به نام خداوند بخشنده مهربان

ژنتیکا

روشها و پروتکلهای ژنتیکی

www.genetica.ir

نگاه کلی به روش Real Time PCR به عنوان یک روش نوین در تشخیص آزمایشگاهی

• امیر سهرابی
دانشجوی دکتری تخصصی (PhD) پزشکی مولکولی دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
Sohrabi@razi.tums.ac.ir

• دکتر مسعود حاجیا
استاد میکروب شناسی پزشکی، بخش بیولوژی مولکولی آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
hajia@health.gov.ir

خلاصه

روش Real Time PCR انقلابی را در راه تشخیص مولکولی در آزمایشگاه‌های تشخیص بالینی باز کرده است. ایده اولیه این روش، ابتدا توسط Higuchi و همکارانش ارائه شد که به مفهوم مشاهده لحظه به لحظه واکنش براساس میزان فلورسانت ساطع شده از واکنش و مشاهده و ثبت آن در یک Detector می‌باشد. از آنجایی که اسید نوکلئیک تکثیر یافته و مراحل تشخیص در یک محیط بسته انجام می‌شود، ریسک آلودگی به محیط و واکنش‌های بعدی را به طور قابل ملاحظه نسبت به روش‌های کلاسیک و معمولی PCR کاهش می‌دهد. سرعت در انجام آزمایش، حذف مرحله ردیابی محصول پس از PCR، مشاهده لحظه به لحظه واکنش و قطع آن در هر زمان، حساسیت و اختصاصیت بالا و انجام واکنش کمی و به دست آوردن میزان دقیق ژنوم و الگوی اولیه در روش Real Time PCR باعث تحول عظیم در تشخیص مولکولی میکرو ارگانیسم ها، بررسی بیان ژن‌ها، ارزیابی درمان، تشخیص موتاسیون ها، افتراق آللی و بسیاری از کاربردهای دیگر شده است. به واسطه طراحی متفاوت که در انواع پروتکل‌های Real-Time ملاحظه می‌گردد، در این مطالعه سعی شده با بررسی انواع روش‌های نشانه گذاری، روش‌های انجام، محاسبه و همچنین نقش و کاربرد کنترل داخلی مورد بحث قرار گیرد.

کلید واژه: Real Time PCR، روش‌های نشانه گذاری، کنترل داخلی

مقدمه

از زمان معرفی روش PCR، این متد تحولات بسیاری را پیدا نموده به گونه‌ای که هم اکنون به عنوان یکی از دقیق ترین و سریع ترین روش‌های تشخیصی در بسیاری از عرصه‌های علوم به کار گرفته می‌شود. در راستای کاربردی تر شدن این روش، مکانیسم انجام و تشخیص نتایج حاصل از آن نیز دچار تحولات متعددی گردیده، که بررسی نتایج حاصل از آمپلیفیکاسیون با استفاده از مواد نشان دار یکی از آن موارد است. محققین شیوه‌ای را طراحی نمودند که به جای تعیین محصول با استفاده از روش الکتروفورز، محصول واکنش با استفاده از مواد نشانه‌گذاری ردیابی شود. حساسیت این روش گرچه نسبت به روش الکتروفورز بالاتر بود اما میزان حساسیت در ابتدا بستگی به نوع ماده نشاندار استفاده شده داشت. به تدریج در ادامه این تحولات در متد PCR، روش دیگری مورد استفاده قرار گرفت. در این شیوه از یک پروب نشاندار استفاده گردید که قابلیت اتصال اختصاصی به ژنوم هدف را داشت. این متدها در حال حاضر به دو صورت در کیت‌های تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در شیوه اول پروب نشاندار پس از تکثیر به محصول اضافه گردیده و در طی پروسه هیبریدایزیشن به محصول متصل می‌گردد. این روش از حساسیتی به مراتب بالاتر از روش قبلی برخوردار بوده و روش PCR Hybridization نامیده می‌شود که در حال حاضر اساس روش Micro array بوده و بیشتر در تعیین ژنوتایپینگ به کار گرفته می‌شود.

در روش دوم پروب نشانه‌گذاری در طی واکنش حضور داشته و در هر سیکل تکثیر در طی تکثیر تجزیه شده و نور ساطع شده از آن در هر سیکل قابل اندازه گیری خواهد بود. این روش به Real Time PCR شناخته شده است. یک منحنی مطلوب را نشان می‌دهند و به اصطلاحات عمومی در Real Time PCR اشاره دارند (تصاویر ۱و۲).

روش‌های رایج نشانه‌گذاری در Real Time PCR

روش‌های نشانه‌گذاری که در Real Time PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد را می‌توان در دو دسته کلی مورد مطالعه و بررسی قرار داد.

۱-روش مبتنی بر استفاده از رنگ‌های متصل شونده به DNA

در این دسته می‌توان به رنگ‌های SYBR Green I ,YO-PRO-1 ,Eva Green , اشاره نمود.

رنگ SYBR Green I با اتصال و جایگزین شدن در DNA Minor Groove در مرحله Annealing و تکثیر DNA، همزمان با افزایش دو رشته‌ای شدن DNA، نور فلورسانت بیشتری ساطع می‌شود و توسط دستگاه اندازه گیری می‌شود. از آنجایی که SYBR Green I به تنهایی قادر به تمایز بین محصولات اختصاصی و غیر اختصاصی نیست، باید منحنی Melt-Curve Analysis با توجه به نمودار ذوب برای هر نمونه رسم گردد. به طور مثال، پس از پایان PCR دستگاه دمای محصولات PCR را به دمای ۹٤ درجه سانتی گراد رسانده، که در این دما همه DNA ها تک رشته شده، سپس به طور منظم دما کاهش یافته و با دو رشته‌ای شدن DNA و جایگزینی و اتصال SYBR Green I و افزایش ناگهانی میزان فلورسانت ساطع شده، منحنی ذوب رسم می‌گردد که با آنالیز منحنی Melt-curve می‌توان تمایز بین باندهای غیر اختصاصی، اختصاصی و پرایمر دایمر را مشاهده کرد (تصویر ۳).

۲- استفاده از پروب ها

روش‌های مبتنی با استفاده از پروب‌های Hydrolysis:

به طور عمده با استفاده از انواع این پروب‌ها میزان حساسیت و اختصاصیت افزایش یافته است. تفاوت پروب در این است که یک رنگ فلورسانت به نام Reporter در'5 و رنگ فلورسانت دیگری در'3 به نام Quencher تعبیه می‌شود. هنگامی که Reporter Quencher , در فاصله نزدیکی از هم قرار دارند (در حالت عادی پروب)، اگر نوری ساطع شود توسط Quencher جذب شده و ثبت نمی‌گردد، ولی به محض جدا شدن این دو رنگ (در نتیجه تکثیر و شکسته شدن پروب) نور ساطع شده توسط Reporter توسط Quencher قابل جذب نیست و توسط دستگاه به صورت فلورسانت قابل ارزیابی و اندازه گیری است (جدول ۱و۲)(تصاویر ٤ و۵).

پروب Taq Man: آنزیم Taq Polymerase با استفاده از خاصیت فعالیت '5 اگزونوکلئازی (5' Exonuclease Activity) در حین تکثیر الگو پروب را تجزیه کرده سپس Reporter از Quencher جدا شده و فلورسانت ساطع می‌شود، که اساس روش Taq Man می‌باشد (تصاویر ٤ و۵).

پروب Beacons: این پروب ساختار لوپی شکل دارد ولی همانند پروب Taq Man دارای رنگ در انتهای'3 و'5 است ولی تجزیه نمی‌شود و در سیکل‌های بعدی دوباره مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۵).

روش مبتنی با استفاده از Hybridization Probes:

در این سیستم که اصطلاحا FRET نیز نامیده می‌شود، پروب به صورت دو قطعه مختلف طراحی می‌شود و رنگ فلورسانت در انتهای'5 یکی و انتهای'3 دیگری قرار می‌گیرد. وقتی این دو رنگ پس از چسبیدن پروب در کنار هم قرار می‌گیرند، فلورسانت ساطع شده توسط دستگاه اندازه گیری می‌شود (تصویر ۵).

به کارگیری کنترل داخلی

بـا توجه به اهمیت تمایز موارد منفی کاذب از موارد منفی حقیقی، اسـتفاده از کنترل‌های داخلی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

انواع شیوه‌های به کار گیری کنترل داخلی: از آنجا که در آزمایشـگاه تشخیص طبی که با تعداد بیشماری نمونه مواجه می‌باشیم ممکن است تعیین میزان موفقیت روش استخراج و همچنین میزان خلوص با استفاده از روش جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر عملی نباشد. لـذا محققین سـعی نموده اند روش‌هـای عملی برای این منظور معرفی نمایند. اسـتفاده از کنترل داخلی در آزمایش PCR به صورت‌های گوناگون مورد اسـتفاده قرار گرفته اسـت که می‌توان آن‌ها را به دو دسـته کلی رقابتی و غیر رقابتی تقسیم نمود.

کنتـرل داخلی غیر رقابتی: در این شـیوه علاوه بر پرایمرهای اختصاصی ژنوم هدف از یک جفت پرایمر دیگر نیز اسـتفاده می‌گردد. این جفـت پرایمر معمولا برای ژن‌هایی طراحی شده که اطمینان نسبت به حضور آن‌ها در انواع نمونه صرف نظر از مثبت بودن یا نبودن آزمایش PCR وجود داشـته باشـد. از مزیت‌های این روش آن اسـت که آن را می‌توان بـرای انواع متفاوت آزمایش مورد اسـتفاده قرار داد. از محدودیت‌های این شـیوه متفاوت بودن شرایط آزمایش آن با شرایط لازم برای ژنوم هدف می‌باشـد. نتیجه منفی حاصل از ست اختصاصـی و سـت کنترل داخلی نتیجـه منفی کاذب تلقی شـده و به معنی موفق نبودن روش خالص سازی اسـت که باید مجدد نمونه کلینیکی مورد تخلیص قرار گیـرد. در صورتی که هر دو سـت پرایمر در یک لوله مورد اسـتفاده قرار می‌گیرند از آنجـا که مواد و آنزیم پلیمراز توسط ست کنترل داخل نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد ضروری اسـت غلظت پرایمرها کنترل داخل در حداقل لازم مورد اسـتفاده قرار گیرد و همچنین در طراحی اولیه برای اندازه محصول مورد بررسـی دقیق قرار گرفته باشد. یکی از اولین روش‌هایی که برای این منظور در آزمایشـگاه مورد اسـتفاده قرار گرفت انجام یک PCR ابتدایی با پرایمرهای اختصاصی برای ژنوم انسـانی بـود. از آنجا که در یک نمونـه بالینی همواره سـلول‌های انسـانی وجود دارند انجـام موفقیت آمیز PCR با پرایمرهای مذکور نشـان دهنده آن می‌باشـد کـه مواد ژنومیک حاصل از پروسـه تخلیص عاری از ممانعت کننده بوده و عمل خالص سـازی به درسـتی صورت گرفته است.

کنترل داخلی رقابتی: پرایمر موجود علاوه بر اتصال بـه الگوی اختصاصی قادر به اتصال به یک قطعه دیگر می‌باشـد که در داخل کیت افزوده گردیده اسـت این قطعه معمولا از پلاسـمیدی تشـکیل شـده اسـت که نواحی مکمل پرایمر در داخل آن ایجاد گردیده و قادر به تولید محصولی با اسـتفاده از همـان پرایمر با طول بیشـتری خواهد بود. در صورت عدم حضور DNA اختصاصی در نمونه خالص شده بیمار، این ناحیه تکثیر یافته و محصولی متفاوت از محصول اصلی با اندازه‌ای به مراتب بزرگتر را تولید می‌نماید که قابل تشـخیص و تفکیـک از طول محصول اختصاصی خواهد بود. در صورت وجـود DNA اختصاصـی پرایمر در رقابت با قطعه کنترل داخلی به واسـطه اندازه کوچکتر بیشتر تکثیر خواهد یافت و فرصت چندانی برای تکثیر کنترل داخلی باقی نخواهد ماند و نهایتا در صورت عدم وجود محصـول اختصاصی و محصول کنترل داخلی به معنی نتیجه منفی کاذب بوده که ناشی از عدم موفقیت روش خالص سازی می‌باشد. در این روش باید توجه داشت که پایین ترین غلظت از قطعه کنترل داخلی در مخلوط واکنشـی اسـتفاده گردد. چرا که در غیر اینصورت به واسـطه مقادیر بالای آن تکثیـر ژنوم هدف تحت تاثیر قرار خواهد گرفت و سـبب کاهش حساسیت تست و بالطبع کسب نتیجه منفی کاذب می‌گردد.

متدهای انجام Real Time PCR

در ارزیابی بیان ژن دو روش ذیل وجود دارد:

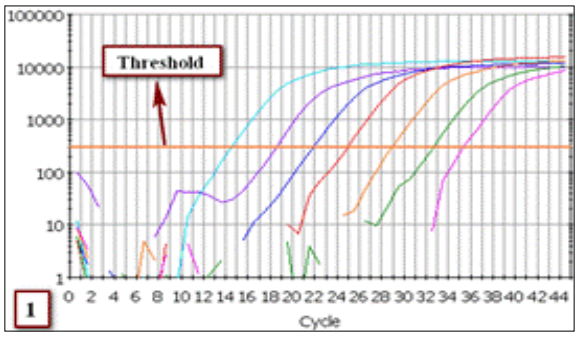
۱- کمیت سنجی مطلق(Absolute Quantification):

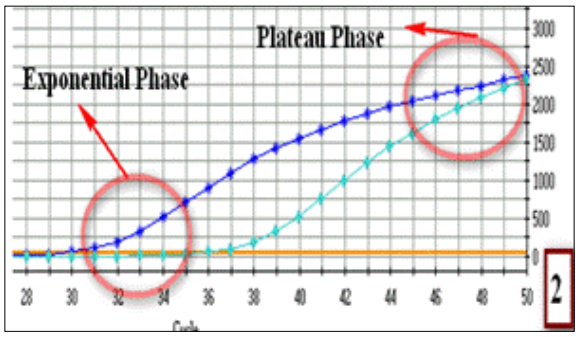
در ایـن روش محاسـبات تعـداد کپـی ژن معمولا با اسـتفاده از سـیگنال Real Time PCR نسـبت به یک منحنی استاندارد به دسـت می‌آید. برای به دست آوردن مقـدار کپی از الگوی اولیه و یا شـرایط کارایی واکنش Real Time PCR با استفاده از رقت سازی

DNA الگو و یا اســتانداردهایی که مقدار آن‌ها مشخص اســت، می‌توان منحنی اســتاندارد را بر این اساس ترسیم کرد. شیب خط منحنی و ضریب رگرسیون باید به ترتیب تقریبا $R2 < 1$, $0.9< M=3.3$ باشد تا Efficiency ۱۰۰ درصــد (یعنــی در هر واکنش مقدار ژنــوم دو برابر شود) حاصل گردد (شکل ٦). البته در روش Absolute Quantification بدون رسم منحنی استاندارد و محاسبه تعداد کپی در تشخیص کیفی (وجود یا عدم وجود الگوی ژنــی مورد نظــر) در کیت‌های تشــخیص مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (تصویر شماره ٦).

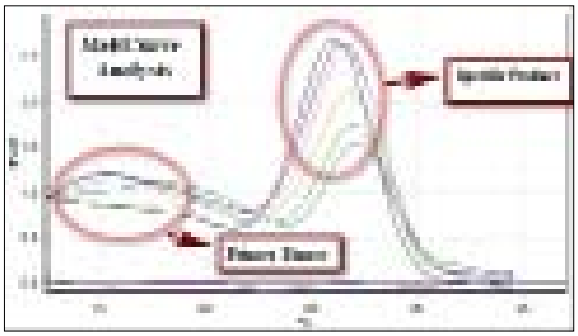
۲- کمیت سنجی نسبی(Relative Quantification):

اطلاعات ژن مورد نظر نسبت به کالیبراتور یا یک کنترل ژن داخلی نشــان داده می‌شود. از متدهای استفاده شده در این رابطه می‌توان به روش‌های($2^{-\Delta\Delta C_T}$) Comparative CT و Pfaffl اشاره کرد. این روش بیشتر در ارزیابی بیان ژن به همراه روش Absolute مورد استفاده قرار می‌گیرد.





تصاویــر ۱ و ۲- ســیکلی را کــه در آن منحنــی Real Time PCR خــط Threshold را قطــع می‌کند CT گفته می‌شــود و از این ســیکل به بعد تکثیر وارد فــاز لگاریتمی شــده و فازهــای Exponential, Amplification و در نهایت به فاز اشــباع (Plateau Phase) می‌رسد.



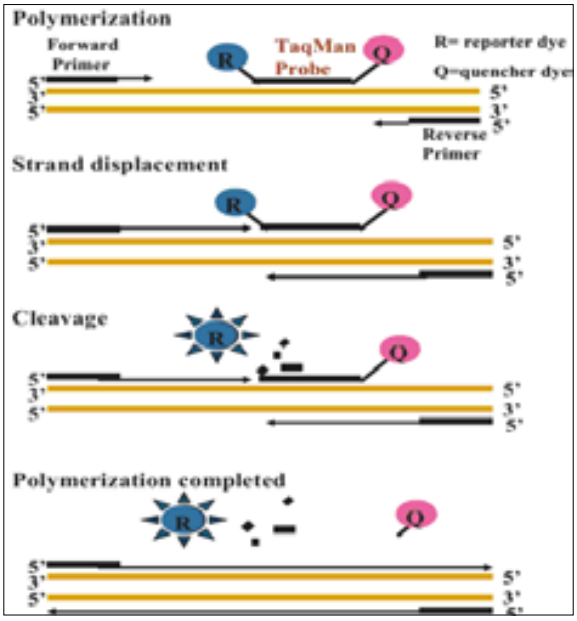
تصویر ۳- منحنی Melt Curve Analysis

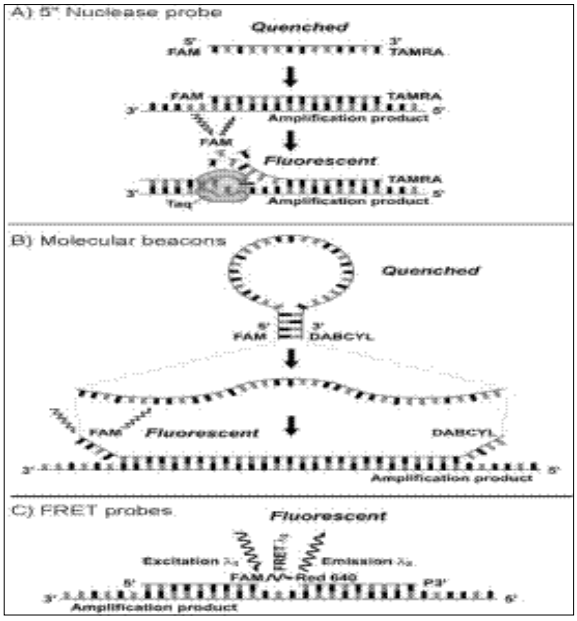
Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM, SYBR Green I, Fluorescein, EvaGreen, Alexa Fluor 488
Yellow	530nm	555nm	JOE, VIC, HEX, TET, CAL Fluor Gold 540, Yakima Yellow
Orange	585nm	610nm	ROX, CAL Fluor Red 610, Cy3.5, Texas Red, Alexa Fluor 568
Red	625nm	660nm	Cy5, Quasar 670, Alexa Fluor 633
Crimson	680nm	710nm	Quasar 705, Alexa Fluor 680
HRM	450nm	510nm	SYTO 9, EvaGreen

جــدول ۱- پرکاربردتریــن رنگ‌هایــی که بــه عنوان Reporter در Real Time PCR مــورد اســتفاده قرار می‌گیرد.

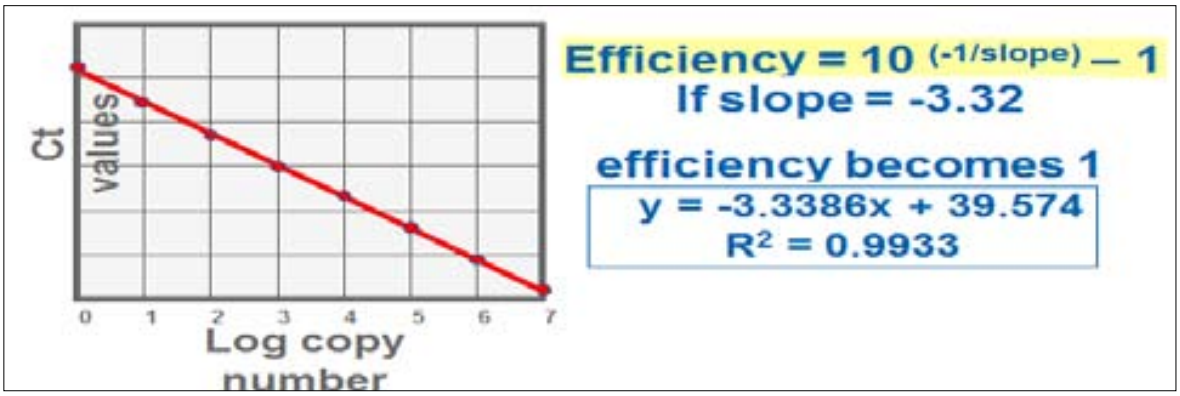
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

جدول ۲- معروف ترین دســتگاه‌های مورد استفاده در روش Real Time PCR





تصاویر ۵ و ٤- در این اشکال پروب های Taq Man, Beacon , FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) به تصویر کشیده شده است.



تصویر ٦- منحنی استاندارد را به همراه محاسبه Efficiency و در حالت مطلوب و ایده آل نشان می‌دهد.

References

1- Espy MJ, Uhl JR, Sloan M, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter JDC, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1): 165-256.

2- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Survey and Summary Real-Time PCR in Virology. NUCLEIC ACIDS RES 2002; 30(6):1292-1305.

3- Schmittgen TD, Livak KJ. Analysing Real Time PCR Data by the Comparative CT Method. Nat Protoc 2008; 3(6): 1101-1108.