

Real Time PCR بسیار شبیه به واکنش PCR می باشد اما تفاوت آن با PCR معمولی به کار گرفتن یک نشانگر فلورسنت در واکنش جهت ردیابی تکثیر محصول واکنش می باشد. این گزارش گرها به گونه ای طراحی می شوند که در صورت تکثیر DNA تولید نور کنند بنابراین نور بیشتر برابر است با تکثیر محصول و افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول بدست آمده نسبت مستقیم دارد.

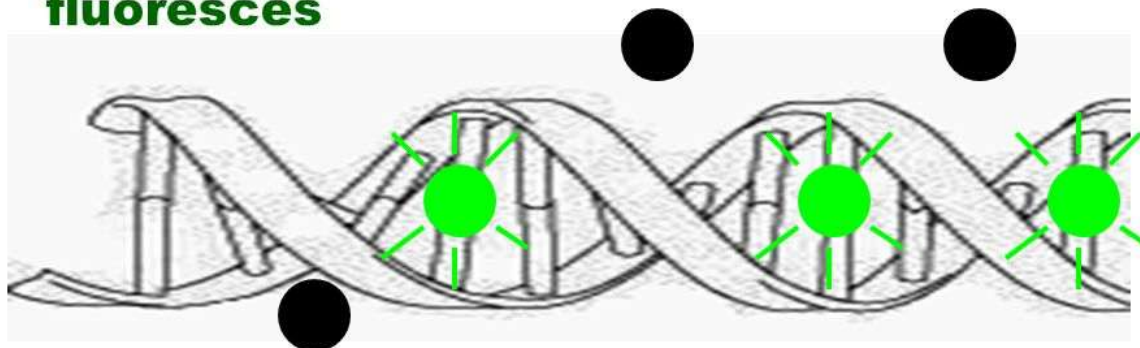
یکی از این نشانگرهای فلورسنت، رنگ سایبرگرین (**SYBR® Green**) و یا اوا گرین (**Eva green**) می باشند. در اینجا از رنگ های باند شده به DNA دو رشته ای به عنوان گزارشگر فلوروسنت برای مشاهده واکنش PCR استفاده می شود. این دو رنگ به شکاف کوچک مارپیچ دو رشته ای DNA باند می شود و سبب ایجاد نور فلورسنت می گردند، اما رنگ هایی که به رشته DNA باند نشده اند فلوروسنت خیلی کمی را نشان می دهند (شکل 1).

SYBR Green

- **Does not bind to single-stranded DNA**



- **Binds to double-stranded DNA and fluoresces**

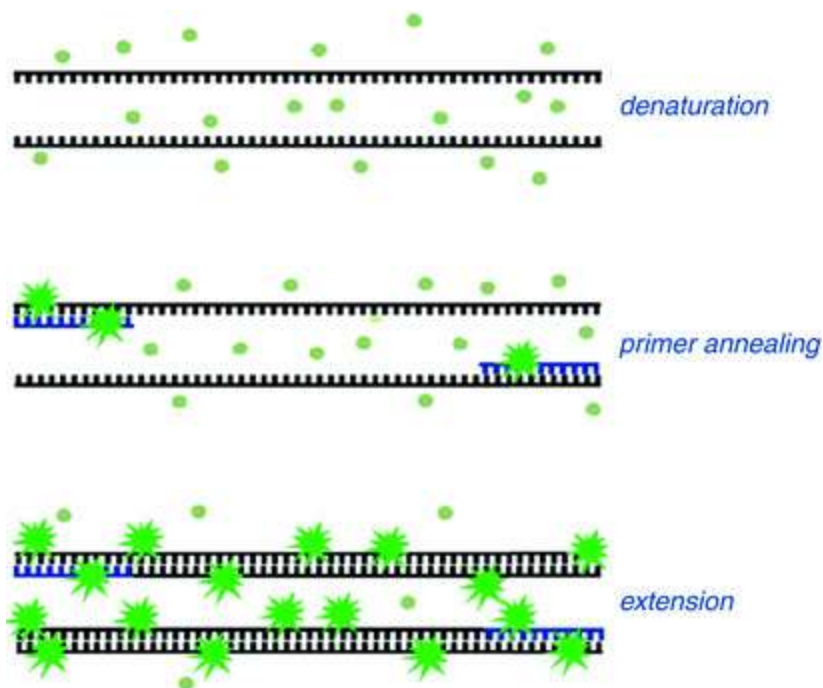


شکل 1: این شکل بیانگر قابلیت اتصال رنگ های فلورسنت به DNA می باشد.

بنابراین در روش ریل تایم، با تکثیر DNA قطعات دو رشته ای افزایش می یابند و با اتصال رنگ های فلورسنت به آن ها میزان نور انتشار شده نیز بیشتر می گردد. و این انتشار نور فلوروسنت در سیکل های متوالی بر اثر مضاعف شدن

محصول PCR افزایش می یابد (شکل 2) بنابراین با ثبت مقدار فلوروسنت ساطع شده در هر سیکل، می توان پیشرفت تکثیر محصولات واکنش PCR را در طول مرحله نمایی PCR مشاهده نمود.

نکته: رنگ های سایبر گرین (SYBR® Green) و یا اوا گرین (Eva green) قابلیت اتصال به DNA تک رشته را ندارند.



شکل 2: عملکرد رنگ های فلورسنت را در اتصال به DNA دورشته ای در روش ریل تایم.

آموزش اختصاصی طراحی پرایمر برای ریل تایم با روش سایبر گرین (Real Time PCR SYBR Green)

در روش ریل تایم نیز مانند روش PCR ما نیازمند طراحی پرایمر می باشیم. برای طراحی پرایمر در روش ریل تایم علاوه بر رعایت نکات عمومی در طراحی پرایمر (که در ادامه به آن اشاره می نماییم) باید به یک سری نکته اختصاصی در طراحی پرایمر توجه نمود که در ادامه به این نکات اشاره می نماییم.

نکته اول در طراحی پرایمر در بررسی بیان ژن ها: پرایمرهای طراحی شده نباید بر روی توالی ژنومی متصل و محصولی را تکثیر نمایند.

در بررسی بیان ژن ها ابتدا از نمونه ها، RNA استخراج شده و سپس RNA استخراج شده توسط آنزیم reverse transcriptase (آنزیم RT) به cDNA تبدیل می گردد. سپس بررسی بیان ژن ها با تعیین میزان نسخه های رونویسی شده از هر ژن (mRNA) در cDNA سنتز شده، صورت می پذیرد. بنابراین پرایمرها باید بر روی توالی mRNA ژن ها طراحی شود و در واکنش باید از cDNA به عنوان الگو استفاده شود. اما از آن جاییکه در بیشتر موارد

RNA استخراج شده و **cDNA** سنتز شده به **DNA** ژنومی آلوده است بنابراین طراحی پرایمرها باید به صورتی باشد که یا به توالی **DNA** ژنومی متصل نشود و یا در صورت اتصال به **DNA**، محصولی از الگوی **DNA** تکثیر نشود.

البته در موقع سنتز **cDNA** می توان از آنزیم **DNase** جهت حذف آلودگی **DNA** استفاده نمود، اما استفاده از آنزیم **DNase** نیز مشکلات بسیاری را ایجاد می کند. مشکل اول این است که آنزیم **DNase** سبب کاهش کیفیت **RNA**ها و کاهش راندمان سنتز **cDNA** می گردد. بنابراین ممکن است بعد از سنتز **cDNA** تکثیر قطعه مورد نظر به خوبی صورت نگیرد.

مشکل دوم استفاده از آنزیم **DNase** این است که جهت استفاده از این آنزیم به میزان بالایی از **RNA** نیاز است. بنابراین هنگامی که میزان **RNA** در دسترس کم باشد، در این شرایط تیمار نمونه های **RNA** با آنزیم **DNase** سبب عدم سنتز **cDNA** می گردد.

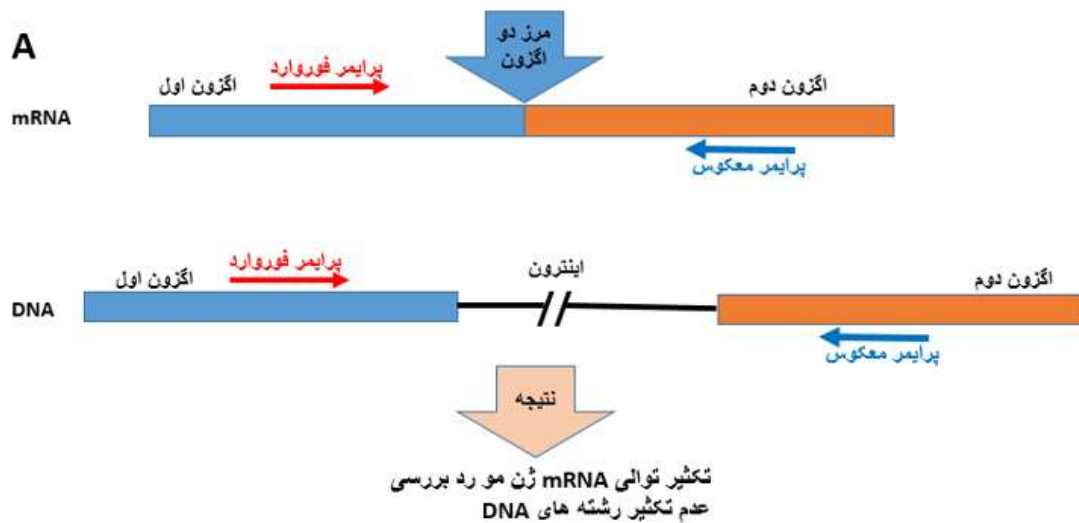
مشکل سوم استفاده از آنزیم **DNase** این است که استفاده از این آنزیم تضمین کننده حذف همه آلودگی های **DNA** نمی باشد و ممکن است **DNA**های باقی مانده سبب جواب مثبت کاذب در نمونه ها شود.

مشکل چهارم آنزیم **DNase** قیمت بالای این آنزیم می باشد.

با توجه به مشکلات فوق در استفاده از آنزیم **DNase** بهتر است پرایمرها به صورتی طراحی شوند که در صورت وجود آلودگی **DNA**، پرایمرها الگوی **DNA** را تکثیر نکنند و به صورت اختصاصی الگوهای **cDNA** را تکثیر کنند.

آموزش نکات طراحی پرایمرهای (intron-spanning (intron inclusion در ریل تایم با روش سایبر گرین (Real Time PCR SYBR Green)

سه روش برای طراحی پرایمرها در بررسی بیان ژن ها وجود دارد. در روش اول (شکل 3) پرایمر فوروارد بر روی یک اگزون و پرایمر معکوس بر روی اگزون مجاور طراحی می شود. به شکل زیر توجه نمایید.



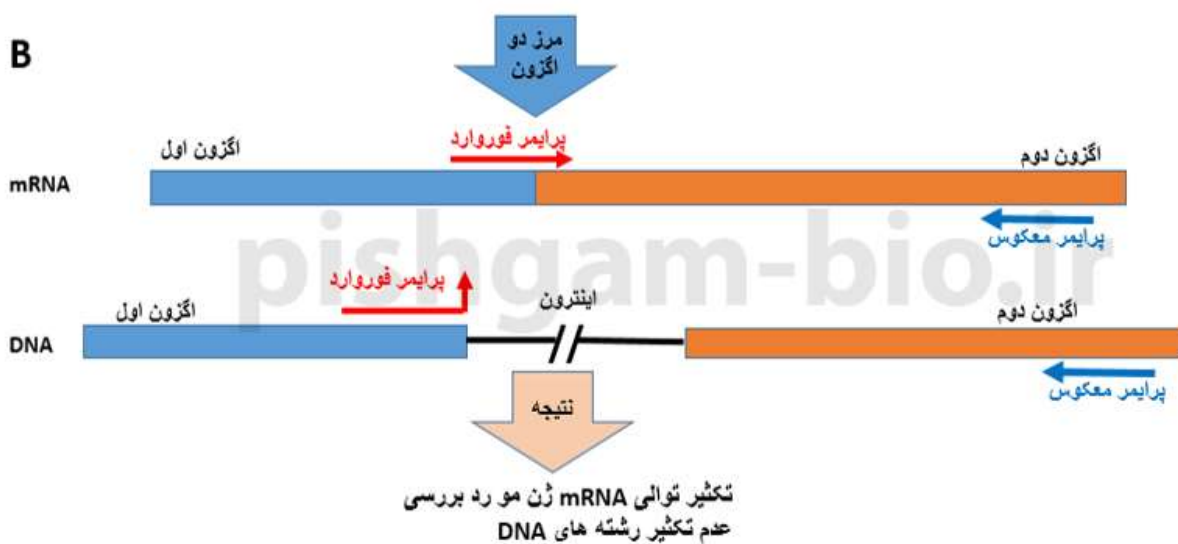
شکل 3: در روش فوق پرایمر فوروارد بر روی یک اگزون و پرایمر معکوس بر روی اگزون مجاور طراحی شده است. به دلیل اینکه در توالی DNA بین دو اگزون توالی اینترون وجود دارد، فاصله بین دو پرایمر در الگوی DNA به قدری زیاد می شود که این پرایمرها قادر به تکثیر الگوهای DNA نمی باشند. فرض نمایید در شکل فوق طول اینترون برابر با 3 هزار جفت باز باشد، حال اگر زمان extension واکنش ریل تایم را بر روی 30 ثانیه تنظیم شده باشد، دیگر توالی 3 هزار جفت بازی تکثیر نخواهد شد.

اما در این روش در الگوهای cDNA بین دو اگزون توالی اینترونی وجود ندارد بنابراین پرایمرها می توانند الگوی cDNA را تکثیر نمایند.

نکته: روش (intron-spanning) (intron inclusion) بهترین و مطمئن ترین و آسانترین روش طراحی پرایمر برای بررسی بیان ژن ها می باشد اما در این روش باید بین دو اگزون انتخاب شده یک اینترون با طول حداقل 300 جفت باز وجود داشته باشد و هنگامی که طول اینترون های یک ژن از 300 جفت باز کمتر باشد استفاده از این روش طراحی پرایمر توصیه نمی گردد.

آموزش نحوه طراحی پرایمرهای exon-exon junction برای بررسی بیان ژن ها در ریل تایم با روش سایبر گرین (Real Time PCR SYBR Green)

هنگامی که در یک ژن طول اینترون ها کوتاه باشد می توان از روش دیگری برای اختصاصی نمودن پرایمرها برای الگوهای cDNA استفاده نمود. به شکل 4 توجه نمایید.



شکل 4: در طراحی پرایمر در روش جدید یکی از پرایمرها دقیقاً بر روی محل اتصال agzoun ها طراحی می گردد (در شکل فوق پرایمر فوروارد). در طراحی پرایمر به این روش باید توجه نمود که توالی سمت 3 پریم پرایمر که بر روی agzoun دوم قرار می گیرد باید بین 3 تا 5 جفت باز طول داشته باشد (شکل 5)

و قرار دادن بیش از 6 جفت باز در سمت 3 پریم پرایمر اصلاً توصیه نمی شود. به دلیل این که در این روش پرایمرها بر روی مرز دو agzoun طراحی می گردند، به این روش exon-exon junction می گویند.



شکل 5: نحوه طراحی پرایمر در مرز دو agzoun برای بررسی بیان ژن ها

نکته: در روش **exon-exon junction** نیز پرایمرها پرایمرها قادر به اتصال به توالی **DNA** نمی باشند (به دلیل وجود اینترون ها) بنابراین آلودگی های **DNA** تکثیر نمی شوند.

نکته: روش **exon-exon junction** دارای یک مشکل بزرگ می باشد: در این روش تعداد مرزهای اتصال اگزون ها به یکدیگر کم می باشد بنابراین محل های انتخاب برای طراحی پرایمر محدود است. و ممکن است که هیچ یک از جایگاه ها دارای شرایط لازم بعدی برای طراحی پرایمر نباشند (به عنوان مثال ممکن است پرایمر انتخاب شده دارای ساختار ثانویه نامناسب باشد).

آموزش نحوه طراحی پرایمرهای داخل اگزونی برای بررسی بیان ژن ها در ریل تایم با روش سایبر گرین (**Real Time PCR SYBR Green**)

شکل 6 روش سوم در طراحی پرایمر برای بررسی بیان ژن ها را نشان می دهد.

شکل 6: در این روش هر دو پرایمر فوروارد و معکوس بر روی یک اگزون قرار دارد. گرچه در شرایط عادی طراحی پرایمر به این روش توصیه نمی گردد اما در برخی موارد ممکن است یک ژن فاقد اینترون باشد و یا طراحی پرایمر به دو روش قبلی ممکن نباشد. در این شرایط هر دو پرایمر بر روی یک اگزون طراحی می گردند. باید توجه داشت در مواردی که پرایمرها به این روش طراحی می گردند باید با تیمار نمودن **RNA** های استخراج شده با آنزیم **DNase** آلودگی **DNA** را تا حد امکان کاهش داد.

اصل دوم در طراحی پرایمر برای بررسی بیان ژن ها این است که بهتر است پرایمرها بر روی اگزون های سمت 3 پرایم **mRNA** طراحی شوند. دلیل این است که در سنتز **cDNA** آنزیم **RT** سنتز را از سمت 3 پرایم **mRNA** آغاز می نماید. بنابراین سنتز **cDNA** سمت 3 پرایم ژن ها با کیفیت بیشتری نسبت به سمت 5 پرایم انجام می گیرد.

اصل سوم در طراحی پرایمر برای بررسی بیان ژن ها این است که طول قطعه تکثیر شونده (محصول ریل تایم) باید بین 90 تا 200 جفت باز باشد. البته در مقالات چاپ شده طول برخی محصولات **PCR** از این دامنه پیروی نکرده است اما توصیه می گردد طول قطعه در همین محدود باشد. طول کمتر سبب می گردد که قطعه تکثیر شده با دایمر پرایمر اشتباه گرفته شود. و طول بیشتر می تواند سبب افزایش تکثیر غیر اختصاصی و همچنین دو قله ای شدن منحنی ذوب محصول ریل تایم شود.

سه اصل ذکر شده در فوق نکات اختصاصی طراحی پرایمر برای بررسی بیان ژن ها می باشد. اما پرایمرهای طراحی شده باید دارای یک سری اصول عمومی نیز باشند. این اصول شامل ویژگی هایی مانند طول پرایمر، دمای **Tm**، مقدار و درصد بازهای **GC**، نحوه اتصال نوکلئوتیدهای انتهایی پرایمر می باشد.

در طراحی پرایمر این اصول زیر را باید همیشه مد نظر قرار دهیم: طول متوسط هر پرایمر بین 18-25 جفت باز باشد، پرایمر با طول کوچک اتصال غیر اختصاصی را افزایش داده و پرایمر بزرگ سرعت هیبریداسیون را کم می‌کند.

میزان GC پرایمر های فوروارد و معکوس شبیه هم باشد که معمولا حدود 40-60 درصد می باشد. پرایمر های مستقیم و معکوس نباید مکمل همدیگر باشند و با یکدیگر ساختار ثانویه تشکیل دهند، زیرا باعث تولید پرایمر دایمر می شود که به ویژه در Real time PCR مشکل ایجاد می کند.

قرار دادن حداقل یک باز G یا C در انتهای ۳ پریم پرایمر سبب افزایش کارایی پرایمر می گردد اما قرار دادن یک باز A یا T سبب افزایش اختصاصیت پرایمر می گردد.

باید دقت کرد که انتهای ۳ پریم غنی از C و یا G (و یا هر دو) نباشد که سبب کاهش اختصاصیت و اتصال های اشتباه به ژنوم می شود.

باید تا حد امکان از توالی های پالیندرومیک (برای مثال GTTAAC) در پرایمر جلوگیری کرد، زیرا احتمال تشکیل پرایمر دایمر را افزایش می دهند.

در پرایمرهای طراحی شده در حد امکان تعداد پورین ها با پیریمیدین ها برابر باشد.

از توالی های تکراری (برای مثال AAAAAA) در پرایمر، به ویژه در ۳ پریم جلوگیری شود و دمای Tm دو پرایمر نزدیک هم باشد.

بنابراین اصول عمومی طراحی پرایمر عبارتند از:

1. طول پرایمر ها باید بین 18 تا 25 نوکلئوتید باشد.

2. دمای Tm دو پرایمر فوروارد و معکوس باید نزدیک به هم باشد.

3. پرایمر ها باید از نظر درصد GC در حد نرمال باشند (حدود 40 تا 60 درصد).

4. پرایمر ها نباید ساختار سنجاق سری تشکیل دهند.

5. پرایمر ها تشکیل Self-Dimer و یا Hetero-Dimer ندهد.

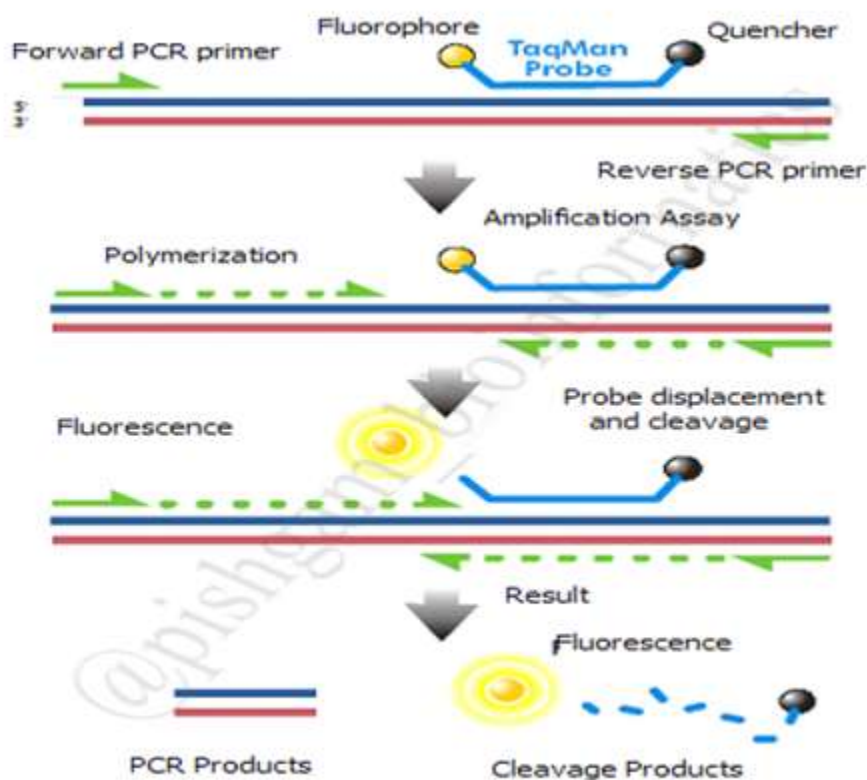
آشنایی با انواع پروب های فلورسنت مورد استفاده در بررسی بیان ژن ها با روش ریل تایم (real time PCR)

آموزش عملکرد پروب های مورد استفاده در روش ریل تایم شامل: Molecular Beacons , TaqMan Probes FRET Scorpion Primers و Hybridization Probes

آموزش انواع پروب های (probs) فلورسنت مورد استفاده در روش ریل تایم (real time PCR)

پروب های مورد استفاده در روش ریل تایم شامل: Molecular Beacons , TaqMan Probes FRET Hybridization Scorpion Primers و Probes می باشند.

آموزش پروب های Taqman در روش ریل تایم (real time PCR)

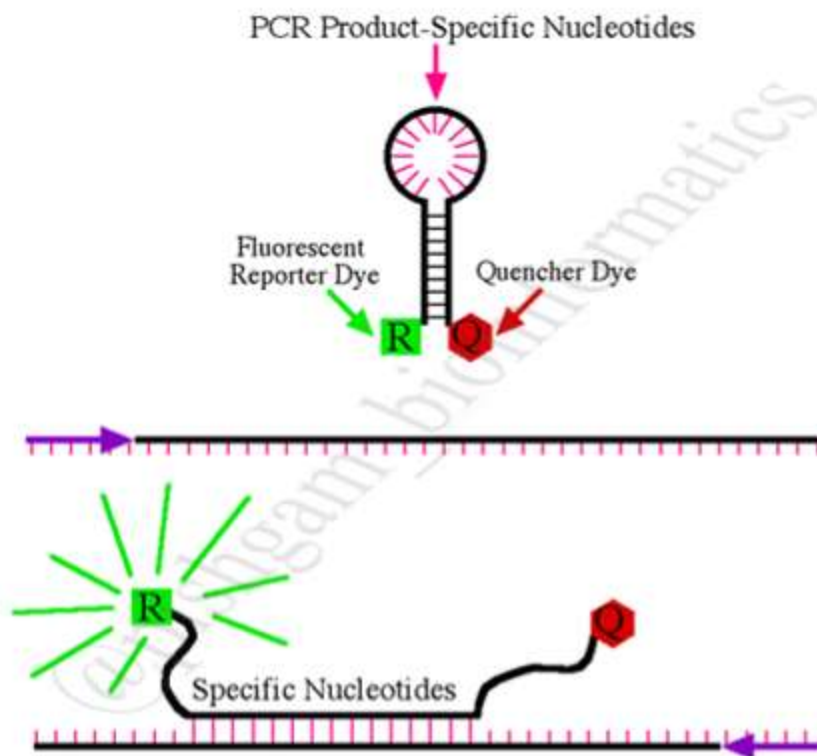


اساس این روش خاصیت 5' Exonuclease Activity آنزیم Taq DNA Polymerase می باشد.

یک Reporter در انتهای 5 و یک Quencher در انتهای 3 وجود دارد. در انتهای 3 یک بلاکر هم وجود دارد (این بلاکر باعث می شود که پروب به عنوان پرایمر استفاده نشود). پروب حدود چندباز بعد از انتهای 3 یکی از پرایمرها (Forward) طراحی می شود. طول این پروب 21 تا 31 نوکلئوتید می باشد.

آنزیم پس از نزدیک شدن به پروب با استفاده از خاصیت 5' Exonuclease Activity آن رانجریه می کند. وقتی پروب تجزیه شد ماده Reporter از تأثیر Quencher خارج شده و از خود فلورسانس ساطع می کند. در هر سیکل با آزاد شدن بیشتر Reporter ماده فلورسانس بیشتری ساطع گردیده و توسط دستگاه ثبت می شود.

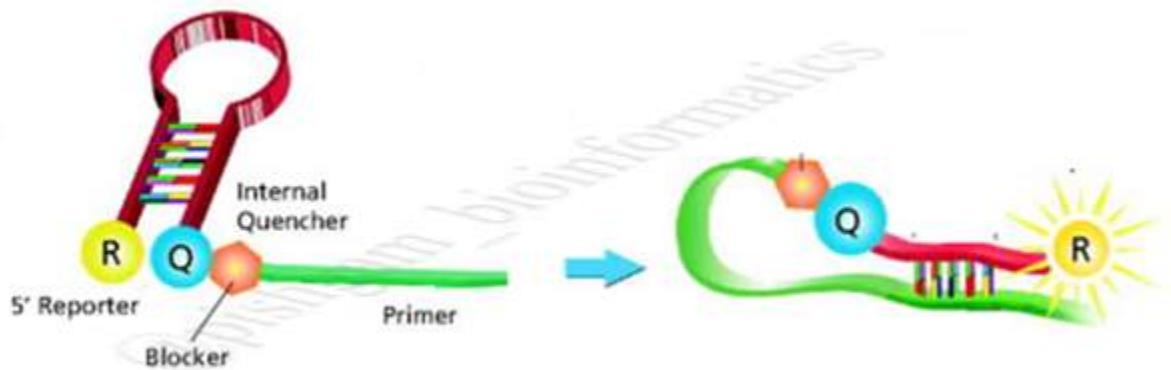
آموزش پروب های Beacon در روش روش ریل تایم (real time PCR)



این پروب نیز همانند پروب Taq Man در اتهای 3 و 5 پریم دارای رنگ بوده اما برخلاف Taq Man تجزیه نمی شود و در سیکلهای بعدی دوباره مورد استفاده قرار می گیرد.

این پروب قبل از اتصال به DNA به صورت لوپ است که به آن Stemloop structure می گویند. به علت نزدیکی Reporter و Quencher نور ساطع شده توسط Quencher مهار می شود. پس از اتصال پروب به محل موردنظر خود، ساختار Stemloop باز و در نتیجه رنگها از هم دور می شوند که نتیجه این امر تابش نور از Reporter است.

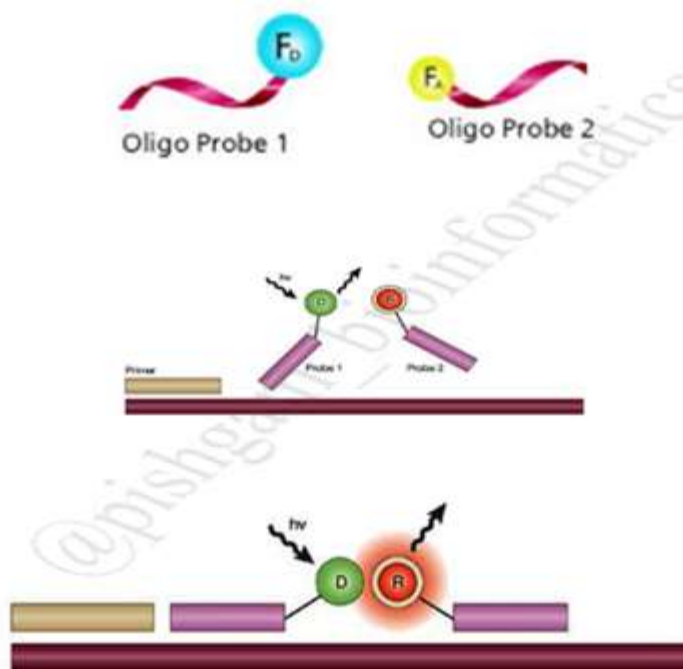
آموزش پروب های scorpions در روش روش ریل تایم (real time PCR)



توالی پروب طوری طراحی شده که مکمل تعدادی از نوکلئوتیدها بعد از پرایمر forward است. دو طرف پروب شامل توالی شش نوکلئوتیدی است که در دمای محیط ایجاد duplex می نماید. انتهای 5 ساقه به صورت کووالان به Reporter و انتهای 3 به Quencher متصل می باشد. هنگامی که پروب به صورت duplex است، نور ساطع نمی شود. یک بلاکر نیز از تکثیر پروب توسط پرایمر Reverse در چرخه بعدی PCR جلوگیری می کند.

جهت گیری پروب به صورتی است که انتهای 5 آن مکمل انتهای 3 تارگت می باشد. در طول سیکلهای PCR، همزمان با اتصال پرایمرها، لوپ پروب باز و به قسمت تکثیرشده از چرخه قبل متصل می شود و در نتیجه به علت جداسدن Reporter از Quencher نور ساطع می شود. در مرحله بعد پروب از Template جدا شده و به حالت خاموش در می آید. به این ترتیب در هر annealing با افزایش محصول PCR مقدار فلورسانس نیز افزایش می یابد

آموزش پروب های Fret در روش روش ریل تایم (real time PCR)



در این سیستم پروب به صورت دو قطعه مختلف طراحی می شود. فلورسانت در انتهای 5 یک پروب و فلورسنت دیگری نیز و در انتهای 3 پروب دیگر قرار دارد. وقتی که این دو دقیقاً در محل مورد نظر خودشان بچسبند نزدیکی فاصله این دو ماده باعث واکنشی به نام FRET می شود. انتخاب رنگها در این پروب به صورتی است که طول موج ساطع شده از یک فلورسنت به عنوان محرک ماده فلورسنت دوم عمل می کند. بنابراین پس از چسبیدن دو پروب بر روی محصولات این رنگهای فلورسنت به هم نزدیک شده و فلورسانس ساطع شده قابل اندازه گیری است. طراحی این پروبها به نحوی است که در صورت تفاوت حتی در یک نوکلیوتید پروب به DNA متصل نمی شود. یکی از کاربردهای این پروب ها در تشخیص SNP می باشد. در موتاسیونهای نقطه ای چون باز جهش یافته مکمل باز مورد نظر در پروب نیست اتصال صورت نمی گیرد.