

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دعای مطالعه

اَللّٰهُمَّ اَخْرِجْنِيْ مِنْ ظُلُمَاتِ الْوَهْمِ وَاكْرِمْنِيْ بِنُوْرِ الْفَهْمِ
اَللّٰهُمَّ افْتَحْ عَلَيْنَا اَبْوَابَ رَحْمَتِكَ وَاَنْشُرْ عَلَيْنَا خَزَائِنَ عُلُوْمِكَ
بِرَحْمَتِكَ يَا اَرْحَمَ الرَّاحِمِيْنَ

پروردگارا، خارج کن مرا از تاریکی های فکر و گرامی بدار به نور فهم
پروردگارا، بکشای بر ما دهای رحمت را و بکستران کنج های دانشت را به امید رحمت
تو ای مهربان ترین مهربانان

بیایید به حقوق دیگران احترام بگذاریم

دوست عزیز، این کتاب حاصل دسترنج چندین ساله ی مؤلف، مترجم و ناشر آن است. تکثیر و فروش آن به هر شکلی بدون اجازه از پدیدآورنده کاری غیراخلاقی، غیرقانونی، غیرشرعی و کسب درآمد از دسترنج دیگران است، نتیجه ی این عمل نادرست، موجب رواج بی اعتمادی در جامعه و بروز بی آمدهای ناگوار در زندگی و محیط ناسالم برای خود و فرزندانمان می گردد.

خلاصه‌ای بر تکنیک RT-qPCR

مؤلف:

نیمامحمدزاه

کتابخانه جامع
دکتر خالیدی

پیش

IQ3

میانبر

استاذ
IQ3

سرشناسنامه	: محمدزاده، نیما، ۱۳۷۱ -
عنوان و نام پدیدآور	: خلاصه‌ای بر تکنیک RT-qPCR / مولف نیما محمدزاده.
مشخصات نشر	: تهران: گروه تألیفی دکتر خلیلی، ۱۳۹۸.
مشخصات ظاهری	: ۵۷ص. : مصور، جدول، نمودار. : ۲۱×۱۴ س.م.
شابک	: 978-600-422-470-3
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
موضوع	: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
موضوع	: Polymerase chain reaction
موضوع	: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز - روش‌ها
موضوع	: Polymerase chain reaction -- methods
موضوع	: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز - کاربرد تشخیصی
موضوع	: Polymerase chain reaction - Diagnostic use
رده‌بندی کنگره	: QP۶۰۶
رده‌بندی دیویی	: ۵۷۲/۴۳
شماره کتابشناسی	: ۵۷۶۴۷۰۱

نام کتاب: خلاصه‌ای بر تکنیک RT-qPCR

مؤلف: نیما محمدزاده

ناشر: گروه تألیفی دکتر خلیلی

نوبت و سال چاپ: اول. ۱۳۹۸

شمارگان: ۱۰۰۰

چاپ و صحافی: شباب

مدیر تولید: اقبال شرقی

مدیر فنی و هنری: مریم آرده

تایپ و صفحه‌آرایی: سمانه توکلیان

بهاء: ۲۰۰۰۰ تومان

آموزشگاه دکتر خلیلی (دفتر مرکزی): ۶۶۵۸۶۲۱-۰۲۱

آموزشگاه دکتر خلیلی (شعبه شریعتی): ۲۲۸۵۶۶۲۰-۰۲۱

فروشگاه: تهران - خیابان انقلاب - رویه‌روی درب اصلی دانشگاه تهران - پاساژ فروزنده - طبقه همکف - پلاک ۳۳۱

تلفن: ۶۶۴۸۹۳۷۵ - ۰۲۱ - ۶۶۴۸۹۳۴۹

مرکز پخش: ضلع جنوب غربی میدان انقلاب - جنب سینما پارس - مجتمع تجاری پارس - طبقه اول

مرکز فروش: ۶۶۵۶۹۲۱۶ - ۰۲۱ مدیر فروش: ۵۵۰۸۵۸۹ - ۰۹۱۲



drkhalilgroupbook



www.DKG.ir



@drkhalilgroupbook

طلیحه سخن مؤلف:

امروزه تکنیک **Real Time PCR** توانسته است جایگاه خود را در بسیاری از علوم پیدا کند و به یکی از پر کاربردترین تکنیک‌ها در جامعه آزمایشگاه‌های بالینی و پژوهشی تبدیل شده است. کتاب حاضر که به اصول تئوری و مبانی کاربردی این تکنیک می‌پردازد، می‌تواند به خوبی نیازهای اولیه دانشجویان و پژوهشگران را در زمینه‌ی آشنایی و بکارگیری آن در مطالعات و پژوهش‌ها مرتفع سازد. با وجود محتوای بسیار زیاد و پیچیدگی‌های فراوان این تکنیک، سعی شده است به تمامی مفاهیم پایه در ساده‌ترین شکل ممکن اشاره شود تا دانشجویان و علاقه‌مندان بتوانند به خوبی با این تکنیک آشنا شوند و از آن استفاده کنند. امید است که این کتاب بتواند سهم بسزایی را در پیشرفت دانشجویان در فراگیری این تکنیک و رسیدن به نتایج درست و قابل قبول را ایفا کند.

تقدیر و تشکر

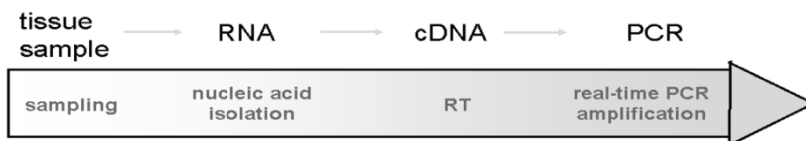
نیما محمدزاده

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۷	تاریخچه.....
۸	برخی از کاربردهای qPCR.....
۱۰	اجزای دستگاه ریل تایم.....
۱۰	انواع مختلف دستگاه‌های ریل تایم.....
۱۱	دستگاه‌های چرخشی.....
۱۱	دستگاه‌های پلیتی.....
۱۲	انواع رنگ‌های مورد استفاده در qPCR.....
۱۳	روش‌های مبتنی بر رنگ‌های آزاد.....
۱۳	سایبرگرین.....
۱۴	اوا گرین.....
۱۴	پروپ.....
۱۵	Hydrolysis Probe Technique.....
۱۶	رنگ مرجع.....
۱۷	مفاهیم اصلی در ریل تایم.....
۲۰	نکاتی مهم در مورد خط Ct.....
۲۲	منحنی ذوب.....
۲۴	انواع روش‌های ارزیابی در تکنیک qPCR.....
۲۴	محاسبه‌ی نتایج از مون RT-qPCR.....
۲۴	محاسبه Fold change.....
۲۶	استخراج DNA و RNA و سنتز cDNA.....
۲۸	روش اول استخراج DNA دستی.....
۲۹	روش دوم استخراج DNA دستی.....
۳۰	استخراج دستی RNA.....
۳۰	سنتز cDNA.....
۳۱	طراحی پرایمر.....
۳۲	قوانین طراحی پرایمر.....
۳۹	مقدارهای مورد نیاز در آزمون qPCR.....
۴۷	آنالیز آماری و توضیحات مربوط به داده‌ها.....
۴۷	PCR چندگانه.....



تاریخچه

کشف راز حیات با انتشار نظریه‌ای از واتسون و کریک مبنی بر دو رشته حلقوی بودن ساختار ژنوم انسان شروع شد. پس از انتشار این نظریه تلاش‌های زیادی برای پرده‌برداری از ساختار این ماده‌ی وراثتی صورت گرفت. در این مسیر دانشمندی به‌نام کری مولیس^۱ با اختراع PCR^۲ (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز) در سال ۱۹۸۴ انقلابی در علم به پا کرد که منجر به دریافت جایزه نوبل در سال ۱۹۹۳ شد. در همین سال‌ها روزل^۳ و همکارانش این تکنیک را گسترش داده و روش RT-PCR^۴ را ابداع کردند که در واقع ترکیبی از تکنیک PCR همراه با مواد فلورسنت می‌باشد. در واقع qPCR^۵ یا RT-qPCR به معنای جمع‌آوری مستمر سیگنال فلورسنت از یک یا چند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در طی چرخه‌ها است.

داستان کشف اتفاقی PCR

مولیس پس از حضور در سمیناری با موضوع سنتز DNA و کلون کردن ژن، متوجه شد که از شیمی برای تولید DNA می‌توان استفاده کرد و شور و هیجان او در این باره منجر به استخدام او در مرکز سنتز الیگونوکلوئوتید Cetus شد. چندین سال بعد زمانی که آزمایشگاه ارلیش^۶ به دنبال یافتن روش‌های جدیدی برای شناسایی جهش‌های تک نوکلئوتیدی در مواد ژنتیکی بود. آن‌ها تکنیکی را به نام محدودکننده الیگومری^۷ ابداع کرده بودند که مبنایی برای ایده PCR شد. در این روش یک پروب الیگونوکلوئوتیدی نشاندار شده به توالی هدف مکمل خود جفت شده و سپس این دایمر به وسیله یک آنزیم محدود کننده بریده می‌شد. در حالی که اگر این پروب به درستی توالی هدف را شناسایی نکرده و با آن جفت نمی‌شد آنزیم نمی‌توانست آن را شناسایی کرده و ببرد. مشکلات بسیاری بر سر راه این روش وجود داشت و در سال ۱۹۸۳ مولیس هنگام بررسی برای

1. Kary Mullis
2. Polymerase Chain Reaction
3. Russle Higuchi
4. Real Time PCR
5. Quantitative PCR
6. Erlich
7. Oligomer Restriction

پیدا کردن راه حل این مشکلات به نظریه PCR دست یافت. در ۱۹۸۵ و ۱۹۸۷ آنزیم Taq پلیمرز مقاوم به دما و اولین ماشین PCR به نام PCR 1000 Thermal Cycler با همکاری Cetus و Perkin-Elmer وارد بازار شدند.

در ایران به کارگیری این روش برای اولین بار توسط عبدالناصر رفیع و از آسایشگاه بابا باغی تبریز و در سال ۱۳۷۰ شمسی شروع شد در آغاز نمونه‌های بیماران درمان شده از جدام به بخش باکتریولوژی دانشکده پزشکی UCL دانشگاه لندن به سرپرستی جان استنفورد منتقل شده و پس از استخراج DNA از آن‌ها، PCR روی آن‌ها صورت می‌گرفت. سپس به مرور و پس از ایجاد بسترهای لازم، اولین آزمایشگاه PCR توسط مشارالیه در مرکز تحقیقات سل دانشگاه علوم پزشکی تبریز در سال ۱۳۷۹ شمسی رسماً تجهیز و راه اندازی گردیده است.

تفاوت PCR با RT.PCR

در PCR جهت بررسی کیفی یک ژن از پرایمرهای اختصاصی استفاده می‌شود که برای آشکار کردن نتیجه نیاز به ژل و الکتروفورز و دستگاه ژل داکت می‌باشد. این در حالی است که برای برآورد کمی یک ژن از روش به نام Real Time PCR استفاده می‌شود. که در آن نیز از پرایمرهای اختصاصی استفاده می‌شود ولی آشکارسازی به کمک نور فلوروسنت و همزمان با انجام واکنش در نرم‌افزار دستگاه مشخص شده و قابل ملاحظه می‌باشد.

برخی از کاربردهای qPCR

امروزه دستگاه Real Time PCR به یکی از ابزارهای پر کاربرد در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی تبدیل شده است. این تکنیک با داشتن حساسیت و سرعت بالاتر نسبت به تکنیک PCR می‌تواند اطلاعات بسیار بیش‌تری از میزان تعداد نسخه‌های یک ژن یا میزان بیان آن ژن را (تعداد mRNA^۱) با دقت و حساسیت ۱ الی ۳ کپی از ژن داشته باشد. این تکنیک به عنوان ابزار تشخیصی- تحقیقاتی در حوزه‌های پزشکی، غیر پزشکی و صنعتی کاربرد فراوانی دارد. به طور مثال در پزشکی برای تشخیص بیماری‌های ژنتیکی، تشخیص سرطان، بدخیمی‌ها و بیماری‌های عفونی، ارزیابی روند درمانی در تشخیص ویروس‌های مقاوم به درمان و تشخیص میکروب‌های بیماری‌زا، در دندان پزشکی تشخیص و پیش‌گیری از پوسیدگی دندان، سرطان دهان و ... می‌باشد. حتی در روان پزشکی برای مشخص کردن برخی بیماری‌های شخصیتی و رفتاری استفاده می‌شود.

برخی از موارد استفاده از تکنیک qPCR:

۱. بررسی بیان ژن‌ها: کاربرد وسیع آن در مورد بیان سایتوکاین‌های مختلف به خصوص در مورد بیماری‌های خود ایمنی و پاتوژن‌هایی نظیر تک یاخته لیشمانیا می‌باشد.
۲. ارزیابی میزان کارایی دارو^۱: برای این منظور یک ژن خاص (البته این ژن عامل بیماری نیست و به عنوان مارکر تلقی می‌شود). در نظر گرفته می‌شود و اثر دارویی مورد نظر بر تغییرات بیان این ژن بررسی می‌شود. تغییر بیان این ژن می‌تواند نشان دهنده‌ی وضعیت درمانی باشد.
۳. بررسی بیان میزان آنزیم‌های کبدی برای متابولیزه کردن داروی خاص: بطور کلی اثر داروها بر روی آنزیم کبدی به دو صورت است. گروهی بیان آنزیم‌های تجزیه کننده داروها را افزایش داده و گروه دیگر باعث مهار آنزیم‌های تجزیه کننده داروها می‌شوند.
۴. کاربرد در جهت شناسایی و تعیین دوز عوامل عفونی^۲: حساسیت به مراتب بالای این تکنیک امکان تعیین میزان دقیق یک پاتوژن را مهیا کرده است. تعیین میزان دقیق عواملی مثل HIV و HBV در درمان افراد آلوده ارزشمند می‌باشد.
۵. بررسی سرطان‌های خونی و تعیین ریسک بازگشت آن‌ها: حساسیت این روش، تشخیص سلول سرطانی از میان سلول‌های سالم است که این تشخیص قبل، حین و یا بعد از درمان قابل انجام است.
۶. تعیین میزان موفقیت پیوند اعضا: هر فرد شاخص‌های ایمونولوژیکی ویژه‌ای دارد. با بررسی این شاخص‌ها در فرد دهنده و گیرنده قبل و بعد از پیوند و مقایسه آن‌ها با هم میزان موفقیت پیوند مشخص می‌شود.
۷. ژن درمانی: در این حالت برای تعیین دوز وکتور حاوی ژن مورد نظر در ژن درمانی یا و ارزیابی این‌که وکتور وارد سلول‌های بافتی شده است از qPCR استفاده می‌شود.
۸. ژنوتایپینگ^۳: متداول‌ترین کاربرد آن تشخیص قبل از تولد لانه‌گزینی و تعیین زیر گونه^۴ و پروس‌ها و باکتری‌ها می‌باشد.
۹. برخی موارد دیگر مثل تشخیص ناقلین ناهنجاری‌های کروموزومی مثل سندرم داون، تشخیص SNP^۱، تمایز آلل‌ها و غیره می‌باشد.

1. Drug Therapy Efficacy

پانویس: تکنیک دیگری با نام RT-PCR یا همان رپورس ترانس کریپتاز PCR نیز وجود دارد که برای تولید cDNA به کار گرفته می‌شود. cDNA که یک DNA سنتز شده از RNA تک رشته است. با آنزیم رپورس ترانس کریپتاز cDNA اغلب برای کلون کردن ژن یوکاریوت‌ها در پروکاریوت‌ها استفاده می‌شود.

2. Infection Dose

3. Genotyping

4. Subtype

برخی کاربردهای این تکنیک در موارد غیر پزشکی

در صنعت بررسی کمیت لود میکروبی در غذاها یا مواد گیاهی

استفاده در علوم پزشکی قانونی و جنایی

تشخیص^۲ GMO

تشخیص انواع پاتوژن‌ها در بیماری‌های مرتبط با انسان، دام و گیاه

LOH^۳

اجزای دستگاه ریل تایم

هر دستگاه qPCR از ۴ بخش تشکیل شده است.

۱. منبع نور^۴: منبع نور در دستگاه می‌تواند شامل منابع مختلفی از جمله لیزر یون آرگون/

لیزرهای LED / لامپ‌های کوارتز هالوژن تنگستن/ لامپ‌های گزنون

۲. سیستم آشکارساز^۵: شناساگر در دستگاه می‌تواند بازجذب فلوروسنت را شناسایی کند. در

تکنیک qPCR از مولکول‌های فلورسانت برای شناسایی و آشکارسازی مولکول‌های DNA و

یا RNA استفاده می‌شود. تقسیم‌بندی نوع مولکول بر اساس عملکردشان صورت می‌گیرد.

۳. ترمال سایکلر (Thermal Cycler)

۴. یک بسته نرم‌افزاری

انواع مختلف دستگاه‌های ریل تایم

امروزه شرکت‌های زیادی توانسته‌اند دستگاه‌هایی با عملکردهای مختلف برای استفاده‌های

متنوعی طراحی و تولید کنند که اساس کار این دستگاه‌ها تقریباً شبیه هم می‌باشد ولی به طور

کلی می‌توان دستگاه‌های ریل تایم را به دو دسته تقسیم‌بندی کرد:

۱. دستگاه‌های چرخشی

۲. دستگاه‌های پلیتی.

۱. Single Nucleotide Polymorphism. جهش‌های نقطه‌ای در منطقه‌ای از ژن را می‌گویند که بهترین مارک‌های اختصاصی ژنتیکی در

فرد است که دارای پلی‌مورفیسم با فراوانی حداقل ۱٪ در جامعه می‌باشند.

2. Genetically Modified Organisms

۳. Loss of Heterozygosity. در صفتی که رابطه غالب و مغلوبی برقرار باشد فرد هتروزیگوت به دلیل داشتن آلل غالب سالم است. در صورت

حذف یا جهش در آلل غالب که در فرد بروز می‌کند به آن بیماری LOH گفته می‌شود

4. Source Light

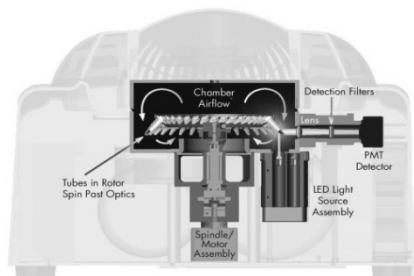
5. Detection System

دستگاه‌های چرخشی

در مدل دستگاه‌های چرخشی که معروف‌ترین آن‌ها دستگاه‌های شرکت QIAGEN می‌باشد. کارکرد این دستگاه به این صورت می‌باشد که نمونه‌ها بر روی یک صفحه گرد قرار می‌گیرند نور لیزر از پایین به نمونه‌ها تابیده می‌شود و جذب آن توسط فیلتری که در کنار دستگاه تعبیه شده است، خوانش می‌شود. با چرخیدن روتور دستگاه، تک تک نمونه‌ها در وضعیت خوانش قرار گرفته و ارزیابی می‌شوند.



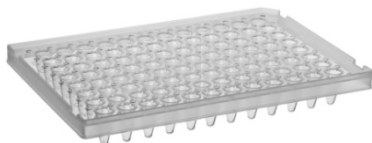
شکل ۱: روتور دستگاه که محل قرارگیری میکروتیوپ‌های مخصوص (استریپ ۱/۰ میکرولیتری) دستگاه می‌باشد.



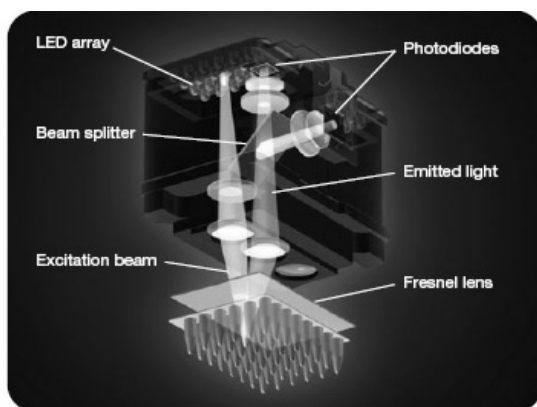
شکل ۲: دستگاه ریل تایم Rotor Gen 6000 از شرکت QIAGEN مکانیسم عملکرد دستگاه و اجزای مختلف آن

دستگاه‌های پلیتی

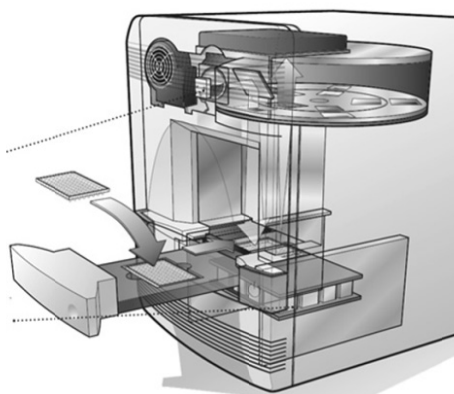
در مدل دستگاه‌های پلیتی که معروف‌ترین آن‌ها دستگاه‌های ABI می‌باشد. کارکرد دستگاه به این صورت است که نمونه‌ها درون یک پلیت مخصوص قرار گرفته و تابش نور و خوانش آن‌ها توسط لیزر و فیلترهایی که در بالای پلیت نمونه‌ها قرار گرفته است ارزیابی می‌شوند.



شکل ۳: پلیت قرار گیری نمونه‌های ریل تایم در دستگاه پلیتی شرکت ABI step one plus



شکل ۴: مکانیسم عملکرد دستگاه‌های پلیتی دستگاه ABI step one



شکل ۵: اجزای مختلف دستگاه Step one plus از شرکت ABI و مکانیسم عملکرد آن

انواع رنگ‌های مورد استفاده در RT-qPCR

به منظور مشخص کردن میزان تکثیر در دستگاه ریل تایم PCR نیاز است که در محلول واکنش یک نشانگر یا همان رنگ فلورسنت قرار بگیرد تا میزان دقیق تکثیر در هر مرحله را به ما نشان دهد. این رنگ‌ها به چند دسته تقسیم می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها شامل:

الف) روش‌های مبتنی بر رنگ‌های آزاد؛

ب) روش‌های مبتنی بر پرایمرهای نشان دار شده با رنگ‌های فلورسنت یا پروپ است.

الف) روش‌های مبتنی بر رنگ‌های آزاد

در این روش از رنگ‌های آزاد متصل شونده به DNA دو رشته‌ای استفاده می‌شود. اساس این روش به این صورت است که پس از سنتز رشته‌ی جدید از روی رشته‌های الگو، رنگ آزاد به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و نور گسیل می‌کند. سیستم شناساگر دستگاه در هر مرحله از تکثیر، نور گسیل شده را ارزیابی می‌کند و بدین ترتیب میزان تکثیر در مراحل مختلف قابل ارزیابی می‌باشد. این روش اختصاصیت کم‌تری نسبت به روش‌های مبتنی بر پروب دارد. چرا که رنگ آزاد می‌تواند به دورشته‌های غیراختصاصی و محصولات ناشی از اتصال پرایمرها به هم نیز متصل شده و از خود نور گسیل نماید. رنگ آزاد (رنگ‌های غیر اختصاصی) مانند سایبرگرین، اوا گرین^۱ / BOXTO.

جدول ۱- انواع رنگ‌های فلورسنت پر کاربرد

رنگ‌های آزاد ^۴	حداکثر جذب ^۳ (نانومتر)	حداکثر نشر ^۲ (نانومتر)
SYBR GREEN	۴۹۷	۵۲۵
EVA GREEN	۴۹۷	۵۲۵
BOXTO	۵۱۵	۵۵۲

۱. سایبرگرین

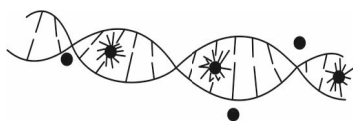
مولکول سایبرگرین یک رنگ آزاد در PCR محسوب می‌شود و در هنگام اتصال به مولکول DNA دو رشته‌ای خاصیت فلورسنت بالایی پیدا می‌کند. در چرخه ابتدایی PCR میزان رنگ فلورسنت گسیل شده توسط سایبرگرین معمولاً بسیار ضعیف می‌باشد و در واقع برای دستگاه قابل تشخیص به عنوان تکثیر نمی‌باشد. پس از چندین مرحله با زیاد شدن نور فلورسنت میزان آن برای تشخیص تعداد اولیه ژنومی قابل محاسبه در هر مرحله از تکثیر می‌باشد. این رنگ به شیارهای کوچک (Minor groove) DNA متصل می‌شود. یکی از معایب بزرگ آن این است که به هر توالی دو رشته‌ای مانند محصولات غیراختصاصی و پرایمر دایمر نیز متصل می‌شود و نتایج بدست آمده برای توالی هدف را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بنابراین بهینه کردن آن باید به صورتی باشد که حداقل میزان پرایمر- دایمر و محصولات غیر اختصاصی ایجاد شوند. به این منظور آنزیم

1. EVA Green
2. Maximum Emission
3. Maximum Absorption
4. Free Dyes

DNA پلی مرز هات- استارت جهت حذف یا کاهش سیگنال‌های اضافی به کار می‌رود. چند دلیل کاربرد از رنگ سایبرگرین در Real Time PCR قیمت ارزان، انجام آزمایش تنها با یک جفت پرایمر و سهولت کار، استفاده از روش شناسایی مشابه برای هر آزمایش می‌باشد.



شکل ۶: که رنگ سایبرگرین را نشان می‌دهد که به DNA تک رشته‌ای متصل نمی‌شود.



شکل ۷: رنگ سایبر گرین را نشان می‌دهد که به DNA ۲ رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت را منتشر می‌کند.

۲. اوا گرین

این رنگ فلورسنت که از سایبرگرین گران‌تر است در دمای بالا مقاوم‌تر بوده و کارایی بیشتری در چرخه‌های انتهایی qPCR دارد.

ب) پروب

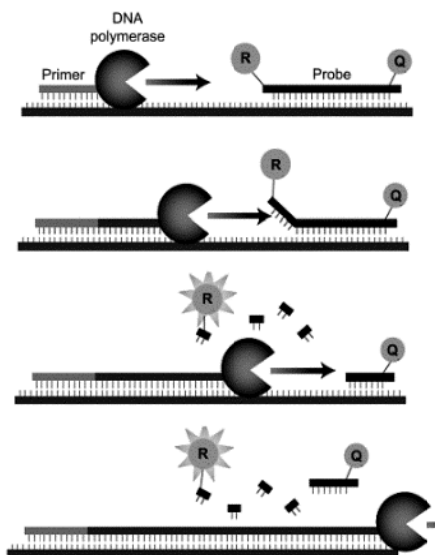
پروب‌ها نوعی پرایمر اختصاصی توالی هدف هستند (و قادر به ایجاد پرایمر-دایمر و محصولات غیر اختصاصی نیستند). پروب منجر به افزایش اختصاصیت و حساسیت qPCR می‌شود. مزیت روش مبتنی بر پروب این است که در این روش سیگنال‌های فرعی ناشی از پرایمر-دایمرها بر خلاف روش‌های مبتنی بر رنگ آزاد، مورد خوانش قرار نمی‌گیرند و تنها محصولاتی از PCR خوانده می‌شود که پرایمرها و پروب‌ها به طور همزمان قادر به اتصال به آن هستند. امروزه ۵ سیستم متفاوت در روش مبتنی بر پروب مورد استفاده قرار می‌گیرند: پروب‌های TaqMan، پروب‌های Beacons، پروب‌های متصل شونده به شیار کوچک^۱، پروب‌های نوکلئیک اسیدی قفل^۲ شده و پروب‌های هیبریدی (مولکول‌های پذیرنده یا خاموش‌گر مانند مولکول ۶ کربوکسی تترامیتیل رودامین یا TAMRA). در زیر به رایج‌ترین و مهم‌ترین آن‌ها اشاره می‌کنیم.

1. Minor Groove Binder MGB
2. Locked Nucleic Acid LNA

پروب‌های Tag man

Hydrolysis Probe Technique

در این مکانیسم پرایمرهای نشان دار شده یا پروب‌ها به گونه‌ای طراحی می‌شوند که در ابتدای پروب یک رنگ فلورسنت به نام گزارش گر یا Reporter و در انتهای دیگر آن یک فلورسانس دیگری به نام خاموش کننده یا Quencher قرار می‌گیرد. در فاصله‌ی بین این دو رنگ، توالی ۱۵ تا ۱۸ نوکلوتیدی اختصاصی در فاصله‌ی بین پرایمرهای فوروارد^۱ و ریورس^۲ قرار گرفته است. این فاصله به قدری کوتاه است که تمامی نوری که توسط گزارشگر منتشر می‌شود بوسیله‌ی خاموش کننده جذب می‌شود و فیلترهای تشخیصی دستگاه قادر به شناسایی آن‌ها نیستند. زمانی که پرایمرها به جایگاه اختصاصی خود متصل می‌شوند و آنزیم Taq پلیمراز آن‌ها را شناسایی می‌کند به دلیل آن‌که این پروب نشان دار شده در حد فاصل بین دو پرایمر قرار گرفته و بر سر راه پلی‌مراز بوده، آنزیم با خاصیت اگزونوکلازی خود آن را برش می‌دهد. زمانی که پرایمر نشان دار شده تجزیه می‌شود، گزارشگر از خاموش کننده جدا شده و نور فلورسانس منتشر شده توسط دستگاه قابل شناسایی می‌شود که نشان دهنده‌ی تکثیر اختصاصی می‌باشد.



شکل ۸: مراحل و مکانیسم عمل پرایمرهای نشان دار شده (پروب‌ها)

1. Forward
2. Reverse

رنگ مرجع

رنگ مرجع یا رفرانس مانند ۶ کربوکسی فلوئورسین / مولکول ۶ کربوکسی X رودامین یا ROX. استفاده از رنگ مرجع در همه واکنش‌ها متداول است و به خاطر کاهش یا حذف انحراف سیگنال فلورسنتی گسیل شده از چاهک‌های دستگاه‌های پلیتی می‌باشد، چرا که زاویه تابش نور دستگاه (در برخی دستگاه‌ها) برای نمونه‌ها یکسان نمی‌باشد. و از آن می‌توان برای نرمال‌سازی خطای اندازه‌گیری دستگاه در خوانش نمونه‌ها در جایگاه‌های متفاوت در دستگاه استفاده کرد. رنگ مرجع با هیچ‌یک از ترکیبات آزمایش واکنشی نمی‌دهد. همچنین مولکول ۶ کربوکسی فلوئورسین یک رنگ بسیار پر کاربرد است که می‌تواند به الیگونکلوتیدها متصل شده و سیگنال قوی تولید نماید و بیش‌ترین تحریک آن در طول موج ۴۸۸ نانومتر است.

انواع آنزیم‌ها

انواع آنزیم‌های نسخه‌برداری معکوس^۱ Reverse transcriptase (RT) مورد استفاده در RT-PCR

RT-PCR بر پایه آنزیم نسخه‌برداری معکوس می‌باشد. این آنزیم از روی RNA تک رشته‌ای یک DNA مکمل سنتز می‌کند. این آنزیم یک DNA پلی‌مراز وابسته به RNA می‌باشد که با DNA پلی‌مراز وابسته به DNA همکاری دارد. در رتروویروس‌ها آنزیم نسخه‌بردار معکوس دارای یک ناحیه RNase H است که RNA متصل به DNA را تجزیه می‌کند.

انواع Reverse transcriptase

آنزیم نسخه بردار معکوس HIV-1 RNase H	آنزیم نسخه بردار معکوس AMV	آنزیم نسخه بردار معکوس MMLV	آنزیم نسخه بردار معکوس تلمو رازی
از ویروس HIV-1	از ویروس avianmyeloblastosis virus	از ویروس moloney murine leukemia virus	حفاظت از انتهای کروموزوم‌های یوکاریوتی را به عهده دارد.
در دمای ۴۲ تا ۴۵ درجه سانتی گراد فعال است	در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد فعال است		
برای ساخت مولکول‌های کامل cDNA استفاده می‌شود.			
فاقد فعالیت اگزونوکلئازی ^۲ به ۳' به ۵'			

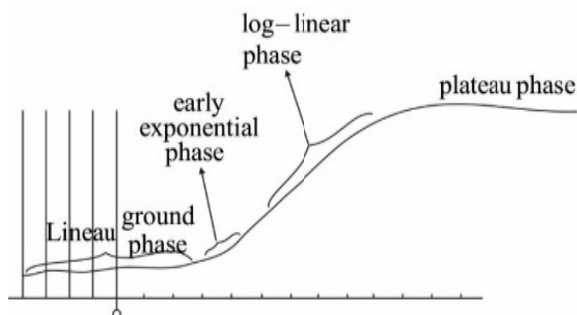
مفاهیم اصلی در ریل تایم

اگر منحنی میزان تکثیر محصول (میزان نور فلورسنت ساطع شده بر حسب تکثیر) در Real Time یا PCR را بر حسب سیکل‌های PCR ترسیم گردد، می‌توان منحنی حاصل را به سه فاز اصلی تقسیم کرد.

فاز اول: Linear phase یا Baseline region در این فاز میزان تکثیر محصولات به قدری نیست که سبب افزایش نور فلورسنت گردد. در واقع میزان افزایش نور فلورسنت با افزایش تکثیر برای دستگاه در حد قابل تشخیص نیست. پس میزان نور ساطع شده در این فاز به صورت خطی است.

فاز دوم: Exponential Phase و Log-liner Phase در این فاز میزان محصول دو رشته‌ای به حدی قابل تشخیص برای دستگاه رسیده است. بنابراین میزان محصولات به صورت تصاعدی افزایش می‌یابد و در واقع در هر چرخه ۲ برابر می‌شود و فلورسنت حاصله به وسیله‌ی دستگاه خوانش می‌شود. در این مرحله داده‌های به دست آمده برای تفسیر و ارزیابی آزمایش مورد استفاده قرار می‌گیرند.

فاز سوم: Plateau Phase در این فاز ترکیبات واکنش تمام شده و یا به دلیل تولید شدن مواد زائد دیگر کارایی مناسب را ندارند و دیگر محصولی تکثیر نمی‌شود بنابراین افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود و به اصطلاح ریل تایم در این مرحله اشباع شده است. در این مرحله سرعت تکثیر بسیار کم شده و نزدیک صفر می‌شود.



شکل ۹: نمودار مراحل و فازهای ریل تایم

کمی‌سازی مطلق^۱: در کمی‌سازی مطلق مقدار نمونه‌های مجهول از طریق مقایسه با منحنی استاندارد تعیین می‌گردد (مثلا در تعیین تعداد کپی ویروس).

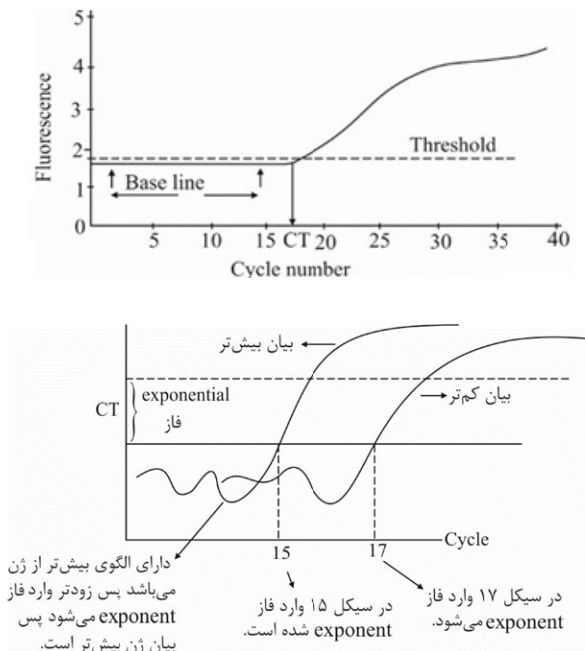
محصول PCR^۲: توالی تکثیر شده DNA در فرایند PCR

1. Absolute Quantification
2. Amplicon

کالیبراتور^۱: یک نمونه مرجع منفرد است که از آن به عنوان مبنای میزان افزایش نسبی در مطالعات مربوط به بیان استفاده می‌گردد (با فرض ثابت بودن بازده واکنش).

خط CT^۲: حد آستانه، که تکثیر در آن نقطه شروع شده است و با حداقل میزان فلورسنت قابل تشخیص است. در واقع واحد CT، همان شماره سیکلی از واکنش است که نور فلورسنت به حدی رسیده که توسط دستگاه شناسایی می‌شود.

آستانه Threshold: آستانه خطی است که منحنی تکثیر را در فاز لگاریتمی قطع می‌کند. به منطقه‌ای از نمودار اطلاق می‌شود که برای بار اول سیگنال فلورسانس قابل تشخیص است. محل آستانه باید در منطقه‌ای مربوط به تکثیر تصاعدی محصول PCR تنظیم گردد. آستانه در واقع یک مقدار عددی است که برای هر آزمایش تعیین می‌شود تا با استفاده از آن مقدار Ct برای هر تکثیر محاسبه گردد.



شکل ۱۰: نشان دهنده خط ct و اجزای آن

1. Calibrator
2. Cycle Threshold

وقتی بخواهیم Ct را محاسبه کنیم خط Threshold را در بخش analysis در نرم‌افزار دستگاه رسم می‌کنیم در واقع خط را به گونه‌ای رسم می‌کنیم که تمامی نورهایی که به عنوان نور پس‌زمینه یا noise وجود دارند، در زیر خط استانه قرار بگیرند. بهترین خط Ct خطی است که تمام noiseها در زیر آن باشند.

کنترل درون زاد^۱: کنترلی که شامل DNA یا RNA ای است. کنترل درون زاد به طور طبیعی در تمام نمونه‌های آزمایش وجود دارد. با استفاده از یک کنترل درون‌زاد تغییر ناپذیر به عنوان مرجع فعال، می‌توان از نظر اختلافات موجود در RNA تام افزوده شده به هر واکنش، نرمال‌سازی کرده و اختلافات بین نمونه‌ها را در واکنش RT-PCR تصحیح کرد.

کنترل برون‌زاد^۲: کنترلی که با غلظت معلوم به هر نمونه افزوده می‌شود. این کنترل DNA یا RNA است. مرجع فعال برون‌زاد معمولاً یک سازه in vitro است. از یک مرجع برون‌زاد برای نرمال‌سازی اختلافات مربوط به بازده استخراج نمونه یا سنتز DNA مکمل (cDNA) نیز می‌توان استفاده نمود. لازم است که از یک رنگ مرجع غیرفعال (ROX-6-carboxy-X-rhodamine) برای نرمال‌سازی نوسانات فلورسانسی که ارتباطی با روند PCR ندارند، استفاده شود.

ژن خانه‌دار^۳: ژن‌هایی که به وفور بیان شده و معمولاً با فرض ثابت بودن میزان بیان در آن‌ها، در Real-Time PCR به عنوان ژن‌های مرجع جهت نرمال‌سازی به کار می‌روند. برای استفاده از آن‌ها باید ابتدا بررسی شود که کدام ژن‌های خانه‌دار مناسب سلول یا بافت هدف مورد نظر هستند و سپس بیش از یکی از این ژن‌ها برای نرمال‌سازی به کار گرفته شود.

کنترل فاقد ترانس کریپتاز معکوس^۴: به نمونه‌ی کنترلی که در آن RNA ابتدایی و تمام اجزاء مورد نیاز برای یک واکنش تک-مرحله‌ای به غیر از ترانس کریپتاز معکوس وجود دارند گفته می‌شود. **آزمایش مالی پلکس^۵:** بررسی هم‌زمان چندین هدف که در یک واکنش تکثیر می‌یابند را با کمک پروب‌ها یا پرایمرهایی که با مواد متفاوتی نشان دار شده‌اند، را آزمایش مالی پلکس.

1. Endogenous Control
2. Exogenous Control
3. Housekeeping Gene
4. Minus Reverse Transcriptase Control (-RTC)
5. Multiplexing

نرمال سازی^۱: نرمال سازی بکارگیری یک استاندارد بی اثر و بدون تغییر در واکنش تا به کمک آن بتوان خطاهای مراحل آزمایش را کم کرد یا از بین برد. استفاده از ژن های خانه داری که بیشترین تناسب را با بافت یا سلول هدف نشان می دهند، مطلوب ترین روش برای نرمال سازی می باشد.

کمی سازی نسبی^۲: این آزمایش جهت بررسی تغییرات ایجاد شده در بیان ژن در یک نمونه مشخص نسبت به یک نمونه مرجع دیگر استفاده می گردد.

شیب^۳: شیب یا انحراف منحنی استاندارد، کارایی و راندمان منحنی Real-Time PCR رانشان می دهد. منحنی استاندارد تعداد Ct در مقابل لگاریتم غلظت یک نمونه استاندارد را نمایش می دهد و از این نمودار برای تخمین غلظت نمونه های مجهول استفاده می شود. یک منحنی استاندارد خوب شیب آستانه و خط پایه معادل $3/3$ ($3/1$ تا $3/6$) باشد، این شیب نشان دهنده ی بازده 100% (یا دقیقاً $1/0.092$) یا تکثیر دوبرابر (یا دقیقاً $2/0.092$) در هر سیکل می باشد. به آن گرایان نیز گفته می شود.

نکاتی مهم در مورد خط Ct

۱. Ct بالای ۳۸ در qPCR قابل قبول نیست ولی اگر در گروه نرمال همه Ct ها بالای ۳۸ بوده اما در گروه سرطانی یا مورد آزمایش زیر ۳۸ باشند این Ct ها قابل قبول هستند یعنی این ژن در گروه نرمال بیان ندارد اما در گروه سرطانی یا گروه مورد آزمایش بیان دارد.
۲. برای هر یک از نمونه ها باید آزمون، ۳ بار (و یا حداقل ۲ بار) تکرار شود. در صورتی که اختلاف Ct در تکرارها بیش تر از ۱ باشد، آزمون مورد قبول نمی باشد و باید تکرار شود. در صورتی که ۲ مورد از ۳ تکرار یک نمونه با اختلاف کم تر از ۱ Ct بود ولی تکرار سوم اختلاف بیش تر از ۱ Ct داشت، نمونه ی سوم حذف می شود و از ۲ تکرار دیگر میانگین گرفته می شود.
۳. بعد از حذف نمونه های غیر قابل قبول باید از Ct های حاصله برای هر نمونه میانگین گرفته و با Ct میانگین دیگر محاسبات را انجام داد.