شبنم بهرامی- دانشجوی مقطع دکترای سلولی و مولکولی

# دستور کار استفاده از دستگاه Real Time PCR

**روش کار Real Time PCR**

**✔ اساس کار کیت HCV Real–TM Quant:**

کیت HCV بر اساس روش Real Time است که جهت تشخیص کمی ویروس هپاتیت C در پلاسما یا سرم انسان و نیز تشخیص کنترل داخلی، به وسیله دو رنگ فلورسانس به کار می رود. وجه افتراق Real Time PCR با PCR معمولی، به کار گرفتن یک نشانگر فلورسنت در واکنش جهت ردیابی محصول واکنش است. این گزارش‌گرها به گونه‌ای طراحی می‌شود که در صورت تکثیر RNA نور تولید کنند. لذا افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول به دست آمده نسبت مستقیم دارد. به اولین چرخه‌ای که شدت فلورسنت بیشتر از خط پایه (Threshold)باشد چرخهٔ آستانه یا CT گویند. عدد CT با مقدار الگوی اولیه رابطهٔ معنی داری دارد و از روی آن می‌توان مقدار mRNA اولیه را تخمین زد. به عبارت دیگر در فاز اولیه مرحله تصاعدی مقدار فلورسنت افزایش می یابد تا به آستانهای می رسد که به مقدارمشخصی از سطح background بالاتر است، چرخه مزبور ( سیکلی از PCR که قطعه تکثیر از حد آستانه عبورمی کند)به عنوان CT شناخته می شود.

به طور کلی Real time PCR چند مرحله دارد که عبارت است از:

۱. **Baseline region**: در این مرحله هیچ گونه نوری قابل رویت نیست.

۲. **Exponential phase**: محصول دو رشته‌ای در هر چرخه دو برابر می شود و رشد تصاعدی مربوط به واکنش آغاز می شود.

۳. **The liner phase**: در این مرحله ترکیبات واکنش و کارایی آنها روبه اتمام است.

٤. **The plateau phase**: در این مرحله ترکیبات واکنش از بین می روند و افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی شود.

روش Real time PCR می تواند به دو صورت One step (همزمان در یک واکنش ساخت cDNA از RNA و تکثیر آن صورت می گیرد) و ( Two step ابتدا ساخت cDNA و در واکنش دیگر تکثیر آن ) انجام می شود.

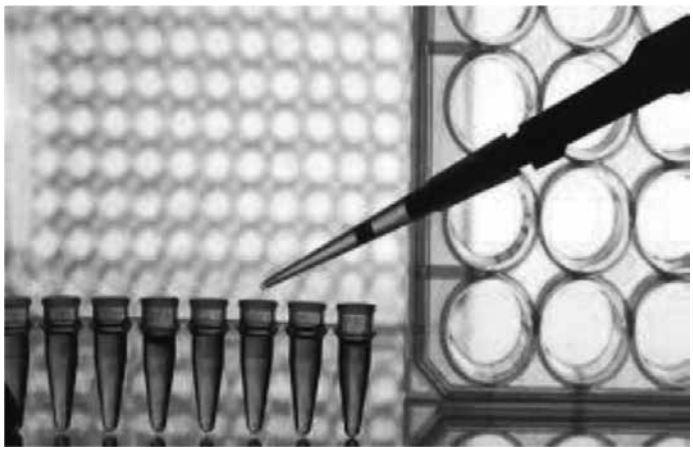
**✔ آنالیزهای کمی در Real time PCR:**

در این روش از نمونهٔ RNA یا DNA با غلظت مشخص برای رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود. غلظت RNA یا DNA استاندارد با اسپکتروفوتومتر (۲٦۰ nm) تعیین می‌شود و سپس از روی وزن مولکولی نمونه به تعداد نسخه‌های آن تبدیل می‌شود. استانداردهای غلظتی ژن‌های معروف به صورت تجاری قابل خریداری است هرچند که بسیار گران قیمتند. از نمونه های استاندارد سری رقت تعیین کرده و همراه با نمونه هدف در دستگاه Real–time PCR قرار می دهیم . با استفاده از Ct که دستگاه برای هر رقت به ما می دهد، یک منحنی رسم کرده که X آن رقت یا تعداد کپی از ژن و Y آن CT باشد، نمودار به دست آمده یک نمودار خطی است که با قرار دادن عدد نمونه هدف در نمودار، غلظت یا تعداد کپی آن نیز بدست می آید. ترجیحا طول قطعه استاندارد مساوی با طول قطعه هدف باشد.

**✔ آماده سازی کیت :**

کیت HCV RealTM PCR در دمای ۲۰- در فریزر نگهداری می شود. نیم ساعت قبل از شروع آزمایش باید کیت را از فریزر خارج نموده در دمای اتاق قرار دهیم، پس از ذوب شدن محلول ها، آنها را Shake کرده و سپس چند ثانیه سانتریفوژ نموده و پس از آن sampling را آغاز می کنیم.

**۱- آماده سازی محلول Mastermix** : جهت تهیه Master mix ، ۳۰۰ میکرولیتر از ۱–RT–PCR–mix ، ۲۰۰ میکرولیتر از RT–



۲- PCR-mix، نیز ۲۰ میکرولیتر از Hot start و نیز ۱۰ میکرولیتر ازM-MLV Revertase را وارد ویال DTT می کنیم.

**اقدامات وابسته:**

- ✔ آگاهی از اساس جداسازی اسیدهای نوکلئیک
- ✔ آگاهی از عوامل جداسازی اسیدهای ✔ نوکلئیک و نیز عوامل مداخله گر
- ✔ آگاهی از برنامه کنترل کیفی در آزمایشگاه
- ✔ آگاهی از روش های محلول سازی در آزمایشگاه
- ✔ آگاهی از نحوه نگهداری نمونه ها پس از انجام آزمایش
- ✔ آگاهی از اصول ایمنی در آزمایشگاه و دستورالعمل های دفع پسماند

**هدف:**

انجام روش صحیح اندازه گیری و گزارش میزان کمی HCV RNA از مایعات بیولوژیک است.

**دامنه عملکرد**

این دستورالعمل جهت اندازه گیری و گزارش میزان کمی HCV RNA از مایعات بیولوژیک نظیر سرم، پلاسما، ادرار، مایع مغزی-نخاعی، مغز استخوان و نمونه های تهیه شده به وسیله سوآب در بخش تشخیص مولکولی و PCR آزمایشگاه کاربرد دارد.

**مسئولیت**

مسئولیت نظارت بر حسن اجرای این دستور العمل بر عهده مسئول بخش تشخیص مولکولی است.

جهت حصول اطمینان از انجام روش صحیح اندازه گیری میزان کمیHCV RNA توسط پرسنل بخش تشخیص مولکولی، قرائت کامل این دستـــور العمل همراه با گذراندن دوره آموزشی به مدت یک هفته تحت نظر مسئول بخش الزامی است.

**اطلاعات نمونه**

✔ **نوع نمونه:**

باتوجه به کیت های مصرفی جهت استخراج اسید نوکلئیک، انواع نمونه های مورد گزارش عبارتند از:

**۱-نمونه سرم :**

غیر همولیز فاقد فیبرین که ترجیحا لیپمیک هم نباشد، برای جداسازی سرم نمونه خون بیمار را که در لوله لخته ژل دار SST گرفته شده است به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۵۰۰-۲۷۰۰ g(معادل ۲۹۰۰-۳۹۰۰ RPM) سانتریفوژ نمایید و بدون استفاده از سمپلر سرم را جدا کرده و داخل یک لوله پلاستیکی نو شفاف درب دار که برای این منظور قبلا استریل شده است نگهداری کنید.

**۲- نمونه پلاسما:**

غیرهمولیز که ترجیحا لیپمیک هم نباشد برای جداسازی پلاسما، نمونه خون بیمار را که در لوله محتوی ضد انعقاد EDTA یا سیترات گرفته شده است (ضد انعقاد هپارین برای آزمایش های مولکولی وPCR قابل قبول نیست) به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۵۰۰-۲۷۰۰ g (معادل ۲۹۰۰-۳۹۰۰ RPM) سانتریفوژ کنید و با استفاده از سمپلر، پلاسما را جدا کرده و داخل یک لوله پلاستیکی نو شفاف درب دار که برای این منظور قبلا استریل شده است نگهداری نمایید.

۳- نمونه ادرار تصادفی یا ۲٤ ساعته که ترجیحا سانتریفوژ شده باشد.

٤- نمونه خلط و سایر مایعات بیولوژیک

۵- نمونه خون کامل

٦- سلول های تک هسته ای جدا شده از خون محیطی(PBMC)

۷- نمونه بیوپسی از بافت های مختلف

**توجه:** مایعات بیولوژیک نظیر ادرار، CSF، مغز استخوان و نمونه های گرفته شده توسط سوآب قبل از هر

چیز می بایست به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با نیروی ۲۷۰۰-۱۵۰۰ g (معادل ۳۹۰۰-۲۹۰۰ RPM)سانتریفوژ شود و مایع حاصل رویی که فاقد سلول است مورد آزمایش قرار بگیرد.

✔ **شرایط ظاهری نمونه :**

– نمونه سرم یا پلاسما باید فاقد همولیز بوده و در صورت لیپمیک یا ایکتریک بودن ، در نتیجه نهایی قید شود

– نمونه ادرار می بایست شفاف بوده و در غیر اینصورت سانتریفوژ شود .

**۱- حجم نمونه:**

حجم نمونه جهت انجام PCR با توجه به دستورالعمل کیت مربوطه تعیین می شود.

**۲- نحوه ذخیره سازی نمونه:**

شرایط نگهداری نمونه با توجه به نوع نمونه و دستورالعمل کیت مربوطه تعیین می شود.

**تجهیزات، مواد، لوازم و وسایل آماده سازی های مورد نیاز قبل از انجام کار**

لوله های پلاستیکی نو درب دار استریل، سمپلرهای اختصاصی (مخصوص PCR) در سایزهای مختلف، سر سمپلر ترجیحا از نوع فیلتردار و فاقد DNA, RNA، میکروتیوب های استریل و فاقد DNA, RNA با حجم ۱.۵ml، میکروسانتریفوژ ترجیحا یخچال دار، هود بیولوژیک اختصاصی مجهز به فن قوی و لامپ UV، Dry-Block- با قابلیت تنظیم در دمای مختلف، ورتکس، ت‌ایمر دیجیتال، پیپت فیلر اتوماتیک، پیپت های ۵ تا ۱۰ سی سی استریل دستکش، رک میکروتیوب اختصاصی، ماژیک اختصاصی، ظرف Safty Box اختصاصی، یخچال، فریزر

**محلول های مورد نیاز و شرایط نگهداری دستگاه Real Time Thermal cycler**: اتانول با درجه خلوص ۱۰۰-۹۶ درصد که به صورت تجاری در دسترس است، اتانول با درجه خلوص ۷۰ درصد که به صورت تجاری در دسترس است.، سدیم هیپوکلریت (آب ژاول) با غلظت ۵درصد که برای تهیه آن آب ژاول را که به صورت تجاری در دسترس است با استفاده از آب دیونیزه استریل به میزان ۱/۲۰ رقیق می نماییم، این محلول ناپایدار بوده و می بایست در هنگام نیاز تهیه شود.، سدیم هیپوکلریت (آب ژاول) با غلظت ۰/۵ درصد که برای تهیه آن آب ژاول را که به صورت تجاری در دسترس است با استفاده از آب دیونیزه استریل به میزان ۱/۲۰۰ رقیق می نماییم، این محلول ناپایدار بوده و می بایست در هنگام نیاز تهیه شود.

**نکات ایمنی :**

استفاده از دستکش حین کار

**مستندات(سوابق مورد نیاز جهت ردیابی و شناسایی عملکرد)**

– فرم ثبت دما
– فرم شناسنامه دستگاه
– فرم درخواست سرویس و کالیبر
– فرم گزارش خرابی و سرویس دستگاه
– فرم تایید عملکرد پس از خرید و نصب

**کنترل کیفی قبل از انجام کار و حین کار :**

توجه به بسته بودن کامل درب به حالت قفل
توجه به خاموش بودن دستگاه بعد از انجام کار
توجه به خارج کردن نمونه بعد از انجام کار

**محدودیت ها :**

خرابی دستگاه
کالیبر نبودن دستگاه

**تفسیر(علل تکرار، چگونگی و محوه گزارش کار )**

آماده نبودن نمونه به طور صحیح
خرابی دستگاه از جمله رفتن برق

**مراجع ومنابع :**

کاتالوگ و دفترچه راهنمایی دستگاه

**ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی را در فضای مجازی دنبال کنید:**

@Tashkhis_Magazine
www.tashkhis.com
Tashkhis_Magazine
tashkhis magazine