دانشگاه علوم پزشکی ارومیه **گروه بیولوژی و کنترل ناقلین بیماریها**	
دستورالعمل نحوه کار با دستگاه ریل تایم (Real-time)	

هدف: تشریح نحوه کار با دستگاه ریل تایم (Real-time)

کاربرد: این روش هم در زمینه تحقیقاتی هم در زمینه بالینی و تشخیص بیماری‌ها به کار برده می‌شود.

مسئولیت: کلیه دانشجویان مسئولیت اجرای این دستورالعمل را به عهده دارند. مسئول آزمایشگاه مسئولیت نظارت بر حسن اجرای مفاد این دستورالعمل را به عهده دارد.

روش کار Real-time-PCR

اساس کار کیت Quant TM-Real HCV:

۱. کیت HCV بر اساس روش Real-time است که جهت تشخیص کمی ویروس هپاتیت C در پالسما 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 گونه ای 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 چرخهایی که شدت فلورسنت بیشتر از خط آستانه (Threshold) باشد چرخه آستانه یا CT گویند. عدد CT با مقدار الگوی اولیه رابطه معنی داری دارد و از روی آن می توان مقدار mRNA اولیه را تخمین زد. به عبارت دیگر در فاز اولیه مرحله تصاعدی مقدار فلورسنت افزایش می یابد تا به آستانه می‌رسد که به مقدار مشخصی از سطح background بالاتر است، چرخه مزبور سیکلی از PCR که قطعه تکثیر از حد آستانه عبور می کند به عنوانCT شناخته می‌شود.

۲. 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 رشته ای در هر چرخه دو برابر می‌شود و رشد تصاعدی مربوط به واکنش آغاز می‌شود. ۳. The liner phase :در این مرحله ترکیبات واکنش و کارایی آنها روبه اتمام است. ۴. The plateau phase : در این مرحله ترکیبات واکنش از بین می‌روند و افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود. روش Real-time-PCR می تواند به دو صورت one step همزمان در یک واکنش ساخت cDNA از RNA و تکثیر آن صورت می‌گیرد و (Two step ابتدا ساخت cDNA و در واکنش دیگر تکثیر آن) انجام می‌شود.

آنالیزهای کمی در Real-time-PCR :

در این روش از نمونه RNA یا DNA با غلظت مشخص (استاندارد) برای رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود. غلظت RNA یا DNA استاندارد با اسپکتروفوتومتر (nm ۲۶۰) 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 قیمت هستند. از نمونه های استاندارد سری رقت تعیین کرده و همراه با نمونه هدف در دستگاه time-Real-PCR قرار می‌دهیم. با استفاده از CT که دستگاه برای هر رقت به ما می‌دهد، 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 می‌آید. ترجیحا طول قطعه استاندارد مساوی با طول قطعه هدف باشد.

آماده سازی کیت:

کیتReal-time-PCR HCV در دمای ۲۰ - در فریزر نگهداری می‌شود. 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 می‌کنیم.

۱. آماده سازی محلول Master mix: جهت تهیه Master Mix ، ۳۰۰ میکرولیتر از ۱- RT-PCR MIX، 200 میکرولیتر از RT
۲. PCR-mix، نیز ۲۰ میکرولیتر از start Hot و نیز ۱۰ میکرولیتر ازRevertase MLV-M را وارد ویالDTT می‌کنیم.

تهیه کنندگان:	تصویب کننده:
دکتر مهدی بدخشان، مهندس فرشته قهوچی خلیق	دکتر صابر قلی زاده مدیر گروه بیولوژی و کنترل ناقلین بیماریها