

TaqMan-分子灯标:一种新型的荧光基因检测探针

孔德明^a 古 珑^a 沈含熙^{*, a} 宓怀风^{b*}

(^a 南开大学化学系 天津 300071)

(^b 南开大学吸附与分离高分子重点实验室 天津 300071)

摘要 在 TaqMan 及分子灯标的基础上开发了一类新型的均相荧光检测探针——TaqMan-分子灯标 (TaqMan-MB), 该探针集合了分子灯标的发夹结构及 TaqMan 探针降解作用的工作原理, 使检测效果更好. 与实时 PCR 仪联用, 可用于靶基因的定量检测.

关键词 TaqMan-分子灯标 (TaqMan-MB), TaqMan, 分子灯标, 均相荧光检测探针

TaqMan-Molecular Beacon: A New Type of Fluorogenic Probe for Target Gene Detection

KONG, De-Ming^a GU, Long^a SHEN, Han-Xi^{*, a} MI, Huai-Feng^b

(^a Chemical School, Nankai University, Tianjin 300071)

(^b State Key Lab of Functional Polymer Materials for Adsorption and Separation, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract A novel homogenous fluorogenic probe, TaqMan-molecular beacon (TaqMan-MB) has been developed from TaqMan and molecular beacons, which combines the hairpin structure of molecular beacons and the cleavage mechanism of TaqMan probes and has much better detection effects than TaqMan or molecular beacons alone. Combining with a real-time PCR instrument, TaqMan-MB presents a promising approach for quantitation of target genes.

Keywords TaqMan-molecular beacon (TaqMan-MB), TaqMan, molecular beacon, homogenous fluorogenic probe

近年来,在聚合酶链式反应(PCR)中的一个重要进展就是均相分析方法的快速发展使 PCR 放大产物的检测可以在一个密闭的容器内进行. 通常,均相分析方法具有高灵敏度、高选择性、操作简便及可进行多组分测定等优势^[1]. 到目前为止, TaqMan 探针^[2,3]及分子灯标(Molecular beacon)^[4,5]是均相检测中最常用且最有发展前途的两类探针,它们都是在荧光能量转移的基础上建立起来的,并在许多方面都显示了广阔的应用前景.

但它们各自又都存在着一定的缺陷与不足. 就 TaqMan 技术来说,它所面临的一个最大问题就是探针的线性结构导致了较高的背景荧光. 如果荧光基团和猝灭基团的距离太近,那么在 PCR 扩增过程中,探针在它们之间降解的可能性将大为降低,从而起不到探针的作用. 相反,如果把荧光基团和猝灭基团分别放在探针的两端,则又会使背景信号大大提高^[6],影响其检测灵敏度. 分子灯标虽然有效地解决了猝灭

效率问题,但由于其荧光信号仅仅是依靠与靶基因杂交时所引起的构象变化产生的,在 PCR/分子灯标检测过程中,分子灯标必须与 PCR 产物的一条链竞争结合在另一条链的靶基因位点上,只有在竞争过程中获胜的分子灯标探针,才能产生荧光^[7],这就极大地影响了分子灯标的检测效果.

为了解决上述问题,我们在分子灯标及 TaqMan 探针的基础上设计了一种新型的均相荧光检测探针 (TaqMan-MB)^[8]. 该探针保留了分子灯标的茎-环结构,这一结构保证了荧光基团与猝灭基团紧密接触,从而有效地解决了背景荧光的问题. 但与常规分子灯标不同的是:除环部序列外,其 5' 端的臂序列也设计为探针的基因识别部位. 在 PCR 扩增的退火/延伸阶段,探针与模板上相应的靶基因位点特异性结合. 同时, Taq 酶随着引物的延伸沿 DNA 模板移动,当移到探针结合位置时,发挥其 5'-3' 外切酶活性,将探针切断^[2],从而使荧光基团与猝灭基团彻底远离,荧光基团荧光复原(图

* E-mail: hxshen@eyou.com

Received August 2, 2002; revised December 9, 2002; accepted January 14, 2003.

国家自然科学基金(No. 20075012)资助项目.

1). 体系荧光信号的产生来自于两方面的贡献:一是来自于探针与靶基因杂交时所引起的构象变化,二是来自于探针的降解,这就极大地增强了体系的荧光强度.在本研究中,我们以乙型肝炎病毒(HBV) DNA 为检测对象,探讨了 TaqMan-MB 作为均相荧光检测探针的可行性,并分别与分子灯标及 TaqMan 探针进行了比较研究.

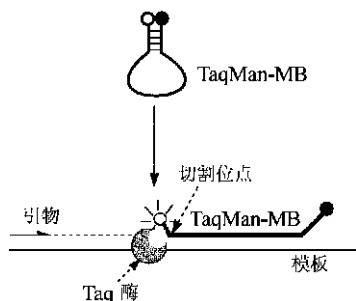


图1 TaqMan-MB 探针的工作原理

Figure 1 Assay principle of TaqMan-MB probes

1 实验部分

1.1 仪器

DNA Thermal Cycler 480 (美国, Perkin Elmer), ABI 5700 DNA Thermal Cycler (美国, Perkin Elmer), 恒压恒流 DF-D 电泳仪 (北京东方特力科贸中心), RF-540 型荧光分光光度计 (日本, 岛津); 16.40-F-Q-10 型微量荧光比色池 (英国, Starna Brand).

1.2 试剂

TaqMan-MB:

FAM-5 -CCCGAGATTGAGATCTTCTCGGACTCGGG-3 -DABCYL, 分子灯标:

FAM-5 -CGAGCATCTTCTCGGACCGGGCTCTG-3 -DABCYL,

TaqMan:

FAM-5 -CCCGAGATTGAGATCTTCTCGGAC-3 -TAMRA (带下划线的为探针序列), 单标探针: FAM-5 -CCCAGATTGAGATCTTCTCGGAC. 以上均委托上海申友生物技术有限责任公司合成. PCR 正向引物: 5'-CACCAAATGCCCTATCTTA-3, PCR 反向引物: 5'-GTTTCCACCTTATGAGTCC-3, 系委托上海生工生物技术服务有限公司合成, 用以扩增 HBV DNA 序列中一段长度为 180 bp 的片段. 其它生物试剂均购自上海生工生物技术服务有限公司.

1.3 步骤

1.3.1 模板 DNA 的制备

HBV DNA 的提取采用的是经典的蛋白酶 K 消化 - 乙醇沉淀法: 200 μ L 血清溶于 200 μ L 裂解液中 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 2.5 mmol/L EDTA, 0.5 % SDS, 0.5 mg/mL 蛋白酶 K), 60 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 然后加入等体积的 Tris 平衡酚 (pH 8.0) 和氯仿 - 异戊二醇 (24/1), 剧烈振荡 30 s, 10000 r/min 离心 10 min, 将上层水相转移入一新的离心管中, 加入等体

积氯仿, 混匀后 10000 r/min 离心 10 min, 再将上层水相转移入另一新的离心管中, 加入 1/4 体积的 NaAc (4 mmol/L) 及 2 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 隔夜放置后, 12000 r/min 离心 15 min. 吸出上层清液, 再用冰冷的 75 % 乙醇荡洗一次, 小心吸出上层清液, 挥发干残留的乙醇, 然后将沉淀溶于 20 μ L 灭菌水中.

1.3.2 PCR 扩增条件

PCR 反应液总体积为 25 μ L: 1 \times PCR 反应缓冲液 (10 mmol/L KCl, 8 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, NP-40), 2 mmol/L MgCl_2 , 各 0.4 mmol/L 的 dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 各 0.4 μ mol/L 的正、反向引物, 0.3 μ mol/L 的荧光探针, 2.5 U Taq DNA 聚合酶, 2 μ L 模板. 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 8 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 15 s, 59 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 59 $^{\circ}$ C 15 min. 反应完成后, 在室温下用 75 μ L PCR 反应缓冲液 (含 2 mmol/L MgCl_2) 将反应液稀释到 100 μ L, 加入到微量荧光比色池中, 在荧光分光光度计上测定体系荧光强度. 本实验中, 所有的荧光测定都是在 $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$ 下进行的.

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳

取 PCR 产物 20 μ L, 在 2 % 的琼脂糖凝胶上 (含溴化乙锭) 电泳 30 ~ 40 min, 于紫外检测仪下观察 180 bp 的特异性 DNA 条带, 并摄影.

2 结果与讨论

2.1 猝灭效率的测定

猝灭基团对荧光基团的猝灭效率是影响荧光探针性能的重要指标之一. 猝灭效率越高, 体系的背景荧光就越低, 探针的检测效果也就越好. 对于 TaqMan-MB、分子灯标及 TaqMan 探针来说, 荧光猝灭效率均可以通过如下公式: $E_{\text{ff}} = [1 - (F_q - F_b) / (F_{\text{uq}} - F_b)] \times 100 \%^{[9]}$ 进行计算, 式中 F_q 为三种探针自身的荧光强度, 此时的荧光基团处于猝灭状态, F_{uq} 为单标探针的荧光强度, 相当于荧光基团处于解除猝灭状态的情况, F_b 为缓冲溶液的荧光强度. 通过计算得出, TaqMan-MB 的猝灭效率为 91.0 %, 与分子灯标 (93.1 %) 相当, 而远远优于 TaqMan 探针 (82.5 %) (表 1).

表 1 三类探针的猝灭效率

Table 1 Quenching efficiencies of the three probes

探针类型	F_b^a	F_q	F_{uq}^a	E_{ff}
TaqMan-MB	0.9	11.8, 12.1, 11.9	123.4	(91.0 \pm 0.2) %
分子灯标	0.8	9.4, 9.2, 9.7	125.8	(93.1 \pm 0.2) %
TaqMan	0.9	22.4, 22.2, 21.5	121.7	(82.5 \pm 0.4) %

^a 3 次测定的平均值.

2.2 PCR 条件的选择

我们设计 TaqMan-MB 的一个目的是使其能在 PCR 扩增中发生类似于 TaqMan 探针的降解作用. 这就要求 TaqMan-

MB 必须在引物延伸至探针结合位点之前结合在模板上, 我们可以通过调节探针的序列及长度来达到这一目的. 在试验中, 我们设计的 TaqMan-MB 具有 24 个核苷酸的探针序列 (7 个核苷酸的臂序列及 17 个核苷酸的环序列), 其结合位点位于反向引物的下游. 我们使用 John Santalucia 的“核酸杂交”软件 (<http://ozone.chem.wayne.edu>) 分别计算反向引物及 TaqMan-MB 与各自靶基因杂交形成的二倍体的熔解温度 (T_m), 在 100 mmol/L NaCl 及 2 mmol/L $MgCl_2$ 存在下, 计算得出的反向引物 T_m 值为 61.2, TaqMan-MB 为 67.4. 由此可见, TaqMan-MB 具有比反向引物更强的结合能力, 它可以在更高的温度下与模板上相应的靶基因位点结合. 为了保证 TaqMan-MB 能有效地结合在模板上, 并在 Taq DNA 聚合酶的作用下充分降解, 我们在 PCR 的变性及退火/延伸步骤之间又增加了一个探针结合步骤, 使在该步骤下, 只有 TaqMan-MB 可以有效地与模板结合, 而引物不能结合在模板上. 该步骤的温度选择方法如下: 分别以 57, 59, 61, 63 为引物退火/延伸温度, 进行两步 PCR 扩增, 以电泳检测扩增产物. 结果发现: 在前三个温度下, 均可产生特异性的扩增产物, 但在 61 下产物的量要明显少于 57 和 59, 在 63 下则根本无扩增产物生成 (图 2), 说明在该温度下, 引物刚好无法与模板结合而进行有效的 PCR 扩增. 这样, 我们选择 63 为 PCR 扩增中的探针结合温度, 59 为引物的退火/延伸温度.

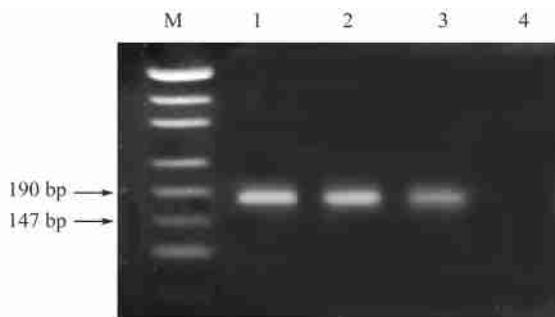


图 2 不同退火/延伸温度下 PCR 扩增结果比较

Figure 2 Comparison of PCR amplifications with different anneal/extend temperatures

(1) 57; (2) 59; (3) 61; (4) 63

同时, 我们考察了 Mg^{2+} 浓度对 PCR/TaqMan-MB 检测分析的影响. 图 3 为反应体系的荧光强度随 Mg^{2+} 浓度的变化情况, 在较低的 Mg^{2+} 浓度下, 体系荧光强度随 Mg^{2+} 浓度的升高迅速增强, 并在 2~7 mmol/L 之间保持较高的水平, 基本上达到一个平台, 其后, 随 Mg^{2+} 浓度的进一步增加, 荧光强度急剧下降. 因此, 在不影响 PCR 产率及专一性的条件下, 我们选择 2 mmol/L 为 PCR 扩增中的 Mg^{2+} 浓度.

2.3 TaqMan-MB 对 PCR 扩增的影响

分别以蛋白酶 K 处理后的正常人血清、含有 HBV 的人血清作为模板, 以水为阴性参照进行 PCR 扩增. 每个模板均进行两个实验, 其中一个在 PCR 反应液中不加 TaqMan-MB

探针, 而另一个则加入 0.3 μ mol/L 的 TaqMan-MB. 同时进行 PCR 扩增, 并用电泳检测扩增产物. 结果发现 (图 4), 对于正常人血清及不含任何模板的四个反应 (1, 2, 5, 6) 来说, 均未出现特异的 PCR 扩增带, 而以 HBV 感染的人血清为模板的两组反应 (3 和 4) 均出现了特异的 PCR 扩增带, 且两条带的位置相同 (180 bp), 亮度相当. 说明 TaqMan-MB 探针的存在不会对 PCR 扩增造成影响, 这就为 TaqMan-MB 用于 PCR 产物的实时监测奠定了基础.

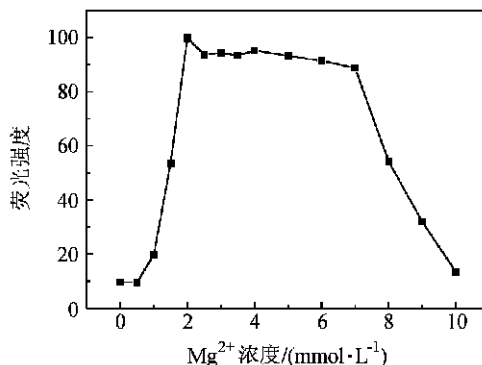


图 3 Mg^{2+} 浓度对 PCR/TaqMan-MB 检测分析的影响

Figure 3 Effect of the concentration of Mg^{2+} on PCR/TaqMan-MB assay.

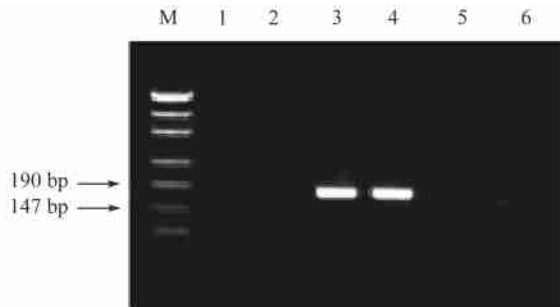


图 4 TaqMan-MB 对 PCR 扩增的影响

(1), (2) 以正常人血清为模板; (3), (4) 以 HBV 感染的人血清为模板; (5), (6) 无模板的阴性对照. 单号不加 TaqMan-MB 探针, 双号则加入 0.3 μ mol/L TaqMan-MB 探针

Figure 4 Effect of the TaqMan-MB on PCR amplification

(1), (2) healthy serum; (3), (4) HBV-infected serum; (5), (6) negative control were used as templates, respectively. For odd numbers, no probes were added in reaction mixtures, for even ones, 0.3 μ mol/L TaqMan-MB was added

2.4 PCR 扩增的实时监测

考察了 PCR/TaqMan-MB 检测体系的荧光强度随 PCR 循环数的变化情况, 并与分子灯标及 TaqMan 探针进行了比较研究. 从图 5 可以看出, TaqMan-MB 的荧光信号变化要明显优于分子灯标及 TaqMan 探针. 对于分子灯标来说, 其荧光强度的贡献主要来自于与靶基因杂交的探针部分, 由于双链扩增产物的竞争作用, 其荧光强度的变化明显弱于 TaqMan-MB 及 TaqMan 探针. 而对于 TaqMan 探针来说, 其较高的背景荧

光同样对荧光强度的相对变化造成了较大的影响.

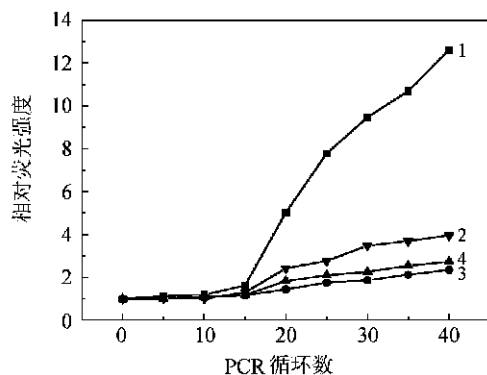


图5 PCR扩增的实时监测

(1) TaqMan-MB 探针; (2) TaqMan 探针; (3) 分子灯标; (4) TaqMan-MB 探针(探针在 PCR 扩增完成后加入)

Figure 5 Real-time monitoring of PCR amplification

(1) TaqMan-MB probe; (2) TaqMan probe; (3) molecular beacon; (4) TaqMan-MB probe (the probe was added after PCR amplification)

就 TaqMan-MB 而言,其荧光信号的来源有两个:探针的杂交和探针的降解.为了考察单纯的探针杂交作用对体系荧光强度的贡献,我们将 TaqMan-MB 在 PCR 扩增完成之后加入.在这种情况下,该探针只发生类似于分子灯标的杂交作用,迫使发夹结构打开而产生荧光.从图 5 可以看出,其荧光信号的变化与分子灯标相当,而远远弱于 TaqMan-MB 探针在 PCR 扩增前加入时的情况.由此可见,对 TaqMan-MB 探针而言,其荧光信号的变化主要来自于探针的降解作用,单纯的杂交作用对体系荧光强度的贡献不大.

2.5 TaqMan-MB 探针的检测专一性

由于茎-环结构的存在, TaqMan-MB 探针同样具有分子灯标的高度识别专一性.为了验证 TaqMan-MB 探针检测血清中 HBV 的可行性,分别将正常人血清、携带有 HBV 的人血清、携带有 HCV 的人血清及携带有 HEV 的人血清用蛋白酶 K 方法处理后作为模板,以水为阴性参照进行 PCR/TaqMan-MB 探针检测.结果表明,除携带有 HBV 的血清标本产生了较强的荧光外,其余四个反应体系的荧光强度均很低,可被判定为阴性(图 6).这一实验说明所设计的 TaqMan-MB 探针只能与目的 DNA 作用,具有较高的特异性,可用于实际血清样品中 HBV 的检测.

对于一些患者来说,在感染有乙型肝炎病毒的同时,可能还会受到其他病毒(如 HCV, HEV)的感染,这样,在患者的血清中可能出现几种病毒共存的情况,为了考察血清中其他病毒的存在是否会对 HBV 的检测产生影响,我们将 HBV, HCV 和 HEV 感染的血清等量混合以模拟四种混合感染血清,分别以这四种血清为标本进行 PCR/TaqMan-MB 探针检测.结果发现,除 HCV/HEV 共感染血清的血清外,其它三种含有 HBV 的血清样本均可产生较强的荧光,且荧光强度与 HBV 单独感染的血清相当(图 6).这说明 TaqMan-MB 探针可用于混合感染的血清中 HBV 的检测,而不受共存的其他病

毒干扰.

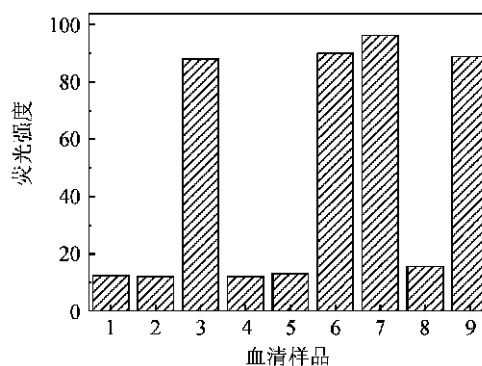


图6 不同血清样品的 PCR/TaqMan-MB 探针检测结果比较

血清样品分别为: (1) 阴性对照; (2) 正常血清; (3) HBV 感染的血清; (4) HCV 感染的血清; (5) HEV 感染的血清; (6) HBV/HCV 共感染血清; (7) HBV/HEV 共感染血清; (8) HCV/HEV 共感染血清; (9) HBV/HCV/HEV 共感染血清

Figure 6 Fluorescence analysis of different serum samples

(1) Negative control; (2) healthy; (3) HBV-infected; (4) HCV-infected; (5) HEV-infected; (6) HBV/HCV-mixed infected; (7) HBV/HEV-mixed infected; (8) HCV/HEV-mixed infected; (9) HBV/HCV/HEV-mixed infected serum samples

2.6 三种探针的检测效果比较

将 HBV 感染的病人血清用正常人血清进行 10 倍连续稀释,分别用三种探针进行检测.从图 7 可以看出, TaqMan-MB 的检测效果要明显优于 TaqMan 探针及分子灯标.当血清稀释倍数在 10^6 以下时, TaqMan-MB 可以获得比 TaqMan 及分子灯标更强的荧光增长,且稀释倍数越低,这种区别越明显.

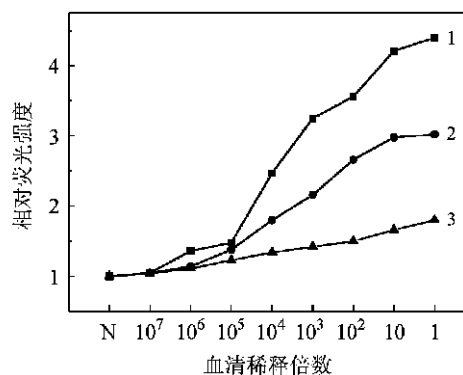


图7 三种探针的检测效果比较

(1) TaqMan-MB 探针; (2) TaqMan 探针; (3) 分子灯标; (N) 无模板的阴性对照

Figure 7 Comparison of analytical results for the three probes

(1) TaqMan-MB probe; (2) TaqMan probe; (3) molecular beacon; (N) negative control

2.7 定量检测

与实时 PCR 仪联用,对 TaqMan-MB 在定量检测中的应用进行了初步探讨.当 PCR 扩增体系中存在 HBV DNA 时,

其荧光强度的变化趋势如图 8A 所示: 在 PCR 扩增的起始阶段, 荧光强度随 PCR 循环数变化不大, 其后, 随着循环数的进一步增加, 荧光强度以指数形式增长. 反应体系中 HBV DNA 起始拷贝数不同, 荧光强度进入指数增长阶段的早晚亦不同, 起始拷贝数越多, 荧光强度进入指数增长阶段时所

需的 PCR 循环数就越少. 将在背景基础上产生可测荧光信号时所需的 PCR 循环数定义为临界循环数 (C_t), 将 C_t 值对体系中 HBV DNA 起始拷贝数的对数值作图 (图 8B), 两者之间存在着良好的线性关系, 线性相关系数为 -0.999.

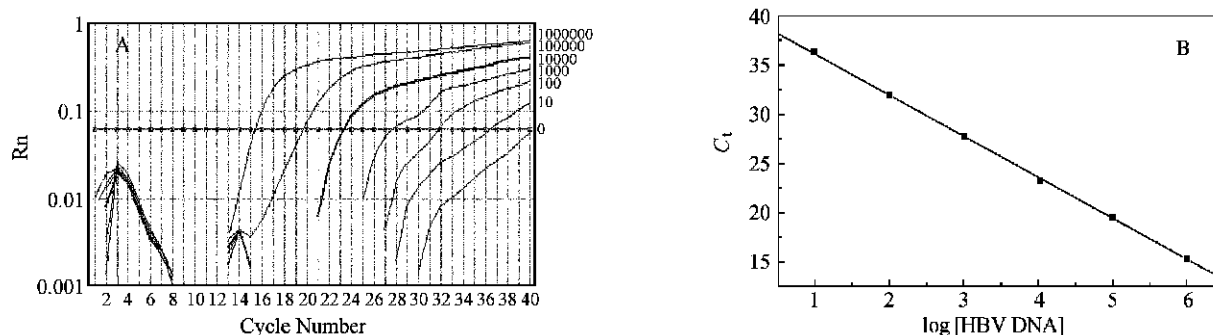


图 8 TaqMan-MB 探针存在下 HBV DNA 的实时 PCR 扩增(A) 及其定量检测曲线(B)

A 图右侧的数据为扩增体系中的 HBV DNA 拷贝数

Figure 8 Real-time PCR amplification (A) and quantitative detection (B) of HBV DNA in the presence of TaqMan-MB probe
HBV DNA copies were indicated on the right edge of Figure A

3 结论

作为一类新型的均相荧光检测探针, TaqMan-MB 集中了现有的 TaqMan 及分子灯标技术的一些优势, 结合特定的 3 步 PCR 扩增步骤, 该探针可以获得比 TaqMan 探针及分子灯标更好的检测效果. 与实时 PCR 仪联用, 还可用于靶基因的定量检测. 总之, TaqMan-MB 探针的出现可以为 PCR 产物的均相实时检测提供一个强有力的工具.

References

- Schwetzer, B.; Kingsmore, S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 21.
- Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 7276.
- Lie, Y. S.; Petropoulos, C. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 43.
- Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303.
- Kostrikis, L. G.; Tyagi, S.; Mhlanga, M. M. *Science* **1998**, *279*, 1228.
- Chen, W.; Martinez, G.; Mulchandani, A. *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 166.
- Poddar, S. K. *Mol. Cell. Probes* **2000**, *14*, 25.
- Kong, D. M.; Gu, L.; Shen, H. X.; Mi, H. F. *Chem. Commun.* **2002**, *21*(8), 854.
- Tyagi, S.; Bratu, D. P.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49.

(A0208092 LU, Y. J.; ZHENG, G. C.)

Radical Addition Reaction between Perfluoro- and α -H-Perfluorodiacyl Peroxides and C_{60}

—Synthesis of Perfluoro- and α -H-Perfluorodiacyl Peroxides and C_{60} Fluoroalkylated C_{60}

HE, Hai-Ying; ZHAO, Cheng-Xue

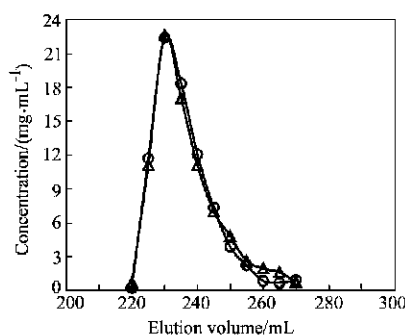
Acta Chimica Sinica **2003**, 61(5), 736

The radical addition reactions between perfluoro- and α -H-perfluorodiacyl peroxides and C_{60} were studied by EPR determination of the radical intermediates, GC analysis and NMR characterization of the products. The per(poly)fluoroalkylated C_{60} shows excellent hydro- and lipophobicity.

An Approach to Purifying Process Analysis of Chinese Herbal Extracts Using NIRS

YANG, Nan-Lin; CHENG, Yi-Yu; QU, Hai-Bin

Acta Chimica Sinica **2003**, 61(5), 742

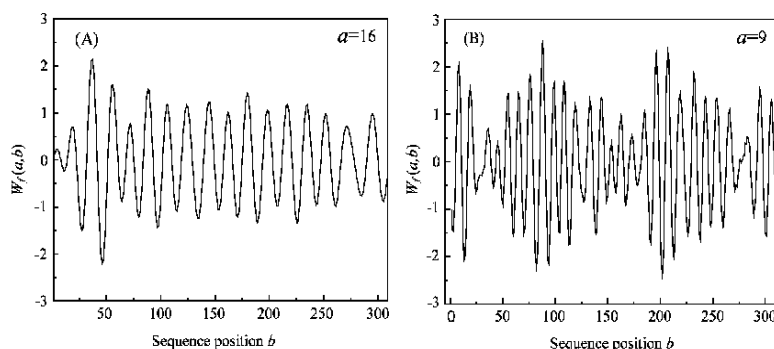


A method for process analysis of the production of herbal medicine, using fiber optic near infrared transmission spectroscopy (NIRS), is proposed. The purification process of *Coptis chinensis* extracts with nonionic macroreticular resin is selected as an application example. The concentrations of Jatrochicine, Palmatine, Berberine and total alkaloid in the elutes can be determined accurately by NIRS simultaneously.

Prediction of Protein Secondary Structures by Continuous Wavelet Transform

QIU, Jian-Ding; LIANG, Rui-Ping; ZOU, Xiaoyong; MO, Jin-Yuan

Acta Chimica Sinica **2003**, 61(5), 748

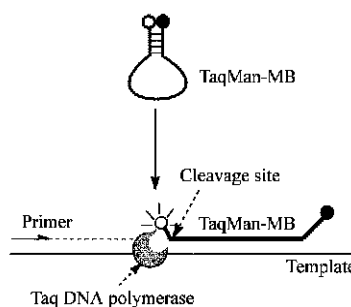


α -Helices and short peptides connecting α -helices and β -strands can be predicted by using continuous wavelet transform (CWT) under the appropriate dilation after the amino acids of proteins are transformed into sequences of hydrophobic values per residue. The results indicate that CWT is an efficient tool to predict the secondary structures of proteins.

TaqMan-Molecular Beacon: A New Type of Fluorogenic Probe for Target Gene Detection

KONG, De-Ming; GU, Long; SHEN, Han-Xi; MI, Hui-Feng

Acta Chimica Sinica **2003**, 61(5), 755



A novel homogenous fluorogenic probe, TaqMan-molecular beacon (TaqMan-MB) has been developed from TaqMan and molecular beacons, which combines the hairpin structure of molecular beacons and the cleavage mechanism of TaqMan probes. It can work much better than TaqMan or molecular beacons alone.