

## A review on different types of Real-time PCR methods and its optimization

M. Keshavarz<sup>1</sup>, MH. Karbalaie Niya<sup>1</sup>, A. Tavakoli<sup>1</sup>, H. Keyvani<sup>1,2</sup>, A. Kachooei Mohagheghi Yaghubi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Virology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Gastrointestinal & Liver Disease Research Center (GILDRC), Firoozgar Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Address: Hossein Keyvani, School of Medicine, Department of Virology, Gastrointestinal and Liver Diseases Research Center Firoozgar Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: +98-21-88602205, Email: keyvanlab@yahoo.com

Received: 16 Jan 2017; Accepted: 29 May 2017

### \*Abstract

In the recent years, Real-time PCR technique introduced as a choice method for diagnosis of infectious diseases in many laboratories. During each cycle of the PCR reaction, this technique combines the polymerase chain reaction chemistry with the utilization of fluorescent reporter molecules for monitoring the production of amplification products. Therefore, the set of features including the high sensitivity and specificity, repeatable data and low contamination risk has made the Real-time PCR technology as an attractive alternative to conventional PCR. This technique is often used to quantify the level of gene expression. Since the whole Real-time PCR reaction is performed within a closed tube, the risk of contamination is reduced and eventually prevent false-positive results. The aim of present study was to provide a general overview on different types of Real-time PCR methods, their benefits and applications.

**Keywords:** Molecular diagnosis, Real-time PCR, Polymerase chain reaction, Fluorophore

**Citation:** Keshavarz M, Karbalaie Niya MH, Tavakoli A, Keyvani H, Kachooei Mohagheghi Yaghubi A. A review on different types of Real-time PCR methods and its optimization. J Qazvin Univ Med Sci. 2017; 21 (3): 76-90.

## مروری بر انواع روش‌های Real-time PCR و بهینه‌سازی آن

محسن کشاورز<sup>۱</sup>، محمد هادی کربلایی نیا<sup>۱</sup>، احمد توکلی<sup>۱</sup>، دکتر حسین کیوانی<sup>۱،۲</sup>، عاطفه کجویی محققى يعقوبى<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد بیمارستان فیروزگر دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤل: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد بیمارستان فیروزگر، تلفن ۸۸۶۰۲۲۰۵ - ۰۲۱  
تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۸

### \* چکیده

روش Real-time PCR در سال‌های اخیر به‌عنوان روشی انتخابی جهت تشخیص بسیاری از بیماری‌های عفونی در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. با استفاده از این فن‌آوری، واکنش زنجیره پلیمرز توسط مولکول‌های گزارش‌گر فلورسنت انجام و از این طریق، تولید فرآورده‌های تکثیری طی هر چرخه واکنش PCR گزارش می‌شود. بدین ترتیب مجموعه‌ای از خصوصیات از جمله؛ حساسیت و اختصاصیت بالا، داده‌های قابل اعتماد و خطر پایین آلودگی، فن‌آوری Real-time PCR را به جایگزینی مناسب برای PCR معمولی تبدیل کرده است. این روش اغلب در تعیین کمیت سطوح بیان ژن نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجایی که تمامی مراحل Real-time PCR در داخل یک لوله در بسته انجام می‌شود، خطر ایجاد آلودگی در آن در مقایسه با PCR معمولی بسیار کاهش یافته و در نتیجه از حصول نتایج مثبت کاذب جلوگیری می‌شود. هدف از این مقاله، مرور کلی در مورد انواع مختلف روش Real-time PCR، مزایا و کاربردهای آن می‌باشد.

**کلیدواژه‌ها:** تشخیص مولکولی، Real-time PCR، واکنش زنجیره پلیمرز، فلوروفور

### \* مقدمه:

بایونیر، بایوراد، شفید، کوربت، ایداهو، ام جی، روچ، استراتاژن دستگاه‌هایی را برای qPCR (PCR کمی) عرضه کرده‌اند.<sup>(۱-۴)</sup>

استفاده از Real-time PCR کمی، در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی و مولکولی در حال افزایش بوده و جایگزین خوبی برای PCR معمولی است.<sup>(۵)</sup> در واقع این روش بر پایه PCR معمولی بوده و امکان آنالیز داده‌ها در آن وجود دارد. مزیت اصلی qPCR نسبت به PCR معمولی این است که غلظت DNA اولیه با دقت و حساسیت بالایی تعیین می‌گردد. بدین ترتیب نتایج به‌دست آمده می‌تواند به‌صورت کیفی یا کمی باشد. در مقابل، PCR معمولی در بهترین حالت خود به‌صورت

همان‌طور که از نام Real-time PCR مشخص است، به معنی مشاهده لحظه به لحظه یک فرآیند می‌باشد. این سیستم در ابتدا توسط هیگوچی و همکارانش طراحی گردید. در این روش یک ماده فلورسنت در هر چرخه از واکنش آزاد می‌شود که میزان آزادسازی آن با مقدار محصولات تکثیر شده متناسب است. این مقدار از فلورسنت توسط یک نمایان‌گر (Detector) شناسایی و ثبت می‌گردد. در نهایت، گرافیکی توسط دستگاه ترسیم خواهد شد که نشان‌دهنده تصویری از فرآیند در حال انجام و تکثیر محصولات است. چنین ابزاری اولین بار در سال ۱۹۹۶ توسط شرکت اپلاید بایوسیستم ساخته و در حال حاضر علاوه بر آن، شرکت‌های دیگری نظیر بایوژن،

(۱) پروب‌هایی که همانند پرایمرها عمل کرده و به آن‌ها پرایمر - پروب می‌گویند؛ (۲) پروب‌های هیدرولیز که به محض تجزیه در طی مرحله گسترش (Extension)، نور فلورسنت را ساطع می‌کنند و همچنین پروب‌های هیبریداسیون که طی واکنش تکثیر و هنگام اتصال به DNA هدف، نور فلورسنت ساطع می‌کنند؛ (۳) آنالوگ‌های اسیدهای نوکلئیک،<sup>(۱۰،۹)</sup> در مطالعه حاضر علاوه بر ساختار و مکانیسم عمل، مزایا و کاربردهای هر کدام از روش‌های شناسایی DNA توسط Real-time PCR بحث خواهد شد.

### گروه اول - بررسی شیمی PCR جهت تشخیص و تعیین کمیت اسیدهای نوکلئیک:

دو روش کلی بررسی DNA در qPCR وجود دارد که عبارتند از: (۱) روش‌هایی که به صورت اختصاصی و غیراختصاصی، محصولات تکثیر شده را با استفاده از رنگ‌های متصل شونده به DNA دو رشته‌ای شناسایی می‌کنند؛ (۲) روش‌هایی که فقط به صورت اختصاصی، محصولات PCR را با استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای متصل به فلوروفور (پرایمر - پروب‌ها یا پروب‌ها) شناسایی می‌کنند.<sup>(۹،۸)</sup>

#### (۱) رنگ‌های متصل شونده به DNA:

طیف گسترده‌ای از رنگ‌های فلورسنت متصل شونده به DNA به صورت تجاری وجود دارد که شامل؛ اتیدیوم بروماید، YO-PRO-1، سایبرگرین I، سایبرگلد، SYTO، BEBO، BOXTO و اوگرین می‌باشد. استفاده از این رنگ‌ها باعث شناسایی محصولات اختصاصی و غیراختصاصی و محصولات پرایمر - دایمر تولیدی در طول واکنش qPCR می‌شود.<sup>(۱۱،۱۰)</sup>

#### ساختار:

پرمصرف‌ترین رنگ، سایبرگرین I می‌باشد که تحت شرایط استاندارد واکنش PCR، دو بار مثبت آن به اتصال قوی این رنگ به DNA دو رشته‌ای کمک می‌کند. کمپلکس DNA-رنگ حاصل، نور آبی  $\lambda_{max}=497$  نانومتر) را جذب کرده و نور

نیمه کمی است. علاوه بر آن، در qPCR واکنش‌ها در یک لوله در بسته انجام شده و داده‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند که با این روند، دیگر نیازی به دست‌کاری‌های پس از تکثیر نبوده و از این‌رو امکان آلودگی کاهش می‌یابد.<sup>(۵-۷)</sup>

سازگاری و مزیت فن‌آوری Real-time PCR در مطالعه‌های متعدد از قبیل؛ زیست پزشکی، میکروبی‌شناسی، دام‌پزشکی، کشاورزی، داروشناسی، بیوتکنولوژی و سم‌شناسی تأیید شده است. همچنین این فن‌آوری کاربردهای جالب و جدید دیگری از جمله؛ تعیین کمیت و تعیین ژنوتایپ عوامل عفونی، بررسی بیان ژن‌ها، آنالیز DNA متیله شده و میکرو RNA، تأیید داده‌های میکروارای، افتراق آلی و ژنوتایپینگ (شناسایی جهش‌ها، آنالیز پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی و ریز ماهواره‌ها، شناسایی تغییرات کروموزومی)، تأیید اثربخشی دارو درمانی و مطالعات پزشکی قانونی دارد.<sup>(۶-۹)</sup>

اجزای qPCR شامل؛ ترموسایکلر با یک منبع نوری (لامپ، لیزر یا LED)، یک سیستم نمایان‌گر فلورسنت (فلوریمتر) و همچنین نرم‌افزاری جهت رسم منحنی تکثیر DNA با استفاده از داده‌های فلورسنت می‌باشد.<sup>(۸)</sup> اضافه کردن یک رنگ اینترکاله برای DNA دو رشته‌ای یا پروب نشان‌دار با فلوروفور به مخلوط واکنش نیز ضروری است. طی ۱۵ سال اخیر، روش‌های متعددی جهت شناسایی DNA در qPCR توصیف شده است. این روش‌ها براساس عامل فلورسنت مورد استفاده و همچنین میزان اختصاصیت به دو گروه اصلی طبقه‌بندی شده‌اند. گروه اول از عوامل اینترکاله‌کننده DNA دو رشته‌ای نظیر سایبرگرین I و اوگرین استفاده کرده و قادر به ردیابی هر دو فرآورده تکثیری اختصاصی و غیراختصاصی هستند؛ اما گروه دوم از فلوروفورهای متصل شده به الیگونوکلوئوتیدها استفاده کرده و تنها قادر به شناسایی محصولات اختصاصی PCR می‌باشند.<sup>(۹،۷)</sup> گروه دوم براساس نوع مولکول‌های فلورسنت اضافه شده به واکنش، خود به سه زیرگروه تقسیم‌بندی می‌شود:

می‌شوند، پیک‌های مجزایی قابل مشاهده خواهد بود.<sup>(۱۴ و ۱۲)</sup>

### مزایا و معایب:

هزینه رنگ‌های متصل شونده به DNA در qPCR نسبت به روش‌هایی که به پروب‌های فلورسنت نیاز دارند، بسیار پایین‌تر می‌باشد. با این حال، رسم آنالیز منحنی ذوب بعد از تکمیل هر آزمون qPCR جهت تشخیص انتخابی محصولات مولتی پلکس PCR ضروری است. سایبرگرین I به عنوان پُرکاربردترین رنگ می‌باشد؛ اما با وجود این محبوبیت دارای محدودیت‌هایی از قبیل؛ پایداری محدود و همچنین مهار PCR است. اواگرین، نسل سوم از رنگ‌های متصل شونده به DNA دو رشته‌ای است و یکی از خصوصیات آن، قابلیت مهارکنندگی کم‌تر PCR در مقایسه با سایبرگرین I است. اواگرین جهت بررسی‌های آزمون ذوب با تفکیک بالا (HRM) نیز مناسب می‌باشد.<sup>(۱۶ و ۱۵)</sup>

### کاربردها:

از این رنگ‌ها می‌توان جهت شناسایی توالی‌های DNA در واکنش PCR استفاده کرد. سایبرگرین I عمدتاً برای شناسایی عوامل عفونی، بررسی بیان ژن، شناسایی جهش، شناسایی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی و همچنین شناسایی ارگانوسم‌های اصلاح شده از نظر ژنتیکی (GMO) استفاده می‌شود. همچنین از اواگرین نیز برای چنین اهدافی استفاده شده است.<sup>(۱۷-۱۹)</sup>

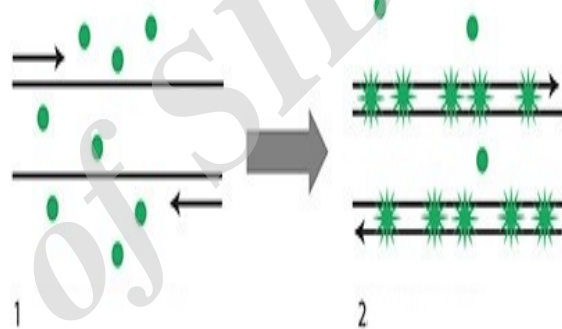
### گروه دوم - الیگونوکلئوتیدهای نشان دار شده با فلوروفور:

فلوروفورها، مولکول‌های فلورسنت کوچکی هستند و برای این که در فن آوری qPCR به صورت پروب عمل کنند باید به الیگونوکلئوتیدها متصل شوند. این الیگونوکلئوتیدهای متصل به فلورسنت به صورت پرایمر-پروپ‌ها، پروپ‌ها یا آنالوگ‌های اسید نوکلئیکی طبقه‌بندی می‌شوند. دو نوع فلوروفور به نام‌های دهنده (Donor) یا گزارش گر (Reporter) و گیرنده (Acceptor) یا کوئنچر (Quencher) وجود دارند.<sup>(۲۰ و ۱۹)</sup> هنگامی که یک

سبز ( $\lambda_{max}=520$  نانومتر) را ساطع می‌کند. اخیراً مشخص شده است که رنگ‌های اواگرین و SYTO نسبت به سایبرگرین I پایداری و حساسیت بیش‌تری برای سنجش کمی DNA توسط qPCR دارند.<sup>(۱۳ و ۱۲)</sup>

### مکانیسم عمل:

با اتصال چنین رنگی به شیار کوچک DNA دو رشته‌ای، فلورسنت ساطع می‌شود که می‌توان آن را در مرحله گسترش هر چرخه از qPCR اندازه‌گیری کرد (شکل شماره ۱).



شکل ۱: اتصال رنگ سایبرگرین به DNA دو رشته‌ای و انتشار نور فلورسنت

با توجه به این که در طی فرآیند PCR محصولات غیراختصاصی و پرایمر-دایمرها می‌تواند شکل گیرد، آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) جهت بررسی اختصاصیت قطعات تکثیر شده توصیه می‌شود. این آنالیز متشکل از حرارت دادن به نمونه (از ۵۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و مشاهده فلورسنت ساطع شده از آن در طی فرآیند است. دمای واسرشته سازی DNA به صورت کاهش شدید در نور فلورسنت و با جدا شدن رنگ از DNA مشخص می‌شود. محصولات غیراختصاصی و پرایمر-دایمرها در مقایسه با محصولات اختصاصی در دماهای پایین‌تری واسرشته می‌شوند. در واقع از آنجایی که محصولات PCR با اندازه‌ها و یا محتویات نوکلئوتیدی مختلف در دماهای متفاوتی واسرشته

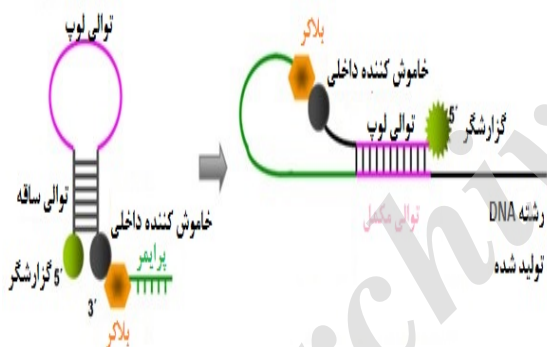
### ۱-۱- پرایمر- پروب‌های سنجاق سری:

این گروه از پرایمر- پروب‌ها، الیگونوکلئوتیدهای تک رشته‌ای هستند. اجزای تشکیل دهنده آن‌ها شامل یک ساختار ثانویه سنجاق سری است که ساختمان لوپ در آن به‌طور اختصاصی به توالی DNA هدف متصل می‌شود. همچنین توالی کوتاهی از ۶ نوکلئوتید (GC) در انتهای ۵' پروب وجود دارد که با انتهای ۳' مکمل است. علاوه بر آن، یک یا دو مولکول فلوروفور وجود دارد که به دو انتها متصل شده است و در برخی موارد، پروب نیز حاوی یک پرایمر متصل به ساختار سنجاق سر می‌باشد. پرایمر- پروب‌های سنجاق سری شامل؛ اسکورپیون، آمپلیفور و LUX می‌باشند.<sup>(۲۰)</sup>

### ۱-۱-۱- پرایمر- پروب‌های اسکورپیون:

#### ساختار:

ساختار این پرایمر- پروب در سال ۱۹۹۹ توسط وایت کومب و همکارانش شرح داده شد (شکل شماره ۲).



شکل ۲- ساختار پرایمر- پروب‌های اسکورپیون

ساختار سنجاق سر در آن دارای یک مولکول گزارش‌گر در انتهای ۵' و یک کوئنچر داخلی در انتهای ۳' می‌باشد. انتهای ۳' ساختار سنجاق سر توسط مهارکننده (Blocker) هگزاتیلن گلیکول (HEG) به انتهای ۵' پرایمر متصل است که از طویل شدن پرایمر توسط پلیمراز جلوگیری می‌کند.<sup>(۲۱،۲۴)</sup>

#### مکانیسم عمل:

در لوله واکنش، مولکول‌های گزارش‌گر و کوئنچر در مجاورت نزدیک هم قرار دارند و انتقال انرژی از طریق

فلوروفور دهنده انرژی را از نور جذب می‌کند، یک وضعیت برانگیخته (Excited) در آن ایجاد می‌شود و با ساطع شدن انرژی از آن به‌صورت نور فلورسنت به وضعیت اولیه خود برمی‌گردد. این نور ساطع شده از فلوروفور دهنده، انرژی پایین‌تر و فرکانس و طول موج بلندتری در مقایسه با نور جذبی دارد و می‌تواند به یک فلوروفور پذیرنده منتقل شود. اگر این دو فلوروفور (دهنده و پذیرنده) در فاصله خاصی از هم قرار گیرند (معمولاً ۱۰ تا ۱۰۰ آنگستروم)، انتقال انرژی حاصل از برانگیختگی از یک فلوروفور گزارش‌گر به یک فلوروفور کوئنچر، انتقال انرژی رزونانس فلورسانت (FRET) نامیده می‌شود.<sup>(۲۰،۲۹)</sup> بر این اساس که چطور انرژی منتقل شده به فلوروفور پذیرنده منتشر می‌شود، دو مکانیسم مختلف از FRET وجود دارد؛ (۱) FRET-quenching که در آن، انرژی الکترونیکی کوئنچر (یک مولکول غیرفلورسنتی) به صورت گرما منتشر می‌شود؛ (۲) FRET که در آن، انرژی منتقل شده به‌صورت فلورسنت ساطع می‌شود؛ زیرا پذیرنده در این حالت، یک مولکول فلورسنت می‌باشد. در حال حاضر طیف گسترده‌ای از دهنده‌ها و پذیرنده‌های مختلف با قابلیت برانگیختگی و طیف تابشی متفاوت وجود دارند که می‌توانند در qPCR مورد استفاده قرار بگیرند.<sup>(۲۱،۲۰)</sup>

### (۱) پرایمر- پروب‌ها:

پرایمر- پروب‌ها، الیگونوکلئوتیدهایی متشکل از توالی‌های پرایمر و پروب در یک مولکول واحد بوده و می‌توان آن‌ها را در سه گروه پرایمر- پروب‌های سنجاق سری، سیکلیکونز و آنگر طبقه‌بندی کرد. فلورسنت ساطع شده از پرایمر- پروب‌ها، طی مرحله واسرشته سازی یا مرحله گسترش qPCR ردیابی و اندازه‌گیری می‌شود که این به نوع پرایمر- پروب مورد استفاده بستگی دارد. استفاده از این پرایمر- پروب‌ها می‌تواند منجر به تکثیر محصولات غیراختصاصی و یا پرایمر- دایمر در طول واکنش PCR شود؛ بنابراین آنالیز منحنی ذوب برای تعیین کارایی واکنش توصیه می‌شود.<sup>(۲۰)</sup>

پروپ‌های وارد نشده در حالت خاموش هستند. همچنین در این سیستم، تخریب آنزیماتیک پرایمر- پروپ ضروری نیست و نورهای فلورسنت قوی‌تری در مقایسه با پروپ‌های دیگر ایجاد می‌شود. (۲۴،۲۳)

### کاربردها:

از پرایمر- پروپ‌های اسکورپیون می‌توان در فرمت‌های تکی و مولتی پلکس جهت شناسایی و تعیین کمیت عوامل عفونی، تعیین ژنوتایپ، افتراق آلی و شناسایی جهش استفاده کرد. به‌منظور بالا بردن دقت در تشخیص پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی و افتراق آلی، اضافه کردن یک آنالوگ اسید نوکلئیکی به پرایمر- پروپ اسکورپیون جهت افزایش پایداری حرارتی و اختصاصیت هیبریداسیون آن توصیه می‌شود. (۲۵-۲۷)

### ۲- پروپ‌ها:

پروپ‌ها، الیگونوکلئوتیدهایی هستند که یک فلوروفور دهنده و یک فلوروفور پذیرنده به آن‌ها متصل شده است. به‌طور کلی دو نوع پروپ به نام‌های پروپ‌های هیدرولیز و هیبریداسیون وجود دارد (جدول شماره ۱).

FRET-quenching ایجاد می‌شود. بعد از اتصال پرایمر- پروپ به توالی DNA هدف، آنزیم پلیمرز از انتهای ۳' پرایمر، شروع به کپی کردن توالی‌های نوکلئوتیدی می‌کند. در مرحله واسرشته سازی بعدی، توالی اختصاصی پروپ به ناحیه مکمل خود در همان رشته DNA تازه ساخت متصل می‌شود. این فرآیند هیبریداسیون، ساختار سنجاق سر را باز کرده و در نتیجه مولکول‌های گزارش‌گر و کوئنچر از یکدیگر جدا می‌شوند و نور فلورسنت به نسبت مقدار محصول PCR تکثیر شده تولید می‌شود. (۲۲)

### مزایا:

سیستم پرایمر- پروپ، فرآیند اتصال و ردیابی را در یک مولکول ادغام و آن را به یک سیستم ارزان تبدیل کرده است. الیگونوکلئوتیدهای دارای ساختار سنجاق سری، از تشکیل پرایمر- دایمر و محصولات تکثیری غیراختصاصی جلوگیری می‌کنند؛ زیرا اتصال درون مولکولی چنین ساختارهایی از نظر جنبشی مناسب و بسیار مؤثر می‌باشد. استفاده از لوپ، مزایای دیگری از جمله کاهش نورهای پس‌زمینه نیز دارد؛ به‌طوری‌که پرایمر-

جدول ۱- مشخصات پروپ‌های هیدرولیز و هیبریداسیون

نوع	مزایا	مکانیسم عمل	ساختار	
پروپ‌های هیدرولیز	طراحی و ساخت این پروپ ساده می‌باشد. حضور MGB، اختصاصیت پروپ را افزایش داده و اجازه استفاده از الیگونوکلئوتیدهای کوتاه را می‌دهد.	در محلول واکنش هنگامی که نور فلورسنت خاموش می‌باشد بدان معناست که دو فلوروفور پروپ در نزدیکی هم قرار دارند. در مرحله گسترش، اتصال پروپ هیدرولیز توسط فعالیت ۵' به ۳' اگزونوکلئازی DNA پلیمرز تخریب شده و نور فلورسنت از گزارش‌گر ساطع می‌شود.	5' R---Q3' 5' R---Q3'- MGB	TaqMan TaqMan-MGB
پروپ‌های هیبریداسیون	این سیستم امکان آنالیز منحنی ذوب را فراهم می‌کند. طراحی و ساخت پروپ‌ها همانند بهینه‌سازی واکنش PCR سریع و آسان می‌باشد.	در طی فرآیند هیبریداسیون، اتصال پروپ به توالی هدف باعث نزدیک شدن فلوروفورها به هم شده و انتقال انرژی توسط FRET صورت می‌گیرد.	5'---R3' + 5'Q---3'-Ph	Hyprobe or FRET
	این سیستم امکان آنالیز منحنی ذوب را فراهم می‌کند. اتصال اختصاصی این پروپ‌ها نسبت به پروپ‌های سنجاق سری بیش‌تر می‌باشد. استفاده از این پروپ‌ها اجازه می‌دهد توالی‌هایی که در یک نوکلئوتید متفاوت هستند نیز از هم تفکیک شوند.	در طی مرحله اتصال، پروپ Beacon باز شده و به توالی DNA هدف متصل و منجر به انتشار نور فلورسنت می‌شود.	5' RΩQ3'	Molecular Beacon
	این سیستم امکان آنالیز منحنی ذوب را فراهم می‌کند.	مقدار فلورسنت منتشر شده از پروپ HyBeacons هیبرید شده به توالی مکمل نسبت به پروپ‌های ss بیش‌تر می‌باشد و شناسایی توالی‌های هدف را ممکن می‌سازد.	5'---FIUb----- -3' Ph	HyBeacon

### ۲-۱- پروب‌های هیدرولیز:

مکانیسم عمل این پروب‌ها به فعالیت ۵' به ۳' اگزونوکلازای Taq پلیمرز متکی می‌باشد که با این خصوصیت خود، پروب متصل را در طول واکنش تکثیر تخریب و همچنین از انجام آنالیز منحنی ذوب ممانعت می‌کنند. در این سیستم، فلورسنت در پایان مرحله گسترش محاسبه می‌شود که متناسب با مقدار محصول اختصاصی تکثیر شده می‌باشد (جدول شماره ۱).<sup>(۲۸،۲۹)</sup>

### ۲-۱-۱- پروب‌های TaqMan:

#### ساختار:

ساختار این پروب در سال ۱۹۹۱ توسط هولند و همکارانش مطرح شد. این پروب‌های الیگونوکلوئیدی در انتهای ۵' خود حاوی مولکول دهنده فلورسنت و در انتهای ۳' خود دارای مولکول پذیرنده فلورسنت می‌باشند و به علت مجاورت این دو مولکول به یکدیگر، فلورسنت ساطع شده از مولکول دهنده خاموش می‌ماند. پروب هیدرولیز جهت اتصال به ناحیه خاصی از DNA هدف طراحی شده است.<sup>(۳۰-۳۲)</sup>

#### مکانیسم عمل:

در لوله واکنش، نور فلورسنت از فلوروفور دهنده توسط فلوروفور پذیرنده سرکوب می‌شود. طی مرحله گسترش، پروب هیدرولیز متصل توسط فعالیت ۵' به ۳' اگزونوکلازای DNA پلیمرز تجزیه و نور فلورسنت از مولکول دهنده ساطع می‌شود. این فرآیند بدون دخالت در ساخت تصاعدی محصولات PCR در هر چرخه تکرار می‌شود.<sup>(۳۳)</sup>

#### مزایا:

طراحی و ساخت پروب‌های TaqMan راحت است؛ اما اگر به خوبی طراحی نشوند، امکان تشکیل پرایمر-دایمرها در حین واکنش qPCR وجود دارد.

#### کاربردها:

از این سیستم می‌توان در فرمت‌های تکی و مولتی پلکس برای شناسایی ویروس، تعیین کمیت بار ویروس یا

باکتری، بررسی بیان ژن، تأیید نتایج میکروآرای، افتراق آلی، شناسایی جهش، تشخیص پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی و GMO استفاده کرد.<sup>(۳۴-۳۷)</sup>

### ۲-۱-۲- پروب‌های MGB-TaqMan:

پروب‌های TaqMan متصل شونده به شیار کوچک DNA به‌عنوان پروب‌های DNA نشان‌دار شده با MGB توصیف شده‌اند.<sup>(۳۸،۳۷)</sup>

### ۲-۲- پروب‌های هیبریداسیون:

فلورسنت ساطع شده حاصل از اتصال این پروب‌ها در طول مرحله اتصال یا مرحله گسترش می‌تواند اندازه‌گیری شود. مزیت اصلی استفاده از این پروب‌ها در مقایسه با پروب‌های هیدرولیز، توانایی آنالیز قطعات تکثیر شده توسط رسم منحنی‌های ذوب است. میزان نور فلورسنت اندازه‌گیری شده ارتباط مستقیمی با میزان تکثیر DNA هدف طی واکنش qPCR دارد.<sup>(۳۸)</sup>

### ۲-۲-۱- پروب‌های FRET یا Hybprobe:

#### ساختار:

Hybprobe که به‌عنوان پروب‌های FRET نیز شناخته می‌شوند، اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط هلر و موریسون معرفی شدند. این سیستم متشکل از یک جفت الیگونوکلوئید متصل شونده به توالی‌های DNA هدف می‌باشد. پروب اول دارای فلوروفور گزارش‌گر در انتهای ۳' و پروب دوم دارای یک کوئنچر در انتهای ۵' خود است و یک گروه فسفات نیز جهت جلوگیری از تکثیر DNA به انتهای ۳' پروب دوم متصل می‌باشد.<sup>(۳۸)</sup>

#### مکانیسم عمل:

توالی‌های این دو پروب طوری طراحی می‌شوند تا در جهت سر به دم با توالی‌های DNA هدف هیبرید شوند؛ به طوری که دو فلوروفور در مجاورت یکدیگر قرار گرفته‌اند. طی مرحله اتصال که دو پروب در مجاورت هم قرار دارند، کوئنچر با توجه به این واقعیت که انرژی آزاد شده از مولکول گزارش‌گر از قبل باعث برانگیختگی آن شده است، نور فلورسنت ساطع می‌کند.<sup>(۳۹،۴۰)</sup>

**مزایا:**

طراحی و ساخت این پروب‌ها همانند بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR سریع و آسان می‌باشد.

**کاربردها:**

از این پروب‌ها می‌توان در فرمت مولتی پلکس جهت شناسایی عوامل عفونی، تعیین کمیت بار ویروس یا باکتری، تأیید نتایج میکرواروی، تعیین ژنوتایپ، افتراق آلی، شناسایی جهش و پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی استفاده کرد.<sup>(۴۱ و ۴۲)</sup>

**۲-۲-۲- پروب‌های سنجاقتی سر:****۲-۲-۲-۱- پروب‌های Molecular Beacon:****ساختار:**

پروب Molecular Beacon اولین بار توسط تایگی و کارمر معرفی شد. این پروب، الیگونوکلئوتیدی تک‌رشته‌ای به شکل سنجاقتی سر است که به چهار بخش تقسیم می‌شوند: (الف) یک لوپ که قطعه‌ای ۱۸ تا ۳۰ جفت بازی است و با توالی DNA هدف مکمل می‌باشد؛ (ب) یک ساقه که توسط دو توالی مکمل ۵ تا ۷ جفت بازی واقع در دو انتهای پروب ایجاد می‌شود؛ (پ) یک مولکول گزارش‌گر فلورسنت که به انتهای ۵' متصل شده است؛ (ت) یک کوئنچر بدون فلورسنت که به انتهای ۳' متصل شده است و زمانی که پروب به شکل بسته خود می‌باشد، فلورسنت ساطع شده از مولکول گزارش‌گر را جذب می‌کند<sup>(۲۴)</sup> (شکل شماره ۳).



شکل ۳- ساختار پروب Molecular Beacon

**مکانیسم عمل:**

این پروب‌ها طی مرحله اتصال باز شده و به توالی هدف خود متصل می‌شوند و از آنجایی که این بار مولکول گزارش‌گر سرکوب نمی‌شود، در نتیجه فلورسنت ساطع می‌گردد. این نور فلورسنت با مقدار محصول PCR تکثیر شده متناسب می‌باشد. اگر پروب Molecular Beacon و توالی DNA هدف کاملاً مکمل هم نباشند، ساختار سنجاقتی سر در طول این هیبریداسیون ناقص همچنان پا برجای باقی مانده و هیچ انتشار فلورسنتی صورت نمی‌گیرد.

**مزایا:**

به دلیل تشکیل ساقه سنجاقتی سر، اختصاصیت اتصال پروب Molecular Beacon در مقایسه با الیگونوکلئوتیدهای فلورسنتی بیش‌تر است. از این‌رو با استفاده از چنین پروب‌هایی می‌توان بین توالی‌هایی از DNA هدف که حتی در یک نوکلئوتید با هم تفاوت دارند نیز تمایز قائل شد.<sup>(۴۳)</sup>

**کاربردها:**

این پروب‌ها می‌توانند در فرمت‌های تکی و مولتی پلکس جهت شناسایی عوامل عفونی، تعیین کمیت بار ویروس یا باکتری، تعیین ژنوتایپ، افتراق آلی، شناسایی جهش، تشخیص پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، آنالیز mRNA در سلول‌های زنده و شناسایی GMO استفاده شوند.<sup>(۲۴ و ۴۴)</sup>

**۲-۲-۲-۲- پروب‌های هیبریداسیون Beacon****یا پروب‌های HyBeacon:****ساختار:**

پروب‌های HyBeacon اولین بار توسط فرنچ و همکارانش معرفی شدند. این پروب‌ها حاوی توالی‌های الیگونوکلئوتیدی تک‌رشته‌ای هستند. به نوکلئوتیدهای داخلی این الیگونوکلئوتیدها، دنباله‌های فلوروفور متصل شده است و یک مهارکننده در انتهای ۳' خود دارند (۳' فسفات) که از طویل‌سازی این پروب‌ها طی واکنش PCR جلوگیری می‌کنند.<sup>(۴۵)</sup>



### 8) Non-natural bases: isoguanine and 5'-methylisocytosine

برخی از این آنالوگ‌ها، شامل LNAs، PNAs و ZNAs و بازهای غیرطبیعی (iG یا iC) به صورت رایج برای کاربردهای مختلف Real-time PCR استفاده می‌شوند.

### ۱-۲- اسید نوکلئیک‌های بسته (LNAs)

#### ساختار:

اسید نوکلئیک‌های بسته که برای نخستین بار در سال ۱۹۹۸ توسط ونگل و همکارانش توصیف شدند، توالی‌هایی از DNA یا RNA بوده که شامل یک یا تعداد بیش‌تری از نوکلئوتیدهای اصلاح شده می‌باشند. به طور اختصاصی این نوکلئیک اسیدها دارای یک پلی‌متیلن بین اتم‌های 2'-O و 4'-C در حلقه ریبوز می‌باشند که یک حلقه bicyclic تشکیل می‌دهند. (۵۱ و ۵۰)

#### مکانیسم عمل:

مکانیسم عمل پروب اسید نوکلئیک‌های بسته مشابه با عملکرد پروب‌ها یا پرایمر- پروب‌هاست.

#### مزایا:

پروب‌های اسید نوکلئیک‌های بسته در برابر تجزیه نوکلئازها مقاوم هستند. نوکلئوتیدهای LNA اغلب در ترکیب با نوکلئوتیدهای DNA/RNA تغییر نیافته استفاده می‌شوند که موجب افزایش پایداری گرمایی پروب می‌شود. نتیجه این افزایش پایداری، بهبود اختصاصیت توالی‌های هدف می‌باشد. (۵۲ و ۵۳)

#### کاربردها:

نوکلئوتیدهای اسید نوکلئیک‌های بسته می‌توانند به اکثر پرایمر- پروب‌ها و پروب‌های توصیف شده در این مقاله مروری عرضه شوند. برای مثال استفاده از LNA Molecular Beacon و پروب‌های LNA TaqMan جهت تشخیص پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، تشخیص GMO، تعیین حضور هلیکوباکتری پیلوری، آنالیز موتاسیونی اختصاصی آلل مربوط به KRAS و BRAF و نیز تعیین کمیت DNA ویروس هپاتیت B در سرم گزارش شده است. (۵۴ و ۵۵)

### مکانیسم عمل:

هنگامی که پروب HyBeacons به توالی هدف خود متصل می‌شود، مقدار فلورسنت منتشر شده به طور قابل توجهی نسبت به پروب‌های تک رشته‌ای در محلول بیش‌تر می‌باشد. فلورسنت طی مرحله گسترش یا طول‌سازی اندازه‌گیری می‌شود. (۴۵)

#### مزایا:

این سیستم امکان آنالیز کامل منحنی ذوب را فراهم آورده و از این طریق اختصاصیت فرآورده تکثیر یافته و کارآمدی واکنش تضمین می‌شود. از مزایای دیگر فن‌آوری HyBeacon عملکرد ساده، طراحی ساده و ساخت نسبتاً ارزان آن می‌باشد. (۴۵)

#### کاربردها:

این پروب‌ها می‌توانند در فرمت تکی و مولتی پلکس جهت شناسایی، تعیین کمیت DNA، تعیین ژنوتایپ، تشخیص پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی و افتراق آلی مورد استفاده قرار گیرند. (۴۸-۴۶)

### ۳- آنالوگ‌های اسید نوکلئیکی:

آنالوگ‌های اسید نوکلئیکی، ترکیبات آنالوگی (از نظر ساختاری شبیه) هستند که به طور طبیعی RNA و DNA را ایجاد می‌کنند. یک آنالوگ ممکن است تغییراتی در اسکلت فسفات، قند پنتوز (ریبوز یا دئوکسی ریبوز) یا بازهای نوکلئوتیدی داشته باشد. به طور طبیعی، آنالوگ‌ها همه مزیت‌های DNA طبیعی را دارند؛ اما در مایعات بیولوژیک پایداری بیشتری دارند و برای مکمل بودن با اهداف اسید نوکلئیکی میل زیادی دارند. انواعی از آنالوگ‌های نوکلئیک اسیدی در سال‌های اخیر شرح داده شده است. (۴۹)

- 1) 2'-O-methyl oligodeoxyribonucleotides or 2'-O-methyl RNA
- 2) Peptide Nucleic Acids (PNAs)
- 3) 2'-Fluoro N3-P5'-phosphoramidites
- 4) 1,5-anhydrohexitol nucleotides (HNAs)
- 5) Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer (PMO)
- 6) Locked Nucleic Acids (LNAs)
- 7) Zip nucleic acids (ZNAs)

## ۴- بازهای غیرطبیعی:

### ۴-۱- پروب‌های Tiny-Molecular Beacon

#### ساختار:

پروب‌های Molecular Beacon توصیف شده توسط براتو و همکاران، به‌عنوان ساختارهای سنجاق سری کوچک شناخته شده و از آنالوگ‌های نوکلئیک اسید کایمیریک 2'-O-متیل RNA-LNA ساخته می‌شوند.<sup>(۵۶)</sup>

#### مکانیسم عمل:

این پروب‌ها عملکرد مشابهی با پروب‌های Molecular Beacons نشان می‌دهند.

#### مزایا:

مقاومت این پروب‌ها در برابر نوکلئازها و نیز پایداری‌شان در داخل محیط سلولی گزارش شده است. این پروب‌ها همچنین دارای میل پیوندی و نیز اختصاصیت بالایی جهت اتصال به توالی‌های RNA هستند که دلیل آن مشارکت الیگونوکلئوتیدهای RNA با LNA در ساختار پروب می‌باشد.<sup>(۵۶)</sup>

#### کاربردها:

فرآیند ساده ساخت و آسان این پروب‌ها و نیز توانایی آن‌ها جهت جفت شدن با طیفی از فلوروفورها، Beacon های Tiny-Molecular را به‌عنوان فن‌آوری مناسبی جهت تشخیص مقادیر کم mRNA ها و RNA های کوچک از قبیل microRNA ها، RNA های کوچک هسته‌ای و RNA های هسته‌ای مطرح ساخته است. اخیراً از این فن‌آوری جهت نمایان‌سازی mRNA های دست نخورده در سلول‌های زنده استفاده شده است.<sup>(۵۷،۵۶)</sup>

#### طراحی پرایمر و پروب:

طراحی پرایمر و پروب یک مبحث بسیار مهم در اکثر کاربردهای qPCR می‌باشد. اختصاصیت، طول، درصد محتوای سیتوزین و گوانین، پایداری انتهای 3'، پیچیدگی توالی، Tm و ناحیه قرارگیری پرایمرها در توالی هدف تعیین‌کننده طول آمپلیکون و کارآمدی تکثیر است.

طراحی پروب موضوعی بسیار تخصصی بوده و باید قبل از طراحی و استفاده از پروب‌ها مد نظر قرار گیرند. ما باید در نظر داشته باشیم که: (۱) اگر می‌خواهیم مقدار DNA را بسنجیم، mRNA را پروفایل کرده و یا سنجش‌های افتراق آلی را انجام دهیم، (۲) چه خواص شیمیایی برای مطالعه ما مناسب‌تر است، (۳) آیا می‌خواهیم DNA یا RNA را بسنجیم و یا هردو، (۴) آیا برای شناسایی و تعیین کمی یک عامل بیماری‌زا مشخص که به یک خانواده با چندین گونه تعلق دارد، تمایز بین توالی‌های نزدیک به هم ضروری است، (۵) کدام ترکیب از مولکول‌های گزارش‌گر / کوئنچر را باید استفاده کرد، (۶) این که آیا پروب ما حاوی آنالوگ‌های DNA، عوامل MGB یا هرگونه تغییرات دیگری باشد یا خیر و (۷) آیا روش سنجش، مولتی پلکس هست یا خیر.<sup>(۵۸)</sup>

امروزه، ابزارهای کامپیوتری متعددی جهت طراحی روش‌های qPCR و آنالیز داده‌های کمی حاصله به‌صورت آنلاین و رایگان گسترش یافته‌اند. برخی از ابزارهای کامپیوتری شامل Primer3، نرم‌افزارهای FastPCR، ابزارهای وب جاوا، PerlPrimer، ابزارهای IDTSci، Uniprimer و پرایمر بلاست می‌باشند. به‌علاوه، آنالیز ساختار دوم پرایمرها با استفاده از یک برنامه ثانویه مثل mFold حائز اهمیت است. MPprimer برنامه‌ای است که برای طراحی پرایمر Multiplex PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد. این برنامه از نرم‌افزارهای Primer3 برای طراحی پرایمر و MFEprimer برای بررسی اختصاصیت پرایمر بهره می‌گیرد.<sup>(۵۹،۵۸)</sup>

لازم به ذکر است، جهت طراحی پروب و پرایمر و آنالیز DNA ارگانسیم‌های عالی‌تر، باید از نواحی پیچیده موجود در ژنوم نظیر عناصر تکرارشونده (LINEs, SINEs, Alu) ژن‌های کاذب و دوپلیکاسیون‌های بزرگ اجتناب شود.<sup>(۶۰-۵۸)</sup>

#### \* بحث و نتیجه‌گیری:

هدف از این مقاله مروری؛ جمع‌آوری، طبقه‌بندی و به

اسید نوکلئیک (PNA, LNA, ZNAs) میل پیوندی و نیز اختصاصیت بسیار بالایی را برای اتصال به DNA و RNA به نمایش گذاشته‌اند. علاوه بر این، پرایمرها و پروب‌های حاوی نوکلئوتیدهای تغییر یافته ویژگی‌های بدیع و جالب توجهی را همچون مقاومت در برابر نوکلئازها یا پروتئازها و نیز نسبت به تغییرات PH و یا نیروی یونی نشان داده‌اند.<sup>(۶۰-۵۹)</sup>

### \*سپاس‌گزاری:

بدین‌وسیله از همکاری اعضای محترم گروه ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران که در هدایت این مطالعه ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

### \*مراجع:

- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10(4): 413-7.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11(9): 1026-30.
- Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29(3): 151-9.
- Logan J, Edwards KJ, Saunders NA. *Real-time PCR: current technology and applications*. Horizon Scientific Press; London, 1st ed. 2009; 28-115.
- Karbalaie Niya MH, Mokhtari Azad T, Shafiei Jandaghi NZ, Yavarian J. Detection of oseltamivir resistant influenza A/H3N2 viruses by Real-time RT-PCR. *Razi J Med Sci* 2015; 22(133): 64-9. [In Persian]
- Sadeghi F, Salehi-Vaziri M, Alizadeh A, Ghodsi SM, Bokharaei-Salim F, Fateh A, et al. Detection of merkel cell polyomavirus large T-antigen sequences in human central

نمایش گذاشتن اطلاعات در دسترس و دانش موجود در ارتباط با جنبه‌های شیمیایی تشخیصی qPCR در سال‌های اخیر است که منجر به پیشبرد موفق و جامع آنالیز DNA وابسته به PCR شده است. اگرچه برخی نویسندگان قبلاً نیز این اطلاعات را توصیف کرده‌اند، اما این مقاله مروری طبقه‌بندی مفید و توصیف دقیقی را از همه این روش‌های تشخیصی ارائه داده است. این روش‌ها براساس عامل فلورسنت به کار رفته و اختصاصیت تشخیصی PCR به دو گروه اصلی طبقه‌بندی شده‌اند که عبارت‌اند از؛ عوامل فضا گیرنده و فلوروفورهای متصل شده به الیگونوکلئوتیدها. فلوروفورهای متصل‌شونده به الیگونوکلئوتیدها براساس نوع مولکول‌های فلورسنت اضافه شده به واکنش به سه زیرگروه تقسیم‌بندی شده‌اند که شامل؛ پرایمر- پروب‌ها، پروب‌ها و آنالوگ‌های نوکلئیک اسیدها می‌باشند. علاوه بر ساختار و مکانیسم عمل، مزایا و کاربردهای مربوط به هر روش تشخیصی DNA نیز در این مقاله شرح داده شده است.

اخیراً چندین روش نوین برای شناسایی DNA در Real-time PCR مطرح شده است، ولی در این عرصه گرایش به سمت معرفی مولکول‌های جدیدی همچون لیگاندهای MGB یا ترکیب سیستم‌های خاصی از PCR سوق گرفته است تا موجب تقویت اختصاصیت و حساسیت اتصال DNA شود. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، استفاده از لیگاندهای MGB موجب افزایش پیک منحنی ذوب پرایمر- پروب شده تا اختصاصیت آن برای واکنش با توالی هدف DNA را افزایش دهد.<sup>(۵۷-۵۹)</sup> این رخداد، پروب‌های MGB را جهت استفاده در تشخیص پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی و افتراق آلی به‌عنوان گزینه‌ای مناسب مطرح می‌سازد. جالب این‌که ترکیب عوامل اینترکاله در DNA دو رشته (SYBR® Gold) با پرایمر- پروب‌های فلورسنت در یک واکنش به‌طور فزاینده‌ای در مطالعه‌ها و جهت تشخیص فرآورده‌های تکثیر یافته اختصاصی و غیراختصاصی رایج شده است. از سوی دیگر، آنالوگ‌های

- nervous system tumors. *J Med Virol* 2015; 87(7): 1241-7. doi: 10.1002/jmv.24178.
7. Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem* 2005; 40(4): 219-59.
- 8 Fraga D, Meulia T, Fenster S. Current protocols: essential laboratory techniques. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ; 2008. 10.3.1-3.40. doi: 10.1002/9780470089941.et1003s08
9. Sadeghi F, Salehi-Vaziri M, Ghodsi SM, Alizadeh A, Bokharaei-Salim F, Saroukalaei ST, et al. Prevalence of JC polyomavirus large T antigen sequences among Iranian patients with central nervous system tumors. *Arch Virol* 2015; 160(1): 61-8. doi: 10.1007/s00705-014-2230-0.
10. Wang W, Chen K, Xu C. DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument. *Anal Biochem* 2006; 356(2): 303-5.
11. Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(19): e127.
12. Ahmad AI, Ghasemi JB. New unsymmetrical cyanine dyes for real-time thermal cycling. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389(3): 983-8.
13. Eischeid AC. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Res Notes* 2011; 4: 263. doi: 10.1186/1756-0500-4-263.
14. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5(2): 209-19.
15. Mao F, Leung WY, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 76.
16. Monis PT, Giglio S, Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem* 2005; 340(1): 24-34.
17. Akiyama H, Nakamura F, Yamada C, Nakamura K, Nakajima O, Kawakami H, et al. A screening method for the detection of the 35S promoter and the nopaline synthase terminator in genetically modified organisms in a real-time multiplex polymerase chain reaction using high-resolution melting-curve analysis. *Biol Pharm Bull* 2009; 32(11): 1824-9.
18. Li YD, Chu ZZ, Liu XG, Jing HC, Liu YG, Hao DY. A cost-effective high-resolution melting approach using the EvaGreen dye for DNA polymorphism detection and genotyping in plants. *J Integr Plant Biol* 2010; 52(12): 1036-42. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.01001.x.
19. Miotke L, Lau BT, Rumma RT, Ji HP. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Anal Chem* 2014; 86(5): 2618-24. doi: 10.1021/ac403843j.
20. Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(12): 2516-21.
21. Atac R, Spink S, Calloway T, Foxlin E. Scorpion hybrid optical based inertial tracker (HOBIT) test results. *SPIE*

- Defense+ Security. International Society for Optics and Photonics. 90860U, 2014; doi: 10.1117/12.2050363
22. Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* 1999; 17(8): 804-7.
23. Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Nat Acad Sci* 1989; 86(16): 6230-4.
24. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons in diagnostics. *F1000 Med Rep* 2012; 4:10. doi: 10.3410/M4-10.
25. Naserpour Farivar T, Johari P, Najafipour R, Farzam A, Nasirian N, HajManouchehri F, et al. The relationship between gastric cancer and helicobacter pylori in formaldehyde fixed paraffin embedded gastric tissues of gastric cancer patients-scorpion real-time PCR assay findings. *Pathol Oncol Res* 2014; 20(1): 113-7. doi: 10.1007/s12253-013-9669-2.
26. Veldore VH, Rao RM, Kakara S, Pattanayak S, Tejaswi R, Sahoo R, et al. Epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung carcinomas: A retrospective analysis of 1036 lung cancer specimens from a network of tertiary cancer care centers in India. *Indian J Cancer* 2013; 50(2):87-93. doi: 10.4103/0019-509X.117013.
27. Zhang Z, Xiao H, Xie F, Zhang H, Chen C, Xiao H, et al. High-incidence of PTEN mutations in Chinese patients with primary small cell carcinoma of the esophagus. *BMC Cancer* 2014; 14: 19. doi: 10.1186/1471-2407-14-19.
28. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22: 176-81.
29. Weissenborn SJ, Wieland U, Junk M, Pfister H. Quantification of beta-human papillomavirus DNA by real-time PCR. *Nat Protoc* 2010; 5(1): 1-13. doi: 10.1038/nprot.2009.153.
30. Oberste MS, Peñaranda S, Rogers SL, Henderson E, Nix WA. Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol* 2010; 49(1): 73-4. doi: 10.1016/j.jcv.2010.06.022.
31. Yan L, Yan P, Zhou J, Teng Q, Li Z. Establishing a TaqMan-based real-time PCR assay for the rapid detection and quantification of the newly emerged duck Tembusu virus. *Virol J* 2011; 8: 464. doi: 10.1186/1743-422X-8-464.
32. Fateh A, Aghasadeghi M, Siadat SD, Vaziri F, Sadeghi F, Fateh R, et al. Comparison of three different methods for detection of IL28 rs12979860 polymorphisms as a predictor of treatment outcome in patients with hepatitis C virus. *Osong Public Health Res Perspect* 2016; 7(2): 83-9. doi: 10.1016/j.phrp.2015.11.004.
33. Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan real-time PCR. *Clin Med Res* 2005; 3(3): 176-85.
34. Gravel A, Sinnett D, Flamand L. Frequency of chromosomally-integrated human herpesvirus 6 in children with acute lymphoblastic leukemia. *PloS One* 2013; 8(12): e84322. doi: 10.1371/journal.pone.0084322.
35. Wei ZH, Guo WH, Wu J, Suo WH, Fu GH. A nonsense mutation in the Xeroderma pigmentosum complementation group F (XPF) gene is associated with gastric

- carcinogenesis. *Gene* 2014; 537(2): 238-44. doi: 10.1016/j.gene.2013.12.061.
36. Buh Gašparič M, Tengs T, La Paz JL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve T, et al. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396(6): 2023-9. doi: 10.1007/s00216-009-3418-0.
37. Karbalaie Niya MH, Yavarian J, Shafiei Jandaghi NZ, Shahmahmoodi S, MokhtariAzad T, et al. Comparison of Real-Time RTPCR Assay with Direct Sequencing for detection of sensitivity or resistant to Oseltamivir in Influenza A/H3N2 viruses. *J Virol Antivir Res* 2014; 3(1): 1. doi: 10.4172/2324-8955.1000120.
38. Heller MJ, Morrison LE. Chemiluminescent and fluorescent probes for DNA hybridization systems; Rapid detection and identification of infectious agents. Academic Press Inc; Orlando, FL (USA). 1st ed. 1985; 19(21): 245-56.
39. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001; 31(5): 1106-16.
40. Bernard PS, Wittwer CT. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin Chem* 2000; 46(2): 147-8.
41. Osińska E, Golke A, Słońska A, Cymerys J, Bańbura M, Dzieciatkowski T. HybProbes-based real-time PCR assay for rapid detection of equine herpesvirus type 2 DNA. *Pol J Vet Sci* 2012; 15(3): 411-6.
42. Schabereiter-Gurtner C, Hufnagl P, Sonvilla G, Selitsch B, Rotter M, Makristathis A, et al. Evaluation of a novel internally controlled real-time PCR assay targeting the 16S rRNA gene for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* infections. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(5): 480-6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.01962.x.
43. Bonnet G, Tyagi S, Libchaber A, Kramer FR. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(11): 6171-6.
44. Huang Q, Liu Z, Liao Y, Chen X, Zhang Y, Li Q. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS One* 2011; 6(4): e19206. doi: 10.1371/journal.pone.0019206.
45. French DJ, Archard CL, Brown T, McDowell DG. HyBeacon™ probes: a new tool for DNA sequence detection and allele discrimination. *Mol Cell Probes* 2001; 15(6): 363-74.
46. French DJ, Archard CL, Andersen MT, McDowell DG. Ultra-rapid DNA analysis using HyBeacon™ probes and direct PCR amplification from saliva. *Mol Cell Probes* 2002; 16(5): 319-26.
47. French DJ, Jones D, McDowell DG, Thomson JA, Debenham PG. Analysis of multiple single nucleotide polymorphisms closely positioned in the ovine PRNP gene using linear fluorescent probes and melting curve analysis. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 90.
48. Howard R, Leathart JB, French DJ, Krishan E, Kohnke H, Wadelius M, et al. Genotyping for CYP2C9 and VKORC1 alleles by a novel point of care assay with HyBeacon® probes. *Clin Chim Acta* 2011; 412(23-24): 2063-9. doi: 10.1016/j.cca.2011.07.013.
49. Petersson B, Nielsen BB, Rasmussen H, Larsen IK, Gajhede M, Nielsen PE, et al. Crystal structure of a partly self-Complementary peptide nucleic acid (PNA)

- oligomer showing a duplex-triplex network. *J Am Chem Soc* 2005; 127(5): 1424-30.
50. Vester B, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* 2004; 43(42): 13233-41.
51. Kauppinen S, Vester B, Wengel J. Locked nucleic acid: high-affinity targeting of complementary RNA for RNomics. *Handb Exp Pharmacol* 2006; (173): 405-22.
52. Frieden M, Hansen HF, Koch T. Nuclease stability of LNA oligonucleotides and LNA-DNA chimeras. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2003; 22(5-8): 1041-3.
53. Kaur H, Arora A, Wengel J, Maiti S. Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry* 2006; 45(23): 7347-55.
54. Wang Q, Wang X, Zhang J, Song G. LNA real-time PCR probe quantification of hepatitis B virus DNA. *Exp Ther Med* 2012; 3(3): 503-8.
55. Morandi L, de Biase D, Visani M, Cesari V, De Maglio G, Pizzolitto S, et al. Allele specific locked nucleic acid quantitative PCR (ASLNAqPCR): an accurate and cost-effective assay to diagnose and quantify KRAS and BRAF mutation. *PLoS One* 2012; 7(4): e36084. doi: 10.1371/journal.pone.0036084.
56. Bratu DP, Catrina IE, Marras SA. Tiny molecular beacons for in vivo mRNA detection. *Methods Mol Biol* 2011; 714: 141-57. doi: 10.1007/978-1-61779-005-8\_9.
57. Catrina IE, Marras SA, Bratu DP. Tiny molecular beacons: LNA/2'-O-methyl RNA chimeric probes for imaging dynamic mRNA processes in living cells. *ACS Chem Biol* 2012; 7(9): 1586-95.
58. Kalendar R1, Lee D, Schulman AH. FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Methods Mol Biol* 2014; 1116: 271-302. doi: 10.1007/978-1-62703-764-8\_18.
59. Wang X, Seed B. High-throughput primer and probe design. *Real-time PCR*. 2006; 1: 93-106.
60. Bustin SA. AZ of quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line, United Kingdom; 2004(5): 185-248.