روش‌های عملی در Real – Time PCR

نویسندگان:

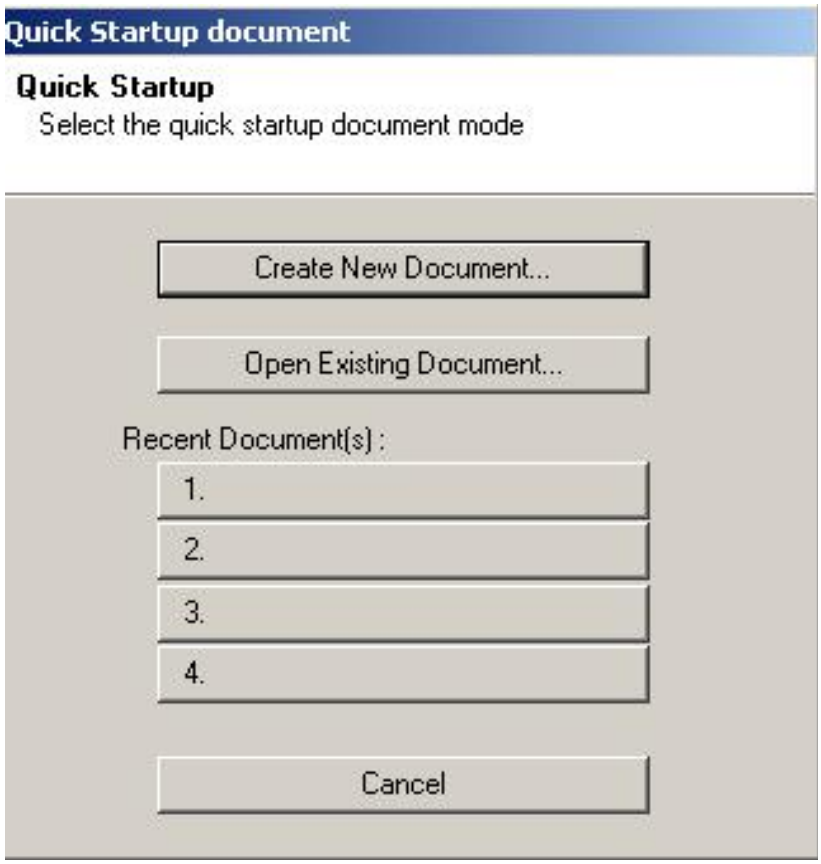
شهرام شجاع (دانشجوی کارشناسی ارشد)

دکتر رضا میرنژاد (باکتریولوژیست- استادیار دانشگاه)

در سه قسمت گذشته تعاریف، کلیات، متدهای گوناگون، اصطـــــــــــــلاحات متداول و روش‌های عملی در Real-Time PCR ارائه گردید، در این مبحث سعی شده تا به صورت کاملاً عملی انجام تست و تفسیر نتایج و همچنین نکاتی در مورد تنظیم Baseline و Threshold Line آورده شود.

راه‌اندازی یک پلیت به روش **Absolute Quantitation** در دستگاه **ABI7500**

1- ابتدا از منوی start بر روی نرم افزار برنامه کلیک کنید تا پنجره **Quick start document** باز گردد. (شکل 1)

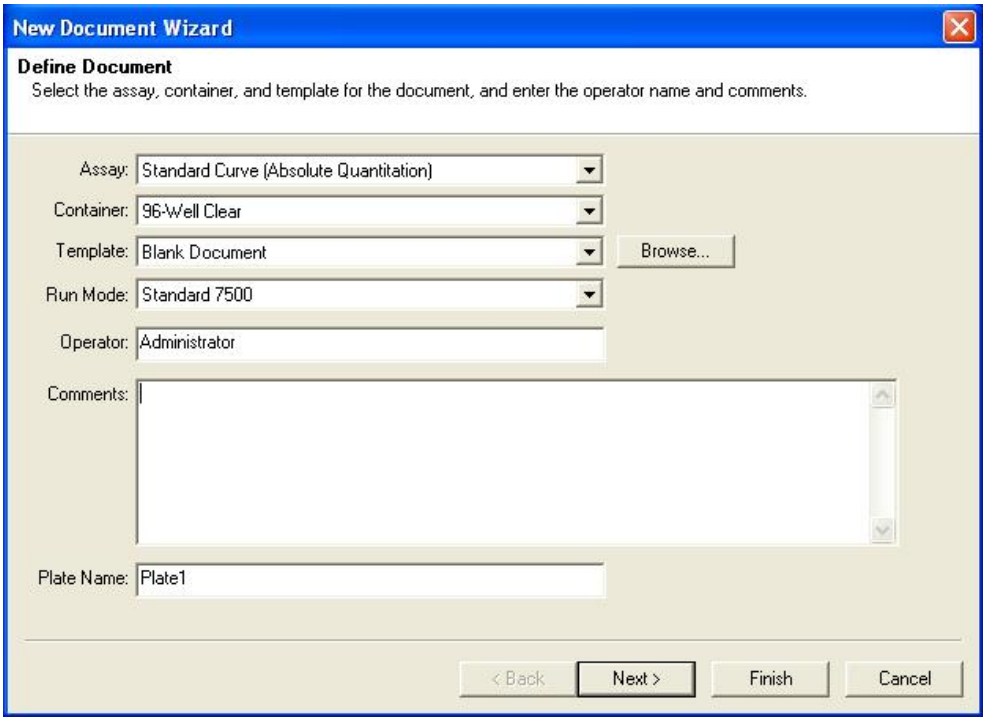


شکل 1: باز کردن منوی Start

2- سپس در همین پنجره بر روی باکس **Create New Document** کلیک کرده تا پنـــــجره **New Document Wizard** باز شود.

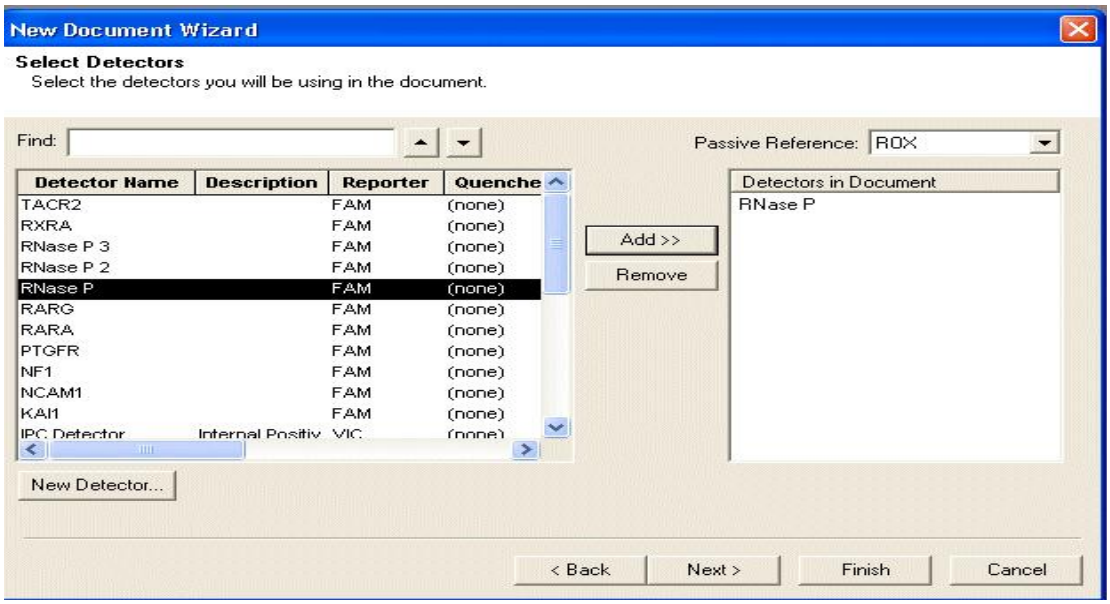
3- سپس در پنجره **New Document Wizard** از قسمت **Assay** نـــــــــــــــــوع آزمون (Absolute Quantitation) را انتخاب کنید. در قسمت **Comment** می‌توانید هرگونه یاداشتی که داشته باشید را مرقوم نمائید.

4- در قسمت **Plate Name** برای آزمون خود یک نام انتخاب و سپس Next را کلیک کنید. (شکل2)



شکل 2: انتخاب نام و نوع آزمون

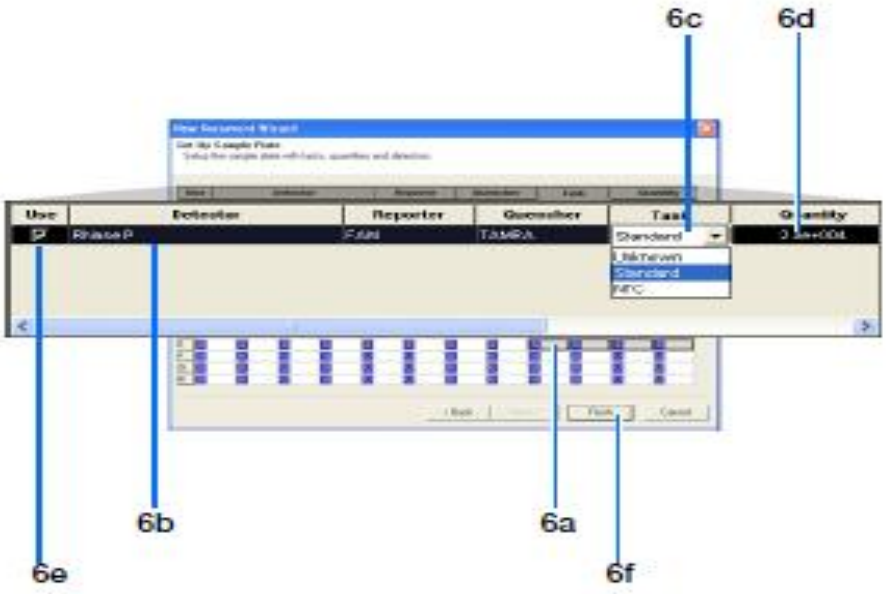
5- در پنجره **New Document Wizard** جدیدی که باز می‌شود، در قسـمت باکس **Reference dye** رنگ مرجع مورد استفاده در آزمون خود را انتخاب کنید. بر روی **Detector** مورد نظرتان را های‌لایت کرده و کلمه **Add** را کلیک کنید تا **Detector** مورد نظرتان برای آزمون انتخاب گردد. چنانچه **Detector** مورد نظر وجود ندارد برای ایجاد **Detector** جدید به قسمت بعد رفته و در پایان این مرحله کلمه **Next** را کلیک نمایید. (شکل 3)



شکل 3: نحوه انتخاب Detector

6- در پنجره **New Document Wizard** جدیدی که باز می‌شود برای هر چاهک آزمون نوع **Detector** و وظیفه آن را می‌توان انتخاب کرد.

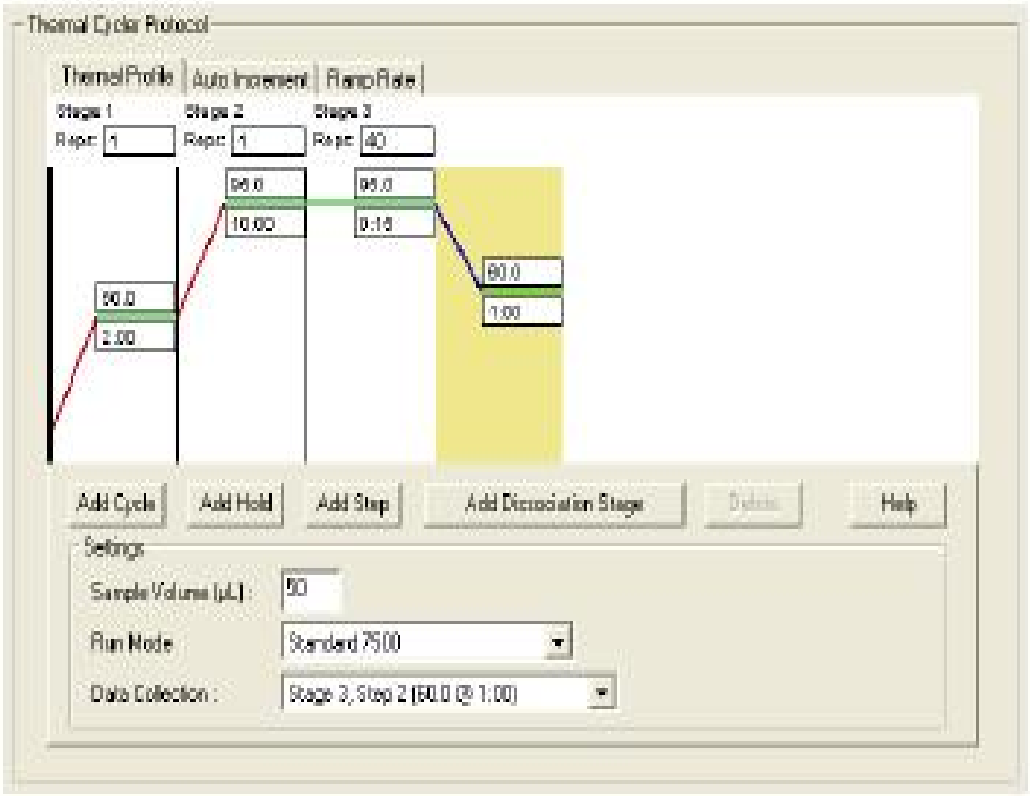
برای این منظور چاهک و یا چاهک‌های مورد نظر را با ctrl-click انتخاب کنید (6a). سپس نام **Detector**ها برای چاهک‌های انتخاب شده را انتخاب نموده (6b)، سپس از گزینه Task نوع نمونه (Unknown یا standard یا NTC) انتخاب می‌شود (6c). در باکس **Quantity** غلظت نمونه استاندارد را وارد و در پایان کلمه **Finish** را کلیک کنید. (شکل 4)



شکل 4: انتخاب وظیفه هر کدام از چاهک‌ها وتعیین غلظت استانداردها

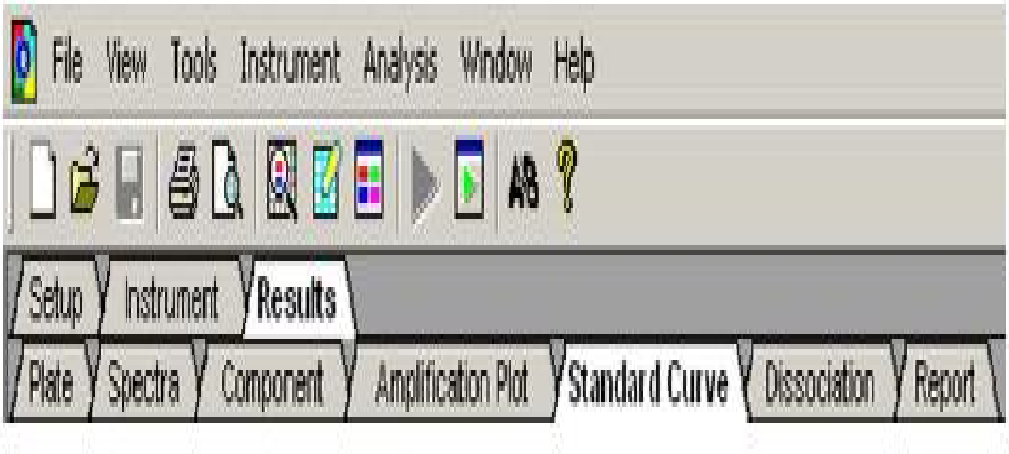
7- سپس در پنجره جدیدی که باز می‌شود کلمه **Setup** را انتخاب کرده و بر روی کلمه **plate** کلیک کنید تا پنجره آن باز شود. چاهک و یا چاهک‌های مورد نـظرتان را انتخاب نموده و بـا Right click بر روی دکمه موس گزینه **well Inspector** را انتخاب کرده و کلیک نمایید. سپس در باکس **sample name** نام نمونه را انتخاب کنید. در قسمت **Detector** تیک آن را بزنید و در قسمت باکس reference day نام رنگ مرجع بکار رفته در آزمون را انتخاب کنید و در پایان بر روی Close کلیک نمائید.

8- در پایان برای بکار انداختن سیکل‌های حرارتی بر روی **Instrument** کلیک کرده و در این صفحه بر حسب اینکه آزمون شما One step RT- PCR یا Two step باشد سیکل‌های حرارت را در قسمت مربوطه تنظیم کرده و سپس در قسمت **Sample Volume** حجم واکنش و در قسمت **Data Collection** مشخص کنید که فلورسانس تابشی در کدام Stage@ step جمع‌آوری گردد. در پایان کلید Start را بزنید که دستگاه ضمن درخواست Save برنامه به کار می‌افتد. (شکل 5)



شکل5: انتخاب سیکل‌های حرارتی

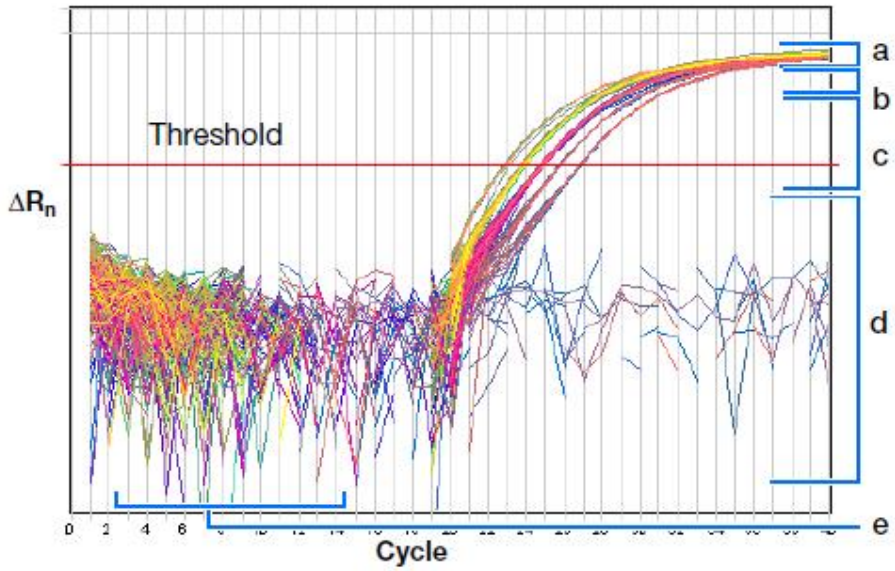
بـــــــــــرای مشاهده لحظه به لحظه پیشرفت واکنش قسمت Result را کلیک کرده و سپس **amplification Plot** را کلیک کنید و بر روی صفحه مانیتور لحظه به لحظه پیشرفت واکنش را مشاهده کنید. معمولاً بر اساس اینکه تعداد کپی اولیه موجود در نمونه چقدر باشد می‌توان منحنی تکثیری نمونه را مشاهده کرد. هرچه تعداد کپی اولیه عامل مورد نظر در نمونه بیشتر باشد در نتیجه Ct کاهش یافته و منحنی زودتر رؤیت می‌گردد. (شکل 6)



شکل 6: مشاهده قسمت‌های مختلف آزمایش از روی صفحه مانیتور

آنالیز داده‌ها و گزارش جواب‌ها:

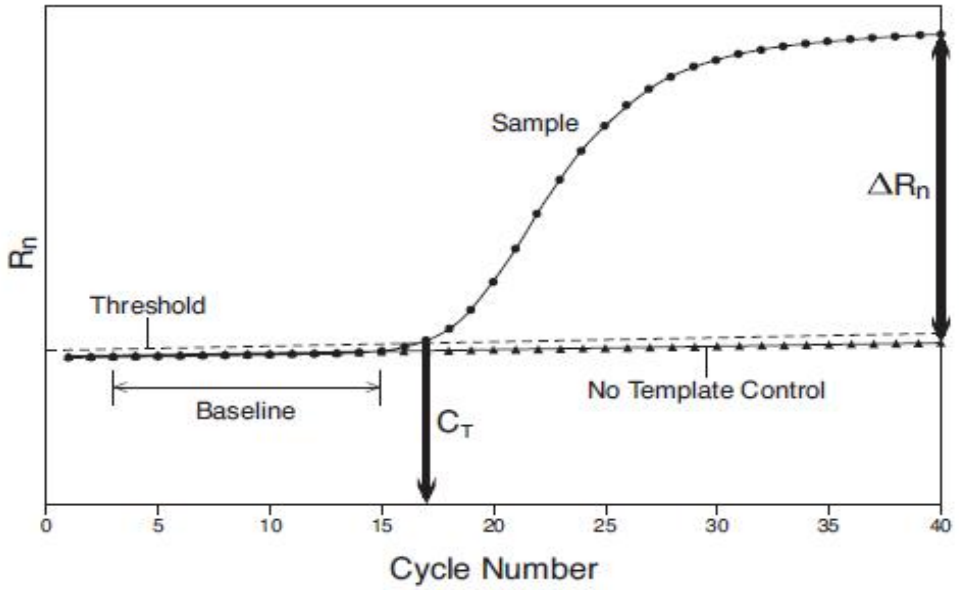
بطور کلی هر نمونه مثبت باید دارای منحنی تکثیر (Amplification plot) با ویژگی و تعاریف زیر باشد: (شکل 7)



A typical amplification curve has a:

- Plateau phase (a)
- Linear phase (b)
- Exponential (geometric phase) (c)
- Background (d)
- Baseline (e)

شکل 7: منحنی تکثیر (Amplification plot)

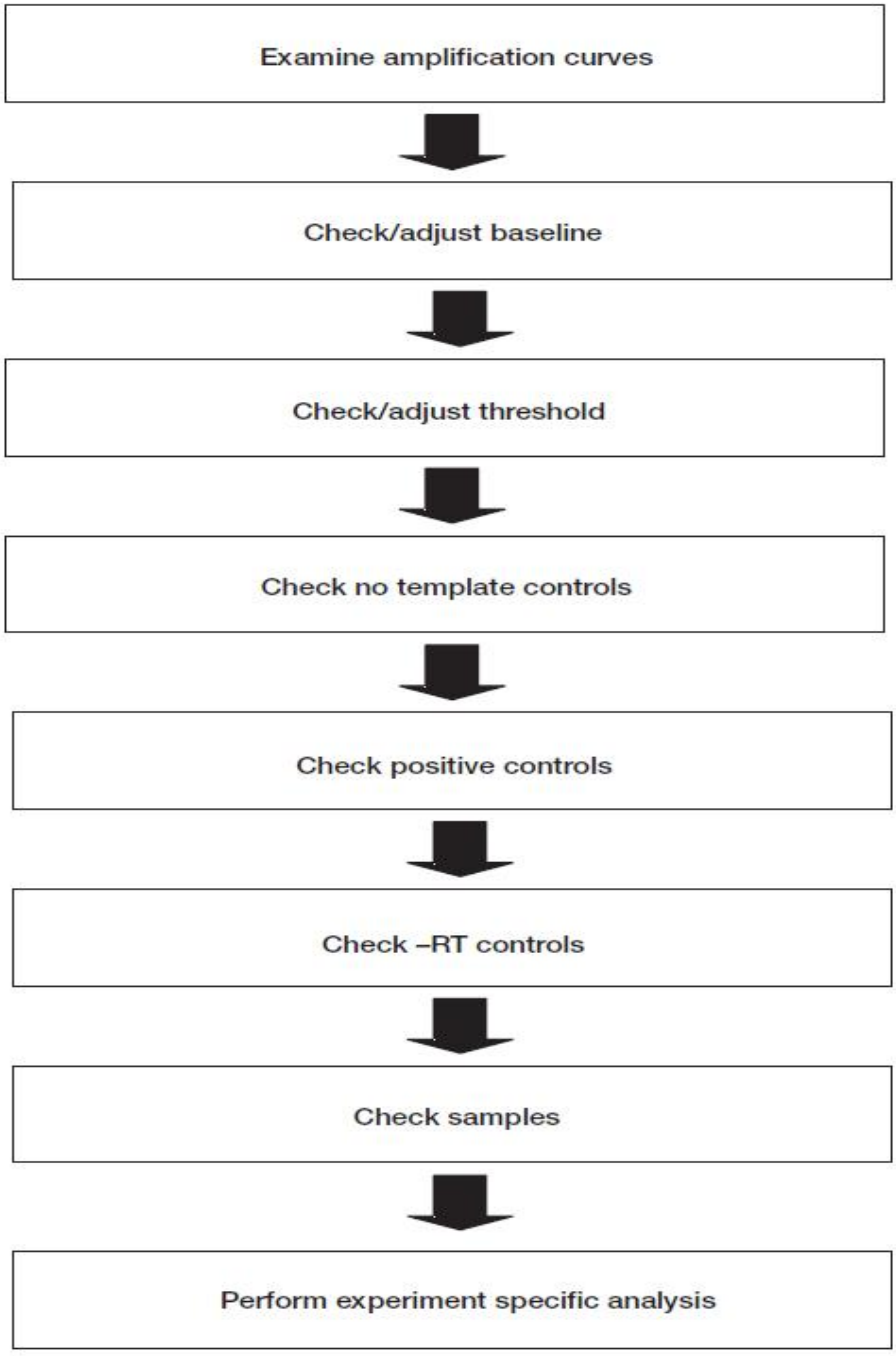


شکل 8: فازهای مختلف منحنی تکثیر

هر منحنی باید دارای سه فاز Baseline، Exponential و plateau باشد، در غیر این صورت جواب قابل قبول نیست (شکل 8).

برای آنالیز داده‌ها طبق نمودار شماره 1 عمل می‌گردد.

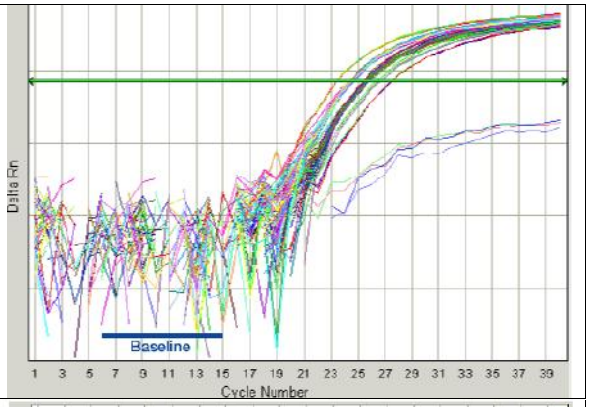
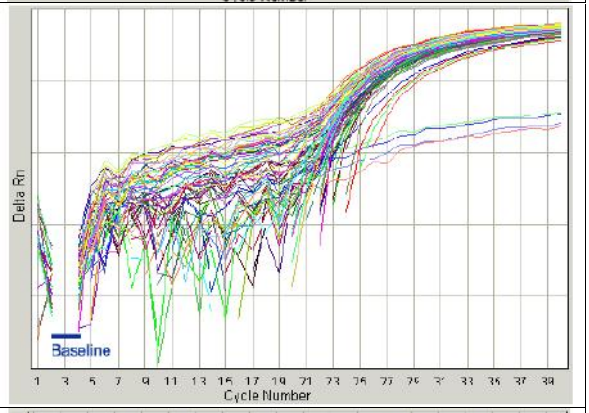
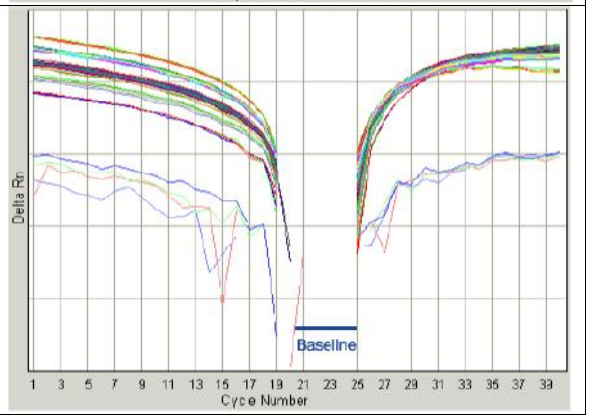
نمودار شماره 1: نحوه آنالیز داده‌ها



.

تنظيم Baseline:

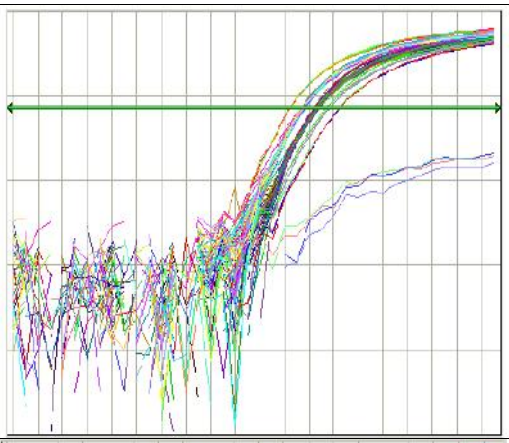
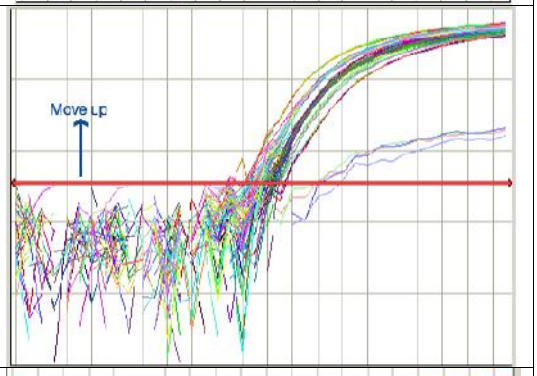
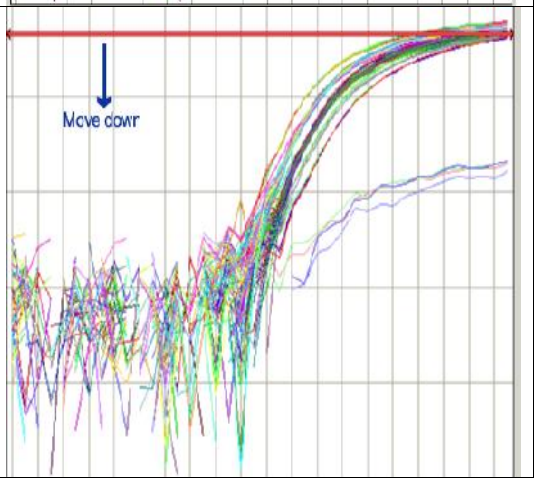
همانگونه که ذکر شد تنظیم Baseline و Threshold در کسب یک نتیجه درست و همچنین تفسیر صحیح نتایج بسیار مهم می‌باشد، برای این منظور به (شکل 9) دقت کنید.

در شکل مقابل baseline به خوبی تنظیم شده و بلافاصله چند سیکل بعد از Baseline منحنی‌های تکثیری شروع شده است.	
در شکل مقابل baseline خیلی پائین انتخاب شده است که در این حالت باید End cycle را افزایش داد.	
در شکل مقابل Baseline خیلی بالا انتخاب شده که در این حالت باید End cycle را کاهش داد.	

شکل 9: نحوه تنظیم Baseline

تنظیم Threshold Line

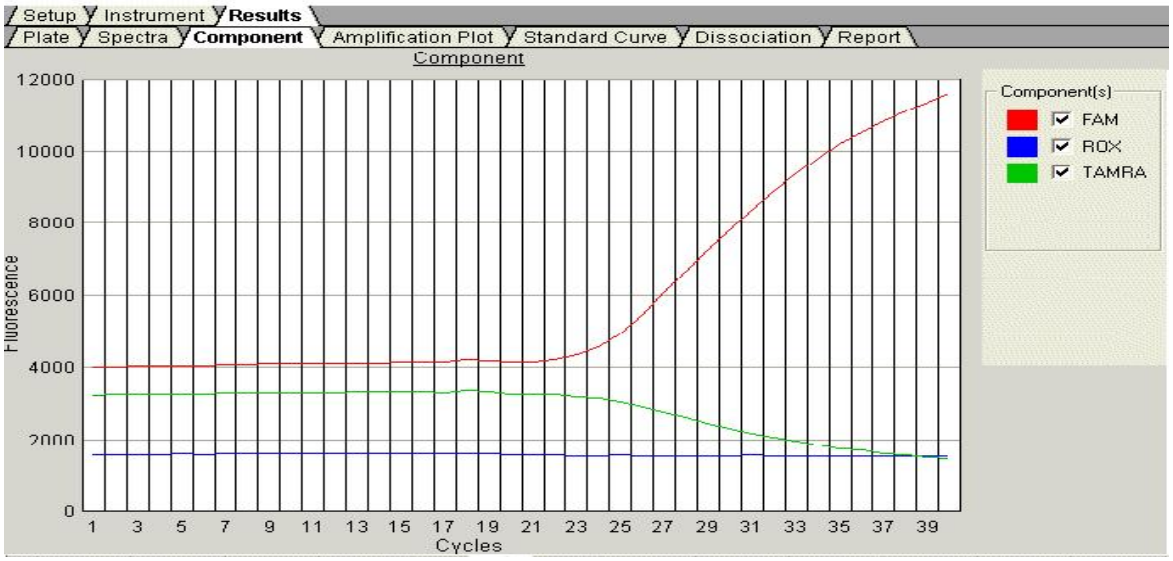
روش تنظیم Threshold Line در شکل شماره 10 نشان داده شده است:

Threshold Line به خوبی تنظیم شده است	
Threshold Line بالا کشیده شود.	
Threshold Line پائین کشیده شود.	

شکل 10: نحوه تنظیم Threshold Line

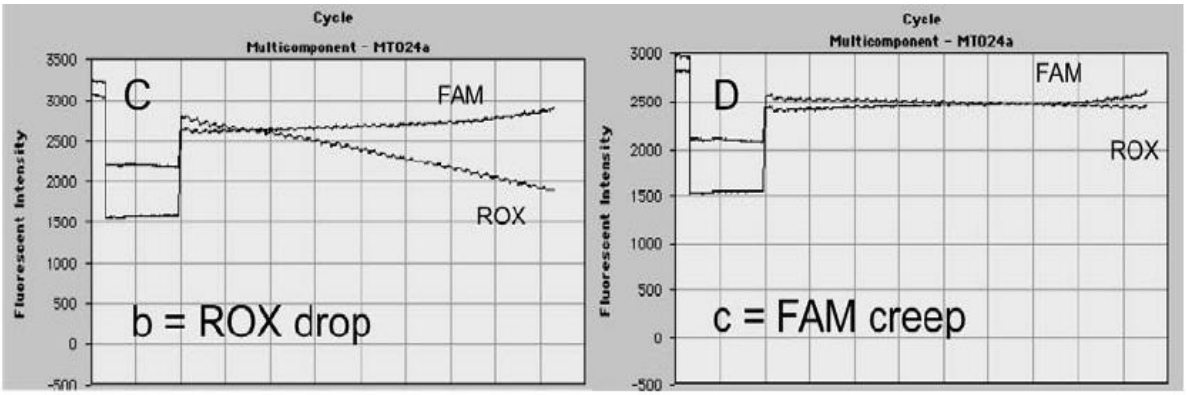
سایر پارامترها که باید ملاحظه گردد:

1- قسمت Component Tab، کنترل کنید اگر نمودار رنگ‌های فلورسانس مورد در آزمون به شکل شماره 11 باشد، طبیعی است.



شکل 11: نمودار رنگ‌های فلورسانس مورد در آزمون

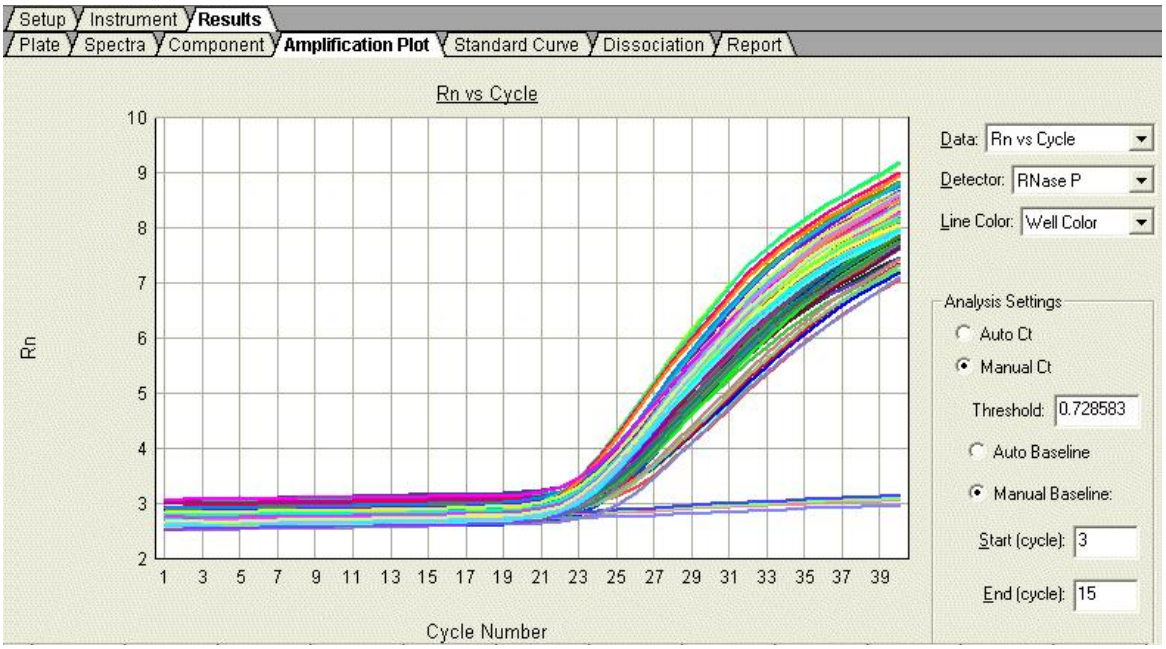
در موارد غیر طبیعی ممکن است FAM creep و ROX drop اتفاق بیفتد. (شکل 12)



شکل 12

2- Rn vs. Cycle (Linear) View

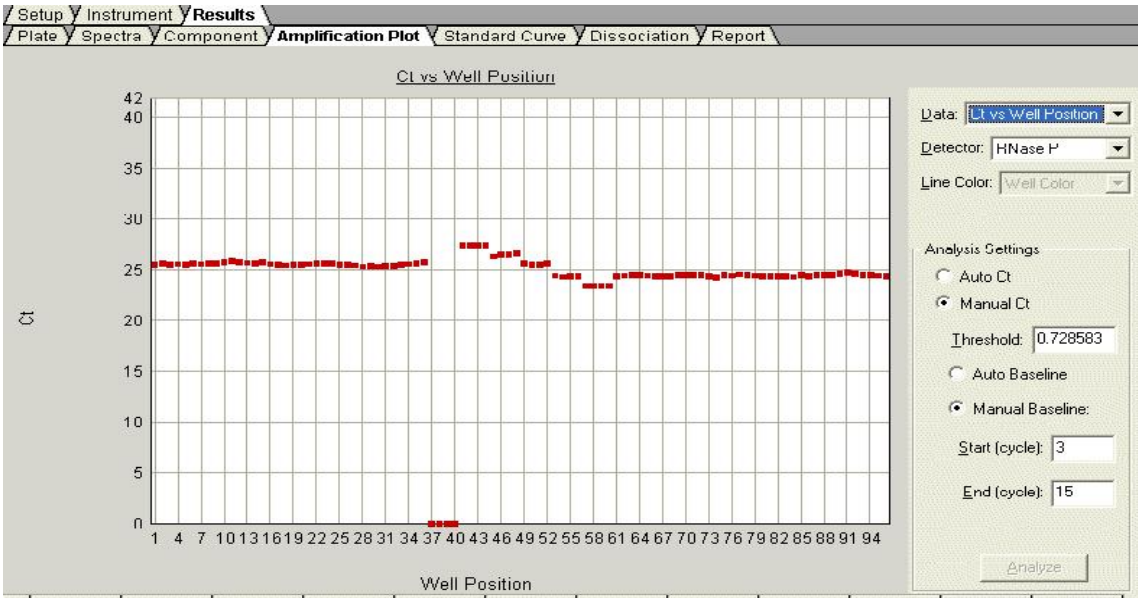
تشخیص تکثیرهای واقعی باید به شکل 13 باشـــــــــــــــــــــــــــــــــــــــد که با مشاهده **Rn vs. Cycle (Linear) View** مشخص می‌گردد و هرگونه نمودار تکثیری که مغایرت با آن داشته باشد باید غیر طبیعی در نظر گرفته شود.



شکل 13: منحنی تکثیری که به خوبی تکثیر در آن اتفاق افتاده است

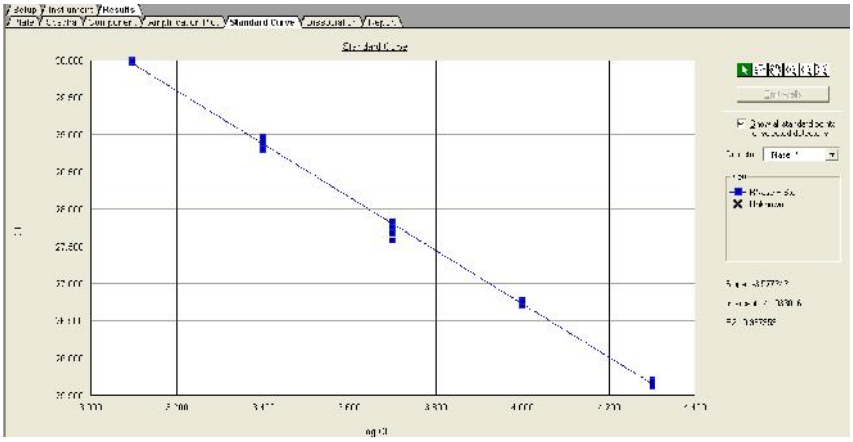
Rn vs. Cycle (Linear) View -1

با تنظیم این پنجره Outlier مشخص می‌شود و نشان می‌دهد در کدام چاهک نمونه ما فاقد تکثیر واقعی بوده است. (شکل 14)



شکل 14: منحنی تکثیری که به خوبی تکثیر در آن اتفاق نیفتاده است

و در پایان بعد از کنترل و تنظیم موارد بالا باید منحنی استاندارد به فرم طبیعی زیر بدست آید (شکل 15).



شکل 15: منحنی استاندارد

یعنی اینکه نمونه‌ها و استـــــانداردها روی یک خط قرار گرفته باشند و Slop یا شیب منحنی باید 3.3- تا 3.6- باشد و بهترین شیب 3.32- است و R آزمون بالای 0.98 باشد.

همچنین در یک آزمون نرمال بایستی نمونه‌های استاندارد که یک لگاریتم اختلاف غلظت دارند اختلاف Ct آنها 3.3 باشد.