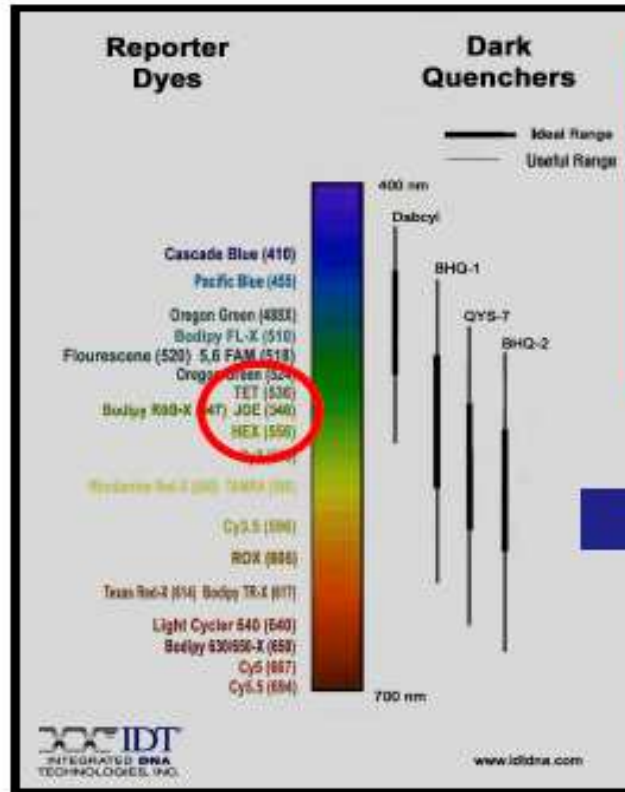


Reporter-Quencher



Dye	Quencher
5,6 FAM	BHQ-1/TAMRA
HEX/JOE	BHQ-2
Texas Red/ROX	BHQ-2
Cy5/Quasar670	BHQ-2 (or-3)

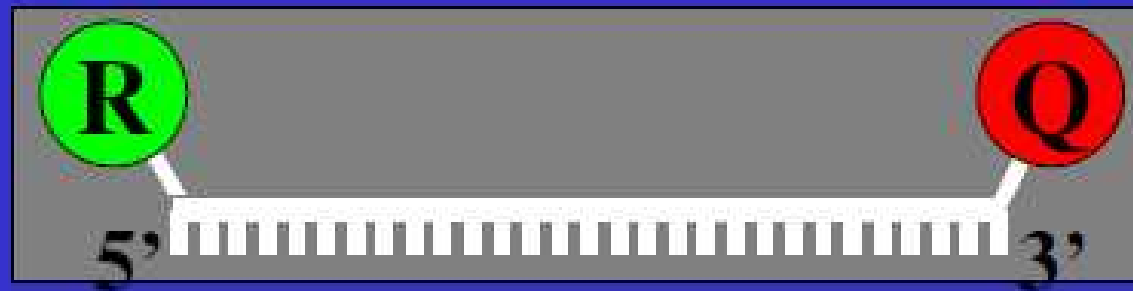
6-carbossifluoresceina

6-carbossitetrametilrodamina

Reporter-Quencher

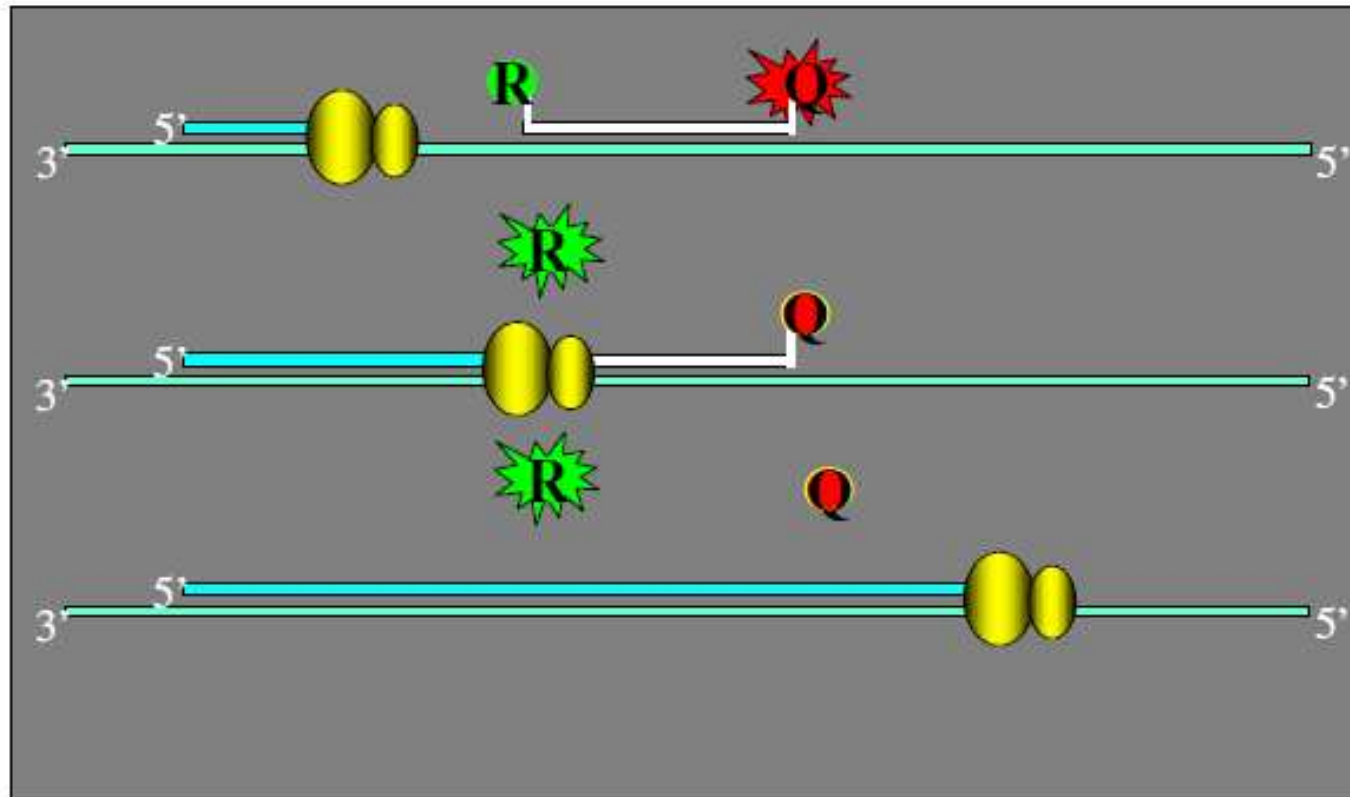
5' REPORTER (R): fluorocromo ad **alta** energia che emette fluorescenza

3' QUENCHER (Q): fluorocromo a **bassa** energia che spegne la fluorescenza del reporter



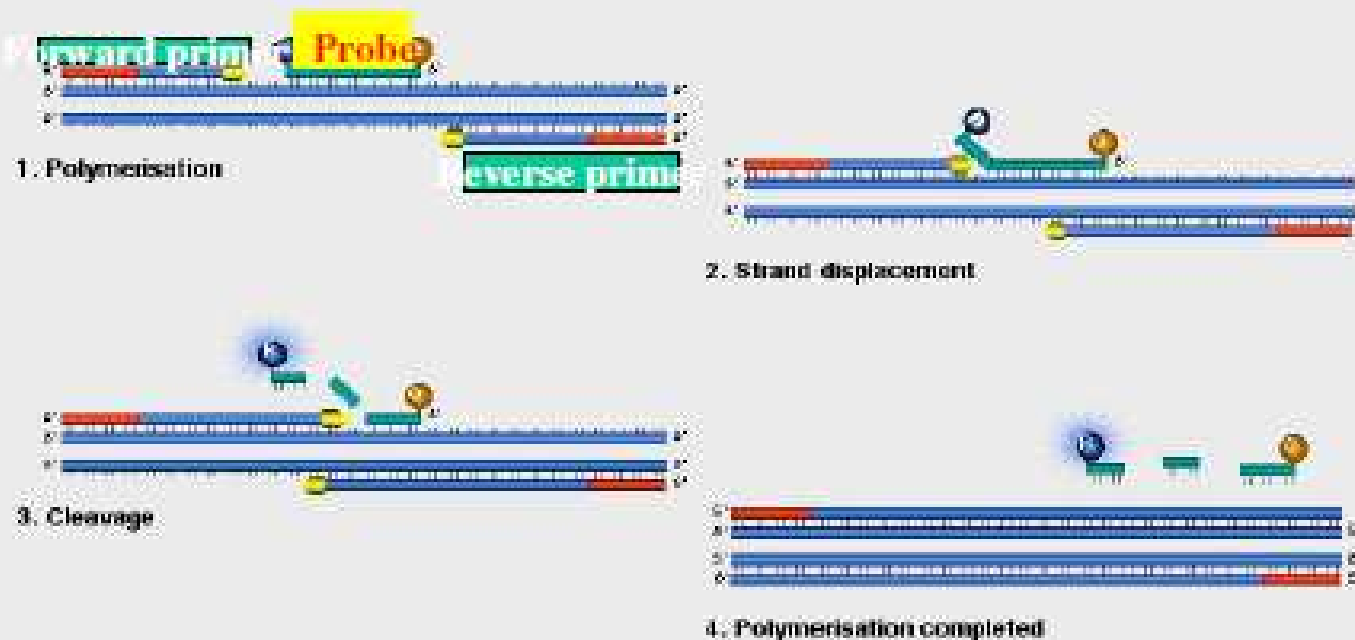
Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q

**Real-Time PCR:
attività 5'>3' esonucleasica**



L'aumento di fluorescenza del Reporter è direttamente proporzionale al numero di ampliconi generati

Fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan[®] chemistry)



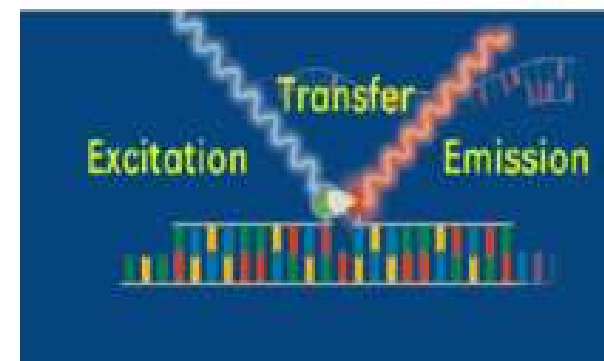
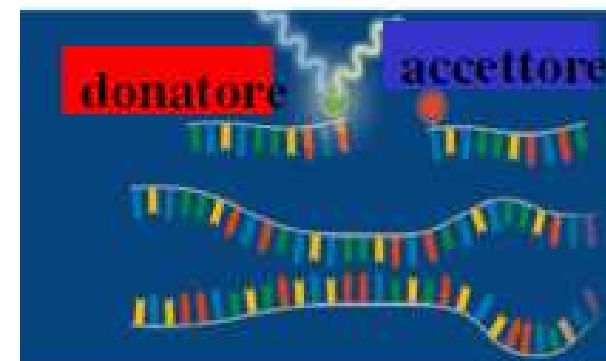
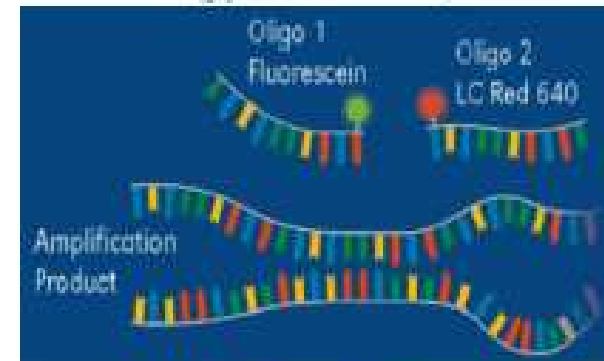
R = Reporter
Q = Quencher

Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Simili alle sonde TaqMan perché si legano al DNA bersaglio e vengono idrolizzate, ci sono però **due sonde** ognuna marcata con un solo fluorocromo (accettore e donatore)

Quando le sonde non sono legate alle sequenze target il segnale fluorescente proveniente dall'accettore non è rilevato

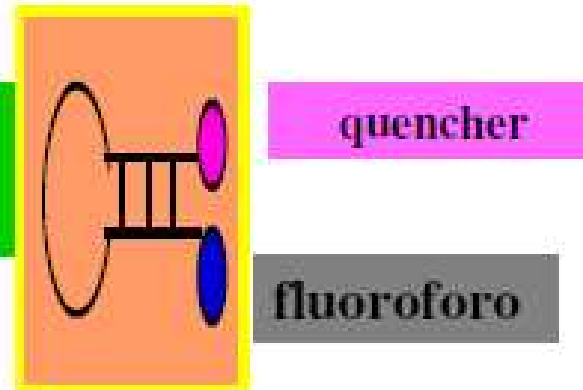
Durante lo step di annealing PCR, entrambe le sonde FRET ibridizzano alle sequenze target: ciò avvicina il fluoroforo donatore all'accettore permettendo il trasferimento di energia tra i due fluorofori e la produzione di un segnale fluorescente da parte dell'accettore che viene rilevato



Molecular Beacons

I "molecular beacons" contengono un fluoroforo e un quencher non fluorescente alle estremità opposte di un oligonucleotide, che sono disegnate in modo da essere complementari tra loro formando una struttura stem-loop

La vicinanza del quencher al reporter fluorescente impedisce l'emissione di fluorescenza

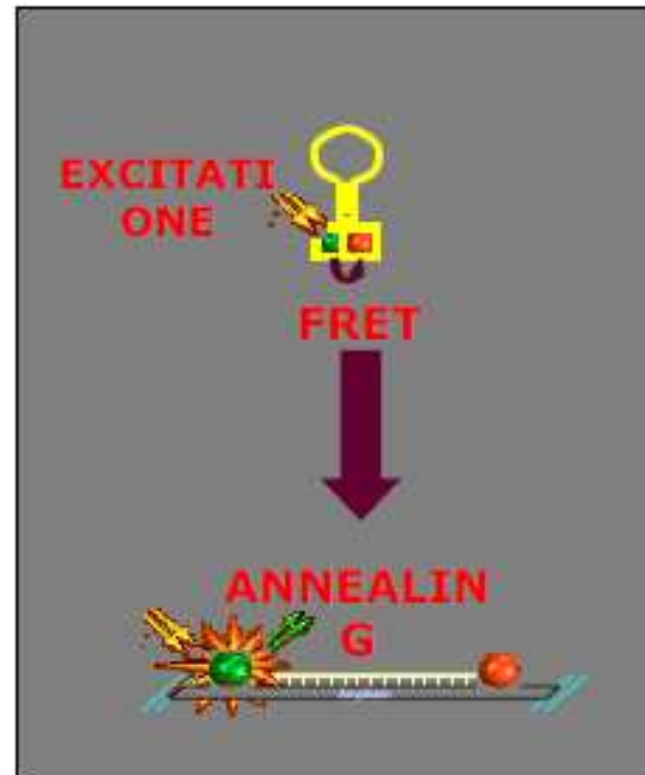


Il loop è complementare ad una sequenza all'interno del prodotto amplificato

Molecular Beacons

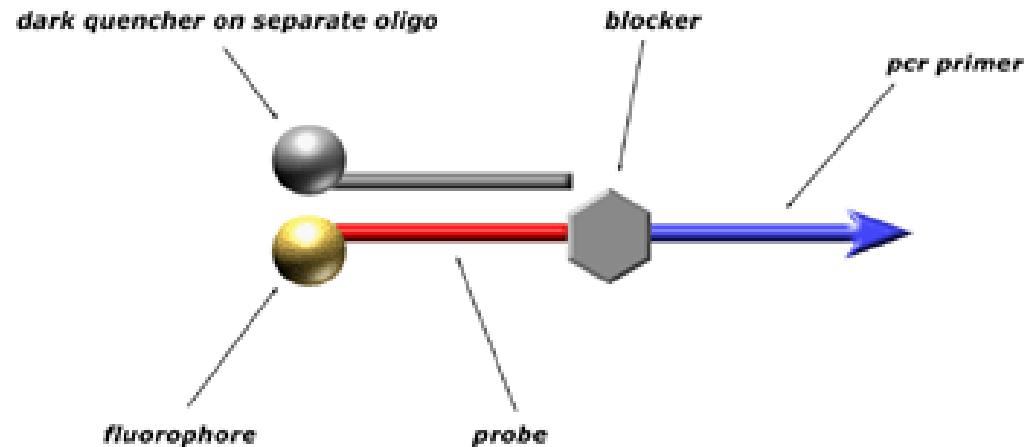
Durante lo step di annealing PCR, la sonda ibridizza con la sua sequenza target: ciò separa il colorante fluorescente dal reporter, producendo un segnale fluorescente

La quantità di fluorescenza prodotta ad ogni ciclo, o dopo la PCR, dipende dalla quantità di prodotto specifico in quel dato momento



A differenza delle sonde TaqMan, le molecular beacons non vengono distrutte durante la reazione di amplificazione per cui possono reibridizzarsi durante il successivo ciclo

Elements of a Scorpions primer



Scorpions are bi-functional molecules containing a PCR primer element covalently linked to a probe element. The molecules also contain a fluorophore that can interact with a quencher to reduce fluorescence. When the molecules are used in a PCR reaction the fluorophore and the quencher are separated which leads to an increase in light output from the reaction tube.

The Scorpions reaction

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



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



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

