (PCR wird extern durchgeführt). Nun im **Sample Type Setup** den Reporterfarbstoff der NAC von FAM auf **TET** abändern. Dann zunächst in der Setup-View bei auf **FAM** eingestelltem Pop-Up Fenster für das Fluoreszenzniveau die Positionen A1-F12 als UNKN definieren und die Matrix wie folgt eingeben:

Allel 1 (A1)-DNA:

A1-4: 50/50	A5-8: 50/100	A9-12: 50/200
B1-4: 100/50	B5-8: 100/100	B9-12: 100/200
C1-4: 200/50	C5-8: 200/100	C9-12: 200/200

Allel 2 (A2)-DNA:

D1-4: 50/50	D5-8: 50/100	D9-12: 50/200
E1-4: 100/50	E5-8: 100/100	E9-12: 100/200
F1-4: 200/50	F5-8: 200/100	F9-12: 200/200

Dann das Pop-Up Fenster für das Fluoreszenz-Niveau auf **TET** umstellen, die Positionen A1-F12 als NAC definieren und die Matrix ein zweites Mal nach gleichem Schema eingeben.

Steht für die Auswertung ein 7700 SDS zur Verfügung, so gibt im Anschluß an die Reaktion und der Analyse der gesammelten On-Line Daten bereits die Intensität der Farbpunkte einen Hinweis auf die Ausbeute für die verschiedenen Sondenkonzentrations-Kombinationen: Je heller das Innere der Kreise, desto mehr Moleküle der Sonde, in deren Fluoreszenzniveau Sie sich gerade befinden, sind während der Reaktion hydrolysiert worden.

Für eine exakte Analyse führen Sie bitte von der fertigen Reaktion eine Endpunktanalyse durch (bei 7700 SDS im Anschluß an die On-Line PCR) und exportieren Sie aus dem **File**-Menü den **Experimental Report** in Excel. Verwenden Sie die Sondenkonzentration, bei der für jedes Allel mit der passenden Sonde ein möglichst hohes spezifisches Signal erzielt wird. Gleichzeitig sollte der Hintergrund beim nichtpassenden Allel aber so niedrig wie möglich sein.

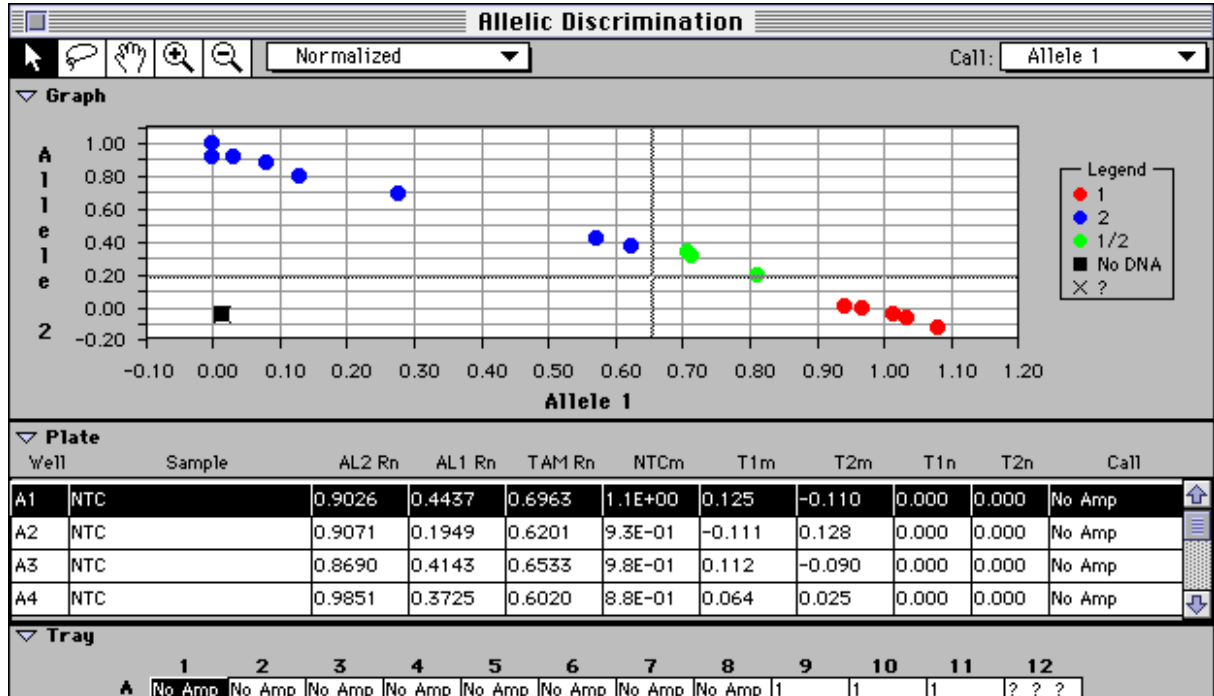
7) Optimieren der Stringenz der Reaktion: Ziel dieser Optimierungsstufe ist es die kombinierte Annealing/Extensionstemperatur so zu optimieren, daß eine automatische Bestimmung der Unbekannten (Autocalling), insbesondere aber auch der Standards, durch die Software möglich ist. Sie sollten hierfür jeden der Standards 8mal (mindestens 6mal) vorpipettieren:

A1-A8	= NTC
A9-B4	= Allel 1
B5-B12	= Allel 2
C1-...	= UNKN (gemischte Genotypen)

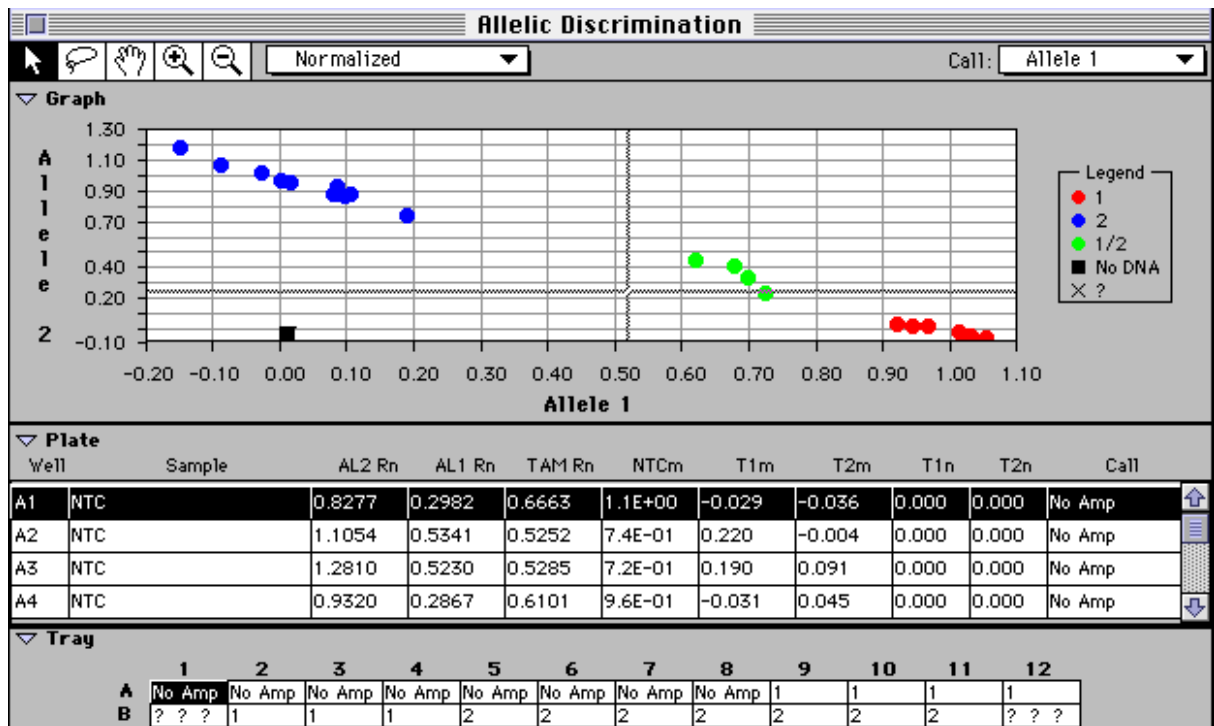
Als Standards dienen entweder Proben bekannten Genotyps, PCR-Produkte bekannten Genotyps oder entsprechend kloniertes Material. Die Standards sollten möglichst die beiden homozygoten Allelzustände repräsentieren. Ist die Software mit 60°C zu einer automatischen Genotypisierung (Autocalls) nicht in der Lage, so muß das Experiment mit 61°C oder noch höheren Temperaturen wiederholt werden. Erfahrungsgemäß liegt die Assay-Temperatur für Sonden mit einem T_m von 65-67°C bei 60-63°C (s. Abb. 16).

Abb. 16: Stringenzoptimierung (Fenster **View Allelic Discrimination**) eines AD-Assays

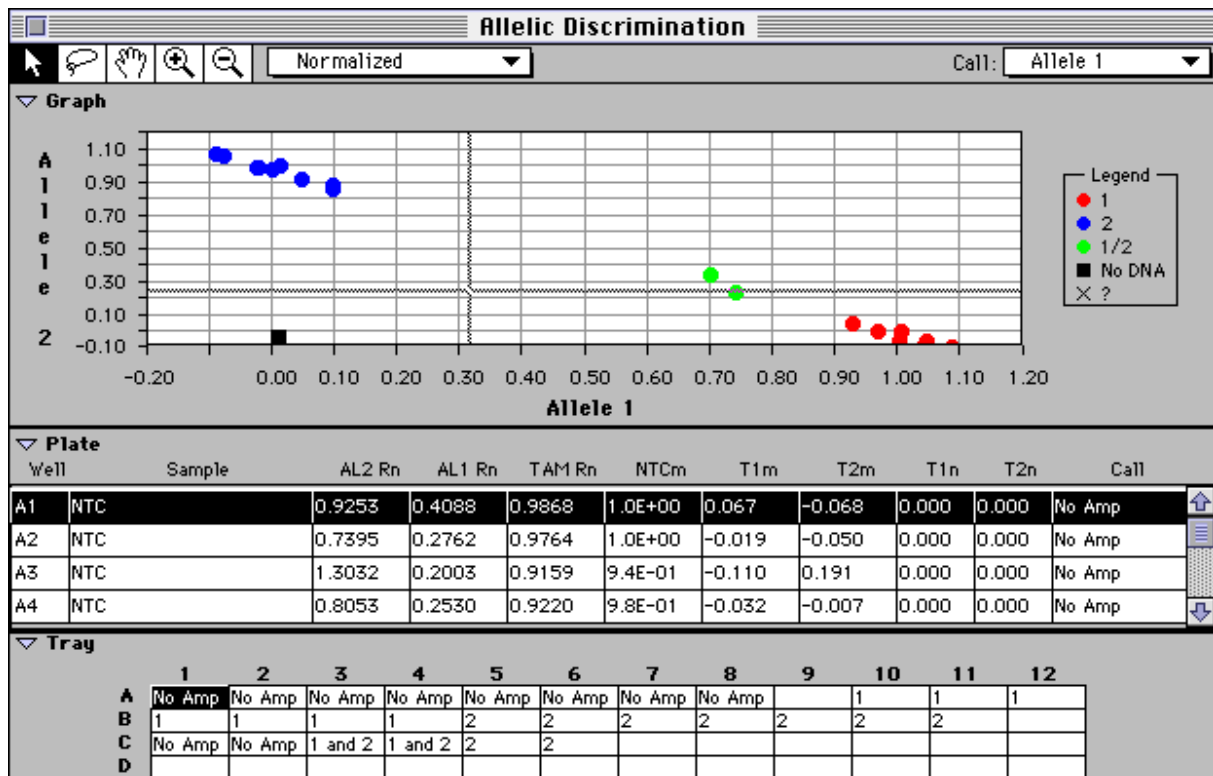
a) Annealing/Extension: 61°C



b) Annealing/Extension: 62°C



c) Annealing/Extension: 63°C



Werden keine Autocalls zu Beginn der Optimierung erzielt, so verfahren Sie bitte wie auf S. 88 beschrieben. Bei der Durchführung von AD-Experimenten, kann es hilfreich sein, die abgelegten Reinfarbenspektren etwa alle 90 Tage zu erneuern. Überprüfen Sie die Qualität der Reinfarbenspektren daher regelmäßig durch Hinzuschalten des Best Fit-Algorithmus (s. S. 47).

Insbesondere bei Verwendung eines 7200 SDS überprüfen Sie bitte anhand der Rohdaten, ob zumindest eine der Wiederholungen eines jeden Standards innerhalb des dynamischen Bereichs des Detektors liegt (anhand der Rohdaten: Flaches Signal bei einer Intensität von 10.000 anstelle der üblichen Peaks). Sollte dies nicht der Fall sein, so müssen die Konzentrationen der beiden Sonden einander proportional reduziert werden.

3.4 Positiv/Negativ-Analysen

Der „Single Reporter“-Plattentypus kann bei Endpunktanalysen auch dazu verwendet werden, Positiv/Negativ-Analysen durchzuführen. Hierzu empfiehlt es sich eine Interne Positivkontrolle, kurz **IPC**, zu verwenden, um Falschnegative (z.B. durch PCR-Inhibitoren verursacht) ausschließen zu können.

Prinzipiell erkennt der „Single Reporter“-Plattentypus ob eine Amplifikation in den Unbekannten (UNKN) Proben stattgefunden hat oder nicht, indem er die **normalisierten Reportersignale (R_n)** der UNKN mit denen der Ohne-Template-Kontrollen (NTC) vergleicht. Es sollten mindestens 6-8 NTCs pro Platte pipettiert werden (bei statistischer Absicherung von $\geq 99\%$), da ansonsten aufgrund des erhöhten t-Faktors ein sehr hoher Schwellenwert berechnet wird, der zu Falsch-Negativen führen könnte (s.u.)!

Mit Hilfe der NTCs wird der **R_n -Wert** gebildet. Die SDS-Software ermittelt von den R_n -Werten der NTCs den Mittelwert sowie die Standardabweichung. Die Standardabweichung wird dann automatisch mit einem Faktor aus der T-Verteilungstabelle (Tab. 17) multipliziert, wodurch ein Schwellenwert gebildet wird (**Threshold- ΔR_n**).

Tab. 17: T-Verteilungstabelle (19)

Probenzahl	Freiheitsgrade	95%	99%	99,5%	99,7%	99,9%
3	2	2,920	6,965	9,925	12,852	22,328
4	3	2,353	4,541	5,841	6,994	10,214
5	4	2,132	3,747	4,604	5,321	7,173
6	5	2,015	3,365	4,032	4,570	5,894
7	6	1,943	3,143	3,707	4,152	5,208
8	7	1,895	2,998	3,499	3,887	4,785
9	8	1,860	2,896	3,355	3,705	4,501
10	9	1,833	2,821	3,250	3,573	4,297
11	10	1,812	2,764	3,169	3,472	4,144
12	11	1,796	2,718	3,106	3,393	4,025
13	12	1,782	2,681	3,055	3,330	3,930
14	13	1,771	2,650	3,012	3,278	3,852
15	14	1,761	2,624	2,977	3,234	3,787
16	15	1,753	2,602	2,947	3,197	3,733
17	16	1,746	2,583	2,921	3,165	3,686
18	17	1,740	2,567	2,898	3,138	3,646
19	18	1,734	2,552	2,878	3,113	3,610
20	19	1,729	2,539	2,861	3,092	3,579
21	20	1,725	2,528	2,845	3,073	3,552
22	21	1,721	2,518	2,831	3,056	3,527
23	22	1,717	2,508	2,819	3,041	3,505
24	23	1,714	2,500	2,807	3,027	3,485
25	24	1,711	2,492	2,797	3,014	3,467
26	25	1,708	2,485	2,787	3,003	3,450
27	26	1,706	2,479	2,779	2,992	3,435
28	27	1,703	2,473	2,771	2,982	3,421
29	28	1,701	2,467	2,763	2,973	3,408
30	29	1,699	2,462	2,756	2,965	3,396
31	30	1,697	2,457	2,750	2,957	3,385
32-41	40	1,684	2,423	2,704	2,902	3,307
42-61	60	1,671	2,390	2,660	2,849	3,232
62-121	120	1,658	2,358	2,617	2,798	3,160

Die Höhe des Threshold- ΔR_n ist abhängig von:

- der Anzahl der NTCs
- Mittelwert und Standardabweichung der R_n -Werte
- Vertrauensintervall, das unter „**Statistic Settings**“ eingestellt wurde.

Wird in einer UNKN-Position der Threshold- ΔR_n überschritten, so wird diese als Positiv gewertet.

Nachdem die Mikrotiterplatte gemessen wurde, kann vor Beginn der Analyse das Vertrauensniveau von den vorgegebenen 99,7% abgeändert werden. Hierzu:

1. das Menü **Analyze** aufrufen
2. dort das Untermenü **Statistical Settings** öffnen
3. in der nun erscheinenden Dialogbox das gewünschte Vertrauensniveau einstellen und **OK** drücken.

In einem **Single Reporter IPC** Experiment werden 2 unterschiedlich markierte TaqMan-Sonden pro Reaktion simultan eingesetzt. Deswegen müssen in der Setup View auch 2 unterschiedliche Farbniveaus programmiert werden (s.S. 92). Weitere wichtige Hinweise zur Programmierung von Experimenten, bei denen mehr als 1 Sonde pro Reaktionsgefäß zum Einsatz kommt, finden Sie in Kapitel 4.6.

Bewertung der Ergebnisse:

Eine Amplifikation der Zielsequenz zeigt ein positives Ergebnis (+) an; auch dann, wenn die IPC kein Signal liefert. Falschnegative Proben werden im Anschluß an die Analyse durch **No Amp** oder **?** gekennzeichnet, da entweder die IPC oder die Zielsequenz kein Amplifikationssignal ergaben (s. S. 94).

Für die Anwendung einer IPC sollten folgende Punkte berücksichtigt werden:

1. Die Primer für die IPC und die eigentliche Zielsequenz sollten möglichst ähnliche, idealerweise die gleichen Annealingtemperaturen besitzen.
2. Die Länge der beiden Amplifikate sollte sehr ähnlich sein. Kürzere Amplifikate (≤ 150 bp) sind vorzuziehen.
3. Um die IPC erfolgreich nutzen zu können, sollte ihre DNA/RNA nicht in zu hohen Kopienzahlen pro Reaktion eingesetzt werden. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn die eigentliche Zielsequenz in sehr niedrigen Kopienzahlen nachgewiesen werden soll. Nur so kann eine präferentielle Amplifikation der IPC vermieden werden, die ansonsten erneut zu Falsch-Negativen Ergebnissen führen würde. In Vorabstudien muß sichergestellt werden, das durch die Coamplifikation der IPC der Nachweis der eigentlichen Zielsequenz nicht beeinflußt wird!

4. Anstelle eines aufwendigen Austestens der richtigen IPC-Startkopienzahl zur Vermeidung präferentieller Amplifikation, können auch limitierende Primer-Konzentrationen (s. S. 31) geschaffen werden.

Sollen ≥ 100 Kopien der Zielsequenz nachgewiesen werden, so sollten < 100 Kopien der IPC zum Reaktionsansatz hinzugegeben werden. Soll ein Single-Copy-Nachweis erfolgen, so empfiehlt es sich dennoch, die IPC in Kopienzahlen von ≥ 10 zum Ansatz hinzuzugeben, da aus Gründen der Poisson-Statistik ansonsten das Vorhandensein von zumindest einer Kopie der IPC im Ansatz nicht gewährleistet werden kann. Unterscheiden sich die Effizienzen beider Reaktionen sehr stark, so kann das Verhältnis IPC : Zielsequenz von 10 : 1 bereits dazu führen, dass die Zielsequenz trotz Vorhandensein von 1 Kopie nicht nachgewiesen werden kann - Vorabstudien hierzu sind deshalb unerlässlich!!!

4. Die ABI PRISM™ Sequence Detection Produktlinie

4.1 Das ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System

Mit Hilfe des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systems (7700 SDS) wird es möglich, den Verlauf einer TaqMan PCR On-Line zu verfolgen. Dadurch werden Wissenschaftler zum ersten Mal in die Lage versetzt, den Ablauf einer Reaktion von ihrem Beginn bis zu ihrem Ende aufzunehmen und die so gewonnenen Daten im Anschluß an die Reaktion auszuwerten.

Das 7700 SDS besitzt einen eingebauten Thermocycler, wobei auf die bewährte Technologie des GeneAmp PCR Systems 9600 zurückgegriffen wurde. Dadurch ist es möglich, einmal auf dem 7700 SDS für Endpunktanalysen optimierte TaqMan PCR Assays auf externen 9600 bzw. 9700 Thermocyclern durchzuführen. Die anschließende Endpunktmessung einer ganzen Mikrotiterplatte dauert nur ca. 10 sec, so daß tausende von Proben im Verlaufe eines Arbeitstages überprüft werden können. Um eine Echtzeit-Analyse der bis zu 96 Proben (Mikrotiter-Format) eines Laufes zu ermöglichen, wurde der Heizdeckel des GeneAmp PCR Systems 9600 zu einem optischen Heizdeckel im 7700 SDS weiterentwickelt. Über jeder Thermocycler-Position befindet sich eine Linse, die den Lichtstrahl in das jeweilige Reaktionsgefäß weiterleitet.

Bei der Laser- und Detektionstechnologie wurde ebenfalls auf bewährte Elemente zurückgegriffen, die in der erfolgreichen ABI PRISM 377/310 Genetic Analyzer Produktlinie eingesetzt werden. Die Fluoreszenzanregung erfolgt mittels eines Argonlasers (488 nm), dessen Strahl über einen dichroiden Spiegel zunächst auf einen Multiplexer (MUX) gelenkt wird (s. Abb. 17). Der MUX ist über 96 Lichtleiter mit dem optischen Heizdeckel des Thermocyclers verbunden, wobei diese jeweils über einer der 96 Linsen enden. Mit Hilfe des MUX wird der Laserstrahl auf die einzelnen Positionen verteilt. Ein kompletter Plattenscan dauert etwa 7 Sekunden. Von der Linse fokussiert, dringt der Strahl in das geschlossene Reaktionsgefäß ein, regt dort die Fluoreszenzemission an, welche den Cyclus über jeweils den selben optischen Leiter wieder verläßt. Da die Fluoreszenz eine andere Wellenlänge besitzt, als der Laserstrahl, wird sie vom dichroiden Spiegel reflektiert, über eine Linse erneut fokussiert, auf einen Spektrographen geleitet und mittels einer CCD-Kamera in ein digitales Signal umgewandelt. Für jede Probe sammelt die CCD-Kamera somit alle 7 Sekunden die Emissionsdaten von 500 bis 660 nm!

Eine Analyse im geschlossenen Reaktionsgefäß bietet verschiedene Vorteile: Zum einen wird die Gefahr der Carry-Over Kontamination auf ein Minimum reduziert. Zum anderen wird die tatsächliche Arbeitszeit deutlich verringert, weil Post-PCR Schritte wie Gelelektrophoresen entfallen. Da jeder Pipettierschritt nach der PCR eine zusätzliche Standardabweichung von ca. 2 % bedeutet, erzielt eine TaqMan On-Line Analyse somit eine sehr hohe, mit konventionellen Methoden nicht erreichbare Genauigkeit. Der dabei erzielte dynamische Meßbereich ist mit 5-6 Größenordnungen enorm.

Für die Analyse im geschlossenen Reaktionsgefäß werden spezielle, optische Reaktionsgefäße benötigt, die keine störende Autofluoreszenz besitzen:

MicroAmp® Optical Tubes (N8010-933): 0,2 ml Reaktionsgefäße, deren Außenseite aufgeraut ist, um eine bessere Reflektion und damit Fluoreszenzausbeute zu erzielen.

MicroAmp® Optical Caps (N8010-0935): 8er-Streifen speziell geschliffener optischer Deckel, damit der Laserstrahl optimal in das Reaktionsgefäß weitergeleitet wird.

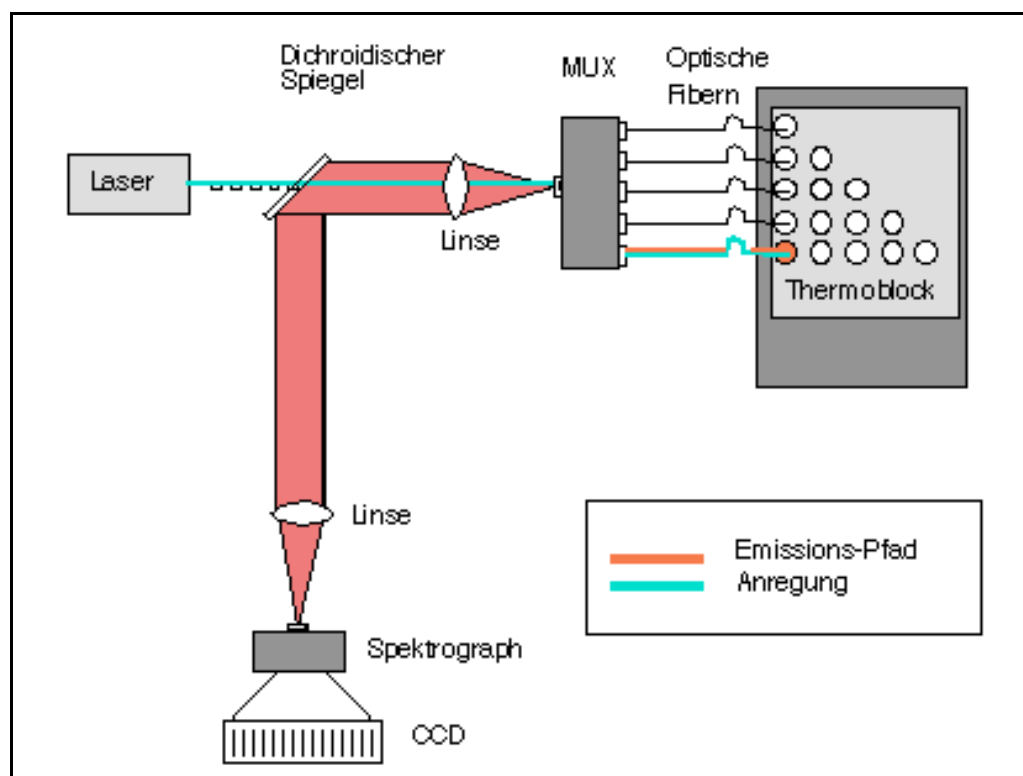
MicroAmp® Optical 96-Well Plate (N8010-0560): Vollständige Mikrotiterplatten, speziell für die Fluoreszenzanalyse entwickelt.

Die Steuerung des Systems erfolgt vollständig über einen Power Macintosh 4400. Es empfiehlt sich deshalb den Macintosh Computer wie auch den 7700 SDS gemeinsam auf einem Labortisch aufzustellen. Der Tisch sollte ca. 1,8 m Länge haben. Zwischen Tischoberfläche und Decke sollten vertikal mindestens 1,30 m Freiraum sein. Das 7700 SDS besitzt folgende Abmessungen:

<u>Länge:</u>	<u>Tiefe:</u>	<u>Höhe:</u>	<u>Gewicht:</u>
94 cm	72,5 cm	61 cm	128 kg

Die Temperatur im Laborraum sollte 30°C nicht überschreiten. Es wird eine 220 V/30 A Steckdose für den Stromanschluß des Systems benötigt.

Abb. 17: Das Prinzip der On-line TaqMan™ PCR Detektion - der Strahlengang im 7700 SDS



4.2 Das ABI PRISM™ 7200 Sequence Detection System

Mit Hilfe des ABI PRISM™ 7200 Sequence Detection Systems (7200 SDS) wird es möglich, TaqMan PCRs im Anschluß an die Reaktion einer Fluoreszenzmessung zu unterziehen und mit Hilfe der Sequence Detection Software professionell und Applikations-spezifisch auszuwerten.

Die Analyse erfolgt im Mikrotiterformat, wobei die Fluoreszenz der einzelnen Positionen mittels einer Xenon-Blitzlampe angeregt wird. Ein Cutoff-Filter läßt nur Fluoreszenzemissionen über 503 nm passieren. Die Emission wird zu einem Monochromator weitergeleitet und mit einer Photomultiplier Tube (PMT) verstärkt und detektiert. Die Messung der Fluoreszenz (500-660 nm) einer vollbelegten Mikrotiterplatte dauert ca. 10-12 Minuten. Die anschließende Applikations-spezifische Datenanalyse weniger als 1 Minute, wodurch die Messung von tausenden von Proben pro Arbeitstag ermöglicht wird.

Dabei bleiben alle Vorteile der TaqMan-Chemie erhalten:

- keine Post-PCR Arbeitsschritte wie z.B: Gelelektrophoresen durch das homogene Format der Reaktion
- Messung im geschlossenen Reaktionsgefäß direkt im Anschluß an die PCR: Neben der Arbeitersparnis wird insbesondere das Kontaminationsrisiko durch Carry-Over drastisch herabgesetzt
- Hohe Sicherheit beim Ergebnis: Spezifität der PCR wird mit der Spezifität einer Sondenhybridisierung kombiniert!

Die Steuerung des Systems erfolgt über einen Power Macintosh Computer mit mindestens 16 Mb RAM. Das 7200 SDS besitzt folgende Abmessungen:

<u>Länge:</u>	<u>Tiefe:</u>	<u>Höhe:</u>	<u>Gewicht:</u>
34 cm	46,5 cm	35 cm	17,5 kg

4.3 Software und Dateninterpretation

4.3.1 Begriffe und Definitionen

Das Signal einer TaqMan™ PCR repräsentiert die Veränderung in der Fluoreszenz-Emission des Reporter-Farbstoffs aufgrund der Hydrolyse der sequenz-spezifischen Sonde. Störende Fluktuationen der Fluoreszenz werden mit Hilfe eines dem Reaktionspuffer zugesetzten passiven Referenzfarbstoffs (ROX) ausgeglichen. Dieser normlisierende Effekt geht in die Berechnungen wie folgt ein:

R_n-Wert: Ein R_n-Wert (normalisiertes Reportersignal) entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporter-Farbstoffes dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffs. Unspezifische Einflüsse wie

Konzentrationsänderungen aufgrund von Voluminaschwankungen (Pipettierfehler) können somit ausgeglichen werden. Dabei repräsentieren R_n^+ -Werte die relative Fluoreszenz von Ansätzen mit Probenmaterial, während R_n^- -Werte die Fluoreszenz von Ohne-Template Kontrollen (NTC) darstellen.

ΔR_n -Wert: Weitere Schwankungen, die nicht auf dem PCR-abhängigen Nuklease-Verdau basieren, werden ausgeglichen, indem das binnen der ersten paar PCR-Zyklen erstellte Hintergrundsignal vom jeweiligen R_n -Wert abgezogen wird.

C_T -Wert: Der sogenannte Threshold Cycle drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfaßt wird. Für die Quantifizierung erstellt das System eine Standardkurve C_T über(LogN) der Startkopienzahl und ermittelt davon über Interpolation die Startkopienzahl der zu untersuchenden Proben.

MERKE: In einem PCR-System mit 100 % Effizienz nimmt der C_T -Wert mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um einen Zyklus ab!

4.3.2 Von der Fluoreszenzmission zur Datenaufnahme

Daten, die mit einem 7700 SDS und solche, die mit einem 7200 SDS gewonnen wurden, sind einander relativ ähnlich, unterscheiden sich jedoch in den absoluten Zahlenwerten. Dies beruht auf dem unterschiedlichen Weg von der Fluoreszenzmission zur Datenaufnahme bei beiden Systemen. Ein Vergleich soll dies deutlich machen:

A. Datenaufnahme beim 7700 SDS:

1. Laser-stimuliertes (488 nm) Fluoreszenzmissionsspektrum
 - im On-line Modus dauert die Laser-stimulierte Fluoreszenzanregung pro Reaktionsgefäß 25 msec, so daß inklusive der Bewegungszeiten der Optik eine Mikrotiterplatte in ca. 7 sec gelesen wird
 - im Plate Read-Modus beträgt die Dauer der Fluoreszenzanregung pro Reaktionsgefäß 50 msec, um eine höhere Signalintensität zu erzielen
2. Fluoreszenzmission passiert Filter, der nur Licht >503 nm durchläßt
3. Spektrograph teilt die Fluoreszenz von 500-660 nm in ein definiertes Muster auf und leitet sie auf die CCD-Kamera weiter
4. die CCD-Kamera teilt das Spektrum von 500-660 nm in 32 Datenpunkte ein und wandelt das Signal als Pixel in Intensitäten um (relative Kalibrierung!, d.h. Pixel-Intensität variiert von System zu System!)
5. durch Vergleich mit den Referenzspektren erfolgt eine Multikomponenten-Analyse, über die die spektralen Anteile der verwendeten Farben am Emissionsspektrum herausgerechnet werden

6. Erstellung der „Clipped Data“ (nur die letzten 3 Datenpunkte der Extensionsphase für jedes Reaktionsgefäß) und Berechnung des Mittelwerts
7. Normalisieren auf Signal der passiven Referenz
8. Grundlinienberechnung aus Signal der Zyklen 3-15
9. multipliziert mit 10x Standardabweichung = C_T -Wert (beim C_T -Wert liegen ca. 10^{-9} M der Sonde geschnitten vor)

B. Datenaufnahme beim 7200 SDS:

1. Xenon-Blitzlampe stimuliertes Fluoreszenzemissionsspektrum
 - 25 msec pro Reaktionsgefäß*)
2. Fluoreszenzemission passiert Filter, der nur Licht >503 nm durchläßt (Cutoff-Filter)
3. Monochromator zur Kontrolle der richtigen Wellenlängen (32 Datenpunkte pro Spektrum)
4. Aufnahme der optischen Daten in einer Photomultiplier Tube (PMT)
5. durch Vergleich mit den Referenzspektren erfolgt eine Multikomponenten-Analyse, über die die spektralen Anteile der verwendeten Farben am Emissionsspektrum herausgerechnet werden
6. Normalisieren auf Signal der passiven Referenz
7. Ermitteln der R_n^- -Werten der NTCs, Berechnung des Mittelwerts sowie der Standardabweichung: Bildung eines statistisch abgesicherten Schwellenwerts
8. Bewertung, ob positiv bzw. negativ

*) beim 7200 kann die Lesezeit pro Reaktionsgefäß vom Anwender definiert werden und so die Daten mit solchen vom 7700 SDS vergleichbar gemacht werden. Für die vorgegebenen 25 msec ergibt dies eine Lesezeit von ca. 10-12 min für eine komplette Mikrotiterplatte.

4.4 ABI PRISM™ Sequence Detection Software (Vers. 1.6)

Die 1.6 SDS Software - wie auch die Vorläuferversion 1.0 - sammelt die kompletten Rohdaten, egal welcher Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde. Neu sind jedoch folgende Punkte, die im Verlauf dieses Kapitels noch detaillierter erklärt werden:

- Meßdaten werden automatisch importiert
- Real-Time- und Plate Read-Lauftypen erlauben
 - Quantifizierung (Real-Time-Modus)
 - +/- Analysen sowie Alleldifferenzierung (Plate Read Modus)
- verbesserte Grafik:
 - Standardkurve unterscheidet zwischen Standards und Unbekannten
 - Semilog-Darstellung der Amplifikationskurven und manuelles Festlegen des Thresholds

- Farbpunkte in der Analysis View tragen dieselben Farben wie in der vorprogrammierten Maske
- im Anschluß an die Analyse sind die Intensitäten der Farbpunkte skaliert und geben an, wieviel Signal in den einzelnen Positionen gebildet wurde
- je heller, desto stärker das Signal
- eingebaute IPC-Funktion zur Vermeidung falsch-Negativer im Real-Time wie auch im Plate Read-Modus

Nicht möglich sind:

- Online-Ansicht noch während die Daten aufgenommen werden
- automatische Quantifizierung bei Verwendung von 2 Sonden pro Reaktionsgefäß

Die SDS Software dient sowohl der Steuerung und Datenanalyse beim System 7700 SDS als auch beim System 7200 SDS! Die Software zeigt schematisiert eine 96-Well-Platte, wobei zwischen zwei Fenstern gewählt werden kann:

1. Setup View
2. Analysis View

Mit Hilfe dieser beiden Fenster wird das System vor und nach der PCR gesteuert. Es werden prinzipiell zwei Lauftypen unterschieden: „Plate Read“ und „Real Time“.

Tab. 18: Eigenschaften der beiden Lauftypen "Real Time" und "Plate Read Only"

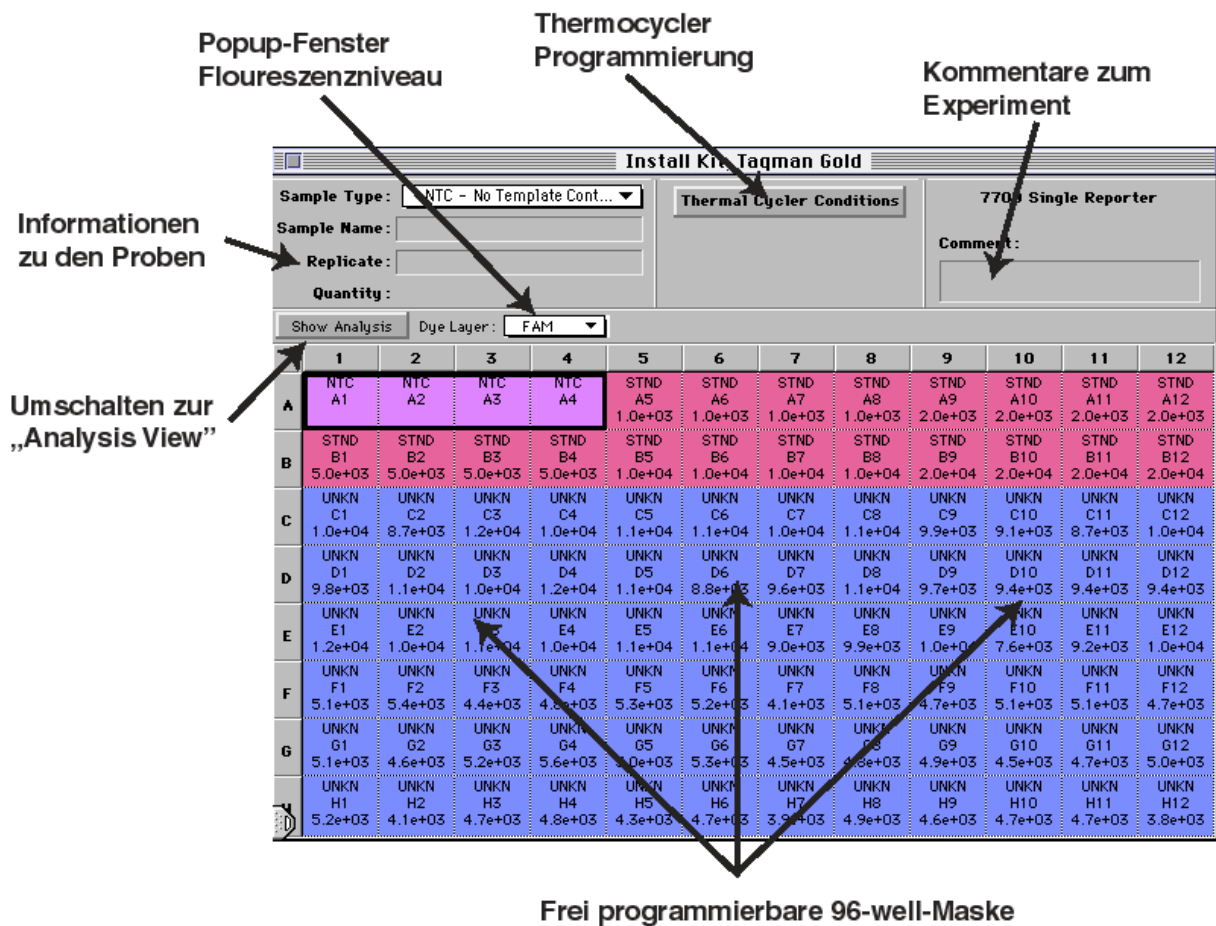
Eigenschaft	Real Time	Plate Read Only
Datenaufnahme	Benutzer-definiert in jedem PCR-Stadium möglich	Nur Endpunkt-Analyse
Fluoreszenz-Detektion	Bei jedem PCR-Zyklus	Nur Endpunktbestimmung
Ergebnisse	1. Standardkurve 2. R_n und ΔR_n für jeden PCR-Zyklus 3. Berechnete Startkopienzahl	1. Endpunkt- R_n und $-\Delta R_n$ 2. Reaktion war +/-

Wichtig: Bei Verwendung eines 7700 SDS stehen die kompletten Real Time- wie auch Plate Read-Funktionen zur Verfügung, bei Verwendung eines 7200 SDS hingegen ausschließlich die Plate Read-Funktionen.

4.4.1 Setup View

Die Setup View ist das Fenster, welches erscheint, wenn die Software geöffnet wird. Das Erscheinungsbild des Teils der Setup View, in den die Informationen zu den Proben eingegeben werden (s. u.) variiert je nach ausgewähltem Plattentyp.

Abb.18: „Setup-View“-Fenster der SDS-Software



Sie erlaubt die folgenden Arbeiten:

1. Definieren eines Plattentyps:

Es werden folgende Plattentypen für die Durchführung der Analyse unterschieden:

Tab. 19: Die verschiedenen Plattentypen und ihre Eigenschaften

Laufotyp	Plattentyp	Ergebniss
Real Time (nur bei 7700 SDS)	Single Reporter	1. Standardkurve 2. R_n u. ΔR_n für jeden PCR-Zyklus 3. Berechnete Startkopienzahl
	Background	Hintergrund
	Pure Spectra	Spektren der reinen Farben
Plate Read Only (bei 7700 SDS und 7200 SDS)	Single Reporter	1. Endpunkt- R_n 2. Reaktion war +/-
	Allelic Discrimination	Allel-Autocalling

2. Definieren des Probentyps der 96 Positionen:

Zum definieren der einzelnen Positionen einer Mikrotiterplatte kann entweder das "Sample Type pop-up menu" des Bildschirmfensters oder aber die "Sample Type Palette" (im Setup Menu) verwendet werden. Hierzu wird der betreffende „Well“ angeklickt, worauf dieser schwarz umrandet erscheint. Es kann gewählt werden:

- ganze Reihe:
Auf das Reihensymbol (A-H) bzw. die Reihenummer (1-12) klicken
- Mehrere Wells:
Maus gedrückt halten und über die betreffenden Wells ziehen, dann loslassen
- Mehrere nichtzusammenhängende Wells:
Command-Taste (⌘) drücken und dabei auf die betreffenden Positionen klicken.

Dann im Fenster auf das "**Sample Type pop-up menu**" gehen, dieses anklicken und gewünschte Definition schwarz unterlegen. Nun einfach die Maus loslassen. Je nachdem, welcher Plattentyp gewählt wurde, bietet das Sample Type pop-up Menü unterschiedliche vordefinierte Probenbezeichnungen an:

1. Single Reporter (Real Time):

Folgende Probenbezeichnungen stehen als Vorgaben bereits zur Verfügung:

- **STND** Standard
- **UNKN** Unknown
- **NTC** No Template Control
- **NAC** No Amplification Control
- **NPC** No Probe Control

- **BUFFER** Buffer Blank

Bei einem Lauf ohne interne Positivkontrolle (IPC) erwartet die SDS-Software mindestens 2 unterschiedliche Probenbezeichnungen pro Lauf (STND und UNKN), bei einem Lauf mit IPC 3 (IPC+, STND und UNKN).

2. Single Reporter (Plate Read):

Folgende Probenbezeichnungen stehen als Vorgaben zur Verfügung:

- **UNKN** Unknown
- **NTC** No Template Control
- **NAC** No Amplification Control
- **NPC** No Probe Control
- **BUFFER** Buffer Blank

Bei einem Lauf ohne interne Positivkontrolle (IPC) erwartet die SDS-Software mindestens 2 unterschiedliche Probenbezeichnungen pro Lauf (NTC und UNKN), bei einem Lauf mit IPC 4 (IPC+, IPC-, NTC und UNKN).

3. Allelic Discrimination:

Folgende Probenbezeichnungen stehen als Vorgaben zur Verfügung:

- **AL1** Allele 1
- **AL2** Allele 2
- **NTC** No Template Control
- **NAC** No Amplification Control
- **UNKN** Unknown
- **BUFFER** Buffer Blank

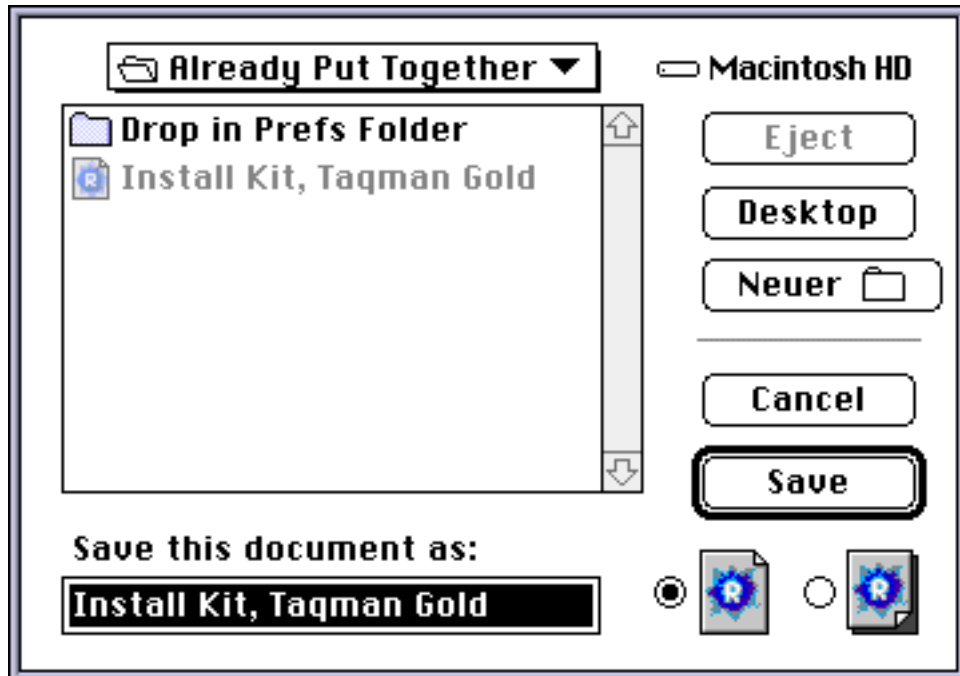
Bei einem Lauf erwartet die SDS-Software mindestens 3 unterschiedliche Probenbezeichnungen pro Lauf (NTC, AL1 und AL2).

Die Listen können entsprechend den experimentellen Anforderungen modifiziert werden und bis zu 50 Eintragungen für verschiedene Probenbezeichnungen tragen.

Zusätzlich können unter „Sample Information“ weitere Informationen eingetragen werden, wie z.B. Probenname oder im Falle der Standards die Kopienzahl, welche im Experiment Report erscheinen. Neben der Kopienzahl können unter "**Preferences**" im "Edit"-Menu auch andere Maßeinheiten wie z.B. µg ausgewählt werden.

Unter der Funktion "**Save as**" des File-Menüs werden zwei Möglichkeiten angeboten, das erstellte Platten-Dokument abzuspeichern:

Abb. 19: Dialogbox zum Speichern eines Platten-Dokuments (linkes, angekreuztes Symbol: Normal File Format; rechts daneben: Stationäres File Format)



1. Normal File Format:

Ein im normalen Format abgepeichertes Dokument enthält die folgenden Informationen:

- Probentyp für jede Position
- Thermocycler/Datenaufnahme-Information

Im Anschluß an den Lauf enthält der File alle gesammelten Daten sowie die Hintergrund- und Reine-Farben-Komponenten. Analysierte Daten werden hingegen nicht gespeichert, wohl aber nachträgliche Veränderungen in der programmierten Maske (z.B. bestimmte Positionen werden im Verlauf der Analyse „Not in use“ gesetzt).

2. Stationery File Format:

Sollen Experimente mit einer einmal erstellten Maske regelmäßig wiederholt werden, so kann diese als stationärer File abgespeichert werden, welcher durch ein separates Icon gekennzeichnet ist. Wird ein stationärer File geöffnet, so fertigt die Software eine Kopie davon an, die das alte Dokument nicht beeinflußt und die modifiziert werden kann. Diese Kopie wird dann einfach als ein normalen File bzw. bei Bedarf als ein neuer stationären File abgespeichert.

3. Wiederholungen definieren:

Hierzu werden die betreffenden Positionen zunächst gemeinsam markiert und definiert. Dann unter "Sample Type Information" ins "Replicate Field" gehen und dort den Namen der Wiederholung eintragen. Diese Information erscheint ebenfalls im Experiment Report. Die Software berechnet für Wiederholungen die durchschnittliche Startkopienzahl sowie deren Standardabweichung.

4. Programmieren des Thermocyclers:

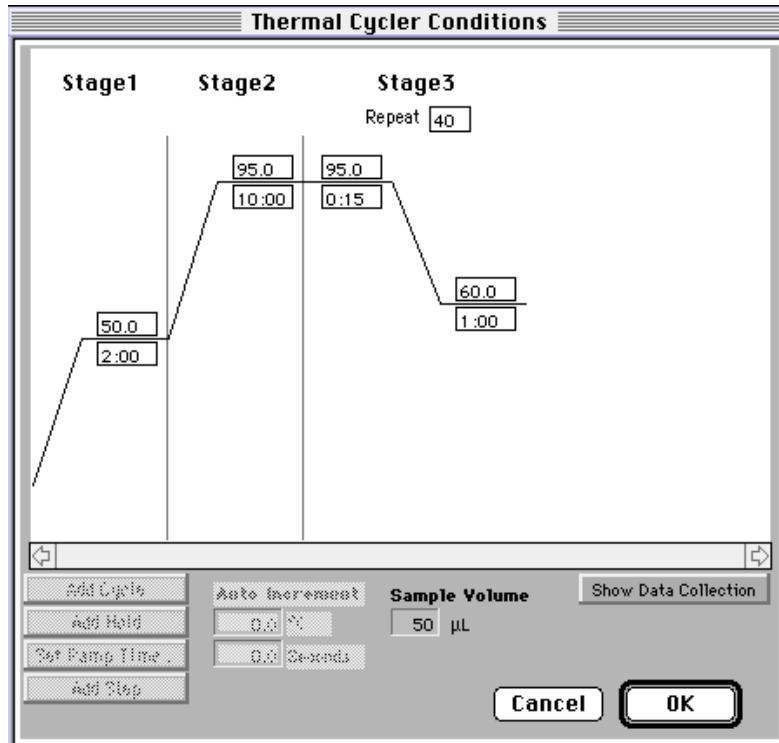
Eine Programmierung des Thermocyclers mit Hilfe der SDS-Software ist nur bei Anwendung eines 7700 SDS möglich!

Dazu wird der Thermocycler Conditions-Knopf über der 96er-Maske gedrückt. Es erscheint die Thermocycler Dialog-Box, die wiederum aus 2 Fenstern besteht:

1. "Time and Temp"-Fenster:

Erlaubt die freie Programmierung des integrierten Thermocyclers im graphischen Display (s. Abb. 20). 4°C-Holds über Nacht sollten durch 25°C-Holds ersetzt werden, da ansonsten der optische Deckel so verkanten kann, das er sich nicht mehr zurückschieben läßt.

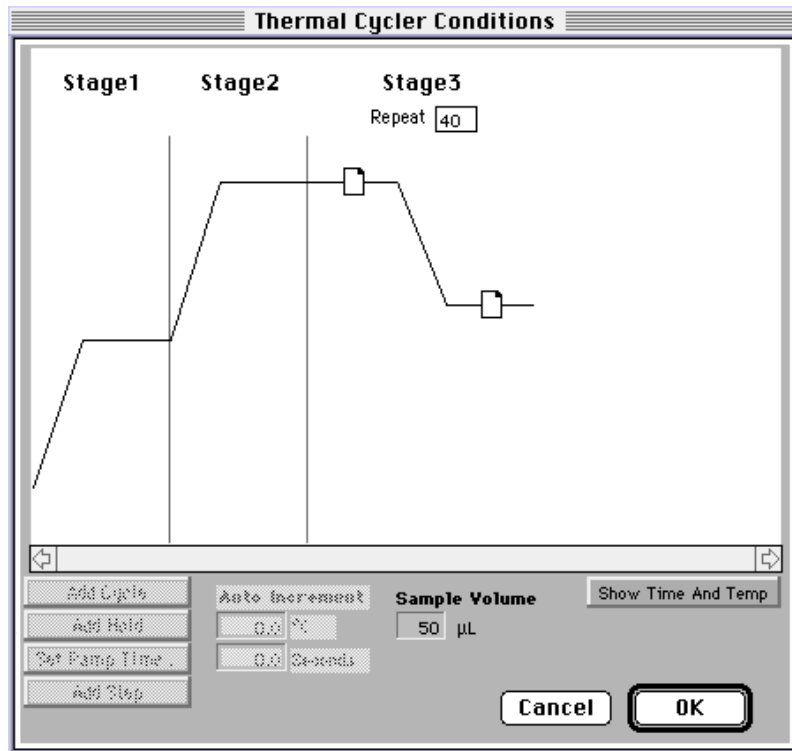
Abb. 20: Graphisches Display zur Programmierung des integrierten Thermocyclers



2. "Show Data Collection"-Fenster:

Hier wird die Datenaufnahme definiert. Für die Real-Time Detektion ist zumindest die Datenaufnahme während der PCR-Extensionsphase erforderlich. Bei „Holds“ über Nacht wird keine Datenaufnahme angeklickt, da ansonsten die Speicherkapazität des Computers überschritten werden kann! Ein durchschnittlicher Real-Time-Lauf benötigt ca. 3,5- 4,5 MB.

Abb. 21: Graphisches Display zur Definition der Datenaufnahme während eines On-Line Laufes



5. Eintragen weiterer Beschreibungen zum Experiment:

Im "**Comments**"-Feld lassen sich zu jedem Experiment Notizen eintragen, welche abschließend auch im Experiment Report erscheint. Der dafür vorgesehene Platz erlaubt einen Text von bis zu 255 Zeichen.

6. Programmieren unterschiedlicher Farbniveaus:

Werden 2 Sonden simultan pro Reaktionsgefäß eingesetzt (IPC-Applikation bzw. Allel-Differenzierung), so müssen in der Setup View die jeweiligen Farbniveaus vorprogrammiert werden, d.h. es werden 2 Masken für die Reaktion erstellt, eine z.B. für das FAM-Signal, die andere für das TET-Signal. Es können bis zu 8 unterschiedliche Farbniveaus programmiert werden.

Die unterschiedlichen Farbniveaus werden im **Farbniveau-Pop-up Menü** (rechts neben dem Knopf zum Umschalten in die Analysis View) aufgerufen. Als Vorgabe ist dort immer der Standard-Reporterfarbstoff FAM eingestellt. Durch Drücken und Festhalten des Pfeils erscheinen die anderen zur Verfügung stehenden Farbniveaus und können durch Aufrufen der gewünschten Farbe eingestellt werden.

Programmieren Sie jedes Farbniveau entsprechend Ihres Assay-Aufbaus, indem Sie im Sample Type Pop-up Menü (s. 2., S. 91) die jeweiligen Vorgaben mit dem verwendeten Reporterfarbstoff ausstatten und in die Maske an der entsprechenden Position für das passende Farbniveau eintragen.

4.4.2 Analysis View

Um in die "Analysis View" zu gelangen, drückt man den "**Show Analysis**"-Knopf der Setup-Menü Maske. Dieses Fenster erlaubt die folgenden Arbeiten:

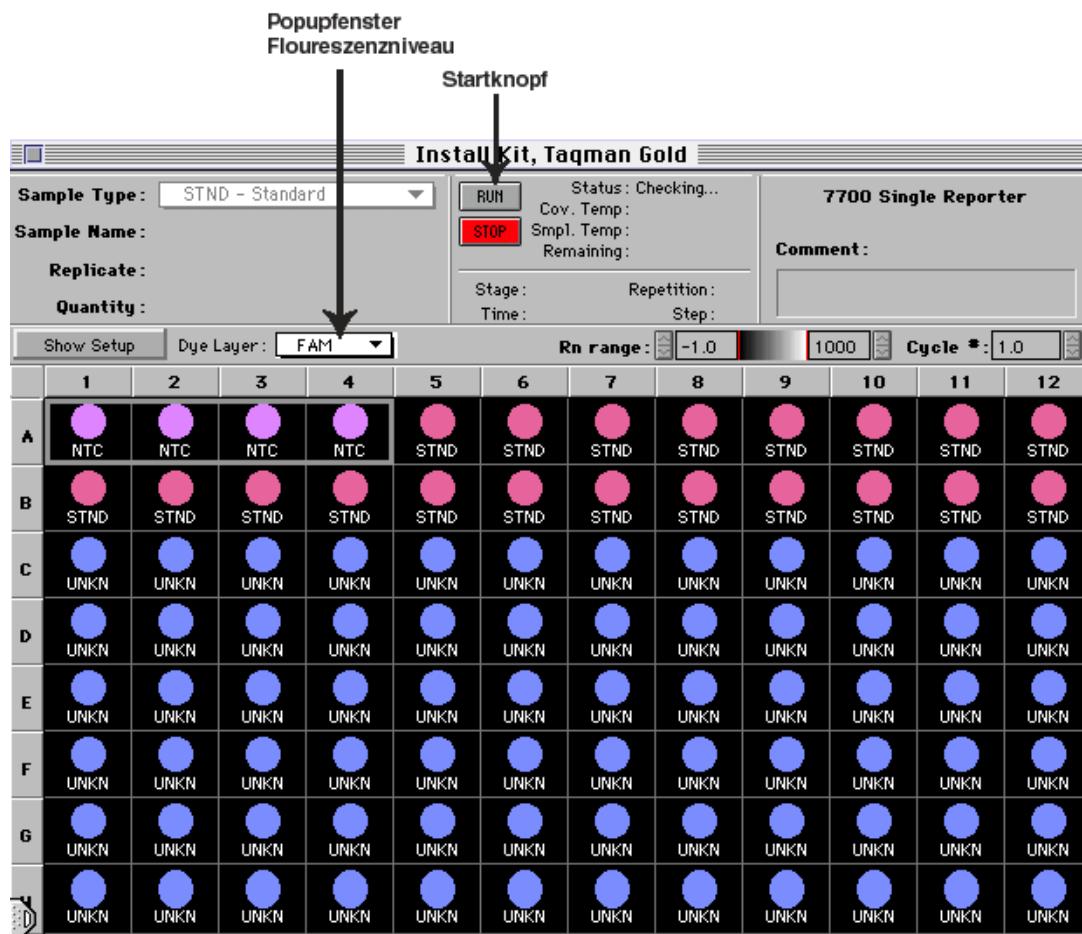
1. Start des 7700 SDS:

Nachdem die Proben in den Cyclor gestellt wurden, wird der optische Heizdeckel durch Drehen des Knopfes verschlossen (weiße Markierung zeigt dann nach vorne). Im Status-Feld erscheint "**Idle**". Steht dort "**Offline**", so kommunizieren Computer und Instrument nicht miteinander, wodurch der Lauf nicht gestartet werden kann. Jetzt wird der "RUN"- Knopf gedrückt, woraufhin der Sequence Detector gestartet wird. Das Status-Feld zeigt zunächst "Waiting" an und das LED-Display-Licht "Comm" auf dem Instrument leuchtet grün auf, während die Daten vom Computer transferriert werden.

Durch Drücken des "**PAUSE**"-Knopfs kann der Lauf jederzeit unterbrochen und durch Drücken des "**START**"-Knopfs wieder aufgenommen werden. Dauert die Pause länger als 10 Minuten, so stoppt der Lauf automatisch.

Vorsicht: Im Thermoblock des 7700 SDS die Reaktionsgefäße niemals öffnen (z.B. um einen manuellen Hot-Start durchzuführen)! Es könnten Aerosole freigesetzt werden, die Fluoreszenz-Moleküle tragen und so die Funktion des Systems beeinträchtigen können!

Abb. 22: „Analysis View“-Fenster der SDS-Software (Vers. 1.6)



1a. Start des 7200 SDS:

Ist die PCR auf dem externen Thermocycler beendet, so öffnen Sie zunächst den Probenhalter durch Betätigen der **LOAD/EJECT**-Taste am 7200 SDS. Nun kann die Mikrotiterplatte in den dafür vorgesehenen Halter gestellt werden.

Wichtig: Achten Sie darauf, dass sich die **A1-Position** in der Ecke oben links befindet!

Anschließend wird der Probenhalter durch erneutes Betätigen des **LOAD/EJECT**-Taste wieder geschlossen.

Der Plattenlese-Vorgang wird vom **Analysis-View**-Fenster der SDS-Software aus gestartet. Im Status-Feld erscheint **Ready**. Steht dort **Offline**, so kommunizieren Computer und Instrument nicht miteinander, weshalb die Messung nicht gestartet werden kann. Jetzt die **Read-Taste** mit der Maus drücken, woraufhin die Status-

Meldung von „Ready“ auf „Running“ umschaltet. Ist die Messung beendet, erscheint wiederum die Meldung „Ready“.

Hinweis: Wurde als Plattentyp „Allelic Discrimination“ gewählt, so erscheint in der Analysis-View **keine** Pre-PCR Read-Taste.

Die **Pre-PCR Read-Taste** dient der Fluoreszenzmessung vor dem Start der PCR, wenn z.B. eine hohe Autofluoreszenz des Probenmaterials vermutet wird.

Wichtig: **Die STOP-Taste beendet nicht nur eine gestartete Fluoreszenzmessung, sondern bewirkt auch, das die bis dahin gesammelten Daten gelöscht werden!**

2. Aufnahme des Fluoreszenz-Signals:

In der "Analysis View" erfolgt die Aufnahme des Fluoreszenz-Signals.

3. Analyse der Rohdaten:

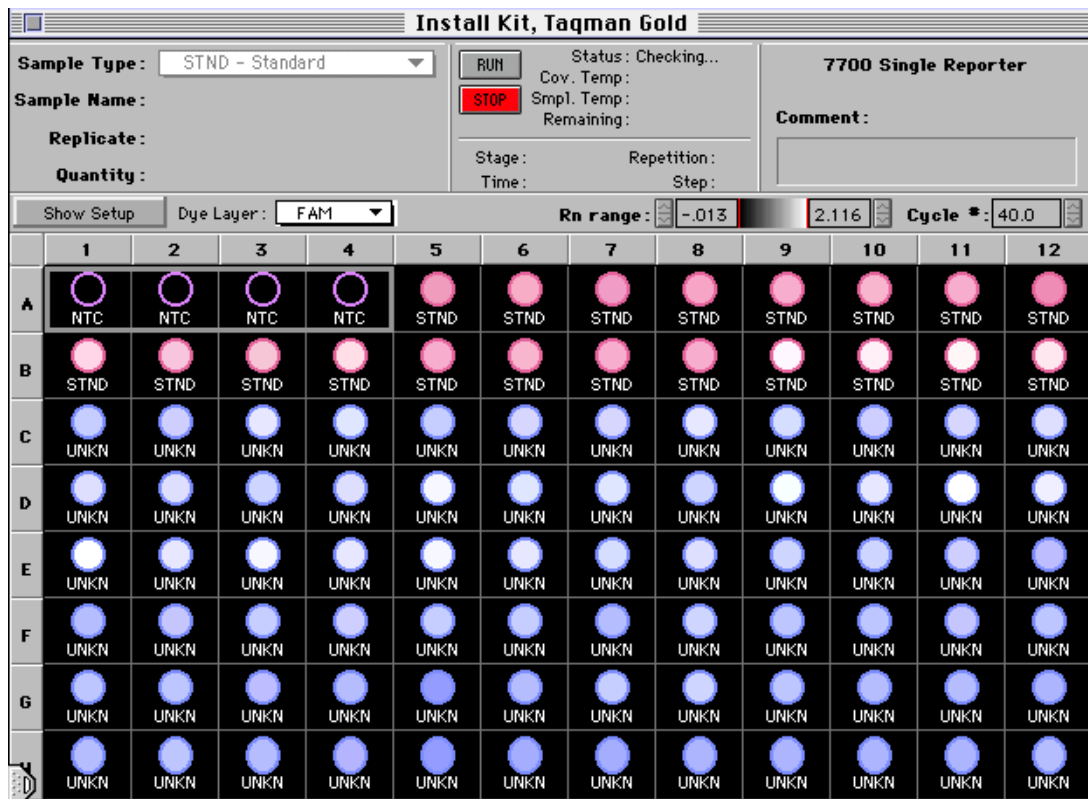
Ist der Lauf beendet, so können die gewonnenen Daten automatisch ausgewertet werden, wobei die Ergebnisse graphisch, wie auch numerisch ausgegeben werden. Hierzu muß der Befehl "**Analyze**" aus dem Analysis-Menü aufgerufen werden. Anschließend kann zunächst der Befehl "**Display**" aus dem Analysis Menü ausgewählt werden, wobei 3 Datendarstellungen der 96-Well-Maske des Analysis-Fensters angeboten werden:

- **ΔR_n :** Zeigt den Delta-Wert des normalisierten Reportersignals an.
- **Quantity:** Gibt die ermittelten Zahlenwerte in der zu Laufbeginn vorgegebenen Maßeinheit wieder (steht nur bei Anwendung eines 7700 SDS zur Verfügung)
- **Sample Type:** Zeigt den Probenotyp der einzelnen Positionen auch im "Analysis View"-Fenster.

Je nach verwendeten Plattentyp können Sie in der Analysis View nach der Analyse der Daten die Ergebnisse für die unterschiedlichen Farbniveaus aufrufen, insofern diese vor Beginn der Messung in der Setup View programmiert wurden.

Wurde vor Beginn eines Real-Time-Laufes im **Edit**-Menü der Befehl **Preferences** aufgerufen und in der dann erscheinenden Preferences-Dialogbox **Show Threshold** durch ankreuzen aktiviert, so erscheint direkt im Anschluß an die Analyse der Amplification Plot in der Semilog-Darstellung. In dieser Darstellung können nun für die unterschiedlichen Farbniveaus die Threshold-Werte graphisch, durch vertikales Justieren des Balkens über das Grundrauschen, festgelegt werden. Wird die Einstellung des Schwellenwertes (Threshold) durch OK bestätigt, so erscheint wieder die Analysis View.

Abb. 23: Skalierte Farbintensitäten im Anschluß an die Datenanalyse



Die Farbintensitäten der Kreise, die belegte Positionen in der Mikrotiterplatte symbolisieren, sind nach einer Analyse (außer bei „Allelic Discrimination“) skaliert und spiegeln den R_n -Wert am Ende des Laufs für die jeweilige Position wieder. Die Funktionsleiste **R_n -Range** gibt den Minimum- sowie den Maximum-Wert an. Mit Hilfe des **PCR-Zyklus-Indikators** (Cycle#) kann der Verlauf der Amplifikation durch Betätigung der Auf-/Abwärtspeile im Anschluß an eine Real-Time PCR (7700 SDS) nachvollzogen werden.

Folgende, weitere Auswerteschritte lassen sich durchführen:

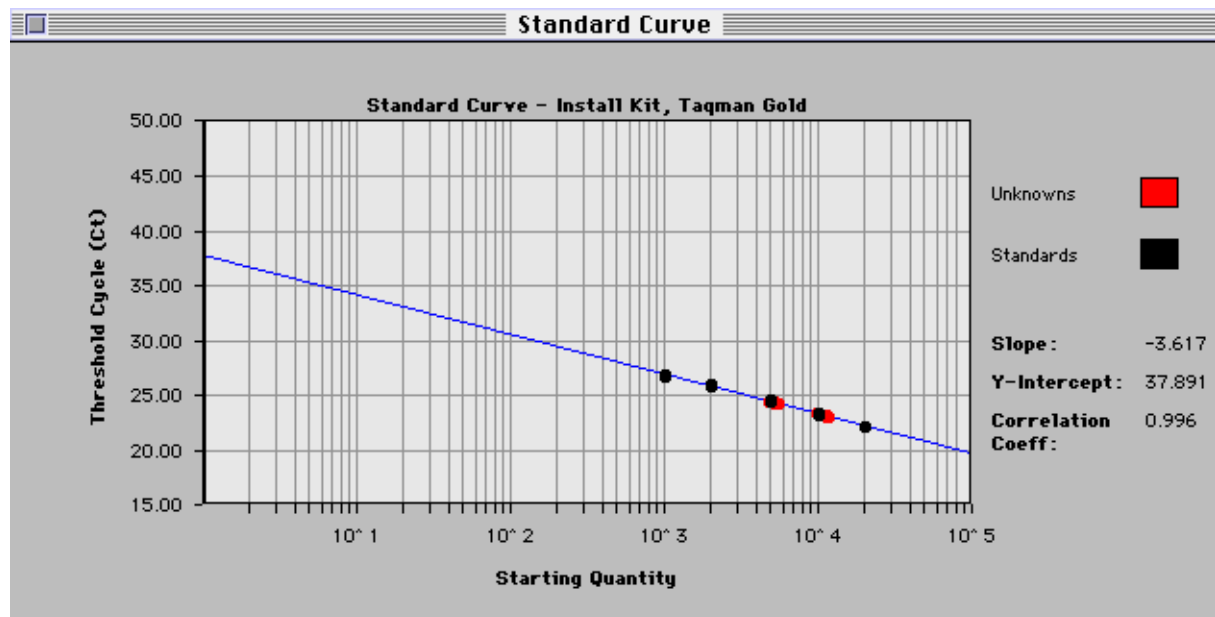
1. Erstellen einer Standardkurve (7700 SDS):

In der Standardkurve erscheinen die Werte aller, zu Reaktionsbeginn als Standards gekennzeichneten Proben.

Es sollten mindestens 5 unterschiedliche Standardkonzentrationen zur Berechnung einer Standardkurve eingesetzt werden!

Die Standardkurve (Abb. 24) zeigt die C_T -Werte über den (LogN) der Startkopienzahl. Rechts neben dem Graphen werden die berechnete Steigung, der Y-Achsenabschnitt sowie der Korrelationskoeffizient angegeben. Die Standardkurvendarstellung unterscheidet farblich zwischen den vorpipettierten Standards sowie den eigentlichen Proben.

Abb. 24: Standardkurve (Vers. 1.6)



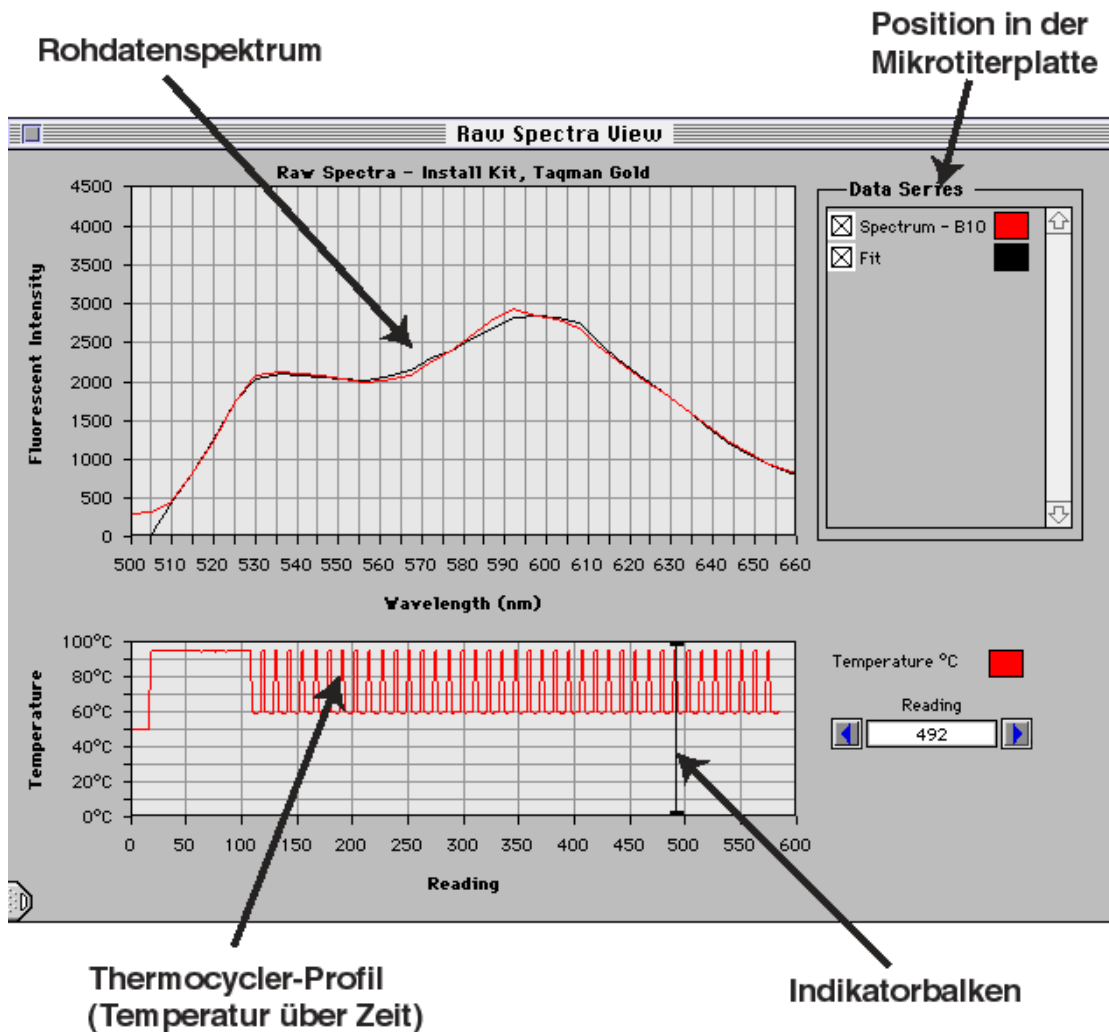
Zum Generieren der Kurve wie folgt vorgehen:

1. Nach der Analyse der Daten eine beliebige Position in der Mikrotiterplatte des Analysis-Fensters anklicken.
2. Im **Analysis**-Menu den Befehl **Standard Curve** anwählen.

2. Graph der Rohdaten (7200 SDS und 7700 SDS):

Die aufgenommenen (nicht normalisierten) Rohdaten werden in Form eines UV-Scans von 500-660 nm (aufgeteilt in 32 Datenpunkte) wiedergegeben und sind im Real-Time Modus (nur 7700 SDS) in Verbindung mit den Temperaturprofil der PCR Zyklus für Zyklus abrufbar. Dabei wird die Abnahme der Fluoreszenz bei höheren sowie ihre Zunahme bei niedrigeren Temperaturen sichtbar. Mit Hilfe eines Indikator-Balkens kann die Veränderung des Fluoreszenzsignals im Verlaufe der PCR für eine oder mehrere Positionen abgegriffen werden. Um die Rohdaten zu sehen:

Abb. 25: Ansicht der Rohdaten im Real-Time Modus



1. Eine oder mehrere Positionen der Mikrotiterplatte im Analysis-Fenster anklicken.
2. Im **Analysis**-Menu zunächst **View**, dann **Raw Spectra** wählen

Zur Beurteilung der Qualität der Rohdaten:

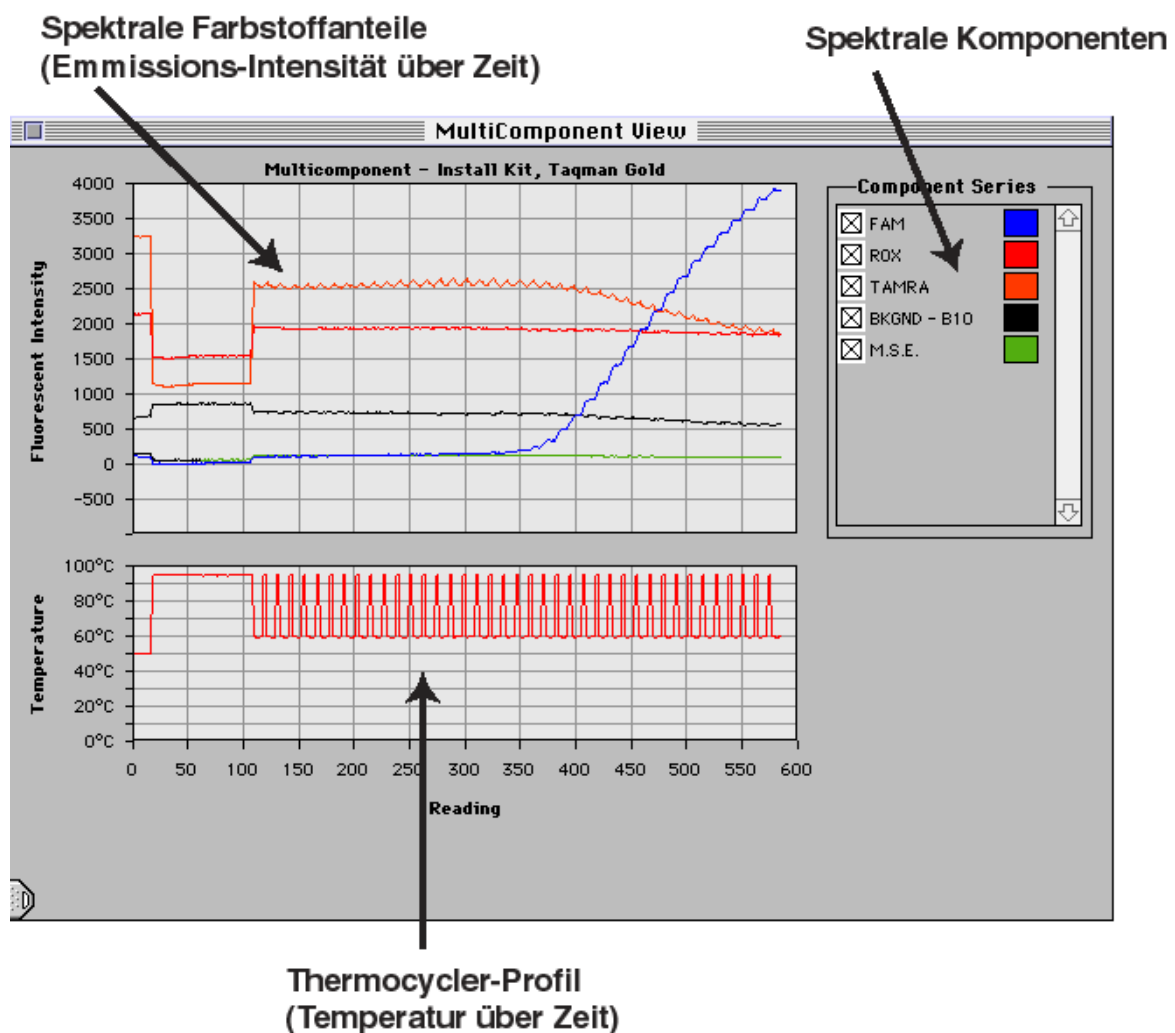
1. Im **Instrument**-Menü **Diagnostics** wird **Advanced Options** geöffnet. Es erscheint ein **Options-Fenster**, in dem "Display best fit in Raw Spectra" angekreuzt wird. Unter "Raw Spectra" erscheint jetzt zusätzlich die **Best-Fit Kurve**, die die von den Reinfarbenspektren abgeleiteten Signalkomponenten für die gewählte Position darstellt. Die Daten sind umso besser, je mehr sich der Verlauf der beiden Kurven gleicht (s. Abb. 25). Weichen die Kurven deutlich voneinander ab, so gibt es dafür 2 mögliche Erklärungen:
 - beim Programmieren wurde bei der Bezeichnung der Position der falsche Reporterfarbstoff zugeordnet

- die im Preferences-Folder abgelegten Reinfarbenspektren müssen erneuert werden

3. Multikomponenten-Darstellung für eine gewählte Position (nur 7700 SDS):

Die Multikomponenten-Darstellung (Abb. 26) gibt vollständig die spektrale Beteiligung eines jeden Farbstoffs sowie den Hintergrund über den Verlauf der PCR wieder:

Abb. 26: Spektrale Farbanteile über den Verlauf der PCR (Multikomponenten-Darstellung)



1. Eine Position der Mikrotiterplatte im Analysis-Fenster anklicken.
2. Im **Analysis-Menu** den Befehl **View** und dann den Unterbefehl **Multicomponent** betätigen.

Hinweis: Da FAM Bestandteil der passiven Referenz ROX ist, erscheint die FAM-Komponente auch, wenn die verwendete Sonde nicht mit FAM markiert wurde!

In der Multikomponenten-Darstellung steht mit der Einblendung des „Mean Squared Errors“ (**MSE**) ein Hilfsmittel zur Bewertung der Analyse zur Verfügung. Um den MSE einzublenden, werden die folgenden Schritte durchgeführt:

1. Das Menü **Instrument** öffnen und dort das Untermenü **Diagnostics** aufrufen; dabei aber die Maus gedrückt lassen!
2. Indem Sie den Cursor nach rechts in Richtung des angezeigten Pfeils bewegen, erhalten Sie Zugriff auf den Befehl **Advanced Options** (mit dem Cursor markieren und die Maus loslassen).
3. Jetzt erscheint die **Advanced Options-Dialogbox**. Kreuzen Sie unter „Viewer“ den Befehl „Display mse in Multicomponent View“ an und bestätigen Sie über OK.

Der MSE wird als Linie in die Grafik eingeblendet und repräsentiert einen Faktor, der mit der Multikomponenten-Analyse in Verbindung steht. Die Linie sollte über den Verlauf der PCR hinweg flach bleiben und eine Höhe von 200 nicht überschreiten. Höhere Werte deuten auf Fehler beim Processing der Daten hin!

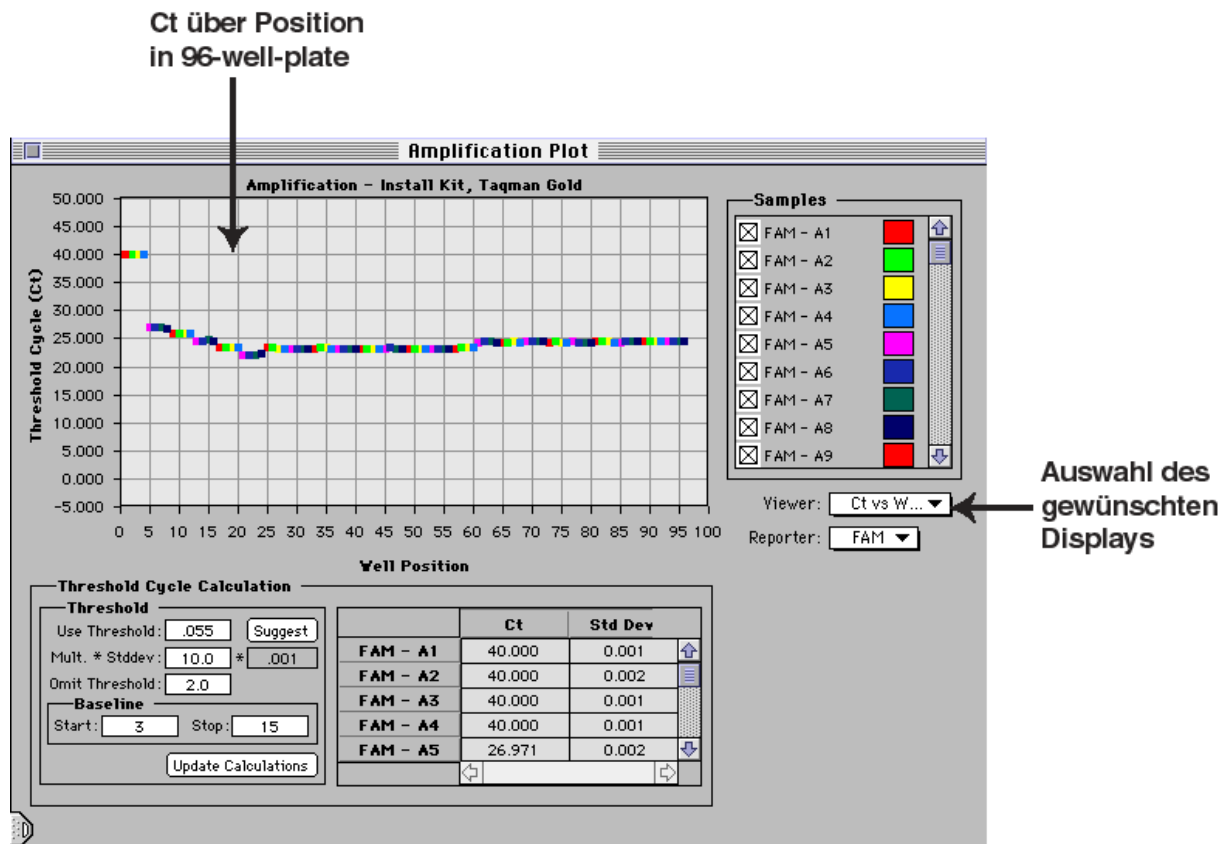
4. Amplification-Plot (nur 7700 SDS):

Mit Hilfe des Amplification-Plots können die analysierten Daten für jede Position in 3 unterschiedlichen Darstellungsformen angeschaut werden:

a.) C_T-Display:

Aus dem C_T-Display (Abb. 27) wird ersichtlich, bei welchem PCR-Zyklus das Signal erstmals detektierbar wurde. Das bedeutet je höher die Startkopienzahl, desto niedriger der C_T-Wert. Im Graphen ist der C_T-Wert auf der Y-Achse aufgetragen, während die X-Achse eine linearisierte Microtiterplatte mit den Positionen 1-96 darstellt.

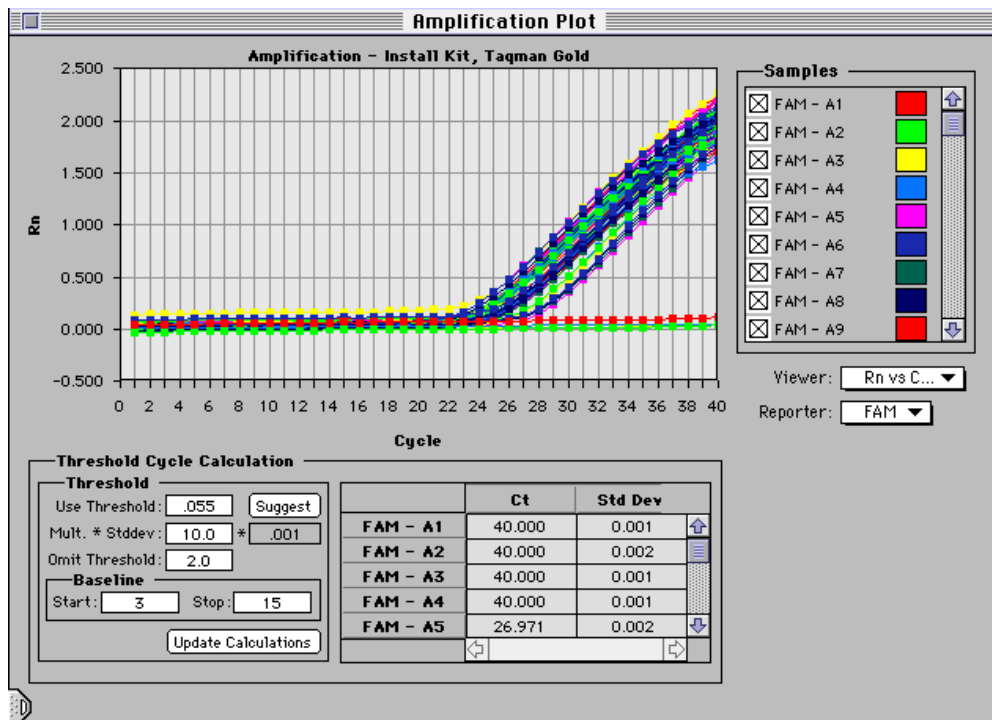
Abb. 27: Darstellung des Threshold-Zyklus über der Position in der Mikrotiterplatte



b.) R_n -Wert über der Zyklenzahl:

Der normalisierte Reporter-Wert R_n wird aus dem Quotienten Reporter-Signal durch das Signal der passiven Referenz gebildet. Das unten abgebildete Display (Abb. 28) gibt den R_n -Wert verschiedener Proben über den vollständigen Lauf wieder.

Abb. 28: Darstellung des normalisierten Reportersignals über der Zyklenzahl



c.) ΔR_n über der Zyklenzahl:

In diesem Display (Abb. 29a + b) wird der R_n -Wert minus dem Reporter-Signal vor der PCR - der sogenannte ΔR_n -Wert - für die verschiedenen Positionen dargestellt.

Abb. 29a: log-Darstellung : ΔR_n über der Zyklenzahl

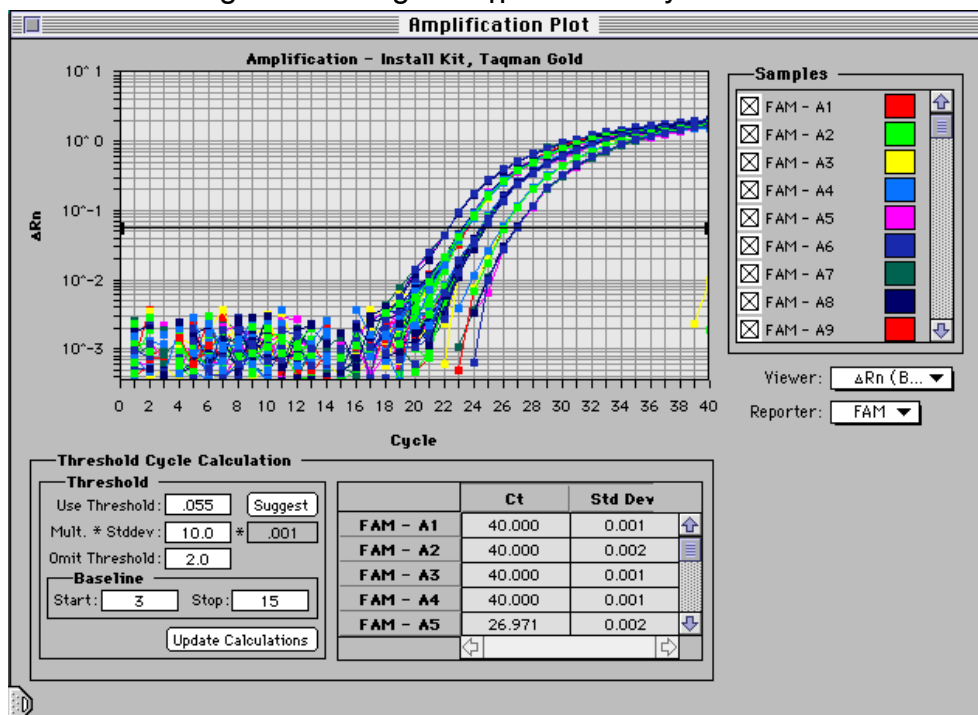
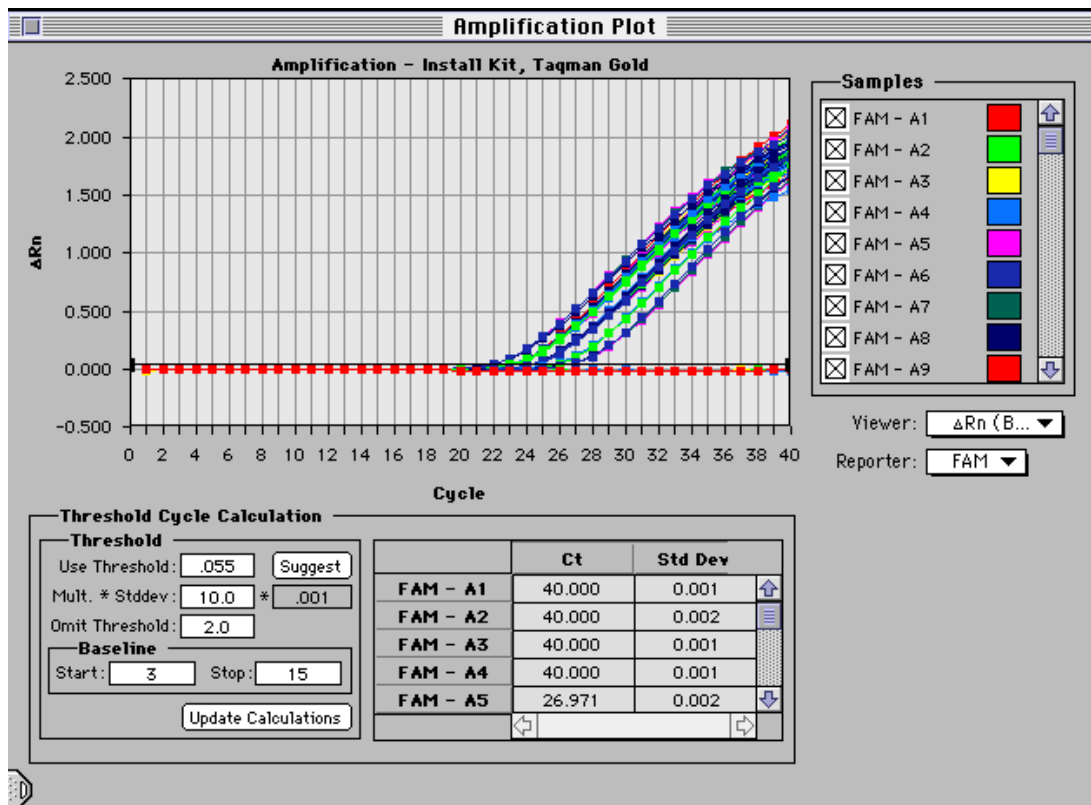


Abb. 29b: Lineare Darstellung



Zwischen der log-Darstellung und der linearen Darstellung des Amplification Plots kann wie folgt hin- und hergewechselt werden:

1. Doppelklicken auf die Zahlen der Y-Achse
2. Es erscheint die **Format Axis** Dialogbox. Unter „Display“ kann zwischen beiden Darstellungsformen durch einfaches Anklicken gewählt werden.
3. Dialogbox durch Drücken von „OK“ schließen. Sie befinden sich in der entsprechenden Darstellungsform und können in der Semilog-Darstellung auch wieder den Threshold graphisch justieren.

5.) Der Experiment-Report (7200 SDS und 7700 SDS):

Der Experiment-Report (Abb. 30) gibt eine Zusammenfassung der während der Analyse eines Plattendokuments gewonnenen Daten wieder:

- Filename, Name des Betreibers, Datum, Modellnummer des Sequence Detection Systems, verwendeter Plattentyp, PCR-Reaktionsvolumen und Kommentare zum Experiment
- verwendetes PCR-Programm
- Statistische Daten zur Standardkurve

- Inhalt der verwendeten Positionen in der Mikrotiterplatte, berechneter C_T -Wert, Ergebnis der Quantifizierung sowie Mittelwert und Standardabweichung im Falle von Wiederholungen (Replicates)

Abb. 30: Experiment-Report

PE Applied Biosystems Sequence Detection Systems 1.6

File Name: Install Kit, Taqman Gold **Plate Type:** 7700 Single Reporter
User: **PCR Volume:** 50
Date: Mit, 17. Dez 1997
Comments:

Thermal Cycle Conditions

Cycle	Temperature	Time	Repeat	Ramp Time	Auto Increment
Hold	50.00	2:00		Auto	
Hold	95.00	10:00		Auto	
Cycle	95.00	0:15	40	Auto	
	60.00	1:00		Auto	
Hold	4.00	95:00		Auto	

Standard Curve

Slope: -3.62 **Threshold:** 0.05
Intercept: 37.89 **Baseline Range:** (3, 15)
Fit R: 1.00

Sample Information

Well	Type	Sample Name	Replicate	Ct	Quantity	Std. Dev.	Mean
A5	STND	A5		26.97	1.0e+03	0.00	1000.00
A6	STND	A6		26.99	1.0e+03	0.00	1000.00

Je nachdem, welches Plattendokument zu Beginn des Laufs gewählt wurde, variieren die Angaben für die einzelnen Positionen der Mikrotiterplatte. So erscheint z.B. bei einer Quantifizierung die berechnete Startkopienzahl, bei einer Alleldifferenzierung hingegen der ermittelte Genotyp.

Da die analysierten Daten nach dem Schließen des Plattendokuments nicht abgespeichert werden, empfiehlt es sich den Experiment-Report zuvor auszudrucken. Hierzu ist wie folgt vorzugehen:

1. Im Menü „**Windows**“ das Feld **Experiment Report** aktivieren.
2. Im Menü „**File**“ das Feld **Page Setup** wählen.
3. Dort unter **Orientation** das erste Icon (Portrait) aktivieren und unter **Reduce or Enlarge** 70 % einstellen.
4. Nun **OK** drücken um das Page Setup Fenster zu schließen.
5. Im Menü „**File**“ die Option **Print** wählen und drucken.

Nachträgliche Änderungen - zum Beispiel der Ausschluß bestimmter Positionen aus dem Report- erfordern entsprechende Veränderungen in der **Setup View**:

1. Die Taste „**Show Setup**“ drücken.
2. Dort die Felder markieren, die nicht im Experiment Report auftauchen sollen.
3. Im **Sample Type Pop-up-Menü** das Feld „**Not in Use**“ aktivieren.
4. Wieder zurück in die **Analysis View** wechseln.
5. Die Platte mit dem Befehl „**Analyze**“ im **Analysis-Menü** neu analysieren. Die ausgeschlossenen Felder werden im Experiment Report nicht mehr berücksichtigt.

Wurde ein Probentyp falsch zugeordnet, so kann durch Änderung des „Sample Types“ in der Setup View und anschließendes Neuanalysieren der Fehler korrigiert werden.

4.5 Anwendung des Plattentypus Allelic Discrimination

Der 7200 SDS wie auch der 7700 SDS besitzen im Plate Read-Modus einen Plattentypus zum Differenzieren von Allelen. Folgende Schritte sind hierzu in der Software durchzuführen:

1. Das **File**-Menü öffnen und **New Plate** aktivieren. In der erscheinenden Dialogbox **Allelic Discrimination** einstellen und mit OK bestätigen.
2. Mit Hilfe des Sample Type Pop-up-Menüs können die einzelnen Positionen in der Mikrotiterplatte entsprechend ihrer Belegung definiert werden.

Die Standards sollten 8fach (mindestens 6fach) pipettiert werden, um ein sicheres Autocalling zu gewährleisten, d.h. 8x NTC, 8x Allel 1 (AL1) und 8x AL2 (s. Abb. 32).

Hinweis: Es sollten die homozygoten Genotypen als Standards vorgegeben werden. Zwar kann auch der heterozygote Zustand als AL2 definiert werden, doch besteht dann aufgrund der starken Kreuzfluoreszenz von Allel 1 die Gefahr, das ein Autocalling nicht möglich ist!

Abb. 31: Typisches Beispiel für die Programmierung einer AD-Maske

Allelic Discrimination												
Sample Type:		UNKN - Unknown						7200 Allelic Discrimination				
Sample Name:								Comment:				
Replicate:												
Show Analysis												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC A1	NTC A2	NTC A3	NTC A4	NTC A5	NTC A6	NTC A7	NTC A8	AL1 A9	AL1 A10	AL1 A11	AL1 A12
B	AL1 B1	AL1 B2	AL1 B3	AL1 B4	AL2 B5	AL2 B6	AL2 B7	AL2 B8	AL2 B9	AL2 B10	AL2 B11	AL2 B12
C	UNKN C1	UNKN C2	UNKN C3	UNKN C4	UNKN C5	UNKN C6	UNKN C7	UNKN C8	UNKN C9	UNKN C10	UNKN C11	UNKN C12
D	UNKN D1	UNKN D2	UNKN D3	UNKN D4	UNKN D5	UNKN D6	UNKN D7	UNKN D8	UNKN D9	UNKN D10	UNKN D11	UNKN D12
E	UNKN E1	UNKN E2	UNKN E3	UNKN E4	UNKN E5	UNKN E6	UNKN E7	UNKN E8	UNKN E9	UNKN E10	UNKN E11	UNKN E12
F	UNKN F1	UNKN F2	UNKN F3	UNKN F4	UNKN F5	UNKN F6	UNKN F7	UNKN F8	UNKN F9	UNKN F10	UNKN F11	UNKN F12
G	UNKN G1	UNKN G2	UNKN G3	UNKN G4	UNKN G5	UNKN G6	UNKN G7	UNKN G8	UNKN G9	UNKN G10	UNKN G11	UNKN G12
	UNKN H1	UNKN H2	UNKN H3	UNKN H4	UNKN H5	UNKN H6	UNKN H7	UNKN H8	UNKN H9	UNKN H10	UNKN H11	UNKN H12

- Speichern Sie das Dokument und stellen Sie die Mikrotiterplatte in das System.
- Schalten Sie zur Analysis View um (Abb. 33).

Abb. 33: „Analysis View“-Fenster eines AD-Assays

Allelic Discrimination												
Sample Type:		UNKN - Unknown						Status: Ready...				
Sample Name:								7200 Allelic Discrimination				
Replicate:								Comment:				
								Stop				
								Post-PCR Read				
Show Setup												
											Rn Range: .0	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	AL1	AL1	AL1	AL1
B	AL1	AL1	AL1	AL1	AL2	AL2	AL2	AL2	AL2	AL2	AL2	AL2
C	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
D	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
E	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
F	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
G	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN

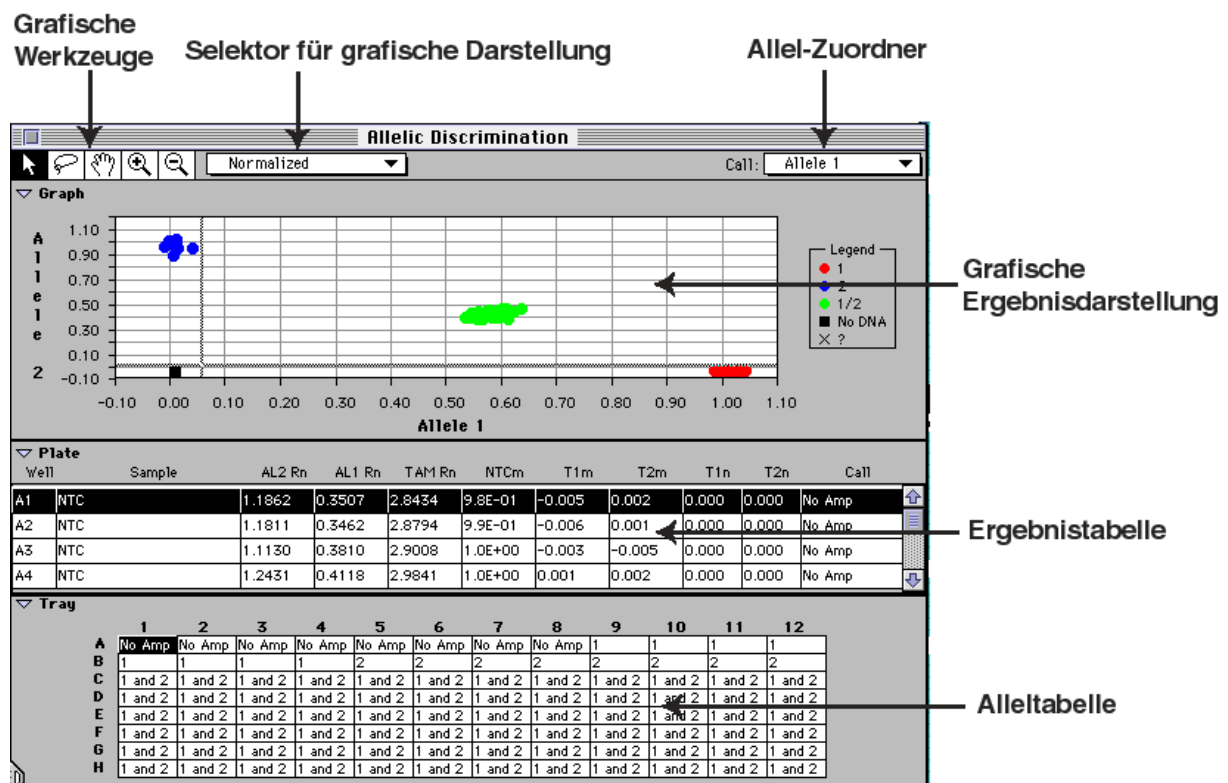
5. Durch Mausklick der **Post-PCR Read**-Taste starten Sie die Messung (ca. 10 sec beim 7700 SDS, ca. 10 min beim 7200 SDS).
6. Speichern Sie die Daten im Anschluß an die Messung.
7. Das **Analysis**-Menü öffnen und über den Befehl „Analyze“ die Platte auswerten. Die erfolgreiche Analyse wird graphisch sichtbar, indem die farbigen Kreissymbole für die belegten Positionen nun in ihrer Mitte schwarz erscheinen (s. Abb. 34).

Abb. 34: „Analysis View“-Fenster eines AD-Assays nach der Datenanalyse



8. Erneut das **Analysis**-Menü öffnen und den Befehl **View Allelic Discrimination** aktivieren.

Abb. 35: Das „Allelic Discrimination“-Fenster



Mit Hilfe der Allelic Discrimination View wird eine Bewertung der gewonnenen Daten möglich. Hierzu werden angeboten:

- Die **Grafische Ergebnisdarstellung** (Allel 2 über Allel 1) ist in 3 Darstellungsformen über das Pop-up Menü **Selektor für die grafische Darstellung** aufrufbar:
 1. Farbkomponenten: R_n -Werte von TET, FAM und TAM
 2. Allelkomponenten: T_{1m} und T_{2m}
 3. Normalisierte Daten: T_{1n} und T_{2n}
- **Ergebnistabelle:** In der Ergebnistabelle werden für die einzelnen Positionen der Mikrotiterplatte numerisch der Weg der Analyse über die Farbkomponenten, Ohne-Template-Kontrollkomponente (NTCm), Allelkomponenten und normalisierten Daten bis hin zur Bestimmung des Genotyps tabellarisch zusammengefaßt.
- **Alleltabelle:** Eine dritte Tabelle - aufgebaut analog der Positionsbezeichnung einer Mikrotiterplatte - gibt für jede Position auf einen Blick das Ergebnis der Analyse wieder.

Desweiteren steht oben links im Bild eine Leiste mit folgenden graphischen Werkzeugen zur Verfügung:

Selektor: Drücken Sie diese Taste und wählen Sie anschließend mit der Maus einen beliebigen Meßpunkt in der Grafik durch Anklicken aus. Der gewählte Punkt verliert seine Farbe und erscheint Grau. Zusätzlich wird in der Alleltabelle der gewählte Punkt schwarz unterlegt und somit exakt identifizierbar.

Lasso: Mit dem Lasso läßt sich eine ganze Gruppe von Datenpunkten auswählen. Hierzu einfach die gewünschte Gruppe im Graphen umkreisen.

Hand: Mit dem Handsymbol können Sie die vorgegebenen Threshold-Linien im Graph neu legen und dadurch die Daten neu positionieren. Dabei wird der Maßstab des Graphs nicht verändert .

Zoom: Wird diese Taste gedrückt und anschließend ein beliebiger Punkt im Graph, so wird dort der neue Bildmittelpunkt gesetzt und von dort ausgehend eine Vergrößerung des Bereiches durchgeführt. Dadurch werden die Allelcluster entsprechend aufgelöst und einzelne Datenpunkte anwählbar.

Verkleinerung: Die Verkleinerungsfunktions-Taste stellt eine Umkehr der Zoom-Taste dar.

Die automatische Allelbestimmung (Autocall) ist mit der SDS-Software sehr konservativ (99,7 %ige Absicherung). Positionen, denen ein Allel nicht automatisch zugeordnet werden kann, sind durch ein „X“ im Graphen bzw. durch ein „?“ in der Tabelle gekennzeichnet. Entscheidend ist, das die Standards richtig zugeordnet werden. Eine nachträgliche Zuordnung per Hand (manual calls) ist jedoch möglich und insbesondere dann notwendig, wenn zuwenig oder „schlechte“ Standardreaktionen durchgeführt wurden. Selbst wenn keine Automatische Allelbestimmung von der Software ausgeführt werden konnte und entsprechend nur die Farbkomponenten-Ansicht in der graphischen Darstellung zugänglich ist, kann eine manuelle Zuordnung noch durchgeführt werden. Um eine manuelle Zuordnung von Allelen durchzuführen, gehen Sie bitte wie folgt vor:

1. Schauen sie sich die graphische Ergebnisdarstellung als **Dye Components** (bzw. **Allele Components**) an. Stellen Sie den Maßstab so ein, das Sie die NTCs, STNDs und UNKNs als bis zu 4 Populationen im Graphen sehen. So sehen sie sehr schnell, wie distinkt die Genotypen voneinander unterschieden werden konnten. Die kräftiger gezeichneten Linien im Gitternetz des Graphen zeigen Ihnen wo die Software die Thresholds für die homozygoten Allelzustände gelegt hat. Meinen Sie - auch nach Ansicht der numerischen Daten - eine bzw. noch weitere, manuelle Zuordnungen durchführen zu können, so:

Einzelne Manuelle Zuordnungen: Drücken Sie die „Zoom“-Taste in der Werkzeugpalette und anschließend im Graph auf die Population in der sich das/die „X“ befindet, welches Sie zuordnen wollen, um diese zu zoomen. Jetzt den Selektor in der Werkzeugpalette drücken und anschließend im Graphen die gewünschte Position.

Ganze Gruppen zuordnen: Ganze Populationen können Sie mit dem Lasso auswählen.

3. Gehen Sie dann mit der Maus in den Bildschirm nach rechts oben (Call) in den **Allel-Zuordner** und rufen Sie dort die Allelbezeichnung auf, die Sie zuordnen wollen.

4. Wenn sie jetzt mit der Maus irgendwo in den Graphen klicken, nimmt das „X“ die Farbe des Allels an, die sie dieser Position zugeordnet haben. Die Änderung wird ebenfalls in den tabellarischen Daten sowie in den Experiment Report aufgenommen.

Hinweis: **Wurde eine manuelle Zuordnung von Allelen durchgeführt, so weist die Mitteilung „Note: Manual calls were made.“ im „Experiment“ Report darauf hin!**

4.5.1 Der Weg von den Rohdaten zur Allel-Bestimmung

Die SDS-Software führt auf dem Weg von den gewonnenen Rohdaten (aufgenommenes Spektrum von 500-660 nm) zur Allel-Bestimmung 4 verschiedene mathematische Berechnungsstufen durch:

1. Umwandlung der Rohdaten in Farbkomponenten

Diese Stufe der Rohdatentransformation ist der Beginn einer jeden Datenanalyse mit der SDS-Software - also auch anderer Applikationen. Es wird zunächst eine Multikomponentenanalyse durchgeführt. Hierzu werden die Rohdaten (Fluoreszenz über der Wellenlänge) und die auf dem System abgelegten Reinfarbspektren als Bekannte genommen und damit die gemessenen Proben als Farbkomponenten über eine Matrixanalyse neu definiert:

$$[\text{Fraktionelle Beteiligung}] = [\text{Rohdaten}] \times [\text{Reinfarbspektren}]$$

Für die Alleldifferenzierung bedeutet dies, dass die gewonnenen Rohdaten einer jeden Position in ihre FAM-, TET, TAMRA (TAM)- und ROX-Komponente zerlegt werden. Die FAM-, TET- und TAM-Komponenten werden dann auf die ROX-Komponente normalisiert und als AL1 R_n , AL2 R_n und TAM R_n tabellarisch wie auch graphisch (Farbkomponenten-Ansicht) wiedergegeben.

2. Umwandlung der Farbkomponenten in Allelkomponenten

In der zweiten Transformationsebene wird festgestellt, inwieweit eine als UNKN definierte Position den Kontrollreaktionen, d.h. NTCs, AL1 und AL2, entspricht. Die drei Kontrollreaktionstypen liefern folgende Aussagen:

1. Wie sieht das Spektrum für die drei Kontrollreaktionstypen aus?
2. In wie weit entsprechen die Farbkomponenten der UNKN einer dieser drei Kurven?

Um die zweite Frage beantworten zu können, wird deshalb eine weitere Multikomponenten-Matrix erstellt, die nun die Daten aus den Kontrollreaktionen einbezieht. Das Ergebnis wird in der Tabelle als NTC_m, T1_m und T2_m bzw. graphisch in der Allelkomponenten-Ansicht zusammengefaßt.

3. Normalisierung auf den Reaktionsverlauf

Mit Hilfe dieser letzten mathematischen Transformation wird berechnet, in wieweit ein UNKN-Spektrum Allel 1 und Allel 2 entsprechen würde, wenn in allen Reaktionen die gleiche Menge an Amplifikat gebildet worden wäre. Hierzu werden die AL1- und die AL2-Komponente durch einen Vergleich mit den NTCs skaliert. Dadurch steht ein Meßwert zur Verfügung, mit dem die UNKNs auf den Reaktionsverlauf normalisiert werden können.

$$\text{Normalisiertes AL1} = \text{AL1} + \text{NTC} \times [\text{AL1}/(\text{AL1} + \text{AL2})]$$

$$\text{Normalisiertes AL2} = \text{AL2} + \text{NTC} \times [\text{AL2}/(\text{AL2} + \text{AL1})]$$

In der Tabelle ist das Ergebnis dieser Transformation als T1_n und T2_n wiedergegeben. Die Daten werden graphisch in der Ansicht der normalisierten Daten dargestellt. Die normalisierten Daten bilden die Grundlage für die abschließende automatische Allelbestimmung.

4. Automatische Allelbestimmung

Mit Hilfe der T-Verteilung und einem 99,7 %igen Vertrauensintervall wird ein vertikaler sowie ein horizontaler Schwellenwert (Threshold) festgelegt:

- Horizontaler Schwellenwert: Variation der Allel 2-Kontrollreaktionen
- Vertikaler Schwellenwert: Variation der Allel1-Kontrollreaktionen

Für die automatische Allelbestimmung ergeben sich dadurch 4 Fälle:

- Allel 1: Kleiner als der horizontale-, aber größer als der vertikale Schwellenwert
- Allel 2: Größer als der horizontale- aber kleiner als der vertikale Schwellenwert
- Heterozygot 1/2: Größer als beide Schwellenwerte
- sind die normalisierten Ergebnisse kleiner als beide Schwellenwerte, so erfolgt keine automatische Allelbestimmung.

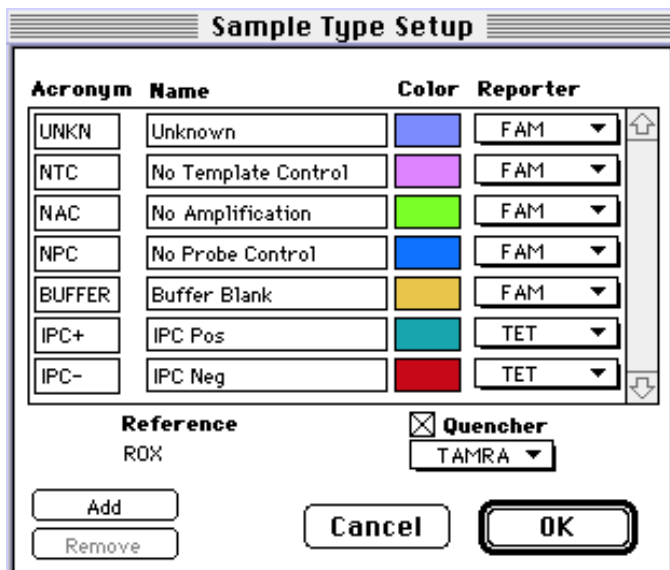
4.6 Plus/Minus Analysen

Der Single Reporter Plattentyp ist im Plattenlese-Modus dafür ausgelegt um die An- bzw. Abwesenheit (+/- - Analysen) einer definierten Nukleinsäure zu erkennen. Um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, kann theoretisch jeder Reaktion eine Interne Positiv Kontrolle (IPC) zugegeben werden, die durch eine mit einem anderen Reporterfarbstoff-markierte Sonde detektiert wird. Hierzu werden wie auf Seite 57 beschrieben die R_n -Werte der UNKNs mit denen der NTCs verglichen.

Beim Programmieren einer Messung beachten Sie bitte folgendes:

- es sollten ≥ 8 Positionen (mindestens 6) pro Mikrotiterplatte als IPC-gekennzeichnet sein. Sämtliche verbleibenden Positionen können als IPC+ vorgegeben werden.
 - das Vertrauensintervall ist auf 99,7 % eingestellt. Sollten Sie eine höhere oder niedrigere Absicherung Ihrer Ergebnisse vorziehen, verfahren Sie bitte wie auf Seite 58 beschrieben.
1. Im **File**-Menü **New Plate** aufrufen.
 2. Unter Plate Type **Single Reporter** und unter Instrument den von Ihnen verwendeten Gerätetyp einstellen. Handelt es sich um einen 7700 SDS, so müssen Sie außerdem noch unter Run die Option **Plate Read** vorgeben.
 3. In der **Setup View** zunächst im **Sample Type Setup** den Positionsbezeichnungen den richtigen, im Ansatz verwendeten Reporterfarbstoff zuordnen, z.B. IPC+: TET, UNKN: FAM, etc.

Abb. 36: Beispiel zur Programmierung des „Sample Type Setup“-Fensters für eine +/- Analyse mit IPC



- Im Pop-Up-Menü für das eingestellte Farbniveau ist FAM vorgegeben. Mit FAM sei in diesem Beispiel die Sonde markiert, mit der die eigentliche Zielsequenz detektiert wird. Programmieren Sie deshalb im „FAM-Niveau“ die Art der verwendeten Proben, z.B: A1-A12 als NTCs, den Rest der Mikrotiterplatte als Unbekannte.

Abb. 37: Beispiel zur Programmierung der Maske einer +/- Messung (Proben-Niveau, FAM)

Internal Positive Control (IPC)												
Sample Type: UNKN - Unknown							7700 Single Reporter					
Sample Name:							Comment:					
Replicate:												
Show Analysis Dye Layer: FAM												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC 0	NTC 0	NTC 0	NTC 0	NTC 0	NTC 0	NTC 0	NTC 0	NTC 0	NTC 0	NTC 0	NTC 0
B	UNKN 2690	UNKN 2690	UNKN 2690	UNKN 2690	UNKN 2690	UNKN 2690	UNKN 380	UNKN 380	UNKN 380	UNKN 380	UNKN 380	UNKN 380
C	UNKN 5000	UNKN 5000	UNKN 5000	UNKN 5000	UNKN 5000	UNKN 5000	UNKN 1150	UNKN 1150	UNKN 1150	UNKN 1150	UNKN 1150	UNKN 1150
D	UNKN 4230	UNKN 4230	UNKN 4230	UNKN 4230	UNKN 4230	UNKN 4230	UNKN 2305	UNKN 2305	UNKN 2305	UNKN 2305	UNKN 2305	UNKN 2305
E	UNKN 1535	UNKN 1535	UNKN 1535	UNKN 1535	UNKN 1535	UNKN 1535	UNKN 765	UNKN 765	UNKN 765	UNKN 765	UNKN 765	UNKN 765
F	UNKN 4615	UNKN 4615	UNKN 4615	UNKN 4615	UNKN 4615	UNKN 4615	UNKN 3460	UNKN 3460	UNKN 3460	UNKN 3460	UNKN 3460	UNKN 3460
G	UNKN 3845	UNKN 3845	UNKN 3845	UNKN 3845	UNKN 3845	UNKN 3845	UNKN 3075	UNKN 3075	UNKN 3075	UNKN 3075	UNKN 3075	UNKN 3075
	UNKN 0	UNKN 0	UNKN 0	UNKN 0	UNKN 0	UNKN 0	UNKN 1920	UNKN 1920	UNKN 1920	UNKN 1920	UNKN 1920	UNKN 1920

- Stellen Sie nun das Farbniveau auf den zweiten verwendeten Reporter um, z.B. TET, mit dem die IPC detektiert wird. Programmieren Sie nun, welche der im „FAM-Niveau“ definierten Positionen IPC+ oder IPC- sind.

Abb. 38: Beispiel zur Programmierung der Maske einer +/- Messung (IPC-Niveau, TET)

Internal Positive Control (IPC)												
Sample Type: <i>Mixed</i>						7700 Single Reporter						
Sample Name:						Comment:						
Replicate:												
Show Analysis Dye Layer: <i>TET</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IPC- 0	IPC- 0	IPC- 0	IPC- 0	IPC- 0	IPC- 0	IPC+ 0	IPC+ 0	IPC+ 0	IPC+ 0	IPC+ 0	IPC+ 0
B	IPC+ 2690	IPC+ 2690	IPC+ 2690	IPC+ 2690	IPC+ 2690	IPC+ 2690	IPC+ 380	IPC+ 380	IPC+ 380	IPC+ 380	IPC+ 380	IPC+ 380
C	IPC+ 5000	IPC+ 5000	IPC+ 5000	IPC+ 5000	IPC+ 5000	IPC+ 5000	IPC+ 1150	IPC+ 1150	IPC+ 1150	IPC+ 1150	IPC+ 1150	IPC+ 1150
D	IPC+ 4230	IPC+ 4230	IPC+ 4230	IPC+ 4230	IPC+ 4230	IPC+ 4230	IPC+ 2305	IPC+ 2305	IPC+ 2305	IPC+ 2305	IPC+ 2305	IPC+ 2305
E	IPC+ 1535	IPC+ 1535	IPC+ 1535	IPC+ 1535	IPC+ 1535	IPC+ 1535	IPC+ 765	IPC+ 765	IPC+ 765	IPC+ 765	IPC+ 765	IPC+ 765
F	IPC+ 4615	IPC+ 4615	IPC+ 4615	IPC+ 4615	IPC+ 4615	IPC+ 4615	IPC+ 3460	IPC+ 3460	IPC+ 3460	IPC+ 3460	IPC+ 3460	IPC+ 3460
G	IPC+ 3845	IPC+ 3845	IPC+ 3845	IPC+ 3845	IPC+ 3845	IPC+ 3845	IPC+ 3075	IPC+ 3075	IPC+ 3075	IPC+ 3075	IPC+ 3075	IPC+ 3075
H	IPC+ 0	IPC+ 0	IPC+ 0	IPC+ 0	IPC+ 0	IPC+ 0	IPC+ 1920	IPC+ 1920	IPC+ 1920	IPC+ 1920	IPC+ 1920	IPC+ 1920

- Sichern Sie die programmierte Maske, schalten Sie dann in die **Analysis View** um und starten Sie die Messung durch Mausklick der **Post-PCR Read**-Taste.
- Speichern Sie den Lauf ab.
- Öffnen Sie das **Analysis**-Menü und starten Sie die Analyse über den Befehl **Analyze**. Die Auswertung sollte (bei Verwendung von 2 Sonden) unter Hinzunahme der Spektralen Kompensation durchgeführt werden (s. S. 104). Die folgende Tabelle zeigt Ihnen, wo Sie welche analysierten Daten finden:

Tab. 20: Welche Daten stehen wo nach der Analyse der Daten einer +/- - Messung zur Verfügung?

Datentyp	Graphische Darstellung	Analysis View	Experiment Report
Rohdaten	Spektrum	-	-
Wiederholungen (Replicates)	-	-	Mittelwert & Standardabweichung
+/- -Ergebnisse	-	+/-/?	+/-/? bzw. No Amp für alle Positionen
ΔR_n oder R_n	-	Im Farbniveau der Zielsequenz numerische Werte	Numerische Werte

Abb. 39: Darstellung der analysierten Meßergebnisse („Analysis View“-Fenster)

a) IPC-Niveau (TET)

Internal Positive Control (IPC)												
Sample Type: <input type="text" value="IPC+ - IPC Pos"/>		Status: Checking...		7700 Single Reporter								
Sample Name:		Pre-PCR Read		Comment:								
Replicate:		Post-PCR Read										
Stage:		Repetition:										
Time:		Step:										
Show Setup		Dye Layer: <input type="text" value="TET"/>		Rn Range: <input type="text" value="-88.6"/> <input type="text" value="2.007"/>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC-	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+	IPC+

b) Proben-Niveau (FAM)

Internal Positive Control (IPC)												
Sample Type: <input type="text" value="UNKN - Unknown"/>		Status: Checking...		7700 Single Reporter								
Sample Name:		Pre-PCR Read		Comment:								
Replicate:		Post-PCR Read										
Stage:		Repetition:										
Time:		Step:										
Show Setup		Dye Layer: <input type="text" value="FAM"/>		Rn Range: <input type="text" value="-3.13"/> <input type="text" value="2.423"/>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	?	?	?	?	?	?	-	-	-	-	-	-
	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
B	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
D	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
G	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN
H	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN

4.7 Schnellprotokoll zum Starten des 7700 SDS

Im Folgenden soll der Ablauf einer Real-Time TaqMan™ PCR auf dem 7700 SDS in 7 Schritten dargestellt werden:

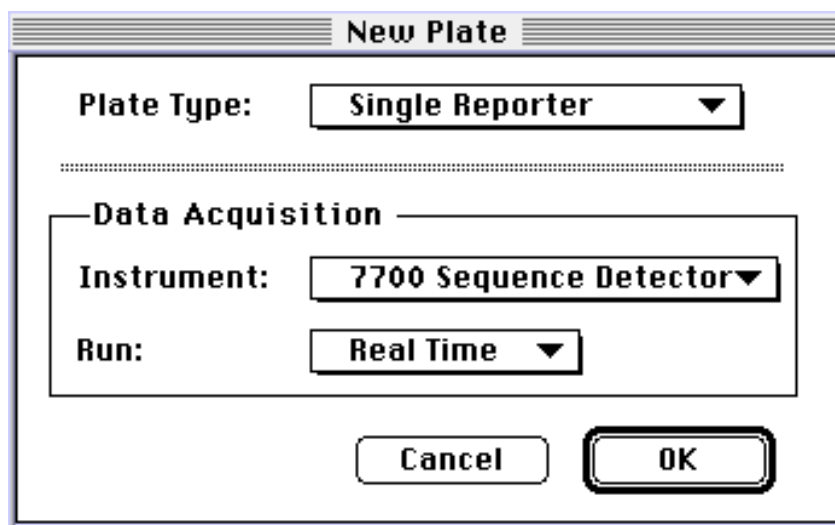
1. Einschalten des Systems

Links unten am Gerät befindet sich die Einschalttaste. Das System sollte mindestens 10 min vor Beginn eines Laufes eingeschaltet werden!

2. Auswahl des Lauf- sowie des Plattentyps

Wird **New Plate** im Menü **File** aufgerufen, so erscheint die **New Plate-Dialogbox**. Hier wird zunächst der Plattentyp sowie die Form der Datenaufnahme definiert.

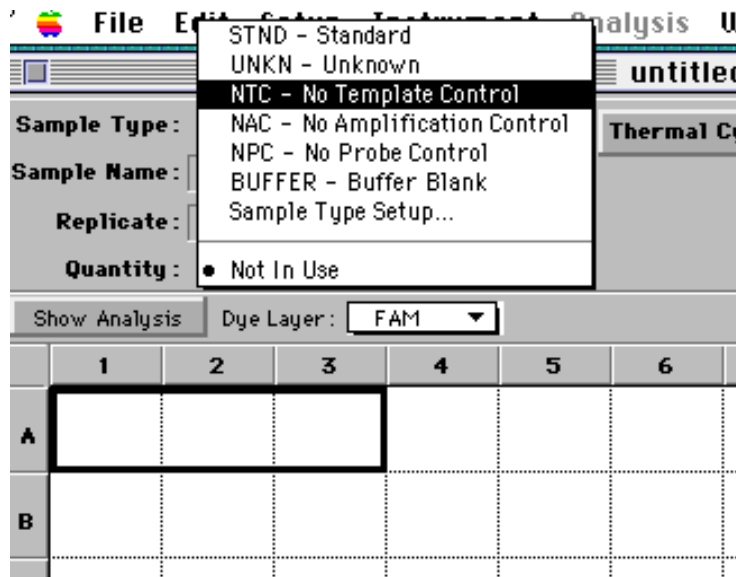
Abb. 40: Die „New Plate“-Dialogbox



3. Definieren der Positionen in der Mikrotiterplatte

Mit Hilfe des **Sample Type Pop-up-Menüs** bzw. der **Sample Type Palette** aus dem Menü **Setup** erfolgt die Zuordnung der einzelnen Positionen in der 96-well-plate Maske. Nicht belegte Positionen sollten als „Not in Use“ gekennzeichnet werden. Kommentare, die im „Experiment Report“ auftauchen sollen, können im **Comments-Feld** eingegeben werden.

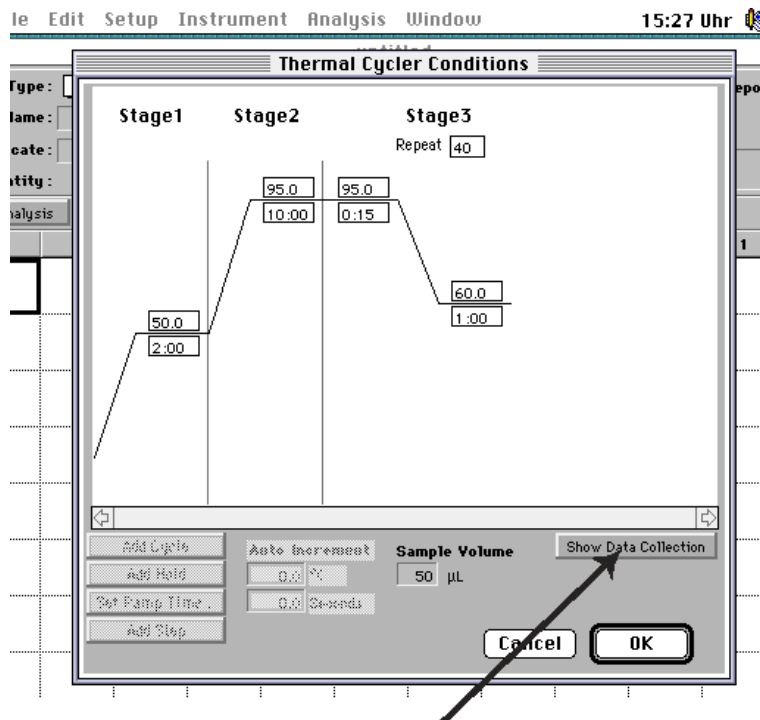
Abb. 41: Aufrufen des Sample Type Pop-up-Menüs (Bsp.: Definieren der NTCs)



4. Programmieren des integrierten Thermocyclers

In der Setup View die Taste für die Thermocycler Programmierung betätigen und das Programm im **Time and Temperatur-Fenster** sowie die Datenaufnahme im **Show Data Collection Fenster** definieren.

Abb. 42: Programmieren des Thermocyclers

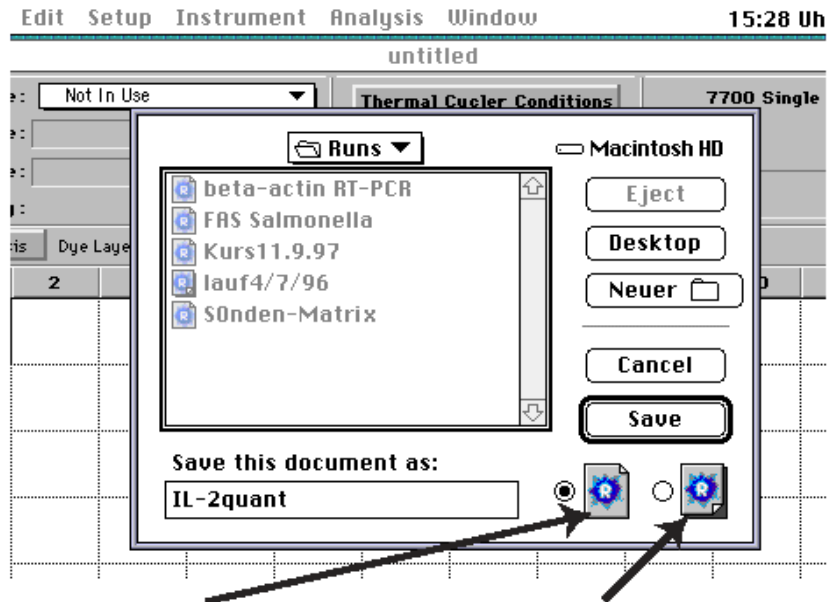


Knopf zum Umschalten zum
„Show Data Collection“-Fenster

5. Abspeichern des Lauf-Dokuments

Im Menü **File** kann das erstellte Dokument unter **Save As** abgespeichert werden. Dabei kann zwischen normalen und stationärem Fileformat gewählt werden.

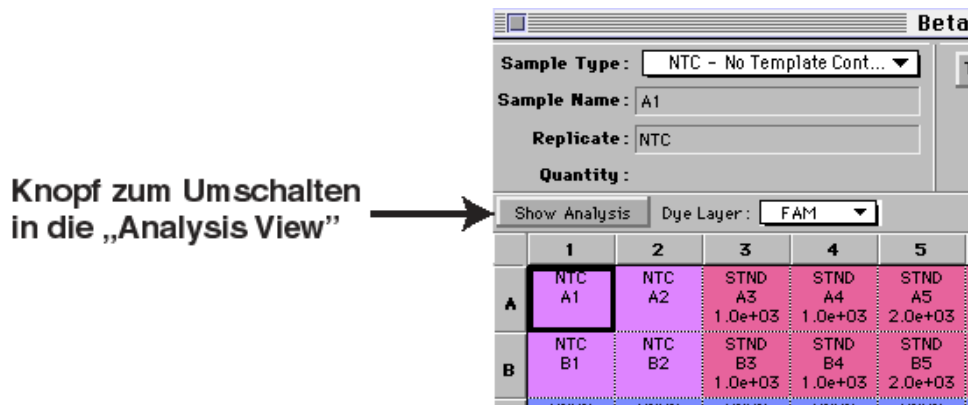
Abb. 43: Abspeichern des erstellten Plattendokuments



Icon für normales Format Icon für stationäres Format

6. Umschalten in die Analysis View

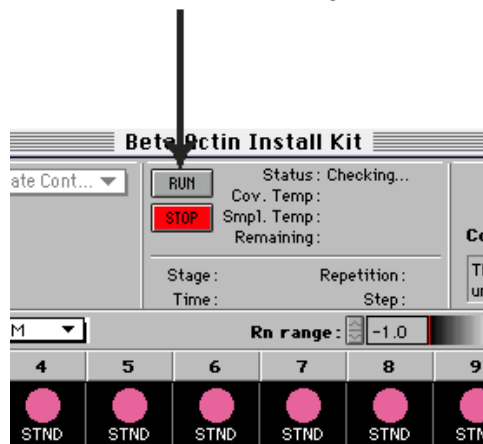
Abb. 44: Umschalten in die Analysis View



7. Starten des 7700 SDS

Abb. 45: Starten eines Laufes

Zum Starten des Laufes den Startknopf drücken
(Achtung, im Statusfeld muß „Idle“ stehen)



4.8 Schnellprotokoll zur Datenanalyse

Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte zur Datenanalyse dargestellt:

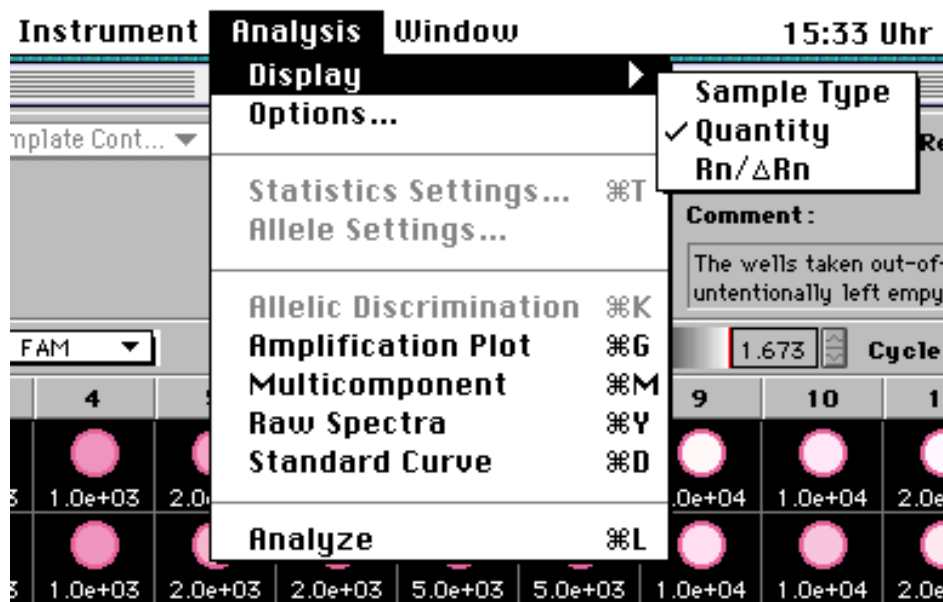
1. Analyse der Rohdaten

Im Menü **Analysis** den Befehl **Analyze** wählen oder die Tastenkombination **⌘L** über die Tastatur eingeben.

2. Kopienzahl

Im Menü **Analysis** unter **Display** den Befehl **Quantity** aktivieren.

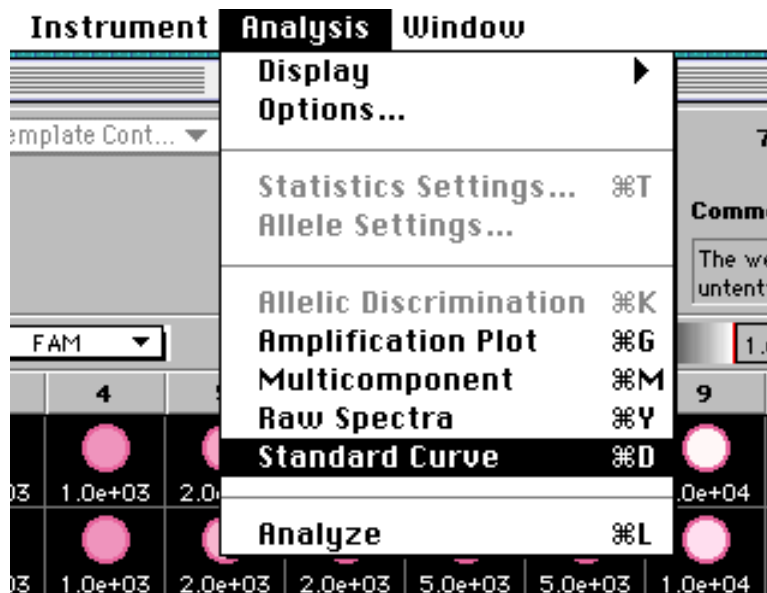
Abb. 46: Aufrufen der berechneten Startkopienzahl



3. Erstellen einer Standardkurve

Im Menü **Analysis** den Befehl **Standardkurve** aktivieren.

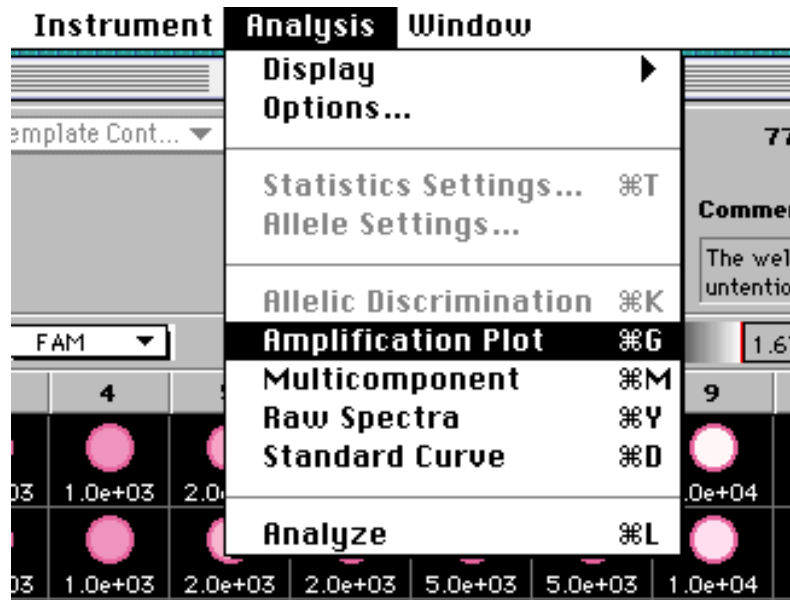
Abb. 47: Erstellen der Standardkurve



4. Erstellen von Amplification-Plots

Im Menü **Analysis** den Befehl **View** aufrufen und **Amplification Plot** aktivieren.

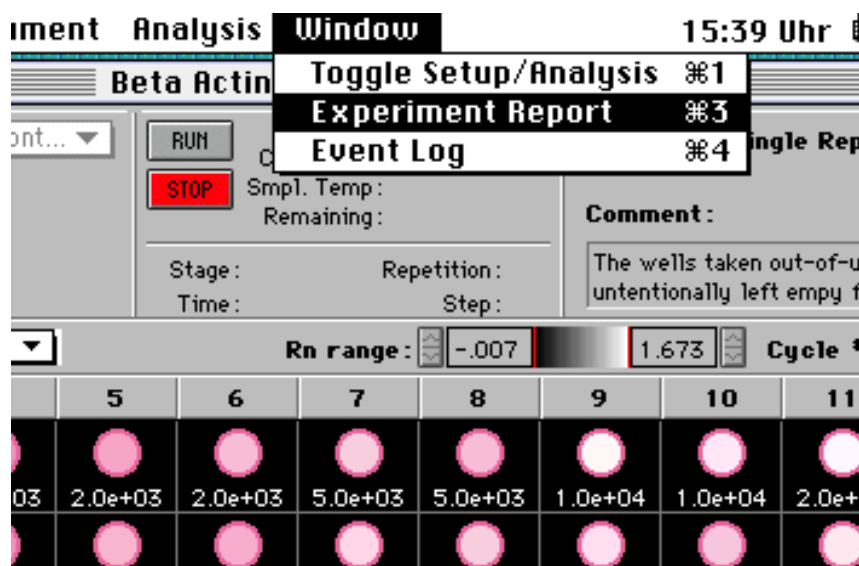
Abb. 48: Aufrufen des Amplifikations-Graphen



5. Ausdrucken des Experiment Report

Im Menü **Window** zunächst den Befehl **Experiment Report** aktivieren. Dann im Menü **File** die Option **Print...** aufrufen.

Abb. 49: Erstellen des Experiment-Reports



4.9 Der Event-Log

Im Event-Log werden Fehlermeldungen zu Ereignissen während der PCR bzw. der Datenanalyse zusammengefaßt. Der Event Log erscheint automatisch nach der Analyse, wenn irgendwelche Fehler aufgetreten sind. Er kann jedoch auch unabhängig davon eingesehen werden. Hierzu im **Windows-Menü** den Befehl **Event Log** aktivieren. Sie finden darin die Uhrzeit wann der Fehler aufgetreten ist sowie eine kurze Beschreibung des Problems, die folgende Bedeutung trägt:

Tab. 21: Fehlermeldungen im Event Log und ihre Bedeutung

Fehlermeldung	Bedeutung
Background Spectra not found.	Multikomponenten-Analyse ist ohne „Background Component“ abgelaufen. Analyse daher wahrscheinlich falsch.
No standard curve generated - all standards have the same quantity.	Wenn den Standards in der Setup View keine oder dieselbe Kopienzahl zugeordnet wird, kann die Startkopienzahl der UNKN nicht bestimmt werden.
Standard curve generated, no unknowns to interpolate.	Es wurden in der Setup View keine UNKN vorgegeben.
SVDCMP: No convergence in 30 iterations.	Entweder 2 der Reinfarbenspektren sind identisch oder eine ist 0.
Well nn: Background spectra not found.	Multikomponenten-Analyse für eine Position ohne „Background Component“ abgelaufen. Analyse daher wahrscheinlich falsch.
Well nn: Invalid threshold cycle for standard.	Der berechnete C_T für einen Standard ist entweder <1 oder größer als die Zahl der programmierten Zyklen. Eine solche Position wird nicht zur Erstellung der Standardkurve herangezogen.
Well nn: Invalid quantity specified for standard.	Für einen/mehrere Standards wurde keine Kopienzahl zugeordnet. Betroffene Positionen werden nicht zur Erstellung der Standardkurve herangezogen.
Well nn: Invalid threshold cycle for unknown.	Der berechnete C_T für eine UNKN ist entweder <1 oder größer als die Zahl der programmierten Zyklen. Es kann keine Startkopienzahl bestimmt werden.
Unknowns specified with no standards.	Es wurden keine STNDs vordefiniert, so daß keine Standardkurve generiert und die Startkopienzahl der UNKNs nicht bestimmt werden kann.

5. Tips & Tricks

5.1 Schnellbefehle über Tastenkombinationen

Die SDS-Software bietet neben der Bedienung der Maus auch verschiedene Tastenkombinationen (Shortcuts), um dieselben Befehle auszuführen:

Tab. 22: Bedienung über die Tastatur

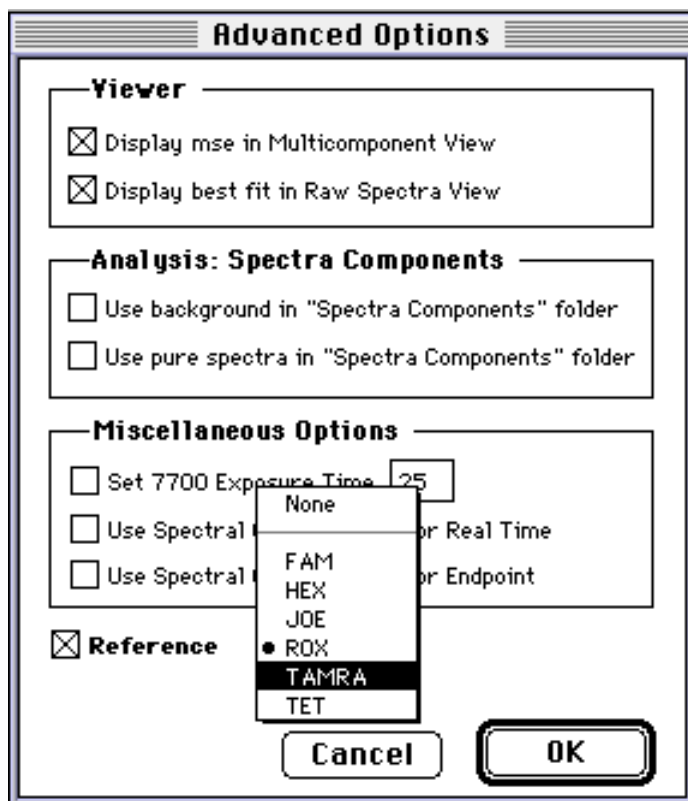
Tastenkombination	ausgeführte Handlung
⌘N	Öffnet die Neue-Platte Dialogbox
⌘O	Öffnet das Verzeichnis um eine abgespeicherte Platte öffnen zu können
⌘W	Schließt ein Laufdokument
⌘E	Exportiert Extensionsdaten im Tab-delimited-Format
⌘S	Sichert ein Laufdokument
⌘H	Exportiert „Result“-Daten im Tab-delimited-Format
⌘P	Öffnet die Drucken-Dialogbox
⌘Q	Schließen der SDS-Software
⌘J	Extrahiert Reinfarbenspektrum
⌘R	Startet den Sequence Detector
⌘F	Öffnet die Funktionstest-Dialogbox
⌘T	Öffnet die Thermocycler-Dialogbox
⌘L	Analysiert die Daten
⌘3	Öffnet Experiment-Report
⌘4	Öffnet „Event Log“
⌘A	Wählt alle Positionen bzw. Elemente in einem Fenster aus und markiert sie
⌘C	Kopiert die gewählten Daten und legt sie im Zwischenspeicher ab
⌘D	Generiert Standardkurve
⌘G	Öffnet Amplifikationskurve
⌘M	Öffnet Multikomponenten-Darstellung
⌘V	Lädt aus dem Zwischenspeicher in die Cursor-Position
⌘X	Schneidet aus und legt im Zwischenspeicher ab
⌘Y	Öffnet Rohdaten-Spektrum
⌘Z	Macht letzte Aktion rückgängig

5.2 Verwendung von TAMRA als Passive Referenz

Die SDS-Softwareversion 1.6 bietet - falls experimentell erforderlich - die Möglichkeit als Ersatz für den passiven Referenzfarbstoff ROX auf den Quencher-Farbstoff TAMRA zu normalisieren. Hierzu führen Sie bitte folgende Schritte durch:

1. Öffnen Sie das **Analysis**-Menü und wählen Sie **Diagnostics**.
2. Rufen Sie dort die Funktion **Advanced Options** auf.
3. Es erscheint die **Advanced Options Dialogbox**. Rufen Sie unter dem Farbstoff Pop-Up Menü TAMRA als neue passive Referenz auf.

Abb. 50: Die „Advanced Options Dialogbox“



4. Bestätigen Sie mit **OK**.
5. Es erscheint folgende Meldung: **Please quit the application and re-launch it in order to use new changes.**
6. Mit **OK** bestätigen und Aufforderung zum Neustart ignorieren (zum Überprüfen ob die Änderung auch tatsächlich übernommen wurde in die Setup View zurück wechseln und unter der Sample Type Setup-Box den eingestellten Referenzfarbstoff überprüfen).

Hinweis: Die Passive Referenz ROX besteht aus einem FAM-ROX-Konjugat, weshalb bei Verwendung des Puffers A immer ein FAM-Signal detektiert wird, selbst wenn keine FAM-markierte Sonde eingesetzt wurde.

5.3 Abnahme der Passiven Referenz

Der passive Referenzfarbstoff ROX kann unter gewissen Umständen in seiner Fluoreszenzintensität im Verlauf der PCR dramatisch abnehmen. Das Ergebnis sind z.B. falsch Positive NTCs wie auch Proben. Ob die Abnahme von ROX ein Problem ist, verdeutlicht die Multikomponenten-Darstellung: Nehmen die anderen Farbstoffe im Verlauf der PCR ebenfalls ab, so liegt kein ROX-Problem vor. Nimmt ROX hingegen alleine stark ab, so können zwei Ursachen dafür verantwortlich sein:

1. Sondensequenz: Noch nicht bekannte Sequenzmotive innerhalb der fluorogenen Sonde können zu einer starken Fällung von ROX führen.

Lösung: Ergänzen Sie den Reaktionspuffer um 0,05 % Gelatine und 0.01 % Tween 20.

2. Aufreinigungsmethode: Verschiedene Nukleinsäurepräparationsmethoden scheinen ebenfalls für eine Ausfällung von ROX im Ansatz verantwortlich zu sein.

Lösung: Wechseln Sie falls möglich die Aufreinigungsmethode.

5.4 Einsatz der Spektralen Kompensation

Bei der Verwendung von mehreren, mit unterschiedlichen Farben markierten Sonden in einer Reaktion kommt es zu einem spektralen Shift. Die Folge ist, dass es scheinbar zu einer sehr schwachen Kreuzfluoreszenz der zweiten Sonde kommt, obwohl nur ein einziges Fluoreszenzsignal erwartet worden wäre. Durch den Einsatz der Spektralen Kompensation wird in solchen Fällen die Analyse wie auch die spektrale Auflösung zwischen den Reaktionsgefäßen verbessert. Der einzige Nachteil bei der Verwendung der Spektralen Kompensation ist ein leicht erhöhtes Hintergrundrauschen, was zu einer größeren Standardabweichung führen kann.

Bei Verwendung multipler Sonden pro Reaktionsgefäß bietet es sich daher an, die Analyse einmal ohne und einmal mit Spektraler Kompensation durchzuführen und zu vergleichen, ob sich der Einsatz dieses Hilfsmittels lohnt. Hierzu gehen Sie bitte wie folgt vor:

1. Öffnen Sie das **Analysis**-Menü und wählen Sie **Diagnostics**.

2. Rufen Sie dort die Funktion **Advanced Options** auf.
3. Es erscheint die **Advanced Options Dialogbox**. Dort können Sie unter **Miscellaneous Options** die Spektrale Kompensation in der Analyse für Endpunkt- wie auch Real-Time Messungen hinzuschalten.
4. Bestätigen Sie mit **OK**.
5. Es erscheint folgende Meldung: **Please quit the application and re-launch it in order to use new changes.**
6. Mit **OK** bestätigen und ignorieren. Anschließend die Analyse wie gewohnt durchführen.

5.5 Probleme durch erhöhten Hintergrund

Für ein erhöhtes Grundrauschen können eine Vielzahl von Ursachen verantwortlich sein:

- Reinigungsmittel für verwendete Glaswaren ist stark fluoreszierend und gelangt so in das Wasser, welches anschließend für die Reaktion verwendet wird
- das verwendete Probenmaterial ist stark fluoreszierend
- Verwendung nicht-optischer Reaktionsgefäße trägt sehr stark zum Hintergrund bei
- Reaktionsgefäße nicht beschriften (auch nicht an den Seiten!), da es die Messung beeinflusst und sich an den Blockinnenwänden für die betroffenen Positionen ablagern kann: Reinigung der betroffenen Positionen mit einem sauberen Q-Tip und reinem Alkohol
- Fluoreszenzkontaminationen im Heizblock, z.B. durch beschädigte oder schlecht verschlossene Reaktionsgefäße bzw. Staub: Reinigung der betroffenen Positionen mit einem sauberen Q-Tip und reinem Alkohol
- Überprüfen des optischen Systems vom Heizdeckel bis zum Laser: Hierzu die mitgelieferte saubere schwarze Platte 1 min bei 25°C messen und anschließend für die gesamte Platte die Rohdaten anschauen. Betroffene Positionen werden durch einen deutlich erhöhten Kurvenverlauf sichtbar (Service verständigen)
- um festzustellen, ob der erhöhte Hintergrund ursächlich im Block zu finden ist, ebenfalls 1 min bei 25°C messen, aber nichts in den Block stellen

5.6 Exportieren von Daten

Die SDS-Software bietet die Möglichkeit Daten für alle 96- bzw. eine Auswahl von Positionen einer Mikrotiterplatte im Tab-delimited-Format zu exportieren. Diese Daten können anschließend mit jeder Software, die dieses Format erkennt, bearbeitet werden. Das gemessene Spektrum von 500-660 nm ist dabei in 32 spektrale Bins aufgeteilt.

Tab. 23: Optionen zum Exportieren von Daten (RT = Real-Time, PR = Plate Read, AD = Allelic Discrimination)

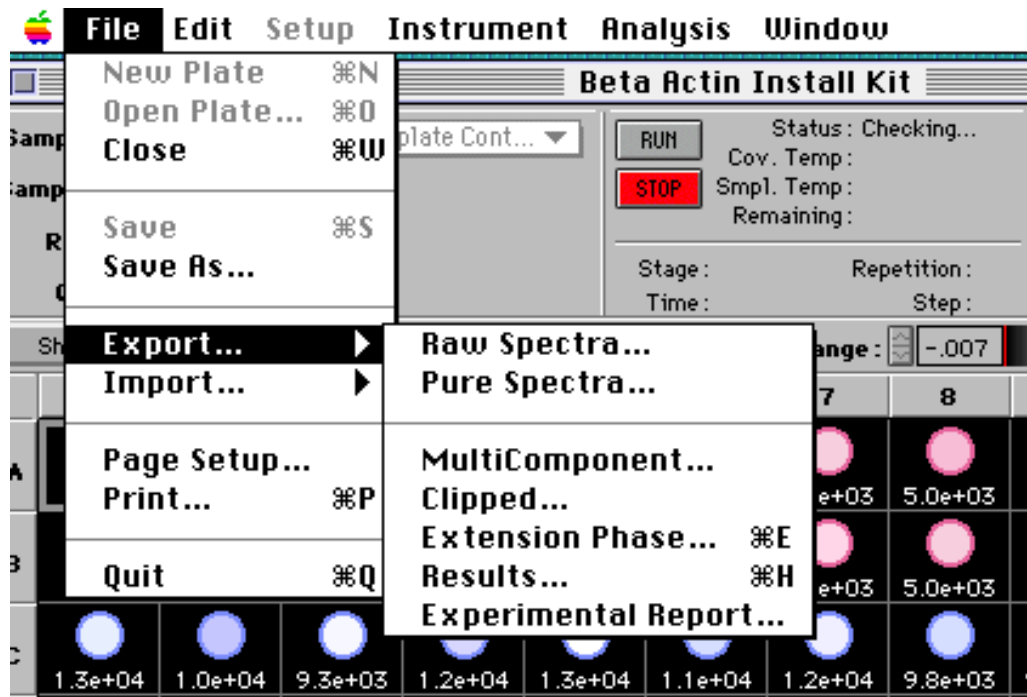
Option	Inhalt	RT	PR	AD
Raw Spectra	Für jede ausgewählte Position wird ein Datenfile erstellt. Die Daten umfassen die 32 spektralen Bins für die Phasen der PCR, die beim Programmieren des Thermocyclers mit Icons belegt wurden (ca. jede 7. sec ein Datenpunkt).	✓	✓	✓
Pure Spectra	Enthält die Reinfarbenkomponenten-Daten in Form eines Datenpunkts für jeden der 32 Spektralen Bins sowie den Hintergrund der 96 Positionen für jeden spektralen Bin.	✓	-	-
Multicomponent	Den berechneten Anteil von jeder Farbkomponente der einzelnen Positionen für die mit einem Icon belegten Phasen der PCR (ca. alle 7 sec ein Datenpunkt). Desweiteren die Reinfarbenkomponenten-Daten und die berechnete Inverse Matrix (auch Einzelwerte).	✓	✓	✓
Clipped	Den Durchschnitt der letzten 3 Datenpunkte der Extensionsphase für jeden Zyklus und jede gewählte Position.	✓	-	-
Extension	Für jeden der 32 Spektralen Bins ein Extensionsphase-Datenpunkt (Für jeden Zyklus und jede Position)	✓	-	-
Results	Real-Time: Ct, Kopienzahl und Mittelwert, die Standardabweichung bei Wiederholungen (für NTCs nur Ct) sowie die Daten der Standardkurve (Steigung, Y-Achsenabschnitt,...) Plate Read: Bei Single Reporter Rn und ΔRn sowie +/- Detektion. Bei Alleldifferenzierung Genotyp (Allel 1-3 wobei 3 = heterozygot).	✓	✓	✓

Die Daten können wie folgt exportiert werden:

1. Die vollständige Mikrotiterplatte bzw. eine gewünschte Auswahl von Positionen auf dem Bildschirm markieren.
2. Im **File-Menü** den Befehl **Export** markieren und den gewünschten Datentyp (s. Tab. 23) auswählen.

Hinweis: Vor der Analyse stehen nur Raw Spectra bzw. Pure Spectra zur Auswahl, danach alle Optionen.

Abb. 51: Export-Optionen im File-Menü



3. Jetzt in der **Export-Dialogbox** den gewünschten Typ des Datenexports einstellen, angeben wo der Datenfile hingespeichert werden soll und ihm einen Namen geben.
4. Durch Drücken von **Export** den Befehl ausführen.

5.7 Troubleshooting Guide

1. Firmware Conflict

Damit der 7700 SDS und der Macintosh Computer optimal zusammenarbeiten, müssen die Softwarekomponenten zusammenpassen, die auf beiden Systemen installiert wurden. Der 7700 SDS trägt dabei ab Fabrik die Firmware auf einem sogenannten EPROM-Baustein der Version 1.0. Bei einem Upgrade auf die Softwareversion SDS 1.6 bzw. bei deren Verwendung wird deshalb die neue Firmware in einen Akku-gepufferten RAM-Speicher auf dem 7700 SDS Motherboard geladen.

Generell sollte der 7700 SDS bei täglicher Anwendung nicht ausgeschaltet werden, um den Laser zu schonen. Wird das System jedoch länger als 48 Stunden (z.B. übers Wochenende) ausgeschaltet, so verliert der Akku an Ladung und die im RAM

abgelegten neuen Firmware-Daten gehen verloren. Beim Starten eines Laufs erscheint dann die Fehlermeldung „**A firmware conflict has occurred**“. Es werden Ihnen 2 Möglichkeiten angeboten:

- **OK:** Sie können die Fehlermeldung ignorieren, indem Sie diese Option wählen. Nach einem kurzen Moment startet dann der Lauf. Allerdings arbeitet jetzt die SDS 1.6 Software nicht mit der neuen Firmware (ist nicht mehr im RAM) sondern mit der alten Version auf dem eingebauten EPROM. Durch die fehlerhafte Abstimmung der Softwarekomponenten von System und Computer läuft dann das System instabil und neigt zu Abstürzen, weshalb diese Option nicht empfehlenswert ist.
- **Autodownload firmware:**
 1. Damit der Akku stark genug ist den RAM-Speicher zuverlässig zu puffern, sollten Computer und 7700 SDS mindestens 20 min vor Inbetriebnahme eingeschaltet worden sein.
 2. Drücken Sie die „Autodownload firmware“-Option (dazu kann ein irrelevanter Lauf mit z.B. einer UNKN gestartet werden, um die Fehlermeldung zu provozieren, wenn das System >48 Stunden ausgeschaltet war). Es wird die neue Firmware aus dem Firmware-Image im Preferences Folder in den 7700er RAM geladen. Der gestartete Lauf wird dadurch automatisch abgebrochen.
 3. Nun beide Geräte ausschalten und neustarten. Die neue Firmware steht jetzt im RAM wieder im vollen Umfang zur Verfügung und beide Systeme können ohne Risiko wie gewohnt bedient werden.

TIP: Um ein stabiles Laufen des 7700 SDS zu gewährleisten, sollte einmal pro Woche die Schreibtischdatei (=Dateizuweisungstabelle) über die Funktion **rebuild desktop** neu angelegt werden. Halten Sie hierzu die Tasten **Alt + Apfel** bei Start des Computers solange gedrückt, bis die Abfrage **rebuild desktop?** erscheint.

Im folgenden sollen Lösungen für Probleme aufgelistet werden, die mit dem Macintosh Computer bzw. der SDS-Software auftreten können:

2. SDS-Software startet nicht

Typische Symptome bei diesem Problem sind:

- SDS Software stürzt ab
- Bildschirm erstarrt, so daß kein Zugriff mehr möglich ist
- entsprechende Fehlermeldung

Es gibt verschiedene Ursachen, die zu diesem Problem führen können:

a) **Beschädigte Preferences**

Um den SDS-Preferences File zu ersetzen, zunächst den **System Folder** auf der Festplatte öffnen, dann darin den **Preferences Folder**, darin wiederum den **SDS-Folder**, worin sich schließlich die SDS Preferences befinden. Ziehen Sie nun die SDS Preferences in das Mülleimer-Symbol und leeren Sie anschließend diesen (**Empty Trash**-Befehl).

Warnung: **Achten Sie dabei darauf, nicht die „Spectra Components“ und den „Background“ in den Mülleimer mit hineinzuziehen, da ansonsten eine neue Kalibrierung des Systems erforderlich wird!**

Anschließend Starten Sie die SDS-Software, wodurch diese neue SDS-Preferences im System-Folder ablegt und der 7700 SDS wieder normal arbeiten sollte.

b) **Beschädigte „Finder-Preferences“**

Um die Finder-Preferences zu ersetzen, gehen Sie wiederum in den **System Folder**, öffnen den **Preferences Folder** und lokalisieren darin die Finder-Preferences. Ziehen Sie diese in das Mülleimer-Symbol und entleeren Sie ihn. Anschließend führen Sie einen Neustart des Computers durch (**⌘ + ctrl + Einschalt-Taste** bzw. Befehl **Restart** unter **Special**). Während des Backups werden automatisch neue Finder Preferences angelegt und die SDS-Software kann wieder gestartet werden.

c) **Beschädigte Parameter RAM**

Muß der Parameter RAM rückgesetzt werden, so führen Sie hierzu einen Neustart des Computers durch, wobei Sie gleichzeitig die Tasten **alt + p + r** gedrückt halten. Sobald der Bildschirm blinkt, können Sie die Tasten loslassen. Der Computer fährt nun vollständig hoch und arbeitet wieder normal.

d) **Beschädigte Schreibtischdatei (Desktop)**

Um die Schreibtischdatei neu anzulegen führen Sie einen Neustart des Computers durch, wobei Sie die Tasten **⌘ + alt** gedrückt halten. Der Computer fragt Sie dann, ob Sie die Schreibtischdatei neuanlegen möchten. Bestätigen Sie mit **OK**.

e) **Inkompatible Systemerweiterungen**

Um zu überprüfen ob inkompatible Sytemerweiterungen die Ursache des Problems sind, deaktivieren Sie zunächst alle Erweiterungen (Extensions), indem Sie den Computer neustarten und dabei die **Shift-Taste** gedrückt halten. Läßt sich das Problem nicht abstellen, so ist wahrscheinlich unter a-d eine Lösung zu finden. Arbeitet das Programm jetzt hingegen normal, so ist eine inkompatible Systemerweiterung die Ursache.

Um das Problem zu lösen, öffnen Sie im **System Folder** die **Control panels** (Kontrollfelder). Hier können Sie jetzt verschiedene Gruppen von Systemerweiterungen deaktivieren, jeweils den Computer neustarten (wodurch diese Veränderung aktiv wird) und so die Inkompatibilität herausfinden.

3. Festplatte ist voll

Wenn nicht mehr genügend Speicher vorhanden ist erscheint die Fehlermeldung **There is more than 50 megabytes of data in the SDS Run folder...**, wann immer Sie die Software starten wollen. Um wieder genügend Speicher zur Verfügung zu haben, kopieren Sie Ihre Laufdaten auf ein Speichermedium (z.B. ZIP-Disketten) und löschen Sie diese Files anschließend von Ihrem Macintosh Computer. Dieser Vorgang sollte - insbesondere bei hohem Probanddurchsatz - routinemäßig wiederholt werden!

4. Allgemeiner Applikationsfehler

Liegt ein allgemeiner Applikationsfehler vor, so erscheint die Fehlermeldung **Could not complete the ... command because there is not enough memory**. Folgende Vorgehensweise wird empfohlen: Sichern Sie zunächst Ihre Arbeit. Führen Sie anschließend einen Neustart der Applikationssoftware durch und versuchen Sie erneut den Befehl auszuführen. Hilft dies nicht das Problem zu beheben, so probieren Sie die Schritte 2a-e.

Abschließend noch eine kurze Übersicht zu Lösungen von Problemen, die während des Betriebs des 7700 SDS auftreten können:

5. Keine Verbindung zwischen Computer und System

Neben der trivialen Erklärung (falsch angeschlossene oder lose Kabel) kann es sein, das Sie Ihren neuen Lauf nicht als „Online“-Dokument definiert haben. Um dies zu überprüfen, öffnen Sie das **Edit-Menü** der SDS-Software und öffnen darunter die **Preferences**. Überprüfen Sie ob in der erscheinenden Dialogbox **Online Document** angekreuzt ist; falls nicht bitte ankreuzen. Nun kann der Lauf gestartet werden.

6. Leerer Experiment Report

Wenn ein Lauf geöffnet wird (auch wenn er früher einmal bereits analysiert wurde), so muß das Plattendokument zunächst stets analysiert werden. Ansonsten erscheint der Experiment Report leer.

7. Reinfarbspektren

Werden die Reinfarbspektren von der Software nicht gefunden, so erscheint folgende Fehlermeldung sobald die Software gestartet wird:

Could not opendocument because needed pure spectra are missing (FAM, TAMRA). New spectra must be extracted.

Schauen Sie im SDS-Folder des Preferences Folder nach, ob die Reinfarbspektren abgelegt sind. Falls nicht, müssen neue Reinfarbspektren auf dem Computer abgelegt werden. Setzen Sie Sich hierzu mit dem Service in Weiterstadt in Verbindung bzw. bestellen Sie sich die reinen Farben (TaqMan™ Spectral

Calibration Kit, Best# 401930) und gehen wie folgt vor (auch zur Durchführung eines Updates der Reinfarbspektren):

Im Kit sind reine Farbstandards für FAM, TET, HEX, JOE, TAMRA und ROX enthalten. Als Voraussetzung für die Erstellung der Reinfarbspektren muß zunächst die Hintergrundkomponente des Systems erfaßt werden (Background Component), falls dies noch nicht geschehen ist:

1. Gehen Sie in das **File-Menü** und aktivieren Sie den Befehl **New Plate**.
2. In der erscheinenden Dialogbox stellen Sie unter Plate Type **Background** ein.
3. Programmieren Sie im Thermocyclerprogramm einen zweiminütigen Hold bei 60°C.
4. Pipettieren Sie eine vollständige Mikrotiterplatte mit 50 µl Wasser pro Reaktionsgefäß.
5. Das System wie gewohnt starten.
6. Im Anschluß an die Messung im **Instrument Menü** den Befehl **Calibrate** aufrufen und darunter den Befehl **Extract Background Component** aktivieren.

Anmerkung: Mit diesem Befehl wird die Hintergrundkomponente des Systems generiert, die die Software automatisch später von den Reinfarbspektren subtrahiert.

7. Das Dokument unter dem Namen Background abspeichern.
8. Verlassen Sie die Software, damit die neue Kalibrierung aktiv wird.

Jetzt können Sie die **Reinfarbspektren** wie folgt erzeugen:

1. Gehen Sie in das **File-Menü** und aktivieren Sie den Befehl **New Plate**.
2. In der erscheinenden Dialogbox stellen Sie unter Plate Type **Pure Spectra** ein.
3. Programmieren Sie im Thermocyclerprogramm einen zweiminütigen Hold bei 60°C und programmieren Sie die schematisierte Mikrotiterplatte wie folgt:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FAM	FAM	FAM	FAM	TAMRA	TAMRA	TAMRA	TAMRA
B	TET	TET	TET	TET	HEX	HEX	HEX	HEX
C	ROX	ROX	ROX	ROX	JOE	JOE	JOE	JOE

4. Pipettieren Sie in einer Mikrotiterplatte je 50 µl des reinen Farbstoffs pro Reaktionsgefäß, entsprechend dem Belegungsschema unter 3.
5. Das System wie gewohnt starten.

6. Speichern Sie die Messung unter dem Namen **Pure Spectra** und bleiben Sie in der **Analysis view**.

7. Markieren Sie jeweils die 4 Wiederholungen derselben Farbe mit dem Cursor.

8. Gehen Sie in das **Instrument Menü**, rufen Sie den Befehl **Calibrate** auf und aktivieren dann den Befehl **Extract Spectra Component**. Es erscheint die **Pure Spectra Extraction-Dialogbox**. Überprüfen Sie, ob unter Pure Spectra Name der korrekte Name des Farbstoffs auftaucht. Drücken Sie **OK**.

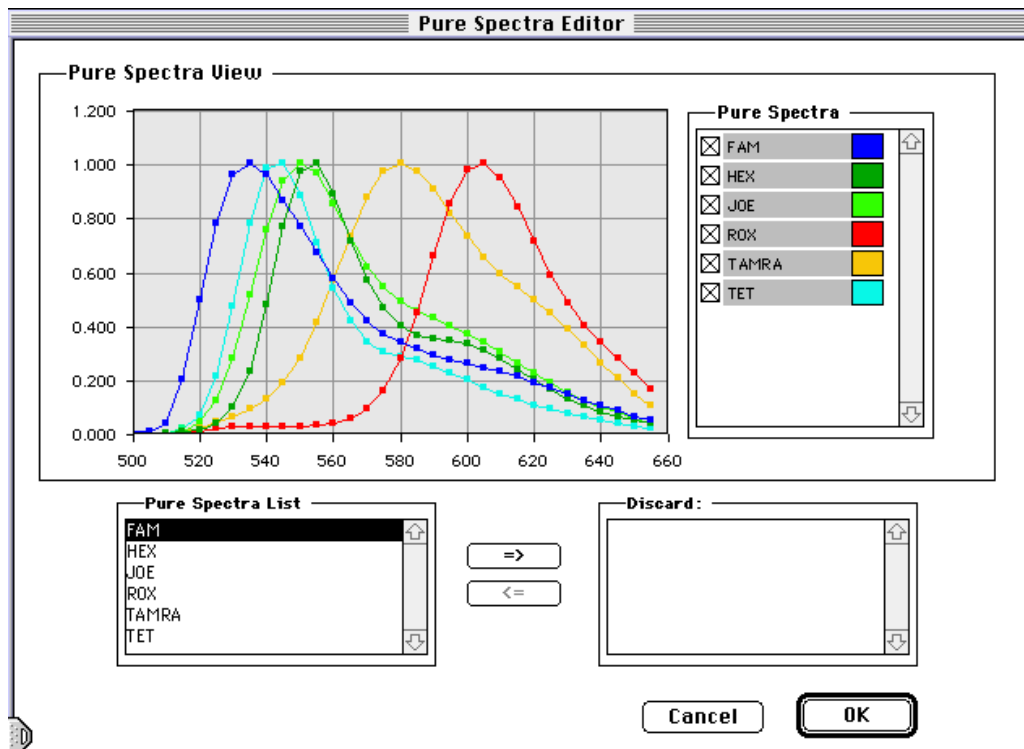
9. Es erscheint ein Graph der Farbspektren der gewählten Positionen. Achten Sie darauf, dass der Kurvenverlauf der Einzelspektren nahezu identisch verläuft. Sie können die Einzelspektren unterscheiden, indem Sie sie in der **Sample Well Box** rechts neben dem Graphen weg- oder hinzuklicken. Unterhalb des Graphen können Sie schließlich definieren, welche der 4 Spektren einer Farbe Sie als Reinfarbspektrum ablegen wollen. Verzeichnen Sie unter **Discard** jene Spektren, die eine Verschiebung nach links bzw. rechts aufweisen; die Höhe der Amplitude ist hingegen nicht signifikant. Bestätigen Sie dann mit **OK**.

10. Wiederholen Sie die Schritte 7-9 für die verbleibenden Farben.

11. Sind alle Farbspektren extrahiert, so verlassen Sie bitte die Software damit die neue Kalibrierung aktiv wird.

Die vorhandenen Reinfarbspektren können jederzeit im **Instrument-Menü** unter der Option **Calibrate** mit Hilfe des Befehls **Edit Pure Spectra** angeschaut und editiert werden (s. Abb. 52). Farben können aus dieser Sammlung entfernt werden, indem sie in die „Discard“-Box gebracht werden. Jedoch müssen sie dann - falls wieder benötigt - komplett neu (s.o.) erstellt werden.

Abb. 52: Editor zum Bearbeiten der Reinfarbspektren (Graph: Normalisierte Fluoreszenz über der Wellenlänge)



8. Verunreinigter Block

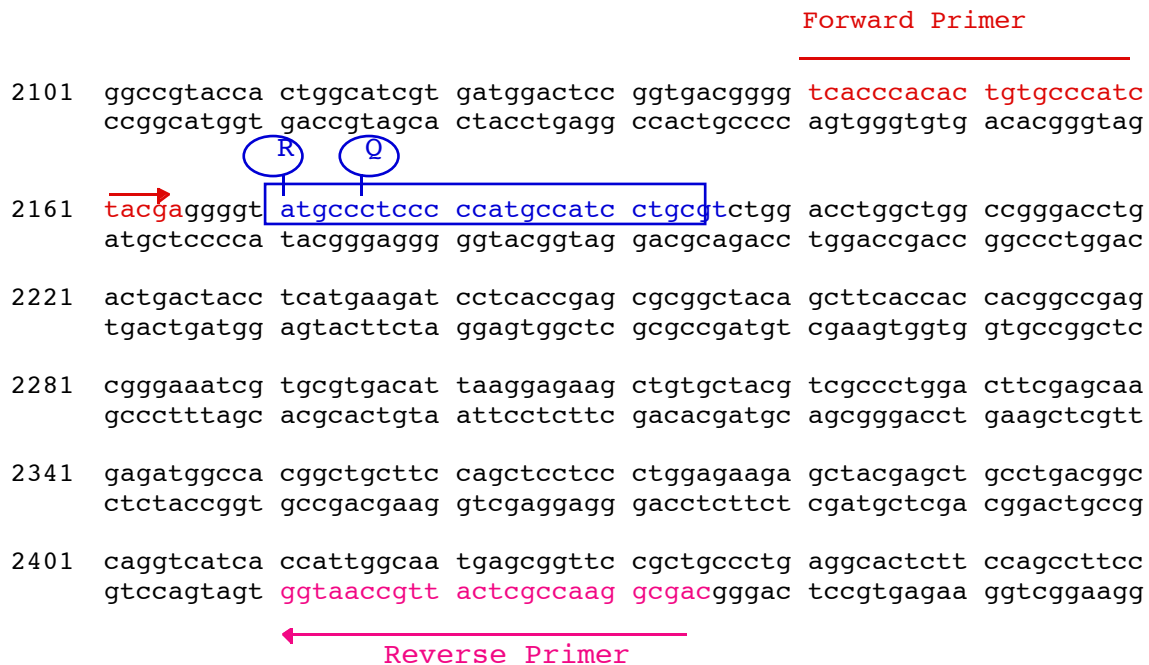
Betroffene Positionen weisen reproduzierbar falsche Ergebnisse aus, wie z.B. positiv, obwohl nachweislich keine Amplifikation stattgefunden hat und kein ROX-Problem vorliegt. Neben der Reinigung mit Alkohol (s. Kapitel 5.5), kann es erforderlich sein den Block auszubauen und komplett mit einer 10 %igen Bleichlösung zu reinigen. Verständigen Sie hierzu den Service!

6. Quantitative β -Actin TaqMan™ PCR

Im Folgenden soll der Ablauf einer quantitativen TaqMan™ On-Line PCR-Analyse exemplarisch am Beispiel der β -Actin-Kontrolle des TaqMan™ PCR Reagenzien Kits (Best.# N808-0230) dargestellt werden. Der Kit enthält die benötigten Reagenzien für 200 Reaktionen, inklusive der Primer, Sonde und des Templates für 100 β -Actin Kontrollreaktionen.

Mit Hilfe der Kontroll-Primer und der Sonde wird der Bereich zwischen den Nukleotiden 2141 und 2435 auf Exon 3 des humanen β -Actin-Gens (17, 18) nachgewiesen (s. Abb. 53).

Abb. 53: Positionen der Primer und der Sonde im β -Actin-Amplicon (NAKAJIMA-IIJIMA et al. 1985)



Zur Erstellung der Standardkurve werden 5 unterschiedliche Verdünnungen von β -Actin DNA eingesetzt (s. Tab. 24). Ein Nanogramm humane DNA enthält etwa 333 Kopien des β -Actin Gens. Die Standards sowie die Ohne-Template Kontrolle sollen in jeweils 4 Wiederholungen pipettiert werden. Von den beiden unbekannteren Verdünnungen, die dagegen quantifiziert werden sollen, werden hingegen jeweils 36 Wiederholungen pipettiert.

Tab. 24: Pipettierschema für die Standard- bzw. Proben-DNA

Reaktionsgefäß	Konzentration [ng/ μ l]	Master-Mix [μ l]	Template [μ l]	# PCR Rxns [50 μ l/Rxn]	Kopienzahl pro Rxn
No Template	-	225	25 (H ₂ O)	4	0
DNA	0,6	225	25	4	1.000
Template 1					
DNA	1,2	225	25	4	2.000
Template 2					
DNA	3,0	225	25	4	5.000
Template 3					
DNA	6,0	225	25	4	10.000
Template 4					
DNA	12,0	225	25	4	20.000
Template 5					
Unknown 1	?	1.800	200	36	?
Unknown 2 (1:1)	?/2	1.800	200	36	?/2

Der Master-Mix für die obigen Reaktionen wird aus dem TaqMan™ PCR Reagent Kit wie folgt pipettiert:

Tab. 25: Pipettierschema für den Master-Mix (96 Reaktionen)

Reaktionskomponente	Pro Reaktion [μ l]	115 Reaktionen [μ l]	Endkonzentration (in 50 μ l)
10x PCR Puffer A	5	575	1x
25 mM MgCl ₂	7	805	3,5 mM
β -Actin Forward Primer	5	575	300 nM
β -Actin Reverse Primer	5	575	300 nM
β -Actin Sonde	5	575	200 nM
dATP	1	115	200 μ M
dCTP	1	115	200 μ M
dGTP	1	115	200 μ M
dUTP	1	115	400 nM
DI-Wasser	13,25	1523,75	-
AmpErase™ UNG*) 1 U/ μ l	0,5	57,5	0,01 U/ μ l
AmpliTaq Gold 5 U/ μ l	0,25	28,75	0,025 U/ μ l
Gesamt	45	5175	

*) Soll auf einen Carryover-Schutz verzichtet werden, das entsprechende Volumen DI-Wasser hinzugeben.

Das Pipettierschema der 96-Well Plate entspricht dem in Abb. 54 gezeigtem.

Abb. 54: Pipettierschem für die quantitative β -Actin PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC A1	NTC A2	NTC A3	NTC A4	STND A5	STND A6	STND A7	STND A8	STND A9	STND A10	STND A11	STND A12
					1.0e+03	1.0e+03	1.0e+03	1.0e+03	2.0e+03	2.0e+03	2.0e+03	2.0e+03
B	STND B1	STND B2	STND B3	STND B4	STND B5	STND B6	STND B7	STND B8	STND B9	STND B10	STND B11	STND B12
	5.0e+03	5.0e+03	5.0e+03	5.0e+03	1.0e+04	1.0e+04	1.0e+04	1.0e+04	2.0e+04	2.0e+04	2.0e+04	2.0e+04
C	UNKN C1	UNKN C2	UNKN C3	UNKN C4	UNKN C5	UNKN C6	UNKN C7	UNKN C8	UNKN C9	UNKN C10	UNKN C11	UNKN C12
	1.0e+04	8.7e+03	1.2e+04	1.0e+04	1.1e+04	1.1e+04	1.0e+04	1.1e+04	9.9e+03	9.1e+03	8.7e+03	1.0e+04
D	UNKN D1	UNKN D2	UNKN D3	UNKN D4	UNKN D5	UNKN D6	UNKN D7	UNKN D8	UNKN D9	UNKN D10	UNKN D11	UNKN D12
	9.8e+03	1.1e+04	1.0e+04	1.2e+04	1.1e+04	8.8e+03	9.6e+03	1.1e+04	9.7e+03	9.4e+03	9.4e+03	9.4e+03
E	UNKN E1	UNKN E2	UNKN E3	UNKN E4	UNKN E5	UNKN E6	UNKN E7	UNKN E8	UNKN E9	UNKN E10	UNKN E11	UNKN E12
	1.2e+04	1.0e+04	1.1e+04	1.0e+04	1.1e+04	1.1e+04	9.0e+03	9.9e+03	1.0e+04	7.6e+03	9.2e+03	1.0e+04
F	UNKN F1	UNKN F2	UNKN F3	UNKN F4	UNKN F5	UNKN F6	UNKN F7	UNKN F8	UNKN F9	UNKN F10	UNKN F11	UNKN F12
	5.1e+03	5.4e+03	4.4e+03	4.8e+03	5.3e+03	5.2e+03	4.1e+03	5.1e+03	4.7e+03	5.1e+03	5.1e+03	4.7e+03
G	UNKN G1	UNKN G2	UNKN G3	UNKN G4	UNKN G5	UNKN G6	UNKN G7	UNKN G8	UNKN G9	UNKN G10	UNKN G11	UNKN G12
	5.1e+03	4.6e+03	5.2e+03	5.6e+03	5.0e+03	5.3e+03	4.5e+03	4.8e+03	4.9e+03	4.5e+03	4.7e+03	5.0e+03
H	UNKN H1	UNKN H2	UNKN H3	UNKN H4	UNKN H5	UNKN H6	UNKN H7	UNKN H8	UNKN H9	UNKN H10	UNKN H11	UNKN H12
	5.2e+03	4.1e+03	4.7e+03	4.8e+03	4.3e+03	4.7e+03	3.9e+03	4.9e+03	4.6e+03	4.7e+03	4.7e+03	3.8e+03

Das untenstehende Programm für die Quantitative PCR in den integrierten Thermocycler des 7700 SDS eingeben:

	HOLD	HOLD	CYCLE (40 Zyklen)		HOLD
Temperatur [°C]	50.0	95.0	95.0	60.0	25.0
Zeit [min:sec]	02:00	10:00	00:15	01:00	∞

Der 7700 SDS ermöglicht es einen Zweifachunterschied der Startkopienzahl nachzuweisen. Um eine 1:1 - Verdünnung wie im Experiment durchgeführt - mit einer Sicherheit von 99,7 % zu unterscheiden, wenn die folgende Gleichung erfüllt wird:

$$[U_2] - 3\sigma [U_2] > [U_1] + 3\sigma [U_1]$$

$[U_1]$ = durchschnittliche Startkopienzahl von UNKN1

$[U_2]$ = durchschnittliche Startkopienzahl von UNKN2 (1:1 Verdünnung von UNKN1)

σ = Standardabweichung der Startkopienzahl, auf 2 Kommastellen genau berechnet

Die Angaben zur Berechnung dieser Gleichung für das Experiment können dem Experiment Report entnommen werden.

7. Literatur

1. Saiki, R.K. et al. (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
2. Southern, E.M. (1975), *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
3. Spector, S.A. et al. (1984), *J. Infect. Dis.* **150**, 121-126.
4. Saiki, R. K., et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6230-6234.
5. Holland, P.M. et al. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7276-7280.
6. Lee, L.G. et al. (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl. Acids. Res.* **21**, 3761-3766.
7. Förster, V. Th. (1948): Zwischenmolekulare Energie-Wanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics (Leipzig)* **2**, 55-75.
8. Livak, K. et al. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Meth. and Applic.* **4**, 357-362.
9. Livak, K. J. Marmaro und J.A. Todd (1995): Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genetics* **9**, 341-342.
10. Rychlik, W. et al. (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6409-6412.
11. Longo, N. et al. (1990): Use of Uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**, 125-128.
12. Gelfand, D.H. (1989), *Current Communications in Molecular Biology: Polymerase Chain Reaction* (Hrsg. Erlich H.A., Gibbs R. Kazazian H.H.) CSHL; Cold Spring Harbor, NY, 11-17.
13. Rolfs et al. (1992), *PCR: Clinical Diagnostic and Research*. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
14. Ferre, F. (1992): Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus Myth. *PCR Methods and Applications* **2**, 1-9.
15. Collins et al. (1995), *Anal. Biochem.* **226**, 120-129.
16. Lyamichev, V. et al. (1993): Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* **260**, 778-783.
17. du Breuil, R.M. et al. (1993): Quantitation of β -actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR. *PCR Meth. and Applic.* **3**, 57-59.
18. Nakajima-Iijima, S. et al. (1985): Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6133-6137.
19. Beyer, W.H., ed. *CRC Standard Mathematical Tables*. 27th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1984.