Real-time PCR

شهرام شجاع (دانشجوی کارشناسی ارشد)

دکتر رضا میرنژاد (باکتریولوژیست- استادیار دانشگاه)

Real-time PCR تکنیکی برای مشاهده بی‌وقفه‌ی پیشرفت واکنش PCR در طول زمان می‌باشد، همچنین با این روش می‌توان مقادیر تولیدات PCR (DNA، cDNA یا RNA) را نیز اندازه‌گیری نمود. این روش بر مبنای فلوروسنت تولیدی از مولکول گزارشگر (Reporter) می‌باشد که در طول واکنش افزایش می‌یابد. مولکول‌های گزارشگر فلوروسنت به صورت رنگ‌هایی می‌باشند که به DNA دو رشته‌ای باند می‌شوند مانند SYBR® Green و یا بصورت شناساگرهای توالی‌های خاص مانند TaqMan® Probes می‌باشند. این تکنیک می‌تواند با حداقل اسید نوکلئیک آغاز شده و مقدار تولید نهایی را با دقت زیادی تعیین نماید. همچنین محدود به زمان و ذخیره منابع نبوده، به راحتی قابل اجرا است و دقت و حساسیت بالاتر از PCR معمولی دارد. این روش توانایی تشخیص توسعه PCR را در مراحل اولیه واکنش دارد، در حالی که تشخیص در PCR معمولی در مرحله نهایی واکنش می‌باشد.

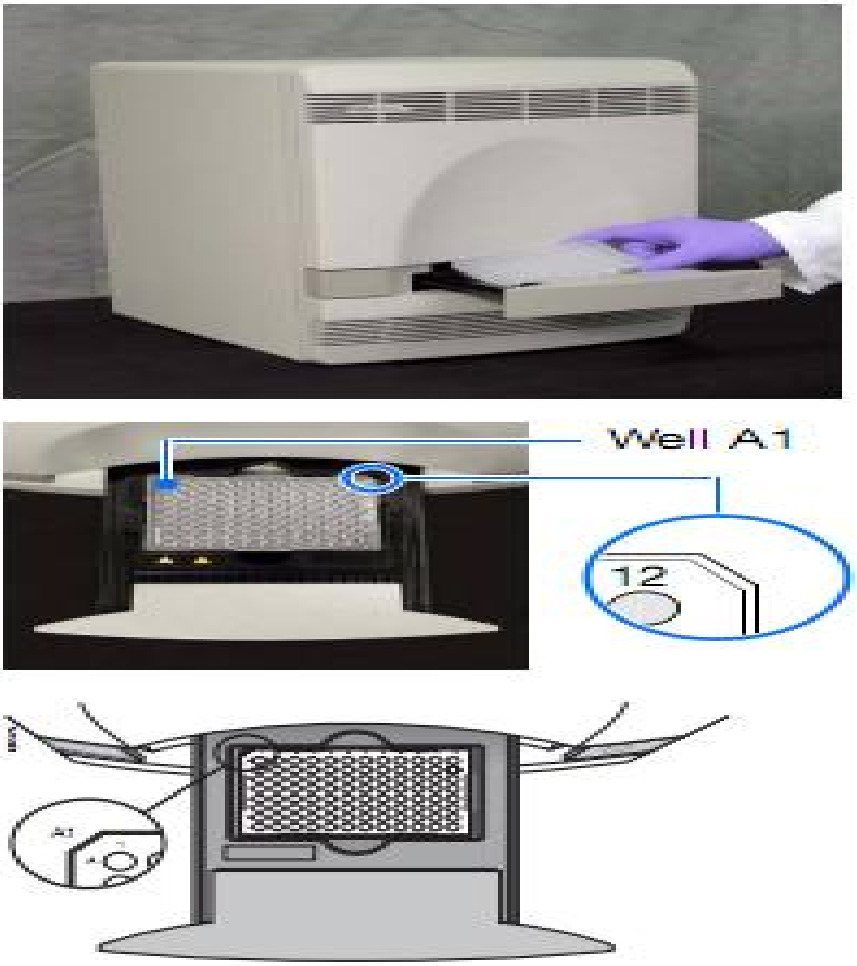
تاریخچه و معرفی Real-Time PCR

در سال‌های 1992 و 1993، Higuchi و همکاران روشی ابداع کردند که امکان تشخیص محصول PCR را هنگام انجام واکنش می‌داد؛ آنها با محاسباتی که در انتهای واکنش انجام می‌دادند، اطلاعات کلیه واکنش‌ها را استخراج می‌کردند. در این سیستم از رنگ اتیدیوم بروماید در واکنش PCR استفاده می‌شد و تغییراتی در ترموسایکلر ایجاد شده بود که می‌توانست نمونه‌ها را با نور ماوراء بنفش تحریک کرده، فلوروسنت بازتاب شده را با استفاده از یک دوربین

Cooled CCD متصل به یک کامپیوتر بررسی کند. با مقایسه افزایش فلوروسنس در هر سیکل PCR، نموداری به دست می‌آمد که بسیار بهتر از بررسی محصول PCR در انتهای واکنش بود.

با ایده گرفتن از این روش ابداعی، شرکت Applied Biosystems (ABI) در سال 1996 اولین دستگاه Real-time PCR را با مدل 7700 SDS وارد بازار کرد (شکل 1). آن دستگاه در زمان خود صحیح‌ترین و حساس‌ترین روش در تشخیص اسیدهای نوکلئیک بود، زیرا توانسته بود بر مشکلات PCR معمولی فایق آید و اختصاصیت و حساس بودن روش PCR را داشت و در عین حال نیاز به الکتروفورز و هیبریداسیون با مواد رادیواکتیو برای تشخیص نیمه کمی را حذف کرده بود. از آن پس شرکت‌های دیگری نیز به استفاده کنندگان این روش پیوستند و آن را ارتقاء دادند. برخی فکر می‌کنند نام Real-time به خاطر توانایی مشاهده منحنی روند پیشرفت واکنش، حین انجام PCR می‌باشد که البته این طور نیست چون نرم افزار ABI 7700 SDS، اولین نرم افزاری که در این دستگاه به کار رفت قادر به نشان دادن منحنی پیشرفت واکنش، در حال انجام برنامه نبود. اصطلاح Real-time به این خاطر به آن اطلاق شد که نرم افزار SDS قادر بود اطلاعات نهایی تمام نمونه‌ها را به صورت یکجا و بلافاصله پس از اتمام واکنش، محاسبه کرده و ارائه نماید، به گونه‌ای که برای کارهای بعدی نیازی به کار اضافی روی اطلاعات نبود. این در حالی بود که پیشرفته‌ترین نرم افزارها در آن زمان پس از اتمام واکنش، اطلاعاتی تولید می‌کردند که نیاز به پردازش و نتیجه‌گیری داشت. از این رو وجه تسمیه Real-time برای این دستگاه، توانایی تولید اطلاعات نهایی بلافاصله پس از اتمام واکنش بوده و قابلیت نمایش پیشرفت واکنش در زمان واقعی Real-time را نرم افزارهای بعدی که در دستگاه نصب شدند، به سیستم اضافه نمودند. در واقع Real-time PCR جمع‌آوری منظم سیگنال‌های فلوروسنت از یک یا چندین واکنش PCR، طی سیکل‌های مختلف یک واکنش می‌باشد و تبدیل این سیگنال‌ها به مقدارهای عددی و اندازه‌گیری غلظت نمونه به کمک آن را

qRT- PCR[1] می‌گویند. به این نوع PCR همچنین kinetic polymerase chain reaction (KPCR) گویند.



شکل1: دستگاه Real-time PCR مدل ABI 7500 و قسمت‌های تشکیل دهنده آن

کاربردهای مهم Real-time PCR

1-اندازه‌گیری مقدار یا لود ویروس:

1) Quantitative Real-Time PCR

همانطورکه ذکر شد در روش Real-time مقدار ژن به صورت کمی قابل جداسازی می‌باشد، لذا از این تکنیک جهت پیگیری اثرات درمانی داروهای خاص می‌توان بخوبی بهره گرفت؛ بطور مثال در بیماری که HBS Ag+ است استفاده از متدهایی مانند PCR معمولی و یا الیزا که روش‌هایی کیفی می‌باشند رهگشا نیست و در عین حال HBS Ag بیمار مثبت گزارش می‌شود، ولی با استفاده از متد Real-time می‌توان Lode یا مقدار ویروس را پس از دریافت دارو رصد کرد که بسیار ارزشمند می‌باشد.

2- کنترل غذاها و داروها

3- بررسی بیان ژن

4- پیش آگهی در مورد سرطان‌ها

5- انگشت نگاری DNA

6- ژن تراپی

7- موفقیت پیوندها

8- ارزیابی کانسرهای خونی

مزیت‌ها و معایب:

Real-time PCR نسبت به سایر روش‌های متداول PCR مزایایی دارد که مهم‌ترین آن‌ها شامل:

1- میزان محصول در هر چرخه قابل ردیابی است در حالی که محصول روش‌های سنتی پس از پایان واکنش و الکتروفورز مشخص می‌شود.

2- امکان بررسی و آنالیز چند رونوشت متفاوت در یک تیوپ امکان پذیر است.

3- حساسیت و دامنهٔ دینامیکی آن 1000 برابر RT- PCR (Reverse transcription PCR) معمولی است.

4- به کمک این تکنیک می‌توان ارزش گذاری کمی انجام داده و میزان الگوی اولیه را دقیقاً تخمین زد.

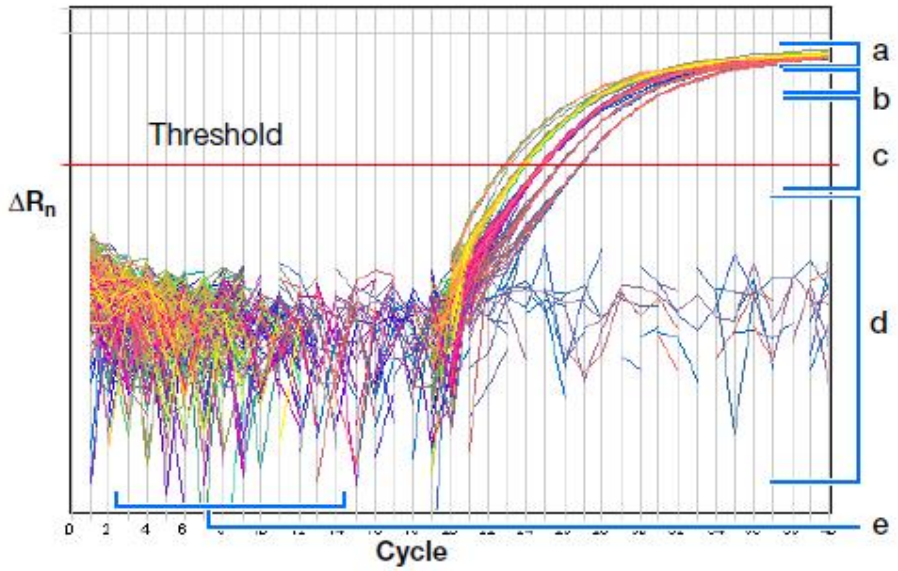
اما در کنار این مزایا می‌توان به ناتوانی این تکنیک در برآورد اندازهٔ محصول تکثیر شده و پرهزینه بودن آن اشاره کرد.

اساس تکنیک Real-time

تکنیک Real-time از بسیاری جهات شبیه PCR معمولی می‌باشد. برنامه واکنش از یک سیکل آغازی و تعداد 30 تا 40 سیکل زنجیره‌ای شامل واسرشت شدن DNA ، اتصال پرایمر و پلیمریزه شدن رشته جدید یا گسترش DNA تشکیل شده است. مواد مورد استفاده برای انجام واکنش همان ترکیبی را دارند که واکنش PCR معمولی دارد. مکانیسم واکنش مشابه PCR است به گونه‌ای که در هر سیکل تعداد نسخه‌های تکثیر شده دو برابر می‌شود. تفاوت آن دو در این است که در سیستم Real-time با به کار بردن رنگ‌های فلوروسنت و پیگیری آنها در خلال واکنش و مشاهده تغییرات جذب فلوروسنت می‌توان پیشرفت واکنش را لحظه به لحظه دنبال کرد و در پایان برنامه، نتایج واکنش‌ها را مشاهده نمود، در صورتی که در واکنش PCR معمولی، بعد از اتمام واکنش، نتایج را با انتقال نمونه‌ها بر روی ژل می‌توان مشاهده کرد. سیستم تشخیص درReal-time، علاوه بر حذف مراحلی که بعد از واکنش PCR برای تأیید صحت آزمایش صورت می‌گیرد، این امکان را فراهم می‌سازد که بتوان میزان DNA تکثیر شده را نیز اندازه‌گیری نمود. برای این منظور دستگاه‌های Real-time علاوه بر داشتن یک بخش تولید کننده گرما، دارای یک بخش تولید و سنجش نور نیز هستند.

به طور کلی دستگاه Real-time از دو بخش مختلف تشکیل شده است: یک بخش چرخاننده گرمایی و یک بخش فلوریمتر. بخش چرخاننده برای اجرای سریع واکنش PCR طراحی شده و برخلاف دستگاه‌های معمول PCR که واکنش در آنها چند ساعت طول می‌کشد در سیستم Real-time، واکنش PCR ظرف 45 تا 60 دقیقه صورت می‌گیرد. بخش فلوریمتر شامل یک

منبع نور، فیلترهای نوری و تجهیزات سنجش نور می‌باشد که با کمک آن ابتدا به محلولی که در آن واکنش PCR در حال انجام است نور تابش داده، باعث تحریک ماده فلوروسنت می‌شود و سپس میزان فلوروسنت منتشر شده را اندازه‌گیری می‌کند. این دو بخش به گونه‌ای در کنار یکدیگر قرار داده شده‌اند که قادر هستند کارکردهای ویژه‌ای مثل تشخیص محصول، بررسی کمی و شناسایی جهش‌ها را انجام دهند. دستگاه Real-time قادر است حالت افزایش نمایی پیشرفت واکنش PCR را تشخیص داده، از آن برای کمیت سنجی DNA استفاده کند. این توان منحصر به فرد را رنگ‌های فلوروسنت به دستگاه Real-time می‌دهند. به این ترتیب که آنها با آشکار سازی DNA ازطریق تابش فلوروسنتی که از خود ساطع می‌کنند، باعث تبدیل افزایش نمایی DNA به افزایش تابش فلوروسنت در هر سیکل واکنش PCR می‌شوند که این افزایش با سیستم فلوریمتری دستگاه اندازه‌گیری و ثبت شده، با کمک نرم افزار کامپیوتری مجدداً به اطلاعاتی کمی برای سنجش DNA تبدیل می‌شود (شکل 2).



A typical amplification curve has a:

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

شکل (2): نمودارهای تکثیر در Real-time PCR و فازهای مختلف یک نمودار

اصول کار Real-time PCR

همانگونه که گفته شـــد تمامی اصول و واکنش‌گرهایی که برای یک RT-PCR معمولی نیاز است در Real - time PCR هم بکار می‌رود، اما یک گزارشگر فلوروسنت نیز در واکنش حضور دارد. این گزارشگرها به گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر محصول، نور تولید کنند، لذا افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول بدست آمده نسبت مستقیم دارد. معمولاً اگر واکنش خود را بهینه کرده باشید در 3 تا 15 چرخهٔ ابتدایی تغییر چندانی در شدت فلوروسنت نمی‌بینید که به این منطقه خط پایه (Base line) گویند. در ادامه شدت فلوروسنت رو به افزایش می‌گذارد. به اولین چرخه‌هایی که شدت

فلوروسنت بیشتر از خط پایه باشد، سیکل آستانه (Threshold cycle) یا C_T گویند. عدد C_T با مقدار الگوی اولیه رابطهٔ معنی‌دار دارد و از روی آن می‌توان مقدار mRNA اولیه را تخمین زد. هر چه مقدار الگوی اولیه بیشتر باشد مقدار C_T کم می‌شود. اگر بخواهید با کمک این تکنیک یک برآورد کمی از مقدار الگوی اولیه داشته باشید باید یک نمودار استاندارد رسم نمائید. بدین منظور ابتدا از یک نمونه معلوم، غلظت‌های مشخصی تهیه کرده و به کمک دستگاه، منحنی‌های استاندارد رسم نمائید. در ادامه با تکثیر و ارزیابی C_T نمونهٔ مجهول و مقایسه آن با منحنی‌های استاندارد، غلظت رونوشت اولیهٔ آن را تعیین کنید.