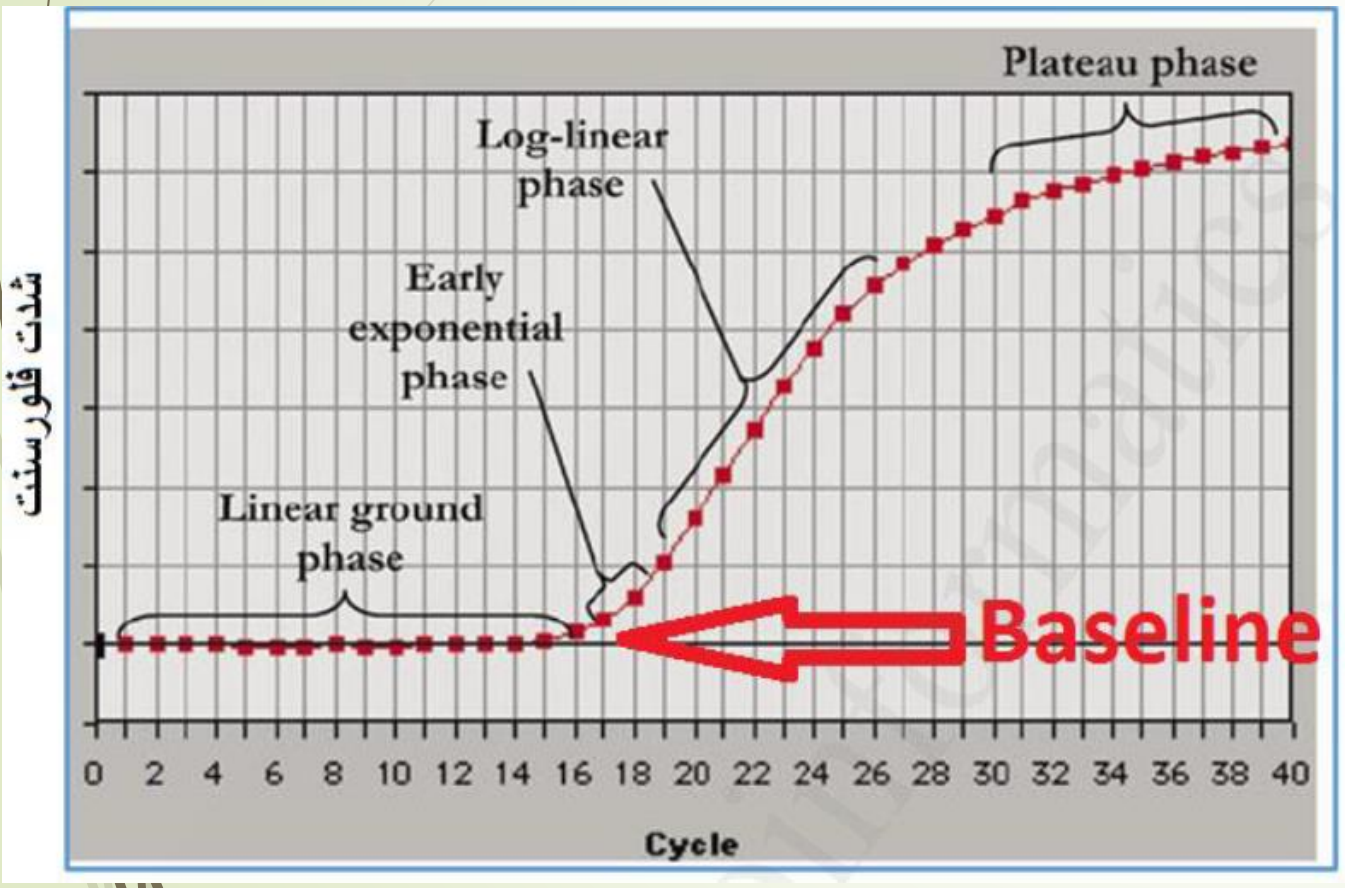
بسم الله الرحمن الرحيم

آموزش نرم افزار LinReg PCR

- **دکتر سیده زهرا مطلوبی**
- دکتری ایمنی شناسی
- استادیار دانشکده پزشکی
- دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

مقدمه: سه فاز منحنی Real time PCR



- فاز اول: Baseline region یا Linear phase
- فاز دوم: Exponential phase و Log liner phase
- فاز سوم: plateau phase

مقدمه: تعاریف

- **سی تی Ct**
- **تفاوت Ct با Cp**
- **دلتا Ct (ΔCt)**
- **Fold change و محاسبه دلتا دلتا Ct (ΔΔCt)**
- **ضرورت محاسبه میزان کارایی PCR و پرایمرها برای آنالیز نتایج ریل تایم**

مقدمه: تعاریف

- Ct به این مفهوم است که در چه سیکلی محصولات real time از یک حد آستانه threshold فراتر می رود.

  مفهوم Ct برای همه دستگاه ها یکسان است.

- در برخی از نرم افزارهای ریل تایم از Cp به جای Ct استفاده می نمایند. Cp مخفف crossing point است و به مفهوم سیکلی می باشد که در آن میزان محصولات real time از یک نقطه خاص (crossing point) فراتر می رود.

  در عمل تفاوتی بین آنالیز داده ها براساس Ct و یا Cp وجود ندارد.

مقدمه: روابط

$$\text{Fola change} = \frac{(2)^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(2)^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

یا

$$\text{Fola change} = \frac{(2)^{\Delta Ct_{target}(control-sample)}}{(2)^{\Delta Ct_{ref}(control-sample)}}$$

$$\text{Fola change} = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

یا

$$\text{Fola change} = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct_{ref}(control-sample)}}$$

E_{target} =کارایی پرایمر برای ژن هدف

E_{ref} =کارایی پرایمر برای ژن رفرنس

$E = 1 +$ (کارایی پرایمرها)

مقدمه: محاسبه E

برای محاسبه میزان کارایی پرایمرها و یا میزان E از دو روش می توان استفاده نمود.

I. استفاده از رقت های متوالی در واکنش ریل تایم، ترسیم منحنی استاندارد و محاسبه شیب خط

II. استفاده از نرم افزار linregPCR

آموزش LinRegPCR

- نرم افزار LinRegPCR یک نرم افزار برای بررسی داده های ریل تایم به منظور محاسبه کارایی پرایمرها یا PCR Efficiency می باشد.
- این نرم افزار داده های ریل تایم را بررسی نموده و بوسیله رگرسیون خطی و تخمین شیب خط رگرسیون برای هر نمونه، کارایی پرایمرها را محاسبه می نماید.

آموزش LinRegPCR

- ناحیه Window-of-Linearity یا W-o-L:

محدوده ای از فاز نمایی یا لگاریتمی. واکنش ریل تایم که از داده های آن محدوده برای محاسبه میزان کارایی پرایمرها و PCR استفاده می شود. این محدوده به صورت خودکار تعیین می گردد و معمولا شامل داده های ۴ سیکل برای هر نمونه در فاز لگاریتمی می باشد. این محدوده را می توان به صورت دستی نیز تعیین نمود.

- داده های خام Raw data:

داده های حاصل از نور فلورسنت سنجش شده برای هر نمونه در هر سیکل از ریل تایم.

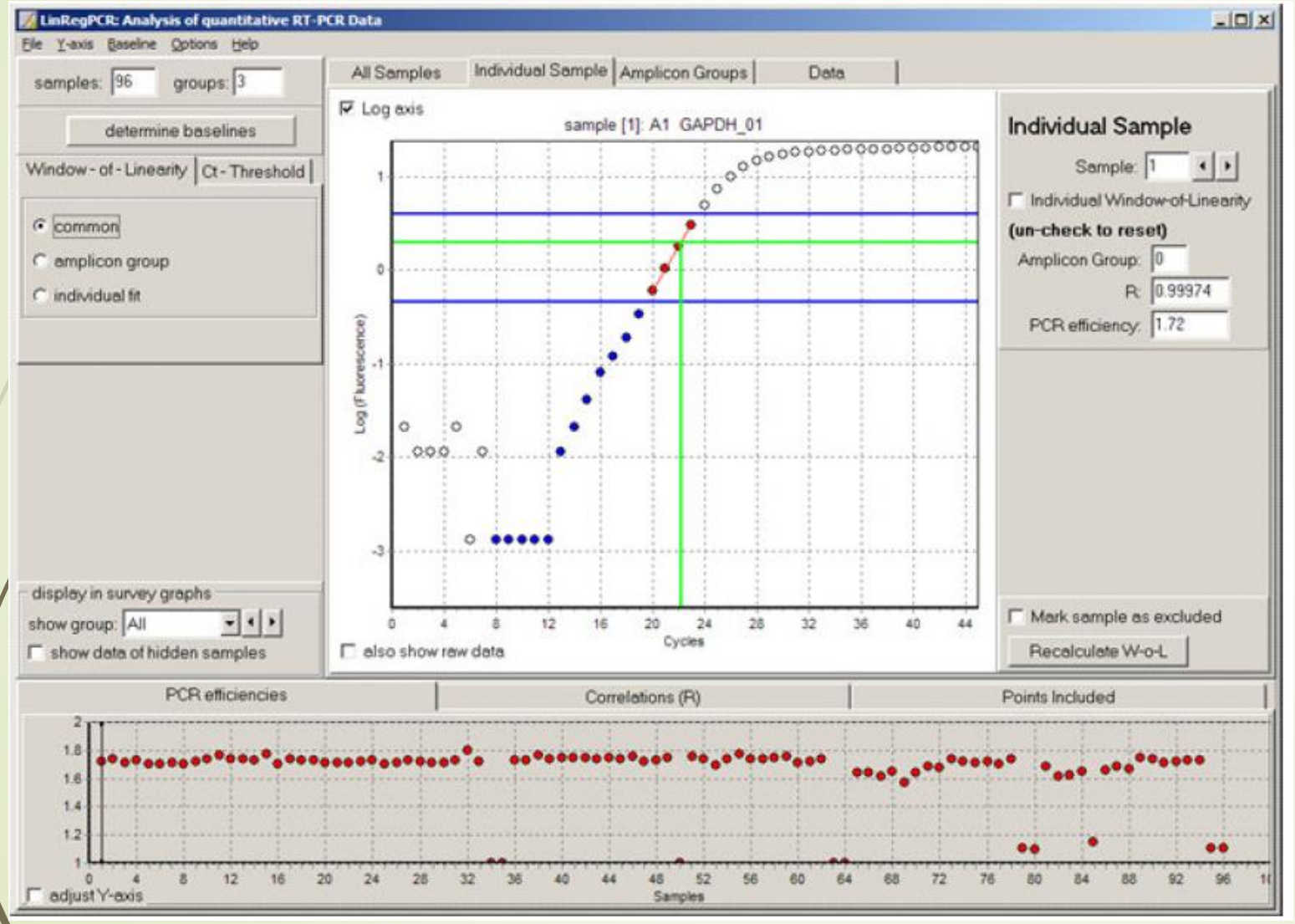
آموزش LinRegPCR

نحوه محاسبه میزان محصول تکثیر شده در ریل تایم در هر سیکل.

- NC: میزان محصول در سیکل مورد نظر (سیکل C).
- N0: غلظت الکو در ابتدای واکنش
- E: میزان کارایی PCR.

$$N_C = N_0 \times E^C \longrightarrow log(N_c) = log(N_0) + c.log(E)$$

آموزش LinRegPCR



آموزش LinRegPCR

مراحل محاسبه کارایی پرایمرها و PCR Efficiency بوسیله نرم افزار linregPCR

I. خروجی گرفتن از داده های خام در ریل تایم، ویرایش داده ها و وارد نمودن داده ها در نرم افزار.

II. اصلاح baselines داده های ورودی، تعیین ناحیه W-o-L و محاسبه کارایی PCR و پرایمرها.

III. گروه بندی نمونه های وارد شده برحسب نوع پرایمر و یا بافت.

IV. بررسی کیفیت داده ها برای نمونه های مورد بررسی.

V. محاسبه میانگین کارایی PCR برای گروه پرایمرها.

VI. ذخیره نمودن نتایج.

با تشکر از توجه شما