



بیان ژن و Real time PCR

تدوین و تالیف:

بهتیار مجرومی (کارشناس ارشد بیوتکنولوژی)

ویرایش اول _ خردادماه ۱۳۹۶



بیان ژن

مطالعه الگوی بیان ژن یکی از مراحل مهم زیست‌شناسی ملکولی مدرن است. تجزیه و تحلیل بیان ژن جزء جدانشدنی مطالعات ژنومیکس کاربردی در همه موجودات زنده بوده که شناخت بهتر فرآیندهای بیولوژیکی پیچیده، مسیرهای متابولیکی و پیام‌ها را که زمینه پاسخ‌های محیطی و رشد و نمو هستند، افزایش می‌دهد (Jain et al., 2006). در زیست‌شناسی نوین، آنالیز بیان ژن، برای جستجوی رونوشت‌هایی با سطح بیان پایین روز به روز اهمیت بیشتری پیدا می‌یابد. این رونوشت‌ها با مقادیر بسیار کم در زیست‌فناوری یا تشخیص بیماری‌ها کاربرد دارند (Bustin, 2000).

استخراج اسیدهای نوکلئیک نسبتاً خالص، یک روش بسیار مهم و یک عامل محدودکننده در آزمایش‌های بیان ژن می‌باشد. بافت‌های گیاهی دارای ترکیبات مختلفی بوده که استخراج RNA را با مشکل مواجه می‌کند. خالص‌سازی اسیدهای نوکلئیک از بافت‌های گیاهی اغلب با آلودگی‌های پلی ساکارییدی، پلی فنلی و متابولیت‌های ثانویه همراه است که این عوامل مانع به دست آوردن RNA باکیفیت می‌شود. این آلودگی‌ها در استفاده‌های بعدی از RNA برای آزمایش‌های نوردرن بلات، رونویسی معکوس و بیان ژن باعث بروز مشکل می‌شوند که با استفاده از روش‌های مختلف استخراج RNA، سعی بر کاهش این آلودگی‌ها صورت می‌گیرد (Dal cin et al., 2005). قبل از اندازه‌گیری بیان ژن برای نمونه‌ها، باید mRNA توسط واکنش رونویسی معکوس به cDNA تبدیل شود (Stahlberg et al., 2004). به‌هرحال اندازه‌گیری کمی سطوح بیان ژن‌ها به یکی از اصلی‌ترین آزمایش‌های زیست‌شناسی ملکولی تبدیل شده است. برای بسیاری از ژن‌ها میزان بیان از ژنی به ژن دیگر و از سلولی به سلول دیگر و یا در طول شرایط آزمایشی مختلف به‌طور چشمگیری تغییر می‌کند (Fraga, 2008).

مهم‌ترین روش‌هایی که به‌طور رایج برای ارزیابی بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل روش نوردرن بلات، ریزآرایه-

های cDNA، SAGE¹ و Real time PCR می‌باشند که در این میان، دو روش ریزآرایه‌های cDNA و Real time

PCR از محبوبیت بالایی برخوردار هستند. میزان بیان تعداد زیادی ژن در یک نمونه با روش ریزآرایه‌های cDNA قابل

بررسی می‌باشد ولی بیان ژن‌های انتخاب‌شده با حساسیت و دقت بسیار بالا با روش Real time PCR قابل‌اندازه‌گیری

¹ Serial Analysis of gene expression

می‌باشد (Stahlberg et al., 2004). با توجه به اینکه در این تحقیق از روش Real time PCR برای مطالعه بیان برخی ژن‌های دخیل در بیوسنتز ترپنوئیدها تحت تأثیر تنش سرما استفاده شده است، لذا این روش توضیح داده می‌شود.

روش Real time PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی)

اختراع و معرفی روش Real time PCR سبب انقلابی در روش‌های زیست‌شناسی مولکولی، خصوصاً مطالعات آنالیز بیان ژن گردیده است. از مهم‌ترین مزایای این روش می‌توان به حساسیت بالا و کمیت سنجی دقیق اشاره نمود (Jain et al., 2006). روش Real time PCR به‌عنوان روشی مناسب و دقیق برای مطالعه بیان ژن استفاده می‌شود. اساس این روش مبتنی بر سنجش کمی نسخه‌های تکثیرشده در PCR از طریق مرحله تصاعدی واکنش و سنجش میزان نشر نور فلورسانس می‌باشد (منصوری و همکاران، ۱۳۸۸). این روش ابتدا توسط Higuchi و همکاران در سال ۱۹۹۲ معرفی شد. از آنجایی که اسیدنوکلیک تکثیر یافته و مراحل تشخیص در یک محیط بسته انجام می‌شود؛ ریسک آلودگی نسبت به روش‌های کلاسیک و معمولی PCR کاهش می‌یابد. سرعت در انجام آزمایش، حذف مرحله ردیابی محصول پس از PCR، مشاهده لحظه به لحظه واکنش و قطع آن در هر زمان، حساسیت و اختصاصیت بالا در روش Real time PCR باعث تحول عظیم در تشخیص مولکولی میکروارگانیسم‌ها، بررسی بیان ژن‌ها، ارزیابی درمان، تشخیص جهش‌ها، افتراق آلی و بسیاری از کاربردهای دیگر شده است. همچنین این روش در تشخیص چندشکلی‌های ناشی از جهش‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) کاربرد دارد (Klein, 2002).

تمامی اصول و واکنش‌گرهایی که برای یک PCR معمولی مورد نیاز است؛ در Real time PCR هم بکار می‌رود اما یک گزارشگر فلورسنت نیز در واکنش حضور دارد. این گزارشگرها به‌گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر محصول، نور تولید کنند. لذا افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول به‌دست آمده نسبت مستقیم دارد. معمولاً اگر واکنش بهینه‌سازی شده باشد، در ۳ تا ۱۵ چرخه ابتدایی تغییر چندانی در شدت فلورسنت دیده نمی‌شود. که به این ناحیه، خط پایه^۲

^۲ Base line



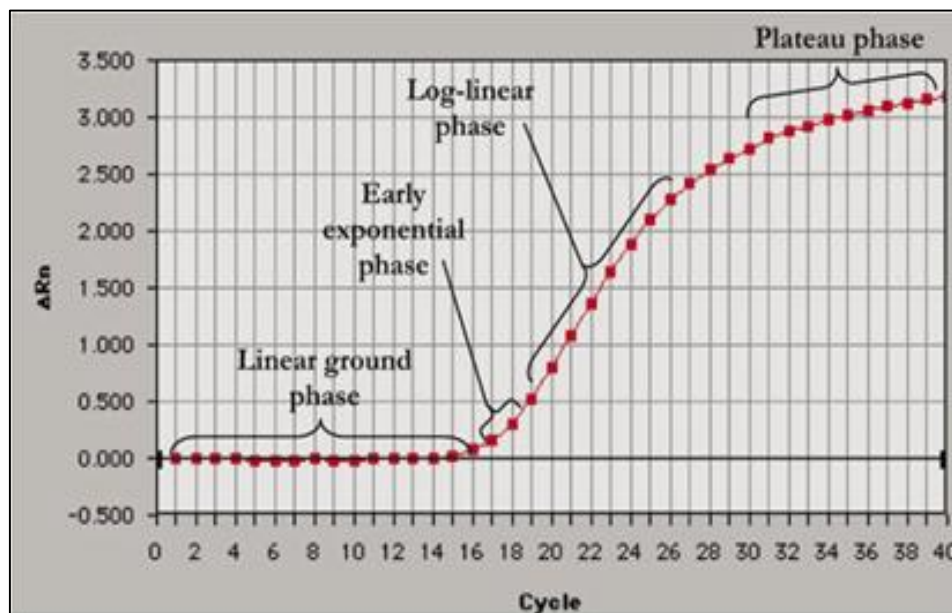
گویند. ولی در ادامه، شدت فلورسنت افزایش می‌یابد. مقدار سیگنال تولیدی در ابتدای مرحله دوم به‌صورت نمایی افزایش می‌یابد و زمانی که تکثیر از فاز نمایی به سمت فاز خطی پیش می‌رود، تعداد مولکول‌های پلیمرز محدود می‌شوند و کم‌کم واکنش Real time PCR به اتمام می‌رسد (Kubista *et al.*, 2006). به‌طور کلی Real time PCR چند مرحله دارد:

فاز اول (Linear ground): باوجود اینکه محصول دو رشته‌ای وجود دارد ولی نور آن قابل‌ردیابی نیست.

فاز دوم (Early exponential): محصول دو رشته‌ای در هر چرخه دو برابر می‌شود و رشد نمایی مربوط به واکنش شروع می‌شود و میزان فلورسنس به‌طور عمده‌ای نسبت به فاز اول افزایش می‌یابد.

فاز سوم (Log-linear): ترکیبات واکنش و کارایی آن‌ها رو به اتمام است.

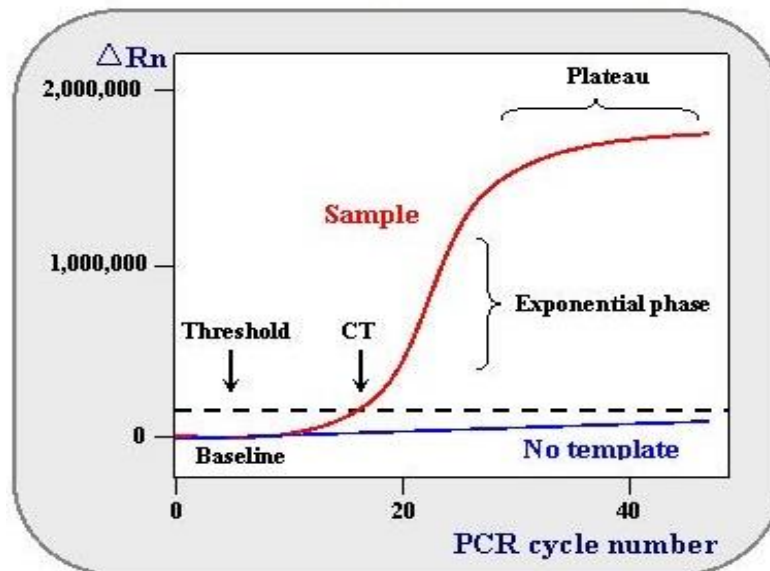
فاز چهارم (Plateau): ترکیبات و کارایی آن‌ها از بین می‌روند و افزایش در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود (Tichopad, 2004). (شکل ۱-۴)



شکل ۱- مراحل مختلف واکنش Real time PCR (Wong and Medrano, 2005)



اندازه‌گیری میزان بیان باید در مرحله‌ای که تکثیر در تمام نمونه‌ها در فاز خطی است، انجام گیرد. سطحی از سیگنال فلورسنت که در واکنش Real time PCR افزایش معنی‌داری به لحاظ آماری نسبت به سیگنال سطح پایه مشاهده می‌شود، Threshold می‌گویند (Heid *et al.*, 2015). به اولین چرخه‌هایی که شدت فلورسنت بیشتر از خط پایه باشد، چرخه آستانه یا C_T گویند. عدد C_T با مقدار الگوی اولیه رابطه معنی‌داری دارد و از روی آن می‌توان مقدار mRNA اولیه را تخمین زد. هر چه مقدار الگوی اولیه بیشتر باشد، مقدار C_T کم می‌شود. اگر بخواهیم با کمک این روش برآورد کمی از مقدار الگوی اولیه داشته باشیم، باید یک نمودار استاندارد رسم کنیم. ابتدا غلظت‌های مشخصی از یک نمونه معلوم تهیه و با دستگاه تکثیر و سپس منحنی استاندارد رسم می‌کنیم و با تکثیر و ارزیابی C_T برای نمونه مجهول می‌توان غلظت رونوشت اولیه را به دست آورد. پس از انجام واکنش Real time PCR؛ می‌توان برای صحت انجام تکثیر، محصول Real time PCR را روی الکتروفورز ژل آگارز بررسی نموده و پس از عکس‌برداری، باند موردنظر را مشاهده کرد (Michael *et al.*, 2006; Wong and Medrano, 2005). (شکل ۱-۵)



شکل ۲- منحنی واکنش Real time PCR که Threshold و C_T روی آن مشخص است (Heid *et al.*, 2015)

³ Threshold Cycle



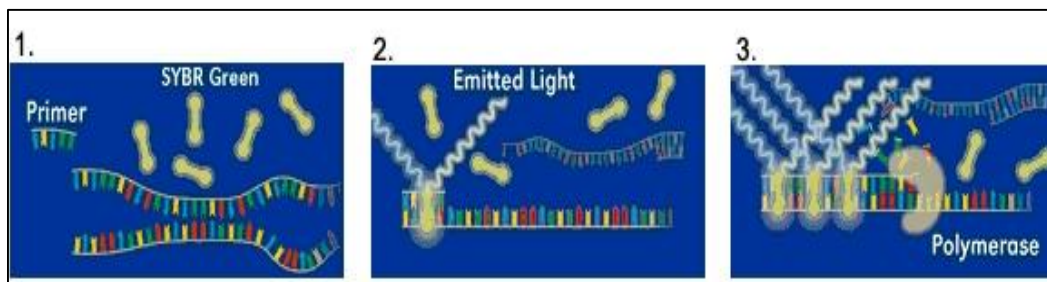
روش‌های شناسایی فرآورده‌های حاصل از تکثیر در Real time PCR

این روش‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند: روش‌های مبتنی بر استفاده از رنگ‌های متصل شونده به DNA و روش‌های مبتنی بر کاوشگرها که در ذیل توضیح داده می‌شود.

روش‌های مبتنی بر استفاده از رنگ‌های متصل شونده به DNA

از رنگ‌های متصل شونده به DNA می‌توان به SYBR Green I، YO-PRO-1 و Eva Green اشاره نمود. رنگ SYBR Green I از رنگ‌های فلورسنت بوده و به الگوهای تک‌رشته‌ای متصل نمی‌شود لذا در این موارد بازتاب ضعیفی دارد. در طی چرخه‌های PCR که محصول دو رشته‌ای تولید می‌شود، این رنگ به آن‌ها متصل شده و در نتیجه افزایش شدت فلورسنت با غلظت DNA دو رشته‌ای متناسب بوده که توسط دستگاه ثبت می‌شود. این رنگ غیراختصاصی بوده لذا برای تمامی آزمایش‌ها قابل استفاده است. از مزایای آن می‌توان به عدم تداخل با پلیمرها، ساده و غیر سمی بودن آن اشاره نمود. به همین دلیل نمی‌توان وجود محصولات غیراختصاصی یا آغازگر دایمر را به کمک این رنگ تشخیص داد. البته استفاده از نمودار منحنی ذوب در دستگاه‌های امروزی، این مشکل را تا حدودی مرتفع کرده است. به‌طور خلاصه واکنش Real time PCR با رنگ سایبرگرین شامل مراحل زیر می‌باشد:

۱. در ابتدای واکنش که مولکول‌های رنگی به DNA متصل نشده‌اند، فلورسنت ضعیفی ساطع می‌شود.
۲. بعد از اتصال آغازگرها، مولکول‌های رنگی به شیارهای کوچک DNA دو رشته‌ای متصل می‌شوند که به محض جذب طول موج ۴۹۸ نانومتر، نور ۵۲۲ نانومتری را ساطع می‌کند.
۳. در طول بسط، مولکول‌های رنگی بیشتری متصل می‌شوند و یک افزایش در میزان فلورسنت مشاهده می‌شود. به محض واسرشت شدن، برای چرخه بعدی مولکول‌های رنگی آزاد می‌شوند و تشعشعات فلورسنت کاهش می‌یابد. این رنگ تحت شرایط PCR، پایدار و باثبات باقی می‌ماند. سطح مطلوبی از درجه حرارت موجب تنظیم القاء و نشر طول موج می‌شود (Dubrana, 2001). (شکل ۶-۱)



شکل ۳- شمایی از انجام Real time PCR با سایبر گرین (Dubrana, 2001)

روش‌های مبتنی بر کاوشگرهای Hydrolysis

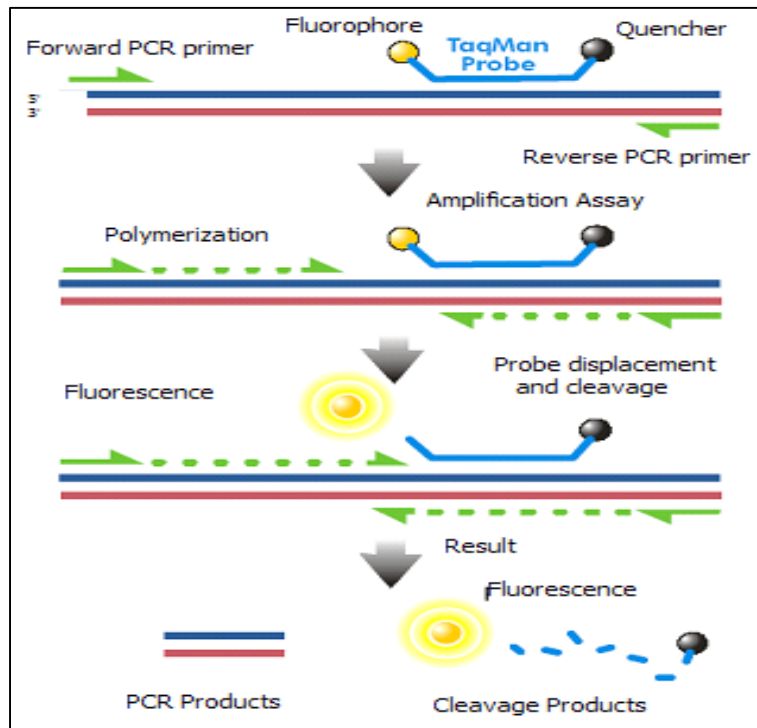
به‌طور کلی تفاوت کاوشگرها در این است که یک رنگ فلورسنت به نام گزارشگر^۴ در انتهای^۵ و رنگ فلورسنت دیگری به نام خاموشگر^۵ در انتهای^۳ تعبیه می‌شود. هنگامی که گزارشگر و خاموشگر در فاصله نزدیکی از هم قرار دارند (در حالت عادی کاوشگر)، اگر نوری از گزارشگر ساطع شود، توسط خاموشگر جذب شده و ثبت نمی‌گردد، ولی به محض جدا شدن این دو رنگ (در نتیجه تکثیر و شکسته شدن کاوشگر) نور ساطع شده توسط گزارشگر، به وسیله خاموشگر قابل جذب نیست و توسط دستگاه به صورت فلورسانت قابل ارزیابی و اندازه‌گیری است.

کاوشگر Taq Man

در این روش علاوه بر دو آغازگری که در PCR سنتی برای تکثیر رشته الگو به کار می‌رود؛ یک کاوشگر از کاوشگرهای هیدرولیزی به‌طور اختصاصی در محلی در پایین دست آغازگر به ناحیه هدف متصل می‌شود. این کاوشگر دارای دو قسمت است؛ رنگ گزارشگر که به انتهای^۵ کاوشگر متصل شده و رنگ خاموشگر در انتهای^۳ آن. تا زمانی که گزارشگر و خاموشگر در فاصله مناسبی از هم باشند، خاموشگر از تشعشع فلورسنت ممانعت می‌کند. در واقع وقتی که آنزیم تک DNA پلیمرز شروع به سنتز از قسمت^۳ آغازگر می‌کند، به کاوشگر رسیده و با فعالیت اگزونوکلئازی کاوشگر را از قسمت^۵ تخریب می‌کند و فاصله دو قسمت مذکور افزایش یافته و در نهایت فلورسنت ساطع می‌شود (Dubrana, 2001) (شکل ۷-۱)

^۴ Reporter

^۵ Quencher



شکل ۴- چگونگی عملکرد کاوشگر TaqMan در روش Real time PCR (Dubrana, 2001)

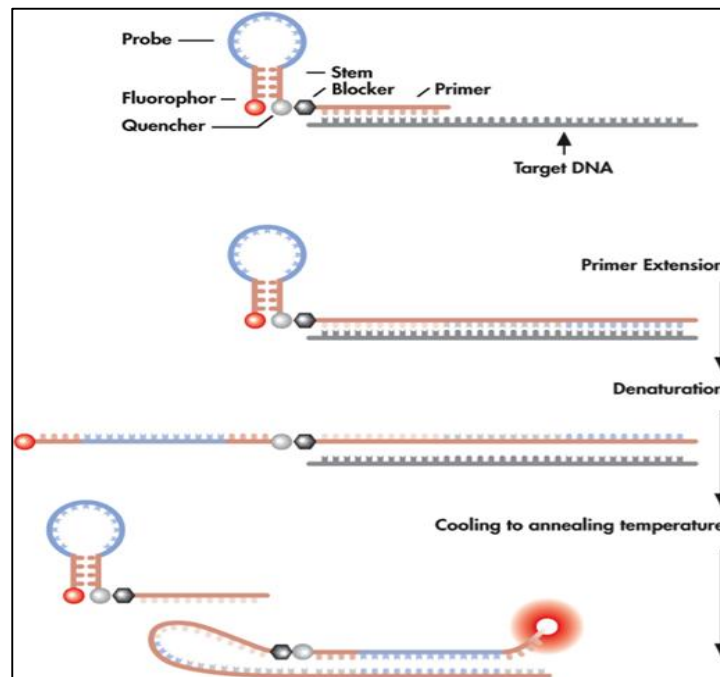
کاوشگر Scorpions

توالی کاوشگر طوری طراحی می‌شود که مکمل تعدادی از نوکلئوتیدها بعد از محل اتصال آغازگر رفت^۶ می‌باشد. دو طرف کاوشگر شامل توالی شش نوکلئوتیدی است که در دمای محیط ایجاد ملکول دو رشته‌ای می‌نماید. انتهای ۵' ساقه به صورت کووالان به گزارشگر و انتهای ۳' به خاموشگر متصل می‌باشد. همچنین در محل اتصال آغازگر با کاوشگر اسکورپین، یک قسمت مسدودکننده وجود دارد که شامل مونومری است که آنزیم DNA پلیمراز قادر به بسط از این قسمت نخواهد بود. هنگامی که کاوشگر به صورت دو رشته‌ای است، نور ساطع نمی‌شود. جهت‌گیری کاوشگر به صورتی است که انتهای ۵' آن مکمل انتهای ۳' هدف می‌باشد. در طول چرخه‌های PCR همزمان با اتصال آغازگرها، لوپ کاوشگر باز و به قسمت تکثیرشده از چرخه قبل متصل می‌شود و در نتیجه به علت جدا شدن گزارشگر از خاموشگر نور ساطع می‌شود. در مرحله بعد، کاوشگر از

⁶ Forward



الگو جدا شده و به حالت خاموش درمی آید. به این ترتیب در هر مرحله از اتصال، با افزایش محصول فلورسانس نیز افزایش می یابد (Thelwell *et al.*, 2000) (شکل ۱-۸).



شکل ۵- چگونگی عملکرد کاوشگر Scorpions در Real time PCR (Mcperson and Moller, 2006)

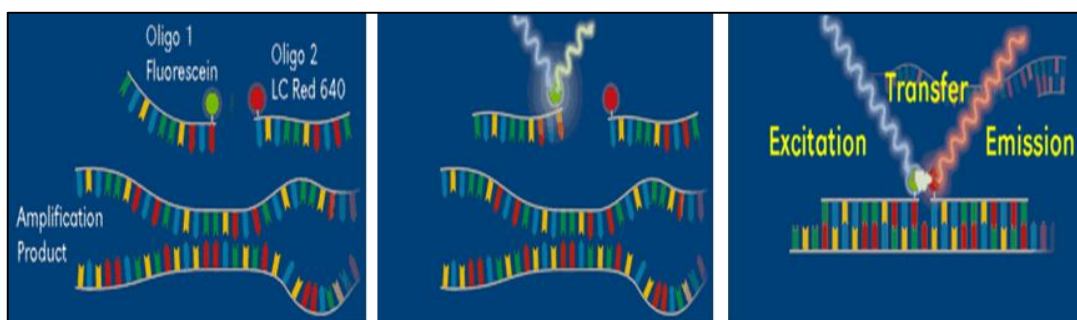
روش مبتنی بر Hybridization

در این سیستم که اصطلاحاً FRET^۷ نیز نامیده می شود، کاوشگر به صورت دو قطعه مختلف طراحی می شود و رنگ فلورسانت در انتهای ۵' یکی و انتهای ۳' دیگری قرار می گیرد. وقتی این دو رنگ پس از چسبیدن کاوشگر در کنار هم قرار می گیرند، فلورسنت ساطع شده توسط دستگاه اندازه گیری می شود. انتخاب یکی از رنگ ها در این کاوشگر به صورتی است که طول موج ساطع شده از یکی به عنوان محرک دیگری عمل می کند (شکل ۱-۹).

⁷ Fluorescent resonance energy transfer



طراحی این کاوشگرها به نحوی است که در صورت تفاوت حتی در یک نوکلئوتید، کاوشگر به DNA متصل نمی‌شود. یکی از کاربردهای این کاوشگرها در تشخیص SNPها می‌باشد. در جهش‌های نقطه‌ای چون باز جهش‌یافته مکمل باز موردنظر نیست، اتصال صورت نمی‌گیرد (Bernard and wittwer, 2000).



شکل ۶- شمای از انجام Real time PCR با روش هیبریداسیون (Haugland et al., 2002)

نرمال‌سازی داده‌ها در Real time PCR

در مطالعات آنالیز بیان ژن در سطح رونوشت‌ها، نرمال‌سازی نمونه‌های آزمایشی جهت به حداقل رساندن خطای نمونه‌برداری، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این خطاها اصولاً در طی مراحل آزمایش شامل مراحل نمونه‌برداری، استخراج RNA، ساخت cDNA و غیره رخ می‌دهند (Dheda et al., 2004). روش‌های مختلفی برای برآورد و رفع این خطاها پیشنهاد شده است. یکی از ساده‌ترین روش‌ها، نرمال‌سازی در سطح RNA بوده که خود نیاز به روش‌های کیت سنجی دقیق دارد. از این گذشته، این نوع نرمال‌سازی مراحل بعدی آنالیز یعنی ساخت cDNA، کارایی PCR و غیره را در برنمی‌گیرد. روش دیگر نرمال‌سازی، استفاده از ژن‌های مرجع یا مرجع می‌باشد که امروزه به‌طور گسترده استفاده می‌شود که خود به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مخاطرات در روش Real time PCR ارزیابی می‌شود. به‌طور کلی سطوح بیان ژن‌های مرجع در بین سلول‌های بافت‌های مختلف و تحت شرایط مختلف آزمایشی ثابت فرض می‌شود (Thellin et al., 1999). که در صورت نقض این فرض، نرمال‌سازی نمونه‌های آزمایشی تحت شعاع قرار گرفته و نتایج اشتباه دور از ذهن نخواهد بود (Bustin, 2000). بدین نحو که نوسانات تصادفی ژن‌های مرجع در بین نمونه‌ها منجر به عدم امکان تعیین اختلافات اندک ژن‌های



هدف خواهد گردید. از این گذشته در صورت تأثیرپذیری مستقیم این ژن‌ها نسبت به شرایط آزمایشگاهی و محیطی، فرآیند نرمال‌سازی با چالش مواجه می‌گردد (Dheda et al., 2004). فرآیند نرمال‌سازی با استفاده از ژن‌های مرجع درگیر در فرآیندهای ساختاری سلولی، نظیر *18S rRNA*⁸، یوبی کوئیتین⁹ (UBQ)، اکتین¹⁰ (ACT)، بتاتوبولین¹⁰ (TUB) و گلیسرآلدهید¹¹ (GAPDH) که از بیان یکنواختی برخوردار هستند، انجام می‌گیرد (Jain et al., 2006).

ویژگی‌های ژن‌های مرجع شامل این موارد می‌باشد:

(۱) در همه سلول‌ها تعداد کپی یکسانی داشته باشد. (۲) در همه سلول‌ها بیان شود. (۳) بیان ژن مرجع و ژن موردنظر باید متناسب باشند. اگر ژن موردنظر به میزان کم بیان می‌شود؛ نباید ژن مرجعی انتخاب کنیم که بیان زیادی دارد. در این صورت مقایسه یک مقدار کم با یک مقدار زیاد باعث افزایش خطای کار می‌شود. (۴) ژن مرجع نباید از تیمارگرهای واکنش و آزمایش تأثیر بپذیرد (Tricarico et al., 2002).

روش‌های تعیین کمیت با Real time PCR

تعیین کمی مقدار ژن بیان‌شده یکی از مهم‌ترین کاربردهای Real time PCR می‌باشد. آنالیز داده‌های حاصل از مطالعه بیان ژن با Real time PCR به دو روش نسبی و مطلق انجام می‌گیرد. انتخاب هر کدام از این روش‌ها به هدف تحقیق بستگی دارد و هر دو روش هم‌اکنون در تحقیقات ملکولی استفاده می‌شوند. روش مطلق تعداد واقعی کپی‌های ژن مورد مطالعه را در نمونه مشخص می‌کند و نیازمند تعیین منحنی استاندارد می‌باشد و اغلب برای تعیین تعداد کپی ویروسی استفاده می‌شود. این روش گران‌قیمت و دشوار می‌باشد. در روش نسبی میزان نسبی بیان ژن یا ژن‌های مورد مطالعه نسبت به حالت کنترل محاسبه می‌شود. این روش بیشتر در مطالعات مربوط به تعیین میزان بیان ژن استفاده می‌شود و به دو روش $\Delta\Delta CT$ و استفاده از منحنی استاندارد انجام می‌گیرد که در ذیل توضیح داده می‌شود.

⁸ Ubiquitin

⁹ Actin

¹⁰ B-tubulin

¹¹ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

کمیت سنجی نسبی^{۱۲}:

در این روش تعداد رونوشت ژن اندازه‌گیری نمی‌شود و کاهش یا افزایش بیان ژن به‌طور نسبی مورد بحث قرار می‌گیرد.

این کاهش یا افزایش با یک استاندارد یا ژن مرجع مقایسه می‌شود. در کمیت سنجی نسبی اطلاع از غلظت نمونه‌ها لازم نیست. این روش هم از نظر اقتصادی و هم از نظر زمانی مقرون به‌صرفه است. برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن‌ها از دو روش $\Delta\Delta CT$ و استفاده از منحنی استاندارد استفاده می‌شود (Pffafi, 2001). در روش $\Delta\Delta CT$ میزان نسبی بیان ژن‌ها به‌صورت زیر محاسبه می‌شود:

ΔCT (ژن نرمال کننده در همان نمونه) - CT (ژن مورد نظر در نمونه) = ΔCT (نمونه تیمار شده)

ΔCT (ژن نرمال کننده در شاهد) - CT (ژن مورد نظر در شاهد) = ΔCT (کنترل)

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (نمونه) - ΔCT (کنترل)

$R = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (میزان نسبی بیان ژن)

در روش منحنی استاندارد از تفاوت مقادیر C_t بین ژن مورد نظر در نمونه تیمار شده و شاهد استفاده می‌شود و از ژن مرجع نیز برای تصحیح و افزایش کارایی تکثیر استفاده می‌شود. در این روش برای محاسبه میزان کارایی از دو روش زیر استفاده می‌شود:

۱. بر اساس شیب خط و با استفاده از انجام PCR با رقت‌های مختلف.

۲. با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR که با مقایسه تکثیر cDNA در هر تیوب در هر چرخه نسبت به چرخه قبلی کارایی واکنش محاسبه می‌شود (Pffafi, 2001).

¹² Relative quantification

کمیت سنجی مطلق^{۱۳}

در این روش محاسبات تعداد کپی ژن معمولاً با استفاده از سیگنال Real time PCR نسبت به یک منحنی استاندارد به دست می‌آید. نمونه RNA یا DNA با غلظت مشخص رقیق می‌شود و به وسیله Real time PCR با حداقل سه تکرار تکثیر انجام می‌گیرد و C_t نمونه مجهول با منحنی استاندارد مقایسه می‌شود و غلظت آن مشخص می‌گردد (Guo *et al.*, 2008).

¹³ Absolute quantification



1. **Bernard, P. S. and Wittwer, C. T. (2000).** Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clinical Chemistry*, 46(2):147-148.
2. **Bustin, S. A. (2000).** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2):169-193.
3. **Dal Cin, V., Danesin, M., Rizzini, F. M. and Ramina, A. (2005).** RNA extraction from plant tissues. *Molecular Biotechnology*, 31(2):113-119.
4. **Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G. and Zumla, A. (2004).** Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37:112-114.
5. **Dubrana, K. (2001).** Examining the distribution of telomeric and DNA repair proteins by ChrIP and real time PCR. Mapping protein/DNA interactions by cross-linking [Internet]. Paris: Institut national de la sante et de la recherche medicale. 13P.
6. **Fraga, D., Meulia, T. and Fenster, S. (2008).** Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 3-10.
7. **Guo, X., Xia, X., Tang, R. and Wang, K. (2008).** Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe*, 14:224–228.
8. **Haugland, R.A., Brinkman, N. and Vesper, S.J. (2002).** Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 50:319–323.
9. **Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. (2015).** Real Time Quantitative PCR. *Genome research*, 986-994.
10. **Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992).** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4):413-417.
11. **Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K., and Khurana, J. P. (2006).** Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications*, 345(2):646-651.

12. **Klein, D. (2002).** Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257-260.
13. **Kubista, M., Manuel, B., Bengtsson, M., Forootan A., Jonac, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, A., Bjorn Sjogreen, D., Linda Stro, M., Stahlberg, A. and Zoric, N. (2006).** The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27:95-125.
14. **Mcperson, M.J. and Moller, S.G. (2006).** PCR Second Edition, Published by: Taylor and France Group. 209-231.
15. **Michael, J., Pherson, Mc. and Moller, S.G. (2006).** PCR Second Edition. Published by: Taylor & Francis Group. PP: 209-231.
16. **Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9):e45-e45.
17. **Stahlberg, A., Hakansson, J., Xian, X., Semb, H. and Kubista, M. (2004).** Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry*, 50(3):509-515.
18. **Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. and Heinen, E. (1999).** Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75:291-295.
19. **Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J. and Brown, T. (2000).** Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research*, 28(19):3752-3761.
20. **Tichopád, A. (2004).** Quantitative real-time RT-PCR based transcriptomics: Improvement of evaluation methods (Doctoral dissertation).
21. **Tricarico, C.P., Pinzani, S., Bianchi, M., Paglierani, V., Distante, M., Pazzagli, S., Bustin, A. and Orlando, C. (2002).** Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*, 309(2):293-300.
22. **Wong, M.L. and Medrano, J.F. (2005).** Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*, 39(1):75.