

بررسی میزان کارایی روش Real-Time PCR با استفاده از دو راهکار رسم منحنی استاندارد و رگرسیون خطی

علی خدادادی^۱، مریم حمیدی نیا^۲، مهری غفوریان^۳، جواد محمدی اصل^{۴*}

چکیده

زمینه و هدف: آنالیز کمی mRNA با استفاده از Real-Time PCR به وسیله روش سایبرگرین به طور وسیعی در مطالعات بیولوژیک کاربرد بسیاری پیدا کرده است. هدف این تحقیق مقایسه کارایی PCR محاسبه شده با استفاده از دو روش شیب خط نمودار استاندارد و نرم افزار LinRegPCR جهت تعیین استراتژی بهتر برای محاسبه کارایی PCR می باشد.

روش بررسی: در این پژوهش پس از خون گیری و استخراج RNA و سنتز cDNA فرآیند qRT-PCR انجام شد. سپس محاسبه PCR Efficiency به دو روش رسم منحنی استاندارد و همچنین با استفاده از نرم افزار LinReg PCR انجام گرفت و در نهایت این دو روش آنالیز با هم مقایسه شدند.

یافته ها: میزان کارایی PCR محاسبه شده برای سه ژن TGF β , GAPDH و IL-10 با روش منحنی استاندارد به ترتیب ۱/۸۱، ۱/۸۷ و همچنین با روش استفاده از نرم افزار رایانه ای LinReg PCR کارایی این سه ژن به ترتیب ۱/۹۸، ۱/۸۲ و ۱/۸۲ به دست آمد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد که در آنالیز داده های حاصل از تکثیر cDNA میزان کارایی PCR به دست آمده برای سه ژن TGF β , GAPDH و IL-10 با دو روش مختلف منحنی استاندارد و LineRegPCR نتایج تقریباً یکسانی حاصل می شود. بنابراین، توصیه می شود که به جای روش پرهزینه منحنی استاندارد از نرم افزار LinReg PCR استفاده گردد.

کلید واژگان: Real-Time PCR، PCR Efficiency، سایبرگرین، نرم افزار LinReg PCR.

- ۱- استادیار گروه ایمونولوژی.
- ۲- دانشجوی کارشناس ارشد گروه ایمونولوژی.
- ۳- دانشیار گروه ایمونولوژی.
- ۴- استادیار گروه ژنتیک پزشکی.

- ۱- گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران.
- ۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران.
- ۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران.
- ۴- گروه ژنتیک پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران.

* نویسنده مسؤول:

جواد محمدی اصل؛ گروه ژنتیک پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۳۰۶۰۲۴۳

Email: mohammadi-asl@ajums.ac.ir

مقدمه

میزان محصول توالی هدف به دو روش انجام می‌پذیرد: (۱) اندازه‌گیری مطلق (۲) اندازه‌گیری نسبی. در اندازه‌گیری مطلق تعداد توالی هدف موجود در یک نمونه مشخص می‌شود که این روش نیازمند یک نمونه استاندارد است تا میزان دقیق تعداد توالی مورد نظر در آن مشخص باشد که این می‌تواند پلاسمید ژن مورد نظر باشد و در اندازه‌گیری نسبی، میزان بیان ژن مورد نظر را نسبت به ژن‌های ساختاری سلول تحت عنوان *housekeeping gene* بیان می‌کنند. از جمله ژن‌های ساختاری سلول می‌توان به β Actin و GAPDH اشاره کرد که در این پژوهش از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده می‌شود.

داده‌های فلورسنس به دست آمده از Real-time PCR می‌بایست توسط روش‌های آنالیز برای کسب میزان نسبی mRNA هدف رونوشت‌برداری شده، مورد پردازش قرار گیرند. چندین تکنیک برای آنالیز داده‌های حاصل Real-time PCR از وجود دارد که باید مناسب-ترین انتخاب شود. اسکرین و همکاران نشان دادند که نتایج حاصل از اندازه‌گیری به‌طور مشخص بستگی به روش مورد استفاده جهت آنالیز داده‌ها دارد و راهکار آنالیزی متفاوت، ممکن است نتایج بیولوژیکی متضاد در پی داشته باشد (۱۷). آنالیز نتایج Real-Time PCR به دو نوع صورت می‌گیرد. در نوع اول که بدون تصحیح کارایی PCR است و از فرمول $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ استفاده می‌شود (۱۸). در روش دوم، نقش میزان کارایی PCR (PCR Efficiency) مورد توجه قرار می‌گیرد و در محاسبات وارد می‌شود. در این متدها برای بررسی تفاوت بیان mRNA در مقایسه با یک ژن کنترل، از فرمول زیر استفاده می‌شود (۱۹).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{P}}^{\text{target}}(\text{control}-\text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{P}}^{\text{ref}}(\text{control}-\text{sample})}}$$

در این روش برای محاسبه میزان کارایی PCR از دو روش استفاده می‌گردد. الف) بر اساس شیب خط و با استفاده از انجام PCRهای با رقت‌های متفاوت. ب) با

روش به‌کارگیری PCR جهت تکثیر یک قطعه خاصی از DNA اول بار توسط Kerry Mullis در سال ۱۹۸۳ معرفی شد (۱). اگر رونوشت‌برداری معکوس Reverse Transcription (RT) با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR) دنبال شود، قدرتمندترین و حساس-ترین فناوری جهت تکثیر و تشخیص مقدار اندکی mRNA حاصل می‌شود (۵-۲). امروزه جهت تعیین کمیت مقدار اندکی از ژن‌های بیان شده در بسترهای زیست‌شناختی روش-*real-time quantitative RT-PCR* (qRT-PCR) یک شیوه‌گزینش شده است. این روش بدون دردسر انجام می‌شود و در مقایسه با روش "RT-PCR نیمه کمی نقطه پایانی" (semi-quantitative end point RT-PCR) برتری‌هایی مثل حساسیت و اختصاصیت زیاد، قابلیت تکثیر خوبی دارد (۶-۱۱).

qRT-PCR حساس‌ترین و معتبرترین روش می‌باشد، به‌ویژه جهت تشخیص مقدار اندکی رونوشت-برداری در بافت‌ها با غلظت‌های پایین RNA و همچنین RNAهایی که تا حدی تنزل یافته‌اند (۹، ۱۲، ۱۳). روش Real-time PCR از جمله حساس‌ترین و معتبرترین روش‌های اندازه‌گیری بیان ژن می‌باشد و به‌طور وسیع برای بررسی ریزآرایه (microarray verification)، تعیین خاصیت پاتوژن، تعیین خاصیت سرطان، یافتن تعداد کپی ترانس ژنیک و مطالعات دارو درمانی استفاده می‌شود (۱۱، ۱۴-۱۶). آنالیز کمی mRNA با استفاده از Real-Time PCR به‌وسیله روش سایبرگرین (SYBR® Green) به‌طور وسیعی در مطالعات بیولوژیکی کاربرد پیدا کرده است. اساس روش Real-Time نورسنجی است، بدین صورت که میزان نور فلورسنس از هر تیوپ ساطع می‌شود، در هر سیکل توسط دستگاه خوانده می‌شود. میزان نور فلورسانس ساطع شده توسط محصولات، نمایانگر میزان نمونه اولیه خواهد بود و با میزان محصولات PCR نسبت مستقیمی دارد. اندازه‌گیری

های خود ایمنی مانند: رماتیسم مفصلی، دیابت و... می-باشند.

دو سی سی از خون سپاهرگی به لوله‌های فالكون ۱۵ سی سی که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر ضد انعقاد EDTA با غلظت ۱۰ درصد بوده اضافه شد و با روش زیر عمل جداسازی RNA انجام شد: به لوله حاوی خون سپاهرگی ۱۳ سی سی محلول لیز کننده گلبول قرمز (RBC Lysis) اضافه شده و ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شد. لوله با دور 600g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس محلول رویی آن خارج شد. یک سی سی لیزکننده RBC به رسوب اضافه شده و به لوله ۱/۵ سی سی (موسوم به لوله Eppendorf) انتقال داده شدند. لوله‌ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول رویی خارج گردید. به رسوب حاصل ۱ سی سی بافر PBS سرد اضافه شده و لوله با سرعت ۳۰۰۰ دور در ثانیه و به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول رویی آن خارج گردید. به رسوب حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر PBS سرد اضافه شد و بعد از حل شدن ۱ سی سی معرف (RNA Plus(cina gene, Iran) اضافه و محلول حاصل به آرامی به هم زده شد تا کاملاً شفاف گردد. به لوله ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سه لایه تشکیل شد که لایه رویی آن حاوی RNA بود. محلول بالایی، جدا شده و به لوله‌ها ۱/۵ سی سی که بر روی یخ قرار داشت، انتقال داده و به آن ۱۰۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. لوله‌ها با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی آن خارج گردید. یک سی سی اتانول ۷۵ درصد اضافه شده و لوله حاصل با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی خارج شد و فرصت داده شد تا الکل کاملاً خشک شود، سپس ۵۰ میکرولیتر DEPC Treated Water به لوله‌ها اضافه شد و ۱۰

استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR که با مقایسه میزان تکثیر DNA در هر تیوب در هر سیکل نسبت به سیکل قبلی میزان کارایی PCR محاسبه می‌شود (۲۰).

هر دو روش مذکور هم اکنون در تحقیقات مولکولی استفاده می‌شوند، اما هنوز استاندارد طلایی برای بررسی نتایج Real-Time PCR مشخص نشده است (۲۱). هدف از انجام این مطالعه، مقایسه کارایی PCR به دست آمده با دو روش شیب خط در نمودار استاندارد و با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR می‌باشد، تا اگر نتایج مشابهی در تعیین میزان کارایی PCR بین دو روش مذکور به دست آمد، ساده‌ترین و کم هزینه‌ترین روش به عنوان یک روش قابل قبول برای بررسی نتایج Real-Time PCR معرفی گردد.

روش بررسی

در این پژوهش علوم پایه، نمونه‌گیری آسان و در دسترس انجام شد. افراد بیمار: شامل ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان بودند که به بیمارستان‌های گلستان، آپادانا و امام خمینی شهر اهواز مراجعه کرده بودند و بیماری آنها با توجه به علائم کلینیکی و ماموگرافی توسط متخصص جراحی تشخیص داده شده بود. بدخیمی آنها توسط متخصص آسیب‌شناسی مورد تأیید قرار گرفته است.

میانگین سن بیماران ۴۸/۱۷±۱۲/۴ با محدوده سنی ۳۱-۷۹ سال بوده است. این بیماران تحت شیمی درمانی قرار نگرفته بوده‌اند و اطلاعات لازم از قبیل وضعیت شیمی درمانی، سن، سابقه بیماری، وضعیت یائسگی، مرحله بیماری با استفاده از اطلاعات موجود در پرونده جمع‌آوری شده و اطلاعات دیگر از قبیل اندازه تومور و وضعیت متاستاز بیماران با استفاده از گزارش پاتولوژی تهیه گردید.

افراد کنترل: این افراد شامل ۴۰ نفر زن با میانگین سنی ۴۹/۲۸±۹/۱ و محدوده سنی ۲۹-۷۰ بوده که فاقد هر گونه علامت یا نشانه‌ای از تومورهای خوش‌خیم و بدخیم در خود یا بستگان درجه اول‌شان بودند و نیز فاقد بیماری-

ردیف بازی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ درج گردیده است. مراحل انجام Real-Time PCR به شرح زیر بود: ابتدا پرایمرهای با غلظت ۵۰ نانو مول تهیه کرده، سپس Master Mix، پرایمرها و DEPC treated water به دمای محیط رسانده و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه (short spin) آماده استفاده شدند، استریپ‌های (تیوب-های) ۱۰۰ میکرولیتری متصل به هم مخصوص دستگاه ABI Real-Time PCR (دستگاه بر روی یخ در زیر هود قرار داده و به آنها ۱۰ میکرولیتر Master Mix، یک میکرولیتر از هر پرایمر اضافه شد، در این مرحله cDNA روی یخ ذوب گردید و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه (short spin) آماده شده و به هر استریپ ۲ میکرولیتر اضافه گردید، استریپ‌ها در دستگاه قرار داده و PCR طبق برنامه دمایی زیر انجام شد.

Cycling Condition:

10 Minute @ 95°C for Enzyme activation

15 second @ 95°C for cycle denaturation

60 second @ 60°C for extension

نمودار منحنی ذوب (Melting Curve): قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب جهت هر ژن به دست آمد و با بررسی این منحنی‌ها صحت پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید گردید. - محاسبه Efficiency با روش شیب خط در نمودار استاندارد:

جهت بررسی بازده واکنش و شرایط حاکم بر آن، نمودار استاندارد رسم گردید. برای این کار رقت‌های مختلف از یک cDNA را تهیه کرده، سپس برای آنها تست Real-time PCR انجام شد و از CT‌های حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم نمودار استاندارد استفاده گردید. بعد از تهیه نمودار استاندارد به وسیله فرمول زیر بازدهی واکنش Real-time PCR محاسبه گردید:

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

محاسبه بیان ژن‌ها بر اساس فرمول $(-\Delta\text{CT}) + 1 + \text{Efficiency}$ که نسبت بیان ژن را به ژن رفرانس بر اساس فرمول Pfaffl method انجام پذیرفت که در این

دقیقه در دمای ۵۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این RNA به دست آمده، آماده برای سنتز cDNA بود. قرائت غلظت RNA: بعد از اینکه RNA آماده شد، ابتدا غلظت آن جهت تعیین حجم مورد نیاز برای سنتز cDNA با فتومتر اندازه‌گیری گردید: خلوص و میزان RNA استخراج شده به روش رنگ‌سنجی به صورت زیر محاسبه می‌شود: ۵µl از محلول RNA در ۹۵µl آب مقطر حل شده و OD آن در ۲۶۰nm و در ۲۸۰nm و نیز ۳۲۰nm توسط اسپکتروفتومتر UV visible (ependorf) قرائت می‌شود و طبق فرمول زیر غلظت RNA محاسبه می‌گردد، و نسبت OD ۲۶۰nm/۲۸۰nm نیز برای تعیین خلوص RNA به دست می‌آید (خلوص بیشتر از ۱/۶ قابل قبول است).

$$\text{RNA concentration} = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times 40 \times 100$$

سنتز cDNA: در این مرحله، از RNA جدا شده از خون محیطی، cDNA ساخته شد، برای این منظور از کیت First strand cDNA (Fermentas, Finland) RevertAidTM Synthesis استفاده شد و کلیه مراحل روی یخ و در زیر هود و در شرایط استریل انجام گرفت. انجام Quantitative Real-Time PCR تکنیک به کار رفته در این تحقیق Real-Time PCR بوده که با این تکنیک میزان بیان mRNA ژن‌های مورد نظر با روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ Syber Green ارزیابی گردیده و میزان تکثیر در چرخه‌ای که بیان ژن‌ها قابل ردیابی بود، تحت عنوان Ct (Threshold Cycle) (نامیده و Ct‌های حاصل نسبت به Ct مربوط به بیان ژن Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) مورد ارزیابی قرار گرفت. از روش $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ برای بررسی تفاوت بیان mRNA استفاده گردید و از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شد. برای ژن‌های IL-10 و GAPDH پرایمرهای لازم با استفاده از سایت اینترنتی Primer3 طراحی شدند. برای ژن TGF-β از پرایمرهای استفاده شده در مقالات دیگر استفاده شد (۲۲).

یافته‌ها

الف - بررسی بازده و شرایط حاکم بر واکنش بر اساس روش منحنی استاندارد:

افزایش در شدت فلورسانس پلاسمیدهای حامل ژن مورد نظر که به‌طور متوالی رقیق شده‌اند، برای تهیه منحنی استاندارد جهت تخمین میزان اولیهٔ ملکول‌های الگو در نمونهٔ مورد نظر استفاده شد. این نتایج برای ژن‌های GAPDH، TGF- β و IL-10 به ترتیب در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ و جدول ۲ نشان داده شده است.

ب - بررسی بازده و شرایط حاکم بر واکنش با روش LinReg PCR:

داده‌های حاصل از real-time PCR بعد از Export شدن به فایل Excel با نرم‌افزار LinRegPCR آنالیز شدند. این نتایج برای ژن‌های GAPDH، TGF- β و IL-10 به ترتیب در شکل‌های ۴، ۵ و ۶ و جدول ۲ نشان داده شده است.

بررسی یک ژن رفرانس و یک یا چند ژن هدف وجود دارد. یک گروه به عنوان کالیبراتور شناخته می‌شود و بیان ژن‌ها نسبت به این کالیبراتور سنجیده می‌شود.

- محاسبهٔ Efficiency با روش LinRegPCR
: program

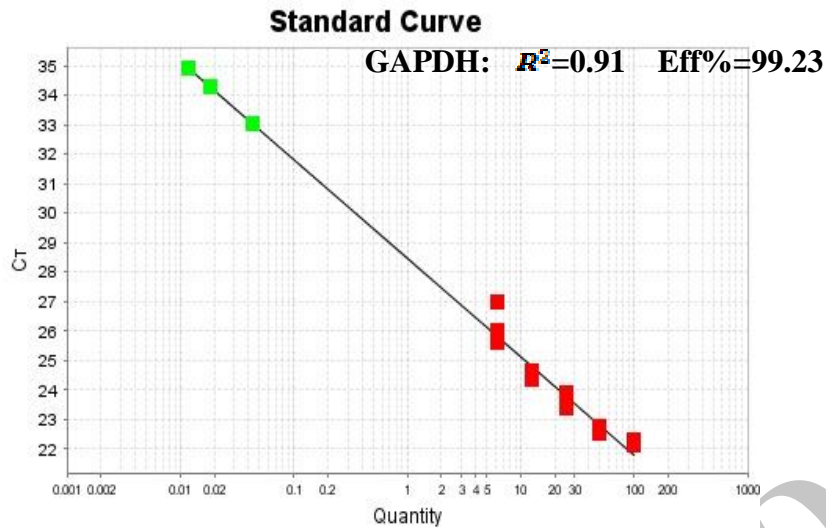
جهت بررسی بازده واکنش و شرایط حاکم بر آن از نرم‌افزار LinReg Analysis of quantitative RT-PCR data استفاده شد. بدین صورت که ابتدا داده‌های حاصل از دستگاه Real Time را به یک فایل Excel تبدیل کردیم. سپس نرم‌افزار LinRegPCR را باز کرده و طبق دستورالعمل help نرم‌افزار (LinReg PCR) داده‌های مربوطه را وارد کرده و محاسبهٔ Efficiency برای هر نمونه را قرائت کردیم. این نرم‌افزار محاسبهٔ کارایی تکثیر هر نمونه را به‌طور جداگانه می‌سنجد. برای این کار فاز لگاریتمی از منحنی تکثیر هر نمونه را با استفاده از انتخاب بیشترین و کمترین حد مشخص نموده، سپس آنالیز رگرسیون خطی از خط رگرسیون انجام می‌دهد.

جدول ۱: ردیف بازها، طول محصول و دیگر مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای ژن‌های GAPDH، TGF β و IL-10
بروش سایبر گرین PCR برای دو ژن GAPDH و IL-10 طراحی توسط سایت اینترنتی Primer3 انجام گرفت.

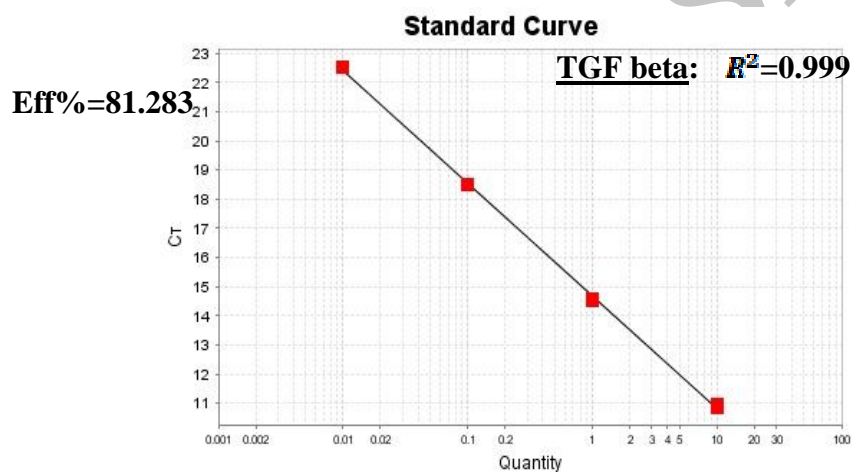
نام ژن	ردیف باز	طول محصول
GAPDH	F: GCAAGAGCACAAGAGGAAGA R: ACTGTGAGGAGGGGAGATTC	92
TGF β (Ref: 22)	F: CCCAGCATCTGCAAAGCTC R: GTCAATGTACAGCTGCCGCA	100
IL10	F: ACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGC R: TCACATGCGCCTTGATGTCTG	111

جدول ۲: میزان کارایی PCR محاسبه شده برای سه ژن GAPDH، TGF β و IL10 با دو روش منحنی استاندارد و نرم‌افزار LinRegPCR که تفاوت چندانی بین نتایج به‌دست آمده از دو روش مشاهده نمی‌شود.

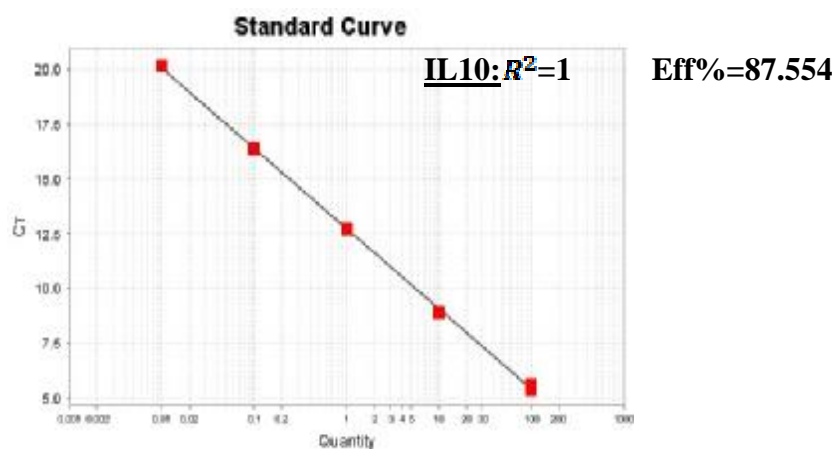
Gene/Method	Standard curve	LinRegPCR
GAPDH	1.99	1.98
TGF β	1.81	1.82
IL10	1.87	1.82



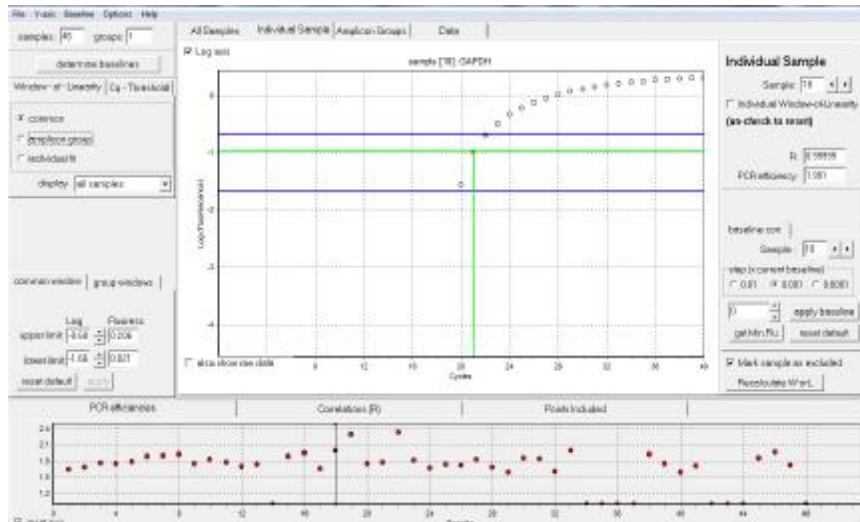
نمودار ۱: منحنی استاندارد به دست آمده برای ژن GAPDH با روش سایبر گرین PCR که کارایی ۹۹/۲۳ درصد به دست آمده است.



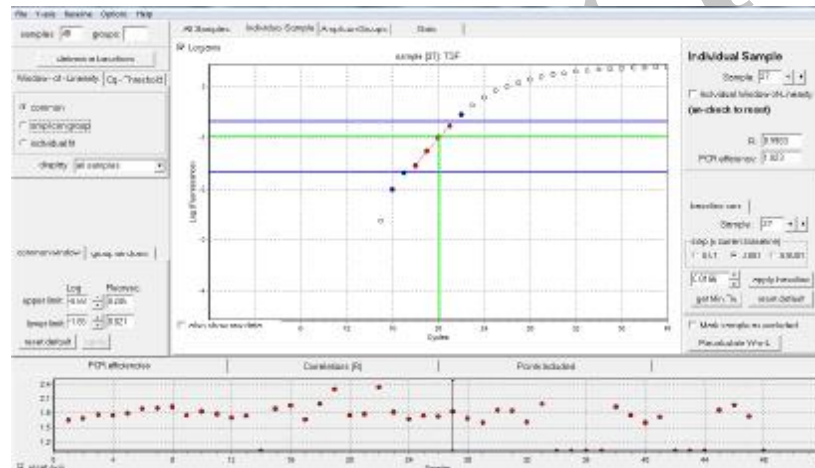
نمودار ۲: منحنی استاندارد به دست آمده برای ژن TGFβ با روش سایبر گرین PCR که کارایی ۸۱/۲۸ درصد به دست آمده است.



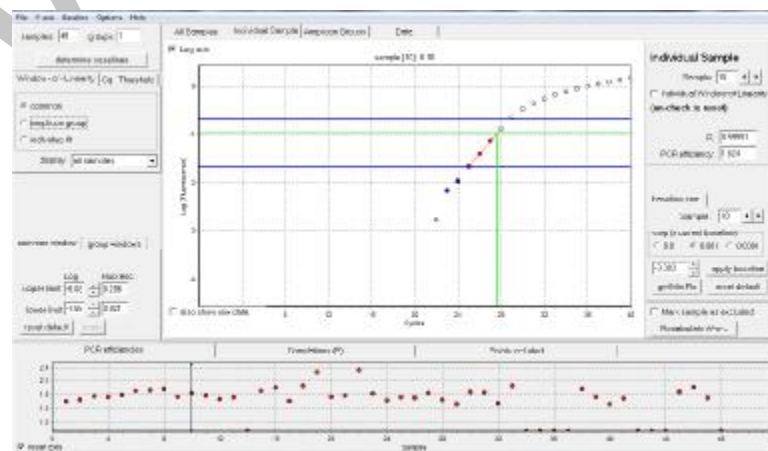
نمودار ۳: منحنی استاندارد به دست آمده برای ژن IL10 با روش سایبر گرین PCR که کارایی ۸۷/۵۵ درصد به دست آمده است.



نمودار ۴: نمایش خروجی نرم افزار LinReg برای بررسی بازده واکنش Real-Time PCR در ژن GAPDH که میزان کارایی برای هر تیوب به صورت نقطه قرمز رنگ در قسمت پایین شکل نشان داده شده است.



نمودار ۵: نمایش خروجی نرم افزار LinReg برای بررسی بازده واکنش Real-Time PCR در ژن TGF که میزان کارایی برای هر تیوب به صورت نقطه قرمز رنگ در قسمت پایین شکل نشان داده شده است.



نمودار ۶: نمایش خروجی نرم افزار LinReg برای بررسی بازده واکنش Real-Time PCR در ژن IL-10 که میزان کارایی برای هر تیوب به صورت نقطه قرمز رنگ در قسمت پایین شکل نشان داده شده است.

در حالتی که به طور حقیقی ۰/۰۴ تفاوت در کارایی PCR وجود داشته باشد، حدود چهار برابر تفاوت بیان به صورت کاذب در محاسبات به دست می آید (۲۰).

کارایی PCR در ژن هدف و ژن رفرانس می تواند از ۱/۸ تا ۲ متغیر باشد و وقتی میزان تفاوت در کارایی PCR را مورد توجه قرار دهیم، به سادگی یک تفاوت حقیقی ۱۰ برابری، بین دو نمونه به سادگی ممکن است بین ۰/۷ تا ۲۱۰ برابر تفاوت بیان گزارش شود (۲۰) و این نشان می دهد که میزان Ct شدیداً به میزان کارایی PCR وابسته است.

در روش منحنی استاندارد و انجام PCR با رقت های متفاوت از یک cDNA این مشکل غیرقابل حل هم وجود دارد که به دلیل رقیق شدن cDNA در رقت های کم تیوب های PCR، هم زمان بازدارنده هایی مانند نمک، فنل، کلروفرم و اتانول هم اگر در cDNA وجود داشته باشند، نیز رقیق می شوند و بنابراین در تیوب های PCR با رقت های کم، اثر سمیت این بازدارنده ها نیز کم می شود و بنابراین کارایی PCR در آنها افزایش می یابد. پس در این رقت های متفاوت کارایی PCR یکسان نیست و بنابراین کارایی PCR محاسبه شده دقیق نخواهد بود و معدلی از کارایی کم (تیوب های با میزان زیاد cDNA) تا کارایی زیاد (تیوب های با میزان کم cDNA) خواهد بود که تعمیم این میزان برای تیوب های تست با اشکال خواهد بود (۲۰).

در روش دیگر که با استفاده از نرم افزار LinRegPCR انجام می گیرد، میزان نور ساطع شده در هر سیکل را با سیکل قبل مقایسه می کند و بر این اساس میزان کارایی PCR را داخل تیوب بر اساس فرمول $N_c = N_0 \times \text{Effc}$ اندازه گیری می شود (۲۰). در این فرمول N_0 و N_c نور ساطع شده در سیکل c و $c-1$ می باشد و Effc معادل کارایی PCR در سیکل c است و نرم افزار معادل کارایی هر تیوب را در ۴ الی ۶ سیکل متوالی که

کلیه روش های کمی (qPCR) quantitative real-time PCR وابسته به اندازه گیری میزان تکثیر قطعات ژنی در هر سیکل PCR با استفاده از ملکول های ساطع کننده نور فلورسنت هستند و داده های فلورسنت جمع آوری شده از real-time PCR بایستی توسط روش های آنالیز داده ها بررسی شوند تا میزان تفاوت بیان mRNA در ژن هدف در مقایسه با ژن کنترل مشخص گردد. در روش کمی که با کمک سیستم نور فلورسانس سایبرگرین استفاده می شود تنها یک نوع محصول (آمپلیکون) PCR قابل تکثیر است، به دلیل اینکه اساس مولکولی نور ساطع شده توسط سایبرگرین، قرار گرفتن در داخل مولکول دو رشته ای DNA می باشد و بنابراین جهت مقایسه بیان دو ژن باید در دو تیوب جداگانه PCR عمل تکثیر DNA انجام گیرد. از نظر تئوری میزان DNA در هر سیکل PCR دو برابر می شود و به همین دلیل از فرمول 2^n برای محاسبه میزان تکثیر DNA استفاده می شود. اما در عمل این فرمول قابل استفاده نیست. چون میزان تکثیر در تیوب PCR همیشه دو برابر سیکل قبلی نیست، بنابراین نمی توان عملاً دو تیوب را با همدیگر در زمانی که کارایی تکثیر دو تیوب با همدیگر متفاوت باشند، مقایسه کرد. فرضیه وارد کردن کارایی تکثیر PCR اول بار توسط Pfafal ارائه شده است (۱۹). در کنار نرمال سازی با یک ژن رفرانس، کارایی PCR در Real-Time PCR دارای تأثیر عمده ای در دقت و اعتبار نتایج بررسی بیان ژن می باشد و تصحیح کارایی PCR می تواند در آنالیز دقیق نتایج و قابل اطمینان بودن آن تأثیر بگذارد (۲۱). در بیشتر متدهای آنالیز داده های حاصل از Real-Time PCR بر این فرض انجام می شود که کارایی PCR در هر تیوب در طول انجام سیکل ها و همچنین بین تیوب های متفاوت PCR ثابت است و حتی در بعضی متدها (بدون کاربرد منحنی استاندارد) برابر ۲ فرض می شود. متأسفانه در متدی که بدون محاسبه کارایی، مقایسه بیان دو ژن را انجام می دهند

انجام آزمایش‌ها را بالا می‌برد، بر اساس این نتایج می‌توان از انجام منحنی استاندارد صرف‌نظر کرد و با نرم‌افزار LinRegPCR داده‌ها را با دقت بالا و هزینه کمتر آنالیز نمود.

قدردانی

این مقاله با استفاده از بخشی از داده‌های پایان‌نامه کارشناسی ارشد سرکار خانم مریم حمیدی‌نیا تهیه شده است که اعتبار آن از طرف معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تأمین شده است و بدینوسیله از حمایت‌های این معاونت و گروه ایمنی‌شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی این دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

بیشترین کارایی را دارند، به صورت کارایی آن تیوب در خروجی نرم‌افزار نشان می‌دهد (شکل‌های ۴-۶).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که در آنالیز داده‌های حاصل از تکثیر cDNA میزان کارایی PCR به دست آمده برای سه ژن GAPDH, IL10, TGFB با دو روش مختلف منحنی استاندارد و LineRegPCR نتایج تقریباً یکسانی به دست می‌آید، بنابراین می‌توان هر دو را به جای همدیگر استفاده کرد. نظر به اینکه در روش منحنی استاندارد لازم است تا در هر بار اجرای آزمایش، رقت‌های مختلف برای هر ژن گذاشت و این موجب مصرف زیاد مواد مصرفی مختلف مانند میکس PCR و cDNA می‌شود و هزینه

منابع

- 1-Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990;48:579-82.
- 2-Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.
- 3-Lockey C, Otto E, Long Z. Real-time fluorescence detection of a single DNA Molecule. *Biotechniques* 1998;24:744-6.
- 4-Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002;29:23-39.
- 5-Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005;6:279-84.
- 6-Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time Monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology(NY)* 1993;11:1026-30.
- 7-Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1101.
- 8-Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:255-69.
- 9-Freeman TC, Lee K, Richardson PJ. Analysis of gene expression in single cells. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:579-82.
- 10-Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000;46:69-81
- 11-Bustin SA Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription Polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.
- 12-Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Brenner CA. Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol Hum Reprod* 1999;5:1034-9.
- 13-Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1292-305
- 14-Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002;8:257-60.
- 15-Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med* 2003;9:189-95.
- 16-Mason G, Provero P, Vaira AM, Accotto GP. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol* 2002;2:20.
- 17-Skern R, Frost P, Nilsen F. Relative transcript quantification by quantitative PCR: roughly right or precisely wrong?. *BMC Mol Biol* 2005;6:10.
- 18-Livak K. ABI Prism 7700 Sequence Detection System[Internet]. User Bulletin2. 1997 [cited 1997]. Available from: <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf>.

- 19-Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29: e45.
- 20-Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 2003;339:62-6.
- 21-Cikos S, Bukovska A, Koppel J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol* 2007;8:113.
- 22-Lee KY, Ito K, Hayashi R, Jazrawi EP, Barnes PJ, Adcock IM. NF-kappaB and activator protein 1 response elements and the role of histone modifications in IL-1beta-induced TGF-beta1 gene transcription. *J Immunol* 2006;176:603-15.

Archive of SID

Evaluation of Real-Time PCR Efficiency by the Use of Two Strategies: Standard Curve and Linear Regression

Ali Khodadadi¹, Maryam Hamidi Nia², Mehri Ghaforian³, Javad Mohammadi Asl^{4*}

1-Assistant Professor of Immunology.

2-Master of Science Student.

3-Associated Professor of Immunology.

4-Assistant Professor of Medical Genetics.

1- Department of Immunology, & Cellular & Molecular Research Center, School of Medicine, Ahvaz, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2-Department of Immunology, & Cellular & Molecular Research Center, School of Medicine, Ahvaz, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3-Department of Immunology, School of Medicine, Ahvaz, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

4-Department of Medical Genetics & Cellular & Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author:

Javad Mohammadi Asl;

Department of Medical Genetics & Cellular & Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Tel: +989163060243

Email: Mohammadi-asl@ajums.ac.ir

Abstract

Background and Objective: The detection of nucleic acids using Real-Time PCR has many applications. Quantitative analysis of mRNA using Real-Time PCR by Relative and Absolute methods. Widely used in biological studies. The purpose of this study was to compare the Relative and calculated PCR Efficiency by standard curve and LinRegPCR methods.

Subject and Methods: After sampling and extraction of RNA and cDNA synthesis, the quantitative RT-PCR was performed, then the PCR Efficiency was calculated by using the two methods of standard curve and LinRegPCR. At the end the results of the two methods were compared and analyzed.

Results: The efficiency of PCR for the GAPDH, TGF- β and IL-10 genes with the standard curve method were 1.99, 1.81 and 1.87, respectively. The PCR efficiency of these three genes were 1.98, 1.82 and 1.82 by using LinRegPCR software method, respectively.

Conclusion: The analysis of the data obtained from PCR proliferation of cDNA of the three genes, GAPDH, TGF β and IL-10 showed no statistical difference between standard curve and LinRegPCR methods. Therefore, it is recommended to use the LinRegPCR software method instead of the expensive standard curve method.

Keywords: Real-Time PCR, PCR Efficiency, Syber Green, LinRegPCR Software.

► Please cite this paper as:

Khodadadi A, Hamidi-Nia M, Ghaforian M, Mohammadi-Asl J. Evaluation of Real-Time PCR Efficiency by the Use of Two Strategies: Standard Curve and Linear Regression. *Jundishapur Sci Med J* 2012;11(1):85-95

Received: Oct 4, 2010

Revised: Nov 26, 2011

Accepted: Dec 21, 2011