

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

اثر سطوح مختلف ترئونین جیره آغازین بر بیان ژن‌های اینترلوکین-۸ و اینترفرون-آلفا موثر بر سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی سویه آرین

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی

سرور ایروانی

استادان راهنما

دکتر سعید انصاری مهباری

دکتر سید عبدالله حسینی



دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام خانم سرور ایروانی
تحت عنوان

**اثر سطوح مختلف ترئونین جیره آغازین بر بیان ژن های اینترلوکین-۸ و اینترفرون-آلفا
موثر بر سیستم ایمنی در جوجه های گوشتی سویه آرین**

در تاریخ ۱۳۹۳/۸/۲۸ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| دکتر سعید انصاری مهباری | ۱. استاد راهنمای پایان نامه |
| دکتر سید عبدالله حسینی | ۲. استاد راهنمای پایان نامه |
| دکتر حمیدرضا رحمانی | ۳. استاد مشاور پایان نامه |
| دکتر محمدحسین بنابازی | ۴. استاد مشاور پایان نامه |
| دکتر امیرحسین مهدوی | ۵. استاد داور پایان نامه |
| دکتر جهانگیر خواجه علی | ۶. استاد داور پایان نامه |
| دکتر محمد مهدی مجیدی | سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده |

مشکر و قدردانی

سپاس و ستایش خدایی را که آفرید

جهان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را و عشق را... و کسانی که غمشان را در وجودم دیدم.

استوارترین تکیه گاهم دستان پر مهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم چشمان سبز مادرم

که هر چه آموختم در مکتب عشق آنها آموختم و هر چه بگو شتم قطره ای از دریای بی کران مهربانیشان را سپاس توانم گفت.

امروز، هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ به شتم رضای آنهاست.

از اساتید ارجمندم جناب آقای دکتر انصاری و جناب آقای دکتر حسینی که مسئولیت راهبانی این پایان نامه را به عهده داشته و زحمات بی دریغ و توصیه های ارزشمندشان در کلیه مراحل یاری دهنده ایجاب بوده است صمیمانه سپاسگزارم.

اساتید مشاور گرامی جناب آقای دکتر جانی و جناب آقای دکتر نبازی که در این مدت به شماره پشتیبان من بوده و راهبانی های ارزشمندشان را علماشی تحقیقتم بوده و از نظرات ارزشمندشان بهره مند بودم، شاکامی و توفیق روز افزون شان را خواستارم.

از جناب آقای دکتر مهدوی و جناب آقای دکتر خواجه علی که قبول زحمت فرموده و داوری تحقیق حاضر را به عهده گرفتند مشکر و قدردانی می کنم، سلامتی و توفیق این عزیزان را در همه عرصه های زندگی آرزو مندم.

سرور ابروانی

پایه ۳۳

کلیه حقوق مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه
متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
هشت	فهرست مطالب
۱	چکیده
۲	فصل اول: مقدمه
۲	۱-۱- اسیدآمینه و بیان ژن
۵	۲-۱- اهداف
۶	فصل دوم: بررسی منابع
۶	۱-۲- تاریخچه ای بر تشخیص و محاسبات اسیدهای نوکلئیک
۸	۲-۲- مزایای روش Realtime PCR
۹	۳-۲- کمیت نسبی
۹	۴-۲- روش‌های مطالعه بیان ژن
۱۰	۵-۲- احتیاجات اسیدآمینه در طیور
۱۲	۶-۲- اسیدآمینه ترئونین
۱۳	۷-۲- اعمال فیزیولوژیکی ترئونین
۱۳	۱-۷-۲- ایمونوپروتئینهای موجود در شیر
۱۴	۲-۷-۲- پردرآوری
۱۴	۳-۷-۲- دستگاه گوارش
۱۴	۴-۷-۲- ایمنی
۱۵	۸-۲- نسبت ترئونین به لیزین در جیره
۱۵	۹-۲- اثر ترئونین بر گوشت سینه
۱۵	۱۰-۲- متابولیسم ترئونین در بدن طیور گوشتی
۱۷	۱۱-۲- ترئونین در دستگاه گوارش
۱۹	۱۲-۲- پاسخهای ایمنی در طیور
۱۹	۱-۱۲-۲- ایمنی ذاتی
۲۱	۲-۱۲-۲- ایمنی اکتسابی
۲۲	۱۳-۲- ارتباط بین تغذیه و سیستم ایمنی طیور

۲۳	۱۴-۲- تنظیم ژنی بوسیله اسیدهای آمینه
۲۳	۱۵-۲- اینترفرون های نوع یک
۲۴	۱-۱۵-۲- ساختمان ، تولید ، گیرنده
۲۴	۲-۱۵-۲- اعمال بیولوژیک
۲۵	۳-۱۵-۲- اینترفرون و ایمنی
۲۷	۱۶-۲- اینترلوکین-۸
۳۰	۱۷-۲- مکانیسم اینترلوکین-۸
۳۲	فصل سوم: مواد و روش ها
۳۲	۱-۳- محل انجام آزمایش
۳۲	۲-۳- جامعه مورد مطالعه
۳۲	۳-۳- مدیریت پرورش
۳۳	۱-۳-۳- برنامه روشنایی، دما و تهویه
۳۳	۲-۳-۳- برنامه واکسیناسیون
۳۴	۳-۳-۳- پرورش و تغذیه
۳۵	۴-۳- نحوه نمونه برداری از بافت روده
۳۵	۵-۳- آماده سازی مواد برای بیان ژن اینترلوکین-۸ و اینترفرون-آلفا
۳۶	۱-۵-۳- مراحل استخراج RNA
۳۷	۲-۵-۳- ساخت cdNA از نمونه های RNA
۳۸	۳-۵-۳- مراحل ساخت cdNA
۳۸	۴-۵-۳- تعیین غلظت و خلوص RNA , cdNA
۳۹	۶-۳- انتخاب و بررسی آغازگرها
۳۹	۷-۳- بهینه سازی واکنش Real-Time PCR
۴۰	۱-۷-۳- دمای مناسب اتصال پرایمر در واکنش
۴۰	۲-۷-۳- بهینه سازی غلظت آغازگرها
۴۰	۸-۳- واکنش Real - time PCR
۴۱	۹-۳- آنالیز منحنی ذوب

۴۱	۱۰-۳- محاسبه بیان نسبی ژن های مورد نظر.....
۴۲	۱۱-۳- مدل آماری طرح
۴۴	فصل چهارم: نتایج و بحث
۴۴	۱-۴- تعیین کمیت و کیفیت RNA و cDNA
۴۴	۱-۱-۴- استخراج RNA
۴۵	۲-۱-۴- سنتز cDNA
۴۵	۲-۴- منحنی ذوب ژن های مورد مطالعه
۴۶	۳-۴- نمودار تکثیر ژن های مورد مطالعه
۴۷	۴-۴- بیان ژن اینترلوکین-۸ در تیمارهای مختلف
۴۸	۱-۴-۴- بررسی بیان ژن اینترلوکین-۸ در مقایسه با ژن مرجع.....
۵۰	۲-۴-۴- بیان ژن اینترلوکین-۸ بصورت کمیت نسبی.....
۵۱	۵-۴- بیان ژن اینترفرون-آلفا در تیمارهای مختلف.....
۵۱	۱-۵-۴- بررسی بی بیان ژن اینترفرون-آلفا در مقایسه با ژن مرجع.....
۵۲	۲-۵-۴- بیان ژن اینترفرون-آلفا بصورت کمیت نسبی.....
۵۳	۶-۴- بررسی همبستگی میان ژن های مورد مطالعه.....
۵۶	فصل پنجم: نتیجه گیری کلی و پیشنهادات
۵۶	۱-۵- نتیجه گیری کلی
۵۷	۲-۵- پیشنهادها
۵۸	منابع

فهرست جداول

<u>عنوان</u>	<u>صفحه</u>
جدول ۱-۳- برنامه دمایی اعمال شده طی دوره پرورش	۳۳
جدول ۲-۳- برنامه واکسیناسیون جوجه‌های گوشتی.....	۳۳
جدول ۳-۳- اجزاء خوراکی مورد استفاده در جیره‌های آزمایشی	۳۴
جدول ۴-۳- میزان انرژی و پروتئین مورد استفاده در جیره‌های آزمایشی.....	۳۵
جدول ۵-۳- نسبت مواد استفاده شده در مرحله ابتداء سـتـر	۳۸
جدول ۶-۳- ترکیب و حجم مواد تشکیل دهنده	۳۸
جدول ۷-۳- توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر نواحی ژنی.....	۳۹
جدول ۸-۳- نسبت مواد در واکنش زنجیره ای پلیمراز.....	۴۰
جدول ۹-۳- چرخه دمایی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....	۴۰
جدول ۱۰-۳- چرخه دمایی آنالیز منحنی ذوب.....	۴۱
جدول ۱-۴- تجزیه واریانس تاثیر سطوح ترئونین جیره بر بیان ژن اینترلوکین-۸.....	۴۹
جدول ۲-۴- مقایسات میانگین‌های ژن اینترلوکین-۸.....	۴۹
جدول ۳-۴- بیان ژن اینترلوکین-۸ برای بصورت کمیت نسبی.....	۵۰
جدول ۴-۴- تجزیه واریانس تاثیر سطوح مختلف ترئونین جیره بر بیان ژن اینترفرون-آلفا.....	۵۲
جدول ۵-۴- مقایسات میانگین‌های ژن اینترفرون-آلفا.....	۵۲
جدول ۶-۴- بیان ژن اینترفرون-آلفا بصورت کمیت نسبی.....	۵۳

دوازده

چکیده

در کنار تغذیه، پتانسیل ژنتیکی طیور در عملکرد صفات تولیدی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. بررسی اینکه چه حیواناتی با پتانسیل ژنتیکی بهتر قادر خواهند بود که از میزان غذای مصرفی، بیشترین تولید یا بهترین راندمان را کسب کنند، منجر به ایجاد شاخه‌ی جدیدی در میان علوم به نام ژنومیکس تغذیه‌ای گردیده است. در مطالعه حاضر، تاثیر سطوح مختلف اسید آمینه ترئونین در جیره غذایی بر بیان ژن‌های اینترلوکین-۸ و اینترفرون-آلفا در جوجه گوشتی سویه آرین مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش با استفاده از ۷۲۰ قطعه جوجه گوشتی در دوره آغازین (۲۱-۰ روزگی) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۶ سطح ترئونین (۰/۶۶، ۰/۷۶، ۰/۸۶، ۰/۹۶، ۱/۰۶ و ۱/۱۶ درصد) با ۴ تکرار و ۳۰ جوجه در هر تکرار انجام شد. در سن ۲۱ روزگی پرنده کشتار و نمونه روده از قسمت ژژنوم جهت بررسی بیان ژن تهیه شد. به منظور بررسی بیان ژن ابتدا کل RNA از سطح بافت روده استخراج و پس از سنتز cDNA، میزان بیان ژن به روش بیان نسبی (نسبت به ژن استاندارد) و با استفاده از تکنیک Realtime-PCR نسبتی اندازه گیری شد. ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. تفاوت سیکل آستانه هر نمونه از ژن استاندارد در قالب مدل طرح کاملاً تصادفی رویه عمومی خطی با استفاده از نرم افزار R مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطوح ترئونین مورد مطالعه (تیمارها) اثر معنی‌دار آماری بر بیان ژن‌های اینترلوکین-۸ و اینترفرون آلفا داشت ($p < 0/05$). مقادیر ΔCT در سطوح ترئونین نشان داد در مقایسه با ژن house keeping بیان ژن اینترفرون آلفا افزایش و بیان ژن اینترلوکین-۸ کاهش یافته است. برای بیان نسبی ژن نیاز به گروه کنترل بود، لذا تیمار چهارم با سطح ۰/۹۶ درصد ترئونین به عنوان معیار سنجش بیان ژن در نظر گرفته شد. در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۸۶ درصد ترئونین در ژن اینترلوکین-۸ بیشترین تفاوت معنی‌داری در غشای روده مشاهده شد و در جیره حاوی ۱/۰۶ درصد ترئونین بیشترین بیان در ژن اینترفرون-آلفا مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: بیان ژن، اینترلوکین-۸، اینترفرون آلفا، ترئونین، جوجه گوشتی

فصل اول مقدمه

۱-۱- اسید آمینه و بیان ژن

اسیدهای آمینه کارکردهایی چندگانه دارند و لذا باید حالت تعادل و ثبات (هموستازی) آنها بخوبی حفظ گردد. برخی آمینواسیدها می‌توانند تحت تاثیر شرایط تغذیه‌ای ویژه و یا استرس‌های مختلف ایجاد شود. از طرفی پستانداران باید عملکردهای فیزیولوژیک خود را در مراحل مختلف که با سطح دسترسی اسیدهای آمینه در ارتباط است بوسیله بیان ژن تنظیم نمایند. در این میان نقش اسیدهای آمینه ضروری همچون متیونین و لیزین که میزان احتیاج آنها بویژه در طیور بیش از مقداری است که توسط منابع بدنی تامین می‌گردد، حیاتی-تر است. برای رفع میزان مورد نیاز، این اسیدهای آمینه بایستی از طریق جیره غذایی تامین گردند. کمبود یا بیش بود آنها در جیره و زیست‌فراهمی^۱ آنها بر کارکردهای فیزیولوژیکی آنها در بدن تاثیر می‌گذارد. میزان اسیدهای آمینه در خون تحت تاثیر شرایط تغذیه‌ای خاص و شرایط استرس قرار می‌گیرد [۸۱]. بدنبال تغییر میزان اسیدهای آمینه در خون، پستانداران و پرندگان بایستی عملکردهای فیزیولوژیکی دخیل در میزان دسترسی به اسیدهای آمینه را از طریق تنظیم بیان ژنهای متعدد، تعدیل نمایند. بیان ژن‌های تمامی سلول‌ها در پاسخ به تغییرات محیط خارجی از جمله قابلیت دسترسی به مواد مغذی تنظیم می‌گردد. در پستانداران غلظت مواد مغذی در پلاسما تا حد زیادی تحت تاثیر بیماری یا وضعیت جیره می‌باشد. مخصوصاً غلظت اسیدهای آمینه در پلاسما به شرایط تغذیه‌ای حساس می‌باشد به نحوی که در شرایط سوء تغذیه سطح اسیدهای آمینه

¹ Bioavailability

چندین برابر افت می‌کند. چنین پدیده‌ای ممکن است در اثر محدودیت جهانی مصرف پروتئین یا محدودیت‌های خاص مربوط به اسیدهای آمینه ضروری روی دهد [۶۰].

هزینه تغذیه بیش از ۶۰-۷۰ درصد کل هزینه‌های پرورش طیور را تشکیل می‌دهد. مهمترین هدف علم تغذیه در صنعت طیور، کسب حداکثر تولید با صرف کمترین هزینه است. از مهمترین روش‌های کاهش هزینه تغذیه، حداکثر ساختن بهره‌وری از مواد مغذی موجود در غذا می‌باشد. برای حداکثر ساختن بهره‌وری استفاده از مواد مغذی، ارزیابی دقیق مواد مغذی موجود در اقلام خوراکی و تعیین دقیق نیاز پرنده ضروری است. اهمیت پروتئین در تغذیه طیور به علت تامین آمینواسیدها و نیتروژن مورد نیاز بدن پرنده می‌باشد. در بین اسیدهای آمینه موجود در طبیعت تنها ۲۰ اسید آمینه در ساختمان پروتئین‌ها حضور دارند. تامین اسیدهای آمینه آزاد برای بافتها، نقش مهمی را در نگهداری بافت‌ها و هموستاز پروتئین در بدن دارد. بهر حال، در کنار نقش آنها بعنوان سوبسترای سنتز پروتئین، اسیدهای آمینه دارای نقش‌های چندگانه و مهم هستند. آنها می‌توانند بعنوان سوبسترای گلوکوژنیک، حامل نیتروژن، نوروترانسمیتر، تنظیم کننده ترن‌اور پروتئین، فعالیت آنزیمی و جریان یونی باشند [۱۳۸]. حیوانات و گیاهان از ۲۲ اسید آمینه در ساخت پروتئین استفاده می‌نمایند ولی حیوانات قادر به سنتز تمام اسیدهای آمینه مورد نیاز خود نمی‌باشند. بنابراین اسیدهای آمینه ضروری (که در بدن ساخته نمی‌شوند)، از طریق خوراک باید تامین شوند. اسیدهای آمینه ضروری ۱۳-۱۰ درصد جیره طیور را تشکیل می‌دهند [۵۵]. هزینه تامین آنها ۵۰-۴۰ درصد هزینه خوراک را شامل می‌شود [۲]. اسیدهای آمینه والین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، متیونین، فنیل آلانین، ترئونین، تریپتوفان و هیستیدین بعنوان اسیدهای آمینه ضروری شناخته شده‌اند. بنابراین اسیدهای آمینه باید در جیره تامین شوند و کمبود هر کدام از آنها می‌تواند منجر به تعادل منفی نیتروژن و علائم کلینیکی گردد. همچنین تحقیقات اخیر به خوبی نقش اسیدهای آمینه در رشد و تکامل دستگاه گوارش و در نتیجه بهبود عملکرد را نشان می‌دهد [۱۳۱]. محققین گزارش کردند که میزان دسترسی اسیدهای آمینه در محتویات دستگاه گوارش برای وزن دوازدهه مهم است و به ارتباط بین افزایش وزن دوازدهه و افزایش وزن بدن اشاره کردند [۱۲۹]. امروزه با استفاده از اسیدهای آمینه کریستالی همانند لیزین هیدروکلراید، دی‌ال-متیونین و ال-ترئونین امکان کاهش دادن پروتئین جیره به لحاظ اقتصادی و جلوگیری از آلودگی محیط زیست وجود دارد. ترئونین به عنوان سومین اسید آمینه محدود کننده بعد از آمینواسیدهای متیونین و لیزین در جیره‌های کاربردی در نظر گرفته می‌شود. تولید صنعتی ال-ترئونین قابلیت دسترسی تجاری آن را افزایش داده است و مشوق مطالعات عظیمی روی آن گردیده است. ال-ترئونین کریستالی توسط تخمیر میکروبی تولید می‌شود. منابعی که بصورت تجاری برای افزودن در جیره حیوانات بکار می‌روند معمولاً حاوی ۵/۹۸ درصد ال-ترئونین می‌باشند و ۱۰۰ درصد قابلیت هضم دارند. رز و همکاران ترکیب آلفا-آمینو-بتا-هیدروکسی بوتیریک اسید (ترئونین) را تعیین و کریستاله نمودن [۱۰۱]. آنها دریافتند که اضافه نمودن این آمینواسید به جیره خالص رشد را حفظ می‌نماید. در حالیکه عدم حضور آن در جیره مانع از رشد حیوان می‌گردد.

در کنار تغذیه، پتانسیل ژنتیکی طیور در عملکرد صفات تولیدی از اهمیت بسزایی برخوردار است. بررسی اینکه چه حیواناتی با پتانسیل ژنتیکی بهتر قادر خواهند بود از میزان غذای مصرفی، بیشترین تولید یا بهترین راندمان را کسب کنند، منجر به ایجاد شاخه‌ی جدیدی در میان علوم به نام ژنومیکس تغذیه گردیده است. ژنومیکس تغذیه^۱ شاخه‌ای نوین از علم است که ارتباطی میان علوم ژنتیک و تغذیه برقرار نموده و اثرات متقابل این علوم را بررسی می‌نماید. تاثیر مواد مغذی بر روی بیان ژن یا تحریک در پروتئین‌سازی از طریق mRNA در پستانداران و طیور یک موضوع مهم در این زمینه تحقیقاتی می‌باشد [۸۲]. با این وجود دانش فعلی در مورد کنترل بیان ژن وابسته به اسیدهای آمینه محدود می‌باشد.

ژن‌های مورد نظر در این مطالعه اینترلوکین-۸ و اینترفرون-آلفا می‌باشد. اینترلوکین-۸ عضوی از خانواده کموکین می‌باشد و نقش کموتاکسی را در سلول‌های هدف ایفا می‌کند و باعث جذب نوتروفیل‌ها به محل عفونت می‌شود. اینترلوکین-۸ از انواع سلول‌های مختلف، سلول‌های ایمنی مثل ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها و همچنین از سلول‌های اندوتلیال غیرایمنی و سلول‌های اپیتلیال تولید می‌شود [۱۴]. تولید اینترلوکین-۸ در سلول‌های اپیتلیال روده در پاسخ به سایتوکین‌هایی مثل INF-آلفا [۷۱] و اینترلوکین یک [۱۳۵] یا با فشار اکسیداتیو مانند پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد. ژن دیگر اینترفرون آلفا بوده که پروتئین‌هایی هستند که توسط میزبان تولید می‌شوند تا جلوی همانندسازی ویروس‌ها را بگیرند. این پروتئین‌ها توسط حیوانات یا سلول‌های کشت شده سالم، در پاسخ به عفونت ویروسی یا عوامل القاکننده دیگر، تولید می‌شوند این ترکیبات رده نخست دفاع بدن علیه عفونت ویروسی هستند [۶۱].

در مطالعات بیان ژن از اطلاعات نهفته در ژن‌ها استفاده می‌شود تا یک محصول کاربردی نظیر پروتئین بدست آید. روش‌های مختلفی برای تعیین میزان بیان ژن‌ها وجود دارد که از جمله می‌توان به تکنیک‌های لکه-گذاری^۲، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به روش نسخه‌برداری معکوس^۳، Real-time PCR، ریزآرایه‌های بیان-ژن^۴، توالی‌یابی RNA^۵ اشاره داشت. در روش Real time PCR تعداد دقیق رونوشت‌های حاصل از یک ژن مهم نیست و فقط کاهش یا افزایش میزان بیان نسبت به بیان یک ژنی که در تمامی شرایط بیان آن تغییر نکند ژن مرجع^۶ سنجیده می‌شود [۷۶]. همچنین در این روش می‌توان از cDNA، RNA، DNA ژنومی و یا حتی DNA کلون شده استفاده کرد.

¹ Nutritional Genomics

² Blotting

³ Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

⁴ Expression Microarray

⁵ RNA-Seq

⁶ Housekeeping

۱-۲- اهداف

به دلیل نبود اطلاعات کافی در زمینه نیاز اسیدهای آمینه در مرغ گوشتی سویه آرین این تحقیق با استفاده از مرغ‌های گوشتی در این سویه انجام شد. علاوه بر این در حال حاضر تنها لاین جوجه گوشتی موجود در کشور، مرغ آرین می‌باشد. اهداف مورد نظر در این آزمایش عبارتند از:

۱- بررسی اثرات سطوح مختلف ترئونین در جیره غذایی آغازین (۰-۲۱ روزگی) جوجه‌های گوشتی سویه آرین در بیان ژن اینترفرون-آلفا

۲- بررسی میزان بیان ژن اینترلوکین-۸ بر روی جوجه‌های گوشتی سویه آرین در دوره اولیه رشد تحت استفاده از سطوح مختلف ترئونین در جیره غذایی

فصل دوم بررسی منابع

۲-۱- تاریخچه‌ای بر تشخیص و محاسبات اسیدهای نوکلئیک

در ابتدا، محاسبات نوکلئیک اسید از طریق افزودن رادیواکتیو نشاندار شده^۱ یا دی‌اکسی‌تیمیدین تری-فسفات (dTTP) به محیط کشت سلولی در آزمایشگاه^۲ و اندازه‌گیری مشارکت آن‌ها در اسیدنوکلئیک‌ها بوسیله رسوب‌دهی TCA (تری‌کلرواستیک اسید) صورت می‌گرفت. اگرچه، مشارکت رادیواکتیو یک تکنیک کمی است و به پژوهشگر ایده‌ای در مورد تغییرات کلی در جمعیت نوکلئیک اسید سیستم آزمایشی می‌دهد، این روش برای شناسایی و یا شمارش تعداد نسخه (رونوشت) ژن‌های اختصاصی کافی نبود. اولین کشف مهم در شناسایی ژن‌های خاص با توسعه روش انتقالی ساترن بلات^۳ پدید آمد [۱۱۴]. پس از این روش، روش نورترن بلات^۴ برای RNA بوجود آمد [۶۴]. در هر دو روش، این امکان وجود داشت که به صورت ویژه، یک ژن خاص یا رونوشت آن را بوسیله هیبریدیزاسیون پروب‌هایی که به صورت رادیواکتیو، در یک غشا که شامل اجزای محدود به DNA و یا RNA، نشانه‌گذاری شده بودند، شناسایی نمود. علی‌رغم تلاش‌های زیادی که برای بدست آوردن اطلاعات کمی از این روش‌ها شده بود، هیچ یک از این دو روش، روش‌های کمی نبودند. پیشرفت بعدی در کمی کردن رونوشت RNA با آزمایش حفاظت RNAase پدید آمد. در این روش، یک RNA معکوس شده کوتاه شدیداً رادیواکتیو (کمتر از ۵۰۰ باز) بواسطه‌ی پلاسمید با استفاده

¹ UTP

² in vitro

³ Southern transfer method

⁴ Northern blot

از آنزیم پلیمراز RNA T7 ساخته شد. RNA رونویسی شده‌ی آزمایشگاهی، برای رونوشت های مورد نظر همراه با پروب مورد استفاده برای نرمال سازی، سنتز شد. سپس، پروب های رادیواکتیو با هر یک از نمونه های RNA کل مخلوط شده و در محیط مایع، هیبرید شدند. RNA با دو رشته ای شدن، محافظت شده و بوسیله الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE)، رشته های با طول متفاوت جدا شده و در معرض فیلم قرار گرفتند. مزیت این روش، هیبریدزاسیون در مایع به جای هیبریدزاسیون در سطح جامد و عدم نیاز به انتقال RNA به غشا بود. با این حال، در این روش زمانی که از فیلم (ژل) استفاده می شود، محدوده ی دینامیکی، کوتاه و یکسان است. مجدداً، تصویربرداری فسفره^۱، به علت محدوده دینامیکی گسترده تر و نرم افزارهای پیشرفته جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات، برای کمی کردن این آزمایش ها توسعه یافت.

واکنش زنجیره ای پلیمراز^۲ ابتدا بوسیله کری مولیس^۳ در سال ۱۹۸۳ کشف و گزارش شد [۸۳] و به واسطه آن، جایزه نوبل را در سال ۱۹۹۳ از آن خود نمود. یافتن تکنیک آزمایشگاهی دیگری به جز PCR که اثرات زیادی روی جنبه های مختلف تحقیقات بیولوژیکی داشته باشد، دشوار است. با ترکیب کردن روش رونوشت معکوس^۴ در PCR، شناسایی رونوشت RNA خاص حتی با تعداد نسخه بسیار پایین از مواد اولیه امکان پذیر شد [۹۰].

کمی سازی رونوشت ها از نمونه های مجهول با اختراع روش رقابتی RT-PCR امکان پذیر گردید [۱۲۷]. در این روش، یک قطعه کوتاه از ناحیه هدف مورد نظر بین محل های پیوندی آغاز گر ها، شبیه توالی رونوشت هدف در نمونه شبیه سازی شده پلاسمید^۵، قرار می گیرد. آسان ترین روش برای ساخت یک هدف رقابتی کوچک تر، تجزیه ناحیه نمونه ی شبیه سازی شده بین محل های پیوندی پرایمر با یک آنزیم محدود کننده می - باشد. مقادیر معلوم از محصول RNA به واکنش RT افزوده می شوند و به cDNA تبدیل می شوند. متعاقباً، هر دوی استاندارد کوتاه شده و توالی های هدف مجهول با استفاده از PCR تکثیر می شوند. cDNA تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید جداسازی می شوند.

در بعضی از روش ها، یک باز دی اکسی نوکلئوتید رادیواکتیو برای نشانه گذاری DNA تکثیر شده و کمی - کردن بوسیله ژل یا تصویربرداری فسفره، انجام می شود. در سایر روش ها، محصولات روی ژل به همراه رنگی نمودن با اتیدیوم بروماید و یا SYBR[®]Green، تصویربرداری می شوند. کمی سازی باندهای هدف مجهول با استفاده از مقایسه این باندها با باندهای استاندارد DNA (لدر یا خط کش)، محاسبه شود. اگرچه این روش دقیق ترین روش تا به امروز است، همچنان دارای مشکلات تشخیصی عنوان شده در قسمت های قبل است. با این وجود، بیشتر انتقادات حول استاندارد DNA افزوده شده (spiked) متمرکز است. این نگرانی وجود دارد

¹ Phosphoimager

² Polymerase Chain Reaction

³ Kerry Mullis

⁴ Reverse Transcription

⁵ Plasmid clone

که استاندارد DNA بر سر منابع معرف و پرایمرها، با هدف مجهول در حین PCR رقابت کند و از این رو، ممکن است نتایج نهایی را تغییر دهد.

در سال ۱۹۹۶، شرکت^۱ ABI دستگاه Real-time 7700 PCR را به صورت تجاری در دسترس همگان قرار داد [۵۶]. تاکنون Real-time PCR کمی، دقیق‌ترین و حساس‌ترین روش برای تشخیص و کمی‌سازی اسید نوکلئیک‌ها می‌باشد. این روش بسیاری از کاستی‌های روش‌های قبلی را جبران نمود. با استفاده از اختصاصی بودن و حساس بودن PCR همراه با تشخیص مستقیم هدف انتخابی با استفاده از آغازگرهای نشان-گذاری شده با فلورسنت، پروب‌ها یا رنگ‌ها، مشکل ذاتی ژل‌ها، انتقال به غشا، هیبریدیزاسیون پروب رادیواکتیو و محدودیت‌های ژل به عنوان ردياب، کاملاً از بین رفته است.

همچنان دو مشکل برای Real-time PCR وجود دارد که از بین نرفته‌اند. یکی روش‌های کمی‌سازی (مثلاً نوع استاندارد، کیفیت سنجش و روش محاسباتی استفاده شده) و دیگری چگونگی نرمال‌سازی مناسب نمونه‌های مختلف برای اصلاح مغایرت‌ها در اسید نوکلئیک ورودی، از نمونه‌ای به نمونه دیگری باشد.

۲-۲- مزایای روش Realtime PCR

برخی مزایای این روش عبارتند از:

- ۱) تکثیر در هر زمان قابل مشاهده می‌باشد. به عبارتی امکان مشاهده لحظه به لحظه واکنش فراهم آمده و در هر سیکل امکان بررسی فرآیند تکثیر وجود دارد.
- ۲) امکان بهینه‌سازی واکنش به طوری که مناسب‌ترین غلظت DNA و آغازگر و همچنین تعداد سیکل لازم برای تکثیر مشخص می‌شود.
- ۳) امکان قطع واکنش در زمان دلخواه. از آنجایی که روند PCR قابل مشاهده می‌باشد و در صورت عدم تکثیر و یا رفتن به مرحله سکون می‌توان به واکنش خاتمه داد و از اتلاف وقت و انرژی پرهیز نمود.
- ۴) انجام PCR کمی^۲. با استفاده از روش تعیین کمیت قطعی^۳ و نسبی^۴ میزان دقیق و نسبی الگوی اولیه قابل اندازه‌گیری می‌باشد.
- ۵) معمولاً واکنش‌ها سریع‌تر اتفاق می‌افتند و لذا زمان کمتری لازم است.
- ۶) محدوده تشخیص^۵ آن بالاتر از PCR معمولی است. این روش قادر است حتی اختلاف کمتر از ۲ برابر را نیز نشان دهد [۸۸].

^۱ Applied Biosystems, Inc.

^۲ Quantitative PCR

^۳ Absolute Quantification

^۴ Relative Quantification

^۵ Detection Range

۳-۲- کمیت نسبی

یکی از کاربردی‌ترین استفاده‌های Real-time PCR بررسی بیان ژن‌هاست که با استفاده از کمیت سنجش نسبی انجام می‌شود و به آن کمیت نسبی^۱ گفته می‌شود. در حال حاضر کمیت نسبی دقیق‌ترین روش برای بررسی تغییرات بیان ژن است. در این روش تعداد دقیق رونوشت‌های حاصل از یک ژن مهم نیست و فقط کاهش یا افزایش بیان ژن مهم می‌باشد. این کاهش یا افزایش را با یک استاندارد یا ژن مرجع^۲ مقایسه می‌کنند [۷۶]. این استاندارد به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته می‌شود. در کمیت نسبی لزومی به دانستن غلظت دقیق نمونه‌ها نیست. این روش هم از نظر اقتصادی و هم از نظر زمانی مقرون به صرفه می‌باشد. در این روش می‌توان از DNA، RNA، cDNA، ژنومی و یا حتی DNA کلون شده استفاده کرد. اساس روش برپایه نسبت بیان ژن موردنظر به ژن مرجع است [۱۰۸].

۴-۲- روش‌های مطالعه بیان ژن

یکی از روش‌های تعیین کمیت نسخه برداری در بررسی بیان ژن، روش رونوشت برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۳ [۱۳۰] است که بالاترین حساسیت را در بین روش‌های گوناگون دارد و انعطاف پذیرترین روش تعیین کمیت RNA به شمار می‌رود [۱۲۸]. در این تکنیک داده‌های آزمایش همزمان با انجام واکنش جمع آوری می‌شوند و در آن غلظت فرآورده PCR به شدت نور فلورسنس ارتباط داده می‌شود [۵۷]. مراحل واکنش PCR به شکل زیر است:

- ۱- خط پایه: به چرخه‌های آغازین PCR که در آنها تغییر جزئی در فلورسنس ایجاد می‌شود خط پایه گویند. در کل، میزان فلورسنس هر چاهک متناسب با غلظت ملکول هدف در آن است.
 - ۲- چرخه آستانه: چرخه‌ای است که در آن تکثیر قطعه هدف برای نخستین بار به وسیله دستگاه قابل شناسایی است. این چرخه که با C_T^4 نشان داده می‌شود زمانی رخ می‌دهد که شدت فلورسنس تولیدی در پی تکثیر قطعه‌های PCR تا مقداری بیش از میزان کم و بیش ثابت فلورسنس زمینه‌ای افزایش یابد.
- حساسیت روش Real-time PCR از روش‌های دیگر بسیار بالاتر است و حتی توان شناسایی تنها یک کپی از یک نسخه برداری ویژه را دارد [۸۸]. در این روش به مقدار بسیار کم RNA نیاز است. در مراحل آغازین نمایی، میزان فلورسنس به میزان آستانه (C_T) می‌رسد که مقدار آن معمولاً ۱۰ برابر انحراف استاندارد فلورسنس پایه است [۱۲۶]. از این نقطه برای تعیین شمار نسخه آغازین موجود در نمونه اصلی استفاده می‌شود [۵۶]. در ادامه در مرحله خطی لگاریتمی تکثیر بهینه رخ می‌دهد و فرآورده PCR می‌تواند در هر چرخه دو برابر شود و در پایان با محدود شدن اجزای واکنش، به مرحله تکثیر یکنواخت می‌رسد.

¹ Relative Quantification

² Reference

³ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

⁴ Cycle threshold