

Comparison of Real-time PCR fluorescent and non-fluorescent quenchers in standard amplification plots of delta-6 desaturase gene in PANC-1 cell line culture

M. Sahmani* M. Darabi** SH. Byagowi*** R. Najafipour****
T. Naserpour Farivar***** M. Darabi Amin*****

*Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

**Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

***M.Sc. in Medical Biotechnology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

****Assistant Professor of Genetics, Cellular and Molecular Research Center University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

*****Professor of Microbiology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

*****Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Maragheh Faculty of Medical Sciences, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Abstract

Background: Employing non-fluorescent quenchers in Real-time PCR is appropriate for gene expression examination.

Objective: The objective of this study was to compare Real-time PCR fluorescent and non-fluorescent quenchers in standard amplification plots of delta-6 desaturase gene in PANC-1 cell line culture.

Methods: This analytical study was conducted in the Reference Laboratory affiliated to Qazvin University of Medical Sciences in 2012. Human pancreatic cancer cells (PANC-1) were cultured in 75 cm² flasks, 3x10⁶ cells were seeded in 6-well plates and were treated with specific intracellular signaling drugs. Changes in expression of delta-6 desaturase gene were examined with fluorescent and non-fluorescent quenchers using Real-time PCR in equal conditions, separately. Data were analyzed using student T-test and gene expression results were analyzed using $\Delta\Delta CT$ method with the assumption of 100% efficiency.

Findings: Employed quenchers showed different absorption of the fluorescence emitted by the reporter and caused different results in Real-time PCR. Using non-fluorescent quencher, the amplification plot was more precise and its baseline was lower. Therefore the signal to noise ratio (S/N) was decreased. Also, the Threshold cycle (Ct) value was lower because of increased T_m (melting temperature) and decreased non-specific bindings.

Conclusion: With regards to the results, non-fluorescent quencher is more appropriate compared to fluorescent quencher and can be a better alternative for current quenchers especially in allelic discrimination and SNP (single nucleotide polymorphism) studies.

Keywords: Real-Time PCR, Delta-6 Desaturase, Cell line

Corresponding Address: Maryam Darabi, Tabriz University of Medical Sciences, Drug Applied Research Center, Tabriz, Iran

Email: mdarabiamin@hotmail.com

Tel: +98-912-8803471

Received: 24 Apr 2013

Accepted: 11 Sep 2013

مقایسه خاموش‌کننده‌های فلورسنت و غیرفلورسنت روش Real-time PCR در پلات‌های آمپلیفیکیشن استاندارد ژن دلتا-۶ دساتوراز در کشت سلولی رده PANC-1

دکتر مهدی سهمانی* دکتر مسعود دارابی** شیما بیباغی*** دکتر رضا نجفی‌پور**** دکتر تقی ناصرپور فریور***** دکتر مریم دارابی امین*****

* استادیار بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** استادیار بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
*** کارشناس ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
**** استادیار ژنتیک مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
***** استاد میکروبی‌شناسی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
***** استادیار بیوشیمی بالینی دانشکده علوم پزشکی مراغه و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

آدرس نویسنده مسؤؤل: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، تلفن ۰۹۱۲۸۸۰۳۴۷۱

Email: mdarabiamin@hotmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۴

* چکیده

زمینه: استفاده از خاموش‌کننده‌های غیرفلورسنت در روش Real-time PCR برای بررسی بیان ژن مناسب است.
هدف: مطالعه به منظور مقایسه توانایی دو نوع خاموش‌کننده فلورسنت و غیرفلورسنت با توجه به نتایج Real-time PCR انجام شد.
مواد و روش‌ها: این مطالعه تحلیلی در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه رفرنس دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. سلول‌های سرطانی پانکراس انسان (PANC-1) در فلاسک‌های ۷۵ سانتی‌متری کشت و تکثیر شدند. سپس 3×10^6 سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای تحت تأثیر داروهای مؤثر بر سیگنال‌های خاص درون سلولی قرار گرفتند و میزان تغییر بیان ژن دلتا-۶ دساتوراز در شرایط یکسان، یک بار با خاموش‌کننده فلورسنت و بار دیگر با خاموش‌کننده غیرفلورسنت با روش Real-time PCR بررسی شد. داده‌ها با آزمون آماری تی و براساس روش $\Delta\Delta CT$ با فرض کارایی ۱۰۰ درصد تحلیل شدند.
یافته‌ها: خاموش‌کننده‌های فوق، با جذب متفاوت نشر گزارش‌گر (Reporter)، باعث تفاوت در نتایج حاصل از Real-time PCR شدند. پلات آمپلیفیکیشن هنگام استفاده از خاموش‌کننده غیرفلورسنت، دقیق‌تر و میزان خط پایه (Base line) پایین‌تر بود و به این ترتیب نسبت سیگنال به noise کاهش یافت. با استفاده از خاموش‌کننده غیرفلورسنت، به دلیل افزایش دمای ذوب (T_m) و کاهش اتصالات غیراختصاصی، میزان عددی دوره آستانه (CT) نیز کاهش یافت.
نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، استفاده از خاموش‌کننده غیرفلورسنت نسبت به فلورسنت مناسب‌تر و جای‌گزین بهتری برای خاموش‌کننده‌های متداول، به خصوص در مطالعه‌های تشخیصی آلل‌ها و SNP (single nucleotide polymorphism) بود.

کلیدواژه‌ها: Real-time PCR، دلتا-۶ دساتوراز، رده سلولی

* مقدمه:

بسیاری از زمینه‌های کاربردی و تحقیقی شد. در سال ۱۹۹۶ شرکت ABI (Applied Biosystems)، روش Real-time PCR را به عنوان حساس‌ترین روش برای آشکارسازی اسیدهای نوکلئیک معرفی کرد.^(۱) این روش کمی‌سازی دقیق را به کمک مولکول‌های فلورسنت فراهم

پس از ابداع روش PCR توسط کری مولیس در سال ۱۹۸۳، تحول‌های اساسی در زیست‌شناسی پایه و کاربردی به وجود آمد. اگرچه PCR روشی ساده و با محدودیت‌های مشهودی بود، ولی نوآوری‌های با ارزش در طول زمان باعث پیشرفت و به کارگیری آن در

پروپ خاموش کننده فلورسنت رایج‌ترین خاموش کننده مورد استفاده در Real-time PCR است. این خاموش کننده یک رنگ فلورسنت است که معمولاً به همراه گزارش‌گر FAM به کار می‌رود. در گذشته از این دو به عنوان جفت رایج در Real-time استفاده می‌شد، ولی امروزه نوع دیگری از خاموش کننده‌ها به نام خاموش کننده غیرفلورسنت (MGB-NFQ) پیشنهاد می‌شود. MGB-NFQ فاقد نشر فلورسانس است و بدین ترتیب با کاهش دادن فلورسانت پس زمینه و کم کردن تداخل‌های نشری باعث افزایش شدت سیگنال نهایی و در نتیجه افزایش دقت آزمایش می‌شود. همچنین استفاده از این نوع خاموش کننده در مواقعی که همزمان از چند گزارش‌گر استفاده می‌شود (هیبریدیژاسیون مولتی پلکس) باعث خاموش کردن طیف نشری آن‌ها بدون تداخل می‌شود و در حقیقت به علت قدرت پوشش دهی بالاتر طیف نشری، در اجرای مطالعه‌های مربوط به بیان ژن‌ها و تشخیص توالی‌های DNA و موتاسیون‌ها مناسب‌تر است.^(۳) مزیت دیگر، افزایش دمای ذوب (Tm) به علت بخش متصل شونده به شیار کوچک DNA در انتهای ۳' آن است.^(۴) این امر امکان استفاده از پروپ کوتاه‌تر را نیز فراهم می‌کند (پروپ غیرفلورسنت با طول ۱۳ تا ۲۲ نسبت به طول ۲۰ تا ۳۵ در پروپ فلورسنت) که باعث افزایش دقت اتصال پروپ می‌شود.^(۵) به گونه‌ای که کم‌تر از ۱۰ نسخه را نیز تشخیص می‌دهد. در حقیقت با افزایش دمای ذوب، اختلاف بیش‌تری در مقادیر Tm بین پروپ‌هایی که درست یا نادرست متصل شده‌اند، آرایه می‌شود که در تشخیص آلل‌ها (Allelic discrimination) و ژنوتایپینگ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدها، اهمیت زیادی دارد.^(۶) در کل، امروزه استفاده از این نوع پروپ نسبت به انواع دیگر بیش‌تر توصیه می‌شود.^(۷)

دلتا-۶ دساتوراز اولین آنزیم و آنزیم محدودکننده در مسیر تبدیل اسید لینولئیک به اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره‌های طولانی است و به نظر می‌رسد این دساتوراز با تغییر ترکیب اسیدهای چرب غشای سلولی، نقش

می‌کند؛ به طوری که میزان فلورسانس در طول هر سیکل اندازه‌گیری می‌شود و متناسب با مقدار محصول PCR است.

امروزه این شرکت با توسعه شیمی Real-time، روش‌های آشکارسازی Taq Man و SYBR Green را فراهم کرده است. SYBR Green روش غیراختصاصی است که در آن رنگ فلورسانس به تمام انواع DNA های دو رشته‌ای موجود، متصل می‌شود. ولی در روش Taq Man، با کمک پروپ‌های نشاندار فلورسانس که ویژه توالی خاصی هستند، آشکارسازی به صورت اختصاصی انجام می‌شود و در آن یک گزارش‌گر به ناحیه ۵' و یک خاموش کننده به ناحیه ۳' پروپ متصل می‌شود.^(۸) قبل از اتصال پروپ، خاموش کننده انرژی نور نشری را به وسیله انتقال انرژی رزونانس فلورسانس (FRET) از گزارش‌گر جذب و سیگنال مولکول گزارش‌گر را خاموش می‌کند. در حقیقت FRET فرایندی است که طی آن انرژی بدون آزاد شدن نور، از یک فلوروفورر تهییج شده به ملکول پذیرنده در همسایگی آن انتقال می‌یابد. در صورت وجود توالی هدف و قرار گرفتن پروپ در جایگاه اختصاصی خود، پروپ به وسیله فعالیت اگزونوکلازی ۵' به Taq ۳' پلیمرز، تجزیه و گزارش‌گر و خاموش کننده از هم جدا می‌شوند. در نهایت رنگ فلورسانس در این لحظه منتشر می‌شود که متناسب با مقدار محصول تولید شده طی PCR است. مؤثر بودن انتقال انرژی در اینجا به فاصله فیزیکی گزارش‌گر و خاموش کننده و میزان هم‌پوشانی بین تشعشع گزارش‌گر و جذب آن طیف توسط خاموش کننده بستگی دارد. محدوده خاموشی برای هر جفت گزارش‌گر و خاموش کننده در پروپ اختصاصی حدود ۳۰ تا ۷۰ انگستروم است. دو نوع پروپ Taq Man توسط شرکت ABI پیشنهاد شده است:

- پروپ خاموش کننده فلورسنت (tetramethyl rhodamine, acronym, TAMRA)
- پروپ خاموش کننده غیرفلورسنت (minor groove - binder, MGB - NFQ)

شاهد استفاده شد. مجدداً سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کشت برای هر خانه از پلیت به صورت سه تایی (triplicate) انجام شد. RNA با استفاده از QIAamp RNA Purification (QIAGEN) استخراج و برای اطمینان از عدم آلودگی با DNA، از کیت افزایش‌دهنده خلوص RNA حاوی DNaseI (RNase-Free DNase Set Kit, QIAGEN) استفاده شد. میزان RNA توسط اسپکتروفتومتر NanoDropND-1000 (Technologies, Wilmington, DE, USA) اندازه‌گیری و برای اطمینان از کیفیت RNA از الکتروفورز با ژل ۱/۵ درصد آگارز به همراه سایبرگرین و Fast digest green buffer (fermentase) استفاده شد. برای سنتز cDNA از کیت Maxima first strand cDNA synthesis Kit (Fermentase) استفاده شد. سپس ۱۰ میکرومول از RNA تام، Reaction Mix و آنزیم به حجم نهایی ۲۰ میکرومول رسید و در دستگاه ترموسایکلر ۹۶ خانگی (Veriti 96 Well, Applied Biosystems) قرار گرفت. انکوباسیون به صورت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه، ۱۵ دقیقه در ۵۰ درجه و ۵ دقیقه در ۸۵ درجه انجام شد. با استفاده از یک شاهد حاوی همه مواد به جز آنزیم، از نبود آلودگی اطمینان حاصل شد. میزان cDNA سنتز شده با اسپکتروفتومتر (جذب ۲۶۰ نانومتر) و نانودراپ اندازه‌گیری شد و برای اطمینان از کیفیت cDNA، از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. پرایمر و پروب‌ها طراحی و برای اطمینان BLAST انجام شد. بخشی از cDNA سنتز شده با پروب حاوی TAMRA و بخشی با پروب حاوی NFQ-MGB بررسی شد.

توالی پرایمر و پروب:

Forward primer (F), Reverse primer (R), Probe (P)

FADS2 (NM_004265)

F 5'-TTACAACATCACCAAATGGTCCAT-3'

R 5'-GAAGGCATCCGTTGCATCTT-3'

P 5'-CCAGCGGGTTCATCGGGCACTAC-3'

GAPDH (NM_002046)

مهمی در فعالیت گیرنده های غشایی سلول مانند گیرنده انسولین دارد.^(۹) شایان ذکر است که در تحقیق‌های انجام شده بر روی این ژن، تاکنون از خاموش‌کننده‌های غیرفلورسنت استفاده نشده و خاموش‌کننده فلورسنت متداول مورد استفاده، TAMRA بوده است.^(۱۰-۱۲) لذا این مطالعه با هدف مقایسه توانایی دو نوع خاموش‌کننده فلورسنت و غیرفلورسنت با توجه به نتایج Real-time PCR انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تحلیلی در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه رفرنس دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. داروهای PD98059، AG1478 و GW0742 که هر یک تأثیر اختصاصی و متفاوتی بر عملکرد سیگنال‌های سلولی مسیر ERK-MAPK و EGFR دارند از شرکت سیگما خریداری شد. برای بررسی تغییر بیان ژن دلتا-۶ دساتوراز، رده سلولی PANC-1 (سلول‌های سرطانی پانکراس انسان) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شد. سلول‌ها در فلاسک ۷۵ سانتی‌متری در محیط کشت RPMI1640+Glutamax حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور مرطوب حاوی ۵ درصد CO₂ و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. وقتی سلول‌ها ۸۰ تا ۹۰ درصد کف فلاسک را اشغال کردند، توسط مخلوط Trypsin-EDTA به پلیت‌های ۶ خانه‌ای منتقل شدند. ۳×۱۰^۶ سلول در هر خانه با ۲ میلی‌لیتر محیط کشت تازه حاوی سرم، رشد داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد محیط کشت تعویض و محیط تازه به همراه داروهای مربوط (به صورت تکی و ترکیبی) به پلیت اضافه شد. محلول داروها در رقت‌های مناسب در DMSO تهیه شد؛ به گونه‌ای که میزان DMSO بالاتر از ۱/۱ درصد از محیط کشت نباشد. از محیط کشت بدون دارو (فقط حاوی DMSO) به عنوان

در تحقیق حاضر، بیان ژن مربوط به آنزیم دلتا-۶ دساتوراز توسط داروهای مؤثر بر سیگنال‌های EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) و ERK- MAPK (Mitogen Activated Proteinkinases) تغییر پیدا می‌کند و این تغییر بیان با روش Real-time PCR به طور کمی اندازه‌گیری می‌شود.

* یافته‌ها:

مقایسه نتایج محاسبات مربوط به خاموش کننده‌های فلورسنت و غیرفلورسنت پس از Real time PCR در مورد ژن هدف و کنترل داخلی نشان داد که علی‌رغم کارایی بالاتر خاموش کننده‌های غیرفلورسنت نسبت به فلورسنت، تفاوت این دو روش از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول شماره ۱).

جدول ۱- مقایسه نتایج محاسبات مربوط به خاموش کننده‌های فلورسنت و غیرفلورسنت پس از Real time PCR

ژن هدف	تعداد	خاموش کننده	میانگین	سطح معنی‌داری
گلیسیرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز	۵	TAMRA MGB-NFQ	۳۰/۶۷±۲/۳۶	۰/۴۶
	۵		۲۷/۹۳±۲/۶۴	۰/۴۵
دلتا ۶ دساتوراز	۵	TAMRA MGB-NFQ	۲۸/۹۱±۲/۳۷	۰/۴۶
	۵		۲۵/۹۷±۲/۸۴	۰/۴۵

با توجه به مقادیر R^2 در نمودار منحنی استاندارد ژن دساتوراز، استفاده از خاموش کننده‌های غیرفلورسنت کارایی بهتری داشت (نمودارهای شماره ۱ و ۲).

F 5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3'
R 5'-TGGGATTTCCATTGATGACAAG-3'
P 5'-CGTTCTCAGCCTTGACGGTGCCA-3'
cDNA به میزان ۱۰ نانوگرم برای Real-time PCR

رقیق شد. ۲ میکرومول از cDNA رقیق شده، ۱۰ میکرومول Taq Man Universal Master Mix II with assaymix (Applied Biosystems)، ۲ میکرومول UNG و ۶ میکرومول آب دیونیزه به حجم ۲۰ میکرومول رسید. Assay Mix حاوی ۲۰۰ نانومول از پرایمر sense و antisense و ۱۰۰ نانومول از پروب‌های مربوطه بود.

شرایط انکوباسیون به صورت ۲ دقیقه در ۵۰ درجه، ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه و ۴۰ سیکل به صورت ۱۵ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه، و یک سیکل به مدت ۱ دقیقه در ۶۰ درجه به صورت سه تایی در پلیت ۹۶ خانه‌ای و در دستگاه 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) انجام شد.

کنترل داخلی مورد استفاده GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphat dehydrogenase) بود. همچنین از ۵ رقت مختلف استاندارد برای هر ژن (دلتا-۶ دساتوراز و GAPDH) به صورت سه تایی استفاده شد. در این مرحله برای حصول اطمینان از عدم آلودگی، یک شاهد حاوی همه مواد به جز cDNA به کار رفت. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS با ویرایش ۱۳ و آزمون آماری تی بررسی و نمودارهای آمپلیفیکیشن استاندارد براساس روش $\Delta\Delta CT$ رسم و نتایج با فرض کارایی ۱۰۰ درصد تحلیل شد.

در این مطالعه برای مقایسه دو نوع خاموش کننده فلورسنت و غیرفلورسنت، پس از انجام Real-time PCR از دوره‌های آستانه حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم پلات‌های آمپلیفیکیشن استاندارد ژن دلتا-۶ دساتوراز (و ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی) استفاده شد. بیان ژن هدف نسبت به ژن رفرانس براساس فرمول Pfaffl method انجام شد.

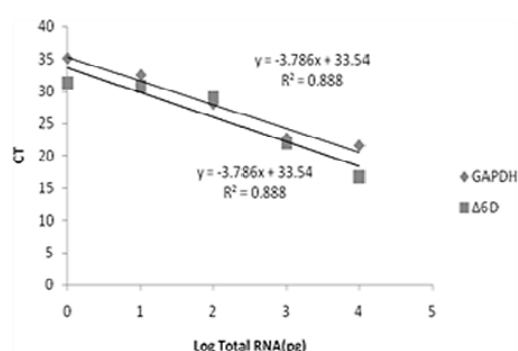
* بحث و نتیجه گیری:

بررسی حاضر نشان داد که استفاده از خاموش کننده‌های غیرفلورسنت نسبت به فلورسنت کارایی بیشتری در بررسی بیان ژن در روش Real-time PCR دارد. در مطالعه‌های گذشته مقایسه خاموش کننده‌های فلورسنت و غیرفلورسنت از نظر حساسیت، اختصاصیت و محدوده عملکردی در نمونه‌های انسانی، تأثیر پیچیدگی نمونه DNA را در نتیجه نهایی PCR نشان داده است، ولی این تأثیر در هنگام استفاده از MGB-NFQ کم‌تر بوده است.^(۷) همچنین تاکنون در بررسی‌های انجام شده بر روی ژن دلتا-۶ دساتوراز و تمامی ایزوفرم‌های آن، از خاموش کننده غیرفلورسنت استفاده نشده و همواره از خاموش کننده‌های فلورسنت استفاده شد.^(۱۳)

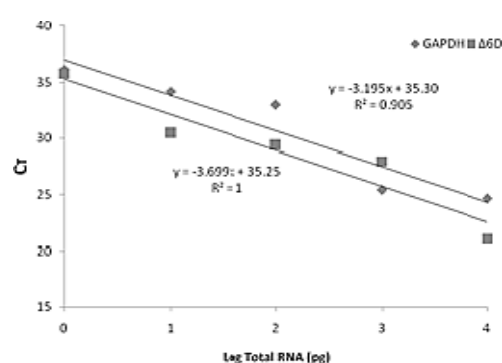
نتایج این مطالعه نشان‌دهنده پایین آمدن (خط Base line پایه) در نمودار مربوط به خاموش کننده غیرفلورسنت بود که این مسأله با توجه به کاهش خطا و حذف تداخلات پس زمینه‌ای، منطقی به نظر می‌رسد. همچنین در میزان دوره آستانه نیز به علت اتصال دقیق‌تر و افزایش نسخه‌برداری، کاهش عددی دیده شد که این نتایج در رابطه با تفاوت خاموش کننده‌ها، با پژوهش‌های قبلی در این زمینه همخوانی دارد.^(۷،۶)

در مطالعه‌های اخیر، مشخص شده است که پروب‌های MGB-NFQ به علت تفاوت‌های ساختاری که ذکر شد، بسیار حساس‌تر عمل می‌کنند. از معیارهای سنجش کارایی پروب می‌توان به نسبت سیگنال به noise اشاره کرد (S/N)، که این نسبت در پروب غیرفلورسنت بسیار بالاتر است. افزایش دمای ذوب (Tm)، کاهش فلورسنس پس زمینه، کاهش اتصال‌های غیراختصاصی و طراحی آسان‌تر و کوتاه‌تر از دیگر مزایای این پروب‌ها هستند.^(۱۴) نتایج نمودارهای رسم شده در هر گروه، قابل قبول و در محدوده نرمال بود، ولی تفاوت‌ها برای یک نتیجه‌گیری کلی نشان‌دهنده کاهش عددی میزان دوره آستانه و پایین آمدن خط پایه در پلات مربوط به خاموش کننده غیرفلورسنت بود. با مقایسه پلات‌های استاندارد می‌توان

نمودار ۱- استاندارد خاموش کننده فلورسنت

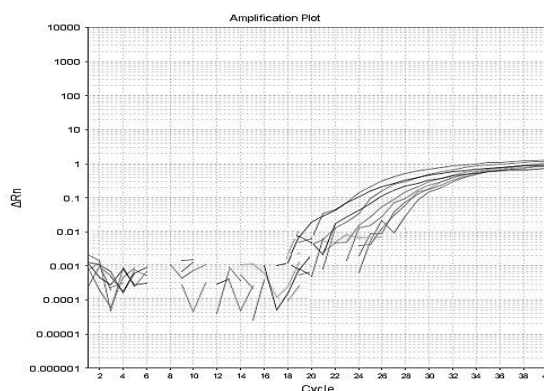


نمودار ۲- استاندارد خاموش کننده غیرفلورسنت



نمودار پلات آمپلیفیکیشن هنگام استفاده از خاموش کننده غیرفلورسنت نشان داد که پروب غیرفلورسنت با کاهش عددی دوره آستانه، میزان نسخه‌برداری را افزایش داد (نمودار شماره ۳).

نمودار ۳- میزان نسخه‌برداری خاموش کننده غیرفلورسنت



6. Belousov YS, Welch RA, Sanders S. Single nucleotide polymorphism genotyping by two colour melting curve analysis using the MGB Eclipse™ Probe System in challenging sequence environment. *Human Genomics* 2004; 1 (3): 209–17
7. Yao Y, Nellaker C, Karlsson H. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. *Mol Cell Probes* 2006 Oct; 20 (5): 311-6
8. Smith SA. Peroxisome proliferator-activated receptors and the regulation of mammalian lipid metabolism. *Biochem Soc Trans* 2009 Nov; 30 (Pt 6): 1086-90
9. Qin X, Xie X, Fan Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 2008 Aug; 48 (2): 432-41
10. Mc Namara RK, Liu Y, Jandacek R, et al. The aging human orbitofrontal cortex: Decreasing polyunsaturated fatty acid composition and associated increases in lipogenic gene expression and stearyl-CoA desaturase activity. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008 Apr-May; 78 (4-5): 293–304
11. Minge CE, Robker RL, Norman RJ. PPAR Gamma: coordinating metabolic and immune contributions to female fertility. *PPAR Res* 2008; 2008: 243791
12. McNamara RK, Jandacek R, Rider T, et al. Deficits in docosahexaenoic acid and associated elevations in the metabolism of arachidonic acid and saturated fatty acids in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Psychiatry Res* 2008 Sep 30; 160 (3): 285-99

این گونه نتیجه‌گیری کرد که استفاده از MGB-NFQ به عنوان خاموش کننده غیرفلورسنت نسبت به خاموش کننده‌های متداول مانند TAMRA به خصوص در مطالعه‌های تشخیصی آل‌ها و ژنوتایپینگ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدها مناسب‌تر است. با این حال برای توجیه کامل‌تر به مطالعه‌های پیش‌تری نیاز است.

* سپاس‌گزاری:

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی این دانشگاه انجام شده است.

* مراجع:

1. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996 Oct; 6 (10): 986-94
2. Livak KJ, Food SJ, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995 Jun; 4 (6): 357-62
3. May JP, Brown LJ, van Delft I, et al. Synthesis and evaluation of a new non-fluorescent quencher in fluorogenic oligonucleotide probes for real-time PCR. *Org Biomol Chem* 2005 Jul; 3 (14): 2534-42
4. Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, et al. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 1997 Jul 1; 25 (13): 2657-60
5. Kutyavin IV, Afonina IA, MillsA, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000 Jan 15; 28 (2): 655-61

13. Irina A. Afonina, Igor V. Kutyavin, Rich B. Meyer, Jr. Oligonucleotides containing pyrazolo [3,4-D] pyrimidines for hybridization and mismatch discrimination. *Analytical biochemistry* 2006; 169: 1-25

14. Pedrono F, Blanchard H, Kloareg M, et al. The fatty acid desaturase 3 gene encodes for different FADS3 protein isoforms in mammalian tissues. *J Lipid Res* 2010 Mar; 51 (3): 472-9