



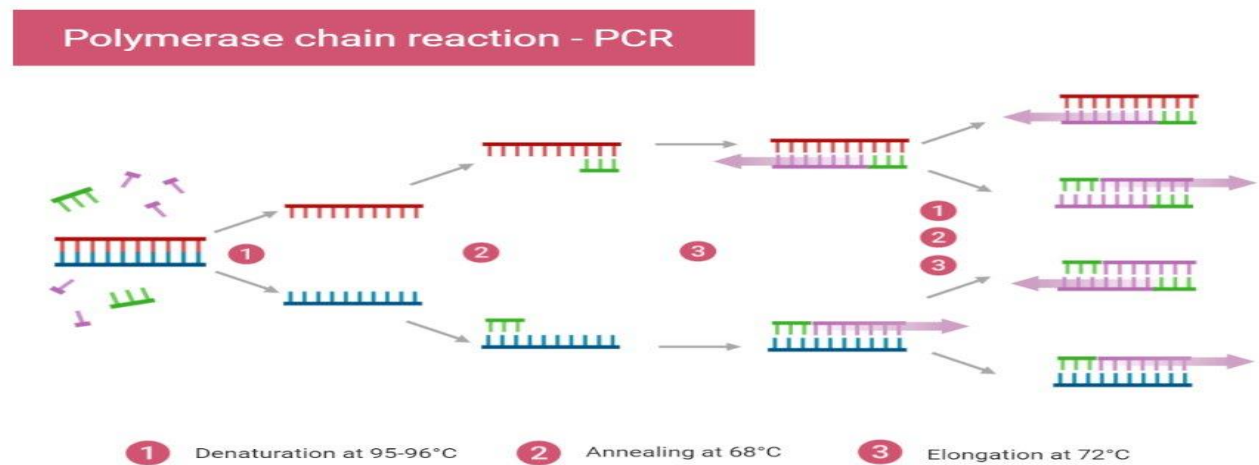
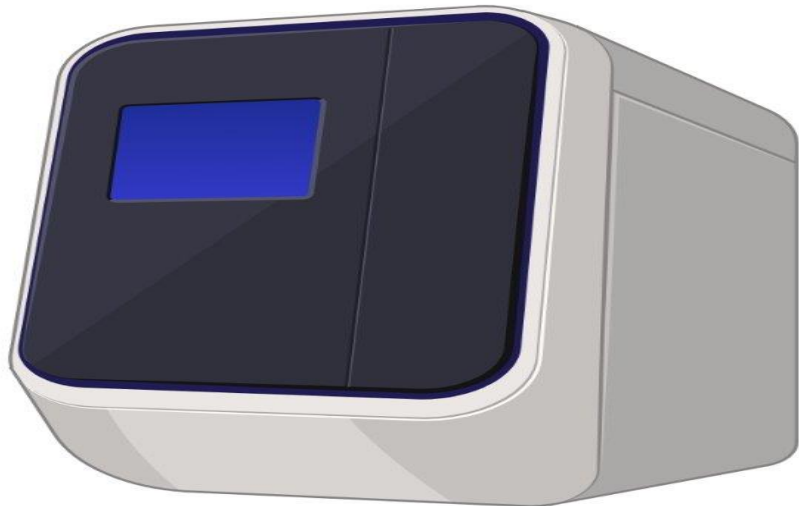
University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

Real-time PCR

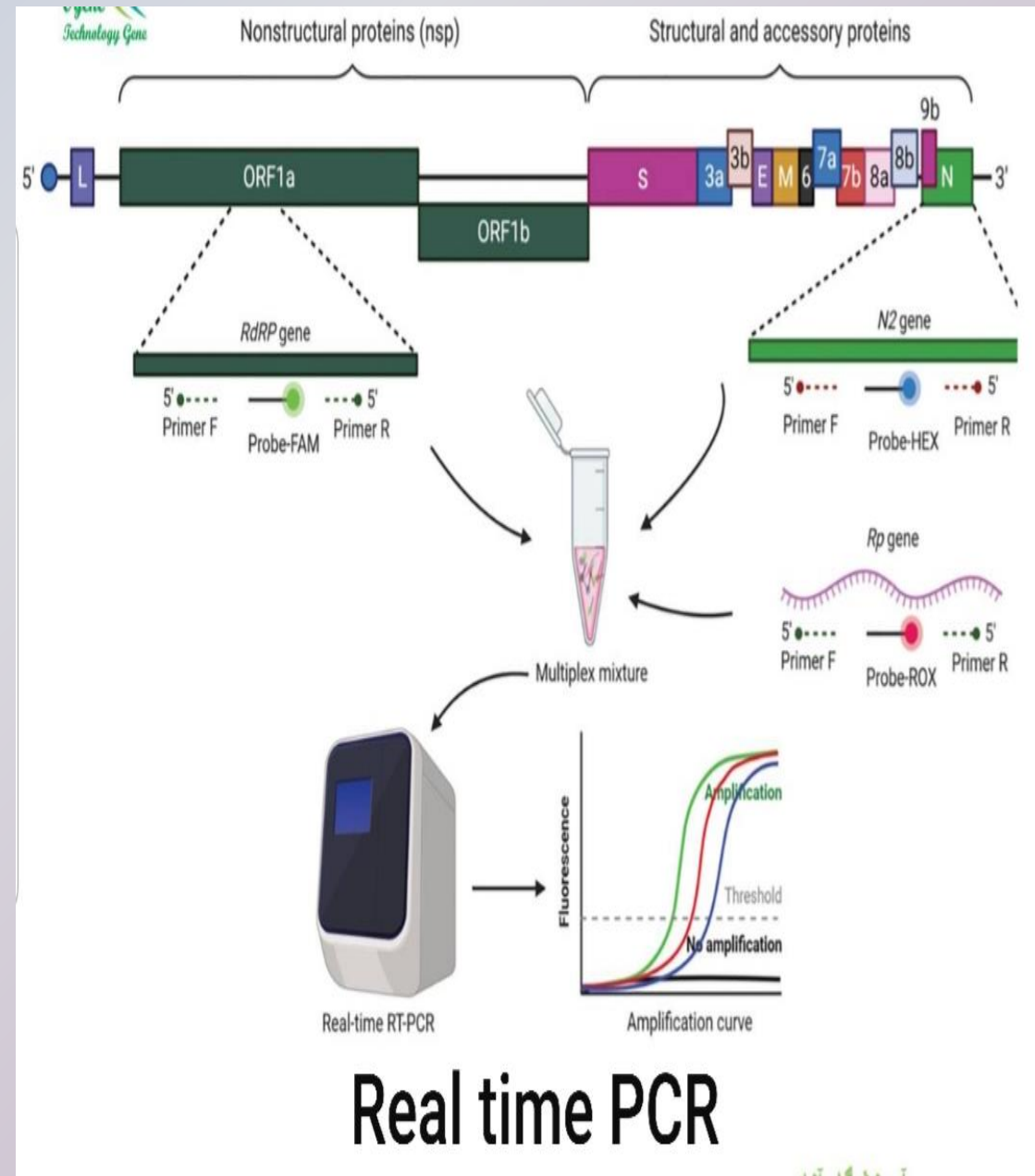
(qPCR)

Real Time PCR / quantitative PCR (qPCR)



اهداف

- ارزیابی کارایی و حساسیت روش ریل تایم یا qPCR
- بررسی مفهوم سیکل آستانه CT یا Threshold Cycle
- بررسی و تعیین میزان بیان ژن



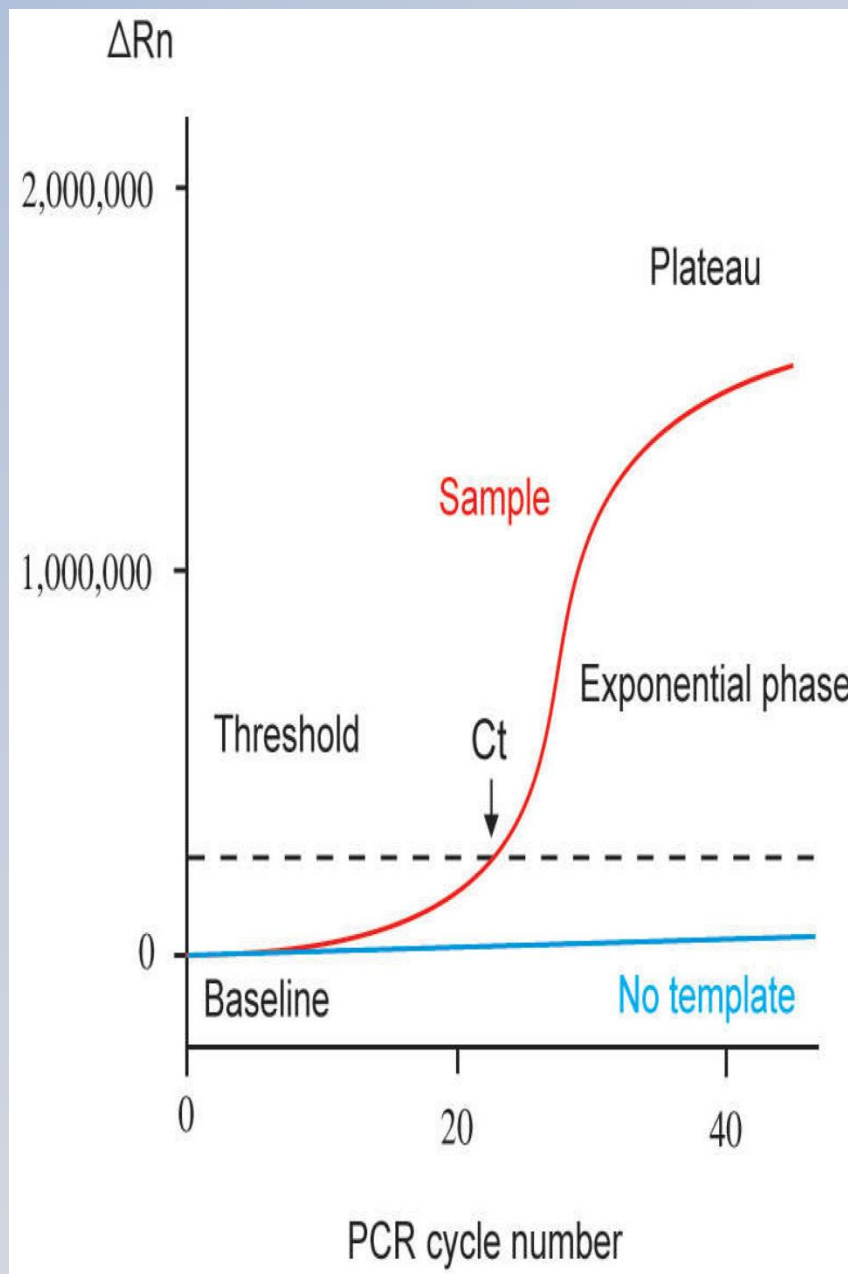
Real time PCR

مقدمه

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (qPCR) یک روش دقیق و حساس برای تعیین کمیت DNA هدف است. این روش به دلیل حساسیت بالا، سرعت زیاد و امکان بررسی بیان ژن در نمونه‌های مختلف، به‌طور گسترده در زیست‌شناسی مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

تکنیک PCR روشی کاربردی است که در آن با استفاده از سیکل‌های دمایی پیوسته اقدام به تکثیر یک ناحیه از ژن می‌گردد. به این ترتیب که ابتدا پیوندهای هیدروژنی دو رشته DNA در دمای بالای 90 درجه از هم باز شده، سپس دما تا حدود 60 درجه پایین آمده و پرایمرها به تک رشته‌ای DNA در دو جهت مخالف متصل می‌شوند. سپس آنزیم POLYMERASE سر 3 پرایمر را شناخته و اقدام به ساخت رشته مکمل می‌کند. سه مرحله نام برده 40 سیکل تکرار شده و نهایتاً از یک رشته الگوی اولیه 2 به توان 40 محصول ساخته می‌شود.

برخلاف Traditional PCR و یا PCR سنتی که حضور و یا عدم حضور ژن هدف را تنها در انتهای واکنش مشخص می‌کند تکنیک PCR کمی لحظه به لحظه پیشرفت واکنش را رصد می‌کند. پیشرفت واکنش در روش qPCR از طریق افزایش در میزان سیگنال فلورسنت قابل تشخیص خواهد بود. سیگنال‌های فلورسنت از طریق رنگ‌های فلوئوروفوری متصل شونده به رشته‌های DNA همچون رنگ سایبرگرین ساطع می‌شوند.



در روش سایبر، رنگ سایبرگرین زمانی که به توالی دو رشته‌ای متصل شود؛ میزان فلورسنت بسیار قوی از خود ساطع خواهد کرد در حالی که با اتصال آن به توالی تک رشته سیگنال بسیار ضعیفی انتشار می‌شود. نهایتاً نتیجه آن می‌شود که با پیشروی سیکل‌ها از مرحله دناتوراسیون و در ادامه اتصال پرایمر و طولی‌سازی، محصولات دو رشته‌ای به تدریج افزایش یافته و سیگنال نوری حاصل از آن‌ها تشدید خواهد شد.

دستگاه ترمال سایکلر به همراه یک منبع نوری و فلوریمتر با تاباندن نور به میکروتیوب‌های واکنش بازتابش رنگ را در هر **reaction** مانیتور کرده و منحنی تکثیر **PCR** را همگام با پیشرفت واکنش رسم می‌کند.

منحنی تکثیر مطابق شکل از سه فاز اصلی تشکیل شده است:

فاز پایه $\Leftarrow$ Baseline phase

فاز تصاعدی $\Leftarrow$ Exponential/Log phase

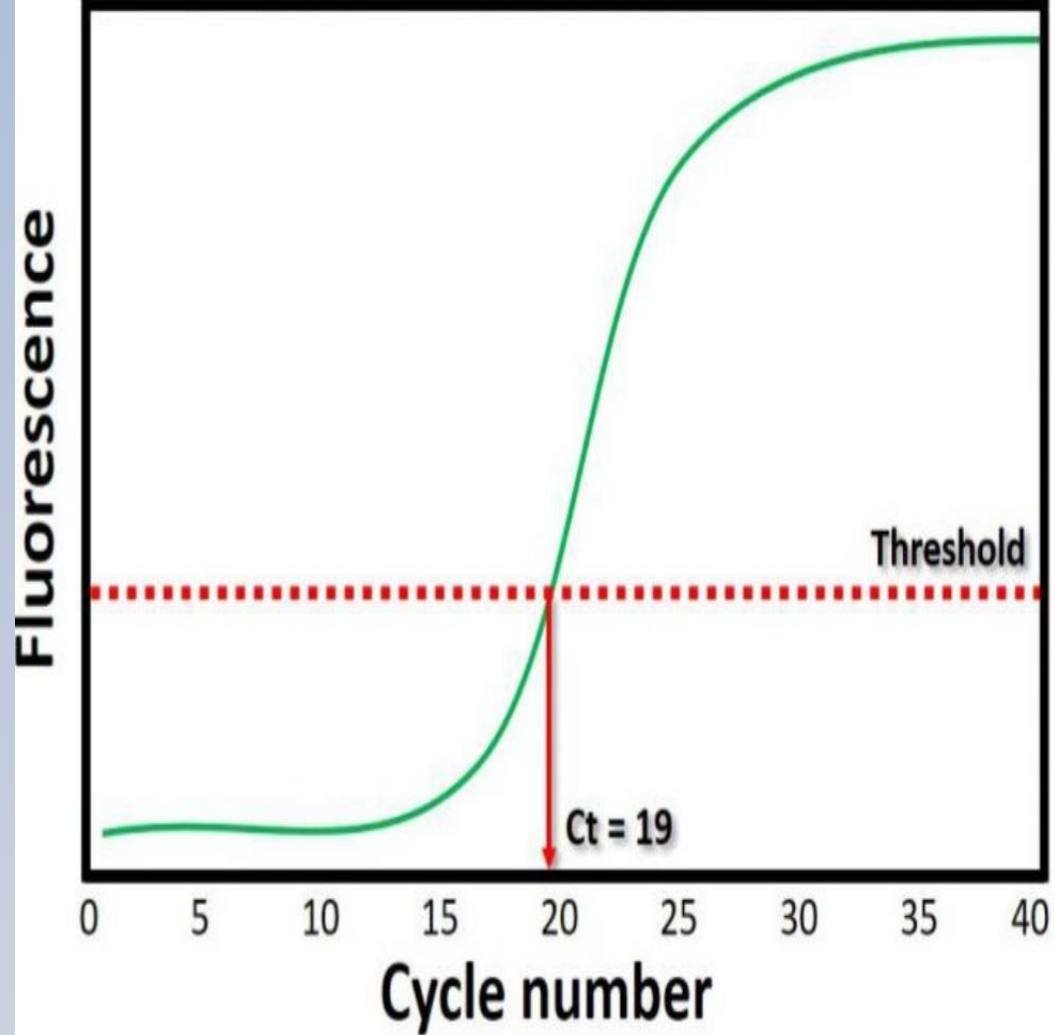
فاز سکون $\Leftarrow$ Plateau phase

در فاز پایه میزان سیگنال به حدی ضعیف است که قابل تشخیص از سیگنال های نویز نمی باشد. در فاز تصاعدی هر محصول در هر سیکل دو برابر شده و سیگنال به طرز تصاعدی افزایش می یابد. در چنین شرایطی گفته می شود بازدهی واکنش ۱۰۰ درصد است. کارایی بالای واکنش در این فاز، به دلیل فراوانی و تازگی اجزای واکنش است و در نهایت در فاز سکون واکنش متوقف شده و دیگر محصولی تولید نمی شود و سیگنال حاصل از رنگ گزارشگر ثابت می ماند.

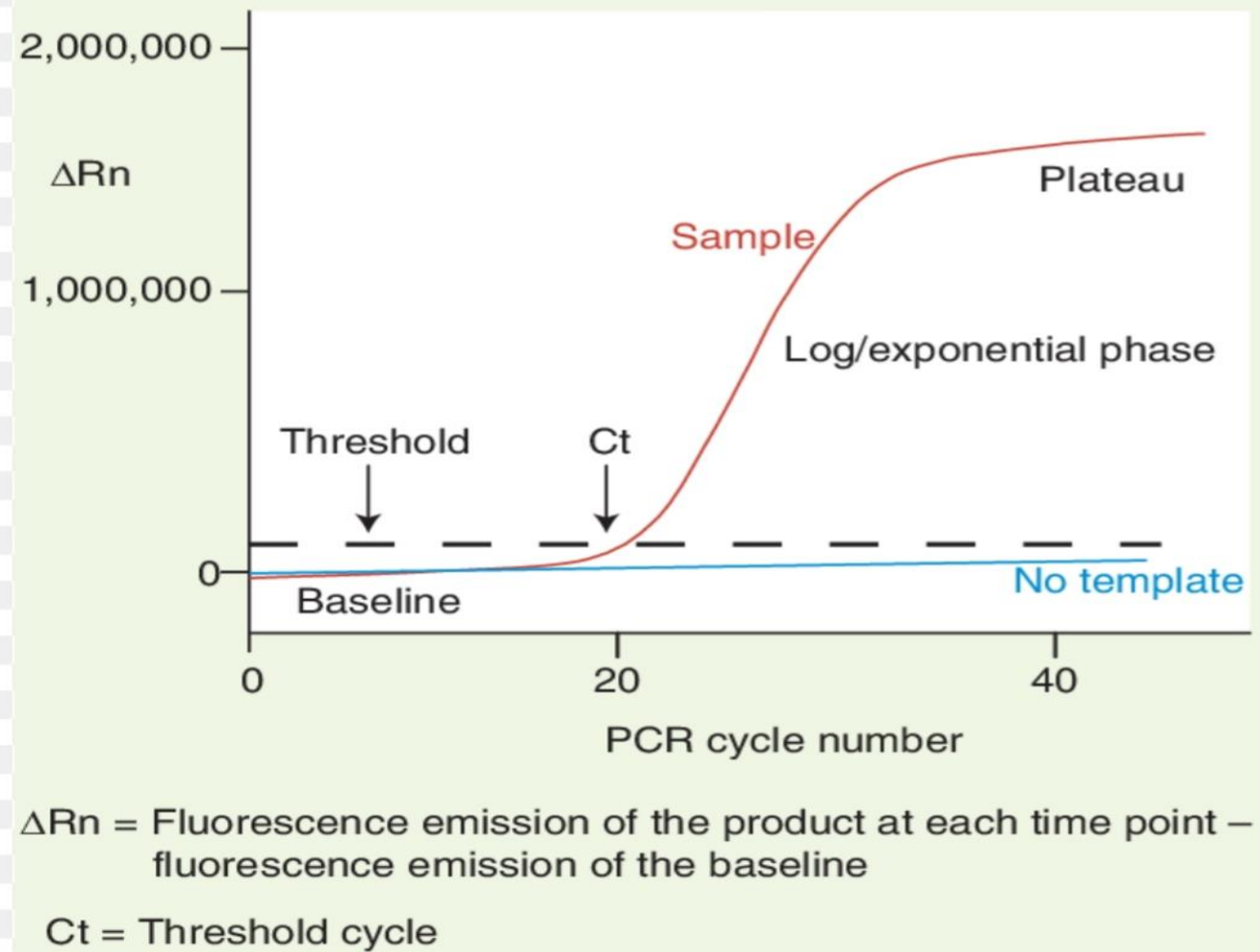
از مرحله تصاعدی برای کمی کردن PCR و گزارش عددی از گراف استفاده می شود. به این منظور بالاتر از سیگنال پایه و در مرحله تصاعدی می توان با رسم یک خط فرضی سیکلی را که در آن گراف تکثیر از حد آستانه عبور می کند به عنوان عدد cq و یا CT اندازه گرفت. به وسیله عدد CT می توان میزان فراوانی رونوشت های RNA حاصل از یک ژن را به صورت نسبی بین دو و یا تعداد بیشتری از نمونه ها ارزیابی کرد.

صعود گراف در مرحله نمایی یا صعودی با میزان فراوانی رونوشت هدف در شروع واکنش رابطه مستقیم دارد. به این صورت که هرچه میزان الگوی اولیه بیشتر باشد صعود گراف سریعتر خواهد بود. با رسم خط آستانه روی گراف سیکلی که در آن واکنش به آستانه می رسد به دست می آید. این کمیت را CT یا سیکل ترشلد یا سیکل آستانه می نامیم.

به بیان بهتر هرچه میزان الگوی اولیه بیشتر باشد میزان CT کمتر خواهد بود و بالعکس.



تعیین-آستانه-RealtimePCR



$$N = 2^n$$

که در آن N ، تعداد نسخه‌ها در دور n ام واکنش را نشان می‌دهد.

وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



وسایل و مواد مورد نیاز



• دستگاه Real-time PCR

• میکروپیپت و نوک‌های استریل

• کیت استخراج مناسب نمونه و DNA هدف یا الگو

• پرایمرهای اختصاصی برای ژن هدف

• آب فاقد نوکلئاز

• میکروتیوب‌های 0.2 میلی‌لیتری

• سانتریفیوژ و ورتکس

مسترمیکس ریل تایم که دارای: انزیم تک پلیمراز / dNTPs
بافر, $MgCl_2$ / و SYBR Green یا پروب TaqMan

جهت انجام واکنش است.

- **Master Mix Components**
- DNA Polymerase.
- dNTPs.
- $MgCl_2$.
- Buffer.
- SYBR Green dye or TaqMan probe.
- ROX (Passive Reference Dye in some systems)/انتخابی .
- **Note:** No need for dark conditions while preparing SYBR Green master mix unless it's exposed for a long time.



- **Master Mix Components and Their Roles:**
- **DNA Polymerase:**
 - **Function:** Enzyme that synthesizes new DNA strands by adding dNTPs complementary to the template strand.
 - **Type:** Heat-stable (like Taq polymerase) to survive high denaturation temperatures.
- **dNTPs (Deoxynucleotide Triphosphates):**
 - **Function:** Building blocks of new DNA strands (A, T, G, C bases).
 - **Importance:** Provide the raw materials needed for DNA strand elongation.
- **MgCl₂ (Magnesium Chloride):**
 - **Function:** Essential cofactor for DNA polymerase activity.
 - **Role:** Stabilizes the DNA-DNA and DNA-enzyme interactions; affects primer binding and enzyme efficiency.
 - **Note:** Concentration is critical — too much or too little Mg²⁺ can reduce specificity and yield.

- **Buffer:**
 - **Function:** Maintains stable pH and ionic environment.
 - **Importance:** Optimal enzyme activity depends on pH and salt concentration.
- **SYBR Green dye or TaqMan Probe:**
 - **Function:** Fluorescence detection system.
 - **Importance:** Allows real-time monitoring of DNA amplification.
- **ROX (Passive Reference Dye):**
 - **Function:** Internal normalization dye.
 - **Importance:** Corrects for non-PCR related signal fluctuations (like pipetting errors or machine variability).

روش کار



روش کار

به جهت حساس بودن تکنیک، آزمایش برای هر نمونه حداقل دو بار تکرار می شود. بنابراین با توجه به تعداد نمونه، مخلوطی از آب مسترمیکس پرایمر و پروب را طبق دستورالعمل ترکیب کرده و به میزان مناسب با توجه به حجم واکنش بین میکروتیوب ها تقسیم می کنیم. در نهایت نمونه های DNA مورد آزمایش را به هر لوله اضافه می کنیم. دقت شود هر نمونه دو بار مورد آزمایش قرار می گیرد و در صورت حصول ct یکسان از هر دو آزمایش نتیجه قابل قبول خواهد بود.

روی میکروتیوب ها را با سرپوش مناسب پوشانده اسپین کرده و در دستگاه Real-time PCR قرار دهید و برنامه حرارتی زیر را اجرا کنید:

- دناتوراسیون اولیه 95°C : به مدت ۵ دقیقه

- ۴۰ سیکل شامل:

- 95°C به مدت ۱۵ ثانیه

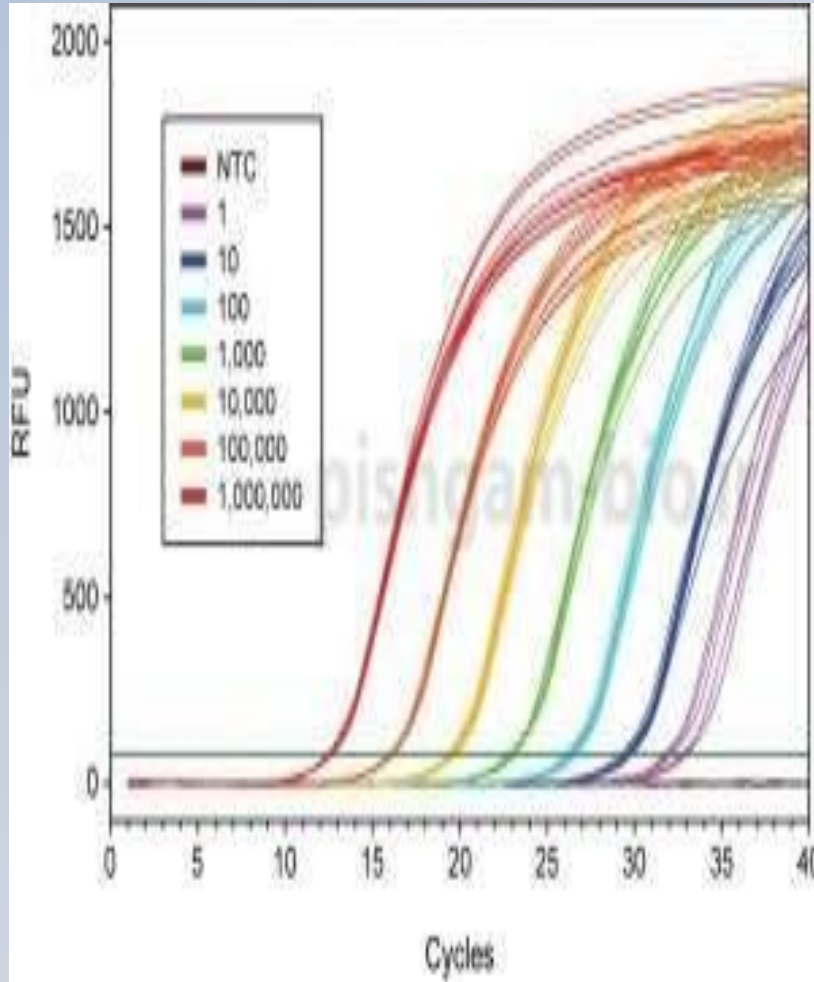
- 60°C به مدت ۳۰ ثانیه (Annealing & Extension)

و دکمه ران دستگاه را بزنید.

بعد از گذشت چند دقیقه گراف تکثیر در نمایشگر کامپیوتر ظاهر شده و پیشرفت لحظه به لحظه واکنش را نشان می دهد.

تفسیر و تحلیل نتایج

آنالیز داده های real time PCR



تکنیک Real Time PCR بسیار شبیه به روش PCR می باشد و در ریل تایم نیز همانند PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، یک توالی تکثیر می گردد. اما تفاوت ریل تایم با PCR معمولی در سنجش کمی توالی تکثیر شده می باشد. در روش ریل تایم با به کار گرفتن یک نشانگر فلورسنت در واکنش، میزان تکثیر محصول ردیابی می گردد. این نشانگرهای فلورسنت به گونه ای طراحی می شوند که در صورت تکثیر DNA با اتصال آن ها به DNA نور تولید کنند. بنابراین نور بیشتر برابر است با تکثیر محصول و افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول بدست آمده نسبت مستقیم دارد.

نتایج به صورت منحنی های تکثیر نمایش داده می شوند. منحنی تکثیر نمایانگر میزان افزایش فلورسانس در طی سیکل ها است. اگر واکنش اختصاصی باشد، تنها یک پیک در منحنی مشاهده خواهد شد. مقادیر C_t کمتر نشان دهنده بیان بالاتر ژن مورد نظر است.

اصول Real time pcr سنجش میزان بیان ژن ها با تکنیک ریل تایم به چه صورت می باشد؟

روش ریل تایم به دو دسته تقسیم بندی می شود:

روش اول: استفاده از نشانگرهای فلورسنت با استفاده از رنگ های باند شده به DNA مانند SYBR Green می باشد.

در این روش از رنگ های متصل شوند به DNA دو رشته ای، به عنوان گزارشگر فلوروسنت برای مشاهده واکنش PCR استفاده می شود. این رنگ به شکاف کوچک مارپیچ دو رشته ای DNA باند می شود و سبب ایجاد نور فلورسنت می گردند، اما رنگ هایی که به رشته DNA باند نشده اند فلوروسنت خیلی کمی را نشان می دهند.

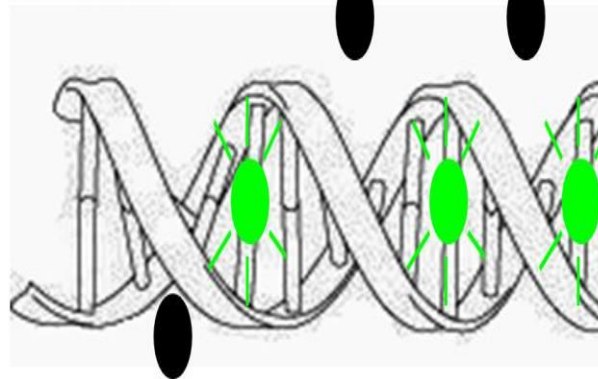
این شکل بیانگر قابلیت اتصال رنگ های فلورسنت به DNA می باشد.

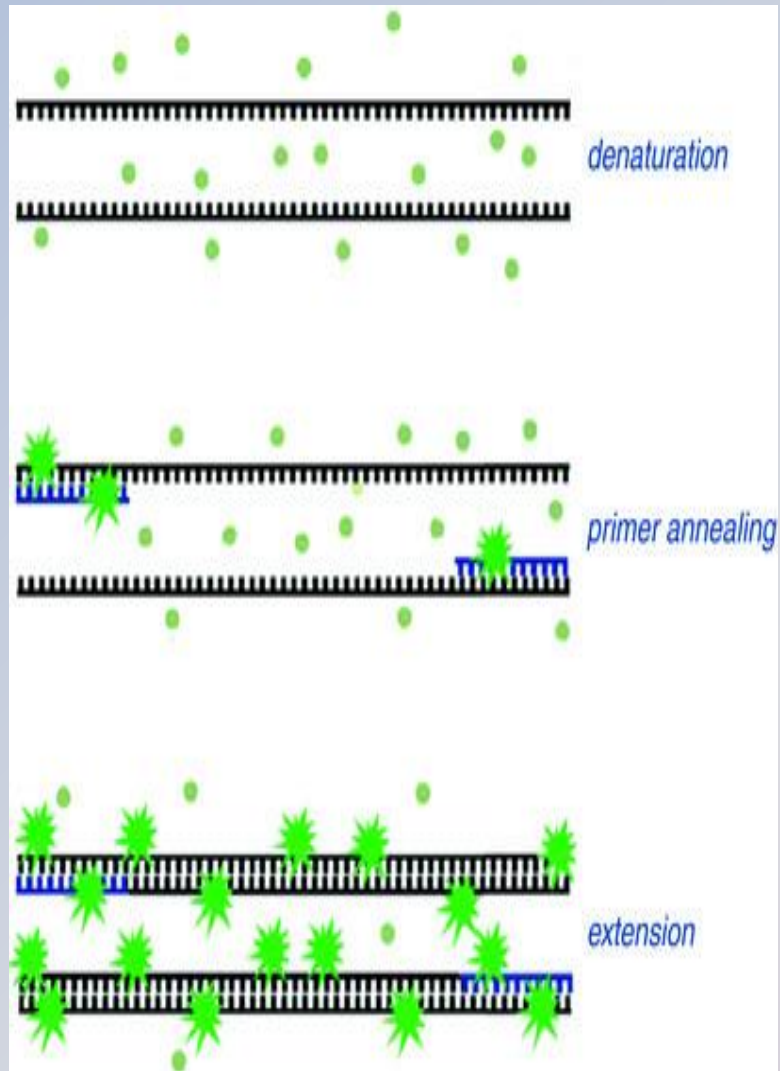
SYBR Green

- Does not bind to single-stranded DNA



- Binds to double-stranded DNA and fluoresces

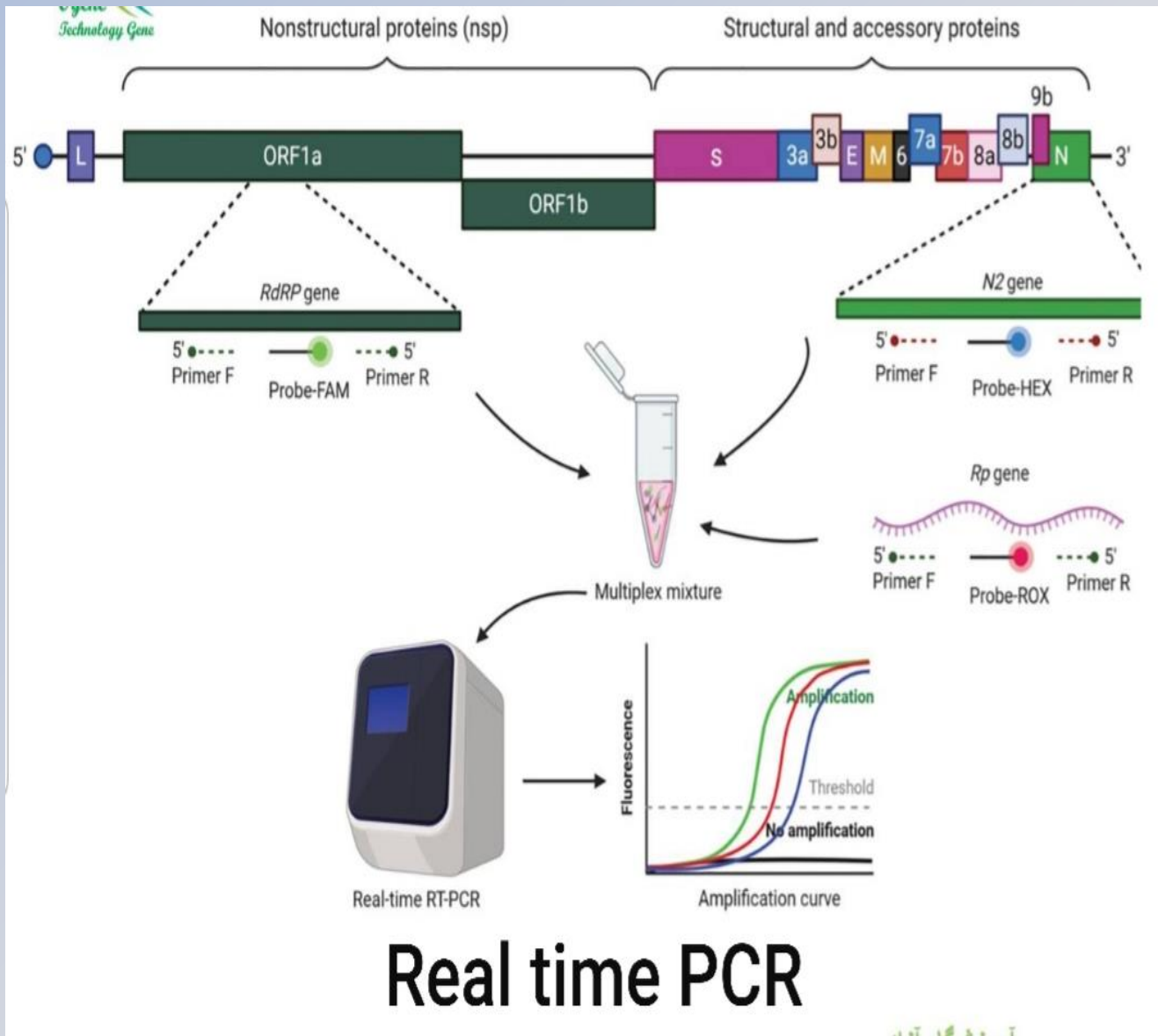




بنابراین در روش ریل تایم، با تکثیر DNA قطعات دو رشته ای افزایش می یابند و با اتصال رنگ های فلورسنت به آن ها میزان نور انتشار شده نیز بیشتر می گردد. و این انتشار نور فلوروسنت در سیکل های متوالی بر اثر مضاعف شدن محصول PCR افزایش می یابد بنابراین با ثبت مقدار فلوروسنت ساطع شده در هر سیکل، می توان پیشرفت تکثیر محصولات واکنش را در طول روند پیشرفت مراحل مشاهده نمود.

نکته: رنگ سایبر گرین (SYBR Green) قابلیت اتصال به DNA تک رشته را ندارند و یا اتصال ضعیف می باشد.

عملکرد رنگ های فلورسنت سایبر گرین در
اتصال به DNA دو رشته ای



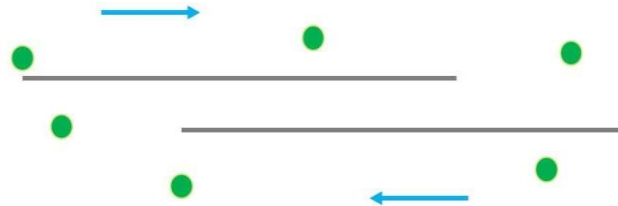
روش دوم: استفاده از نشانگرهای فلورسنت اختصاصی با استفاده از شناساگرها یا (پروب) ژن هدف می باشد.
در این روش از تعدادی شناساگر الیگونوکلئوتیدی (probe) بنام تک من TaqMan Probes استفاده می شود.

Fluorescence Detection:

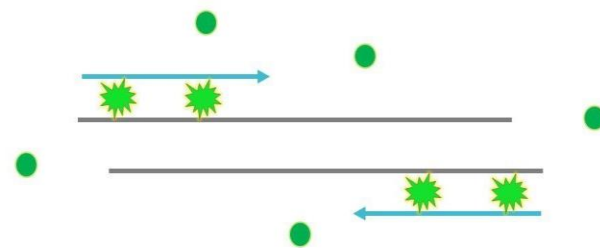
- SYBR Green binds to any double-stranded DNA (dsDNA).
- TaqMan Probes emit fluorescence after cleavage during amplification.

SYBR

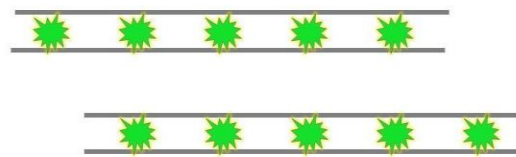
Denature



Polymerization

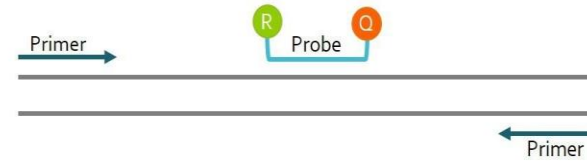


Signal detection (Polymerization completed)

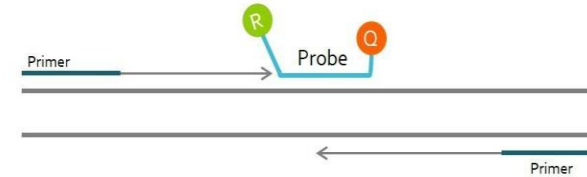


TaqMan

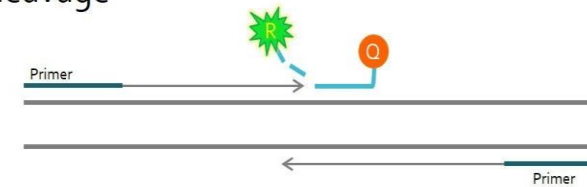
Annealing



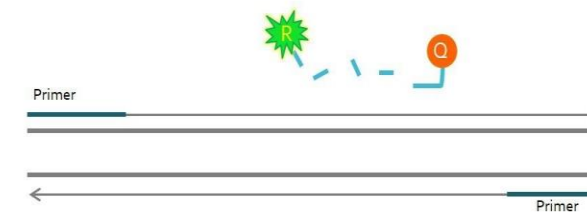
Polymerization & strand displacement



Cleavage



Signal detection (Polymerization completed)



آنالیز داده های real time pcr با مفاهیم پایه در تکنیک ریل تایم Real time PCR

مفهوم سی تی (Ct) در ریل تایم Real time

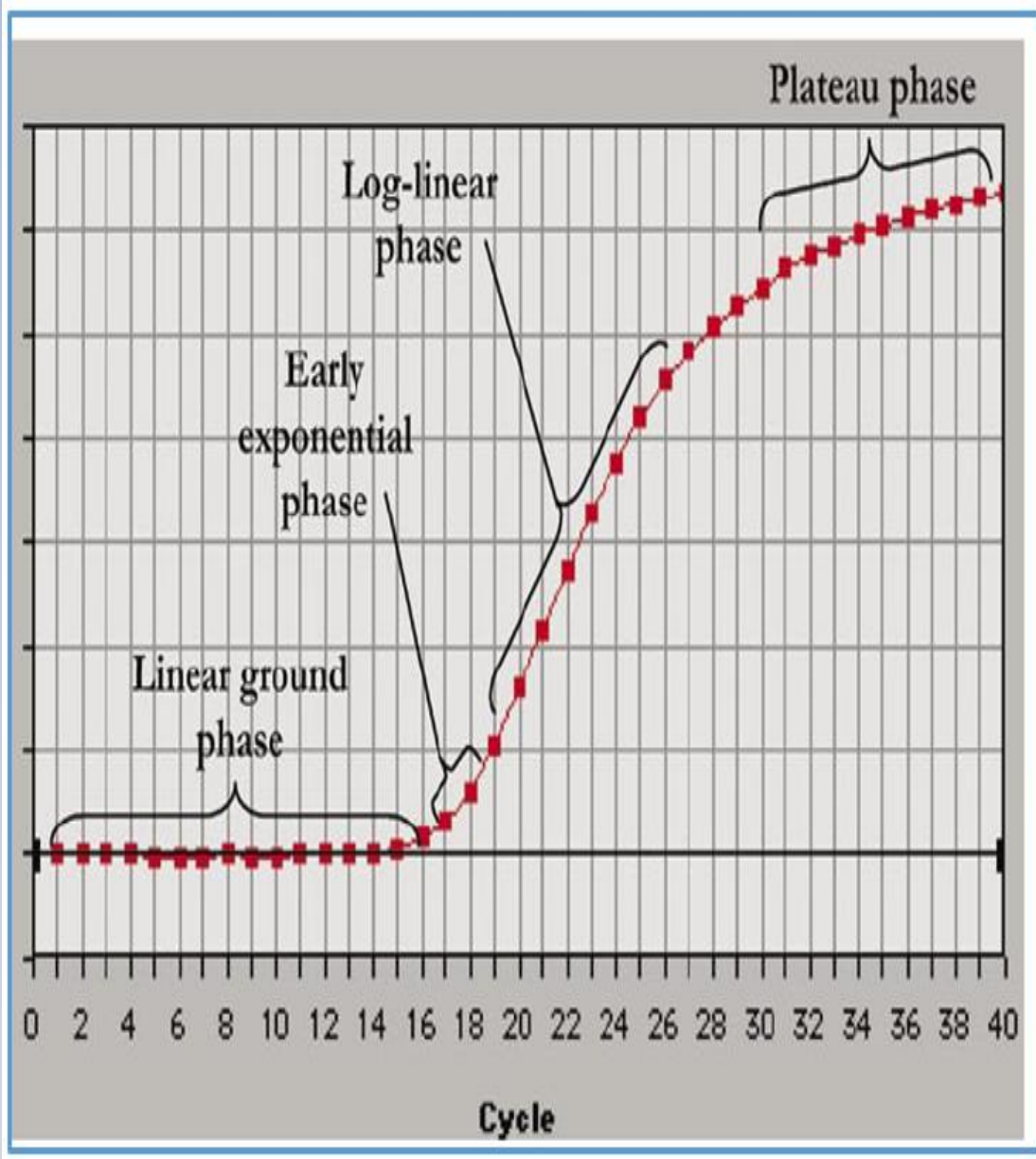
اگر منحنی میزان تکثیر محصول در Real time یا PCR را بر حسب سیکل های PCR ترسیم گردد، می توان دریافت که به این منحنی شامل سه فاز می باشد که عبارت است از:

مرحله اول: فاز Baseline region می باشد. در این فاز میزان تکثیر محصولات به قدری نیست که سبب افزایش نور فلورسنت گردد. نور فلورسنت مشاهده در این فاز از 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: فاز Exponential phase یا 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.

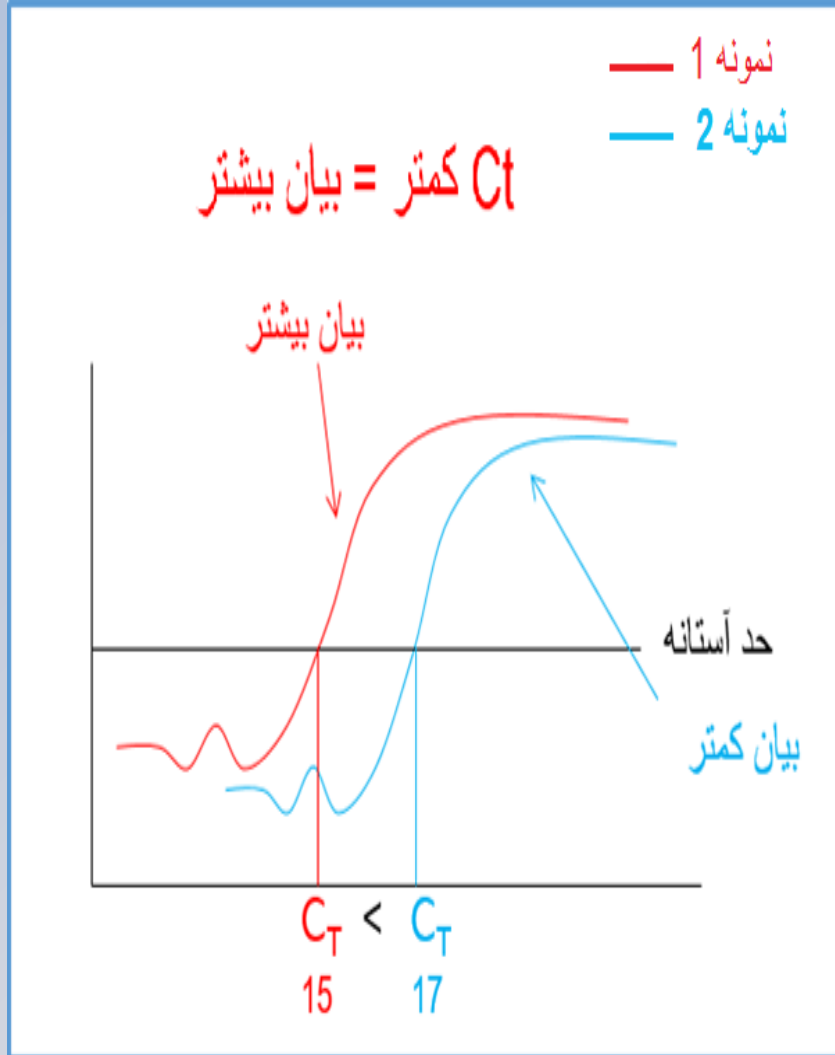
مرحله سوم: فاز plateau phase : در این فاز، ترکیبات واکنش از بین می روند و دیگر محصولی تکثیر نمی شود بنابراین افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی شود. گفته می شود به اصطلاح ریل تایم در این مرحله اشباع شده است.

نمودار تکثیر محصولات در ریل تایم بر حسب سیکل

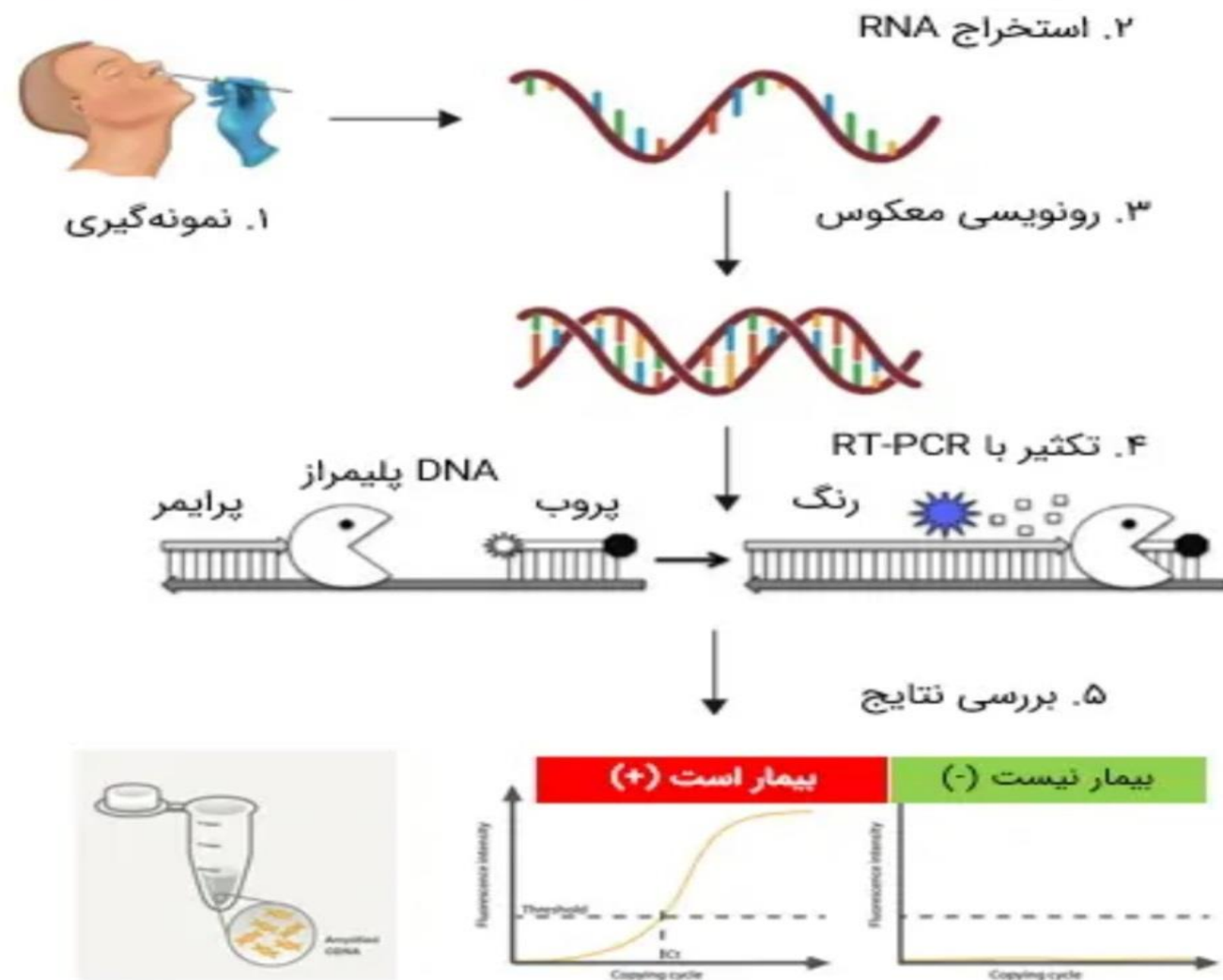


همان گونه که مشاهده می گردد تا 15 سیکل اول در میزان محصولات تکثیر شده تغییر محسوسی دیده نمی شود اما از سیکل 16، واکنش وارد یک فاز افزایشی می گردد که به آن فاز **Exponential** می گویند. سیکلی که در آن واکنش وارد فاز **Exponential** می گردد به میزان **DNA** الگوی اولیه بستگی دارد. یعنی هر چه میزان الگوی اولیه برای تکثیر بیشتر باشد بنابراین واکنش **Real time** یا **PCR** در سیکل پایینتری وارد فاز **Exponential** می گردد.

تفسیر منحنی real time



این شکل منحنی تکثیر ژن YHZ2 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 15 و نمونه آبی رنگ در سیکل 17 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.



روند تشخیص ناقلان کرونا با کیت PCR