

۹. سایز امپلیکون قابل قبول در این آزمایش باید بین ۶۵ تا ۲۰۰ bp باشد.



شرایط نگهداری و ذخیره سازی:

۱. در دمای -20°C - بمدت یک سال نگهداری شود.
۲. در تاریکی نگهداری شود.
۳. مخلوط واکنش را به اندازه حجم‌های مصرفی برای هر بار استفاده تقسیم‌بندی کنید تا از Freeze/Thaw جلوگیری شود.
۴. خوب شدن مخلوط روی یخ صورت بگیرد در غیر این صورت باعث کاهش راندمان میشود.

مواد و دستگاه مورد نیاز:

۱. پرایمرها
۲. DNA الگو
۳. پیپتور فاقد نوکلئاز
۴. سرسمپلر استریل و فاقد نوکلئاز
۵. دستگاه ریل تایم سازگار
BIORAD CFX, Applied Biosystem, ROTOR GENE

فرآیند انجام واکنش:

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

جدول ۱: مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش qPCR

محتویات	حجم	غلظت نهایی 1x
مخلوط واکنش Super SYBR Green (2X)	10 μl	
هر پرایمر فوروارد 10 μM	1.0 - 1.6	200-400 nM
هر پرایمر ریورس 10 μM	1.0 - 1.6	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 Super SYBR Green (2x) 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.

عنوان محصول:

Super SYBR Green Master Mix (2X)

حجم محلول: ۱ میلی لیتر

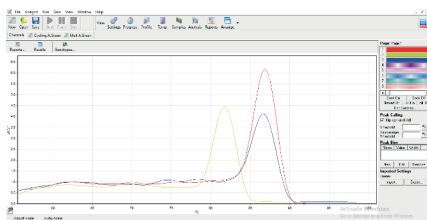
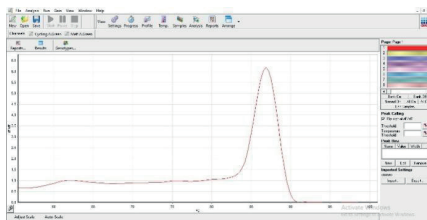
رنگ محلول: شفاف

معرفی محصول:

مخلوط واکنش سایبرگرین Super SYBR Green (2x) با حساسیت و دقت بالا قابلیت شناسایی DNA دو رشته ای در نمونه های بالینی را توسط دستگاه های ریل تایم دارد. رنگ اینترکاله و فلورسنت سایبرگرین ۱ در شیار کوچک DNA قرار میگیرد و قادر به شناسایی هر گونه اسیدنوکلئیک دو رشته ای در نمونه در حین انجام تست در دستگاه می‌باشد. این مخلوط واکنش بدلیل وجود رنگ فلورسنت سبز ارزان و کاربرد آن آسان است. مخلوط واکنش Super SYBR Green (2x) نسبت به دما پایدار است و با آنزیم Hot star Taq DNA Polymerase مهندسی شده است. این مخلوط واکنش تمام مواد موردنیاز برای واکنش ریل تایم بجز پرایمر و الگو را دارا می باشد.

از جمله ویژگی‌های این محصول می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. آنالیز بیان ژن
۲. تشخیص ژن‌های باکپی پایین
۳. این محصول با بسیاری از دستگاه‌های ریل‌تایم که به رنگ ROX نیاز ندارند، سازگار است.
۴. این محصول با دستگاه‌های ریل‌تایم APPLIED BIOSYSTEM و BIORAD که به رنگ ROX نیاز دارند، سازگار است.
۵. تکنولوژی HotStart
۶. آنزیم بکار رفته در این مخلوط واکنش دارای پایداری بسیار بالا در مقایسه با سایر محصولات مشابه می‌باشد.
۷. این مخلوط واکنش بصورت Ready to use حاوی تمامی موارد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR (بجز پرایمرها و الگو) در یک ویال می‌باشد، تا با کم شدن مراحل حجم‌برداری از بروز آلودگی احتمالی جلوگیری کند.
۸. برای توالی‌های GC با الای ۵۰ درصد مناسب می‌باشد.



تصویر ۱: نتایج منحنی ذوب در دستگاه Rotor Gene Corbett

مشکلات	علل ایجاد	راه حل
واکنش PCR تکرارپذیر نیست یا واکنش متوقف شده است	خطا در ست آپ واکنش	روش صحیح پیپتینگ را بررسی کنید. یک مخلوط اصلی از تمام واکنشگرها به غیر از الگوی DNA ایجاد کنید. این را در لوله‌های PCR جداگانه بریزید. الگوی DNA را با پیپت به مخلوط اصلی اضافه کنید. مطمئن شوید که واکنشگرهای صحیح اضافه شده‌اند. بررسی کنید که برنامه صحیح چرخه حرارتی انتخاب شده است.
تغییرات در اجزای واکنش	وجود مهارکننده	بررسی کنید که آیا اجزای جدیدی به ترکیب اصلی اضافه شده است (مثلاً دسته جدیدی از پرایمر، غلظت الگو را کاهش دهید. استخراج DNA را تکرار کنید و مراقب باشید که انتقال مهارکننده‌ها به حداقل برسد. از یک کنترل استفاده کنید. مثلاً کنترل بدون الگو. از رعایت اصول آزمایشگاهی خوب و شرایط استریل اطمینان حاصل کنید. افزایش طول پرایمر برای افزایش تکثیر اختصاصی. افزایش دمای اتصال برای بهبود اختصاصیت اتصال پرایمر. بررسی طراحی پرایمر در BLAST برای اطمینان از توانایی صحیح. واکنش را برای بررسی نمونه‌ها تکرار کنید. برای به حداقل رساندن آلودگی قبل و بعد از PCR، مناطق کاری خاصی را ایجاد کنید. از عملکرد خوب آزمایشگاهی و شرایط استریل اطمینان حاصل کنید.
تکثیر غیراختصاصی	خطای طراحی پرایمر	غلظت پرایمر ممکن است بیش از حد غلیظ باشد. سعی کنید غلظت پرایمرهای رو به جلو و معکوس را کاهش دهید. برای بررسی وجود دایمرهای پرایمر، یک منحنی ذوب انجام دهید. طراحی پرایمر را دوباره ارزیابی کنید و ساختارهای مکمل را دوباره بررسی کنید.
تکثیر در کنترل منفی	آلودگی در DNA نمونه	
تشکیل پرایمر و دایمر		

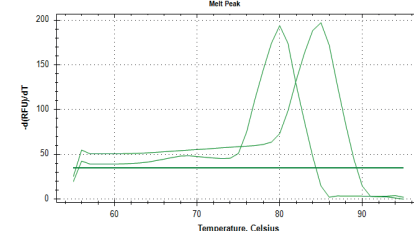
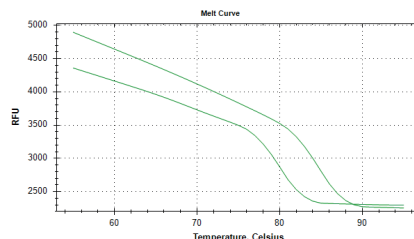
۱. ابتدا بگذارید تمامی محتویات داخل ویال به آرامی ذوب شود (مستر را در دمای بالا ذوب نکنید).
۲. مستر را بمدت ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس کنید.
۳. مخلوط واکنش را با پرایمرها و آب فاقد نوکلئاز طبق جدول بالا مخلوط کنید.
۴. حجم مناسب مستر آماده را به تیوب‌ها یا پلیت PCR اضافه کنید.
۵. DNA الگو (یا آب برای NTC) را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

مرحله	دما	زمان	سیکل
فعالسازی اولیه	۹۵ °C	۵ دقیقه	۱
دنا تراسیون	۹۵ °C	۱۰-۲۰ ثانیه	۴۰
انلینگ / گسترش	۵۵-۶۰ °C	۳۰-۶۰ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲	۳۰-۴۵ ثانیه	۱
آنالیز منحنی ذوب	۹۵-۶۰ °C		

توجه :

- ◀ دمای Annealing / Extension با توجه به دمای Tm پرایمرها متفاوت است.
- ◀ بهینه ترین دما را توسط PCR گرادینت میتوانید انتخاب کنید.
- ◀ زمان Annealing / Extension بهتر است بیشتر از ۳ ثانیه باشد.



تصویر ۱: نتایج منحنی ذوب در دستگاه BioRAD CFX

منابع:

1. Bustin, S.A. et al. (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 22–611,55
2. Dorak, M.T. (2009) Glossary of real-time PCR terms. This can be viewed online at: www.dorak.info/genetics/glosrt.html
3. 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.
4. Lefever, S. et al. (2009) RDML: Structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. Nucleic Acids Res. 9–2065,37.
5. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods 8–402,25.

جدول نمادها:

	Catalog number	شماره رفرنس
	Batch code	سری ساخت
	In vitro diagnostic medical device	فرآورده تشخیصی و بالینی
	Data of manufacture	تاریخ تولید
	Expiry date	تاریخ انقضا
	Temperature limitation	دمای نگهداری
	Read instructions before 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

مشکلات	علل ایجاد	راه حل
هیچ محصول qPCR یا بازده بسیار کم	خلوص پایین DNA	کیتهای خالص سازی مخصوص نمونه برای DNA را در نظر بگیرید. خلوص DNA را با استفاده از اسپکتروفتومتر UV اندازه گیری کنید. نمکها و مهارکنندها را با تکرار خالص سازی حذف کنید.
وجود مهارکننده	مقدار کم DNA/الگوی تخریب شده	غلظت DNA را با استفاده از اسپکتروفتومتر UV بررسی کنید. برای اطمینان از تکثیر مناسب، از DNA تازه استخراج شده استفاده کنید. برای کاهش تخریب، چرخه های انجماد-ذوب را کاهش دهید. الگوی DNA را رقیق کنید تا مهارکننده های موجود کاهش یابند. استخراج DNA را تکرار کنید و مراقب باشید که انتقال مهارکننده ها به حداقل برسد.
	زمان و دمای ناکافی برای واکنش تکثیر	دستگاه qPCR را از نظر زمان و دمای صحيح بررسی کنید. شرایط چرخه حرارتی را بهبه کنید. به عنوان مثال، زمان بیشتری را برای DNA ژنومی در نظر بگیرید تا تخریب و گسترش کافی انجام شود.
کیفیت واکنش	مقدار Ct بالاتر از حد انتظار	به پیشنهادات نگهداری سازنده مراجعه کنید. فقط از معرف های تازه استفاده کنید تا از تکثیر مناسب اطمینان حاصل شود. تعداد چرخه های انجماد-ذوب را کاهش دهید. از مخلوط کامل معرف ها اطمینان حاصل کنید. هرگونه رسوب در معرف ها را بررسی کنید.
		پروتوکل استخراج رو چک کنید از تمیز بودن محل کار اطمینان حاصل کنید. برای تمیز کردن تمام تجهیزات و فضا از اتانول ۷۰٪ و ۵٪ dH ₂ O استفاده کنید.
وجود مهارکننده	مقدار Ct کمتر از حد انتظار یا مقدار Ct کمتر از کنترل مثبت	برای حذف مهارکننده های موجود در طول استخراج DNA، از شستشوی اضافی اتانول استفاده کنید. پروتوکل استخراج DNA را مرور کنید.
		با بررسی و تعویض معرف ها، منبع آلودگی را شناسایی کنید. برای واکنش های قبل و بعد از PCR از بیپت های جداگانه استفاده کنید. از تمیز بودن محل کار اطمینان حاصل کنید. از اتانول ۷۰٪ و ۵٪ dH ₂ O برای تمیز کردن تمام تجهیزات و فضا استفاده کنید.
غلظت نمونه DNA خیلی زیاد است	خطا در شرایط سیکل واکنش	غلظت DNA را تأیید کنید. غلظت DNA را در تنظیمات PCR کاهش دهید. برای بهینه سازی و تمام آزمایش های آینده از همان دستگاه ترموسایکلر استفاده کنید.
		برخی از پرایمرها به تغییر دما حساس هستند. مشخصات پرایمرها را دوباره بررسی کنید. اجزای کسری برای کاهش تعداد نمونه های تخریب شده در چرخه انجماد-ذوب.