



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00236**

(22) Data de depozit: **10/05/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2022 BOPI nr. **12/2022**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **NIȚU FLORENTIN ROMEO, STR.LUPENI,
NR.4, BL.M13, AP.7, PLOIEȘTI, PH, RO;**
• **IONIȚĂ MARIANA, ȘOS.VIRTUȚII NR.6,
BLR12, SC.1, ET.8, AP.33, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **SENZOR PE BAZĂ DE OXID DE GRAFENĂ ȘI METODĂ
PENTRU DETECȚIA SECVENȚELOR SCURTE DE ACIZI
NUCLEICI ÎN MEDIU DE CULTURI CELULARE
SUPLIMENTAT CU LIZAT PLACHETAR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui senzor pe bază de material grafenic utilizat într-o metodă optică pentru detecția secvențelor scurte de acizi nucleici. Procedeu, conform invenției, constă în funcționalizarea oxidului de grafenă (GO) cu un surfactant anionic de tip dodecil sulfat de sodiu (SDS) pentru menținerea dispersabilității GO în prezență de proteine și săruri, respectiv, menținerea proteinelor solubile la temperatura de 42°C și acid etilendiaminotetraacetic

(EDTA), după care se prepară o soluție stoc diluată de 100 μg/ml GO conținând 0,1 mg/ml SDS și 0,1 mg/ml albumină serică bovină (BSA), pentru monitorizarea fluorescenței, utilizată pentru detecția în timp real a acidului nucleic țintă în medii fiziologice complexe.

Revendicări: 1

Figuri: 3



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2021 00286
11-05-2021	
Data depozit	

33

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la un senzor pe bază de material grafenic modificat necovalent și la o metodă pentru detectia și analiza omogenă în medii fiziologice complexe, fără marcarea prealabilă a secvențelor scurte de acid nucleic. Se utilizează oxidul de grafenă (GO) pentru stingerea fluorescenței, un detergent anionic (dodecil sulfat de sodium-SDS) și o proteină (albumină serică bovină-BSA) pentru menținerea dispersibilității GO în medii complexe (medii de culturi celulare) și sonde acid dezoxiribonucleic (ADN) oligonucleotidice marcate cu un singur fluorofor (US6635427B2) a căror emisie de fluorescență se stinge ca răspuns la hibridizarea celor două catene de acizi nucleici, datorită transferului de electroni fotoindus dintre fluorofor și bazele azotate, în special guanina, din catena acidului nucleic țintă. Răspunsul senzorului este liniar pe domeniul 1 nM – 8 nM, cu limita de cuantificare (LOQ) 1 nM ADN complementar.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în evitarea agregării oxidului de grafenă (GO) în medii fiziologice complexe, prin folosirea surfactanților, oxidul de grafenă funcționând ca un quencher (capacitatea de a stinge fluorescența), ducând la stingerea fluorescenței oligo fluorescein phosphoramidite (FAM)-DNA în exces sau nehibridizat. Detectia oligo ADN țintă se bazează pe quenching-ul specific datorită transferului de electroni fotoindus, dintre fluoroforul situat pe una dintre catenene ADN și bazele azotate din catena complementară (în special guanina).

Hibridizarea sondelor de acid nucleic marcate cu un colorant fluorescent este o metodă utilizată pe scară largă pentru detectarea, analiza și determinarea concentrației secvențelor de acid nucleic. Tehnicile obișnuite includ hibridizarea „Southern blot”, „dot blot”, testele de „gel-shift”, analizele omogene în soluție care sunt adesea cuplate cu reacția în lanț a polimerazei (PCR). Au fost raportate mai multe metode de detecție a acizilor nucleici bazate pe probe fluorescente:

i. metoda care folosește FRET (Transfer de energie prin rezonanță în fluorescență), Mergny și colab., care constă în hibridizarea a două sonde de acid nucleic la un acid nucleic țintă. Aceste două sonde de acid nucleic sunt marcate cu coloranți fluorescenți. Colorantul fluorescent al uneia dintre cele două sonde poate transfera energie către colorantul fluorescent al celeilalte sonde, astfel încât al doilea colorant fluorescent va emite fluorescență. Aceste două sonde sunt proiectate astfel încât, când acestea hibridizează cu acidul nucleic țintă, coloranții lor fluorescenți

sa fie situați separat unul de celălalt prin 1 până la 9 baze. Când aceste două sonde de acid nucleic se hibridizează cu acidul nucleic țintă, are loc emisia de fluorescență a celui de-al doilea colorant fluorescent. Intensitatea acestei emisii de fluorescență este proporțională cu numărul de copii ale acidului nucleic țintă.

ii. metoda balizelor fluorescente moleculare (Molecular Beacon): Tyagi și colab. O sondă de acid nucleic este marcată la un capăt al acestuia cu un colorant fluorescent donor și la un capăt opus al acestuia cu un colorant acceptor. Deoarece ambele secvențe finale ale sondei sunt complementare între ele, secvența de nucleotide a sondei este proiectată să formeze o buclă de ac de păr. Datorită acestei structuri, emisia colorantului fluorescent donor este suprimată de colorantul acceptor datorita energiei de rezonanță Förster, molecula fiind într-un lichid. Când sonda hibridizează cu un acid nucleic țintă, structura buclei acului de păr este linearizată. Acest lucru duce la o creștere a distanței dintre compusul fluorescent donor și colorantul acceptor, astfel încât transferul de energie rezonantă Förster nu mai are loc. Aceasta permite colorantului fluorescent să producă emisie de fluorescență.

În cazul testelor omogene, metodele de detectare sunt cuplate cu procesele de amplificare, realizându-se amplificarea și analiza într-un flux continuu, eliminând sau minimizând necesitatea de a transfera probe între cele două procese. Un element cheie care face ca testele omogene să funcționeze este un semnal generat de hibridizarea sondă-țintă care poate fi detectat fără a fi necesară îndepartarea sondei libere (patent US6635427B2, patent US20010000148A1).

Au fost raportate mai multe patente referitoare la utilizarea capacității de a stinge fluorescența a GO și la probe oligo DNA fluorescente pentru detecția oligo DNA sau miRNA (micro RNA). Stingerea fluorescenței este datorată transferului de energie de rezonanță în fluorescență sau transferului de energie de rezonanță Förster. În cele mai multe metode, probele oligo DNA fluorescente sunt stinse (quenched) de GO în absența oligo DNA complementar țintă (KR20190086259A, KR20180017566 (A), US2016138096 (A1), US2015080251 (A1), CN102643916 (A), KR20150028514A).

Metodele de determinare ale ADN pot fi efectuate heterogen sau omogen. Cele heterogene sunt alcătuite din mai multe etape, cum ar fi imobilizarea ADN-ului țintă pe microparticule sau suprafețe, adăugarea în exces a probelor fluorescente complementare, hibridizarea, îndepartarea probei nehibridizate și apoi detecția probei care rămâne legată de ținta imobilizată. Adesea, proba țintă este marcată fluorescent. Probele nehibridizate fluorescente sau ADN țintă, dacă este

marcat fluorescent, trebuie să fie îndepărtate prin spălare extensivă și reprezintă timpul cel mai mare consumat în metodă. Folosirea suprafețelor solide cresc timpul de hibridizare, prin comparație cu hibridizarea în soluție, datorită mobilității reduse a catenelor ADN adsorbite pe suprafețe, dar și datorită accesului redus la catena complementară. Un avantaj al metodelor bazate pe adsorbția pe suprafețe este acela că se pot identifica simultan mai multe secvențe de ADN diferite.

Metodele omogene sunt efectuate în soluție și nu sunt necesare alte etape de separare pentru a îndepărta proba nehibridizată. Detecția specifică a hibridului ADN-probă/ADN-țintă se face prin folosirea unei probe marcată fluorescent, la care fluorescența este afectată de un quencher. Se pot utiliza metode omogene "turn on" în care, după hibridizarea ADN monocatenar (ținta cu proba ADN complementară monocatenară adsorbită pe GO), ADN-ul dublucatenar format se disociază de GO, iar fluorescența este restabilită sau metode "turn off" (de stingere a fluorescenței), în care fluorescența scade datorită stingerii fluorescenței ADN-ului probă de către GO.

In acest brevet, utilizăm o metodă omogenă, fără marcarea prealabilă a ADN ținta și o detecție "turn off", cu două etape de stingere a fluorescenței.

Prima etapă constă în stingerea specifică a fluorescenței (quenching) în soluție, datorită transferului de electroni fotoindus (PET), dintre fluorofor și guanina de pe catena ADN complementară, după hibridizare. A doua etapă constă în stingerea fluorescenței FAM-DNA monocatenar nehibridizat datorată adsorbției pe oxidul de grafenă (FRET).

Brevetele identificate până acum pentru detecția oligo DNA folosind GO ca un quencher, utilizează detecția "turn on": (#1) KR20190086259A, (#2) KR20180017566 (A), (#3) US2016138096 (A1), (#4) US2015080251 (A1), (#5) CN102703594 (A), (#6) CN102643916 (A), (#7) KR20150028514A. Probele constau în oligonucleotide marcate fluorescent, a căror fluorescență este stinsă de GO în absența ADN țintă complementară. După hibridizarea cu ADN țintă, ADN-ul dublucatenar se detașează de GO, iar fluorescența este restabilită.

In brevetul #1, se extrage miRNA din celule canceroase pulmonare, fiind o metodă heterogenă.

In brevetul #2, se folosește GO PEGylat (GO modificat covalent prin atasarea de polietilen glycol) și acid nucleic peptidic (PNA, nucleotide atașate prin legături amidice/peptidice) ca probă de aptamer marcată fluorescent. La fel și in brevetul #3 se folosește PNA ca probă de aptamer marcată fluorescent. Brevetul #4 este similar cu brevetul #3 și folosește o metodă "turn on" și PNA.

Brevetul #5 folosește o tehnologie de amplificare a acidului nucleic la temperatură constantă, o probă DNA specifică, împachetată (în “ac de par”), un primer de amplificare corespunzător secvenței țintă de miRNA și o enzimă de amplificare cu proprietăți de disociere a catenei ADN nou sintetizate. Brevetul #6 folosește o probă ADN marcat fluorescent și GO pentru stingerea fluorescenței, într-o metodă “turn on” a detecției oligo ADN. Brevetul #7 folosește o probă PNA marcată fluorescent pentru detecția RNA. Este o metodă “turn on”. Tot în cadrul acestui brevet este descrisă și o metodă pentru măsurarea activității ARN polimerazei

Materialele grafenice sunt monostraturi constituite din atomi de carbon hibridizați sp^2 care includ următoarele specii: grafenă (G), oxid de grafenă (GO) și oxid de grafenă redus (rGO). Dispersibilitatea grafenei și a derivaților săi în medii apoase este aproape invers proporțională cu conținutul de oxigen. Ca un simplu ghid, dispersibilitatea urmărește tendința $GO > rGO > G$. Prezența unor ioni precum Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} sau surfactanți cationici în cazul GO, facilitează agregarea straturilor grafenice. Funcționalizarea chimică a acestor materiale poate îmbunătăți dispersibilitatea, dar poate, de asemenea, să crească defectele acestora și să aibă un impact negativ asupra proprietăților precum conductivitatea electrică și termică sau rezistența mecanică. Modificarea ne-covalentă, respectiv utilizarea surfactanților, oferă o abordare complementară pentru dispersia materialelor grafenice. Pe de altă parte, folosirea surfactanților oferă posibilitatea de a modula selectivitatea de legare a aptamerilor la GO. Peterson et al., a arătat că aptamerii ADN sunt compatibili cu surfactanții și au găsit că surfactanții neutri și anionici au un impact minor asupra abilității aptamerilor de a se plia și de a lega molecule țintă hidrofobe. Aceiași autori demonstrează că surfactanții pot fi folosiți pentru a modula preferința de legare de substrat a aptamerilor, cel mai probabil datorită sechestrării în micellele de detergent a moleculelor hidrofobe țintă (Peterson et al., 2015).

Selectivitatea de legare a substratului este esențială pentru multe aplicații de legare a aptamerilor. Un alt aspect este selectivitatea de legare a ADN dublu catenar la GO în prezența surfactanților neionici. Lei et al. a arătat că surfactantul neionic Triton X-100 poate bloca formarea complexelor ADN dublu catenar – GO, astfel încât crește fracția ADN-ului dublu catenar ce rămâne în soluție, ADN-ul monocatenar rămânând adsorbit pe suprafața GO (aspect important în proiectarea metodelor de detecție).

Solubilitatea și stabilitatea GO în soluții fiziologice.

Stabilitatea suspensiilor oxidului de grafenă (capacitatea GO de a rămâne dispersată) în soluție depinde de interacțiunea dintre funcționalitățile lor chimice de suprafață și compoziția chimică a mediului de suspendare. Această problemă este critică în mediile fiziologice în care sărurile, ionii și biomoleculele pot interacționa cu GO, ducând la floclularea sau agregarea nanopanelor de GO. De exemplu, deși GO este cunoscut a fi stabil în apă, atunci când este transferat în medii de cultură celulară sau soluții tampon, acesta suferă frecvent o agregare (Bao și colab., 2011, Ren și colab., 2012, Feng și colab., 2011, Liu et al., 2008, Yang și colab., 2013). Toate tipurile de materiale grafenice pot interacționa cu componente ale mediilor fiziologice. Aceste interacțiuni ar putea modifica dimensiunea, forma sau chimia suprafeței oxidului de grafenă (GO) (Tan și colab., 2013, Ding și colab., 2014). Două aspecte au o importanță deosebită: proprietățile GO sub forma dispersată și formarea pe suprafața GO a unei corone proteice (înveliș proteic) (McCallion și colab., 2016). GO formează dispersii stabile în apă și dimetil sulfoxid (DMSO) (Johnson și colab., 2015), dar se agregă treptat în tampon fosfat salin (PBS), NaCl și mediul Eagle modificat de Dulbecco (DMEM), care conține ioni, proteine și aminoacizi hidrofobi. PBS conține NaCl aproximativ 137 mM, pH = 7,4, NaCl 0,9% conține 154 mM NaCl, iar mediul celular DMEM conține NaCl aproximativ 109 mM, cu 10% ser fetal bovin (FBS) ce conține și albumină serică bovină), pH 7,4, la 25 ° C (Zheng et al., 2018). FBS este utilizat pentru a suplimenta mediile de cultură celulară, este un amestec de elemente care conține, printre altele, proteine, aminoacizi și săruri. Agregarea GO este observată atunci când intră în contact cu FBS și acest lucru se datorează în principal unei interacțiuni cu proteinele (Franqui și colab., 2019).

Într-un alt raport, GO agregă ușor în PBS și este complet agregat în mediu celular și ser (Wang și colab., 2011). Pe de altă parte, particulele de grafenă funcționalizate (FGS), descrise ca fiind obținute prin reducerea chimică a oxidului de grafenă, sunt stabile timp de peste un an în dodecil sulfat de sodiu cu concentrația peste 40 μM (Hsieh și colab., 2013).

Pentru a aborda aspectul menținerii dispersibilității GO în mediu de culturi celulare, suplimentat cu lizat plachetar, am folosit un detergent anionic, dodecil sulfat de sodiu (SDS), pentru a dispersa GO în prezență de proteine și săruri și, în același timp, pentru a menține proteinele solubile la temperatură ridicată (42 °C) și acid etilendiaminotetraacetic (EDTA) pentru a complexa/chelata ionii divalenți. Pentru obținerea soluției stoc de 100 μg/mL GO, s-a folosit albumina serică bovină 0.1 mg/mL concentrație finală și SDS 0.1% concentrație finală.

Se prezintă în continuare un exemplu de obținere a oxidului de grafenă modificat necovalent și metoda de detecție. Următorii compuși chimici au fost achiziționați de Sigma-Aldrich: oxid de grafenă 2 mg/mL, cat. No. 763705, clorură de magneziu, $\geq 98\%$, clorură de sodiu, $\geq 99.5\%$, sodiu dodecil sulfat de sodiu, $\geq 99\%$. S-a mai utilizat mediu de cultură „Minimum Essential Medium Eagle”, 22561021 (ThermoFisher), suplimentat cu lizat plachetar „PLTMax® Human Platelet Lysate Stem Cell Supplement” Cat. # SCM141, de la Sigma-Aldrich. Secvența model de oligo ADN este corespunzătoare unei porțiuni din secvența promotorului genei ARN polimerazei din bacteriofagul T7 (Zhou et al., 2013) și a fost marcată la capătul 3' cu 6 – fluorescein phosphoramidite (6-FAM), corespunzătoare secvenței: 5'-TTT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA TCT CCC-3'/6-FAM (FAM-DNA). Secvența ADN complementară folosită este 5'-GGG AGA TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG AAA-3' (c-DNA). Amândouă secvențele FAM-DNA și cDNA au fost achiziționate de la Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA, USA).

Conținutul de carbon al oxidului de grafenă (raportat la substanța uscată) este de 42-52%, iar conținutul de oxigen 44-54%, cu diametrul mediu de 22 μm , 90 % din particule având diametrul mediu sub 50 μm (pe baza specificațiilor producătorului, Sigma-Aldrich).

Masurătorile spectrofotometrice. Experimentele au fost efectuate utilizând un microplate reader de fluorescență Spark TECAN (Tecan Trading AG., Männedorf, Switzerland), având lățimea benzii razei de excitație de 20 nm la 485 nm și o lățime a benzii de emisie de 20 nm la 535 nm.

Oxidul de grafenă 2 mg/mL a fost redispersat prin ultrasonare timp de 10 minute, înainte de fiecare experiment, iar pH-ul a fost ajustat la pH 8.0 cu soluție tampon la o concentrație finală de 10 mM Tri-HCl. Din soluția stoc de oxid de grafenă 2 mg/mL, s-a obținut o soluție stoc diluată de 100 $\mu\text{g/mL}$ oxid de grafenă, conținând 0.1% dodecil sulfat de sodiu și 0.1 mg/mL albumina serică bovină. Celelalte soluții stoc, 40 nM FAM-DNA și 40 nM cDNA au fost preparate conținând 0.1 % albumină serică bovină și 0.1% SDS, concentrație finală, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.

FAM-DNA, 5'-TTT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA TCT CCC-3'/6-FAM și catena complementară cDNA, 5'-GGG AGA TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG AAA-3', au fost incubate în soluția tampon pentru hibridizare, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, ce conține 0.1% SDS, 0.1% BSA, 1 mM EDTA (acid etilendiaminotetraacetic) pentru 60 minute, la temperatura de 25

°C, după care s-a adăugat oxidul de grafenă, 5 µg/mL, concentrație finală și s-a continuat monitorizarea fluorescenței. Primul rând al plăcii s-a utilizat ca blank al microplăcii, având godeuri cu apă sau cu soluție tampon 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Pentru interacțiunea dintre oxidul de grafenă, (GO), proba ADN marcată fluorescent și ADN complementar țintă în medii de culturi celulare, s-a utilizat 0.1 % SDS, în soluția stoc de GO diluată și în mediul de reacție.

Se utilizează FAM-DNA, în prezență de oxid de grafenă și mediu de culturi celulare, „Minimum Essential Medium Eagle” suplimentat cu lizat plachetar, „PLTMax® Human Platelet Lysate Stem Cell Supplement” Cat. # SCM141, Sigma-Aldrich (Fig. 3). Concentrațiile utilizate: 8 nM FAM-ssDNA, 8 nM cDNA, 0.1% SDS, 1/4 diluție finală a mediului de culturi celulare (tăria ionică finală a amestecului de reacție datorită sărurilor din mediul de cultură $I \approx 40$ mM), 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 25 °C.

S-au utilizat controalele:

- FAM-DNA
- FAM-DNA și mediu de cultură celular suplimentat cu lizat plachetar.
- FAM-DNA, oxid de grafenă (GO) și mediu de cultură celular suplimentat cu lizat plachetar.
- FAM-DNA, ADN complementar (cDNA) și mediu de cultură celular suplimentat cu lizat plachetar, pentru detectia stingerii fluorescenței datorită transferului de electroni fotoindus.

Proba de analizat:

- FAM-DNA, ADN complementar (cDNA), oxid de grafenă (GO) și mediu de cultură celular (ccm) suplimentat cu lizat plachetar.

În prezența de oxid de grafenă, amestecul dintre proba ADN marcată fluorescent și catena ADN complementară, FAM-DNA + cDNA, prezintă o scădere a fluorescenței în timp, scădere care este asociată cu legarea FAM-DNA nehibridizat la GO (linia albastră, FAM-DNA+cDNA+ccm+GO), (FRET).

Semnalul fluorescent cuantificat (ΔF) este reprezentat de diferența fluorescenței dintre proba inițială și fluorescența probei cu cDNA, stingerea fluorescenței fiind:

$$\Delta F = (\text{FAM-DNA} + \text{ccm} + \text{GO}) - (\text{FAM-DNA} + \text{cDNA} + \text{ccm} + \text{GO}).$$

Stingerea fluorescenței (quenching-ul) reprezentată grafic față de concentrațiile de FAM-DNA este proporțională cu cantitatea de cDNA și arată o liniaritate bună, (Fig. 3). ADN-ul

complementar țintă (DNAc) este detectat în mediul de cultură celulară suplimentat cu lizat plachetar, detecția ADN complementar prezintă liniaritate în intervalul 1 - 8 nM, iar limita de dozare (LOQ, limit of quantitation) este de 1 nM ADN complementar. $F_0 = \text{FAM-DNA} + \text{cDNA}$, $F = \text{FAM-DNA} + \text{cDNA} + \text{GO}$.

REVENDICĂRI

Un procedeu de preparare a oxidului de grafenă, modificat necovalent cu un detergent și o proteină în vederea menținerii dispersabilității în medii de culturi celulare suplimentate cu lizat plachetar și săruri.

Dozarea în analiză omogenă, fără marcarea prealabilă, a oligo ADN monocatenar, 30 nucleotide, în mediu de cultură celular „Minimum Essential Medium Eagle” (EMEM) suplimentat cu lizat plachetar. Limita de dozare (LOQ) este de 1 nM/litru ADN complementar sau 0.1 - 0.8 pmoli/100 μ L mediu de reacție.

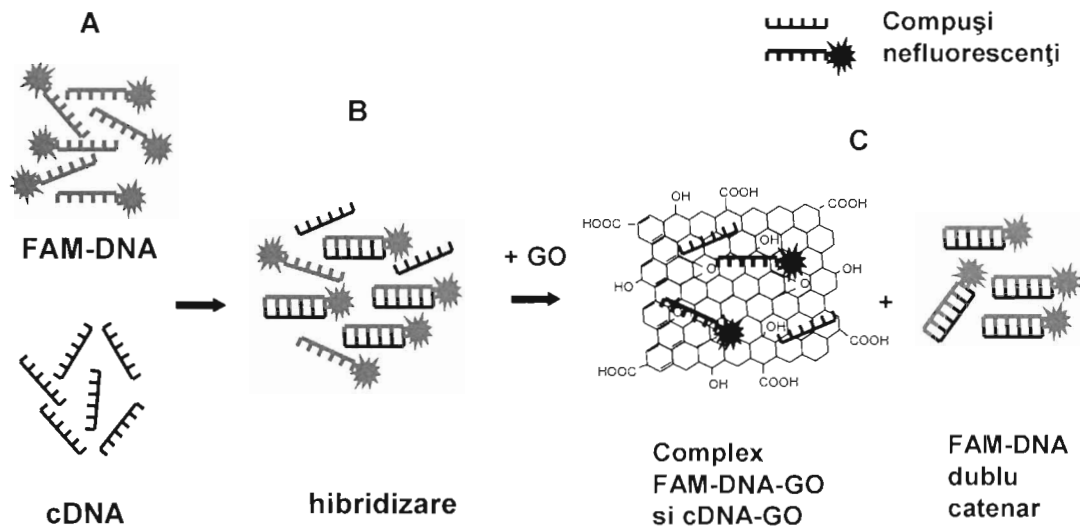


Figura 1. Schema detecției cDNA țintă. (A) Hibridizarea probei fluorescence monocatenare FAM-DNA cu proba țintă monocatenară cDNA, (B) După hibridizare, amestecul de reacție conține ADN monocatenar (FAM-ssDNA) și ADN dublucatenar (FAM-dsDNA), (C) Fluorescența ADN-ului monocatenar este stinsă de către oxidul de grafenă (GO), iar fluorescența rămasă este proporțională cu cantitatea de ADN țintă (cDNA).

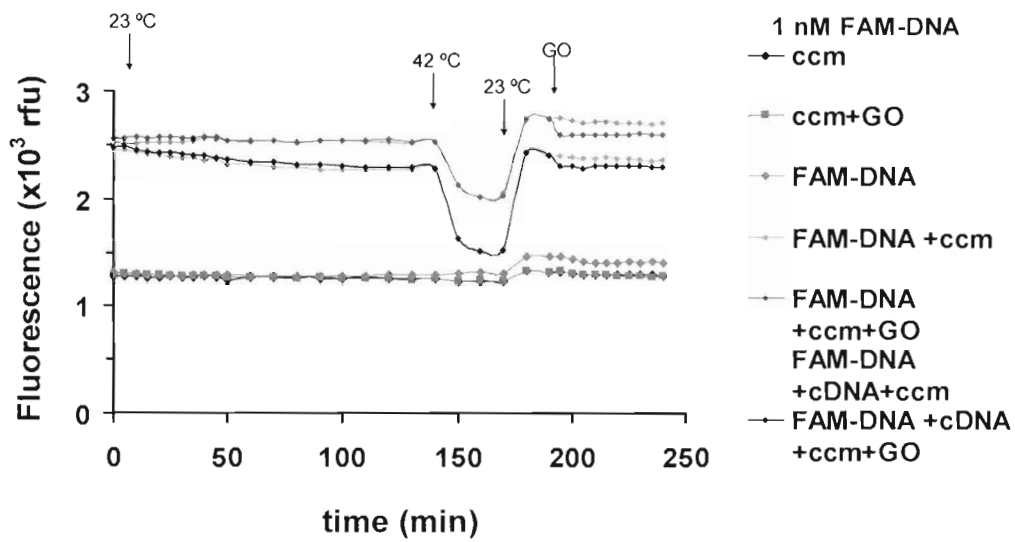


Figura 2. Detecția ADN țintă complementar (cDNA) in mediu de culturi celulare suplimentat cu lizat plachetar, prin monitorizarea scăderii fluorescenței sondei ADN, datorită stingerii specifice a fluorescenței (quenching), FAM-DNA : cDNA raport molar 1 : 1, 23 °C, 25 uL mediu de culturi celulare (ccm) (tăria ionică $\bar{I} \sim 40$ mM), 1 nM FAM-DNA (1 ng/100 uL), 5 μ g/mL GO (0.5 μ g/100 uL).

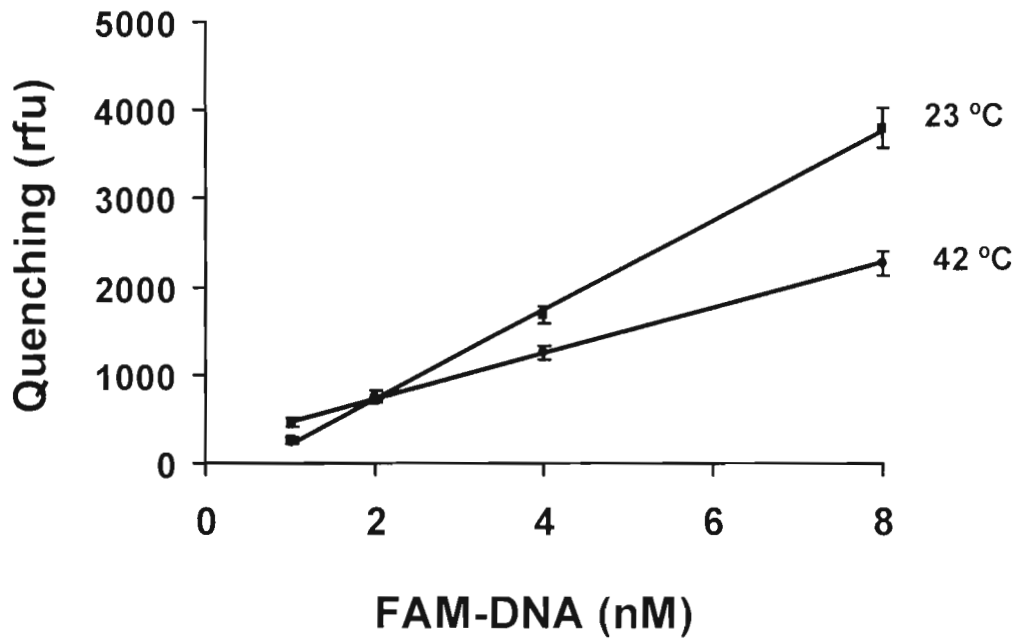


Fig. 3. Determinarea cantitativă a ADN complementar țintă în mediu de culturi celulare suplimentat cu lizat plachetar, în domeniul 1 – 8 nM/litru, FAM-DNA : cDNA raport molar 1 : 1, 23 °C vs. 42 °C. Semnalul fluorescent cuantificat este cel rămas după adăugarea GO: stingerea fluorescenței $\Delta F = (\text{FAM-DNA} + \text{ccm} + \text{GO}) - (\text{FAM-DNA} + \text{cDNA} + \text{ccm} + \text{GO})$, (PET + FRET). Barele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei a trei experimente, fiecare experiment cu probe în triplicat, r.f.u. = unități relative de fluorescență.