

همچنین در شروع سیکل اول دمایی غیرفعال می ماند و بصورت کاملاً هوشمندانه در دمای مناسب فعالیت خود را آغاز می کند.

۳. در حین استفاده از این مخلوط واکنش هیچ گونه محصول غیراختصاصی در اثر اتصال غیراختصاصی تولید نخواهد شد.

۴. آنزیم بکار رفته در این مخلوط واکنش دارای پایداری بسیار بالا در مقایسه با سایر محصولات مشابه می باشد.

۵. این مخلوط واکنش بصورت Ready to use حاوی تمامی موارد مورد نیاز جهت انجام واکنش qPCR (بجز پرایمرها و الگو) در یک ویال می باشد، تا با کم شدن مراحل حجم برداری از بروز آلودگی احتمالی جلوگیری کند.

۶. در یک واکنش قادر به تشخیص و تکثیر همزمان ۴ ژن با رنگ مختلف می باشد.

۷. برای توالی های با GC بالای ۵۰ درصد مناسب می باشد.

۸. ساز ساز امپلیکون قابل قبول در این آزمایش باید بین ۷۰ تا ۲۰۰ bp باشد.

شرایط نگهداری و ذخیره سازی:

۱. در دمای ۲۰-۰°C بمدت یک سال نگهداری شود.
۲. در دمای ۴°C بمدت یک هفته نگهداری شود.
۳. در تاریکی نگهداری شود.
۴. مخلوط واکنش را به اندازه حجم های مصرفی برای هر بار استفاده تقسیم بندی کنید تا از Freeze/Thaw جلوگیری شود.
۵. ذوب شدن مخلوط روی یخ صورت بگیرد در غیر این صورت باعث کاهش راندمان میشود.

مواد و دستگاه مورد نیاز:

۱. پرایمرها و پروب
۲. DNA الگو
۳. پیتور فاقد نوکلئاز
۴. سرمیملر استریل و فاقد نوکلئاز
۵. دستگاه ریل تایم سازگار , BIORAD CFX, MIC , ROTOR GENE, Applied biosystems

شرایط انجام واکنش:

طبق جدول زیر تمامی موارد زیر را به آرامی باهم میکس و پیپت کنید.
بمنظور عدم ایجاد حباب به هیچ وجه ورتکس نکنید (حباب در عملکرد فلورسانس تداخل ایجاد میکند.)

عنوان محصول:

مخلوط واکنش Probe qPCR Master Mix (۲X)

حجم محلول: ۱ میلی لیتر

رنگ محلول: شفاف

معرفی محصول:

مخلوط واکنش Probe qPCR Master Mix حاوی بافر بهینه شده، dNTPs و پایدارکننده ها می باشد. یکی دیگر از محتویات حیاتی این مخلوط واکنش آنزیم Hot start DNA Polymerase می باشد که از نظر شیمیایی و با آنتی بادی مخصوص جهت جلوگیری از واکنش غیراختصاصی و افزایش کارایی و حساسیت و با تکرارپذیری بالا تغییر یافته است. این آنزیم در دمای اتاق کاملاً غیرفعال می باشد و در دمای مناسب PCR ظرف مدت ۲ دقیقه به بالاترین عملکرد خود می رسد. این مخلوط واکنش به جهت داشتن GC Enhancer قادر به تکثیر و گسترش ژن های با درصد بالای GC می باشد. به این ترتیب انجام تست با توالی های چالش برانگیزی که GC زیاد دارند، توسط این مخلوط واکنش از اختصاصیت و قابلیت تکرارپذیری بالایی برخوردار می باشد. این مخلوط واکنش تمام مواد مورد نیاز برای واکنش ریل تایم بجز پرایمر و الگو را دارا می باشد. این مخلوط بصورت Ready To Use برای واکنش های Probe-based qPCR تمامی مواد مورد نیاز این واکنش بجز پرایمرها، پروب و الگو را دارا می باشد. در حالت عادی رنگ Reporter و Quencher به هم نزدیک هستند و Quencher فلورسنت منتشر شده از رنگ Reporter را تماماً جذب می کند. زمانی که یک پروب به DNA نمونه متصل می شود، در مرحله گسترش PCR، فعالیت ۵'-۳' اگزونوکلازی آنزیم Taq Polymerase ، پروب را می شکند و Reporter از Quencher جدا می شود و سیگنال فلورسنت آزاد می شود. این مخلوط واکنش qPCR Master Mix قادر به انجام تست های qPCR بصورت تکی و مالتیپلکس می باشد.

از جمله ویژگی های این محصول می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. بدلیل استفاده از آنزیم Hot Start اتصال پرایمرها در مرحله Real time PCR بصورت کاملاً اختصاصی صورت می گیرد.
۲. به جهت استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه آنزیم

جدول ۱: مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش qPCR

محتویات	حجم	غلظت نهایی 1x
مخلوط واکنش qPCR Master Mix (2X)	10 µl	
هر پرایمر فوروارد 10 µM	0.6 - 1.2	200-400 nM
هر پرایمر ریورس 10 µM	0.6 - 1.2	200-400 nM
هر پروب 10 µM	0.4 - 0.6	200-400 nM
الگو	5 µl	
آب فاقد نوکلئاز	تا 20 µl	
حجم کل	20 µl	

آب مقطر باید فاقد RNase و DNase باشد درغیراینصورت باعث آلودگی می‌شود.

پروتکل:

آنزیم Hot Start بکار رفته در مخلوط واکنش Probe qPCR Master Mix به گونه ای طراحی شده است که به راحتی می‌توان مواد اولیه جهت انجام واکنش را در دمای محیط به مخلوط واکنش اضافه کرد. حجم کلی در این پروتکل ۲۰ µl است.

۱. ابتدا بگذارید تمامی محتویات داخل ویال به آرامی ذوب شود (مخلوط را در دمای بالا ذوب نکنید).
۲. مخلوط پروب را بمدت ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس کنید.
۳. مخلوط واکنش را با پرایمرها و پروب هیدرولیزکننده و آب فاقد نوکلئاز طبق جدول بالا میکس کنید.
۴. حجم مناسب مخلوط آماده را به تیوب‌ها یا پلیت PCR اضافه کنید.

۵. DNA الگو (یا آب برای NTC) را به تیوب‌ها اضافه کنید.
۶. در تیوب‌ها را ببندید و بمدت کوتاهی سانتریفیوژ کنید تا محتویات تیوب‌ها به انتهای آن بیایند.

جدول ۲: برنامه دمایی ۳ مرحله ای

مرحله	دما	زمان	سیکل
فعالسازی اولیه	۹۵ °C	۲-۵ دقیقه	۱
دناوراسیون	۹۵ °C	۳۰ ثانیه	۴۰
انلینگ / گسترش	۵۵-۶۰ °C	۳۰-۶۰ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲	۳۰-۶۰ ثانیه	

جدول ۳: برنامه دمایی ۲ مرحله ای

مرحله	دما	زمان	سیکل
فعالسازی اولیه	۹۵ °C	۲-۵ دقیقه	۱
دناوراسیون	۹۵ °C	۳۰ ثانیه	۴۰
انلینگ / گسترش	۵۵-۶۰ °C	۳۰-۶۰ ثانیه	

توجه :

◀ دمای Annealing / Extension با توجه به دمای Tm پرایمرها متفاوت است.

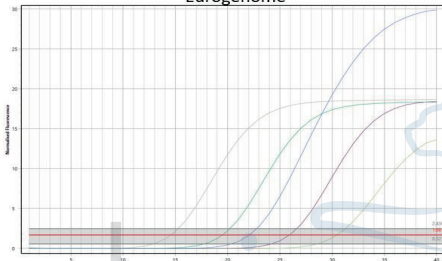
◀ بهینه ترین دما را توسط PCR گرایانت میتوانید انتخاب کنید.

◀ زمان Annealing / Extension بهتر است برای واکنشهای چند ژن بیشتر از ۳۰ ثانیه باشد.

آنالیز داده‌ها:

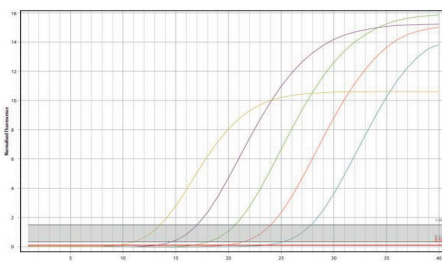
منحنی استاندارد مقادیر CT که نشان دهنده مقدار غلظت نمونه هست را با تحلیل رگرسیون خطی تعیین می‌کند. اگر منحنی ضریب همبستگی استاندارد (R²) بیشتر از ۰.۹۸ شود، غلظت نمونه در محدوده رنج خطی می‌باشد. زمانیکه شیب خط منحنی استاندارد بین -۳ تا -۳.۵ باشد، کارایی واکنش (E) بین ۹۰% تا ۱۲۰% می‌باشد.

qPCR Probe Linearity
Eurogenome



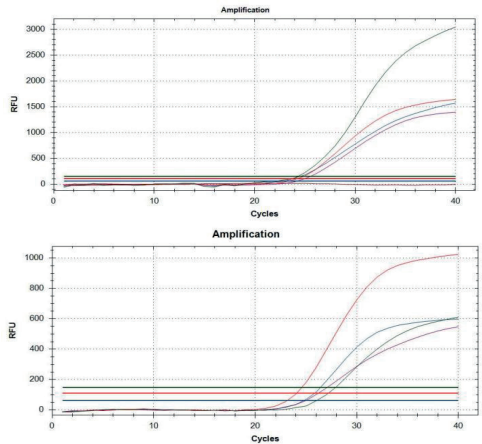
Dilution	Ct	R	Efficiency (%)
100000	13.2	0.98	110.0
10000	17.4	0.98	110.3
1000	21.4	0.98	110.2
100	25.1	0.92	98.3
10	30.1	0.89	91.0

qPCR Probe Linearity
Biosiya



Dilution	Ct	R	Efficiency (%)
100000	13.2	0.97	105.0
10000	16.1	0.98	105.3
1000	19.6	0.97	108.2
100	22.1	0.98	108.1
10	25.1	0.98	107.2

تصویر ۱: نتایج خطی بودن



تصویر ۲: نتایج واکنش Multiplex

مشکلات	علل ایجاد	راه حل
هیچ محصول qPCR یا بازده بسیار کم	آنزیم یا مستر میکس به طور نادرست استفاده شده است	مستر میکس ها را طبق توصیه‌ها استفاده کنید و اطمینان حاصل کنید که پروتکل پیشنهاد شده رعایت شود
	آلودگی‌ها مانع از انجام PCR می‌شوند	ماده‌های بازدارنده از الگو، پرایمرها و مواد شیمیایی با کیفیت پایین می‌توانند بازده را کاهش دهند. الگو را خالص کنید و از مستر میکس‌های با کیفیت بالا برای qPCR استفاده کنید.
	طراحی نادرست پرایمر، از غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.	از بیش از ۱۰% از حجم واکنش رونویسی مکسوس برای qPCR استفاده نکنید. از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی پرایمر استفاده کنید. کیفیت پرایمر را روی ژل پلی‌اکریلآمید داتوره شده بررسی کنید و محصول PCR را روی ژل آگارز بررسی کنید.
	غلظت بهینه پرایمر همیشه باید تجربی انتخاب شود. غلظت بالای پرایمر می‌تواند باعث کاهش خاصیت انتخابی qPCR به دلیل افزایش خطای پرایمینگ شود.	پرایمرها باید همیشه در غلظت اضافی در مخلوط واکنش حضور داشته باشند و هر دو در غلظت‌های مساوی.
الگوی ناکافی یا الگوی با کیفیت پایین	محصول PCR خیلی بلند است	آزمایش‌ها را برای آمپلیکون‌هایی طراحی کنید که حداقل ۵۰۰ جفت باز طول داشته باشند. بهترین طول حدود ۱۵۰ جفت باز است.
	الگوی ناکافی یا الگوی با کیفیت پایین	الگو را دوباره خالص کنید و کیفیت و یکپارچگی آن را در ژل آگارز بررسی کنید اگر ممکن است. میزان الگو را افزایش دهید.
مواد شیمیایی qPCR — حاوی رنگ‌های فلورسانس یا پروپ که در معرض نور قرار گرفته‌اند	پس از تنظیم واکنش، فوراً مواد شیمیایی یا پروپ خود را به بسته‌بندی محصول بازگردانید تا از تماس با نور به حداقل برسد.	

خطاهای در تنظیمات	تمامی مواد شیمیایی را قبل از هر بار استفاده خوب مخلوط کنید. هرگاه ممکن است، مستر میکس‌ها را تهیه کنید زیرا این کار خطاهای پاتینگ را کاهش می‌دهد.
تغییرات در اجرا	هر تغییر در مواد شیمیایی یا پلاستیک های استفاده شده برای qPCR، تحت نظر داشته باشید. هر تغییر ممکن است بر نتایج تأثیر بگذارد.
چرخه‌زنی نادرست	دیتاتورسازی کامل DNA اولیه برای به دست آوردن بازده خوب PCR ضروری است. معمولاً ۱ تا ۳ دقیقه دیتاتورسازی در ۹۵ °C کافی است.
	در طول چرخه‌زنی، معمولاً ۳۰ ثانیه د ناتورسازی DNA در ۹۴-۹۵°C برای هر چرخه انجام می‌شود. برای الگوهای DNA با محتوای GC بالا، این مرحله می‌تواند با افزایش ۵ ثانیه‌ای طولانی‌تر شود.
	دمای اتصال پرایمر باید ۵-۶°C کمتر از کمترین دمای ذوب پرایمر (Tm) باشد. زمان اتصال ۳۰ ثانیه است. دمای اتصال خیلی پایین منجر به پس‌زمینه زیاد می شود، و دمای خیلی بالا ممکن است باعث عدم تولید محصول PCR شود.
	مرحله گسترش PCR واکنش کشش پرایمر است که معمولاً در ۷۲°C انجام می‌شود که دمای بهینه برای پرایمر است. مرحله کشش باید برای آمپلیکون‌های ۵۰۰ جفت باز ۳۰ ثانیه طول بکشد.
چرخه‌های PCR ناکافی	برای مقدار کم الگو (۱۰ نسخه یا کمتر) تعداد ۴۰ چرخه انجام دهید.
محصولات غیر اختصاصی کوتاه یا بلند	از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.
کیفیت پرایمر را روی ژل داتوره شده بررسی کنید و محصول را روی ژل آگارز بررسی کنید.	از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.
	از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.
	از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.
	از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.
الگوی ناکافی یا الگوی با کیفیت پایین	از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.
	از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.
مواد شیمیایی qPCR — حاوی رنگ‌های فلورسانس یا پروپ که در معرض نور قرار گرفته‌اند	از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.
	از نرم‌افزارهای اختصاصی برای طراحی غلظت ناکافی پرایمر، یا پرایمرهای با کیفیت پایین.

میزان الگو را افزایش دهید.		
تنظیم واکنش در دمای اتاق	واکنش PCR را روی یخ تنظیم کنید و تمام مواد شیمیایی را روی یخ نگه دارید.	
دمای اتصال پرایمر خیلی پایین	دمای اتصال پرایمر باید ۵°C کمتر از کمترین دمای ذوب پرایمر (Tm) باشد. زمان اتصال ۳۰ ثانیه است.	
	دمای اتصال خیلی پایین منجر به پس زمینه زیاد می شود، و دمای خیلی بالا ممکن است باعث عدم تولید محصول در qPCR شود.	
زمان کشش خیلی طولانی	مرحله گسترش PCR واکنش کشش پرایمر است که معمولاً در ۷۲°C انجام می شود که دمای بهینه برای پلیمراز است. مرحله کشش باید برای آمپلیکون های ۵۰۰ جفت بازی ۳۰ ثانیه طول بکشد. برای آمپلیکون های کوتاه تر باید این زمان کاهش یابد.	
آلودگی PCR	محیط کاری تمیز را حفظ کنید. هنگام تهیه qPCR، باید دقت شود که احتمال آلودگی با الگوهای DNA خارجی از بین برود. از نواحی تمیز جداگانه برای آماده سازی نمونه، آماده سازی مخلوط واکنش و چرخه زنی استفاده کنید. قبل از تنظیم qPCR، فضای کاری خود را با الکل ۷۰٪ یا اسپری خاص حذف کننده DNA تمیز کنید. همیشه دستکش های تازه بپوشید. برای تنظیم qPCR از لوله ها و نوک پیت استریل یا فیلترهای آئروسول استفاده کنید. از مواد شیمیایی بدون DNA و نوکلئاز از جمله آب استفاده کنید.	
	آلودگی نوکلئازی	محیط کاری تمیز را حفظ کنید. از نواحی تمیز جداگانه برای آماده سازی نمونه، آماده سازی مخلوط واکنش و چرخه زنی استفاده کنید.

منابع:

- Bustin, S.A. et al. (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 22-611, 55
- Dorak, M.T. (2009) Glossary of real-time PCR terms. This can be viewed online at: www.dorak.info/genetics/glosrt.html
- Fleige, S. and Pfaffl, M.W. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Mol. Aspects Med. 39-126, 27.
- Lefever, S. et al. (2009) RDML: Structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. Nucleic Acids Res. ,37 9-2065.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- ΔΔCT Method. Methods 8-402, 25.

جدول نمادها:

	Catalog number	شماره رفرنس
	Batch code	سری ساخت
	In vitro diagnostic medical device	فروزرده تشخیصی و بالینی
	Date of manufacture	تاریخ تولید
	Expiry date	تاریخ انقضا
	Temperature limitation	دمای نگهداری
	Read instructions befor use	مطالعه بروشور
	Sufficient for n tests	محتویات برای n تست کافیست
	Caution consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	آدرس شرکت
	Keep away from sunlight	در جای تاریک نگهداری شود

فلورسانس در آلودگی در مواد	در صورتی که به آلودگی مشکوک هستید، مواد شیمیایی و ملزومات را تغییر دهید.
دایمرهای پرایمر	از نرم افزارهای اختصاصی برای طراحی پرایمر استفاده کنید تا از ایجاد دایمرهای پرایمر جلوگیری شود.
نتایج غیرقابل تکرار	مواد شیمیایی با کیفیت پایین از ستر میکس های با کیفیت بالا برای qPCR و آب بدون نوکلئاز استفاده کنید. قبل از هر بار تنظیم qPCR، کیفیت و یکپارچگی الگو را دوباره بررسی کنید، اگر ممکن است.