دکترمحمدجواد غروی، استاد انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
لادن وکیل، دانشجوی دکترای پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
مسعود شریف، کارشناس علوم آزمایشگاهی، آزمایشگاه مرکزی فردیس

مروری بر روش‌های کمی تشخیصی به روش Real –Time PCR

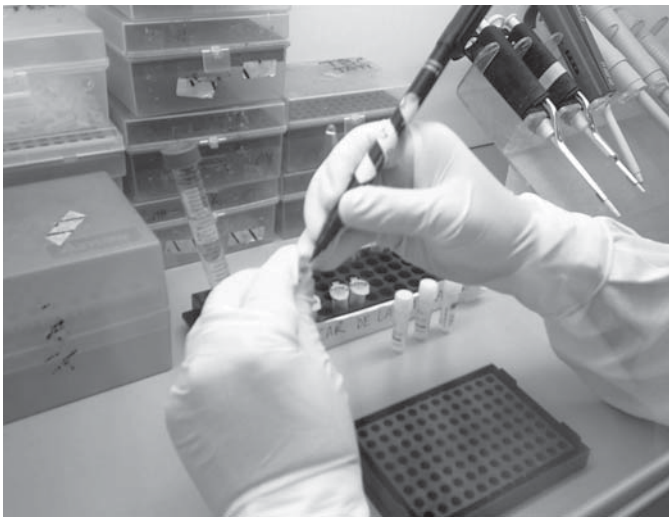
عوامل عفونی واگیر شایع ترین علل بیماری‌ها هستند. اگرچه امروزه واکسیناسیون به هنگام، به اندازه فراوان از دچار شدن به گونه ی وحشی این بیماری‌ها کاسته، اما همچنان در کسانی که از کاهش سیستم ایمنی رنج می‌برند، می‌تواند واکسیناسیون با شکست مواجه شود ونمونه‌هایی از دچار شدن به بیماری در واکسینه شده نیز دیده شود.

بیماری‌های عفونی محدود به دوران کودکی نبوده و در بسیاری از افراد سالخورده نیزدیده می‌شود که این امر خود از مصادیق مهم کنترل و مراقبت از سلامت در جامعه است.

به همین جهت سازمان بهداشت جهانی خواستار آن شده تا مراکز بهداشتی همه کشورها، پیشگیری از بیماری‌های عفونی و پایش سطح ایمنی جامعه را در اولویت‌های بهداشتی خود قراردهند.

به‌طور متداول آزمایش مورد درخواست برای تشخیص اکثر بیماری‌های عفونی تست‌های سرولوژیکی است. (۱)

تست الایزا بر اساس سنجش IgM آنتی بادی در نمونه‌های خون، بزاق دهان، سواب گلو، ادرار یا مدفوع درصورت افزایش چهار برابری تیتر IgG آنتی بادی سرمی در نمونه بیماران به عنوان مثبت تلقی می‌شود. این آنتی بادی‌ها متعاقب تحریک سیستم ایمنی و معمولا بعد از ظهور علائم کلینیک نظیر راش پوستی مثبت می‌شوند و چنانچه بخواهیم ردیابی و تشخیص سریع‌تر صورت گیرد، باید از تکنیکی استفاده شود



که بتواند حضور DNA، RNA عامل عفونی را در نمونه تایید کند. [۲، ۳]

اگر چه روش آنزیم ایمنو اسی جهت تشخیص آنتی بادی IgM در فاز حاد سرمی به عنوان یکی ازشایع ترین متدهای آزمایشگاهی برای تایید عوامل عفونی از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است اما به لحاظ عدم جمع آوری نمونه‌های بالینی درزمان مناسب و یاحضور IgM آنتی بادی ناشی از دیگرعوامل بیماری‌زای، نتایج منفی کاذب و نتایج مثبت کاذب را منجر می شود که این خود لزوم راه اندازی روش‌های تشخیصی بر اساس ردیابی DNA، RNA عوامل عفونی مانند روش بسیار حساس RealTimePCR رابرای شناسایی سریع و اختصاصی و و تائید آزمایشگاهی موارد اسپورادیک و نتایج سرولوژیکی متناقض و غیر قطعی به عنوان یک روش جایگزین بیان می‌کند.[۲]

در این روش پیشرفته در مواقع احتمال شیوع بیماری تکثیر و توالی یابی ژن وبررسی ژنوتایپ سویه در نمونه و حتی بررسی کمی نمونه امکان پذیر می‌شود و این روش سریع و حساس برای کنترل آلودگی و جلوگیری از شیوع منطقه ای خصوصا در بین کودکان وافراد دارای نقص ایمنی کاربرد وسیعی دارد.

روش Real Time PCR

روش نوین Real– Time PCR در موارد احتمال شیوع بیماری، پس از جمع آوری نمونه برای تشخیص ژنوم تنها یک روز کاری زمان نیاز دارد. [۳] حتی در بسیاری از مراکز بهداشتی –تحقیقاتی روش‌هایی نظیر Nested PCR (آشیانه ای) که در سطح وسیع و به طور روزمره

در تشخیص نمونه‌های مختلف کلینیکی در کمترین زمان کاری صورت می گیرد در مقایسه با روش Real- Time PCR زمان بر هستند.[۳]

از ویژگی‌های بسیار مهم روش Real-Time PCR این است که در مقایسه با RT-PCR مرسوم، حساس‌تر، آسان تر و سریع‌تر بوده و از تکرارپذیری بسیار بالاتری برخورداراست و بنابراین تجزیه وتحلیل نتایج آن نیز بسیار معتبر است. [۱ ، ۲ ، ٦]

امروزه اهمیت رعایت استانداردهای کنترل کیفی تولید واکسن و لزوم تولید واکسن کارآمد و نیز پایش سطح ایمنی جمعیت واکسینه شده برای حصول اطمینان از کارایی قابل قبول واکسیناسیون صورت گرفته از اولویت‌های موسسات تحقیقاتی و تولیدی به‌شمار می‌آید.

در حال حاضر Plaque assay وCCID ۵۰ روش‌های گلد استاندارد برای تعیین قدرت (potency) و کمیت سنجی پارتیکل عفونی در واکسن‌های زنده ویروسی است. این تیتراسیون براساس مشاهده اثر سیتو پاتیک ویروس (CPE) و وابسته به سویه ویروسی و نوع کشت سلول اینCPE متغیراست به همین دلیل تفسیر نتایج آن بسته به متغیرهای موجود در هر آزمایشگاه مانند شخص انجام دهنده و نوع کشت سلول متفاوت بوده و زمان بر بودن و دشواری‌های تکنیکی از محدودیت‌های مهم این روش‌ها است.[٦،۵]

در مطالعات انجام گرفته میانگین تغییر پذیری CV تخمین توان واکسن با استفاده از روش‌های متداول در هر واکسن حدود log۱۰ ۲-۱ و حداقل زمان لازم برای انجام روش پلاگ و روش CCID۵۰، نه روز گزارش شده است که یک مشکل بزرگ برای کنترل کیفی واکسن زنده ویروسی به‌شمار می‌رود.[۵]

به همین جهت در برخی از موسسات، روش Real-Time PCR در کمیت سنجی وتخمین قدرت واکسن زنده ویروسی مانند ویروس سرخک وروتا ویروس انسانی ونیز ارزیابی غیرفعال سازی موفق عوامل عفونی در فرآوری محصولات دارویی مورد استفاده قرارگرفته است.

در مقایسه این روش نسبت به دیگرروش‌های متداول، تیتراسیون نمونه واکسن از دقت وصحت یکسان اما در عین حال سریع‌تر و آسان تر و حساس تر بوده است.

Real-Time PCR با استفاده از دو تکنیک Taqmanو SYBR Green امکان پذیر است.

دو تکنیک Taqmanو SYBR Green در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است اما Taqmanدر مقایسه با SYBR Green از حساسیت، اختصاصیت وتکرار پذیری بیشتری برخوردار است و این حساسیت و اختصاصیت متفاوت مربوط به استفاده از الیگو نوکلئوتید سوم دیگری است که با رنگ فلور سنت نشاندار شده است.[۷]

مزایای Sybr Green Real Time PCR

- کوتاه تر شدن زمان دسترسی به نتایج
- افزایش دامنه کمیت سنجی وعدم نیاز به مراحل آنالیز بعد PCR
- ابزارهای متعدد آنالیز مانند نمودار تکثیر، نمودار اجزای واکنش ومنحنی ذوب، درتعیین سایز کلیه قطعات تکثیر شده در واکنش می‌تواند تکثیراحتمالی قطعات غیر اختصاصی مانند پرایمر دایمر را مشخص نماید و تفسیر سیگنال مربوط به کنترل منفی روی نمودار تکثیر و منحنی ذوب بسیار آسان است.

همچنین آنالیز بیان ژن با نسخه برداری معکوس از mRNA با استفاده از تکنیک سایبر گرین امکان پذیراست و به طور کلی نسبت به روش PCR مرسوم حساس تر و دقیق تر است. [۷، ٦]

تکنیک سایبرگرین به طور روتین می‌تواند جایگزین بسیار خوب روش نسبتا پرهزینه Taqman نیز باشد اما گمان می‌رود نسبت به تکنولوژی Taqman که از پرایمر وپروب نشاندار شده با فلورسنت استفاده می‌کند ازحساسیت کمتری برخورداراست .[٤]

در PCR معمولی شدت باند محصولات برروی ژل آگارز با میزان اولیه رشته الگو متناسب نبوده و تصاویر ژل، گویای میزان واقعی رشته الگو و قابل اطمینان نیست. یکی از دقیق ترین روش‌ها برای تعیین میزان اولیه رشته الگودر نمونه واکنش ۳′ → ۵′ اگزو نوکلئازی آنزیم Taq DNA polymerase در تکنیک Taqman است.

در این تکنیک الیگو نوکلئوتید دو سر نشاندار شده با فلور سنت(پروب) در بین دو پرایمر قرار گرفته و با پیشرفت PCR فعالیت ۵′ اگزو نوکلئازی آنزیم Taq

انتهای ´۵ پروب جدا و به محض برداشته شدن اثر مهاری Quencher شروع به تشعشع می نماید که این تشعشع با میزان الگوی DNA تناسب داشته و به این معنا است که مقداربالای DNA نمونه، تکثیر سریع تر و بیشتر داشته وشدت تشعشع فلورسانس هم سریعا توسط دستگاه ثبت شده و بر عکس اگر شدت تشعشع فلورسانس دیرتر توسط دستگاه ثبت شود نشان دهنده مقدار کم DNA در نمونه است. [۷ و۸]، بسیاری از مطالعات حساسیت بالای روش Taqman را برای تشخیص و تعیین کمی سریع و صحیح و کنترل کیفی واکسن‌های زنده ویروسی مورد تایید قرار داده اند.

در روش Real-Time PCR می‌توان مستقیما RNA ژنومی را به عنوان الگو مورد استفاده قرار داد و در یک تیوب واکنش نسخه برداری معکوس و تکثیر DNA دو رشته ای را به‌طور هم‌زمان انجام داد (One Step) یا ابتدا از RNA ژنومی cDNA تهیه و سپس در تیوب جداگانه cDNA را به DNA دو رشته ای مبدل کرد (Two Step). [۷]

روش One Step RT-Real Time PCR بااستفاده از پرایمرهای یکسان در مقایسه با PCR معمولی حساس تر و تعیین محدوده تشخیص به روش RT-Real Time PCR یک مرحله ای در مقایسه با RT-PCR استاندارد از اختصاصی و تکرار پذیری بالاتری برخوردار است اما برای نمونه با تعداد پارتیکل کم مناسب نیست. [٦]

یکی از روش‌های معمول برای جداسازی قطعات RNA ژنومی و ساخت cDNA استفاده از Hexamer primer Random یاOligo dT است که در مرحله دوم با پرایمرهای اختصاصی از cDNA ژنومی DNA دو رشته ای تهیه می‌شود. از محاسن این روش اینست که روش Two Step به واسطه سنتز cDNAاز RNA ژنومی برای بررسی ژنوتایپ نمونه‌های ار سالی به آزمایشگاه مرجع جهت تشخیص افتراقی بیماری های مشابهی که علایم کلینیکی یکسانی ایجاد می‌کنند روش سریع، حساس، معتبر است. روش Two Step Real Time PCR حساس تر از Nested PCR و الایزا است وجهت شناسایی موارد عود عفونت نیز روش Two Step کارآمد تر است.

حساسیت تست به روش Two Step و ساخت cDNA در مقایسه با روش One Step حساسیت بالاتری داشته که این بررسی با مطالعه ای که بر روی استرو ویروس‌ها صورت گرفته وروش Two Step RT-Real Time PCR را در مقایسه با One Step RT-Real Time PCR بسیار حساس تر می‌داند انجام گرفته است . [۳]

منبع نوری تنگستن هالوژن کوارتز که شایع‌ترین منبع نوری در این دستگاه است و طیف طول موج برانگیختگی (٤٥٠-nm٦٥٠) وطیف طول موج تشعشع (nm ٧٠٠-٥٠٠) آن با ویژگی رنگ FAM-٦ متناسب تراست. FAM-٦ از شایع‌ترین رنگ‌های مورد استفاده در تکنیک Real -TimePCR است که درطول موج nm ٥١٨ تشعشع می‌نماید، این بیم توسط این منبع نوری تامین می‌شود. به‌علاوه رنگ FAM-٦ به راحتی به الیگونوکلئوتید پروب متصل می‌شود و سیگنال بسیار قوی از خود تشعشع می‌کند واز حساسیت بالایی برخورداراست در مقابل رنگ مهار گر از انواع رنگ‌های سیاه (BHQ) است که طول موج برانگیختیnm ٦٨٠-٤٣٥ آن نزدیک به طول موج برانگیختگی FAM-٦ است و می‌تواند به شدت آن را مهارکند. این قدرت مهاری بالا با افزایش حساسیت تست همراه خواهد بود. این طول موج‌ها با طول موج ROX (٦- کربوکسی رودامین) از شایع‌ترین رنگ مرجع غیر فعال که به‌عنوان کنترل داخلی تست که در طیف قرمز از خود نور ساطع می‌کند تداخلی نداشته و از حساسیت تست نمی‌کاهد.

تفاوت حساسیت بین روش PCR معمولی و Real-Time PCR می‌تواند ناشی از منبع نور تنگستن هالوژن دستگاه که باعث تحریک قوی این رنگ ودر نتیجه پرتو افشانی و تشعشع قوی فلورسانس در مقایسه با دستگاه PCR معمولی که فاقد منبع نور تنگستن است مرتبط باشد، از طرفی نحوه آشکار سازی نمونه حاوی سایبرگرین در PCR معمولی برروی ژل آگارز می‌تواند در شدت باندهای آن موثر بوده و نحوه ساختار شیمیایی ژل آگارز و طول موج تحریکی دستگاه UV-Transilluminatorو حتی دقت چشم محقق ونیز تفاوت دقت دستگاه‌های Gel documentation می‌تواند از دیگر عوامل موثر در تفاوت حساسیت روش PCR معمولی و Real-Time PCR باشد. [۷]

با توجه به این که q RT-Real Time PCR یک تکنیک بسیار قوی است اما به‌علت اینکه گزارش نتایج آن براساس استناد به کالیبراتور ژن‌های غیر استاندارد است که اغلب آن‌ها ممکن است دراثر دستکاری‌های تجربی در آزمایشگاه تغییر کنند. [۸]

اکثرا برای تفسیر با مشکلاتی همراه است و ممکن است که نتایج آزمایشگاه های مختلف بیش از هزار مرتبه با یکدیگر تفاوت نشان دهند. بنابراین چنانچه گزارش نتایج با تعیین دقیق حساسیت روش صورت نگیرد، یافته‌های مثبت و منفی همگی مشکوک و سوال برانگیز خواهند بود و به همین دلیل کلیه متدهای q RT-PCR اختصاصی، به تهیه کالیبراتور استاندارد و معتبر سازی براساس اسید نوکلئیک نیازمند است.[٤]

به نظر می‌رسد یکی از متدهای بسیاردقیق برای کمیت سنجی مطلقRNA ژنوم، استفاده از منحنی استاندارد بر اساس پلاسمید حاوی cDNA است که با استفاده از فلورسانس رنگ نشانکردر مقدار cDNA نمونه را در مقایسه با فلور سانس نمونه استاندارد پلاسمیدی شمارش می‌کند. در این متد cDNA را درون پلاسمید کلون کرده و سپس به‌عنوان نمونه استاندارد برای کالیبراسیون نمونه مجهول مورداستفاده قرار داده و نتایج خود را به‌صورت cDNA تعداد نسخه در میکروگرم کپی نامبر گزارش می‌کند.

اگر چه یکی ازشایع‌ترین نمونه کالیبراتور خارجی برای کالیبراسیون تست در کمیت سنجی ژن‌های House Keeping هستند اما هنور اشکالات مهمی در استفاده از این سیستم وجود دارد اغلب این ژن‌ها کاملا ثابت نبوده وممکن است طی چرخه سلولی و جابجایی تغییرات مختصری داشته باشند.[۸]

برای سنتز cDNA به طور ایده آل از یک مجموعه یکسان استفاده می‌شود تا از هرگونه تغییرات ناشی از تفاوت در کارایی نسخه برداری ژن هدف وژن مرجع جلوگیری شود اما چون این امر در نمونه هایی که در فاصله‌های زمانی متفاوت جمع آوری می‌شوند امکان پذیر نیست به نظر می‌رسد یک جایگزین مطمئن برای استاندارد داخلی، استفاده از نمونه استاندارد به فرم پلاسمید حاوی ژن هدف است که بامقدار معلوم پلاسمید حاوی ژن می‌توان منحنی کالیبراسیون رسم کرده و سپس نمونه‌های مجهول را در مقایسه با این منحنی، کمیت سنجی کرد. این نتایج به صورت کمیت سنجی مطلق و به صورت تعداد کپی ژن هدف گزارش می‌شود. البته این متد هم مانند متدهای دیگر مشکلاتی دارد چون این کمیت سنجی مطلق باید بر پایه ساخت نمونه استاندارد معتبر و دقیق تکیه داشته باشد. به هر حال این تکنیک یعنی استفاده از پلاسمید حاوی ژن هدف برای رسم منحنی استاندارد بر بسیاری از ایرادهای وارد به نتایج Real-Time PCR فائق آمده و به نظر می رسد می‌تواند به‌عنوان یک تکنیک ساده و روزمره در بسیاری از موارد که باید چندین نمونه با دقت بالا با هم مقایسه شوند به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار بگیرد.[۸]

البته در بسیاری از موارد نیز با نسخه برداری ازRNA و همسانه سازی (کلونینگ) درون پلاسمید و تهیه منحنی استاندارد از RNA استاندارد سنتتیک به‌عنوان مرجع کمیت سنجی استفاده شده است.[۹،۵،۲]

می‌توان با تعیین و تایید درجه خلوص پلاسمید حاویcDNA، DNA ، RNA ژنومی و به وسیله نانودراپ تهیه رقت‌های ده تایی متوالی از آن به‌عنوان نمونه کالیبراتور برای رسم منحنی و استاندارد کمیت سنجی به روش SYBR Green وTaqman استفاده کرد و به‌صورت کپی نامبر گزارش کرد. البته در مواردی نیز دامنه خطای تخمین تعداد کپی cDNA نمونه نسبت به دامنه خطای تخمین تعداد کپی RNA همان نمونه کاهش وجود دارد. [٤]

دراین صورت دو فرض لحاظ شده است:

- بازده سنتز cDNA در واکنش نسخه برداری معکوس با پرایمرهای اختصاصی ۱۰۰٪ باشد.
- بازده تکثیر cDNA و تکثیرDNA پلاسمیداستاندارد در یک لوله و به‌طور هم‌زمان یکسان در نظر گرفته شود.

اگر چه با این متد حتی مقادیر بسیار کم RNA قابل تخمین است اما چون بازده ۱۰۰٪ برای سنتز cDNA امکان پذیر نیست به‌نظر می‌رسد DNA پلاسمید تخلیص شده در شرایط تکثیر بسیار کارامد تر از نمونه‌های cDNA است. [٦]

تخلیص RNA

یکی از مهم‌ترین مراحل استفاده از RNA نمونه ها و جداسازی و تخلیص دقیق آن است. تخلیص RNA باید با دقت بالایی صورت بگیرد تا DNA سلولی و پروتئین‌های متصل شونده به RNA به حداقل ممکن برسد زیرا این پروتئین‌ها شایع‌ترین پروتئین‌هایی هستند که در پروسه تخلیص اسید نوکلئیک باقی می‌مانند و می‌توانند مانع از انجام موفق واکنش نسخه برداری معکوس شوند. امروزه استفاده از کیت‌های تجاری در مقایسه با روش‌های دستی از دقت بیشتری برخوردار بوده و کاهش خطرآلودگی و کوتاه تر بودن زمان و راحتی روش از مزایای کیت‌های تجاری به شمار می‌رود.[۷]

استفاده از هگزامر پرایمر یکی از روش‌های معمول برای ساخت قطعات ژنومی cDNA است، هگزامر پرایمر به هر مکانی از توالی ژنوم متصل شده وچون جهت نسخه برداری آن به سمت ´۵ است، یک گرادیان از توالی را با بالاترین مقدار cDNA از ناحیه ´۵ نسخه خواهیم داشت بنابراین اگرهرچه توالی هدف برای نسخه برداری از نزدیک‌ترین موقعیت به انتهای ´۵ ژنوم انتخاب شود حساسیت روش بیشتر می‌شود.[۳، ۷، ۹]

به هرحال استفاده از هگزامر پرایمر و ساخت cDNA و تبدیل آن به DNA دو رشته‌ای به‌وسیله پرایمرهای اختصاصی و همسانه سازی (کلونینگ) در درون پلاسمید مانند pTZ۵۷R/T و پس از تخلیص پلاسمید با حداکثر خلوص لازم می‌توان براساس فرمول کپی نامبر، تعدادکپی ژن هدف را دقیقا محاسبه کرد و سپس از پلاسمید حاوی ژن، رقت‌های متوالی ده تایی تهیه و با پرایمرهای اختصاصی و بادرنظر گرفتن کلیه پارامترهای کیفی لازم برای رسم یک منحنی استاندارد دقیق، منحنی استاندارد تهیه و به‌عنوان مرجع کمیت سنجی در هر دو روش Taqmanو SYBR Green استفاده کرد.

پارامترهای اصلی در Real Time PCR

پارامترها کیفی منحنی استاندارد براساس مقالات و کتاب به طور دقیق اپتیمایز شده است:

منحنی استاندارد از دو پارامتر Ct نمونه در هر سیکل در مقابل لگاریتم رقت‌های متوالی ده مرتبه‌ای اسید نوکلئیک هدف (پلاسمید+ژن هدف) به‌دست می‌آید. از اتصال نقطه تقاطع این دو پارامتر به یکدیگر شیب خطی Slope رسم می‌شود که نشان‌دهنده کارایی واکنش PCR انجام شده است. محدوده نرمال برای این شیب ٪۱۰±۳/۳- است.

کارایی واکنش از فرمول E=[۱۰ (-۱/slope)]-۱ محاسبه می‌شود که E باید ٪۱۰۰-۹۰ باشد واین پارامتر نشاندهنده آن است که در هر سیکل آمپلیکون هدف دو برابرشده که با توجه به فرمول این کارایی با شیب خطی (slope) نیز مرتبط است.

سایز طول آمپلیکون، وجود مهار کننده‌های احتمالی در واکنش و ساختارهای ثانویه پلاسمید و پرایمرها و پروب با کارایی واکنش نیز رابطه مستقیمی دارند و تحقیقات نشان می‌دهد غلظت مناسب پروب وپرایمرها در حساسیت و اختصاصیت تست موثرند. سایز بزرگ آمپلیکون، وجود مهارکننده PCR و ساختار ثانویه پلاسمید غیر خطی هر یک می‌تواند کارایی واکنش را کاهش دهد. مثلا چنانچه پلاسمید غیر خطی در محیط محلول به شکل سوپر کویل در آمده و به‌طور صد در صد در دسترس آنزیم وپرایمرها قرار نگیرد، علی رغم طراحی مناسب پرایمرها و پروب، کارایی واکنش صد درصد نخواهد بود. سایز آمپلیکون که معمولا برای روش Real-TimePCR (کمتر از bp۲۰۰) توصیه نمی‌شود زیرا فرضیه رابطه سایز کوتاه تر آمپلیکون با افزایش حساسیت واکنش عملا تایید شده است.[۷]

پارامترE (کارایی) بالا نشاندهنده انتخاب مناسب سایز آمپلیکون‌ها و عدم وجود مهارکننده احتمالی و دسترسی کامل عوامل واکنش به پلاسمید حاوی ژن است و به علاوه اینکه دمای مناسب واسرشتگی پلاسمید و دمای مناسب اتصال پرایمرها وپروب بطور بسیار دقیق اپتیمایز شده است.

پارامتر مهم دیگر یعنی ضریب R۲ یا ضریب ار تباط در یک منحنی استاندارد ایده ال باید ۰/۹۹-۱ باشد. ضریب ار تباط R۲ نشان‌دهنده چگونگی انجام واکنش PCRدر یک چاهک و گویای میزان دقت تهیه رقت‌های متوالی ده تایی و پایپتینگ مواد درون چاهک‌ها است.

پارامتر دیگر y-intercept است. این گزینه نشان دهنده حساسیت روش و دقت کمیت سنجی است. اگر در نظر بگیریم

محدوده تشخیص نمونه فاقد ۱۰۱۱-۱۰۱۰ FAM باشد در کارایی صدرصد واکنش PCR، می توان یک کپی از نمونه را در بین سیکل‌های ۳۷-۳۳ تشخیص داد. بنابراین در یک بررسی قابل قبول و معتبر Slope=-۳/۳ برابر با کارایی ۱۰۰٪ و y=۳۳-۳۷ و ضریب ارتباط R۲=۱ است. چنانچه y بالای ۳۷ و پائین ۳۳ باشد نشان‌دهنده آن است که کمیت نمونه صحیح تعیین نشده و چنانچه خیلی بالا باشد به معنای تخریب نمونه در اثر ذوب یا فریز شدن متوالی و یا عدم وجود نمونه و یا نگهداری نمونه با غلظت‌های پائین بدون نگهدارنده است.

سیستم آشکار کننده سایبرگرین به عنوان ساده ترین و شایع ترین و با صرفه ترین روش بر اساس توانایی در اتصال به شکاف کوچک DNA دو رشته ای و متعاقب آن افزایش فلورسانس تا ۲۰۰۰ برابر مقدار آزاد اولیه است. در این روش فقط نیاز است پرایمرها اپتیمایز شوند و به صورت یک مکانیسم عمومی برای بررسی هر ژن قابل استفاده است. اماچون این ماده به طور غیر اختصاصی با هر DNA دو رشته ای اعم از محصول اصلی یا پرایمر دایمر یا محصول غیر اختصاصی توانایی اتصال دارد لذا طراحی بسیار دقیق پرایمرها یک امر ضروری است.

Eva green از انواع دیگر رنگ‌های آزاد متصل شونده به DNA دو رشته ای است اما به‌علت این که گزارش شده تا حدودی باعث مهار واکنش PCR و در نتیجه کاهش کارایی آن می‌شود. نسبت به سایبرگرین در دمای بالا پایداری آن کم و فلورسانس آن ضعیف تر است و همچنین گران تر از سایبرگرین است، الگوی Curve Melting واکنش، به طور مشخصی منحنی پرایمر دایمر از قطعه هدف قابل تفکیک است که می‌تواند در اپتیمایز نمودن واکنش برای قطعات دیگر راهنما باشد. در موارد لزوم و در دسترس نبودن روش Taqman روش SYBR Green که روشی کم هزینه تر و در دسترس تر است می‌تواند با دقت وصحت بسیار بالا جهت بررسی، مورد استفاده قرار گرفته ونتایج آن مانند روش Taqman کاملا معتبرو قابل گزارش است. البته صرف نظر از هزینه بر بودن روش Taqman، به لحاظ رعایت نکات ایمنی- زیستی برای کاربر و محیط زیست، که دارای خواص موتاژنیک مانند اتیدیوم بروماید است ، روش Taqman نسبت به SYBR Green ارجح است.[۷]

راه حل اصلی مشکل پرایمر دایمر آنالیز منحنی ذوب(Melting curve) در روش Real-Time PCR است. منحنی ذوب پس از پایان واکنش PCR در یک مرحله جداگانه بر اساس تغییرات سریع دمایی وذوب DNA دو رشته ای رسم می‌شودTm . که در آن نیمی از DNA دو رشته‌ای مبدل به DNA تک رشته‌ای می‌شوند و خود Tm به طول توالی و محتوای GC قطعه بستگی دارد و هنگامی که DNA دو رشته ای که سایبرگرین به آن متصل است در معرض دمای بالا قرار می‌گیرد کاهش ناگهانی رنگ فلورسانس که ناشی از واسرشتگی رشته DNA و رهایی رنگ سایبرگرین است به‌صورت یک منحنی ذوب یا Peak رسم می‌شود.

معمولا اولین پیک مربوط به کنترل منفی و پیک دوم مربوط به DNA دو رشته ای آمپلیکون هدف است. از این منحنی برای تعیین پرایمر دایمر جهت اپتیمایز کردن واکنش و اطمینان از عدم حضور احتمالی رشته‌های غیر اختصاصی استفاده می‌شود.

برای ارزیابی خطی بودن (linearity) روش Real-Time PCR رقت‌های ده مرتبه‌ای از پلاسمید حاوی ژن ، به طور مثال رقت های ۱۰-۹-۱۰-۱ را در هردو تکنیک Taqman و SYBR Green آزمایش می‌کنند. توان تشخیص حداقل کپی ژن در هر میکرولیتر Limitation of Detection (LoD) است.

- ضریب تغییرات در یک واکنش (Intra-assay varrability)
- ضریب تغییرات در بین چندین واکنش (Inter-assay variability)

Inter & Intra-assay variability برحسب Ct value محاسبه می شود.

ضریب تغییرات CV یک واکنش (Intra-assay variability) که از تقسیم انحراف استاندارد بر میانگین ارزش Ct برای نمونه در هر تست جداگانه به‌دست می‌آید.

سایر امتیازات

از دیگر ویژگی‌های بسیار مهم روش Real-Time PCR این است که در مقایسه با RT-PCR استاندارد، حساس تر ،آسان تر و سریع تر بوده و از تکرارپذیری بسیار بالاتری برخوردار است. بنابراین تجزیه وتحلیل نتایج آن نیز بسیار معتبر تر است. [۱ ، ۲ ، ٦]

از مزیت‌های مهم این روش قابلیت کمیت سنجی اسید نوکلئیک در غلظت‌های پائین، کمیت سنجی پاتوژن‌ها، آنالیز بیان ژن و تشخیص آسیب DNA و تضمین کیفیت و کنترل کیفی محصولات بیو لوژیکی با استفاده از تکنیک‌های متعدد است. همچنین کاهش نتایج مثبت کاذب به دلیل عدم نیاز به فرآیندهای آنالیزی بعدPCR، احتمال پائین آلودگی متقاطع، امکان نمونه گذاری در مقیاس وسیع وامکان غربالگری در فاز اپیدمیک در یک زمان کوتاه برای مدیریت بیماران و تشخیص تاییدی موارد نیازمند به ایمونوگلوبولین یا کنترل افراد در معرض خطر آلودگی و جلوگیری از شیوع منطقه‌ای بسیار سودمند است.[۳] به‌علاوه می‌توان پیامدهای وخیم ناشی از عفونت و موارد مشکوک به بیماری ناشی از واکسیناسیون ناموفق را به کمک Real-Time PCR شناسایی کرده وحتی درمطالعات تحقیقی رابطه کمیت عامل عفونی را با پاتوژنز و شیوع بیماری در جمعیت حساس ارزیابی کرد. [۲، ٤، ٥، ٦] روش Real Time PCR می‌تواند جایگزین روش‌های زمان‌بر، سخت وکم بازده متداول شود و سرعت و توانایی شمارش از ویژگی مهم برای بررسی پاتوژنز وطراحی دارو است. [۱۰]

منابع

[1]. H.S. El Mubarakab، R.L. De Swarta، A.D.M.E. Osterhausa، M. Schuttena; Development of a semi-quantitative real-time RT-PCR for the detection of measles virus;Journal of clinical virology 317-313(2005)32

[2]. Kimberly B. Hummel، Luis Lowe، William J. Bellini، Paul A. Rota ; Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens; Journal of Virological Methods 173–166 (2006) 132

[3]. Brenda Thomas، Stuart Beard، Li Jin، Kevin E. Brown، * and David W.G. Brown; Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Rapid Identification and Semi-Quantitation of Measles Virus ;Journal of Medical Virology 1592–79:1587 2007))

[4]. S´ebastien Plumet، Denis Gerlier ; Optimized SYBR green real-time PCR assay to quantify the absolute copy number of measles virus RNAs using gene specific primers; Journal of Virological Methods 87–79 (2005) 128

[5]. Johanna A.C. Schalk، Christa van den Elzen، Hans Ovelgönne،

Chantal Baas، Peter M.J.M. Jongen; Estimation of the number of infectious measles viruses in live virus vaccines using quantitative real-time PCR; Journal of Virological Methods 117 187–179 (2004)

[6]. Bok-Soon Mina، b، Yoon-Ju Noha، Jin-Ho Shin c، Sun-Young Baeka، Kyung-Il Mina،Seung-Rel Ryua،Byoung-Guk Kima، Mi-Kyung Park a، Seung-Eun Choi a، Eun-Hee Yang a، Sue-Nie Park a، Sook-Jin Hura، Byung-Yoon Ahnb، Assessment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus; Journal of Virological Methods 286–280 (2006) 137

[7]. M. Tevfik Dorak P. (2007). Real- Time PCR . Advanced Methods ISBN -7734-4153-0X & ISBN -0-978: 13 77348-4153

[8]. Joseph A.Whelan Nick B Russell Michael A Whelan; A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR;Journa of Immuunological Methods269-261(2003)278

[9]. Miho Akiyama، Hirokazu Kimura، Hiroyuki Tsukagoshi، Katsuya Taira، Katsumi Mizuta، Mika Saitoh، Manami Nagano، Asuka Sutoh، Masahiro Noda، Yukio Morita، Osamu Sakatsume، Nobuhiko Okabe1 and Masato Tashiro6; Development of an assay for the detection and quantification of the measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcriptase PCR; Journal of Medical Microbiology (643–638 ،58 ،(2009

سایر منابع را در وب سایت ماهنامه می توان دید