

Validierungsbericht — Schmelztemperatur-Berechnung

Werk: codex-vivum · **Version:** v1.0 · **Datum:** 2026-05-12 **Autor:** Thomas Schüller · ORCID 0009-0003-9799-6747 · CC BY 4.0

Dieser Bericht dokumentiert die im Papier (Abschnitt 5) beschriebene Validierung.

Anlage

Die in der Anwendung eingesetzte Berechnung wurde unverändert nach Python portiert und gegen `Bio.SeqUtils.MeltingTemp.Tm_NN` verglichen — eine unabhängige Implementierung derselben Methodik (Nearest-Neighbor-Parameter nach SantaLucia 1998, Salzkorrektur nach Owczarzy et al. 2004).

Testmenge. 40 systematisch erzeugte Primer: Längen 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 nt; GC-Gehalte 30, 40, 50, 60, 70 %; je 50, 100 und 200 mM Na⁺ bei 250 nM Primerkonzentration. Ergibt 120 Vergleichspunkte. Deterministisch über festen Zufallsstartwert (42).

Vorab festgelegtes Kriterium. Höchstens ±2 °C Abweichung bei mindestens 80 % der Fälle.

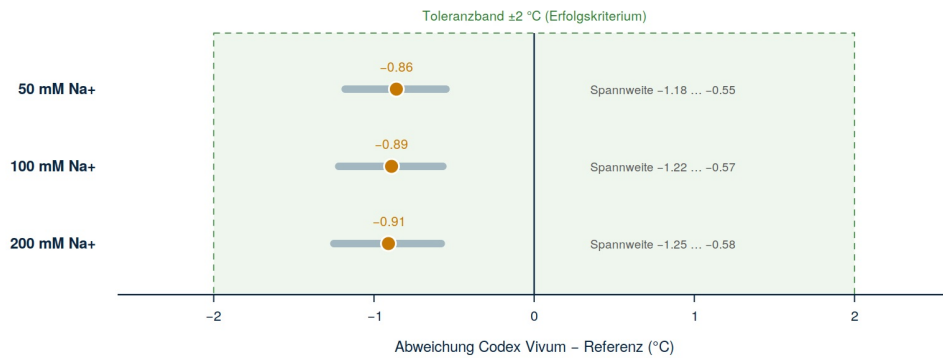
Ergebnis

Bedingung	Mittlere Abweichung	Standardabweichung	Max. Betrag	innerhalb ±2 °C
50 mM Na ⁺	−0,86 °C	0,16 °C	1,18 °C	100 %
100 mM Na ⁺	−0,89 °C	0,17 °C	1,22 °C	100 %
200 mM Na ⁺	−0,91 °C	0,17 °C	1,25 °C	100 %
gesamt (n = 120)	−0,89 °C	0,17 °C	1,25 °C	100 %

Kriterium erfüllt. Zusätzlich bestanden: fünf Plausibilitätsprüfungen (Monotonie in Länge, GC-Gehalt und Salzkonzentration; Wertebereich eines typischen 20mers; Behandlung selbstkomplementärer Sequenzen).

Abb. 2 — Tm-Validierung: Abweichung gegenüber Referenz-Implementierung

120 Vergleiche · 40 Primer (16–30 nt, 30–70 % GC) · 250 nM · Referenz: Biopython Tm_NN (SantaLucia 1998 + Owczarzy 2004)



Alle 120 Werte innerhalb ± 2 °C. Der konstante Versatz ist auf die Konzentrationskonvention (C_T vs. $C_T/4$) zurückzuführen, nicht auf abweichende Parameter.

Deutung des Versatzes

Ein erster Durchlauf ergab $-1,78$ °C und 73 % innerhalb der Toleranz, das Kriterium wäre verfehlt gewesen. Die Ursache war kein Rechenfehler, sondern eine abweichende Konzentrationskonvention: Das Modell definiert die Schmelztemperatur über die Gesamtstrangkonzentration C_T mit dem Faktor $C_T/4$ für nicht-selbstkomplementäre Duplexe. Die Referenzimplementierung bildet dies über zwei Konzentrationsparameter ab. Nach Angleichung sank der Versatz auf $-0,89$ °C; bei exakt passender Einzelparametrisierung betrug die Differenz $0,02$ °C.

Der Befund wird bewusst dokumentiert: Er betrifft alle, die Werte verschiedener Werkzeuge vergleichen. Die Uneinheitlichkeit der Konventionen ist seit Panjkovich & Melo (2005) und Chavali et al. (2005) bekannt.

Einordnung: wie stark bewegt die Methodenwahl das Ergebnis?

Ein Abgleich gegen experimentell gemessene Schmelztemperaturen steht weiterhin aus (siehe unten). Ersatzweise wurde beziffert, wie groß die Unterschiede zwischen den veröffentlichten Parametersätzen selbst sind — denn eine Abweichung von $0,89$ °C ist nur im Verhältnis zu dieser Streuung zu beurteilen.

Verglichen wurden vier publizierte Nearest-Neighbor-Sätze auf denselben 20 Primern, bei 250 nM und 50 mM Na^+ :

Parametersatz	Mittelwert	Spanne
Breslauer 1986	61,23 °C	39,4 – 81,0
Sugimoto 1996	56,41 °C	42,0 – 69,0
SantaLucia 1998	52,75 °C	38,3 – 66,4
SantaLucia & Hicks 2004	52,69 °C	38,2 – 66,4
Codex Vivum (SantaLucia 1998)	51,74 °C	37,1 – 65,5

Die Streuung je Sequenz über die vier Sätze beträgt im Mittel **8,67** °C, im Extremfall $14,63$ °C. Die eigene Abweichung gegenüber derselben Methodik liegt bei $0,89$ °C — also etwa ein Zehntel dessen, was allein die Wahl des Parametersatzes ausmacht.

Zwei Folgerungen. Erstens ist die Umsetzung von SantaLucia 1998 im Werkzeug genau, im Rahmen dessen, was überhaupt bestimmbar ist. Zweitens — und für den Unterricht wichtiger — ist ein Tm-Wert ohne Angabe der Methode wenig aussagekräftig. Wer Werte zweier Werkzeuge vergleicht, vergleicht möglicherweise Breslauer gegen SantaLucia und sieht dann fast neun Grad Unterschied, ohne dass eines der beiden falsch rechnet. Genau das beschreiben Panjkovich und Melo (2005) als Befund ihres Methodenvergleichs.

Die neueren Parameter von SantaLucia und Hicks (2004) unterscheiden sich von der Fassung von 1998 nur um 0,06 °C im Mittel. Für ein Lehrwerkzeug ist der ältere, breiter dokumentierte Satz damit unbedenklich.

Grenzen dieser Validierung

- Verglichen wurde gegen eine Implementierung **derselben** Methodik, nicht gegen Messwerte. Die absolute Genauigkeit gegenüber experimentellen Schmelztemperaturen ist nicht geprüft. Öffentlich verfügbare Datensätze für diesen Schritt: Owczarzy et al. (2004, 2008), Referenzmenge von 348 Sequenzen aus Panjkovich & Melo (2005), Nearest Neighbor Database.
- IDT OligoAnalyzer und NEB TmCalculator wurden nicht eingebunden (keine offene Schnittstelle im Testrahmen); ein manueller Stichprobenvergleich bleibt sinnvoll.
- Die Restriktions-Site-Erkennung ist nicht Gegenstand dieses Berichts.

Reproduktion

```
pip install -r requirements.txt
python3 tm_validation.py
```

Vollständige Konsolenausgabe: `validation_output.txt`.