

پروسی بیان ژن ها با تکنیک

Real time PCR

سایبرگوبین

حسین خرم دل آزاد

دکتر غلامحسین حسن شاهی

دکتر مؤمنان نوری

فهرست مطالب

۱	پیشگفتار و توصیه نامه جناب آقای دکتر کابلی
۳	پیشگفتار نویسندگان
۴	صل اول
۵	مقدمه Real time PCR
۸	مزایای استفاده از روش Real time PCR
۹	مروری بر روش‌های روش Real time PCR
۱۰	انواع روش‌های Real time PCR
۱۳	مروری بر Real time PCR و روش‌های آن
۱۳	DNA پلی مرالز
۱۴	دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات‌ها یا dNTPs
۱۴	غلظت منیزیم Mg concentration
۱۴	نقش تجهیزات، وسایل، تکنیک و کاربر
۱۵	الگو یا template
۱۶	طراحی یک پرایمر مناسب

- ۱۸..... Real time PCR واژه‌های مهم در
- ۱۸..... Baseline یا خط پایه
- ۱۸..... Threshold یا آستانه
- ۱۹..... Cycle threshold یا Ct
- ۲۰..... Standard Curve منحنی استاندارد یا
- ۲۱..... (Correlation coefficient (R^2 ضریب همبستگی یا
- ۲۱..... Y-intercept
- ۲۲..... Exponential phase فاز تصاعدی یا
- ۲۲..... Slope شیب یا
- ۲۲..... efficiency راندامان یا
- ۲۳..... Dynamic range
- ۲۳..... Absolute quantification تعیین کمیت مطلق یا
- ۲۴..... Relative quantification تعیین کمیت نسبی یا
- ۲۳..... (Melting curve (dissociation curve منحنی ذوب یا تفکیک

۲۵..... Real time PCR در سیستم تشخیص فلورسنت

۲۷..... اختصاصیت سنجش ۵ پریم نوکلئاز

۲۸..... سایرگرین

۲۸..... اختصاصیت سنجش با سایرگرین

۲۹..... گسستگی پیوند سایرگرین

۳۱..... Real time PCR دستگاه

۳۱..... افتراق رنگ

۳۲..... آنالیز منحنی دمای ذوب

۳۳..... اهمیت آنالیز منحنی دمای ذوب

۳۳..... منحنی دمای ذوب و پدیده دایمر پرایمر

۳۴..... چگونگی انجام منحنی دمای ذوب

۳۴..... Passive reference dyes یا رنگ‌های مرجع غیرفعال

۳۵..... Real time PCR از آلودگی در

۳۵..... کنترل‌های داخلی و ژن‌های مرجع

- ۳۶..... Real time PCR در تضمین کیفیت در کالیراسیون ۱۱۰
- تصحیح اختلاف و خطای انتشار و تحریک پذیری
- ۳۶..... (Excitation/emission)
- ۳۷..... نوسانات اپتیکی
- ۳۹..... فصل دوم
- ۴۰..... طرحی یک آزمایش Real time PCR
- ۴۰..... انواع کاربردهای تشخیص Real time PCR
- ۴۱..... نکات مهم در مورد آلیمن پرایمرها
- ۴۲..... آلودگی DNA ژنومیک
- ۴۵..... روش‌های خالص سازی نوکلئیک اسید در Real time PCR
- ۴۸..... سنجش میزان خلوص RNA
- ۴۹..... پرایمرهای الیگو dT و رندوم
- ۵۱..... کنترل‌ها
- ۵۱..... روش‌های یکسان سازی یا نرمالیزاسیون

استفاده از منحنی استاندارد در Real time PCR برای تعیین میزان راندمان و حساسیت آزمایش	۵۵
راندمان واکنش	۵۶
فصل سوم	۵۹
انجام آزمایش Real time PCR	۶۰
سبب کردن پلیت Real time PCR	۶۲
تعریف پروتکل Real time PCR در دستگاه	۶۳
تعریف مختصات و پیک برای هر واکنش	۶۴
فصل چهارم	۶۶
تجزیه و تحلیل داده‌ها	۶۷
تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش نسبی	۶۷
بررسی فرمول ساده شده $\text{Fold difference} = 2^{\Delta\Delta Ct}$	۶۸
بررسی فرمول $\Delta\Delta Ct$	۶۸
کمیت سنجی نسبی با استفاده از منحنی استاندارد	۷۰
فصل پنجم	۷۲

- ۷۳..... خطاهای رایج در Real time PCR
- ۷۵..... روش‌های تعیین دایمر پرایمر
- ۷۵..... ژل الکتروفورزیس
- ۷۶..... استفاده از نتایج منحنی تفکیک یا دمای ذوب
- ۷۷..... اقدامات تشخیصی در جهت عدم تشکیل دایمر پرایمر
- ۷۸..... نگهداری و ذخیره سازی پرایمرها
- ۷۹..... نگهداری طول مدت پرایمر و پروب
- ۸۰..... عوامل مداخله‌گر، مهارکننده، کاهش دهنده راندمان
- ۸۱..... اقدامات اصلاحی در جهت تصحیح راندمان
- ۸۲..... خطاهای فنی کاربر
- ۸۲..... مشکلات نرم‌افزاری
- ۸۴..... استفاده از رنگ‌های مرجع مانند ROX
- ۸۵..... منابع

به نام خداوند جان و خرد

کتاب حاضر با عنوان Real Time PCR محصول تجربه علمی و تلاش‌های چندین ساله و نشانگر احاطه عملی و نظری دوست و همکار عزیز و پرتلاشم، استاد ارجمند جناب آقای دکتر حسن شاهی و همکاران ایشان می‌باشد. در این کتاب ارزشمند، علاوه بر اختصارگوئی و اجتناب از غاله نابجای مطالب که می‌توانست برای خواننده کسالت‌آور باشد، در عین زمان، توصیه‌ات کافی موجب حفظ جامعیت این اثر علمی گردیده است. یکی از خصوصیات این کتاب قابل‌استفاده بودن آن در مقاطع مختلف تحصیلات، شدایی، از کارشناسی تا دکترا در تمامی رشته‌هایی است که زمینه بیولوژی مولکولی در آنها موجود است. خواننده این کتاب علاوه بر آگاهی از تاریخچه و سیر تحول PCR، اطلاعات دقیق، کاربردی و جامعی از جزئیات علمی و عملی این مهم‌ترین روش تشخیصی در حوزه‌های پزشکی مولکولی، بیولوژی مولکولی، ژنتیک مولکولی و رشته‌های مرتبط و پیرامونی همچون ایمونولوژی، میکروبیولوژی، بیولوژی به دست می‌آورد. به همین سبب مطالعه دقیق و به کار گرفتن نکات ظریفی که حاصل سال‌ها زحمت و ممارست علمی و عملی نویسندگان این کتاب در دانشگاه‌ها و مراکز علمی ایرانی و بین‌المللی می‌باشد را ابتدا به همه دانشجویان عزیز و طالبین واقعی علم در تمامی مقاطع عالی دانشگاهی در حوزه‌های نام‌برده در بالا توصیه می‌نمایم.

این‌جانب در طول آشنای حدود بیست‌ساله‌ای که با جناب آقای دکتر حسن شاهی داشته‌ام گواهی می‌دهم که باوجود باقی ماندن آثار و یادگاری‌هایی که از زمان جنگ تحمیلی بر پیکر ایشان برجای مانده و لاجرم باعث زحمت مضاعف ایشان در مقایسه با همکاران و همگنان دوران دانشجویی در دانشگاهی مانند دانشگاه منچستر انگلستان می‌گردید، اما ایشان با تحمل مشکلات جسمی، علاوه بر اینکه از دانشجویان دیگر به‌هیچ‌وجه عقب نماندند، بلکه با روحیه مثال‌زدنی خود، در محیط بسیار رقابتی دانشگاه منچستر، روحی از دانشجویان را به دنبال خود به جلو می‌کشیدند که با توجه به جمعی شرایط، این وضعیت قابل‌تحسین و شایسته الگوبرداری جوانان و دانشجویان غریب است.

توفیق در خدمت به جامعه علمی برای همگان و به‌ویژه نویسندگان محترم و خوانندگان گرامی این کتاب، از نگاه عالم حقیقی مسئلت دارم.

دکتر مجید کابلی MD, PhD

گروه ژنتیک پزشکی

دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

پیشگفتار

امروزه تکنیک‌های نوین سلولی و مولکولی کاربرد وسیعی در علوم زیستی پیدا کرده و روزبه‌روز شاهد معرفی روش‌های دقیق و مؤثرتر در این زمینه هستیم. کاربرد وسیع این روش‌ها در تشخیص انواع بیماری‌ها، عوامل بیماری‌زا، تعیین توالی ژن‌ها، بیان انواع ژن‌ها، طبقه‌بندی ارگانیسم‌ها و رامنل بیماری‌زا در اپیدمی‌های مختلف در مناطق مختلف جهان، ایجاد تغییرات در روش‌های ژنتیکی در باکتری‌ها، ویروس‌ها، گیاهان و حتی جانوران در جهت تشخیص به موقع و یا درمان بیماری‌های مربوطه همگی از اهمیت و ضرورت فراگیری و گسترش این روش‌ها در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی علوم زیستی حکایت دارد. در این مجموعه با توجه به اهمیت بررسی بیان ژن‌ها با تکنیک Real time PCR و استفاده شایع محققین از سایبرگرین، بر آن شدیم تا به طور خلاصه و کاربردی، این روش را در ابعاد مختلف مورد بررسی قرار دهیم. اما در این مجموعه که گردآوری آخرین اطلاعات ثابت‌شده در مورد Real time PCR است، بتواند برای دانشجویان رشته‌های مختلف علوم زیستی جهت آشنایی هر چه بیشتر با این تکنیک مفید واقع شود.

نگارنده: نگارنده

مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان