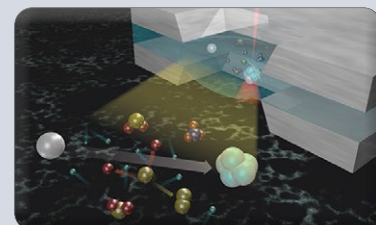


معرفی روش آنالیز فلوسایتومتری

به اشتراک گذاری تجربیات کارشناسان آزمایشگاهها؛ برنامه زنده
اینترنتی شبکه آزمایشگاهی



معرفی روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
هم‌زمان



معرفی اصول عملکرد میکروسکوپ الکترونی
عبوری محیطی درجا / بهنگام مجهز به سلول مایع



معرفی آزمون خستگی فرتینگ یا خستگی -
سایشی مواد با بارگذاری خمشی متناوب



جداسازی و شناسایی اجزاء تشکیل دهنده
اسانس و اسیدهای چرب تری گلیسریدی
در گیاه کلپوره به روش کروماتوگرافی گازی -
طیف‌سنجی جرمی



کاربردهای جدید رزونانس مغناطیس هسته

نویسندگان

ساره حجی آبادی^{۱*}، زهرا حسینی نیا^۲،
زهرا منتخب‌فراهی^۳، سحر داودی^۴،
اطهر امینی^۵، محمدرضا نژادمقدم^۶

*Hajjabadi.sa@gmail.com

معرفی روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هم‌زمان



واژه‌های کلیدی

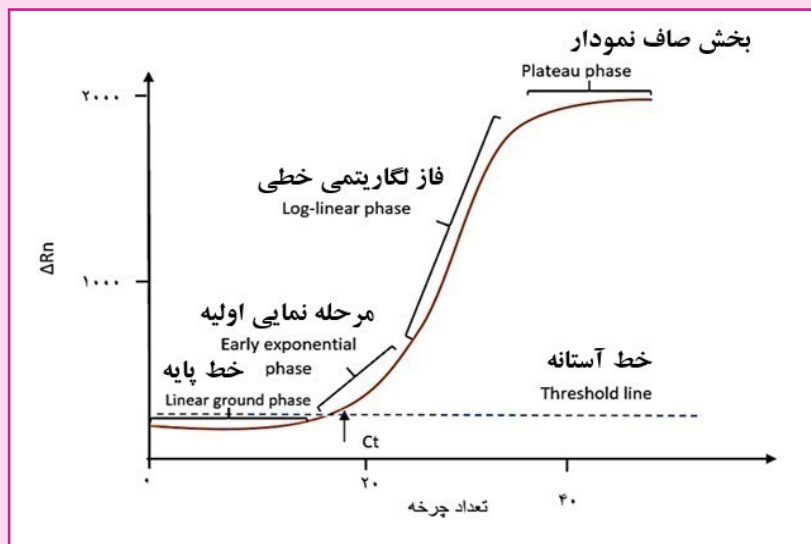
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هم‌زمان، رنگ‌های فلورسنت، آغازگر، گزارشگر، آنالیز کمی.

چکیده

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۱ هم‌زمان یکی از پرکاربردترین روش‌های اندازه‌گیری بیان ژن است؛ زیرا دارای دامنه دینامیکی وسیع و حساسیت و انتخابگری فوق‌العاده است و نیاز به پردازش پس از تکثیر ندارد و یا به پردازش کمی نیاز دارد. با این حال، استفاده بهینه از این مزایا مستلزم درک روشنی از چگونگی اجرای آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هم‌زمان و کاربرد صحیح این روش است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هم‌زمان امکان تکثیر DNA هدف را طی واکنش به کمک مولکول‌های گزارشگر فلورسنت فراهم می‌کند. این مقاله در مورد اصول واکنش و دستگاه ریل تایم، سیستم تشخیص فلورسنت، روش‌های آنالیز داده و کاربردهای مختلف این روش بحث می‌کند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز یکی از قدرتمندترین روش‌ها در زیست‌شناسی مولکولی است. در PCR توالی‌های اختصاصی از DNA الگو یا cDNA با استفاده از الیگونوکلوئیدهای آغازگر^۹ اختصاصی و آنزیم DNA پلیمرز پایدار در برابر حرارت، طی چرخه‌های دمایی متوالی هزار تا یک میلیون برابر تکثیر می‌شوند. اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز همزمان^{۱۰} مشابه PCR معمولی است با این تفاوت که در آن جمع‌آوری داده همزمان با انجام واکنش صورت می‌پذیرد. بنابراین، در این روش، تکثیر و شناسایی در یک مرحله انجام می‌شود [۱]. PCR Real-time شامل یک سری از چرخه‌های دمایی است که حداقل تا حدود ۳۰ چرخه تکرار می‌شود. هر چرخه شامل مرحله دناتوراسیون^{۱۱} DNA (دو رشته DNA از یکدیگر باز می‌شوند)، اتصال توالی‌های آغازگر به توالی هدف و گسترش آغازگرها با استفاده از آنزیم DNA پلیمرز است. انتخابگری واکنش به اتصال توالی‌های آغازگر به توالی هدف و حساسیت آن به توانایی تکثیر آنزیم وابسته است. آنالیز محصولات در PCR معمولی در انتهای واکنش و با استفاده از ژل الکتروفورز^{۱۲} انجام می‌شود. در حالی که در Real-time PCR مقدار محصول بعد از هر چرخه با مشاهده تغییر در شدت نور حاصل از ماده فلورسنت مورد استفاده در این واکنش، قابل ارزیابی است. بنابراین، کاربر دستگاه با بررسی واکنش در ابتدای فاز نمایی^{۱۳} می‌تواند مقدار اولیه ماده ژنتیکی مورد آنالیز را با دقت بسیار زیاد تعیین کند [۲].

منحنی تکثیر Real-time PCR به صورت سیگموئیدی بوده که از ۴ قسمت تشکیل شده است: فاز پایه^{۱۴}، ابتدای فاز نمایی، فاز نمایی^{۱۵} و فاز مسطح یا پلاتو^{۱۶}. در طول فاز پایه (معمولاً ۱۰ تا ۱۵ چرخه اول) فقط واکنش PCR آغاز شده و انتشار نور فلورسنت در هر چرخه بالاتر از شدت فلورسنت زمینه نیست. در طی فاز نمایی در صورتی که کارایی واکنش ۱۰۰ درصد باشد، میزان محصول دو رشته‌ای در هر چرخه دو برابر شده و به صورت نمایی افزایش می‌یابد یعنی به ازای n چرخه، ۲n کپی DNA تولید می‌شود؛ بنابراین، در هر چرخه تعداد مولکول DNA هدف ۲ برابر می‌شود [۲]. در فاز مسطح، اجزای واکنش مصرف شده و به اتمام می‌رسد و دیگر محصولی تکثیر نمی‌شود؛ بنابراین، دیگر افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود و به اصطلاح Real-time در این مرحله اشباع شده است (شکل (۱)). اندازه‌گیری‌های کمی براساس آنالیز سیگنال فلورسنت در ابتدای فاز نمایی انجام می‌شود، نقطه‌ای که شدت فلورسنت بالاتر از شدت فلورسنت زمینه^{۱۷} بوده و نماینده تعداد کپی اولیه در نمونه است آستانه چرخه^{۱۸} یا نقطه عبور^{۱۹} نامیده می‌شود.



شکل (۱): منحنی تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز همزمان و فازهای مختلف آن. محور Y، اختلاف نشر فلورسنت محصول از نشر فلورسنت پایه را در هر نقطه زمانی نشان می‌دهد.

به‌منظور انجام روش Real-time PCR وسایل و مواد خاصی مورد نیاز است. از جمله دستگاه Real-time PCR که در زمان تکثیر، قادر به شناسایی و ثبت سیگنال‌های فلورسنت باشد. همچنین اجزای واکنش Real-time PCR شامل آغازگرها، پروب‌های نشان‌دار و یا رنگ‌های متصل شونده به DNA، آنزیم DNA پلیمرز و DNA هدف است [۲].

دستگاه Real-time PCR

ساده‌سازی تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR دارند. منحنی تکثیر با توجه به تکثیر توالی هدف، اطلاعاتی ارائه می‌دهد در حالی که منحنی تفکیک، ویژگی‌های محصول تکثیر شده نهایی را نشان می‌دهد [۴].

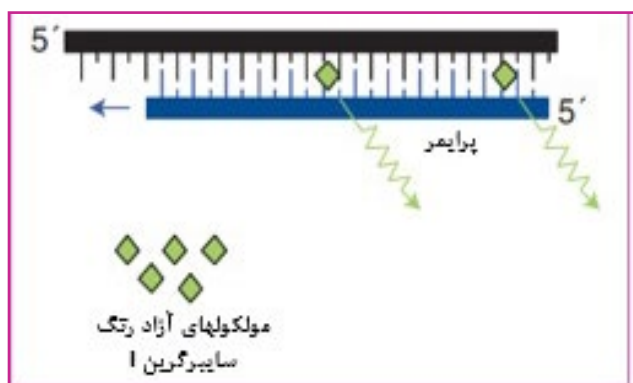
سیستم تشخیص فلورسنت در Real-time PCR

امروزه از روش‌های تشخیص فلورسنت متعددی به‌منظور شناسایی DNA در Real-time PCR استفاده می‌شود. اساس تمام روش‌ها، تولید سیگنال فلورسنت متناسب با مقدار محصول PCR تشکیل شده، است.

این روش‌ها براساس عامل فلورسنت مورد استفاده و همچنین میزان انتخابگری به دو گروه شامل استفاده مستقیم از ماده فلورسنت با قابلیت اتصال به محصول DNA دو رشته‌ای و استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای نشان‌دار شده با فلوروفور طبقه‌بندی می‌شوند. روش تشخیص، نقش مهمی در موفقیت Real-time PCR ایفا می‌کند [۶].

استفاده مستقیم از مواد فلورسنت با قابلیت اتصال به DNA دو رشته‌ای

متداول‌ترین روش برای تشخیص DNA تکثیر شده، استفاده از رنگ‌هایی است که هنگام اتصال به DNA دو رشته‌ای امواج فلورسنت ساطع می‌کند. طیف گسترده‌ای از رنگ‌های فلورسنت متصل شونده به DNA به‌صورت تجاری وجود دارد که شامل اتیدیوم بروماید^{۲۰}، سایبرگرین I^{۲۱}، سایبرگلد^{۲۲}، سایتو^{۲۳}، باکستو^{۲۴}، بیبو^{۲۵} و اوآگرین^{۲۶} است [۸ و ۷] (شکل (۲)).



شکل (۲): عوامل متصل شونده به DNA دو رشته‌ای به‌منظور انتشار امواج فلورسنت.

هم‌زمان با تکثیر DNA دو رشته‌ای در طول واکنش، سیگنالی توسط رنگ تولید می‌شود که متناسب با تعداد کپی DNA بوده و برای دستگاه Real-time PCR قابل تشخیص است. بنابراین فلورسنت، هنگام اتصال رنگ به DNA دو رشته‌ای، به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. شدت سیگنال فلورسنت به میزان DNA دو رشته‌ای موجود بستگی دارد. از جمله مزایای این روش ارزان، راحت و حساس بودن آن است.

این دستگاه دارای توانایی ایجاد چرخه‌های حرارتی و سیستم نوری برای تحریک و جمع‌آوری نشر امواج فلورسنت است که به منظور جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار مخصوص به یک کامپیوتر متصل شده‌است [۳].

چرخه حرارتی

اولین مولفه‌ای که در سیستم عامل‌های PCR مورد توجه قرار می‌گیرد، موتور حرارتی است. موتور حرارتی، وظیفه تنظیم چرخه‌های حرارتی در جایگاه‌های نمونه و دستیابی سریع به این درجه حرارت‌ها را برعهده دارد [۳].

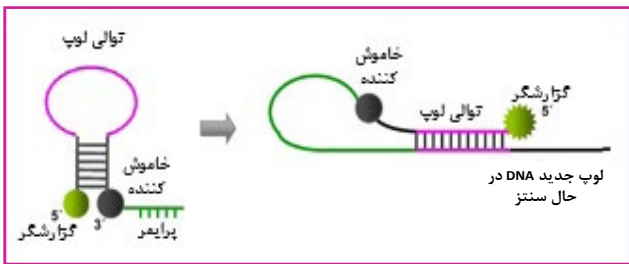
بخش دیگری از این دستگاه از یک ترموسایکلر برای انجام PCR تشکیل شده‌است. توانایی ترموسایکلر برای پایداری دمایی در بین تمام چاهک‌های نمونه‌ها بویژه برای Real-time PCR بسیار مهم است، زیرا هر تفاوتی در دما می‌تواند منجر به کارایی متفاوتی در تکثیر PCR شود. این کار با استفاده از یک بلوک گرمایشی، هوای گرم شده، یا ترکیبی از این دو انجام می‌شود [۴]. در روش بلوک گرمایشی در ضمن عبور جریان الکتریکی از مداری با دو رسانای غیر هم‌جنس، انرژی گرمایی از یک اتصال گرفته شده و در اتصال دیگر جذب می‌شود که این امر باعث می‌شود اتصال اول سردتر و اتصال دوم گرم‌تر شود. بنابراین، گرادیان حرارتی از جریان عبوری ایجاد می‌شود [۵]. یکی از محدودیت‌های این فناوری هدایت دمایی آهسته بلوک گرمایشی است [۵]. علاوه بر این، لایه عایق پلاستیکی بین چاهک واکنش و منبع گرما نیز یک تأخیر حرارتی اضافی ایجاد می‌کند که سبب انتقال نسبتاً کند دما می‌شود. همچنین برای به حداقل رساندن تغییرات دمایی از چاهکی به چاهک دیگر، بلوک‌ها باید بسیار دقیق طراحی شوند [۳]. به‌طور کلی انتظار می‌رود، بلوک‌های گرمایشی در مقایسه با روش هوای گرم شده دما را آهسته‌تر تغییر دهند که این مسئله سبب طولانی‌تر شدن مدت زمان عملکرد ترموسایکلر می‌شود.

سیستم نوری

یک نیاز مهم برای فناوری Real-time PCR، توانایی تشخیص سیگنال فلورسنت و ثبت پیشرفت PCR است. لذا از این حیث سیستم نوری دستگاه‌های Real-time PCR شامل ورود انرژی برای تحریک (برانگیختگی) و همچنین تشخیص طول موج خاص منتشر شده در یک طول موج مشخص است [۴].

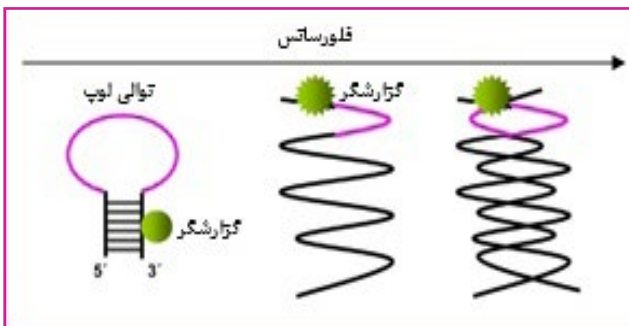
سیستم نرم‌افزاری

ابزار Real-time PCR قطعاً بدون سخت‌افزار رایانه، کسب اطلاعات مناسب و نرم‌افزار تجزیه و تحلیل، کامل نخواهد بود. سیستم عامل‌های نرم‌افزار با ارائه خروجی گرافیکی از نتایج شامل منحنی تکثیر و منحنی تفکیک (نقطه ذوب) سعی در



شکل (۳): آغازگر-گزارشگر آمپلیفلور.

آغازگر-گزارشگرهای لوکس، از یک آغازگر نشان‌دار شده با یک فلوروفور گزارشگر نزدیک به انتهای ۳' در یک ساختار سنجاق سری تشکیل شده است [۱۷]. برخلاف آغازگر-گزارشگرهای اسکورپیون و آمپلیفلور، آنها نیازی به وجود یک خاموش کننده داخلی ندارند. پیکربندی سنجاق سری به طور موثر سیگنال فلوروسنت را قبل از انجام PCR بدون اینکه نیازی به قسمت خاموش کننده مجزا باشد، خاموش می‌کند [۱۸]. ساختار سنجاق سری توانایی کاهش سیگنال فلوروسنت در حالت آزاد و افزایش نمایی سیگنال در حالت اتصال آغازگر-گزارشگر به توالی هدف را ایجاد می‌کند. بیشینه مقدار انتشار فلوروسنت پس از ترکیب آغازگر-گزارشگر لوکس در DNA دو رشته‌ای ایجاد می‌شود و شدت فلوروسنت در طول مرحله گسترش اندازه‌گیری می‌شود (شکل (۴)) [۱۸].



شکل (۴): آغازگر-گزارشگر لوکس.

■ سیستم تشخیص بر پایه گزارشگر-خاموش کننده
سیستم‌های مبتنی بر گزارشگر-خاموش کننده نیز تشخیص بسیار حساس و اختصاصی DNA و RNA را فراهم نموده است. با این حال، نشان‌دار بودن دوطرفه و ویژگی‌های پیچیده طراحی، آنها را نسبت به سیستم‌های مبتنی بر آغازگر یا رنگ‌های متصل شونده به DNA، گران‌تر و دشوارتر می‌کند. سیستم تشخیص بر پایه گزارشگر-خاموش کننده، لیگونوکلئوتیدهایی هستند که دارای دو نوع فلوروفور گزارشگر و خاموش کننده هستند. وقتی گزارشگر و خاموش کننده در فاصله مولکولی نزدیکی قرار می‌گیرند (در حالت اتصال به گزارشگر)، نوری که از دستگاه به گزارشگر برخورد می‌کند، باعث ایجاد تابشی می‌شود که طول موج این تابش در محدوده تحریک خاموش کننده است و مولکول خاموش کننده این نور را جذب و تابشی با طول موج بلندتر ساطع می‌کند که قابل

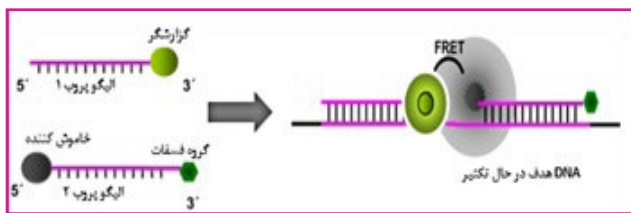
البته یکی از معایب بزرگ آن این است که با اتصال به دو رشته‌های جانبی محلول واکنش، مثل آغازگر دایمر و دیگر باندهای غیراختصاصی، غلظت غیرواقعی از نمونه مورد آنالیز را برایمان تخمین می‌زند. بنابراین، طراحی مناسب آغازگر و انتخاب سیستم شناساگر با کیفیت، در بهینه‌سازی سیستم واکنش، بسیار اهمیت دارد تا حتی المقدور کمترین دایمر ناشی از آغازگر و محصول غیر اختصاصی ایجاد شود [۹].
پرکاربردترین رنگ، سایبرگرین I است، اما با وجود محبوبیتش، دارای محدودیت‌هایی از قبیل پایداری محدود و همچنین قابلیت مهارکنندگی PCR است. اخیراً مشخص شده که رنگ‌های اواگرین و سایتو نسبت به سایبرگرین I پایداری و حساسیت بیشتری برای سنجش کمی DNA دارند. اواگرین، نسل سوم از رنگ‌های متصل شونده به DNA دو رشته‌ای است و یکی از ویژگی‌های آن، قابلیت مهارکنندگی کمتر PCR در مقایسه با سایبرگرین I است [۱۰ و ۱۱].
از رنگ‌های متصل شونده به DNA، می‌توان به منظور شناسایی عوامل عفونی، بررسی بیان ژن، شناسایی جهش، شناسایی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی و همچنین شناسایی ارگانیسم‌های اصلاح شده از نظر ژنتیکی استفاده کرد [۱۲-۱۴].

■ استفاده از لیگونوکلئوتیدهای نشان‌دار شده با فلوروفور

فلوروفورها، مولکول‌های فلوروسنت کوچکی هستند و برای این که در روش Real-time PCR به صورت شناساگر عمل کنند باید به لیگونوکلئوتیدها متصل شوند. دو نوع فلوروفور به نام‌های گزارشگر^{۲۷} و خاموش کننده^{۲۸} وجود دارند. لیگونوکلئوتیدهای متصل به فلوروسنت به سه گروه آغازگر-گزارشگر، گزارشگر-خاموش کننده و آنالوگ‌های اسید نوکلئیک طبقه‌بندی می‌شوند [۱۴ و ۱۵].

■ سیستم تشخیص بر پایه آغازگر-گزارشگر

فناوری‌های تشخیص فلوروسنت مبتنی بر آغازگر-گزارشگر، تشخیص بسیار حساس و اختصاصی DNA و RNA را فراهم نموده است. در این سیستم‌ها، فلوروفور گزارشگر، به یک آغازگر که مختص بخشی از توالی نمونه مورد آنالیز است، متصل می‌شود و در طی تکثیر به محصول PCR متصل و فلوروسنت از این طریق افزایش می‌یابد. برای ساخت چنین سیستمی از ساختارهای آغازگر-گزارشگر سنجاق سری (اسکورپیون^{۲۹}، لوکس^{۳۰}، آمپلیفلور^{۳۱})، انگلر^{۳۲} و سایکلوکن^{۳۳} استفاده می‌شود [۱۵].
آغازگر-گزارشگرهای آمپلیفلور، دارای یک فلوروفور و یک خاموش کننده متصل به یک آغازگر هستند. این نوع آغازگر-گزارشگرها برای اینکه فلوروفور را در نزدیکی خاموش کننده قرار دهد، از پیکربندی سنجاق سری استفاده می‌کند. سیگنال فلوروسنت هنگامی که آغازگر به حالت تان شده است و فلوروفور و خاموش کننده دور از هم بوده و در ترکیب با محصول تکثیر شده، افزایش می‌یابد [۱۶] (شکل (۳)).



شکل (۶): گزارشگر هیبریداسیون-گزارشگرهای FRET.

در واقع در این واکنش یک فلوروفور دهنده در حالت الکترونی برانگیخته می‌تواند انرژی برانگیختگی را به فلوروفور گیرنده در نزدیکی خود منتقل کند و طول موج ساطع شده از یک رنگ به‌عنوان محرک رنگ دیگر است. برخلاف موارد قبل، در این روش با افزایش تعداد محصول حصول هدف میزان سیگنال فلورسنت کاهش می‌یابد [۲۲ و ۲۳]. طراحی این گزارشگرها به‌گونه‌ای است که در صورت تفاوت حتی در یک نوکلئوتید، گزارشگر به DNA متصل نمی‌شود، بنابراین نسبت به روش‌های قبلی از انتخابگری بیشتری برخوردار است. یکی از کاربردهای این گزارشگرها در تشخیص پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی^{۲۸} است [۲۴].

■ سیستم تشخیص بر پایه آنالوگ‌های اسید نوکلئیک

آنالوگ‌های اسید نوکلئیک از نظر ساختاری با نوکلئیک اسیدهایی که به‌طور طبیعی RNA و DNA را ایجاد می‌کنند، مشابه هستند.

یک آنالوگ ممکن است تغییراتی در اسکلت فسفات، قند پنتوز (ریبوز یا دئوکسی ریبوز) یا بازهای نوکلئوتیدی داشته باشد. به‌طور طبیعی، آنالوگ‌ها همه ویژگی‌های DNA طبیعی را دارند، اما در مایعات بیولوژیک پایدارتر بوده و برای مکمل بودن با اهداف اسید نوکلئیک میل زیادی دارند [۲۵].

انواعی از آنالوگ‌های نوکلئیک اسید به شرح زیر است:

- 1) 2'-O-methyl oligodeoxyribonucleotides or 2'-O-methyl RNA
- 2) Peptide Nucleic Acids (PNAs)
- 3) 2'-Fluoro N3-P5'-phosphoramidites
- 4) 1,5-anhydrohexitol nucleotides (HNAs)
- 5) Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer (PMO)
- 6) Locked Nucleic Acids (LNAs)
- 7) Zip nucleic acids (ZNAs)
- 8) Non-natural bases: isoguanine and 5'-methylisocytosine

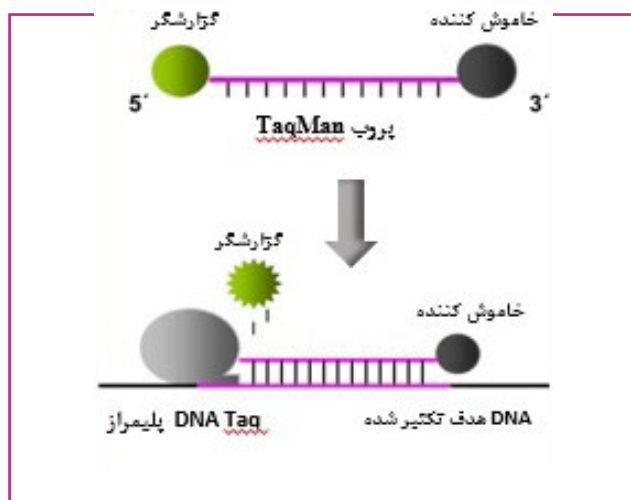
برخی از این آنالوگ‌ها، شامل PNAs, LNAs, ZNAs به‌صورت رایج برای کاربردهای مختلف Real-time PCR در سیستم‌های مشابه آغازگر-گزارشگر یا گزارشگرها استفاده می‌شوند.

سازوکار عمل آنالوگ‌های اسید نوکلئیک‌ها مشابه با عملکرد گزارشگرها یا آغازگر-گزارشگرها است. گزارشگرها یا آغازگر-گزارشگرهای حاوی آنالوگ‌های اسید نوکلئیک در برابر نوکلئازها و پروتئازها مقاومت بیشتری دارند و می‌توانند با تعداد کمی کمتر DNA نسبت به گزارشگرهای استاندارد /

ارزیابی با استفاده از دستگاه نیست. پس از جدایی گزارشگر و خاموش کننده، به دلیل فعالیت اگزونوکلئازی آنزیم پلیمرز در مرحله گسترش پرایمر، نور ساطع شده از گزارشگر قابل جذب توسط خاموش کننده نیست و توسط دستگاه به‌صورت فلورسنت قابل اندازه‌گیری است.

به‌طور کلی دو نوع گزارشگر به نام‌های گزارشگرهای هیدرولیز (به‌عنوان مثال، گزارشگرهای تک‌من^{۳۴}) و گزارشگرهای هیبریداسیون (گزارشگرهای هیبریداسیون^{۳۵}، بیکن مولکولی^{۳۶}، های-بیکن^{۳۷}) وجود دارد [۱۹].

سیستم‌های مبتنی بر هیدرولیز، مثل سیستم‌های تک‌من، علاوه بر عامل فلورسنت (گزارشگر) واجد بخش دیگری به نام خاموش کننده هستند. بخش‌های گزارشگر و خاموش کننده به ترتیب به سر ۳' و ۵' آغازگرها متصل می‌شوند. مادامی که این اتصال برقرار است گزارشگر فعالیت فلورسنت ندارد. اما وقتی آغازگر به توالی مکمل اختصاصی خود متصل می‌شود به واسطه فعالیت ۵' نوکلئازی آنزیم پلیمرز، از آغازگر جدا شده و سیگنال فلورسنت آن فعال می‌شود. لذا با افزایش هر چرخه از واکنش PCR میزان سیگنال فلورسنت افزایش می‌یابد [۱۹ و ۲۰] (شکل (۵)).



شکل (۵): گزارشگر هیدرولیز - TaqMan.

در گزارشگرهای هیبریداسیون یا FRET، فلورسنت گزارشگر در طول مرحله اتصال آغازگر و مرحله گسترش اندازه‌گیری می‌شود. مزیت اصلی استفاده از این گزارشگرها در مقایسه با گزارشگرهای هیدرولیز، توانایی آنالیز کمی قطعات تکثیر شده بواسطه رسم منحنی‌های ذوب است. میزان نور فلورسنت اندازه‌گیری شده ارتباط مستقیمی با میزان تکثیر DNA هدف طی واکنش Real-time PCR دارد. در این سیستم گزارشگرهای FRET به‌صورت دو قطعه گزارشگر مختلف طراحی می‌شود. گزارشگر فلورسنت در انتهای ۵' و هر دو آغازگر بالادستی و پایین‌دستی قرار دارد [۲۱]. هنگام اتصال این دو در محل موردنظر، نزدیکی فاصله این دو ماده باعث واکنشی به نام FRET می‌شود (شکل (۶)).

آغازگر- گزارشگرها برهم‌کنش کنند [۲۶ و ۲۷].

■ ویژگی آغازگرها و گزارشگرها در Real-time PCR

یکی از عوامل مهم در واکنش Real-time PCR، طراحی آغازگر و گزارشگر مناسب است. مهم‌ترین نکاتی که در طراحی آغازگر و گزارشگر باید مدنظر واقع شوند شامل موارد ذیل است:

■ طول محصول PCR تقریباً ۵۰ تا ۱۵۰ جفت باز باشد، زیرا تکثیر محصولات بلندتر به‌صورت کارآمد انجام نمی‌شود؛

■ طول آغازگر تقریباً ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید باشد، بهینه‌سازی آغازگرهای خیلی کوتاه دشوار بوده و آغازگرهای خیلی بلند نیز ممکن است منجر به تشکیل ساختارهای ثانویه یا آغازگر-دایمر شوند؛

■ توالی هدف فاقد ساختارهای ثانویه، موتیف‌های^{۳۹} تکراری و هم‌پلیمرها (به‌عنوان مثال، پلی‌گوانین) باشند. برای تأیید انتخابگری آغازگرها، جستجوی توالی آغازگرها در میان توالی‌های اسید نوکلئیک به‌منظور بررسی تشابه توالی با یکی از پایگاه‌های داده مانند ابزار پایه‌ای برای جستجوی هم‌ترازی موضعی^{۴۰} در سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی^{۴۱} انجام گیرد تا اطمینان حاصل شود که آغازگرها فقط به هدف مورد نظر متصل می‌شوند؛

■ دمای ذوب جفت آغازگرهای روبه‌جلو^{۴۲} و معکوس^{۴۳} باید مشابه باشند (با اختلاف دمای حدود ۵ درجه سانتیگراد) و تقریباً حاوی ۳۵ تا ۶۵ درصد GC باشند. توجه شود که آغازگرهای با محتوای GC بالا می‌توانند هیبریدهای پایدار تشکیل دهند. از طرف دیگر محتوای پایین GC باعث اتصال ضعیف آغازگر می‌شود؛

■ توالی‌های جفت آغازگر باید از نظر عدم مکمل بودن و هیبریداسیون بین آغازگرها (آغازگر-دایمر) بررسی شوند؛

■ آغازگرهای طراحی شده بهتر است به‌گزن‌ها (توالی‌های کدکننده ژن) در دو طرف اینترون (توالی‌های غیرکدکننده ژن) متصل شوند و یا در مرز بین ۲ اگزون مجاور در mRNA قرار گیرند تا تفاوت بین تکثیر cDNA و آلودگی DNA ژنومی مشخص شود؛

■ نتایج مطلوب ممکن است به غلظت آغازگر بین ۵۰ تا ۵۰۰ نانومول نیاز داشته باشد. غلظت نهایی ۲۰۰ نانومول برای هر آغازگر برای بیشتر واکنش‌ها مناسب است؛

■ دمای ذوب گزارشگر به‌طور کلی باید تقریباً ۱۰°C بالاتر از آغازگر رو به جلو یا معکوس باشد؛

■ نوکلئوتید G نباید در انتهای ۵' گزارشگر قرار گیرد؛ زیرا این امر باعث خاموش شدن فلورسنت یا فلورسنت گزارشگر می‌شود؛

■ گزارشگر نباید قابلیت اتصال به خود^{۴۴} و ایجاد ساختار ثانویه را داشته باشد. تشکیل ساختار ثانویه ممکن است کارایی اتصال گزارشگر را کاهش داده و منجر به کاهش حساسیت سنجش شود [۲۸].

برنامه‌های نرم‌افزاری طراحی آغازگر، مانند نرم‌افزارهای الیگوپرفکت^{۴۵} و پریمر اکسپرس^{۴۶} و نرم‌افزار تجزیه و تحلیل توالی، مانند نرم‌افزار Vector NTI می‌توانند توالی هدف را به‌طور خودکار ارزیابی کنند و بر اساس معیارهای ذکر شده در بالا، آغازگر و/یا گزارشگر را طراحی کنند. با استفاده از نرم‌افزار طراحی آغازگر / گزارشگر، اطمینان حاصل خواهد شد که آغازگرها برای توالی هدف اختصاصی بوده و از ساختار ثانویه داخلی برخوردار نیستند. طراحی مناسب آغازگر به ویژه هنگام استفاده از رنگ‌های متصل شونده به DNA برای تشخیص محصول PCR اختصاصی بسیار مهم است [۲۸ و ۲۹].

■ آنالیز داده‌ها

همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد، در Real-time PCR مقدار محصول در ابتدای فاز نمایی متناسب با مقدار DNA اولیه در شرایط ایده‌آل است. در طی فاز نمایی، محصول PCR در صورت کارایی کامل، یعنی ۱۰۰ درصد، دو برابر خواهد شد. امکان انجام واکنش با کارایی تکثیر نزدیک به ۱۰۰ درصد در فاز نمایی با توجه به شرایط PCR، مشخصات آغازگر، خلوص الگو و طول محصول وجود دارد. هم DNA ژنومی و هم cDNA می‌توانند به‌عنوان الگوهای Real-time PCR استفاده شوند [۳۰ و ۳۱].

اساس Real-time PCR، یک ارتباط مستقیم مثبت بین یک رنگ با تعداد محصول PCR است. همان‌طور که در شکل (۱) نشان داده شده‌است، نمودار سیگنال فلورسنت در مقابل تعداد چرخه، یک محدوده خطی را ارائه می‌دهد که در آن لگاریتم شدت فلورسنت مرتبط با مقدار DNA اولیه است. سپس می‌توان یک مبنای^{۴۷} و یک آستانه^{۴۸} را برای تجزیه و تحلیل بیشتر تنظیم کرد. عدد چرخه در سطح آستانه فلورسنت مبتنی بر لگاریتم به‌عنوان عدد Ct تعریف می‌شود، که مقدار مشاهده شده در بیشتر آزمایش‌های Real-time PCR است و بنابراین معیار آماری اولیه است [۳۲].

داده‌های Real-time PCR به دو صورت مطلق^{۴۹} و نسبی^{۵۰} تعیین کمیت می‌شوند. در تعیین کمی مطلق، از استانداردهای رقیق شده سری با غلظت‌های شناخته شده برای تولید منحنی استاندارد استفاده می‌شود. منحنی استاندارد یک رابطه خطی بین Ct و مقادیر اولیه کل RNA یا cDNA ایجاد می‌کند و امکان تعیین غلظت نمونه‌های ناشناخته را براساس مقادیر Ct آنها فراهم می‌کند. این روش فرض می‌کند که همه استانداردها و نمونه‌ها دارای کارایی تکثیر تقریباً برابر هستند. علاوه بر این، غلظت استانداردهای استفاده شده باید غلظت نمونه‌های آزمایشی را در برگیرد و در محدوده قابل اندازه‌گیری و قابل تشخیص برای دستگاه Real-time PCR باشد [۳۲]. کمی‌سازی مطلق در مواردی که نیاز به تعیین دقیق تعداد کپی رونوشت باشد مهم است. با این حال کمی‌سازی نسبی برای بیشتر مطالعات فیزیولوژیکی و آسیب‌شناسی کافی است. کمی‌سازی نسبی، بر مبنای مقایسه بیان ژن هدف در مقابل

فرمول (۲)

$$\text{Ratio of gene expression in treatment group} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target}}}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta CT_{\text{reference}}}}$$

$$\Delta CT_{\text{target}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treatment}}$$

$$\Delta CT_{\text{reference}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treatment}}$$

اگر هر دو ژن هدف و مرجع به بالاترین بازده تکثیر PCR برسند، امکان استفاده از مدل $\Delta\Delta CT$ وجود خواهد داشت. در این شرایط، هر دو کارایی هدف و کنترل برابر با ۲ است که نشان دهنده دو برابر شدن محصول در طی هر چرخه است. سپس نسبت بیان مساوی مشتق شده از $2^{-\Delta\Delta CT}$ وجود خواهد داشت [۳۲ و ۳۷].

فرمول (۳)

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta C_{\text{reference}} - \Delta C_{\text{target}}$$

کاربردهای روش Real-time PCR

روش Real-time PCR برای بررسی بیان ژن به صورت کمی در علوم مختلف از جمله پزشکی، میکروبی‌شناسی، پزشکی قانونی، دامپزشکی و غیره استفاده می‌شود که در ادامه به صورت مختصری در مورد آنها توضیح داده می‌شود.

پزشکی و علوم پایه

روش‌های تکثیر نوکلئیک اسید باعث ایجاد تحولی بزرگ در تشخیص به خصوص در زمینه پزشکی شخصی شده^{۵۲} که در عصر جدید بسیار مورد توجه است، شده است. در این علم به صورت مرحله به مرحله، شانس انتخاب داروی مناسب برای بیمار افزایش می‌یابد. به عنوان مثال، عوارض جانبی دارو که یکی از علل مرگ و میر است در اثر تغییر بیان در فنوتیپ خاصی رخ می‌دهد. در این موارد روش Real-time PCR در ترکیب با دیگر روش‌های مولکولی امکان کنترل تداخلات دارویی و پاسخ‌های فردی به دارو را ممکن می‌سازد [۳۸ و ۳۹].

تشخیص و درمان سرطان

سرطان حاصل تجمع پلی مورفیسیم‌های ارثی و غیرارثی یا جهش در روند چرخه سلولی، سازوکارهای تعمیر DNA و همچنین ژن‌های سیگنالینگ سلولی است که علیرغم پیشرفت تست‌های تشخیصی، روش‌های جراحی و داروهای پیشرفته هنوز یکی از علل اصلی مرگ و میر در دنیا است. همچنین تشخیص زود هنگام سرطان و میزان پیشرفت آن به دلیل پیچیدگی و هتروژنیتی مشکل است.

ژن مرجع (ژن مرجع یک کنترل داخلی واکنش است که دارای توالی متفاوت از توالی هدف بوده و میزان بیان آن تحت تأثیر عوامل آزمایش قرار نمی‌گیرد) در نمونه‌های تیمار در مقابل نمونه کنترل است [۳۳].

از آنجا که کمی‌سازی نسبی برای بیشتر آزمایش‌های Real-time PCR استفاده می‌شود، چندین روش تجزیه و تحلیل داده گسترش یافته است. دو مدل ریاضی در این زمینه، مدل کارایی کالیبره شده^{۵۱} [۳۳] و مدل $\Delta\Delta CT$ [۳۴] است. سیستم‌های آزمایشی هر دو مدل مشابه هستند. این آزمایش شامل یک نمونه کنترل و یک نمونه تیمار است. از DNA، cDNA و یا قطعه استخراج از ژل هر یک از ژن‌های هدف و ژن مرجع رقت‌های متوالی تهیه می‌شود. معمولاً چندین تکرار برای هر غلظت تهیه شده و سپس منحنی استاندارد با استفاده از Ct و مقادیر اولیه تهیه می‌شود تا کارایی تکثیر مشخص شود. کارایی تکثیر PCR را می‌توان به صورت درصد (از ۰ به ۱) یا براساس زمان افزایش محصول PCR در هر چرخه (از ۱ به ۲) تعریف کرد. با این حال، بسیاری از PCRها دارای کارایی تکثیر ایده‌آل نیستند و محاسبات بدون ضریب تصحیح مناسب ممکن است غلظت شروع را بیش از حد ارزیابی کند. مدل‌های ریاضی فعلی، فرضیاتی در مورد سینتیک واکنش نشان می‌دهند و معمولاً به اندازه‌گیری دقیق آن نیاز دارند [۳۵].

به طور سنتی، بازده تکثیر واکنش با استفاده از داده‌های جمع‌آوری شده از یک منحنی استاندارد با فرمول زیر [۳۲] محاسبه می‌شود:

فرمول (۱)

$$\text{Exponential amplification} = 10^{\frac{-1}{\text{slope}}}$$

$$\text{Efficiency} = [10^{\frac{-1}{\text{slope}}}] - 1$$

بازدهی واکنش تکثیر از حالت پایدار نسبی در فاز نمایی تغییر یافته و به تدریج به صفر کاهش می‌یابد. این کاهش به دلیل اتمام اجزای واکنش PCR و کاهش فعالیت آنزیم پلیمرز و رقابت با محصولات PCR است.

مدل کارایی کالیبره شده با یک مدل $\Delta\Delta CT$ تعمیم یافته است. مقدار Ct ابتدا در برابر cDNA ورودی رسم می‌شود (یا لگاریتم cDNA ورودی)، و شیب نمودار برای تعیین کارایی تکثیر (E) محاسبه می‌شود.

ΔCT برای هر ژن (هدف یا مرجع) با کسر مقدار Ct نمونه کنترل از نمونه تیمار محاسبه می‌شود. همان‌طور که در فرمول (۲) نشان داده شده است، نسبت بیان ژن هدف در تیمار نسبت به گروه کنترل می‌تواند از نسبت بین کارایی ژن هدف (E) هدف) به توان ΔCT هدف (ΔCT هدف) و کارایی ژن مرجع (E) مرجع) به توان ΔCT مرجع (ΔCT مرجع) مطابق فرمول (۲) حاصل شود [۳۲ و ۳۶].

به موقع از اهمیت بالایی برخوردار است که با روش‌هایی مثل Real-time PCR به این مهم دست یافته‌اند. مطالعات دیگر در مورد جنبه‌های مختلف علوم دامپزشکی با استفاده از Real-time PCR انجام شده‌است، به‌عنوان مثال، اثرات عفونت‌های ویروسی بر زنده ماندن سلول‌های بنیادی عصبی، تشخیص چندین ویروس، پاسخ‌های ایمنی ذاتی به عفونت ویروسی، عوامل موثر در همانندسازی ویروس و پروفایل بیان ژن در هنگام عفونت از این موارد است [۴۳].

■ باکتری شناسی

به‌طور معمول درمان‌های آنتی‌بیوتیکی بر پایه شناسایی باکتری، براساس روش رنگ‌آمیزی گرم انجام می‌شود. اما تنوع بالای عوامل بیماری‌زای باکتریایی شناخته شده منجر به تغییر روش‌های شناسایی ابتدا با استفاده از روش PCR با مقدار کمی از DNA باکتری و سپس با استفاده از Real-time PCR تسریع شد. مزایای این روش نسبت به روش‌هایی مانند کشت سلولی و ایمنی، تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر نوع باکتری، تجویز به موقع آنتی‌بیوتیک مناسب را تسهیل می‌کند [۴۴].

■ قارچ‌ها

روش‌های معمول تشخیصی برای قارچ‌های بیماری‌زای انسانی در بسیاری از موارد بسیار زمان‌بر هستند. اما روش‌های تشخیصی بر پایه Real time PCR بسیار سریع‌تر از روش‌های معمول عمل می‌کنند.

مایکوتوکسین‌ها از مهمترین آلاینده‌های غذایی هستند که به دلیل اثرات سوء در سراسر جهان به یک نگرانی بزرگ تبدیل شده‌اند. به‌منظور غلبه بر این مشکل، تشخیص سریع و مقرون به صرفه پاتوژن‌های منتقل شده از مواد غذایی در سراسر زنجیره غذایی همچنان یک نگرانی عمده برای صنعت و بهداشت عمومی است [۴۴].

یک گروه متخصص بین‌المللی در کمیته استانداردسازی اروپا، به‌منظور توصیف پروتکل‌های تشخیصی عوامل بیماری‌زای ناشی از مواد غذایی با استفاده از روش PCR، ایجاد شده‌است. از نظر این گروه، یک روش استاندارد مبتنی بر PCR برای تشخیص پاتوژن‌های منتقل شده از طریق مواد غذایی باید از معیارهای مختلف از جمله دقت تحلیلی و تشخیصی، امکان تشخیص بالا و پروتکل‌های آسان، در دسترس و کاربر پسند برای کاربرد و تفسیر آن برخوردار باشد. روش Real-time PCR، نسبت به روش‌های معمول تشخیصی برای قارچ‌های بیماری‌زای انسانی، بسیار سریع‌تر و با حساسیت بالاتر از روش‌های معمول عمل می‌کند [۴۵].

■ پزشکی قانونی

فناوری‌های پیشرفته برای تجزیه و تحلیل DNA با استفاده از توالی‌های تکراری پشت سرهم کوتاه^{۵۸} تحولی در تحقیقات

Real-time PCR یک روش با حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص در حد یک مولکول DNA است. بیشتر سرطان‌ها با بیان ژن‌های مارکر قابل تشخیص هستند. از آنجا که حساسیت ردیابی یک مارکر برای کاربردهای کلینیکی کافی نیست، مجموعه‌های چند ژنی برای بیشتر بدخیمی‌های رایج طراحی شده‌اند که دقت تشخیص در مراحل اولیه سرطان را افزایش می‌دهند. هم‌اکنون کیت‌های تشخیصی بسیاری بر پایه روش Real-time PCR برای تشخیص انواع مختلفی از بدخیمی‌ها وجود دارند. همچنین در پزشکی شخصی شده برای درمان سرطان و کاهش عوارض ناخواسته در اثر استفاده از داروی نامناسب و انتخاب موثرترین دارو براساس نوع جهش از این روش استفاده می‌شود [۴۰].

■ ویروس‌شناسی

تحقیقات بسیاری برای شناسایی و بررسی میزان ویروس در نمونه‌های آلوده انسانی با استفاده از روش Real-time PCR انجام شده‌است. به‌عنوان مثال، در تشخیص ویروس آبله^{۵۳}، این روش حساسیت بیشتری نسبت به کشت سلول در نمونه‌های پوستی نشان داده است. همچنین Real-time PCR در مطالعه اثر متقابل ویروس و میزبان به‌عنوان یک ابزار مناسب در بررسی میزان کارایی ترکیبات ضدویروسی است. همچنین روش‌های Real-time-PCR چندانگانه^{۵۴} برای تشخیص و تمایز چندین ژنوتیپ ویروسی در بیماران که دچار نقص ایمنی هستند و با چند ویروس هم‌زمان آلوده می‌شوند کاربرد دارد [۴۱].

بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ (COVID-19)^{۵۵}، که ناشی از سندرم حاد تنفسی شدید ویروس کرونا^{۵۶} (SARS-CoV-2) است، برای اولین بار در سال ۲۰۱۹ در ووهان چین گزارش شد و متعاقباً سازمان بهداشت جهانی آن را یک بیماری همه‌گیر اعلام کرد. تعداد زیاد بیماران مبتلا به کرونا در زمان شیوع این بیماری، موجب تکمیل ظرفیت پذیرش بیمارستانها می‌شود. بنابراین شناسایی سریع و دقیق بیماران، درمان آنها و جداسازی این بیماران از بیماران عادی اهمیت زیادی در مدیریت بهتر مراکز بهداشتی خواهد داشت. روش Real-time PCR برای بیماری SARS-CoV-2 با استفاده از نمونه‌های دستگاه تنفسی فوقانی و تحتانی (سواب نازوفارنکس، سواب گلو و خلط) استاندارد طلایی برای تشخیص این ویروس است [۴۲].

در حوزه دامپزشکی نیز تشخیص ویروس‌ها با حساسیت بالا با روش Real-time PCR امکان‌پذیر شده‌است. عفونت گربه‌های خانگی با ویروس نقص ایمنی گربه‌سانان^{۵۷} منجر به بیماری نقص ایمنی کشنده مشابه ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV-1) در انسان شده‌است. این موضوع به پیشرفت تحقیقات به ویژه در تولید واکسن‌های کاندید در مورد ویروس مشابه از نظر مورفولوژیکی و ژنتیکی کمک کرده است و باعث تشخیص و اندازه‌گیری با حساسیت بسیار بالا با استفاده از روش Real-time PCR برای این ویروس شده‌است. همچنین در مورد عوامل بیماری‌زای مشترک انسان و دام تشخیص و درمان

- آنالیز بیان ژن با روش Real-Time PCR برای نمونه‌های میکروبی (باکتری، قارچ، ویروس و غیره)؛
- آنالیز بیان ژن با روش Real-Time PCR برای نمونه و بافت انسانی؛
- آنالیز بیان ژن با روش Real-Time PCR برای نمونه گیاهی و خوراکی؛
- آنالیز تراریختگی به روش Real-time PCR؛
- آنالیز تشخیص انواع جهش‌های ژنتیکی شامل الحاق، حذف و موتاسیون نقطه‌ای با روش Real-time PCR؛
- آنالیز تشخیص سریع آلودگی به مننگوکوک با روش Real-time PCR؛
- آنالیز تشخیص غیرفعال شدن ژن‌ها در کروموزوم با روش Real-time PCR؛
- آنالیز تعیین تعداد کپی از هر ژن با روش Real-time PCR یا آنالیز سنجش میزان بیان ژن با روش Real-time PCR؛
- آنالیز تعیین مقدار ژن و زیگوسیتی با روش Real-time PCR؛
- آنالیز تعیین میزان آسیب به DNA با روش Real-time PCR؛
- آنالیز تعیین میزان تماس با اشعه رادیواکتیو با روش Real-time PCR؛
- آنالیز تعیین همسانی در لوکوس‌های HLA با روش Real-time PCR؛
- آنالیز داده‌های خام Real-time با سامانه محاسباتی زیست‌شناسی؛
- آنالیز رسوب کروماتین با استفاده از اتصال آنتی-ژن-آنتی‌بادی با روش Real-time PCR؛
- آنالیز سنجش ایمنی زیستی و پایداری ژن با روش Real-time PCR؛
- آنالیز سنجش صحت نتایج در آرایه‌ها با روش Real-time PCR؛
- آنالیز سنجش ویروس‌ها با روش Real-time PCR یا تشخیص آلودگی‌های ویروسی با روش Real time PCR؛
- آنالیز شناسایی متیلاسیون با روش Real-time PCR؛
- آنالیز شناسایی عوامل پاتوژن با روش Real-time PCR؛
- آنالیز شناسایی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و گونه‌های مقاوم با روش Real-time PCR؛
- آنالیز شناسایی پاتوژن‌های میکروبی در آب‌های محیطی با روش Real-time PCR؛
- آنالیز پیوند سلول‌های بنیادی خونساز با روش Real-time PCR؛
- آنالیز ژنوتایپینگ با Real-Time PCR به روش HRM؛
- آنالیز کمی گزارشگرهای میکروساتلیت‌ها (ریزماهواره) با روش Real-time PCR؛
- تشخیص آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در نمونه‌های سلولی با روش Real time PCR.

پزشکی قانونی ایجاد کرده است. یکی از متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده PCR است که اطلاعات دقیق ژنوتیپ نمونه‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد. یکی از روش‌های زمان‌بر در این مورد، روش لکه‌گذاری نقطه‌ای^{۵۹} است. هم‌اکنون Real-time PCR به‌عنوان یک روش شناخته شده در پزشکی قانونی برای بررسی کمی DNA هسته‌ای و میتوکندریایی انسانی به کار می‌رود؛ همچنین این روش برای نمونه‌هایی با تخریب بالا از کارایی زیادی برخوردار است [۴۶].

■ شناسایی محصولات اصلاح شده ژنتیکی^{۶۰}

کشت محصولات اصلاح شده ژنتیکی در بسیاری از نقاط جهان در حال گسترش است و تعداد زیادی از دانه‌های تراریخته و محصولات تولید شده از آنها به‌صورت بین‌المللی عرضه می‌شود. ارزیابی ایمنی مواد غذایی در بسیاری از کشورها اجباری شده‌است. روش‌های رایج PCR و Real-time PCR امکان تشخیص این محصولات را با حساسیت و انتخابگری بالا فراهم نموده که هم‌اکنون در بسیاری از آزمایشگاه‌های کشور، نمونه‌های غذایی مختلف مطابق استانداردهای ملی و بین‌المللی با این روش ارزیابی می‌شوند [۴۷].

■ لیست خدمات تخصصی آزمون بر پایه روش Real Time PCR ثبت شده در شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی:

- خدمات آزمایشگاهی که با روش Real Time PCR توسط آزمایشگاه‌های ارائه دهنده خدمات تخصصی آزمون انجام می‌شود، بسیار متنوع است. شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، به‌عنوان پلتفرم به اشتراک‌گذاری دستگاه‌ها و ارائه خدمات آزمایشگاهی کشور، تاکنون خدمات آنالیزی متنوعی به روش Real Time PCR را به شرح زیر ثبت کرده است:
- آزمون تشخیص آلودگی‌های ترپونما پالیدومی با روش Real time PCR؛
- آزمون‌های ژنتیک و مولکولی با دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز هم‌زمان Real Time PCR؛
- آنالیز DNA میتوکندریایی با روش Real-time PCR-؛
- آنالیز بررسی انواع تریزومی با روش Real Time PCR؛
- آنالیز بررسی حساسیت استرپتوکوکوس پنومونیا به پنی‌سیلین با روش Real-time PCR؛
- آنالیز بررسی فرآیندهای زیستی در سلول‌های زنده با روش Real-time PCR؛
- آنالیز بررسی میزان اثربخشی داروها و مانیتورینگ داروها با روش Real-time PCR؛
- آنالیز بررسی هاپلوتایپینگ با روش Real-time PCR؛
- آنالیز بیان ژن با روش Real-Time PCR برای نمونه‌ها و بافت‌های جانوری؛

Real-time PCR یک روش رایج برای تشخیص و تعیین کمی پروفایل بیان ژن‌های مورد نظر است. این روش قادر به تشخیص محصولات در حین واکنش به کمک مولکول‌های گزارشگر فلورسنت است. آغازگرهای طراحی شده، روش‌های تشخیص فلورسنت و آنالیز صحیح داده‌ها از عوامل تاثیرگذار بر کارایی Real-time PCR هستند. حساسیت و انتخابگری بالا، سرعت و تکرارپذیری بالای این روش سبب کاربرد گسترده آن در علوم مختلف شده است.

پی‌نوشت

۱. دانشجوی دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی مشهد، آزمایشگاه بیوتکنولوژی
۲. دانشجوی دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳. دانشجوی دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، شرکت پارسیان بهینه پایش
۵. کارشناسی ارشد مهندسی ژنتیک، شرکت پارسیان بهینه پایش
۶. دکترای تخصصی نانوفناوری پزشکی، مرکز تحقیقات ریزفناوری زیستی، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی - ابن‌سینا
۷. عضو کارگروه تخصصی زیست‌فناوری
8. Polymerase chain reaction (PCR)
9. Primers
10. Real-time Polymerase Chain Reaction
11. Denaturation
12. Gel electrophoresis
13. Early exponential phase
14. Baseline phase
15. Exponential phase
16. Plateau
17. Fluorescent background
18. Cycle threshold (Ct)
19. Crossing point (CP)
20. Ethidium Bromide
21. SYBR® Green
22. SYBR® Gold
23. SYTO
24. BOXTO
25. BEBO
26. EvaGreen
27. Reporter
28. Quencher
29. Scorpion
30. LUX
31. Amplifluor
32. Angler
33. Cycloicon
34. TaqMan
35. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)
36. Molecular Beacon
37. HyBeacon
38. Single-Nucleotide Polymorphism (SNP)
39. Motif
40. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
41. National Center for Biotechnology Information (NCBI)
42. Forward
43. Reverse
44. Self annealing
45. OligoPerfect
46. Primer Express®
47. Baseline
48. Threshold
49. Absolute
50. Relative
51. Efficiency calibrated model
52. Personalized medicine
53. Varicella-zoster
54. Multiplex
55. Coronavirus
56. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
57. Feline immunodeficiency virus (FIV)
58. Short tandem repeats (STR)
59. Slot blot
60. Genetically modified organisms (GMO)

مراجع

- [1] R1. I. D. Rebrikov and D. Trofimov, Real-Time PCR: A Review of Approaches to Data Analysis, Applied Biochemistry and Microbiology, 42 (2006) 455-463.
- [2] P. Quan, M. Sauzade, E. Brouzes, dPCR: A Technology Review, Sensors, 18 (2018), 1-27.
- [3] K. Edwards, J. Logan, and N. Saunders, Real-time PCR: an Essential Guide, Emerging Infectious Diseases, 11 (2005) 185-186.
- [4] MA. Valasek and JJ. Repa, The power of real-time PCR, Advances in Physiology Education, 29 (2005) 151-159.
- [5] X. Qiu and J. Yuan, Temperature Control for PCR Thermocyclers Based on Peltier-Effect Thermoelectric, Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference Shanghai, China, (2005) 1-4.
- [6] B. Kaltenboeck, C. Wang, Advances in realtime PCR: application to clinical laboratory diagnostics. Advances in Clinical Chemistry, 40 (2005) 219-259.
- [7] W. Wang, K. Chen, C. Xu, DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument Analytical Biochemistry, 356 (2006) 303-305.
- [8] H. Gudnason, M. Dufva, DD .Bang, A .Wolff, Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. Nucleic Acids Research, 35 (2007) e127
- [9] M. Kubišta, Nucleic acid-based technologies: application amplified. Pharmacogenomics, 5 (2004) 767-773.
- [10] F. Mao, WY. Leung, X. Xin, Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications, BMC Biotechnology, 7 (2007) 76.
- [11] PT. Monis, S. Giglio, CP. Saint, Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis, Analytical Biochemistry, 340 (2005) 24-34.
- [12] H. Akiyama, F. Nakamura, C. Yamada, K. Nakamura, O. Nakajima, H. Kawakami, A screening method for the detection of the 35S promoter and the nopaline synthase terminator in genetically modified organisms in a real-time multiplex polymerase chain reaction using high-resolution melting curve analysis, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 32 (2009) 1824-1829.
- [13] YD. Li, ZZ. Chu, XG. Liu, HC. Jing, YG. Liu, DY. Hao, A cost-effective high- resolution melting approach using the EvaGreen dye for DNA polymorphism detection and genotyping in plants, Journal of Integrative Plant Biology, 52 (2010) 1036-1042.
- [14] L. Miotke, B. Lau, R. Rumma, H. Ji, High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR, Analytical Chemistry, 86 (2014) 2618-2624.
- [15] I. Nazarenko, S. Bhatnagar, R. Hohman, A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer, Nucleic Acids Research, 25 (1997) 2516-2521.
- [16] IA. Nazarenko, SK. Bhatnagar, RJ. Hohman, A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer, Nucleic Acids Research, 25 (1997) 2516-2521.
- [17] K. Ririe, R. Rasmussen, C. Wittwer, Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, Analytical Biochemistry, 245 (1997) 154-160.
- [18] I. Nazarenko, B. Lowe, M. Darfler, P. Ikonomi, D. Schuster, A. Rashtchian, Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore, Nucleic Acids Research, 30 (2002) e37.
- [19] M. Oberste, S. Peñaranda, S. Rogers, E. Henderson, WA. Nix, Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens., Journal of Clinical Virology, 49 (2010) 73-74.
- [20] L. Yan, P. Yan, J. Zhou, Q. Teng, Z. Li, Establishing a TaqMan-based real-time PCR assay for the rapid detection and quantification of the newly emerged duck Tembusu virus, Virology Journal, 8 (2011) 464.
- [21] M. Heller, L. Morrison, Chemiluminescent and fluorescent probes for DNA hybridization systems; Rapid detection and identification of infectious agents, 1st ed., Academic Press Inc, Orlando, FL (USA), 1985.
- [22] V. Didenko, DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications, Biotechniques, 31 (2001) 1106-1116.
- [23] P. Bernard, C. Wittwer, Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes, Clinical Chemistry, 46 (2000) 147-148.

- [24] E. Osińska, A. Golke, A. Słońska, J. Cymerys, M. Bańbura, T. Dzieciatkowski, HybProbesbased real time PCR assay for rapid detection of equine herpesvirus type 2 DNA, *Pol The Journal of Veterinary Science*, 15 (2012) 411-416.
- [25] B. Petersson, B. Nielsen, H. Rasmussen, IK. Larsen, M. Gajhede, PE. Nielsen, et al, Crystal structure of a partly self Complementary peptide nucleic acid (PNA) oligomer showing a duplex-triplex network, *The Journal of the American Chemical Society*, 127 (2005) 1424-1430.
- [26] M. Frieden, HF. Hansen, T. Koch, Nuclease stability of LNA oligonucleotides and LNADNA chimeras, *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids*, 22 (2003) 1041-1043.
- [27] H. Kaur, A. Arora, J. Wengel, S. Maiti, Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes, *Biochemistry*, 45 (2006) 7347-7355.
- [28] R1. Kalendar, D. Lee, AH. Schulman, Fast PCR software for PCR primer and probe design and repeat search, *Methods in Molecular Biology*, 1116 (2014) 271-302.
- [29] X. Wang and B. Seed, High-throughput primer and probe design, *Real-time PCR*, 1 (2006) 93-106.
- [30] C. Heid, J. Stevens, K. Livak, P. Williams, Real time quantitative PCR, *Genome Research*, 6 (1996) 986-994.
- [31] U. Gibson, C. Heid, P. Williams, A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Research*, 6 (1996) 995-1001.
- [32] J. Yuan, A. Reed, F. Chen, C. Stewart, Statistical analysis of real-time PCR data, *BMC Bioinformatics*, 7 (2006) 1-12.
- [33] M. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, 29 (2001), 2002-2007.
- [34] K. Livak, T. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods*, 25 (2001) 402-408.
- [35] J. Marino, P. Cook, K. Miller, Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR, *Journal of Immunology Methods*, 283 (2003) 291-306.
- [36] M. Najafi, How to Analyze Real Time qPCR Data? *Biochemistry and Physiology*, 2(2013) 1-2.
- [37] M. Wong and J. Medrano, Real-time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques*, 39 (2005) 75-85.
- [38] G. Severino, and M. Del Zompo, Adverse drug reactions: role of pharmacogenomics. *Pharmacolog*, 49 (2004), 363-373.
- [39] M.A. Alaoui-Jamali, and Y.J. Xu, Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7 (2006), 411-420.
- [40] J. Schmutzhard, H.M. Riedel, B.Z. Wirtgart, L. Grillner, Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *Journal of Clinical Virology*, 29 (2004), 120-126.
- [41] M. Ikeda, K. Imai, S. Tabata, K. Miyoshi, N. Murahara, T. Mizuno, M. Horiuchi, Clinical evaluation of self-collected saliva by RT-qPCR, direct RT-qPCR, RT-LAMP, and a rapid antigen test to diagnose COVID-19, *MedRxiv* (2020).
- [42] D.J. Blake, J. Graham, M. poss, Quantification of feline immunodeficiency virus (FIVpco) in peripheral blood mononuclear cells, lymph nodes and plasma of naturally infected cougars. *Journal of General Virology*, 87 (2006) 967-975.
- [43] T. Wada, S. Maeda, A. Tamaru, S. Imai, Hase, A. and Kobayashi, K. Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2004) 5277-5285.
- [44] M. Burkhard, E. Paccassoni, P. Fach, Cornelia Bunge, Annett Martin, and Reiner Helmuth. "Diagnostic real-time PCR for detection of Salmonella in food. *Applied and environmental microbiology*, 70 (2004) 7046-7052.
- [45] M.D. Timken, K.L. Swango, C. Orrego, M.R. Buoncristiani, A duplex real-time qPCR assay for the quantification of human nuclear and mitochondrial DNA in forensic samples: implications for quantifying DNA in degraded samples. *Journal of Forensic Sciences*. 50 (2005) 1044-1060.
- [46] P.G. Rieger, H.M. Meier, M. Gerle, U. Vogt, T. Groth, H.J. Knackmuss, Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence, *Journal of Biotechnology*, 94 (2002) 101-123.
- [47] M. Junichi, S. Hatano, Y. Nagatomi, S. Futo, R. Takabatake, K. Kitta. Highly sensitive GMO detection using real-time PCR with a large amount of DNA template: single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*, 101 (2018) 507-514.

Authors

Sare Hajiabadi^{1,7*}, Zahra Hosseininia²Zohre Montakhab Farahi³Sahar Davodi^{4,7}, Athar Amini^{5,7}Mohammad-Reza Nejadmoghaddam^{6,7}

*Hajiabadi.sa@gmail.com

1. PhD student of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran, Biotechnology Lab
2. PhD student of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad
3. PhD student of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad
4. M. Sc of Biotechnology, Parsian Behineh Payesh Company
5. M. Sc of Genetic Engineering, Parsian Behineh Payesh Company
6. PhD of Nanomedicine, Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran
7. Member of the specialized biotechnology working group

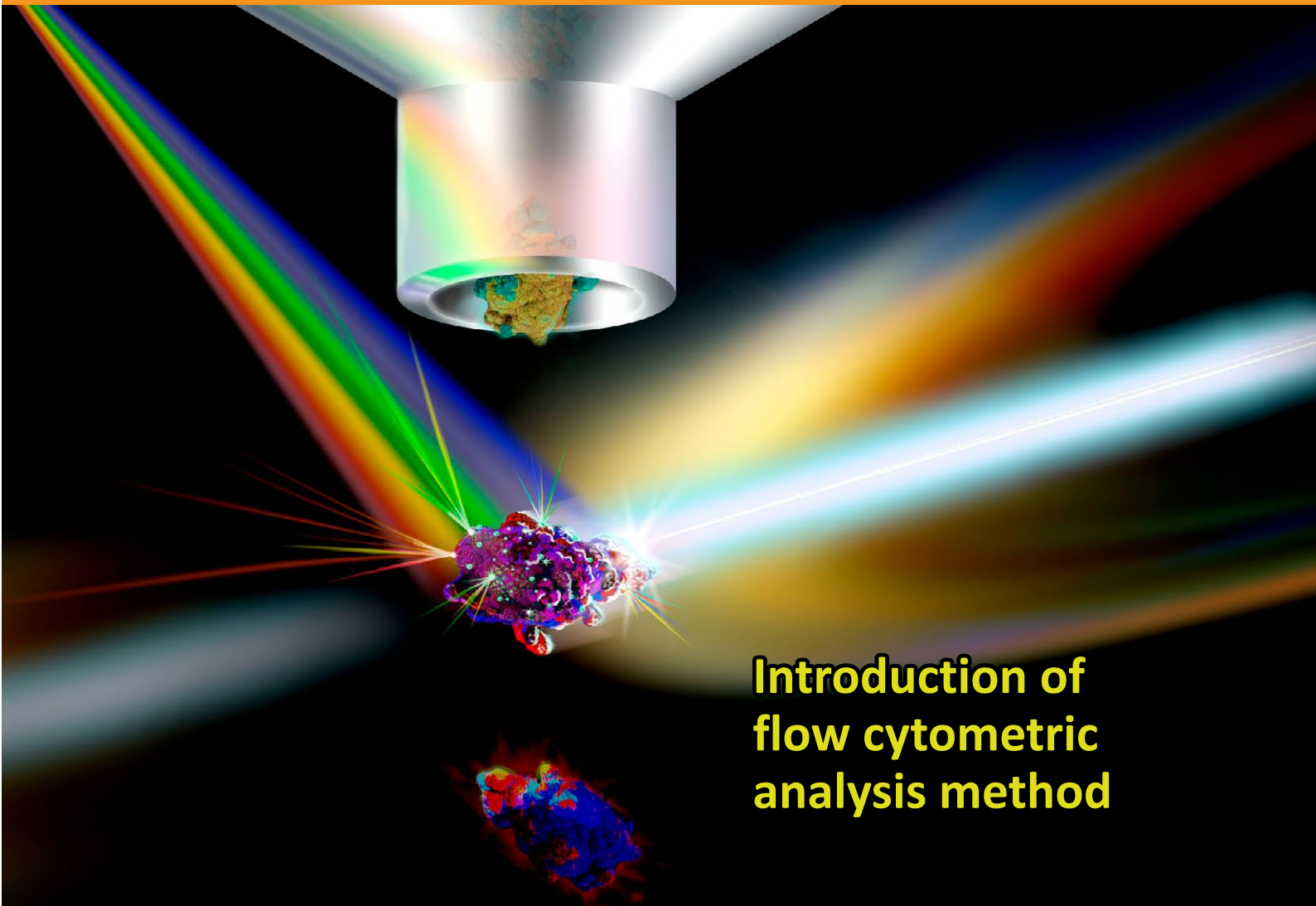
Introduction of Real-time PCR method

Abstract

Real-time PCR has become one of the most widely used methods of gene quantitation because it has a large dynamic range, excellent sensitivity and specificity, has little to no post-amplification processing. However, optimal benefit from these advantages requires a clear understanding of the many options available for running a real-time PCR experiment and its accurate application. Real-time PCR provides the amplification of a targeted DNA molecule and reports it using fluorescent reporter molecules during the amplification reaction. This review article discusses the principles of the real time reaction equipment utilized in the process, fluorescent detection systems, data analysis methods and several applications of this technique.

Keywords

Real-time PCR, fluorescent dyes, primer, probe, quantitative analysis



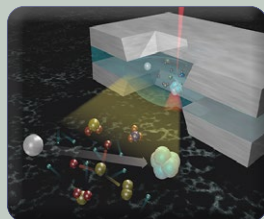
Introduction of flow cytometric analysis method



Introduction of Real-time
PCR method



Separation and identification of
essential oil and triglyceride fatty
acids in Teucricium polium plant
by gas chromatography mass
spectrometry method.



An introduction to In-situ
Environmental Transmission
Electron Microscopy equipped
with a liquid cell



Introduction to fretting fatigue
or fatigue-wear testing of
materials under bending cyclic
loading



New Applications of Nuclear
Magnetic Resonance