Real-Time PCR

آقای دکتر شهبانی

ارائه: علی محب علیان

ناهید جوانشیر

مهندسی ژنتیک

زمستان ۱۴۰۰

فهرست مطالب

Introduction ۳
Rea-time PCR application ۳
Basics of real-time PCR ٤
Cicles ٤
(RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR ٥
Real-time PCR components ٥
Real-time PCR fluorescence detection systems ۹
SYBR® Green dye ۱۰
Probes ۱۰
Taq man probs ۱۱
Beacon probs ۱۱
Scorpion® Primers ۱۲
FRET Hybridization Probes ۱۳
Real-time PCR analysis ۱٤
Standard curve ۱٦
Correlation coefficient (R2) ۱۷
y-intercept ۱۷
Slope ۱۸
Efficiency ۱۸
Dynamic range ۱۸
Melt curve ۱۹
Absolute quantification ۲۰
Relative quantification ۲۰
Internal reaction control ۲۰
آشنایی با مفهوم ژن کنترل داخلی (ژن رفرنس) در روش ریل تایم ۲۲
انواع کنترل در ریل تایم ۲۳
RT+ ۲۳
No-RT ۲۳
NTC ۲۳
Real-time PCR analysis ۲٤

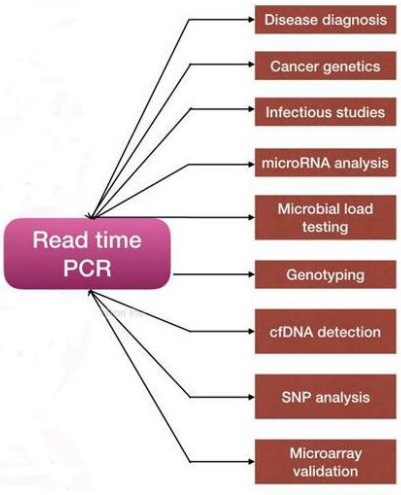
Introduction

(PCR) یکی از قدرتمندترین فناوری ها در زیست شناسی مولکولی است. با استفاده ازPCR ، میتوانیم specific sequencesرا در یک DNA or cDNA template تا هزاران یا میلیون برابر کپی یا amplify کرد با استفاده از سه مرحله :

Sequence-specific oligonucleotides, heat stable DNA polymerase, and thermal cycling

PCR معمولی ازنظر تعیین وجود یا عدم وجود توالی خاص بسیار کارا می‌باشد؛ اما مشکل زمانی بروز می‌کند که هدف، تعیین میزان اولیه مولکول الگو با مقیاس کمّی (Quantitative) بین نمونه‌های مختلف باشد. علت این امر ناشی از دو عامل نحوه‌ی پردازش داده‌ها در PCR و ماهیت آن است. پردازش داده‌ها در PCR به این صورت است که در انتهای PCR محصول به‌دست‌آمده، به روش‌های مختلفی تیمار شده و اطلاعات موردنظر از آن در اغلب موارد با ران کردن محصول PCR بر روی ژل آگارز انجام می‌شود. اگر هدف از PCR ، مقایسه‌ی کمی نمونه‌ها باشد، تنها با مقایسه‌ی شدت باندهای ظاهرشده بر روی ژل می‌توان به میزان اولیه در نمونه‌ها پی برد؛ زیرا هر چه میزان الگوی اولیه بیشتر باشد محصول بیشتر و باند قوی‌تری خواهیم داشت. بااین‌حال، برخی محدودیت‌ها در ژل آگارز عامل بروز خطا در نتایج خواهد شد ازجمله: حساسیت پایین ژل آگارز، تمایز تنها بر اساس قطعات است، رنگ اتیدیوم برماید با کارایی یکسانی به تمام قطعات متصل نمی‌شود، نتایج به‌صورت عددی بیان نمی‌شود و...؛ اما در بررسی بیان ژن با روش Real Time PCR امکان مشاهده‌ی هرلحظه از واکنش فراهم است

Rea-time PCR application



Basics of real-time PCR

سه مرحله اصلی وجود دارد که هر چرخه را در real-time PCR تشکیل می دهد. واکنش ها معمولاً برای ۴۰ سیکل ران می شوند.

Cicles

Denaturation

انکوباسیون در دمای بالا برای دینیچر کردن DNA دو رشته ای به تک رشته ها و در اصل سست کردن ساختار ثانویه در DNAتک رشته ای استفاده می شود. بالاترین دمایی که DNA پلیمراز می تواند تحمل کند معمولاً استفاده می شود (معمولاً ۹۵ درجه سانتیگراد). اگر محتوای GC تمپلیت زیاد باشد، زمان denaturation شدن را می توان افزایش داد.

Annealing

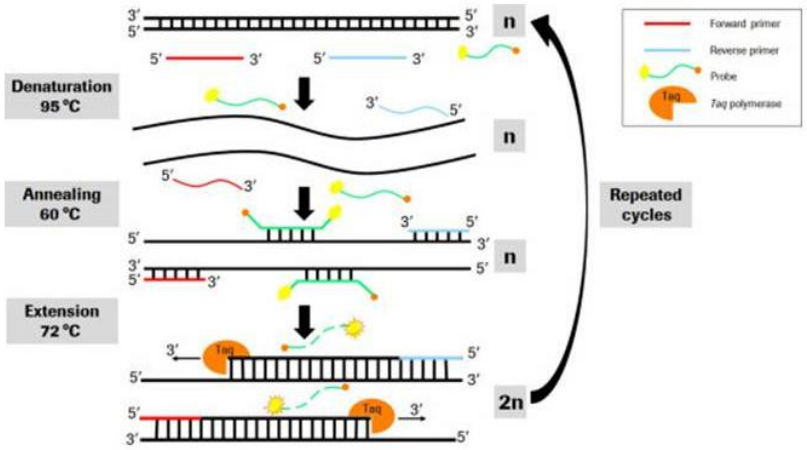
در طولAnnealing ، توالی های مکمل فرصت هیبرید شدن دارند، بنابراین از دمای مناسبی استفاده می شود که بر اساس دمای ذوب محاسبه شده (Tm) پرایمرها (۵ درجه سانتی گراد زیر Tm پرایمر) باشد.

Extension

در دمای ۷۰-۷۲ درجه سانتیگراد، فعالیت DNA پلیمراز در این دما بهینه است و پرایمر اکستنشن تا سرعت ۱۰۰ باز در ثانیه رخ می دهد.

Real-time PCR steps

- **Denaturation**
- **Annealing**
- **Extension**



(RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR

برای ارزیابی بیان ژن با اندازه گیری فراوانی RNA های خاص است. دو روش کلی موجود است: RT-qPCR یک مرحله ای و RT-qPCR دو مرحله ای. در هر دو مورد، RNA ابتدا به cDNA معکوس رونویسی می شود، که سپس به عنوان الگو برای تقویت qPCR استفاده می شود. در RT-qPCR یک مرحله ای، سنتز cDNA و qPCR در یک ظرف واکنش در یک بافر واکنش مشترک انجام می شود. در RT-qPCR دو مرحله‌ای، cDNA در یک واکنش سنتز می‌شود و سپس مقدار کمی از cDNA برای آزمایش qPCR بعدی استفاده می‌شود.

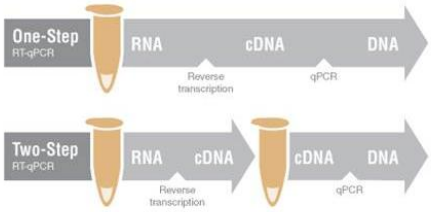
One-step qRT-PCR

First-strand cDNA synthesis reaction and real-time PCR reaction in the same tube simplifying reaction setup and reducing the possibility of contamination
Gene-specific primers (GSP) are required

Two-step qRT-PCR

Reverse transcription of RNA or poly(A)+ RNA → cDNA (reverse transcriptase (RT))
first-strand cDNA synthesis reaction can be primed using :

- **Random primers**
- **Oligo(dt)**
- **Or gene-specific primers (gsps)**



Real-time PCR components

۱- DNA polymerase:

عملکرد PCR بسیار به DNA پلیمراز مقاوم در برابر حرارت مرتبط است، بنابراین انتخاب آنزیم برای موفقیت بسیار مهم است. یکی از عوامل اصلی موثر بر ویژگی PCR این واقعیت است که Taq DNA polymerase دارای فعالیت در دماهای پایین است. پرایمرها می توانند به طور غیر اختصاصی به DNA متصل شوند و به پلیمراز اجازه می دهند محصول غیر اختصاصی را سنتز کنند. مشکل محصولات غیراختصاصی ناشی از mis-priming را می توان با استفاده از آنزیم « hot start» به حداقل رساند. استفاده از hot start enzyme تضمین می کند که هیچ DNA پلیمراز فعالی در طول تنظیم واکنش و مرحله اولیه دناتوره شدن DNA فعال نیست.

۲- Reverse transcriptase

Reverse transcriptase (RT) برای موفقیت qRT-PCR به اندازه DNA پلیمراز حیاتی است. مهم است که RT را انتخاب کنید که نه تنها بازده بالایی از full-length cDNA را ارائه دهد، بلکه در دماهای بالا نیز فعالیت خوبی داشته باشد. عملکرد دمای بالا نیز برای دناتوره سازی RNA با ساختار ثانویه بسیار مهم است.

۳- Magnesium concentration

در real-time PCR، کلرید منیزیم یا سولفات منیزیم به طور معمول در غلظت نهایی ۳ میلی مولار استفاده می شود. این غلظت برای اکثر اهداف به خوبی کار می کند. با این حال، غلظت بهینه منیزیم ممکن است بین ۳ و ۶ میلی مولار متفاوت باشد.

۴-Template

برای هر واکنش Real-time PCR از ۱۰ تا ۱۰۰۰ کپی از اسید نوکلئیک template استفاده کنید. این معادل تقریباً ۱۰۰ pg تا ۱ میکروگرم DNA ژنومی یا cDNA تولید شده از ۱ pg تا ۱۰۰ng از RNA کل است. template اضافی ممکن است سطوح آلودگی بالاتری را به همراه داشته باشد که می تواند کارایی PCR را تا حد زیادی کاهش دهد. از طرفی با تریت کردن rna با dnase میتوان genomic DNA contamination رو کم کرد.

۵- پرایمر:

طول مناسب پرایمر ۱۸ تا ۲۲ باز می‌باشد

برای مولکول‌های الگوی بزرگ از جمله ژنوم سلول‌های پستانداران بهتر است از حداکثر طول مناسب (۲۲ باز) برای پرایمر استفاده شود. برای تکثیر از روی مولکول‌های کوچک الگو (مثلا ژنوم باکتری) می‌توان از حداقل طول پرایمر (۱۸ باز) استفاده کرد.

پرایمرها را با دمای ذوب ۵۲ تا ۵۸ درجه طراحی کنید. ضمنا بهتر است اختلاف دمای ۲ پرایمر حداکثر ۳ درجه سانتی‌گراد باشد.

دمای ذوب پرایمر (Primer melting temperature – Tm) موید ثبات ساختار دو رشته ای DNA است. در اینجا منظور از ساختار DNA دو رشته ای، باند شدن و اتصال پرایمر به مولکول الگو می‌باشد. دمای ذوب پرایمر، دمایی است که در آن نیمی از مولکول‌های پرایمر، تک رشته‌ای هستند و نیمی دیگر به مولکول DNA متصل شده و دو رشته‌ای شده‌اند.

دمای اتصال پرایمر

(Primer annealing temperature – Ta)، پرایمر به طور خیلی اختصاصی به تارگت اصلی خود می‌چسبد. هر چقدر دمای Ta بیشتر باشد، اتصال ویژه و اختصاصی از احتمال بیشتری برخوردار است. این در حالی است که امکان باقی ماندن این اتصال از لحاظ زمانی کوتاهتر است. هر چقدر این اتصال از ثبات کمتری برخوردار باشد، آنزیم فرصت کمتری برای ساخت محصول پیدا می‌کند و لذا کل تکثیر در واکنش PCR کم می‌شود. لذا دمای Ta بسیار بالا منجر به هیبریدیزاسیون ناکافی پرایمر با الگو شده و در نتیجه محصول PCR کاهش می‌یابد. در مقابل، Ta بسیار پائین ممکن است منجر به ایجاد محصولات غیراختصاصی شود.

این دما معمولا ۲ تا ۵ درجه از دمای Tm بالاتر است. در هنگام انجام واکنش PCR، این دما را به طور تقریبی از روی دمای ذوب محاسبه کنید و با توجه به نتایج کسب شده در واکنش‌های آزمایشی به بهترین دما برسید. بهترین دمای اتصال دمایی است که در آن محصول با سایز و مقدار مناسب تولید می‌شود و باندهای غیر اختصاصی به چشم نمی‌خورند.

محتوای GC پرایمر

در Primer GC content این که چه مقدار از طول پرایمر را چه بازهایی تشکیل می‌دهند مهم است. محتوای GC بهتر است بین ۴۰ تا ۶۰ درصد باشد. این بدان معنی است که محتوای AT می‌بایست بین ۶۰ تا ۴۰ درصد می‌باشد. بهتر است پرایمرهایی با محتوای GC حدود ۵۰ درصد طراحی کنید.

گیره GC در انتهای پرایمر

توصیه می‌شود دو باز انتهای ‘۳ پرایمر، بازهای G و C باشند که به آن گیره GC در انتهای پرایمر یا GC Clamp گفته می‌شود.

نکته کاربردی: پرایمرها طوری طراحی شوند که بازهای انتهای ‘۳ در صورت امکان به صورت GC، CG، CC، یا GG باشند.

تکرارهای ۲ بازی در پرایمر

به لحاظ تعریف، تکرار بازها (Repeats) به معنای وجود دو باز تکرار شونده (مثلا (ATATAT در توالی پرایمر است.

نکته کاربردی: بهتر است چنین پرایمرهایی طراحی نشوند، چون امکان اتصال به مناطق تکراری ژنوم و تولید محصولات غیر اختصاصی را دارند.

تکرارهای پشت سرهم یک باز در پرایمر

به لحاظ تعریف، تکرار زیاد یک باز به طور پشت سر هم ران (Runs) نامیده می‌شود. برای مثال در پرایمر AACCCCCTTAAGGCC برای باز C ران ۵ عددی وجود دارد.

نکته کاربردی: بهتر است چنین پرایمرهایی طراحی نشوند.

ساختارهای ثانویه پرایمر

قابلیت اتصال بازها درون یک پرایمر (primer self-complementarity) موجب تولید ساختارهای ثانویه (Secondary structures) نامناسبی می‌شود که روی موفقیت واکنش PCR اثر سوء دارند. از انجا که اتصال بازها با یکدیگر باعث تا شدن پرایمر می‌شود، به اصطلاح ساختارهای سنجاق سری (hairpin structures) تولید می‌شوند.

نکته کاربردی: بهتر است چنین پرایمرهایی طراحی نشوند

پرایمر دایمر

اتصال پرایمرها به یکدیگر (Primer dimer) می‌تواند به یکی از حالت‌های زیر باشد:

پرایمرهای forward به یکدیگر و پرایمرهای reverse به یکدیگر. این نوع اتصالات را self-dimer می‌نامند.

اتصال پرایمرهای رفت (forward) و برگشت (reverse) در self-dimer

امکان دارد پرایمرهای forward و reverse به یکدیگر به صورت heterodimer وصل شوند. در این صورت هر پرایمر برای دیگری الگو شده و با فعالیت پلی مراز ادامه هر کدام ساخته می‌شود.

نکته کاربردی: در صورتی که دمای زیادی برای جداشدن چنین پرایمرهایی لازم است، بهتر است چنین پرایمرهایی طراحی نشوند.

پرایمر blast حتما انجام شود که در منطقه مورد نظر طراحی پرایمر انجام گردد. و همولوژی ها هم مد نظر باشد.

Real-time PCR fluorescence detection systems

در Real-time PCR، مقدار DNA بعد از هر سیکل از طریق رنگ‌های فلورسنت اندازه‌گیری می‌شود که سیگنال فلورسنتی رو تولید میکنه که با تعداد مولکول‌های محصول PCR (آمپلیکون‌های) رابطه مستقیم دارد

گزارشگرهای فلورسنت مورد استفاده در real-time PCR شامل:

۱- double-stranded DNA (dsDNA)- binding dys

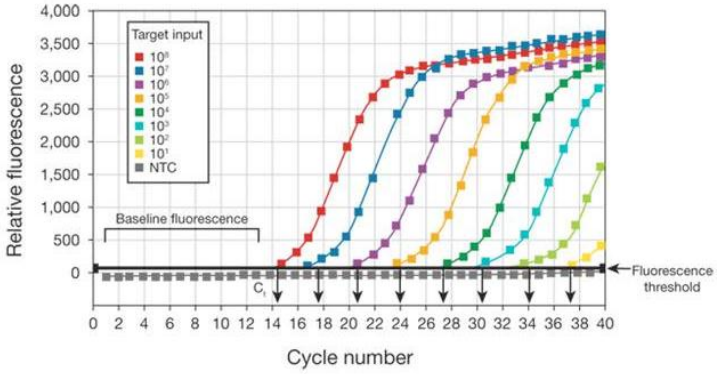
۲- Dye molecules attached to PCR primers or probes

در اصل تغییر در فلورسانس در طول واکنش ترکیبی است از چرخه حرارتی thermal cycling با Fluorescent dye scanning capability ترکیب می کند. همون طور که در نمودار میبینیم با ترسیم نمودار فلورسانس در برابر تعداد سیکل، real-time PCR یک plot amplification ایجاد می کند که نشان دهنده تجمع محصول در طول مدت کل واکنش PCR است

شکل زیر نمودار فلورسانس نسبی در مقابل عدد سیکل. نمودارهای تقویت زمانی ایجاد می شوند که سیگنال فلورسنت از هر نمونه بر اساس شماره چرخه ترسیم شود. بنابراین، نمودارهای amplification دهنده تجمع محصول در طول مدت real-time PCR آ است. نمونه‌های مورد استفاده برای ایجاد نمودارها، dilution seriesهستند از توالی DNA هدف هستند.

Fluorescent reporters used in real-time PCR:

- **Double-stranded DNA (dsDNA)- binding dyes**
- **Dye molecules attached to PCR primers or probes**

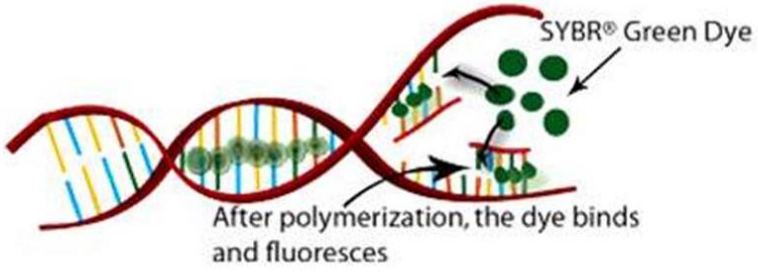


SYBR® Green dye

سایبرگرینI یک فلوئورسنت متصل شونده به شیار کوچک مارپیچ دورشته‌ای DNA است. با افزایش مقدار DNA محصول، سایبرگرین بیشتری به آن متصل شده و افزایش فلورسانس خواهیم داشت. میزان فلورسانس با مقدار مولکول-های دو رشته‌ای DNA ی تولیدشده متناسب است. از این طریق میزان تکثیر را طی زمان و از طریق اندازه‌گیری فلورسانس در هر چرخه می‌توان بررسی نمود. قابل‌ذکر است که سایبرگرین به DNA تک رشته متصل نمی‌شود. پس در مرحله‌های Annealing و Extension و هم‌زمان با دو رشته‌ای شدن مولکول DNA متصل می‌شود. در زمان اتصال، سایبرگرین نور را در طول موج ۴۸۰ نانومتر جذب نموده و در طول ۵۲۰ نانومتر منتشر می‌شود. سایبرگرین نسبت به سایر پروب‌ها دارای مزایایی هست ازجمله: ارزان است و کاربرد آن آسان می‌باشد. دارای حساسیت بیشتری نسبت به سایر پروب‌ها است، نسبت به دما پایدار است و با آنزیم DNA پلیمراز تداخل چندانی ندارد؛ اما چون این ماده می‌تواند به‌صورت غیراختصاصی به هر DNA دو رشته‌ای متصل شود، پس علاوه بر اتصال به DNA موردنظر به پرایمر و سایر دو رشته‌های غیراختصاصی هم اتصال می‌یابد و این مورد از عیوب سایبرگرین است

SYBR® Green dye

SYBR® Green I dye is a fluorescent DNA binding dye, binding to the minor groove of any double-stranded DNA.



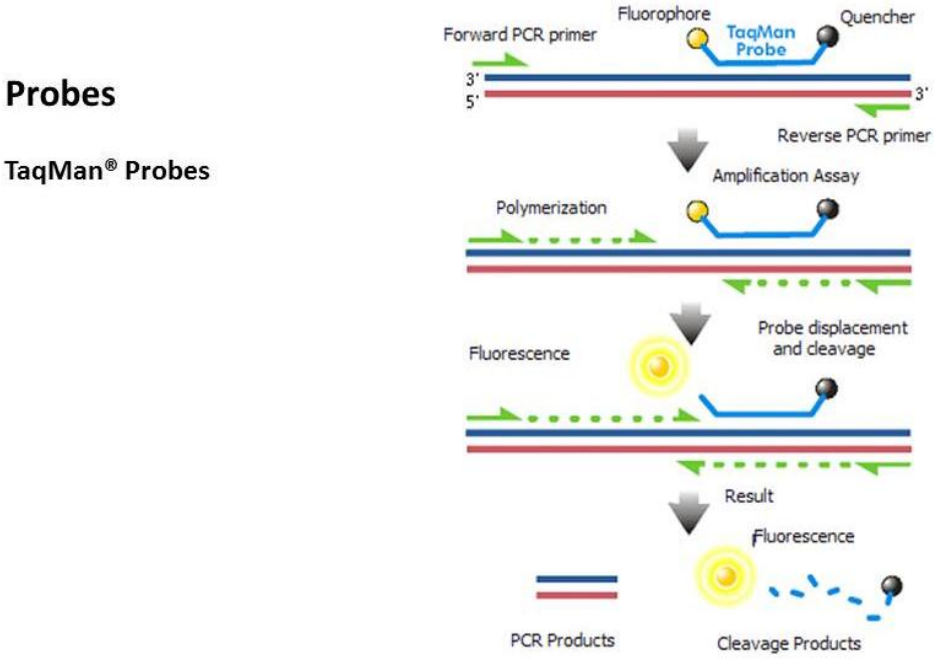
Probes

استفاده از نشانگرهای فلورسنت اختصاصی با استفاده از شناساگرهای (پروب) ژن هدف. در این روش از تعدادی شناساگر الیگونوکلئوتیدی (probe) استفاده می شود.

شناساگرهای مورد استفاده در این روش شامل: Molecular Beacons , TaqMan® Probes FRET Hybridization Probes و Scorpion® Primers می باشند.

Taq man probs

اساس این روش خاصیت ۵ ′Exonuclease Activity آنزیم Taq DNA Polymerase می باشد. یک Reporter در انتهای ۵ و یک Quencher درانتهای ۳ وجود دارد. در انتهای ۳ یک بلاکر هم وجود دارد) این بلاکر باعث می شود که پروب به عنوان پرایمر استفاده نشود. پروب حدود چندباز بعد از انتهای ۳ یکی از پرایمرها (Forward) طراحی می شود.طول این پروب ۲۱ تا ۳۱ نوکلئوتید می باشد. آنزیم پس از نزدیک شدن به پروب با استفاده از خاصیت ۵′ Exonuclease Activity آن راتجزیه می کند. وقتی پروب تجزیه شد ماده Reporter از تأثیر Quencher خارج شده واز خود فلورسانس ساطع می کند. در هر سیکل با آزادشدن بیشتر Reporter ماده فلورسانس بیشتری ساطع گردیده و توسط دستگاه ثبت می شود.

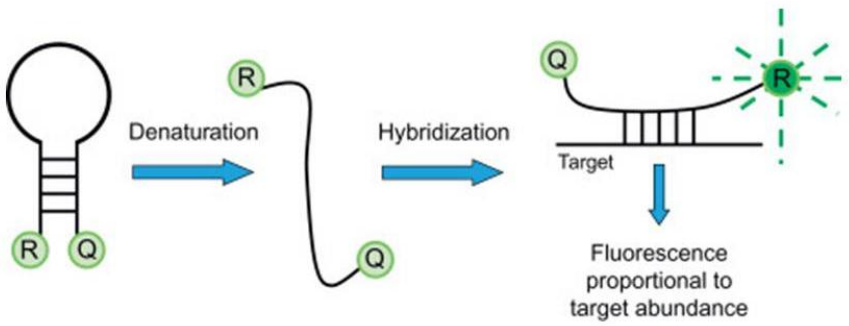


Beacon probs

این پروب نیز همانند پروب Taq Man در اتهای ۳ و ۵ پریم دارای رنگ بوده اما برخلاف Taq Man تجزیه نمی شود و در سیکلهای بعدی دوباره مورد استفاده قرار می گیرد .این پروب قبل از اتصال به DNA به صورت لوپ است که به آن Stemloop structure می گویند. به علت نزدیکی Reporter و Quencher نور ساطع شده توسط Quencher مهار می شود. پس از اتصال پروب به محل موردنظر خود، ساختا ر Stemloop باز و در نتیجه رنگها از هم دور می شوند که نتیجه این امر تابش نور از Reporter است.

Probes

Molecular Beacons

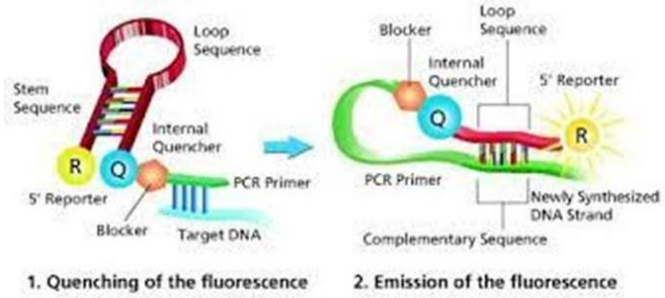


Scorpion® Primers

توالی پروب طوری طراحی شده که مکمل تعدادی از نوکلئوتیدها بعد از پرایمر forward است. دو طرف پروب شامل توالی شش نوکلئوتیدی است که در دمای محیط ایجاد duplex می نماید. انتهای ۵ ساقه به صورت کووالان به Reporter و انتهای ۳ به Quencher متصل می باشد. هنگامی که پروب به صورت duplex است، نور ساطع نمی شود. یک بلاکر نیز از تکثیر پروب توسط پرایمر Reverse در چرخه بعدی PCR جلوگیری می کند . جهت گیری پروب به صورتی است که انتهای ۵آن مکمل انتهای ۳تارگت می باشد. در طول سیکلهای PCR، همزمان با اتصال پرایمرها، لوپ پروب باز و به قسمت تکثیرشده از چرخهٔ قبل متصل می شود و در نتیجه به علت جداشدن Reporter از Quencher نور ساطع می شود. در مرحلهٔ بعد پروب از Template جداشده و به حالت خاموش در می آید. به این ترتیب در هر annealing با افزایش محصول PCR مقدار فلورسانس نیز افزایش می یابد

Probes

Scorpion® Primers

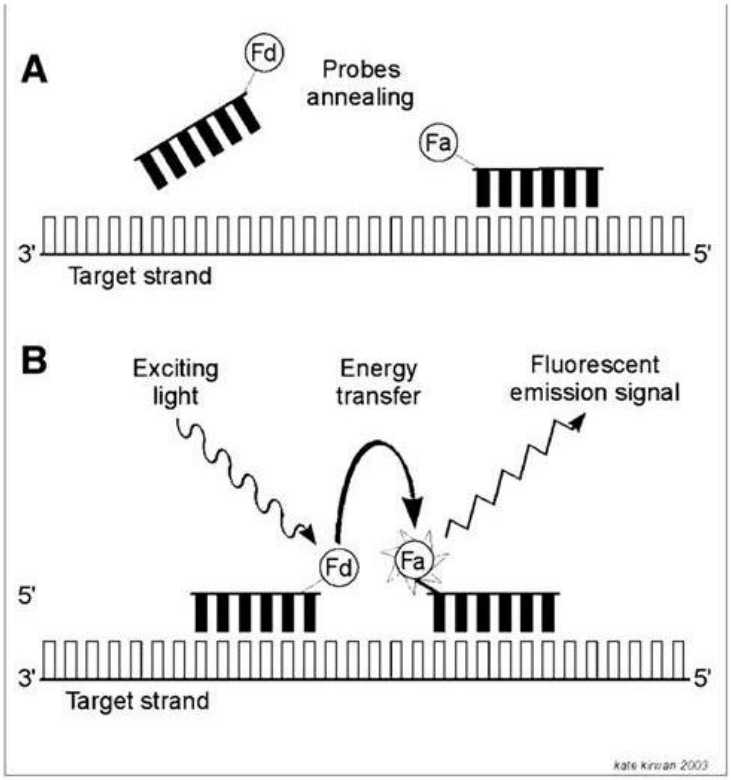


FRET Hybridization Probes

در این سیستم پروب به صورت دو قطعه مختلف طراحی می شود. فلورسانت در انتهای ۵ یک پروب و فلورسنت دیگری نیز و در انتهای ۳ پروب دیگر قرار دارد. وقتی که ا ین دو دقیقاً درمحل موردنظر خودشان بچسبند نزد یکی فاصله ا ین دو ماده باعث واکنش FRET می شود. انتخاب رنگها در این پروب به صورتی است که طول موج ساطع شده از یک فلورسنت به عنوان محرک ماده فلورسنت دوم عمل می کند. بنابراین پس از چسبیدن دو پروب بر روی محصولات این رنگهای فلورسنت به هم نزدیک شده و فلورسانس ساطع شده قابل اندازه گیری است. طراحی این پروبها به نحوی است که در صورت تفاوت حتی در یک نوکلیوتید پروب به DNA متصل نمی شود.یکی از کاربردهای این پروب ها در تشخیص SNP می باشد. در موتاسیونهای نقطه ای چون باز جهش یافته مکمل باز مورد نظر در پروب نیست اتصال صورت نمی گیرد.

Probes

FRET Hybridization Probes



Real-time PCR analysis

منحنی میزان تکثیر محصول در Real time یا PCR بر حسب سیکل های PCR شامل سه فاز است :

مرحله اول: فاز Baseline region یا Linear phase می باشد. در این فاز میزان تکثیر محصولات به قدری نیست که سبب افزایش نور فلورسنت گردد. نور فلورسنت مشاهده در این فاز ازcDNA ، پرایمرها و رنگ های فلورسنت آزاد در محیط واکنش نشر می یابد بنابراین در این فاز میزان نور ساطع شده به صورت خطی می باشد.

مرحله دوم: فازهای Exponential phaseو Log liner phase: در این فاز میزان محصول دو رشته ای در هر چرخه دو برابر می شود بنابراین میزان محصولات به صورت نمایی افزایش می یابد.

مرحله سوم: فاز plateau phase : در این فاز، ترکیبات واکنش از بین می روند و دیگر محصولی تکثیر نمی شود بنابراین افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی شود. به اصطلاح ریل تایم در این مرحله اشباع شده است.

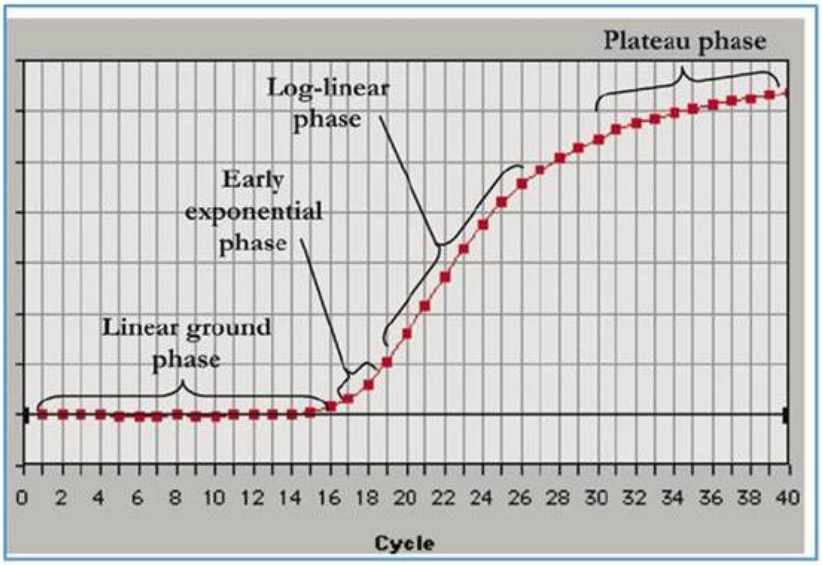
نمودار تکثیر محصولات در ریل تایم بر حسب سیکل. همان گونه که مشاهده می گردد تا ۱۵ سیکل اول در میزان محصولات تکثیر شده تغییر محسوسی دیده نمی شود اما از سیکل ۱۶، واکنش وارد یک فاز افزایشی می گردد که به آن فاز Exponential می گویند. سیکلی که در آن واکنش وارد فاز Exponential می گردد به میزان DNA الگوی اولیه بستگی دارد. یعنی هر چه میزان الگوی اولیه برای تکثیر بیشتر باشد بنابراین واکنش Real time یا PCR در سیکل پایینتری وارد فاز Exponential می گردد.

Linear ground phase

Early exponential phase

Log-linear or exponential phase

Plateau phase

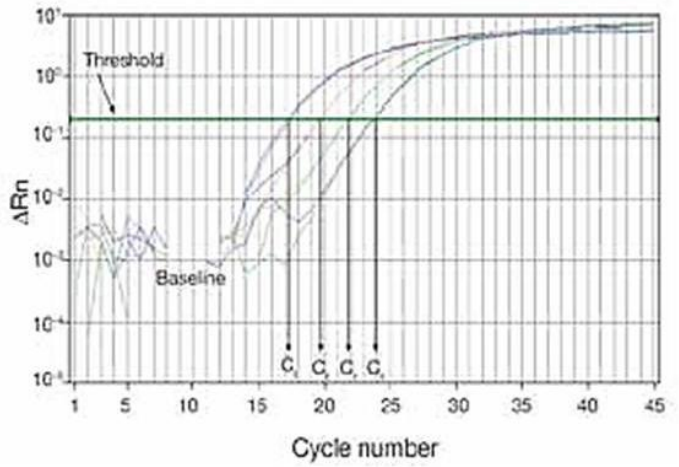


baseline واکنش Real-time PCR به سطح سیگنال در طول سیکل های اولیه PCR، معمولاً چرخه های ۳ تا ۱۵، که در آن تغییر کمی در سیگنال فلورسنت وجود دارد، اشاره دارد. low-level signal of the baseline را می توان با "نویز" واکنش برابر دانست .

Baseline

Threshold

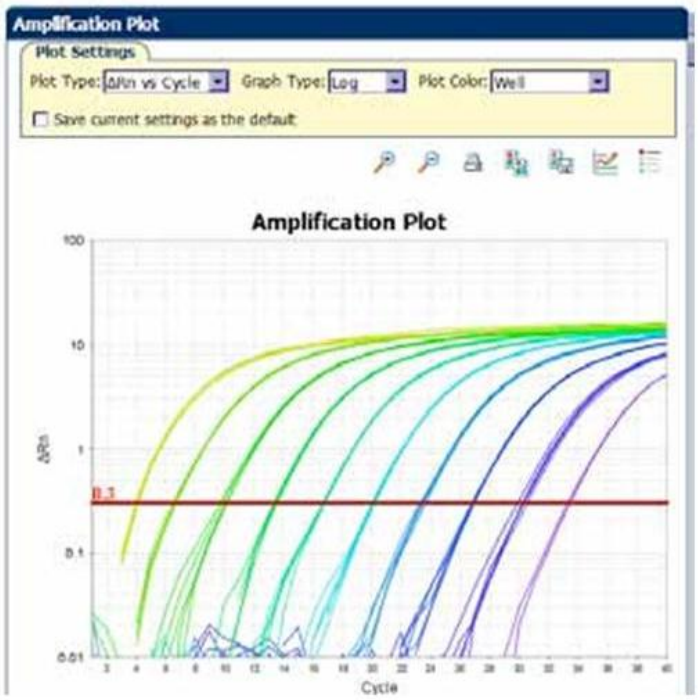
Threshold cycle (Ct)



سیکلی که در آن محصولات وارد فاز exponential می شود در تکنیک real time به این سیکل مرجع به اصطلاح سیکل آستانه یا Ct (cycle of threshold) گویند. Ct به این مفهوم است که در چه سیکلی محصولات real time از یک حد آستانه (threshold) فراتر می رودر دستگاه های real time این حد آستانه بر اساس فرومول های خاصی تعیین می گردند. با این وجود مفهوم Ct برای همه دستگاه ها یکسان است و به مفهوم سیکلی است که در آن محصولات real time از یک حد آستانه فراتر فراتر رفته است.

همانطور که در شکل میبینید Ct با مقدار اولیه dna یا initial DNA copy number رابطه عکس داره و هر چی تعداد کپی بیشتر باشه ct در چرخه پایین تری هست .

Ct value is inversely related to the starting amount of target



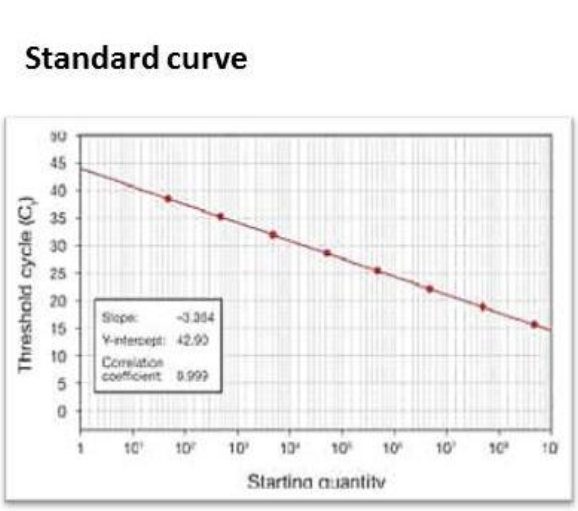
Standard curve

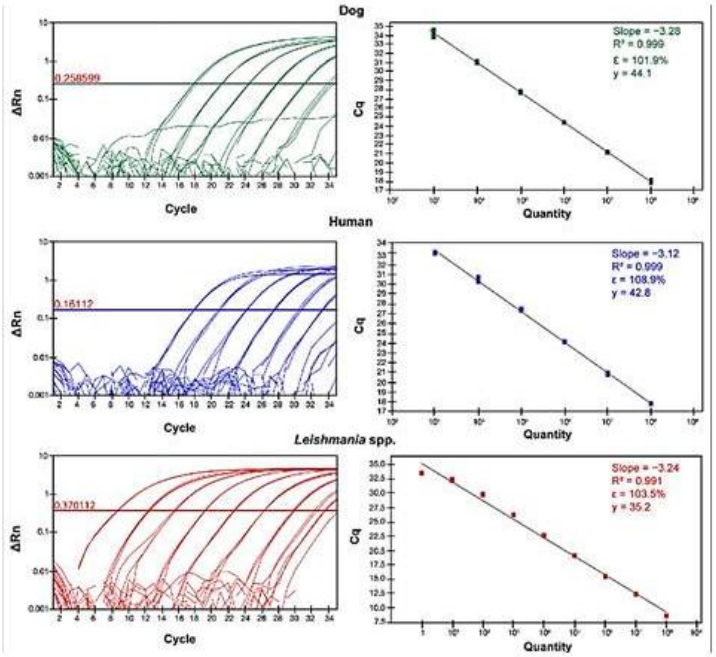
یکdilution series of known template concentrations سری رقت از غلظت های الگوی شناخته شده می تواند برای ایجاد یک منحنی استاندارد برای تعیین مقدار اولیه اولیه الگوی هدف در نمونه های تجربی یا برای ارزیابی کارایی واکنش استفاده شود (شکل ۴). log هر غلظت در سریال دایلوشن (محور x) در برابر مقدار Ct برای آن غلظت (محور y) رسم می شود. از این Standard curve منحنی استاندارد، اطلاعات مربوط به عملکرد واکنش و همچنین پارامترهای مختلف واکنش (شامل شیب، قطع y و ضریب همبستگی) Y-intercept و Slope و **Efficiency** و Dynamic range را می توان به دست آورد.

در این روش از نمونهٔ RNA یا DNA با غلظت مشخص برای رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود. غلظت RNA یا DNAاستاندارد با اسپکتروفوتومتر (nm260) تعیین می‌شود و سپس از روی وزن مولکولی نمونه به تعداد نسخه‌های آن تبدیل می‌شود.

استانداردهای غلظتی ژن‌های معروف به صورت تجاری قابل خریداری است هرچند که بسیار گران قیمتند. از نمونه های استاندارد سری رقعت تعیین کرده و همراه با نمونه هدف در دستگاه Real-time PCR قرار می دهیم با استفاده از Ct که دستگاه برای هر رقت به ما می دهد یک منحنی رسم کرده که X آن رقت یا تعداد کپی از ژن و Y آن CT باشد، نمودار

به دست امده یک نمودار خطی است که با قرار دادن عدد نمونه هدف در نمودار غلظت یا تعداد کپی آن نیز بدست می آید. ترجیحا طول قطعه استاندارد مساوی با طول قطعه هدف باشد.





Correlation coefficient (R2)

ضریب همبستگی معیاری است که نشان می دهد چقدر داده ها با منحنی استاندارد مطابقت دارند. مقدار R2 منعکس کننده خطی بودن منحنی استاندارد است. در حالت ایده آل، R2 = 1، اگرچه ۰,۹۹۹ به طور کلی حداکثر مقدار است.

y-intercept

یک آستانه ای هست که از Ct انتظار میره در حالتی که کمترین کپی نامبر مولکول تارگت یک تکثیر قابل توجه داشته باشد. اگرچه PCR از نظر تئوری قادر به تشخیص یک کپی از یک هدف است، تعداد کپی ۲-۱۰ معمولاً به عنوان پایین ترین سطح هدف تعیین. مقدار y-intercept به عنوان معیار مستقیم حساسیت به حساب میاد.

Slope

شیب log-linear phase of the amplification reaction معیاری برای بازده واکنش است. برای به دست آوردن نتایج دقیق و قابل تکرار، واکنش ها باید بازدهی تا حد امکان نزدیک به ۱۰۰ درصد، معادل شیب ۳,۳۲- داشته باشند.

Efficiency

بازده 100% PCR مطابق با شیب ۳,۳۲- است که با معادله زیر تعیین می شود :

Efficiency = 10(-1/slope)

در حالت ایده آل، راندمان (E) یک واکنش PCR باید ۱۰۰٪ باشد، به این معنی که الگو پس از هرthermal cycle سیکل حرارتی در فاز exponential mplification دو برابر می شود. بازده واقعی می تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد واکنش ارائه دهد. عوامل تجربی مانند طول، ساختار ثانویه و محتوای GC amplicon می توانند بر بازده تأثیر بگذارند. شرایط دیگری که ممکن است بر کارایی تأثیر بگذارد، پویایی خود واکنش، dynamics of the reaction استفاده از غلظت‌های غیربهینه معرف و non-optimal reagent concentrations و کیفیت آنزیم است که می‌تواند منجر به راندمان کمتر از ۹۰ درصد شود. وجود مهارکننده های PCR در یک یا چند معرف می تواند بازدهی بیش از ۱۱۰ درصد ایجاد کند. یک واکنش خوب باید بازدهی بین ۹۰ تا ۱۱۰ درصد داشته باشد که مربوط به شیب بین ۳/۵۸- تا ۳/۱۰- است.

اگر inhibitors در نمونه‌های تغلیظ شده وجود داشته باشند، در مقایسه با نمونه‌های بدون inhibitors ، سیکل های بیشتری برای عبور از threshold تشخیص مورد نیاز است. در نتیجه، مقادیر ΔCt بین نمونه غلیظ و رقیق شده، همانطور که پیش‌بینی می‌شد، کوچک‌تر است و در نتیجه amplification efficiency بالای ۱۰۰ درصد را به همراه دارد.

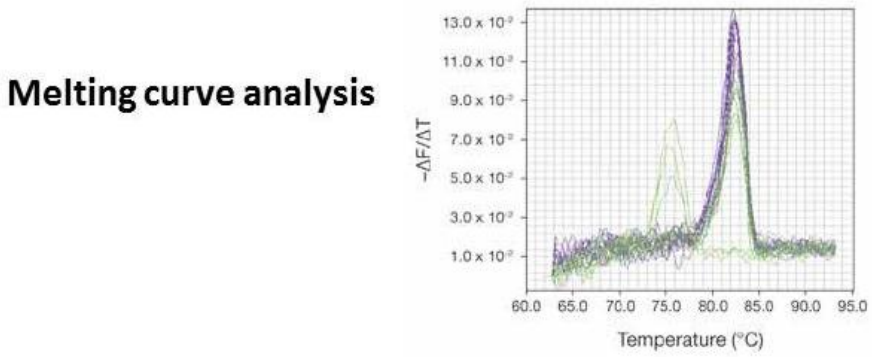
Dynamic range

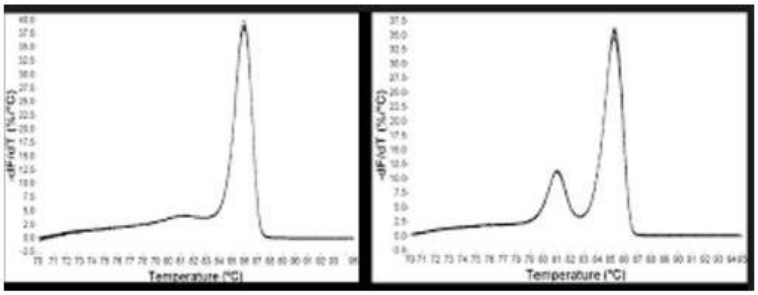
Dynamic range محدوده input template (بین بالاترین و کمترین RNA یا DNA ورودی) است که خطی بودن قابل قبول (R2 ≥0.980) و efficiency (ترجیحاً بین ۹۰ تا ۱۱۰٪) مشاهده می شود. برای نتایج آزمایش qPCR، تنها مقادیر معتبر Cq آنهایی هستند که در dynamic range معتبر قرار می گیرند. در اصل این رنجی است که افزایش غلظت ماده اولیه منجر به افزایش amplification product می شود.

Melt curve

در صورتی که از رنگ های فلورسنت مانند سایبرگرین در ریل تایم استفاده نموده اید می توانید منحنی ذوب را برای هر نمونه مورد بررسی قرار دهید. منحنی ذوب تغییر در فلورسانس را نشان می‌دهد که وقتی DNA دو رشته‌ای (dsDNA) با مولکول‌های رنگ گنجانده شده جدا می‌شود، یا با افزایش دمای واکنش به DNA تک رشته‌ای (ssDNA) ذوب می‌شود.

از آن جاییکه هر ژن دارای منحنی ذوب خاص خود می باشد بنابراین منحنی های یک ژن در تمام نمونه ها باید با هم منطبق باشند و همچنین باید تمام منحنی ها تک قله باشندوجه کنید که همه قله های یک ژن باید روی یک دما باشند ولی نیازی نیست ارتفاع قله ها یکسان باشد. در آنالیز داده های ریل تایم نمونه هایی که منحنی ذوب آن ها برای هر دو ژن با سایر نمونه ها منطبق نیست باید از بررسی حذف شوند. توجه کنید که منحنی ذوب ژن و ژن کنترل داخلی باید جدا گانه مورد بررسی قرار گیرند و نیازی نیست منحنی های این دو ژن با هم منطبق باشد.





Absolute quantification

یکی از روش های آنالیز داده های ریل تایم، ترسیم منحنی استاندارد جهت سنجش میزان مطلق ژن هدف در نمونه ها می باشد. در این روش از یک نمونه RNA یا DNA با غلظت مشخص برای رسم منحنی استاندارد استفاده می شود. ابتدا غلظت RNA یا DNA استاندارد با روش اسپکتروفوتومتر تعیین می شود و سپس با استفاده از وزن مولکولی توالی RNA یا DNA می توان تعداد نسخه های RNA یا DNA را در نمونه استاندارد تعیین نمود. در مرحله بعد از این نمونه استاندارد چند سری رقت متوالی تهیه می گردد که تعداد نسخه های ژن هدف و یا میزان آن به نانوگرم در هر رقت مشخص می باشد. سپس برای این نمونه ها ریل تایم گذاشته می شود. البته در این روش علاوه بر نمونه های حاصل از رقت های متوالی، نمونه های مورد بررسی (که تعداد نسخه ژن هدف باید در آن ها تعیین گردد) نیز با ریل تایم بررسی و میزان Ct برای همه نمونه ها مشخص خواهد شد. در مرحله بعد یک نمودار استاندارد از نمونه های رقیق شده ترسیم می گردد بدین صورت که محور X میزان رقیق سازی یا تعداد کپی ژن هدف و محور Y میزان Ct هر نمونه می باشد، در ادامه با مقایسه Ct حاصل برای نمونه هدف با نمودار استاندارد می توان میزان کپی و یا غلظت ژن هدف را در آن نمونه محاسبه نمود.

Relative quantification

روش مقایسه نسبی بیان ژن ها در تکنیکReal time PCR

در این روش: بیان یک یا چند ژن هدف بین دو یا چند گروه (به عنوان مثال تومری و نرمال) مقایسه می گرددر این حالت بهترین راه گزارش میزان تغییرات آن ژن در یک نمونه نسبت به نمونه دیگر fold change می باشد. مفهوم fold changeهمان "چند برابر" می باشد، به عبارت بهتر بیان ژن مورد نظر در نمونه های گروه اول (به عنوان مثال نمونه های سرطانی) نسبت به نمونه های گروه دوم (به عنوان مثال نمونه های نرمال) چند برابر افزایش و یا کاهش یافته است؟ این جمله به این مفهوم است که اگر بیان ژن هدف را در گروه اول برابر ۱ در نظر بگیریم، بیان آن در گروه دوم برابر چه میزانی خواهد بود؟

Internal reaction control

برای حذف نوسانات مقادیر RNA وارد شده در واکنش و خطاهای دستگاه ها و افراد در این روش از ژن های رفرنس به عنوان کنترل استفاده می شود. ژن های رفرنس باید در همه بافت ها بیان ثابت داشته باشند. بدین منظور از ژن هایی تحت عنوان Housekeeping genes مانند b-actin و GAPDH استفاده می شود. بیان این ژن ها در همه نمونه ها وبافت

ها ثابت می باشد و از مقایسه بیان ژن هدف با ژن کنترل داخلی می توان کاهش یا افزایش بیان ژن هدف در نمونه ها را مشخص نمود.

انواع template ها که به عنوان استانداردهای absolute quantitation استفاده شده است:

DNA standards

آمپلیکون PCR هدف مورد نظر، یا کلون پلاسمید حاوی هدف مورد نظر.

مزایا.Easy to generate, quantify, and maintain stability with proper storage :

معایب: نمی توان مرحله رونویسی معکوس qRT-PCR را انجام داد، که می تواند به طور قابل توجهی بر کارایی واکنش تأثیر بگذارد.

استانداردهایRNA

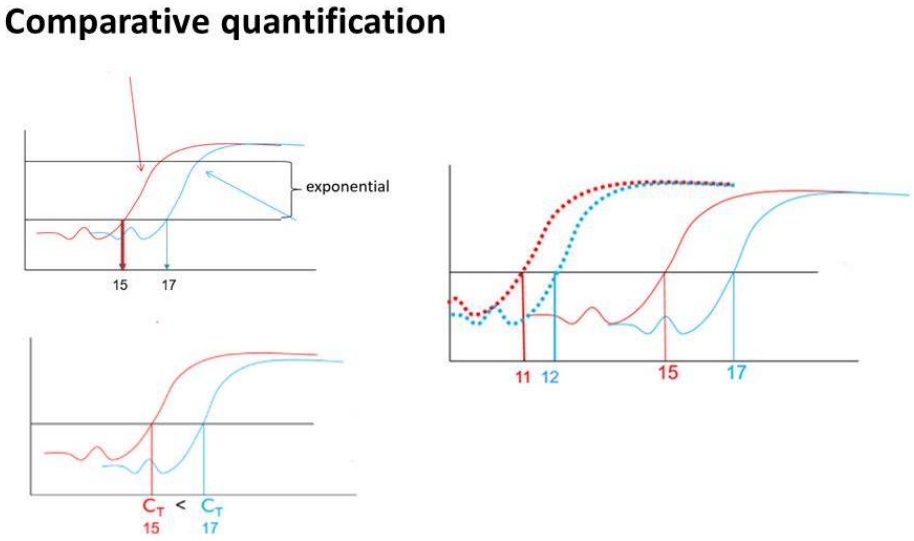
RNA :رونویسی شده در شرایط آزمایشگاهی هدف مورد نظر.

مزایا: بهره وری RT را شامل می شود و هدف مورد علاقه را به طور مشابه تقلید می کند.

معایب Time-consuming :بر و حفظ دقت accuracyدر طول زمان به دلیل instability دشوار است.

این شکل منحنی تکثیر ژن را به عنوان مثال را در دو نمونه مختلف (به عنوان مثال سرطانی و نرمال) در واکنش Real time pcr نشان می دهد. نمونه قرمز رنگ دارای الگوی بیشتر از ژن فوق نسبت به نمونه آبی رنگ در شروع واکنش می باشد بنابراین زودتر وارد فاز exponential می شود. نمونه قرمز رنگ در سیکل ۱۵ و نمونه ابی رنگ در سیکل ۱۷ وارد فاز exponential می شوند. چون نمونه قرمز رنگ زودتر به فاز exponential رسیده و دارای الگوی بیشتری است می توان گفت که بیان ژن مورد نظر در نمونه قرمز رنگ بیشتر است. بنابراین هرچه قدر سیکلی که در آن میزان محصول ریل تایم وارد فاز exponential می گردد کمتر باشد یعنی میزان الگوی اولیه (و به عبارتی بیان ژن) بیشتر بوده است.

حال می توان به صورت توافقی سیکلی که در آن محصولات وارد فاز exponential می شود را به عنوان سیکل مرجع در نظر گرفت و بگوییم در شکل ct برای نمونه قرمز رنگ برابر ۱۵ و برای نمونه آبی رنگ برابر ۱۷ است. Ct به این مفهوم است که در چه سیکلی محصولات real time از یک حد آستانه (threshold) فراتر می رود.



آشنایی با مفهوم ژن کنترل داخلی (ژن رفرنس) در روش ریل تایم

در توضیحات قبل گفتیم که " Ct کمتر = بیان بیشتر" و علت آن را توضیح دادیم. اما باید توجه شود که درست بودن این فرض به شرایط بسیاری بستگی دارد و رعایت نمودن همه این شروط به قدری سخت می باشند که عبارت " Ctکمتر = بیان بیشتر" چندان قابل اعتماد نمی باشد. مثلا در یک نمونه از ۴ میکرولیتر cDNA به عنوان الگو استفاده شده است در حالی که در نمونه دیگر تنها یک میکرولیتر cDNA به عنوان الگو استفاده شده باشد و در نتیجه ctمتفاوت میده اما این ct متفاوت دلیلش بیان بیشتر نبوده . بنابراین با قطعیت نمی توان گفت که " Ctکمتر = بیان بیشتر". البته در آماده سازی واکنش ها در نمونه ها جهت Real time خطای سمپلینگ به این شدت رخ نمی دهد اما خطاهای دیگری می تواند رخ بدهد که ممکن است تفسیر اشتباه نتایج گردد. به عنوان مثال ممکن کیفیت استخراج RNA بالاتر در نتیجه cDNA ساخته شده کیفیت بیشتری داررہ و در نتیجه اون نمونه زودتر به Ct برسد. و یا ممکن است کیفیت ساخت cDNA بین دو نمونه متفاوت باشد. بنابراین بروز این گونه خطاهای آزمایشگاهی سبب می شود که نتوان به Ct به عنوان یک پارامتر جهت مقایسه دو نمونه اعتماد نمود.

برای حل این مشکل از ژن های کنترل داخلی استفاده میکنیم (مانند ژن های GAPDH، ACTIN، و یا RPLP0). ازآنجایی که بیان بین این ژن ها در تمام نمونه ها باید یکسان باشد در صورتی که بین Ct این ژن ها در نمونه های مختلف اختلافی مشاهده گردد، به این معنی است که شرایط آزمایش برای همه نمونه ها یکسان نبوده. و با توجه به

Ctاین ژن ها میتوان Ct مربوط به ژن مورد بررسی را اصلاح نمود. ژن ها ی کنترل داخلی به دلیل اینکه برای حیات سلول ها ضروری می باشند معمولا دارای بیان بیشتر نسبت به سایرژن ها می باشند (Ct کمتری دارند).

قرمز نمونه نرمال آبی نمونه مورد بررسی و نقطه چین ها ژن کنترل داخالی ما هست.

نکته : در آنالیز نمونه های فوق، به اولین نکته ای که باید توجه شود بررسی کیفیت ساخت cDNA با توجه به Ct ژن کنترل داخلی در دو نمونه می باشد. وقتی که cDNA سنتز شده کیفیتش مناسب باشه، Ct ژن های کنترل داخی از ۲۵ کمتر است. Ct بالاتر برای ژن های کنترل داخلی بیانگر کیفیت کم cDNA سنتز شده و یا شرایط بهینه نشده در ریل تایم می باشد.

انواع کنترل در ریل تایم

RT+

منظور ازRT ، آنزیم revese transcriptase می باشد که در سنتز cDNA کاربرد دارد. به دلیل اینکه در سنتز cDNA از آنزیم RT استفاده می شود به نمونه هایcDNA ، نمونه های +RT گفته می شود. در واقع نمونه های+RT ، نمونه هایی هستند که بیان ژن ها باید در آن ها سنجیده شود.

No-RT

یک نوع کنترل در سنتز cDNA می باشد. برای تهیه این نمونه ها همه شرایط مثل سنتز cDNA است با این تفاوت که در تهیه آن ها از آنزیم RT استفاده نمی شود به همین دلیل به این نمونه ها) No-RT فاقد (RT گفته می شود. کنترل No-RTجهت بررسی آلودگی DNA در نمونه ها استفاده می گردد. به دلیل اینکه در این نمونه ها از آنزیم RT استفاده نمی شود بنابراین هیچ رشتهcDNA ای سنتز نمی شود بنابراین تکثیر این نمونه ها در ریل تایم بیانگر آلودگی DNA و یا وجود پرایمر دایمر می باشد. به نمونه های No-RT نمونه های -RT نیز گفته می شود.

NTC

نمونه کنترل منفی (NTC): در فرایند آماده سازی مواد برای واکنش ریل تایم همیشه امکان آلودگی مواد با DNA و آلودگی خارجی وجود دارد. برای بررسی احتمال وجود آلودگی در مواد ریل تایم باید ۲ یا ۳ ویال را در ریل تایم به کنترل منفی اختصاص داد. در این کنترل ها از هیچ نوع نمونه های به عنوان الگوی تکثیر استفاده نمی شود از این رو به این نوع

کنترل، نمونه های NTC نیز گفته می شود (no template control). به دلیل اینکه در این کنترل از رشته الگو جهت تکثیر استفاده نمی شود بنابراین نباید در ریل تایم محصولی برای این نمونه ها مشاهده شود در غیر این صورت وجود آلودگی در مواد ریل تایم حتمی می باشد.

Real-time PCR analysis

در آنالیز نتایج ریل تایم به آن توجه شود این است که در واکنش Real time معمولا Ct های بالای ۳۸ برای نمونه ها قابل قبول نیستند چون این ژن ها داری بیان بسیار بسیارکمی بوده و برای بررسی این ژن ها بهتر است کیفیت ساخت cDNA را افزایش داد تاCt ها پایین تر بیایند.

در یک صورت می توان Ct بالای ۳۸ را برای ژن مورد بررسی نمونه ها مورد قبول دانست که نمونه ها دارای شرایط زیر باشند:

Ctژن کنترل داخلی از ۲۱ کمتر باشد.

از یک نمونه که ژن مورد نظر در آن بیان دارد به عنوان کنترل مثبت استفاده شود و Ct نمونه کنترل مثبت از ۳۸ کمتر باشد.

بنابراین در صورتی که بیان یک ژن را در دو گروه بررسی می نمایید و Ct نمونه ها در گروه اول کمتر از ۳۸ اما در گروه دوم بالاتر از ۳۸ می باشد. در صورتی Ct گروه دوم قابل قبول می باشد که Ct ژن کنترل داخلی در نمونه های گروه دوم از ۲۱ کمتر باشد. این نتایج نشان می دهد که ژن مورد بررسی در گروه فاقد بیان می باشد.

CT

برای نرمال کردن داده ها، Ct ژن کنترل داخلی را در همه نمونه ها از Ct ژن مورد بررسی کم می کنیم.

Fold change

آشنایی با مفهوم Fold change و نحوه محاسبه (ΔΔCt) در ریل تایم در واکنش ریل تایم هنگامی که میزان بیان یک ژن را در چند گروه مقایسه می نماییم بهترین راه بیان میزان تغییرات آن ژن در یک نمونه نسبت به نمونه دیگر foldمی باشد. مفهوم fold change همان "چند برابر" می باشد change

نحوه محاسبه fold change

داده های CtΔ از نوع لگاریتمی برپایه ۲ می باشد. زیرا در real time هر سیکل محصول ما ۲ برابر می شود. بنابراین برای محاسبه fold change در ریل تایم باید CtΔ ها را از هم تفریق نمود. پارامتر جدید را که از تفریق CtΔ ژن مورد نظر در نمونه سرطانی از CtΔ نمونه غیر سرطانی به دست آمده است را دلتا دلتا ΔΔCt می نامیم.

در توضیحات قبلی ابتدا ذکر نمودیم که " Ct کمتر = بیان بیشتر" و سپس آن را اصلاح نمودیم و ذکر کردیم که "CtΔ کمتر = بیان بیشتر" و سپس برای محاسبه fold change میزان CtΔΔ را محاسبه نمودیم و ذکر نمودیم که " CtΔΔ کمتر = بیان بیشتر"، اما در ادامه می خواهیم بگوییم " fold change بیشتر = بیان بیشتر"// برای همین مقدار CtΔΔ را در عدد (۱-) ضرب نمود پس اکنون می گوییم " CtΔΔ- بیشتر= بیان بیشتر".

همان گونه که قبلا گفته شد داده های Ct، ΔCt، ΔΔCt و CtΔΔ- بر اساس لگاریتم بر پایه ۲ هستند بنابراین CtΔΔ- همان fold change به صورت لگاریتمی بر پایه۲ می باشد. حال برای اینکه CtΔΔ- را به حالت خطی در اورد، باید ۲ را توان CtΔΔ- رساند. مقادیر حاصله بیانگر fold change برای هر نمونه خواهد بود.

در برخی از نرم افزارهای ریل تایم از Cp به جای Ct استفاده می نمایند. Cp مخفف crossing point می باشد و به مفهوم سیکلی می باشد که در آن میزان محصولات real time از یک نقطه خاص (crossing point) فراتر می رود. در عمل تفاوتی بین آنالیز داده ها براساس Ct و یا Cp وجود ندارد.

Efficiency در نمودار استفاده از فرمولهای ۱ تا ۳ برای محاسبه fold change در شرایطی صحیح است که میزان کارایی همه پرایمرها برابر با ۱۰۰درصد باشد. ۱۰۰درصد بودن کارایی پرایمرها به این معنی است که محصولات ریل تایم در هر سیکل از واکنش، ۲ برابر می شوند، اما همیشه این گونه نیست و در بسیاری از موارد کارایی پرایمرها از ۱۰۰درصد کمتر است بنابراین نمی توان از عدد ۲ در فرمول ۱ استفاده نمود. به عنوان مثال اگر کارایی پرایمرهای ژن هدف و ژن کنترل داخلی برابر با ۸۰درصد باشد بنابراین در فرمول ۱ به جای عدد ۲ باید از عدد ۱,۸ (۱+۰,۸) استفاده نمود.

Comparative quantification algorithms

ΔCT = CT(target gene)−CT(reference gene)

ΔΔCT = ΔCT(sample 2)−ΔCT(sample 1).

Log 2 fold change = -ΔΔCT → fold change $2^{-\Delta\Delta CT}$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{control})} = \frac{2^{-(\Delta Ct)_{sample}}}{2^{-(\Delta Ct)_{control}}} \qquad \frac{2^{-(Ct_{target} - Ct_{ref})_{sample}}}{2^{-(Ct_{target} - Ct_{ref})_{control}}}$$

Comparative quantification algorithms

$$\text{fold ghange} = \frac{2^{-(Ct_{target} - Ct_{ref})_{sample}}}{2^{-(Ct_{target} - Ct_{ref})_{control}}} \qquad \text{fold ghange} = \frac{2^{-(Cp_{target} - Cp_{ref})_{sample}}}{2^{-(Cp_{target} - Cp_{ref})_{control}}}$$

$$\text{Fola change} = \frac{(2)^{\Delta CP_{target}(control - sample)}}{(2)^{\Delta CP_{ref}(control - sample)}} \qquad \text{fold ghange} = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control - sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control - sample)}}$$

$$\text{Fola change} = \frac{(2)^{\Delta Ct_{target}(control - sample)}}{(2)^{\Delta Ct_{ref}(control - sample)}} \qquad \text{fold ghange} = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{target}(control - sample)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct_{ref}(control - sample)}}$$