

Taqman-Sonden



J. Arnemann
Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln,
Deutschland

Synonym(e) fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonde

Englischer Begriff Taqman probes

Definition Der Einsatz von Taqman-Sonden in einem PCR-Experiment (s. ► **PCR (Polymerase-Kettenreaktion)**) ermöglicht nicht nur eine Verfolgung der Fluoreszenzsignale der einzelnen PCR-Zyklen in Echtzeit (als Realtime-PCR), sondern auch eine sichere Quantifizierung der resultierenden PCR-Produkte.

Beschreibung Taqman-Sonden sind eine definierte Form von fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden, die in einem PCR-Experiment eingesetzt werden. Kern dieser Sonden ist ein Oligonukleotid mit Sequenzhomologie zu dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt, d. h. mit optimal 1–2 Basen Abstand zu den eigentlichen PCR-Primern, und einer Schmelztemperatur (T_m), die oberhalb der Werte der PCR-Primer liegen sollte. Dieses Oligonukleotid enthält weiterhin an seinem 5'-Ende ein Donorfluorochrom, auch Reporter genannt, sowie am 3'-Ende ein Akzeptorfluorochrom, bei Taqman-Sonden auch „dark quencher“ genannt. Der Wirkung der Taqman-Sonde liegt das Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) zugrunde, das besagt, dass ein durch

Lichtenergie angeregtes Donorfluorochrom einen Teil seiner Energie an ein in begrenzter Nähe befindliches Akzeptorfluorochrom abgibt. Bei der Taqman-Sonde handelt es sich beim Akzeptor um einen sog. „dark“ oder Black-Hole-Quencher, der die Anregungsenergie des Donors absorbiert und als Hitze abgibt und nicht, wie sonst bei Akzeptormolekülen üblich, die Anregungsenergie in Form von Licht abgibt. Vergrößert sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, wird der Quencher-Effekt reduziert und die Akzeptorenergie wird als Fluoreszenzlicht freigesetzt.

Bei der PCR-Reaktion kommt es zu einem Annealing der PCR-Primer sowie der Taqman-Sonde an die reziproke Sequenz des DNA-Fragments. Bei der Synthese des neuen Strangs hat die DNA-Polymerase eine zusätzliche 5'-3'-Exonukleaseaktivität, mit der sie die gebundene Taqman-Sonde vom 5'-Ende her abbaut. Durch diesen Abbauprozess werden Reporter und „dark quencher“ voneinander räumlich getrennt, sodass das Reportermolekül seine Energie als Fluoreszenzlicht emittieren und so detektiert werden kann. Eine Zunahme des Fluoreszenzsignals ist somit direkt proportional zur Synthese der PCR-Produkte und erlaubt damit auch eine genaue Quantifizierung.

Literatur

- Applied Biosystems StepOne Real-time-PCR systems; Part Number 4379704 TM Rev E; 06/2010
Kessler Y et al (2009) Quantitative TaqMan[®] real-time PCR assays for gene expression normalisation in feline tissues. *BMC Mol Biol* 10:106–120