

مروری بر روش‌های کمی تشخیصی به روش Real-Time PCR



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 از شایع ترین متدهای آزمایشگاهی برای تایید عوامل عفونی از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است اما به لحاظ عدم جمع آوری نمونه‌های بالینی در زمان مناسب و یا حضور IgM آنتی بادی ناشی از دیگر عوامل بیماری‌زای، نتایج منفی کاذب و نتایج مثبت کاذب را منجر می‌شود که این خود لزوم راه اندازی روش‌های تشخیصی بر اساس ردیابی DNA، RNA عوامل عفونی مانند روش بسیار حساس RealTimePCR را برای شناسایی سریع و اختصاصی و و تأیید 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 و بررسی 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 خصوصاً در بین کودکان و افراد 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 (آشیا نه ای) که در سطح وسیع و به طور روزمره

عوامل عفونی واگیر شایع ترین علل بیماری‌ها هستند. اگر چه 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 و نمونه‌هایی از دچار شدن به بیماری‌های عفونی محدود به دوران کودکی نبوده و در بسیاری از افراد سالخورده نیز دیده 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 قرار دهند.

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 در صورت افزایش چهار برابری تیتراژ IgG آنتی بادی سرمی در نمونه بیماران به عنوان مثبت تلقی می‌شود. این آنتی بادی‌ها متعاقب تحریک سیستم ایمنی و معمولاً بعد از ظهور علائم کلینیک نظیر راش پوستی مثبت می‌شوند و چنانچه بخواهیم ردیابی و تشخیص سریع‌تر صورت گیرد، باید از تکنیکی استفاده شود

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 و منحنی ذوب، در تعیین سائز کلیه قطعات تکثیر شده در واکنش می تواند تکثیر احتمالی 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 پذیر است و به طور کلی نسبت به روش PCR مرسوم حساس تر و دقیق تر است. [۶،۷]

تکنیک سایبرگرین به طور روتین می تواند جایگزین بسیار خوب روش نسبتاً پرهزینه Taqman نیز باشد اما گمان می رود نسبت به تکنولوژی Taqman که از پرایمر و پروب نشاندار شده با فلورسنت استفاده می کند از حساسیت کمتری برخوردار است. [۴]

در PCR معمولی شدت باند محصولات بر روی 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 الگو در نمونه واکنش ۳' → ۵' آگرو نوکلئازی آنزیم Taq DNA polymerase در تکنیک Taqman است.

در این تکنیک الگو نوکلئوتید دو سر نشاندار شده با فلورسنت (پروپ) در بین دو پرایمر قرار گرفته و با پیشرفت PCR فعالیت ۵' آگرو نوکلئازی آنزیم Taq

در تشخیص نمونه های مختلف کلینیکی در کمترین زمان کاری صورت می گیرد در مقایسه با روش Real-Time PCR زمان بر هستند. [۳] از ویژگی های بسیار مهم روش Real-Time PCR این است که در مقایسه با RT-PCR مرسوم، حساس تر، آسان تر و سریع تر بوده و از تکرارپذیری بسیار بالاتری برخوردار است و بنابراین تجزیه و تحلیل نتایج آن نیز بسیار معتبر است. [۱، ۲، ۶]

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 اولویت های موسسات تحقیقاتی و تولیدی به شمار می آید. در حال حاضر Plaque assay و CCID₅₀ روش های گلد استاندارد برای تعیین قدرت (potency) و کمیت سنجی پاریتیک عفونی در واکسن های زنده ویروسی است. این تیتراسیون براساس مشاهده اثر سیتو پاتیک ویروس (CPE) و وابسته به سویه ویروسی و نوع کشت سلول این CPE متغیر است 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 دشواری های تکنیکی از محدودیت های مهم این روشها است. [۶،۵]

در مطالعات انجام گرفته میانگین تغییر پذیری CV تخمین توان واکسن با استفاده از روش های متداول در هر واکسن حدود $10^2 - 10^1$ و حداقل زمان لازم برای انجام روش پلاگ و روش CCID₅₀، نه روز گزارش شده است که یک مشکل بزرگ برای کنترل کیفی واکسن زنده ویروسی به شمار می رود. [۵]

به همین جهت در برخی از موسسات، روش Real-Time PCR در کمیت سنجی و تخمین قدرت واکسن زنده ویروسی مانند ویروس سرخک و روتا ویروس انسانی و نیز ارزیابی غیرفعال سازی موفق عوامل عفونی در فرآوری محصولات دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. در مقایسه این روش نسبت به دیگر روش های متداول، تیتراسیون نمونه واکسن از دقت و صحت یکسان اما در عین حال سریع تر و آسان تر و حساس تر بوده است.

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

دو تکنیک Taqman و SYBR Green در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است اما Taqman در مقایسه با SYBR Green از حساسیت، اختصاصیت و تکرار پذیری بیشتری برخوردار است و این حساسیت و اختصاصیت متفاوت مربوط به استفاده از الگو نوکلئوتید سوم دیگری است که با رنگ فلورسنت نشاندار شده است. [۷]

انتهای ۵' پروب جدا و به محض برداشته شدن اثر مهارى Quencher شروع به تشعشع می نماید که این تشعشع با میزان الگوی DNA تناسب داشته و به این معنا است که مقدار بالای DNA نمونه، تکثیر سریع تر و بیشتر داشته و شدت تشعشع فلورسانس هم سریعاً 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 و ۸]، 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 می توان مستقیماً 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 به طور هم زمان 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 با استفاده 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. [۶]

یکی از روش‌های معمول برای جداسازی قطعات RNA ژنومی و ساخت cDNA استفاده از Hexamer primer یا Random Oligo dT است که در مرحله دوم با پرایمرهای اختصاصی از

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 و روش Two Step RT-Real Time PCR را در مقایسه با One Step RT-Real Time PCR بسیار حساس تر می داند انجام گرفته است. [۳] منبع نوری تنگستن هالوزن کوارتز که شایع ترین منبع نوری در این دستگاه است و طیف طول موج برانگیختگی (۴۵۰-۶۵۰ nm) و طیف طول موج تشعشع (۷۰۰-۵۰۰ nm) آن با ویژگی رنگ FAM-۶ متناسب تراست. FAM-۶ از شایع ترین رنگ‌های مورد استفاده در تکنیک Real-Time PCR است که در طول موج ۵۱۸ nm تشعشع می نماید، این بیم توسط این منبع نوری تامین می شود. به علاوه رنگ FAM-۶ به راحتی به الیگونوکلوئید پروب متصل می شود و سیگنال بسیار قوی از خود تشعشع می کند و از حساسیت بالایی برخوردار است در مقابل رنگ مهار گر از انواع رنگ‌های سیاه (BHQ) است که طول موج برانگیختگی ۶۸۰-۴۳۵ nm آن نزدیک به طول موج برانگیختگی FAM-۶ است و می تواند به شدت آن را مهار کند. این قدرت مهارى بالا با افزایش حساسیت تست همراه خواهد بود. این طول موج‌ها با طول موج ROX (۶- کربوکسی رودامین) از شایع ترین رنگ مرجع غیر فعال که به عنوان کنترل داخلی تست که در طیف قرمز از خود نور ساطع می کند تداخلی نداشته و از حساسیت تست نمی کاهد.

تفاوت حساسیت بین روش PCR معمولی و Real-Time PCR می تواند ناشی از منبع نور تنگستن هالوزن دستگاه که باعث تحریک قوی این رنگ و در 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 بر روی ژل آگارز می تواند در شدت باندهای آن موثر بوده و نحوه ساختار شیمیایی ژل آگارز و طول موج تحریکی دستگاه UV-Transilluminator و حتی دقت چشم محقق و نیز تفاوت دقت دستگاه‌های Gel documentation می تواند 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 به علت اینکه گزارش نتایج آن براساس استاندارد به کالیبراتور ژن‌های غیر استاندارد است که اغلب آن‌ها ممکن است در اثر دستکاری‌های تجربی در آزمایشگاه تغییر کنند. [۸]

اکثراً برای تفسیر با مشکلاتی همراه است و ممکن است که نتایج آزمایشگاه‌های 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. [۴]

به نظر می‌رسد یکی از متدهای بسیار دقیق برای کمیت سنجی مطلق RNA ژنوم، استفاده از منحنی استاندارد بر اساس پلاسمید حاوی cDNA است که با استفاده از فلورسانس رنگ نشان‌کننده مقدار cDNA نمونه را در مقایسه با فلورسانس نمونه استاندارد پلاسمیدی شمارش می‌کند. در این متد cDNA را درون پلاسمید کلون کرده و سپس به عنوان نمونه استاندارد برای کالیبراسیون نمونه مجهول مورد استفاده قرار داده و نتایج خود را به صورت cDNA تعداد نسخه در میکروگرم کپی نامبر گزارش می‌کند.

اگر چه یکی از شایع‌ترین نمونه کالیبراتور خارجی برای کالیبراسیون تست در کمیت سنجی ژن‌های House Keeping هستند اما هنوز اشکالات مهمی در استفاده از این سیستم وجود دارد اغلب این ژن‌ها کاملاً ثابت نبوده و ممکن 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 و ژن مرجع جلوگیری شود اما چون این امر در نمونه‌هایی 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 با مقدار 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 می‌رسد می‌تواند

به عنوان 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 از RNA و همسانه سازی (کلونینگ) درون پلاسمید و تهیه منحنی استاندارد از RNA استاندارد سنتتیک به عنوان مرجع کمیت سنجی استفاده شده است. [۹، ۵، ۲]

می‌توان با تعیین و تایید درجه خلوص پلاسمید حاوی cDNA، DNA، RNA، ژنومی و به وسیله نانودراپ تهیه رقت‌های ده تایی متوالی از آن به عنوان نمونه کالیبراتور برای رسم منحنی و استاندارد کمیت سنجی به روش SYBR Green و Taqman استفاده کرد و به صورت 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. [۴]

در این صورت دو فرض لحاظ شده است:

- بازده سنتز cDNA در واکنش نسخه برداری معکوس با پرایمرهای اختصاصی ۱۰۰٪ باشد.

- بازده تکثیر cDNA و تکثیر DNA پلاسمید استاندارد در یک لوله و به طور 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 به نظر می‌رسد DNA پلاسمید تخلیص شده در شرایط تکثیر بسیار کارآمد تر از نمونه‌های cDNA است. [۶]

تخلیص RNA

یکی از مهم‌ترین مراحل استفاده از RNA نمونه‌ها 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 خطر آلودگی 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 و چون جهت نسخه برداری آن به سمت ۵' است، یک گرادیان از توالی را با بالاترین مقدار cDNA از ناحیه ۵' نسخه خواهیم داشت بنابراین اگر هرچه توالی هدف برای نسخه برداری از نزدیک‌ترین موقعیت به انتهای ۵' ژنوم انتخاب شود حساسیت روش بیشتر می‌شود. [۳، ۷، ۹]

به هر حال استفاده از هگزامر پرایمر و ساخت cDNA و تبدیل آن به DNA دو رشته‌ای به وسیله پرایمرهای اختصاصی و همسانه سازی (کلونینگ) در درون پلاسמיד مانند pTZ57R/T و پس از تخلیص پلاسמיד با حداکثر خلوص لازم می‌توان براساس فرمول کپی نامبر، تعداد کپی ژن هدف را دقیقاً محاسبه کرد و سپس از پلاسמיד حاوی ژن، رقت‌های متوالی ده تایی تهیه و با پرایمرهای اختصاصی و بادر نظر گرفتن کلیه پارامترهای کیفی لازم برای رسم یک منحنی استاندارد دقیق، منحنی استاندارد تهیه و به‌عنوان مرجع کمیت سنجی در هر دو روش Taqman و 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 (پلاسמיד+ژن هدف) به دست 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 $10\% \pm 3/3-$ است.

کارایی واکنش از فرمول $E = [10^{-(1/\text{slope})}] - 1$ محاسبه می‌شود که E باید $90-100\%$ باشد و این پارامتر نشان‌دهنده آن است که در هر سیکل آمپلیکون هدف دو برابر شده 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 پلاسמיד و پرایمرها و پروب با کارایی واکنش نیز رابطه مستقیمی دارند و تحقیقات نشان می‌دهد غلظت مناسب پروب و پرایمرها در حساسیت و اختصاصیت تست موثرند. سایز بزرگ آمپلیکون، وجود مهارکننده PCR و ساختار ثانویه پلاسמיד غیر خطی هر یک می‌تواند کارایی واکنش را کاهش دهد. مثلاً چنانچه پلاسמיד غیر خطی در محیط محلول به شکل سوپر کویل در آمده و به‌طور صد در صد در دسترس آنزیم و پرایمرها قرار نگیرد، علی‌رغم طراحی مناسب پرایمرها و پروب، کارایی واکنش صد درصد نخواهد بود. سایز آمپلیکون که معمولاً برای روش Real-Time PCR (کمتر از ۲۰۰bp) توصیه نمی‌شود زیرا فرضیه رابطه سایز کوتاه تر آمپلیکون با افزایش حساسیت واکنش عملاً تایید شده است. [۷]

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

پارامتر مهم دیگر یعنی ضریب R^۲ یا ضریب ارتباط در یک منحنی استاندارد ایده‌آل باید $0/99-1$ باشد. ضریب ارتباط R^۲ نشان‌دهنده چگونگی انجام واکنش PCR در یک چاهک و گویای میزان دقت تهیه رقت‌های متوالی ده تایی و پایپتینگ مواد درون چاهک‌ها است.

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

محدوده تشخیص نمونه فاقد ۱۰۱۱- FAM ۱۰۱۰ باشد در کارایی صد درصد واکنش PCR، می توان یک کپی از نمونه را در بین سیکل های ۳۷-۳۳ تشخیص داد. بنابراین در یک بررسی قابل قبول و معتبر $Slope = -3/3$ برابر با کارایی ۱۰۰٪ و $y = 33-37$ و ضریب ارتباط $R^2 = 1$ است. چنانچه y بالای ۳۷ و پائین ۳۳ باشد نشان دهنده 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 غلط های 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 ایتیمایز شوند و به صورت یک مکانیسم عمومی برای بررسی هر ژن قابل استفاده است. اما چون 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 رنگ های آزاد متصل شونده به DNA دو رشته ای است اما به علت این که گزارش شده تا حدودی باعث مهار واکنش PCR و در نتیجه کاهش کارایی آن می شود. 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 می تواند در ایتیمایز نمودن واکنش برای قطعات دیگر راهنما باشد. در موارد لزوم و در دسترس نبودن روش Taqman روش SYBR Green که هزینه تر و در دسترس تر است می تواند با دقت و صحت بسیار بالا جهت بررسی، مورد استفاده قرار گرفته و نتایج آن مانند روش Taqman کاملاً معتبر و 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 و ذوب DNA دو رشته ای رسم می شود T_m . که در آن نیمی از DNA دو رشته ای مبدل به DNA تک رشته ای می شوند و خود T_m 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 می گیرد کاهش ناگهانی رنگ فلورسانس که ناشی از واسرشتگی رشته DNA و رهایی رنگ سایبرگرین است به صورت یک منحنی ذوب یا Peak رسم می شود.

معمولاً 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 ایتیمایز کردن واکنش و اطمینان از عدم حضور احتمالی رشته های غیر اختصاصی استفاده می شود.

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

- ضریب تغییرات در یک واکنش (Intra-assay variability)
- 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 به دست می آید.

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
realtimePCR; Journal of Immunological
Methods 269-261 (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

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 و تحلیل نتایج آن نیز بسیار معتبر تر است. [۱، ۲، ۶]

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 بیولوژیکی با استفاده از تکنیک‌های متعدد است. همچنین کاهش نتایج مثبت کاذب به دلیل عدم نیاز به فرآیندهای آنالیزی بعد PCR، احتمال پائین آلودگی متقاطع، امکان نمونه گذاری در مقیاس وسیع و امکان غربالگری در فاز اپیدمی در یک زمان کوتاه برای مدیریت بیماران و تشخیص تاییدی موارد نیازمند به ایمنوگلوبولین یا کنترل افراد در معرض خطر آلودگی و جلوگیری از شیوع منطقه‌ای بسیار سودمند است. [۳] به علاوه می توان پیامدهای وخیم ناشی از عفونت و موارد مشکوک به بیماری ناشی از واکسیناسیون ناموفق را به کمک Real-Time PCR شناسایی کرده و حتی در مطالعات تحقیقی رابطه کمیت عامل عفونی را با پاتوژن و شیوع بیماری در جمعیت حساس ارزیابی کرد. [۲، ۴، ۵، ۶] روش Real Time PCR می تواند جایگزین روش‌های زمان‌بر، سخت و کم بازده متداول شود و سرعت و توانایی شمارش از ویژگی مهم برای بررسی پاتوژن و طراحی دارو است. [۱۰]

منابع

- [1]. H.S. El Mubarakab, R.L. De Swarta, A.D.M.E. Osterhaus, M. Schuttana; 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]. Sébastien 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