REAL TİME PCR'DA TAQMAN PROB YÖNTEMİYLE KANTİTATİF GEN ANALİZİ

Saltuk Buğrahan CEYHUN[1], Ercüment AKSAKAL[2], Gen KANEKO[3] Orhan ERDOĞAN[4], Hamit CEYLAN[4], Feyza İÇOĞLU[2]

[1] Atatürk Üniversitesi, Hınıs Meslek Yüksekokulu, Hınıs, Erzurum, Türkiye

[2] Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye

[3]Laboratory of Marine Biochemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan.

[4] Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye

Giriş

PCR, DNA veya cDNA üzerinde seçilen bir veya birden fazla bölgenin *in vitro* şartlarda çoğaltılması yöntemidir. 1986 yılında Mullis ve arkadaşlarının (1993 yılında kimya alanında Nobel ödülü aldıkları) moleküler düzeydeki çalışmalara çığır açan bu buluşundan zaman sonra Gradientli PCR, Multiplex PCR, Nested PCR gibi farklı uygulamalara yönelik PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bunların en önemlilerinden biri, Higuchi ve arkadaşlarının 1993 yılında kinetik PCR analizi adını verdikleri çalışmalarında real time PCR'ı keşfetmeleridir.

Real Time PCR adından da anlaşılacağı üzere PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan DNA veya cDNA'nın floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif tespitidir. PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan ürün miktarı, floresan boyaların verdiği sinyal ile doğru orantılı olarak artmakta ve hangi döngüde hangi oranda artışın olduğu reaksiyon esnasında belirlenebilmektedir. Floresan boyaların verdiği bu sinyal normal klasik PCR'dan farklı olarak cihaz içerisinde bulunan filtrelerden belirli dalga boylarında gönderilen ışığın absorbe edilmesi ile tespit

edilmektedir. Yani real time PCR klasik PCR'dan farklı olarak bünyesinde filtreler barındırmaktadır. Yine, real time PCR'da klasik PCR'daki gibi ürünün çoğaltılıp çoğaltılmadığının jel elektroforezi gibi yöntemlerle belirlenmesine gerek olmadığından kontaminasyon riski de azdır. Reaksiyon esnasında ürün amplifikasyonu miktarsal olarak izlenebilir. Real time PCR'da çoğaltılan ürünün kantitatif miktarı hakkında bilgi edinilmesine rağmen ürün uzunluğu hakkında bir bilgi edinilemez.

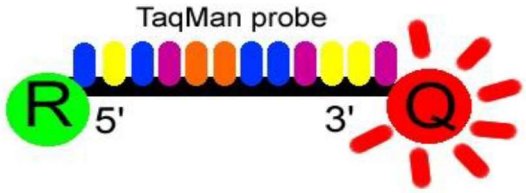
Özellikle son yıllarda gen ekspresyonu (veya mRNA seviyesi olarak da nitelendirilmektedir) tespitine yönelik çalışmalarda real time PCR'ın kullanımına literatürlerde sıklıkla rastlanmaktadır (Aksakal et al., 2010; Ceyhun et al. 2010; 2011a; 2011b; Ostaszewska et al., 2010; Ekinci et al., 2011; Beydemir et al. 2011; Erdoğan et al. 2011). Organizmalara ait dokulardan direkt izole edilen mRNA veya total RNA ardından mRNA izolasyonu ve sonrasında cDNA kütüphanesinin oluşturulması real time PCR'da kullanılacak olan genetik materyalin esasını teşkil etmektedir. cDNA kütüphanesi üzerinde ilgili gen/genlere ait bölgelerin amplifikasyonu ve bu cihazda gerçek zamanlı izlenmesi ürün miktarı hakkında bilgi vermektedir. Tabiki bu çalışmaların protein düzeyinde de tespiti sonuçların karşılaştırılması ve birlikte değerlendirilmesi açısından önem arz etmektedir.

Bu bölümde asıl olarak real time PCR çalışmalarında sıklıkla kullanılan TaqMan prob yöntemi, primer/prob dizaynları, primer etkinlik oranları, kullanılan matematiksel modeller ve elde sonuçların nasıl değerlendirildiği anlatılmıştır.

2. TaqMan Prob

Moleküler işaretleyiciler arasında en çok bilinen ve kullanılan TaqMan problar, amplifikasyon bölgesine özgü ve 5' ucunda floresan bir işaretçi boya (reporter), 3' ucunda ise bu floresan boyanın ışığını soğuran bir söndürücü veya soğurucu (quencher) bulunan nükleik asit dizileridir (Şekil 1). Söndürücünün yaptığı soğurma işlemi, bir floresan boyanın ışımasının, proton emisyonu olmaksızın bir

diğeri tarafından inhibe edilmesi olarak tanımlanan FRET (Floresan Rezonans Enerji Transferi) prensibine dayanır. Aslında bu olay, düşük dalga boylu yüksek enerjili bir floresan boyanın (ör. FAM (492 nm)) enerjisinin daha yüksek dalga boylu ve daha düşük enerjili diğer bir floresan boya (ör. TAMRA (559 nm)) tarafından soğrulması şeklinde özetlenebilir.



Şekil 1. TaqMan Prob

Floresan işaretleyici olarak çeşitli boyalar kullanmak mümkündür. Aşağıda reporter ve quencer olarak kullanılabilecek bazı boyalar ile uyarılma ve yayılma dalga boyları verilmiştir (Çizelge 1). Burada boya seçiminde ana prensip soğurucunun daha düşük enerjiye yani işaretçiden daha yüksek dalga boyuna sahip olmasıdır. Yapılan çalışmalarda, aynı dizi üzerindeki birden fazla bölgeye özgü dizayn edilen primer ve problar farklı boyalarla işaretlenerek reaksiyon çoklu (multiplex) olarak yürütülebilir. Bu sayede, reaksiyonlar arasında optimizasyonla ilgili tereddüt ortadan kalktığı gibi yüksek olan çalışma maliyeti de önemli ölçüde düşürülmüş olur.

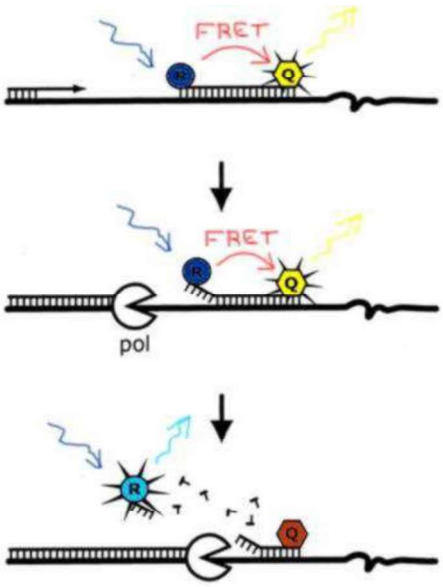
Çizelge 1. Reporter ve quencer olarak kullanılan bazı floresan boyalar ile uyarılma ve yayılma dalga boyları

Reporter		
Boya	**Uyarılma**	**Yayılma**
FAM	492	517
HEX	538	555
Cy3	550	564
ROX	588	608
TEX	596	613
Texas Red	598	617
Cy5	648	668

Quencer		
Boya	**Uyarılma**	**Yayılma**
TAMRA	559	583
BHQ-1	480	580
BHQ-2	550	650
BHQ-3	620	730
Iowa Black-FQ	420	620
Iowa Black-RQ	500	700

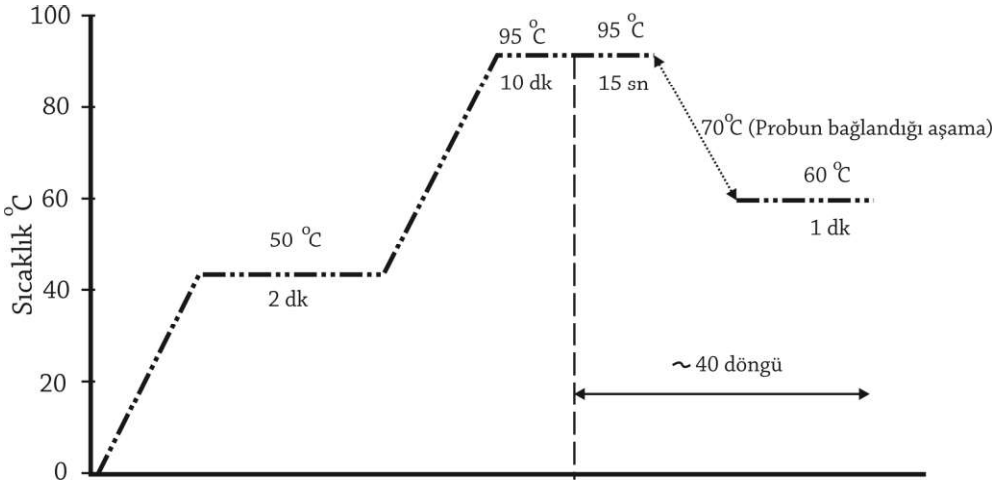
TaqMan yönteminde reaksiyon şu şekilde gerçekleşir; amplifikasyon bölgesine özgü primerlerin, amplifiye ettiği bölgenin içine bağlanacak şekilde tasarlanan TaqMan problar daha yüksek bağlanma sıcaklığında dizayn edilirler (~10^{0}C) ve primerlerle birlikte kullanılırlar. Öyle ki; kantitatif analiz çalışmalarında PCR işlemi denatürasyon ve bağlanma olmak üzere iki aşamalı olarak yürütülür. Denatürasyonun ardından cihaz reaksiyonu bağlanma sıcaklığına gelecek şekilde soğutmaya başlayacaktır.

Bu aşamada reaksiyon tüpü primerlerin bağlanma sıcaklığına (~ 60^{0}C) düşmeden önce probun bağlanma



Şekil 2. TaqMan Prob prensibi

sıcaklığından (~ 70 ^{0}C) geçecektir. Bu sayede TaqMan prob primerlerden daha önce hedef bölgeye bağlanacaktır. Bağlanma sıcaklığına gelindiğinde primerler bağlanacak ve kısa olan (genellikle 60-150 bp) hedef bölgeyi amplifiye etmeye başlayacaktır. Bu aşamada hedef bölgeye daha önce bağlanmış olan TaqMan prob, polimeraz enziminin 3'→5' eksonükleaz aktivitesi ile bulunduğu yerden koparılacaktır (Şekil 2). Bu sayede soğurucudan ayrılan boya ışıma verecektir ve döngü sonunda yapılan ölçümle ışıma miktarı tespit edilecek ve oluşan ürün miktarı kantitatif olarak tayin edilir (Şekil 3).

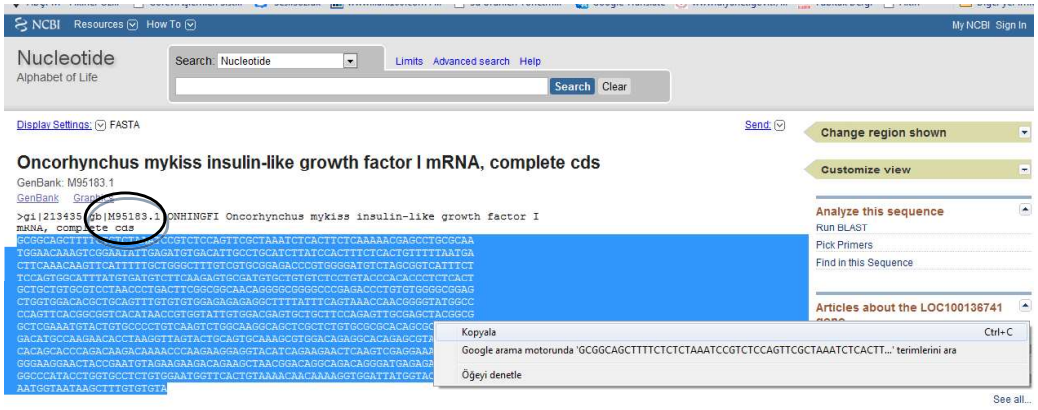


Şekil 3. Real time PCR protokolü ve TaqMan Probun bağlanması

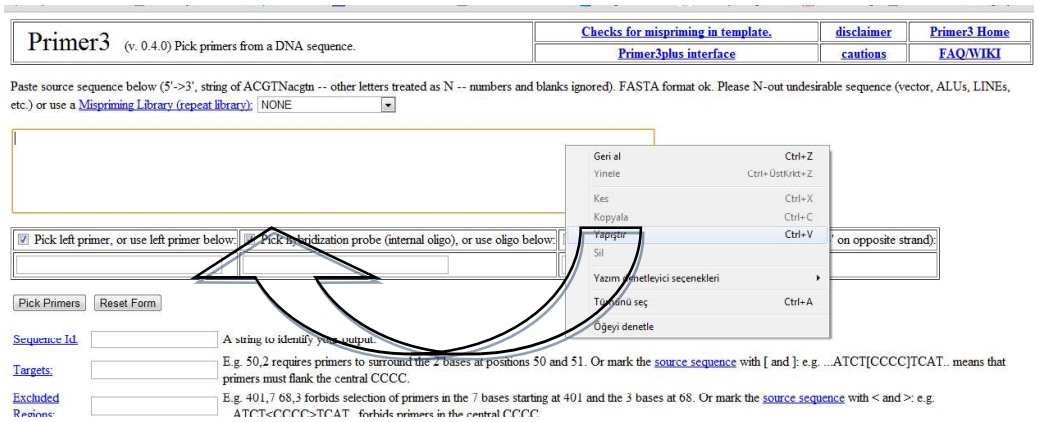
2.1. Primer ve Prob Dizaynı

Primer ve prob dizaynını şöyle özetleyebiliriz;

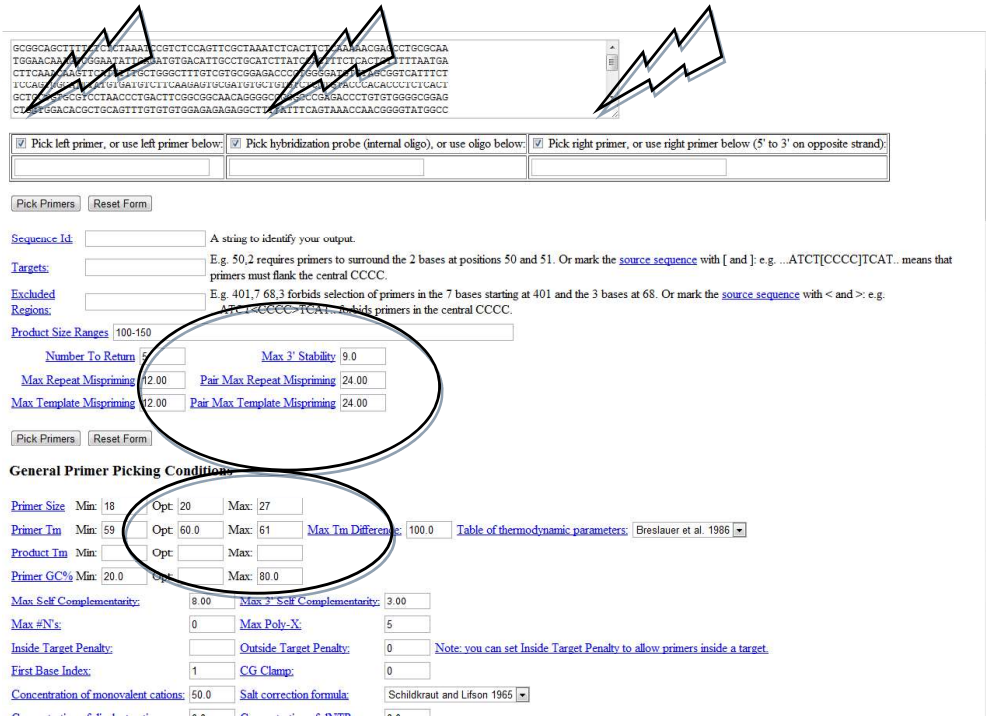
Gen bankasından ilgili bölgenin baz dizilimine ulaşılır, dizilim FASTA formatında kopyalanır.



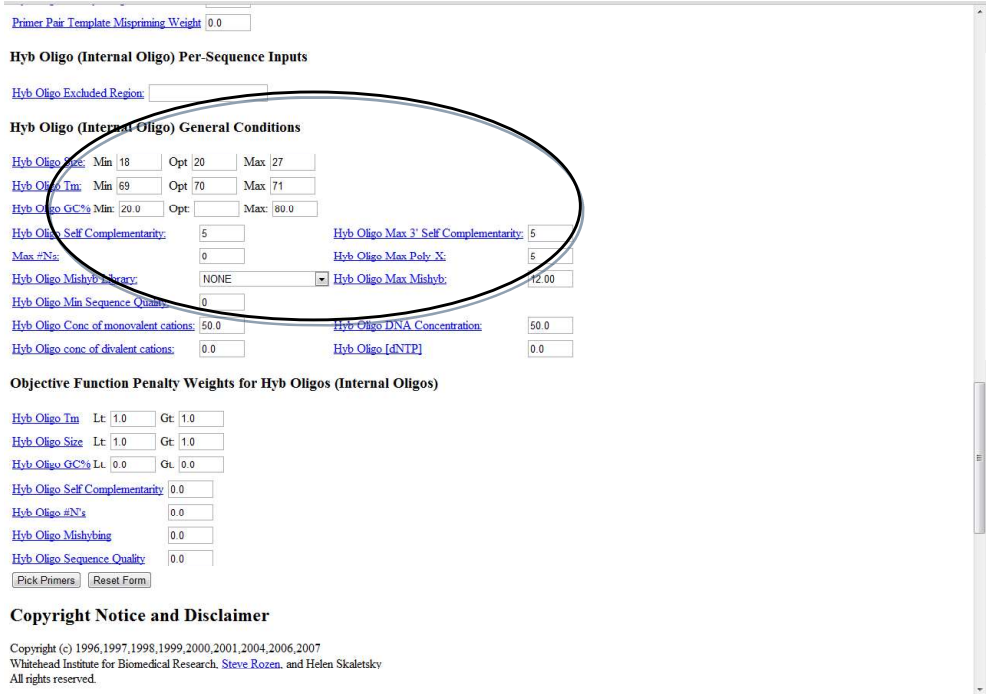
http://frodo.wi.mit.edu/primer3/ internet adresinden Primer3 programı açılır, kopyalanan dizilim ilgili yere yapıştırılır.



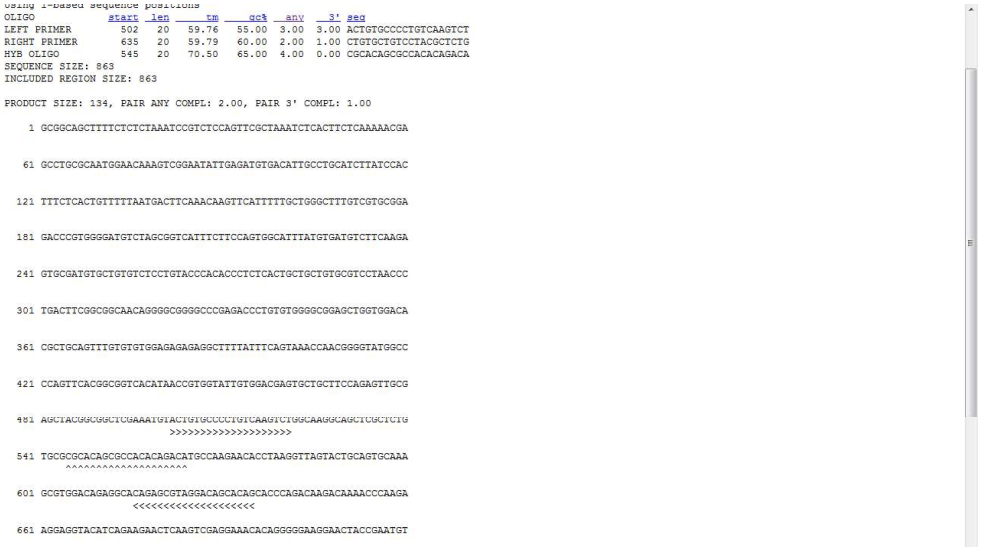
Pick left primer, Pick hybridization probe, Pick right primer kutucuklarının tamamı işaretlenir. Poduct Size Range kısmından ürü boyutu seçilir ve General Primer Picking Conditions kısmından tercih edilen bağlanma sıcaklığı aralığı, primerin boyutu, self complemantary ihtimalleri gibi seçimler yapılır.



Hyb Oligo (Internal Oligo) General Conditions kısmından proba ait tercih edilen bağlanma sıcaklığı aralığı, probun boyutu, self complemantary ihtimalleri gibi seçimler yapılır.



"Pick Primer" tıklanarak dizayn yapılır. Bu kısımda dizilimler, primer ve probun bağlandığı bölgeler, bağlanma sıcaklıkları vs. tüm bilgiler verilmektedir. Şayet programın dizayn ettiği dizilimler bizim kriterlerimize uygun değil ise daha alt kısımda verilen dizilimler kontrol edilir. Şayet onlarda bizi tatmin etmedi ise geri dönülerek, primerlerin ve/veya probun bağlanma sıcaklığı, ürün boyutu vs gibi değerler değiştirilerek istediğimiz niteliklere sahip primer ve prob takımı dizayn edebiliriz. Yapılacak çalışmaların sonuca ulaşmasında en önemli basamaklardan birisi olan primer ve prob dizaynına gereken önem verilmeli ve sabırla uygun dizilim elde edilmeye çalışılmalıdır.



```
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm     gc%   any    3'  seq
LEFT PRIMER        502   20   59.76   55.00  3.00  3.00 ACTGTGCCCCTGTCAAGTCT
RIGHT PRIMER       635   20   59.79   60.00  2.00  1.00 CTGTGCTGTCCTACGCTCTG
HYB OLIGO          545   20   70.50   65.00  4.00  0.00 CGCACAGCGCCACACAGACA
SEQUENCE SIZE: 863
INCLUDED REGION SIZE: 863

PRODUCT SIZE: 134, PAIR ANY COMPL: 2.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

    1 GCGGCAGCTTTTCTCTCTAAATCCGTCTCCAGTTCGCTAAATCTCACTTCTCAAAAACGA

   61 GCCTGCGCAATGGAACAAAGTCGGAATATTGAGATGTGACATTGCCTGCATCTTATCCAC

  121 TTTCTCACTGTTTTTAATGACTTCAAACAAGTTCATTTTTGCTGGGCTTTGTCGTGCGGA

  181 GACCCGTGGGGATGTCTAGCGGTCATTTCTTCCAGTGGCATTTATGTGATGTCTTCAAGA

  241 GTGCGATGTGCTGTGTCTCCTGTACCCACACCCTCTCACTGCTGCTGTGCGTCCTAACCC

  301 TGACTTCGGCGGCAACAGGGGCGGGGCCCGAGACCCTGTGTGGGGCGGAGCTGGTGGACA

  361 CGCTGCAGTTTGTGTGTGGAGAGAGAGGCTTTTATTTCAGTAAACCAACGGGGTATGGCC

  421 CCAGTTCACGGCGGTCACATAACCGTGGTATTGTGGACGAGTGCTGCTTCCAGAGTTGCG

  481 AGCTACGGCGGCTCGAAATGTACTGTGCCCCTGTCAAGTCTGGCAAGGCAGCTCGCTCTG
                              >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

  541 TGCGCGCACAGCGCCACACAGACATGCCAAGAACACCTAAGGTTAGTACTGCAGTGCAAA
        ^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^

  601 GCGTGGACAGAGGCACAGAGCGTAGGACAGCACAGCACCCAGACAAGACAAAACCCAAGA
                        <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

  661 AGGAGGTACATCAGAAGAACTCAAGTCGAGGAAACACAGGGGGAAGGAACTACCGAATGT
```

2.2. Primer ve Prob Dizaynında Dikkat Edilmesi Gereken Konular

Probun bağlanma sıcaklığı genellikle primerlerinkin den ~10°C yüksek olmalı.

Probun soğurucunun tutturulacağı 5' ucu G ile bitmemeli.

Genellikle probun GC içeriği % 35-65 arasında olmalı.

Genellikle G ve C ile başlayan dizilimler tercih edilmemeli.

Primer ve probların kendi aralarında ve kendi kendilerine bağlanma ihtimalleri olabildiğince düşük olmalı.

Amlifikasyon bölgesinin boyutu 60-150 bp arasında tercih edilmeli.

Prob olabildiğince primerlerden herhangi birine yakın olmalı, fakat üst üste gelmemeli (Dorak 2006).

2.3. Multiplex Real Time PCR için Yöntem

RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve normalizasyonun ardından real time PCR için kullanılacak karışım aşağıdaki gibi hazırlanır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Multipleks Real time PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	**Final Konsantrasyonu**	**Miktar (µL)**
TaqMan® Probe Master	1x	25
Hydrolysis Probe A (25 M)	250 nM	0,5
Hydrolysis Probe B (25 M)	250 nM	0,5
Forward Primer A (90 M)	900 nM	0,5
Reverse Primer A (90 M)	900 nM	0,5
Forward Primer B (90 M)	900 nM	0,5
Reverse Primer B (90 M)	900 nM	0,5
ddH_2O (Steril)	-	17
cDNA (50 ng)	-	5
Toplam Hacim		**50**

cDNA hariç diğer karışım örnek sayısı kadar hazırlanır ve vorteks kullanılmadan iyice karıştırılır ve real time PCR tüplerine aktarılır. Daha sonra üzerilerine cDNA numuneleri katılır. Standart curve analizi için kontrol cDNA 1/1; 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000 oranlarında seyreltilerek hazırlanır. Şekil 2 'de verilen PCR protokolüne göre PCR başlatılır. Protokoldeki 50 ^{0}C' de 2 dk AmpErase UNG enziminin aktivasyonu için, 95 ^{0}C' de 10 dk ise DNA polimeraz enziminin aktivasyonu için gereklidir (Ceyhun et al. 2011a). İşlem sonunda C_T değerleri kaydedilir ve matematik modelleme ile sonuçlar değerlendirilir.

3. Matematiksel model

Real time PCR uygulamalarında bir genin ekspresyon derecesinin kantitatif olarak tespitinde kullanılan farklı matematiksel modeller vardır (Çizelge 3) (Wong and Medrano 2005).

Çizelge 3. Real time PCR'da karşılaştırmalı gen ekspresyonu ölçümünde kullanılan bazı metodlar ve özellikleri (Wong and Medrano 2005).

Metot	**Amplifikasyon etkinliğini doğrulama**	**Amplifikasyon etkinliğini hesaplama**	**Kaynak**
Standart curve	Yok	Standart eğri ile	Livak (1997)
Comparative C_T	Var	Standart eğri ile	Livak and Schmittgen
Pfaffl	Var	Standart eğri ile	Pfaffl (2001)
Q-Gene	Var	Standart eğri ile	Muller et al.
Gentle et. al.	Var	Ham veri ile	Gentle et al.
Liu and Saint	Var	Ham veri ile	Liu and Saint
DART-PCR	Var	Ham veri ile	Peirson et al.

Bunlardan; Livak and Schmittgen (2001) ve Pfaffl (2001) yapmış olduğu çalışmalarda, real time PCR'da hedef genin karşılaştırmalı (göreceli) ölçümünde referans gen ile hedef genin karşılaştırıldığı bir matematiksel model belirlemişlerdir (Kaneko and Aksakal 2008). Bu bölümde literatürlerde en çok kullanılan Pfaffl (2001)'nin yapmış olduğu matematiksel modele değinilecektir. Bu modele göre; Geçiş noktası (crossing point=CP) ve Primer etkinlik oranı (*E=efficiency*) matematiksel modelde kullanılan önemli faktörlerdir. Geçiş noktası real time PCR'da reaksiyon esnasında çoğaltılan üründe anlamlı artışın gerçekleştiği C_T değeridir. Primer etkinlik oranı ise dizayn edilmiş primerin gene

spesifik olup olmadığının bir ölçütüdür. Primer etkinlik oranı ile çoğaltılan DNA arasında doğru bir orantı vardır. Yani primer etkinlik oranı artarsa amplifiye edilen ürün miktarıda artmaktadır (Çizelge 4,5).

Çizelge 4. Real time PCR'da 1 döngü sonrasında primer etkinlik oranına bağlı olarak matematiksel modelde kullanılan *E* değeri arasındaki ilişki

Primer etkinlik oranı (%)	*E*
100	2.00x
90	1.90x
80	1.80x
70	1.70x

Çizelge 5. Real time PCR'da primer etkinlik oranına bağlı olarak amplifiye edilen DNA kopya sayılarının karşılaştırılması

Döngü	**DNA miktarı**	**DNA miktarı**	**DNA miktarı**	**DNA miktarı**
	%100 primer	%90 primer	%80 primer	%70 primer
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	4	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1.024	613	357	202
↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓

26				
27	134.217.728	33.600.615	7.804.726	1.667.711
28	268.435.456	63.841.168	14.048.506	2.835.109
29	536.870.912	121.298.220	25.287.311	4.819.686
30	1.073.741.824	230.466.618	45.517.160	8.193.466

E değeri slope değeri ile bağlantılı olup $E = 10^{-1/slope}$ şeklindedir. Aynı zamanda gradient olarak da isimlendirilen slope değeri standart eğrinin matematiksel olarak hesaplanmış eğimidir. İdeal slope değeri 3.3 (3.1-3.6 arasında da olabilir) olmalıdır.

$$Hedef\ Gen Oranı = \frac{\left(E_{hedef\ gen}\right)^{\Delta CP\ hedef\ (kontrol-örnek)}}{\left(E_{referans\ gen}\right)^{\Delta CP\ referans\ (kontrol-örnek)}}$$

Real time PCR'da karşılaştırmalı (göreceli) ölçüm için matematiksel model (Pfaffl 2001)

Hedef Gen Oranı : Relatif ekspresyon seviyesi

$\boldsymbol{E_{hedef\ gen}}$ **:** Hedef geni çoğaltan primerin etkinlik oranı (Sayı olarak ifade edilir. 2, 1.9, 1.8, 1.7 gibi)

$\boldsymbol{E_{referans\ gen}}$ **:** *Referans (housekeeping veya kontrol) geni çoğaltan primerin etkinlik oranı (Sayı olarak ifade edilir. 2, 1.9, 1.8, 1.7 gibi)

ΔCP : CP= Geçiş noktası (crossing point). PCR reaksiyonu esnasında ürünün miktarsal olarak anlamlı artışının gerçekleştiği C_T değeri

$\boldsymbol{\Delta CP_{hedef\ (kontrol-örnek)}}$ **:** Hedef genin ortalama C_T değeri (kontrol grubu hedef genin C_T değeri – örneğe ait hedef genin C_T değeri)

$\Delta CP_{\text{referans (kontrol - örnek)}}$: Referans (housekeeping) genin ortalama C_T değeri (kontrol grubu referans genin C_T değeri – örneğe ait referans genin C_T değeri)

* Bir housekeeping (referans, kontrol) gen genellikle temel hücresel fonksiyonların gerçekleştirilmesi için gerekli olan, bir organizmanın her hücresinde bulunan temel bir gendir (Butte et.al., 2001).

Kaynaklar

1. Aksakal, E. Ceyhun, S.B. Erdoğan, O. Ekinci, D., 2010. Acute and long-term genotoxicity of deltamethrin to insulin-like growth factors and growth hormone in rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 152(4):451-455.
2. Beydemir, S., Aksakal, E., Alım, Z., Erdoğan, O., Ceyhun, S.B., 2011. The Effects of Stocking Density on CYP 450 1A Gene Expression and Carbonic Anhydrase Enzyme Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fresenius Environmental Bulletin, 20(6):1452-1457.
3. Butte, AJ., Dzau, V.J., Glueck, S.B., 2001. Further defining housekeeping, or maintenance, genes focus on a compendium of gene expression in normal human tissues. Physiol.Genomics 7:2, 95–96.
4. Ceyhun, S.B., Sentürk, M., Ekinci, D., Erdoğan, O., Çiltaş, A., Kocaman, E.M., 2010. Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 152(2):215-223.
5. Ceyhun, S.B., Aksakal, E., Kırım, B., Atabeyoglu, K., Erdoğan, O., 2011a. Chronic toxicity of pesticides to the mRNA expression levels of metallothioneins and cytochrome P450 1A genes in rainbow trout. Toxicology and Industrial Health, (in press).

6. Ceyhun, S.B., Ekinci, D., Aksakal, E., Erdoğan, O., Beydemir, S., 2011b. Influence of cobalt and zinc exposure on mRNA expression profiles of metallothionein and cytocrome P450 in rainbow trout. Biological Trace Element Research (in press).
7. Dorak, M.T., 2006. Real time PCR. Taylor & Francis Group, New York, 333 p.
8. Ekinci, D., Ceyhun, S.B., Aksakal, E., Erdoğan, O., 2011. IGF&GH mRNA levels are suppressed upon exposure to micromolar concentrations of cobalt and zinc in rainbow trout white muscle. Comparative Biochemistry and Physiology C- Toxicology & Pharmacology, 153(3):336-341.
9. Erdoğan, O., Ceyhun, S.B., Ekinci, D., Aksakal, E, 2011. Impact of deltamethrin exposure on mRNA expression levels of metallothionein A, B and cytochrome P450 1A in rainbow trout muscles. Gene (in press).
10. Gentle, A., Anastasopoulos, F., McBrien, N.A., 2001. High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. BioTechniques 31:502-508.
11. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. Nature Biotechnology, 11:1026-1030.
12. Kaneko, G., and Aksakal, E., 2008. Real-Time PCR Application and Gene Analyzing. Su Ürünlerinde Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Lisansüstü Yaz Okulu Ders Kitabı. Atatürk Üni. Ziraat Fak. Ders Yay. No:237, 107-116. s., 129 s., Erzurum.
13. Liu, W., Saint, D.A., 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. Anal. Biochem. 302:52-59.
14. Livak, K. 1997. ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin 2. PE Applied Biosystems, Foster City, CA.

15. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods, 25:402–408.
16. Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., Dobbie, Z., 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. BioTechniques 32:1372-1379.
17. Ostaszewska, T., Kamaszewski, M., Grochowski, P., Dabrowski, K., Verri, T., Aksakal, E., Szatkowska, I., Nowak, Z., and Dobosz, S., 2010. The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 155(1):107-114.
18. Peirson, S.N., Butler, J.N., Foster, R.G., 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. Nucleic Acids Res. 31:73.
19. Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, 29 (9): 2003-2007.
20. Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques, 39:75-85.