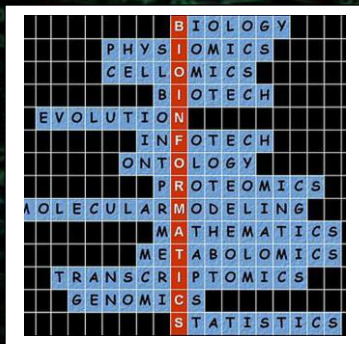


بسم الله الرحمن الرحيم



آموزش انواع کنترل ها، تکرارها و آزمون های مورد استفاده در آنالیز

آماري داده های ریل تایم (real time PCR) ، مقدمه ای بر آموزش نرم

افزار GenEx

کانال تلگرام

[@pishgam_bioinformatics](https://t.me/pishgam_bioinformatics)

سایت

<http://pishgam-bio.ir>

ایمیل: pishgaman_bioinformatics@gmail.com



آموزش نرم افزار GenEx: جامعترین نرم افزار برای بررسی کیفیت، اصلاح و آنالیز

آماري داده های ریل تایم (real time PCR)

سرشناسه	پیشگامان بیوانفورماتیک ۱۳۹۶-ع.ف.
عنوان و نام پدیدآور	: آموزش جامع آنالیز داده های ریل تایم / پیشگامان بیوانفورماتیک
مشخصات ظاهری	: ۴۷۵ص.: مصور، جدول، نمودار
شابک	: ۶۰۰۰۰۰۰۰ریال: ۳۶۵-۲۵۴۶-۳۶۵۸-۴۸-۹
وضعیت فهرست نویسی	: خیا
یادداشت	: عنوان: آموزش جامع آنالیز داده های ریل تایم
عنوان دیگر	: آموزش نرم افزارهای REST و GenEx
موضوع	: آنالیز داده های ریل تایم بیوانفورماتیک.
شناسه افزوده	: خانه بیوانفورماتیک
رده بندی کنگره	: ۱۳۹۶ع6/682/FB2:
رده بندی دیونی	: ۵۶۲/۵۴۲۶۳:
شماره کتابشناسی ملی	: ۵۴۶۳۲۵۹:

آموزش جامع آنالیز داده های ریل تایم.	خانه بیوانفورماتیک
نام کتاب:	آموزش جامع آنالیز داده های ریل تایم
تالیف:	گروه پیشگامان بیوانفورماتیک
ناشر:	خانه بیوانفورماتیک
ویرایش:	اول/۱۳۹۶
نوبت چاپ:	اول/۱۳۹۶
حروفچینی و صفحه آرایی:	جواد معزی اولیا
طراح و گرافیک:	گروه پیشگامان بیوانفورماتیک
امور فنی و چاپ:	محمد اقدسی
لیتوگرافی/صحافی:	پایتخت
شابک:	۳۶۵-۲۵۴۶-۳۶۵۸-۴۸-۹
شمارگان:	۵۰
قیمت:	۶۰۰۰۰۰۰ریال

تلفن مرکز پخش: ۶۶۲۴۲۱۵
فروش اینترنتی: <http://pishgam-bio.ir>

1	بخش اول مقدمه
3	آموزش انواع تکرارها در واکنش ریل تایم
6	آموزش انواع نمونه های کنترل در ریل تایم
7	روش های آنالیز داده های Real time PCR
10	آشنایی با اساس روش ریل تایم (real time PCR)
13	آشنایی با مفاهیم تخصصی در تکنیک Real time PCR
13	آموزش Ct در روش ریل تایم (Real time PCR)
17	آشنایی با مفهوم ژن کنترل داخلی (ژن رفرنس) در روش ریل تایم
21	آشنایی با مفهوم Fold change و نحوه محاسبه دلتا دلتا Ct ($\Delta\Delta Ct$) در ریل تایم
25	آموزش آنالیز داده های ریل تایم (Real time) به صورت دستی با فرمول های مربوطه
27	آموزش نحوه بررسی کیفیت داده های ریل تایم به صورت دستی
36	ضرورت محاسبه میزان کارایی PCR و پرایمرها برای آنالیز نتایج ریل تایم
41	بخش دوم: آموزش آنالیز داده های ریل تایم با استفاده از نرم افزار GenEx
42	آشنایی مقدماتی با نرم افزار GenEx
49	آموزش فرمت بندی داده های ریل تایم برای وارد نمودن در نرم افزار GenEx
56	آموزش آماده سازی داده های ریل تایم برای وارد نمودن در نرم افزار GenEx
73	آموزش بررسی کیفیت داده ها ریل تایم، یافتن داده ها نامعتبر و اصلاح آن ها توسط نرم افزار GenEx
104	پردازش اولیه داده های ریل تایم و آماده سازی داده ها جهت محاسبه Fold change و آنالیز آماری
125	آموزش آنالیز آماری داده های ریل تایم با استفاده از نرم افزار GenEx
127	آموزش کاربرد آزمون T (T-test) در آنالیز داده های ریل تایم و محاسبه آن در نرم افزار GenEx
163	پردازش و اصلاح نمودن داده ها ریل تایم براساس کنترل های no-RT
185	اصلاح و پردازش داده های ریل تایم با میزان RNA استفاده شده در سنتز cDNA
187	آموزش پردازش داده های ریل تایم با استفاده از Spike
194	پردازش داده های تکرار تکنیکال برای ریل تایم
208	آموزش پردازش داده های ریل تایم که در چند پلیت مجزا (چند واکنش ریل تایم) انجام می شود

آموزش کاربرد آزمون T جفت شده (paired T-test) در آنالیز داده های ریل تایم و محاسبه آن در نرم افزار GenEx	211
آموزش کاربرد آزمون one-way Anova در آنالیز داده های ریل تایم و محاسبه آن در نرم افزار GenEx	224
آموزش ترسیم heatmap برای داده های ریل تایم (ژن ها و نمونه ها) در نرم افزار GenEx	240
آموزش ترسیم دندروگرام برای داده های ریل تایم (نمونه ها) در نرم افزار GenEx	244
آموزش کاربرد آزمون Repeated measures ANOVA در آنالیز داده های ریل تایم و محاسبه آن در نرم افزار GenEx ..	249
آموزش کاربرد آزمون 2-wayanova در آنالیز داده های ریل تایم و محاسبه آن در نرم افزار GenEx	257
بررسی علت پراکنده بودن و error bar زیاد داده های ریل تایم با استفاده از نرم افزار GenEx	272
تعیین بهترین ژن رفرنس برای نرمال سازی داده ها ریل تایم با استفاده از نرم افزار GenEx	287
انتخاب بهترین ژن رفرنس برای آنالیز داده های ریل تایم با استفاده از روش geNorm	292
انتخاب بهترین ژن رفرنس برای آنالیز داده های ریل تایم با استفاده از روش NormFinder	296
آموزش ترسیم منحنی Roc و محاسبه حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) برای ژن ها به عنوان بیومارکر در تشخیص بیماری ها	304
آموزش سنجش تاثیر بیان ژن ها در Survival بر اساس داده ها ریل تایم در نرم افزار GenEx	314
بررسی میانکنش ژن ها و میکروRNAها با استفاده از داده های ریل تایم در نرم افزار GenEx	326
محاسبه ضریب همبستگی بین ژن هدف و میکروRNA با استفاده از نتایج ریل تایم در نرم افزار GenEx	341
آموزش ترسیم منحنی استاندارد جهت تعیین کارایی پرایمر برای داده های ریل تایم با نرم افزار GenEx	347
آموزش ترسیم منحنی استاندارد برای داده های ریل تایم جهت تعیین میزان مطلق ژن هدف با نرم افزار GenEx	357
آنالیز دسته بندی ژن ها و نمونه ها بر اساس داده های ریل تایم با روش PCA	365
آنالیز و پیش بینی نوع نمونه ها(سالم، بیمار،...) بر اساس داده های ریل تایم با روش Potential curves	379
آموزش شناسایی ژن های برتر در تفکیک نمونه ها (بیمار، سالم، ...) با روش Dynamic PCA با نرم افزار GenEx	390
آنالیز داده ها ریل تایم با روش 3-way	400
بررسی کیفیت داده های ریل تایم و اصلاح آن ها به صورت خودکار توسط نرم افزار GenEx	424
آموزش محاسبه سطح معنی داری تصحیح شده (adjusted p-value)	445
آموزش تهیه نرم افزار GenEx و نحوه رفع محدودیت زمانی استفاده از نرم افزار	449

انواع ژن های مورد بررسی در ریل تایم:

۱. **ژن هدف:** منظور از ژن هدف، ژنی می باشد که محقق می خواهد تغییرات بیان آن را در چند گروه بررسی نماید.
۲. **ژن کنترل داخلی:** ژنی که در همه نمونه ها و گروه ها دارای بیان ثابتی می باشد و برای اصلاح خطاهای تکنیکی از آن استفاده می شود. با استفاده از این ژن می توان تغییرات حاصل در بیان ژن هدف که ناشی از روش کار و کتتیک می باشد را از بین برد تا تغییرات ژن هدف تنها در بین نمونه ها مورد بررسی قرار گیرد. به ژن کنترل داخلی، ژن رفرنس نیز گفته می شود.
۳. **Spike:** Spike رشته های RNA سنتزی با غلظت های مشخص می باشد. بعد از استخراج RNA و هنگام سنتز cDNA میزان یکسانی از RNA های spike را به همه نمونه ها اضافه می نمایند و سپس سنتز cDNA انجام می پذیرد. برای رشته های spike نیز پرایمر طراحی شده است و از آن ها در واکنش ریل تایم استفاده می شود. بنابراین در ریل تایم برای هر نمونه علاوه بر محاسبه Ct برای ژن رفرنس و ژن هدف، برای spike نیز Ct محاسبه می شود. به دلیل اینکه میزان RNA های spike برای همه نمونه ها یکسان می باشد میزان Ct محاسبه شده در همه نمونه ها برای spike باید برابر باشد. در واقع spike مشخص کننده کیفیت سنتز cDNA می باشد. اگر Ct گزارش شده برای Spike در یک نمونه بالا باشد می توان نتیجه گرفت که مراحل سنتز cDNA برای آن نمونه دارای مشکل می باشد.

آموزش انواع تکرارها در واکنش ریل تایم

همه آزمایش های زیستی شامل دو نوع تکرار اصلی می باشند:

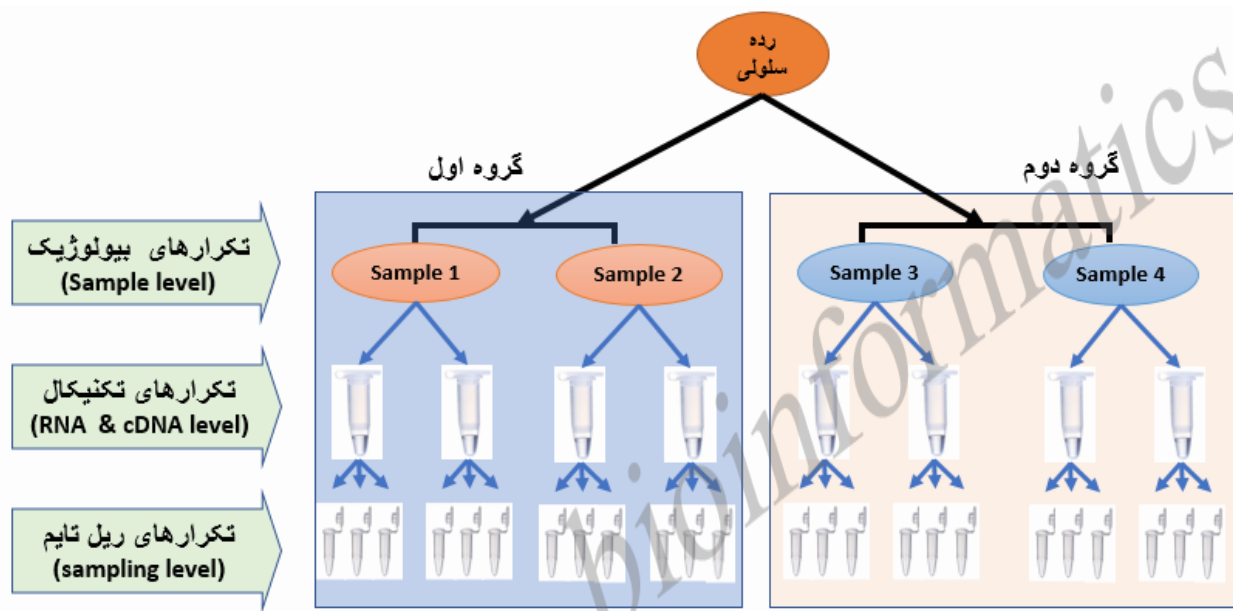
۱. تکرار بیولوژیک

۲. تکرار تکنیکال

آزمایش ریل تایم علاوه بر دو تکرار فوق دارای یک تکرار اختصاصی به نام تکرار qPCR و یا ریل تایم نیز می باشد.

تکرار بیولوژیک از واژه بیولوژی به معنی زیست شناسی گرفته شده است، علم زیست شناسی نیز علم مطالعه موجودات زنده می باشد بنابراین در آزمایش ها به نمونه های زنده یا نمونه هایی که قبلا زنده بودند تکرار بیولوژیک گفته می شود. به عنوان مثال در یک آزمایش که بیان یک ژن هدف در ۵۰ فرد بیمار و ۵۰ فرد سالم مورد بررسی قرار می گیرد، هر گروه سالم و نرمال دارای ۵۰ تکرار بیولوژیک می باشد. در آزمایشی که اثر یک دارو بر روی ۵ رده سلولی بررسی می گردد، ۵ تکرار بیولوژیک وجود دارد. اگر نمونه خون و یا یافت از ۴۰ نفر تهیه شود این آزمایش نیز دارای ۴۰ تکرار بیولوژیک می باشد.

شکل زیر تکرارهای یک آزمایش را با مثال توضیح می دهد.



در آزمایش طراحی شده در شکل فوق، دو نمونه از یک رده سلولی به عنوان گروه اول با ویتامین D تیمار شده اند و دو نمونه نیز در گروه دوم به عنوان کنترل (تیمار نشده) در نظر گرفته شده است. بنابراین گروه کنترل و شاهد دارای دو تکرار بیولوژیک می باشند. در این نمونه ها بیان ژن هدف باید سنجیده شود بنابراین از هر نمونه بیولوژیک باید RNA استخراج شود و سپس سنتز cDNA انجام گیرد و در مرحله بعد بوسیله ریل تایم تغییر بیان ژن هدف بررسی شود. سوالی که پیش می آید این است که آیا فرایند استخراج RNA، سنتز cDNA و ریل تایم به درستی انجام می گیرد؟ برای پاسخ به این سوال باید پس از انجام مراحل فوق، یک بار دیگر نیز از نمونه های بیولوژیک استخراج RNA و سنتز cDNA انجام پذیرد و سپس بر روی cDNA های جدید ریل تام انجام شود و نتایج جدید با نتایج قدیم برای هر نمونه بررسی شود. در صورتی که نتایج هر دو تکرار مشابه باشد می توان گفت که فرایند استخراج RNA، سنتز cDNA و ریل تایم به درستی انجام شده است. در واقع در این تکرار، تکنیک و روش کار مورد بررسی قرار گرفته است به همین دلیل به این تکرار، تکرار تکنیکال گفته می شود. بنابراین تکرار تکنیکال در سطح استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش ریل تایم می باشد و تکرار بیولوژیک در سطح نمونه

های زنده می باشد. در شکل فوق از هر نمونه بیولوژیک دو بار به صورت جداگانه استخراج RNA و سنتز cdNA انجام گرفته است برای همین آزمایش فوق دارای ۲ تکرار تکنیکال می باشد. از آنجایی که امکان دارد پس زمینه (back ground) ژنتیکی نمونه های زنده با یکدیگر متفاوت باشد ممکن است نتایج حاصل از بررسی بیان ژن هدف در بین تکرارهای بیولوژیک مقداری متفاوت باشد اما تمام تکرارهای تکنیکال برای یک نمونه زیستی باید تا حد زیادی مشابه باشند. توجه نمایید در آزمایش هایی مانند شکل فوق که در آن چند نمونه با پس زمینه ژنتیکی یکسان به عنوان تکرار بیولوژیک در نظر گرفت می شوند، در صورتی که نتایج تکرارهای بیولوژیک با یکدیگر تفاوت داشته باشند دلیل آن می تواند عدم بهینه بودن آزمایش (مانند عدم یکسان بودن نتیجه تیمارها) باشد و حتی در صورت مشاهده اختلاف زیاد بین تکرارهای بیولوژیک احتمال عدم تکرار پذیر بودن نتایج نیز وجود دارد. بنابراین یکی از دلایل وجود تکرارهای بیولوژیکی بررسی تکرار پذیری آزمایش می باشد.

در صورت مشاهده اختلاف نتایج در بین تکرارهای تکنیکال یک نمونه بیولوژیک، باید روند آزمایش بهینه سازی شود و در روش ریل تایم باید مراحل استخراج RNA و سنتز cdNA بهینه گردند.

فرض نمایید که فرایند سنتز cdNA برای نمونه های بیولوژیک به درستی صورت گرفته باشد پس اکنون نوبت انجام واکنش ریل تایم می باشد. در انجام واکنش ریل تایم سمپلینگ نمونه ها بسیار مهم می باشد بنابراین در صورتی که یک فرد سمپلینگ نمونه ها را به درستی انجام ندهد، نتایج حاصله قابل اعتماد نمی باشد. پس در واکنش ریل تایم برای اطمینان از سمپلینگ درست، باید برای هر نمونه cdNA دو یا ۳ واکنش در نظر گرفته شود. منظور از واکنش در این مرحله این است که واکنش ریل تایم برای هر نمونه cdNA در ۲ یا ۳ ویال تکرار گردد که به این تکرارها، تکرارهای ریل تایم و یا qPCR گفته می شود که دقت سمپلینگ فرد را نشان می دهد. در روش ریل تایم نتایج به دست آمده برای تکرارهای ریل تایم

باید یکسان باشد و در صورت مشاهده اختلاف نتایج در بین تکرارهای ریل تایم، باید در سمپلینگ نمونه ها توجه بیشتری نمود.

آموزش انواع نمونه های کنترل در ریل تایم

۱. **نمونه RT+:** منظور از RT، آنزیم reverse transcriptase می باشد که در سنتز cDNA کاربرد دارد. به دلیل اینکه در سنتز cDNA از آنزیم RT استفاده می شود به نمونه های cDNA، نمونه های RT+ گفته می شود. در واقع نمونه های RT+، نمونه هایی هستند که بیان ژن ها باید در آن ها سنجیده شود.

۲. **نمونه No-RT:** یک نوع کنترل در سنتز cDNA می باشد. برای تهیه این نمونه ها همه شرایط مثل سنتز cDNA است با این تفاوت که در تهیه آن ها از آنزیم RT استفاده نمی شود به همین دلیل به این نمونه ها No-RT (فاقد RT) گفته می شود. کنترل No-RT جهت بررسی آلودگی DNA در نمونه ها استفاده می گردد. به دلیل اینکه در این نمونه ها از آنزیم RT استفاده نمی شود بنابراین هیچ رشته cDNAی سنتز نمی شود بنابراین تکثیر این نمونه ها در ریل تایم بیانگر آلودگی DNA و یا وجود پرایمر دایمر می باشد. به نمونه های No-RT نمونه های RT- نیز گفته می شود.

۳. **نمونه کنترل منفی (NTC):** در فرایند آماده سازی مواد برای واکنش ریل تایم همیشه امکان آلودگی مواد با DNA و آلودگی خارجی وجود دارد. برای بررسی احتمال وجود آلودگی در مواد ریل تایم باید ۲ یا ۳ ویال را در ریل تایم به کنترل منفی اختصاص داد. در این کنترل ها از هیچ نوع نمونه های به عنوان الگوی تکثیر استفاده نمی شود از این رو به این نوع کنترل، نمونه های NTC نیز گفته می شود (no template control). به دلیل اینکه در این کنترل از رشته الگو جهت تکثیر استفاده نمی شود بنابراین نباید در ریل تایم محصولی برای این نمونه ها مشاهده شود در غیر این صورت وجود آلودگی در مواد ریل تایم حتمی می باشد.

روش های آنالیز داده های Real time PCR

۱. روش ترسیم منحنی استاندارد (مقایسه مطلق)

یکی از روش های آنالیز داده های ریل تایم، ترسیم منحنی استاندارد جهت سنجش میزان مطلق ژن هدف در نمونه ها می باشد. در این روش از یک نمونه RNA یا DNA با غلظت مشخص برای رسم منحنی استاندارد استفاده می شود. ابتدا غلظت RNA یا DNA استاندارد با روش اسپکتروفوتومتر تعیین می شود و سپس با استفاده از وزن مولکولی توالی RNA یا DNA می توان تعداد نسخه های RNA یا DNA را در نمونه استاندارد تعیین نمود. در مرحله بعد از این نمونه استاندارد چند سری رقت متوالی تهیه می گردد که تعداد نسخه های ژن هدف و یا میزان آن به نانوگرم در هر رقت مشخص می باشد. سپس برای این نمونه ها ریل تایم گذاشته می شود. البته در این روش علاوه بر نمونه های حاصل از رقت های متوالی، نمونه های مورد بررسی (که تعداد نسخه ژن هدف باید در آن ها تعیین گردد) نیز با ریل تایم بررسی و میزان Ct برای همه نمونه ها مشخص خواهد شد. در مرحله بعد یک نمودار استاندارد از نمونه های رقیق شده ترسیم می گردد بدین صورت که محور X میزان رقیق سازی یا تعداد کپی ژن هدف و محور Y میزان Ct هر نمونه می باشد، در ادامه با مقایسه Ct حاصل برای نمونه هدف با نمودار استاندارد می توان میزان کپی و یا غلظت ژن هدف را در آن نمونه محاسبه نمود.

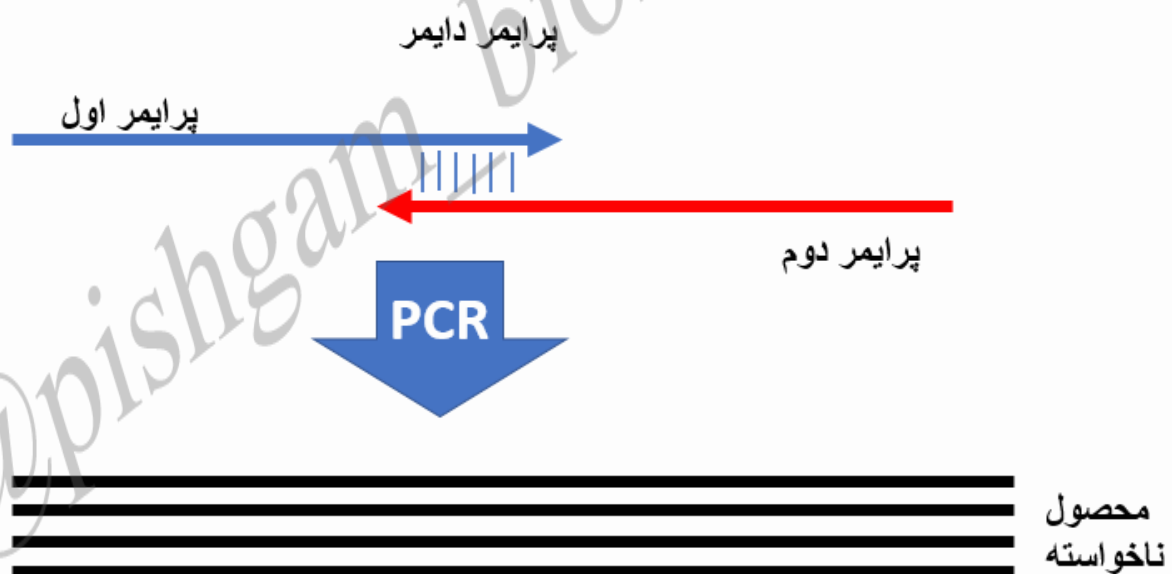
۲. روش مقایسه نسبی بیان ژن ها

در این روش بیان یک یا چند ژن هدف بین دو یا چند گروه (به عنوان مثال تومری و نرمال) مقایسه می گردد. در این روش معمولاً بیان ژن هدف در همه گروه ها نسبت به یک گروه مرجع محاسبه می گردد. در روش ریل تایم هنگامی که میزان بیان یک ژن را در چند گروه مقایسه می نماییم بهترین راه گزارش میزان تغییرات آن ژن در یک نمونه نسبت به نمونه دیگر fold change می باشد. مفهوم fold change

همان "چند برابر" می باشد، به عبارت بهتر بیان ژن مورد نظر در نمونه های گروه اول (به عنوان مثال نمونه های سرطانی) نسبت به نمونه های گروه دوم (به عنوان مثال نمونه های نرمال) چند برابر افزایش و یا کاهش یافته است؟ این جمله به این مفهوم است که اگر بیان ژن هدف را در گروه اول برابر ۱ در نظر بگیریم، بیان آن در گروه دوم برابر چه میزانی خواهد بود؟

برای حذف نوسانات مقادیر RNA وارد شده در واکنش و خطاهای دستگاه ها و افراد در این روش از ژن های رفرنس به عنوان کنترل استفاده می شود. ژن های رفرنس باید در همه بافت ها بیان ثابت داشته باشند. بدین منظور از ژن هایی تحت عنوان Housekeeping genes مانند β -actin و GAPDH استفاده می شود. بیان این ژن ها در همه نمونه ها و بافت ها ثابت می باشد و از مقایسه بیان ژن هدف با ژن کنترل داخلی می توان کاهش یا افزایش بیان ژن هدف در نمونه ها را مشخص نمود.

پرایمر دایمر چیست: در صورتی که انتهای ۳ پرایمر پرایمرهایی که در سنتز cDNA به کار می روند و یا پرایمرهایی که در ریل تایم به کار می روند دارای بازهای مکمل بوده و این پرایمرها به یکدیگر متصل شوند، پرایمرها سبب ایجاد یک محصول جدید ناخواسته در واکنش ریل تایم می گردند که در ریل تایم تکثیر و سبب نتیجه کاذب می شود (شکل زیر). به این محصول ناخواسته پرایمر دایمر گفته می شود. پرایمر دایمر می تواند بین یک پرایمر هم ایجاد و حتما نیاز نیست دو نوع پرایمر مختلف با هم جفت شوند.



شکل فوق: نحوه تشکیل محصول ناخواسته به وسیله پرایمر دایمر.

مراحل آنالیز داده های ریل تایم شامل ۳ مرحله می باشد:

مرحله اول: بررسی کیفیت داده ها ریل تایم و اصلاح داده های مخدوش

مرحله دوم: پردازش اولیه داده های ریل تایم و آماده سازی داده ها جهت محاسبه Fold change و آنالیز

آماري

مرحله سوم: محاسبه Fold change و آنالیز آماری تغییرات بیانی ژن های هدف.

در ادامه این سه مرحله را بیستر توضیح خواهیم داد

مرحله اول: بررسی کیفیت داده ها ریل تایم و اصلاح داده های مخدوش

مراحل بررسی کیفیت و اعتبار داده های زیل تایم

مرحله اول بررسی کیفیت داده ها، بررسی منحنی ذوب برای هر نمونه می باشد. که مه منحنی های ذوب برای یک ژن باید در یک دما قرار بگیرد.

مرحله دوم بررسی کیفیت داده ها بررسی Ct کنترل های منفی (NTC) برای همه ژن ها می باشد. میزان Ct تعیین شده برای نمونه های کنترل منفی باید بالای ۳۸ باشد و یا برای نمونه های کنترل منفی Ct تعیین نشده باشد. همچنین میزان Ct نمونه های کنترل منفی باید با Ct نمونه های RT+ بیش از ۳ سیکل فاصله داشته باشد. به عنوان مثال اگر میزان Ct برای نمونه های کنترل منفی برابر ۳۸ باشد حداکثر Ct مجاز برای نمونه های RT+ برابر ۳۵ می باشد. پس در صورتی که میزان Ct برای نمونه های کنترل منفی از ۳۸ کمتر باشد اما میزان Ct برای نمونه های RT+ به میزان حداقل ۳ سیکل از Ct نمونه کنترل منفی کمتر باشد می توان داده ها را قابل قبول دانست (البته در آزمایشگاه های پیشرفته اگر Ct کنترل منفی از ۳۸ کمتر باشند نتایج را قابل قبول نمی دانند اما به دلیل اینکه قیمت مواد ریل تایم گران می باشد و شرایط تکرار آزمایش برای همه میسر نیست مجبور هستیم مرزهای قابل قبول بودن و غیر قابل بودن داده ها را کمی جابجا نماییم D:). در صورتی که داده های یک ژن دارای کیفیت مطلوب نباشد باید ریل تایم تکرار شود و آلودگی از محیط کار حذف شود.

مرحله سوم بررسی کیفیت داده ها بررسی Ct کنترل های no-RT برای همه نمونه ها می باشد. میزان Ct تعیین شده برای نمونه های no-RT باید بالای 36 باشد و یا برای این نمونه ها Ct تعیین نشده باشد. همچنین میزان Ct نمونه های کنترل no-RT نیز (همانند Ct نمونه های کنترل منفی) باید با Ct نمونه های RT+ بیش از ۳ سیکل فاصله داشته باشد. Ct پایین تر از ۳۶ در نمونه های no-RT بیانگر آلوده بودن نمونه ها به DNA ژنومی می باشد. در صورتی که قادر به حذف آلودگی DNA ژنومی از نمونه های خود

نیستید، باید پرایمرهای خود را به صورتی طراحی نمایید که مختص توالی mRNA باشد و به توالی DNA متصل نشود. آموزش نحوه طراحی پرایمر به صورت اختصاصی برای توالی mRNA را می توانید از لینک زیر نهیه نمایید.

<http://pishgam-bio.ir/product/%D8%A2%D9%85%D9%88%D8%B2%D8%B4-%D8%AA%D8%AE%D8%B5%D8%B5%DB%8C-%D8%B7%D8%B1%D8%A7%D8%AD%DB%8C-%D9%BE%D8%B1%D8%A7%DB%8C%D9%85%D8%B1%D9%87%D8%A7%DB%8C-%D8%B1%DB%8C%D9%84-%D8%AA%D8%A7%DB%8C%D9%85/>

مرحله چهارم بررسی کیفیت داده های ریل تایم، بررسی داده های Ct برای تکرارهای ریل تایم هر نمونه (triplicate) می باشد. در آزمایش های زیستی همیشه احتمال خطای سمپلینگ وجود دارد برای همین هر نمونه را سه یا دو بار تکرار می نمایم تا در صورت وجود خطای سمپلینگ از آن مطلع شویم. در این مرحله برای همه نمونه ها و ژن ها میزان Ct هر سه تکرار ریل تایم را بررسی می نمایم برای همه تکرارها باید میزان Ct در یک محدوده ی یکسان قرار گرفته باشد و Ct ها باید بسیار به هم شبیه باشند.

مرحله پنجم در بررسی کیفیت داده های ریل تایم بررسی میزان Ct ژن رفرنس برای هر نمونه می باشد. در بسیاری از آزمایشگاه های پیشرفته Ct بالای ۲۵ را برای ژن کنترل داخلی قابل قبول نمی دانند، اما به دلیل اینکه بسیاری از افراد در تکرار ریل تایم محدودیت دارند حد استاندارد رو بالاتر می آوریم و می گوئیم که Ct کمتر از ۳۰ (خیلی با ارفاق ۳۱) برای ژن رفرنس قابل قبول می باشد. اما باید توجه نمود اگر میزان Ct برای ژن رفرنس از ۲۴ بیشتر باشد در صورتی که بیان ژن هدف در نمونه مورد بررسی پایین باشد، ممکن Ct برای ژن هدف تشخیص داده نشود و به عبارت دیگر نمونه به Ct نرسد.

مرحله ششم در بررسی کیفیت داده های ریل تایم بررسی میزان Ct برای هر نمونه می باشد. در برخی از موارد حتی Ct بالای ۳۴ را برای نمونه ها قابل قبول نمی دانند، اما به دلیل اینکه بسیاری در تکرار ریل

تایم محدودیت دارند حد استاندارد رو بالاتر می بریم و می گوییم که Ct بالای ۳۸ را برای نمونه ها قابل قبول نمی باشد. مخصوصا زمانی که کنترل های NTC و no-RT دارای Ct باشند.

در یک صورت می توان Ct بالای ۳۸ را برای ژن مورد بررسی در نمونه ها مورد قبول دانست که نمونه ها دارای شرایط زیر باشند:

۱. Ct ژن کنترل داخلی از ۲۵ کمتر باشد (برابر ۲۴ و یا کمتر از آن). البته میزان ایده آل حد استاندارد کمتر از ۲۱ می باشد.

۲. از یک نمونه که ژن مورد نظر در آن بیان دارد به عنوان کنترل مثبت استفاده شود و Ct نمونه کنترل مثبت از ۳۸ کمتر باشد.

بنابراین در صورتی که بیان یک ژن را در دو (یا چند) گروه بررسی می نمایید و Ct نمونه ها در گروه اول بیشتر از ۳۸ اما در گروه دیگر کمتر از ۳۸ می باشد. در صورتی Ct گروه اول قابل قبول می باشد که Ct ژن کنترل داخلی در نمونه های گروه اول از ۲۴ کمتر باشد. این نتایج نشان می دهد که ژن مورد بررسی در گروه اول فاقد بیان می باشد.

با استفاده از نرم افزار GenEx می توان کیفیت همه داده های را به صورت خودکار بررسی نمود و داده های مخدوش را مشخص و اصلاح نمود.

مرحله دوم: پردازش اولیه داده های ریل تایم و آماده سازی داده ها جهت محاسبه Fold change و آنالیز آماری

پردازش و اصلاح نمودن داده های ریل تایم براساس کنترل های no-RT

همان گونه که قبلاً توضیح دادیم کنترل های no-RT یکی از کنترل های مهم در بررسی کیفیت داده های ریل تایم می باشد و همچنین توضیح دادیم که اختلاف نمونه های RT+ با نمونه های No-RT نباید از ۲ سی تی کمتر باشد. وجود Ct پایین برای نمونه های No-RT می تواند دلیل آلودگی DNA و یا وجود پرایمر دایمر در واکنش ریل تایم باشد. از آنجایی که آلودگی DNA و دایمر پرایمر می تواند سبب تغییر Ct نمونه های RT+ گردد و به عنوان مثال نمونه ای که آلوده به DNA می باشد می تواند دارای Ct پایین تر نسبت به نمونه های فاقد آلودگی باشد، بنابراین اثر آلودگی DNA و دایمر پرایمر بر روی Ct نمونه های RT+ باید اصلاح شود.

اصلاح و پردازش داده های ریل تایم با میزان RNA استفاده شده در سنتز cDNA

یکی از شرایط مهم در سنتز cDNA برای نمونه ها این است که میزان RNA استفاده شده برای همه نمونه ها برابر باشد. افزایش میزان RNA می تواند سبب افزایش تعداد رشته های الگو در واکنش ریل تایم و در نتیجه کاهش Ct آن نمونه گردد. البته در صورتی که از ژن رفرنس نیز در کنار ژن های هدف به عنوان نرمال کننده استفاده شود میزان dCt محاسبه شده برای cDNA های سنتز شده با RNA ها با غلظت متفاوت برای یک نمونه یکسان خواهد بود. اما در شرایطی که از ژن رفرنس در ریل تایم استفاده نمی شود و یا در صورت تمایل می توان داده های ریل تایم را با میزان RNA استفاده شده در سنتز cDNA اصلاح نمود. استفاده از میزان RNA استفاده شده در سنتز cDNA برای اصلاح داده های ریل تایم دارای یک شرط می باشد: حجم cDNA نهایی و میزان رقیق نمودن آن و میزان استفاده از cDNA در واکنش ریل تایم برای همه نمونه ها برابر باشد. به عنوان مثال اگر برای نمونه اول با ۵۰۰ نانوگرم RNA ۲۰ میکرولیتر cDNA سنتز شود و این cDNA به نسبت ۱ به ۵ رقیق شود و از ۱ میکرو لیتر آن به عنوان الگو در ریل تایم استفاده شود در صورتی که نمونه دوم با ۲۵۰ نانوگرم RNA ۱۰ میکرولیتر cDNA

سنتز شود و با شرایط ۱ به ۵ رقیق شود دیگر نمی توان از میزان RNA استفاده شده در سنتز cDNA برای اصلاح داده های ریل تایم استفاده نمود.

آموزش پردازش داده های ریل تایم با استفاده از Spike

Spike الگوهای RNA سنتزی با غلظت های مشخص می باشد. بعد از استخراج RNA و هنگام سنتز cDNA میزان یکسانی از RNA های spike را به همه نمونه ها اضافه می نمایند و سپس سنتز cDNA انجام می پذیرد برای رشته های spike نیز پرایمر طراحی شده است و از آن ها در واکنش ریل تایم استفاده می شود. در واقع برای هر نمونه علاوه بر محاسبه Ct ژن رفرنس و ژن هدف، برای spike نیز Ct محاسبه می شود. به دلیل اینکه میزان RNA های spike برای همه نمونه ها یکسان می باشد میزان Ct محاسبه شده در همه نمونه ها برای spike نیز باید برابر باشد. در واقع spike مشخص کننده کیفیت سنتز cDNA می باشد. اگر Ct گزارش شده برای Spike بالا باشد در نتیجه مراحل سنتز cDNA برای آن نمونه دارای مشکل می باشد.

پردازش داده های تکرار تکنیکال برای ریل تایم

تکرار تکنیکال برای بررسی صحت مراحل کار مانند استخراج RNA، سنتز cDNA و ریل تایم ضروری می باشد. اما هنگامی که می خواهیم داده های دو تکرار ریل تایم که در دو ریل تایم مجزا اجرا شده است را با هم ادغام نماییم یک مشکل پیش می آید و آن هم این است که به دلیل این که واکنش های ریل تایم در زمان های مختلف اجرا شده اند ممکن است محدوده Ct برای ژن ها متفاوت باشد. برای اصلاح این مشکل باید در هر دو واکنش ریل تایم علاوه بر نمونه های مورد بررسی باید از یک نمونه مشترک (cDNA) نیز استفاده نمود. برای این نمونه مشترک در هر دو واکنش ریل تایم میزان Ct محاسبه می گردد و سپس با مقایسه اختلاف Ct های گزارش شده برای این نمونه مشترک بین دو واکنش ریل تایم می توان محدوده

Ct همه ژن ها را در دو یا چند واکنش ریل تایم مجزا اصلاح نمود. به این نمونه مشترک در بین واکنش های ریل تایم، نمونه IPC یا کالیبره کننده بین پلیتی (inter plate calibrator) گفته می شود. بنابراین هر پلیت ریل تایم دارای یک نمونه IPC می باشد و منبع cDNA نمونه IPC در همه پلیت های ریل تایم مشترک می باشد. در این مثال به دلیل اینکه ما همه نمونه های ریل تایم اول را در ریل تایم دوم نیز تکرار می نماییم و در واقع همه نمونه ها بین دو پلیت مختلف ریل تایم مشترک هستند، همه نمونه ها یک نوع IPC محسوب می شوند. بنابراین در صورتی که از نمونه IPC در دو ریل تایم استفاده ننموده اید می توانید از داده های یکی از نمونه هایی که دارای بهترین کیفیت Ct در بین نمونه ها می باشد به عنوان IPC استفاده نمایید.

آموزش پردازش داده های ریل تایم که در چند پلیت مجزا (چند واکنش ریل تایم) انجام می شود

در بسیار از موارد به دلایل خاص مانند زیاد بودن نمونه ها، ممکن است بخشی از نمونه ها در یک واکنش ریل تایم و بخش دیگر از نمونه ها در واکنش ریل تایم دیگر انجام گیرد و به این صورت همه نمونه ها (منظور تکرار تکنیکال نیست) در چند واکنش ریل تایم سنجش می شوند. همان گونه که قبلا ذکر کردیم هنگامی که میخواهیم داده های دو واکنش مجزای ریل تایم را با یکدیگر ترکیب و آنالیز نماییم یک مشکل پیش می آید و آن هم این است که به دلیل این که واکنش های ریل تایم در زمان های مختلف گذاشته شده اند ممکن است محدوده Ct برای ژن ها متفاوت باشد. برای اصلاح این مشکل در هنگامی که نمونه های در چند واکنش ریل تایم آزمایش می شوند نیز باید از نمونه های IPC استفاده نمود بنابراین در هر واکنش ریل تایم علاوه بر نمونه های مورد بررسی باید از یک نمونه با cDNA مشترک به عنوان نمونه IPC استفاده نمود پس هر پلیت ریل تایم دارای یک نمونه IPC می باشد و منبع cDNA نمونه های IPC در همه پلیت های ریل تایم مشترک می باشد.



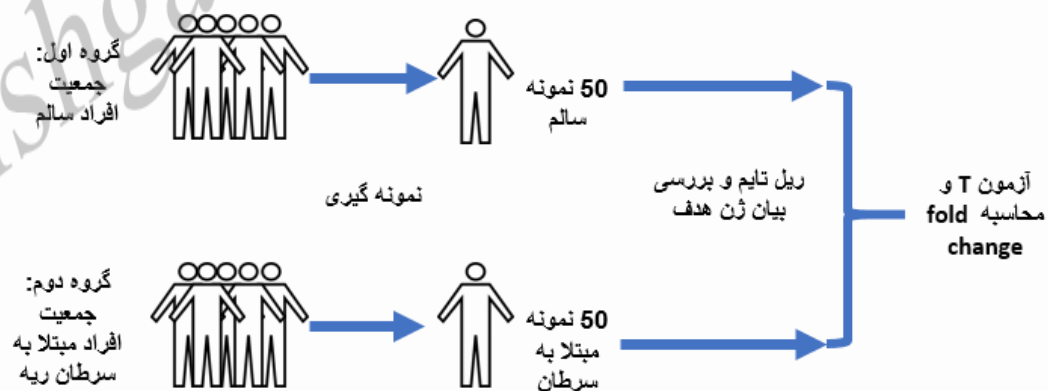
در شکل فوق طراحی یک آزمایش را نشان می دهد که شامل دو دو تکرار تکنیکال می باشد. در هر تکرار تکنیکال بخشی از نمونه ها در یک پلیت و بخشی دیگر در پلیت دوم آزمایش شده اند. بنابراین ۴ پلیت در این آزمایش به کار برده شده است.

مرحله سوم: محاسبه Fold change و آنالیز آماری تغییرات بیانی ژن های هدف.

آموزش کاربرد آزمون T (T-test) در آنالیز داده های ریل تایم

با استفاده از آزمون T (T-test) می توان میانگین بیان یک یا چند ژن هدف را دو گروه مستقل مورد بررسی قرار داد. به عبارتی دیگر در این آزمون، میانگین های بدست آمده از نمونه های هر گروه مورد بررسی قرار می گیرد. بدین معنی که از دو جمعیت مختلف مانند جمعیت افراد مبتلا به سرطان ریه و جمعیت افراد سالم، نمونه هایی (اعم از اینکه تعداد نمونه ها مساوی یا غیر مساوی باشند)، به طور تصادفی انتخاب کرده و میانگین های آن دو جامعه را با هم مقایسه می کنیم (شکل زیر).

آزمون T بر پایه ی توزیع نرمال t بوده و برای نمونه های کوچک نیز، زمانی بهترین کاربرد را دارد که داده های متغیر مقایسه شوند در گروه های مستقل از توزیع نرمال برخوردار باشند.



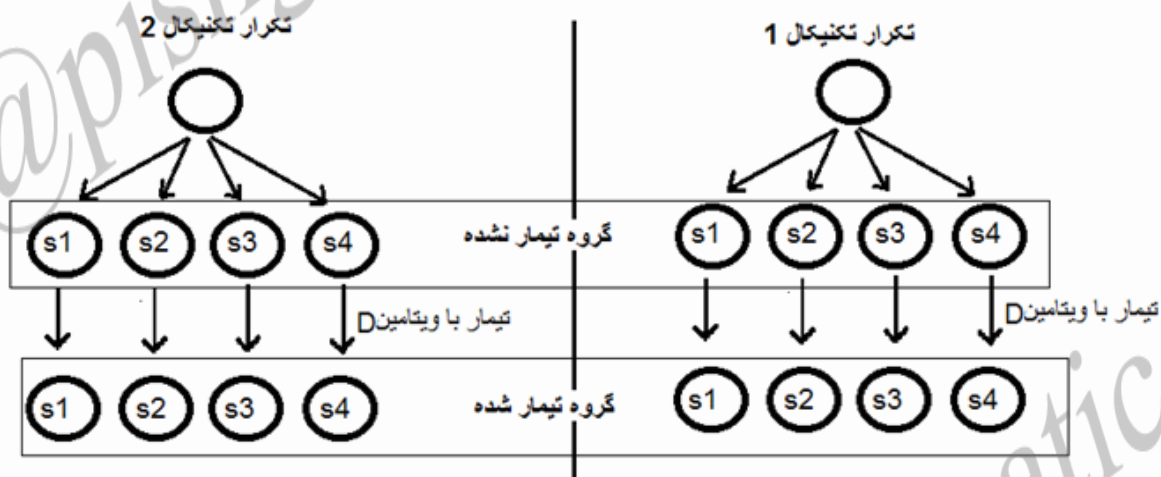
شکل فوق: استفاده از آزمون T در محاسبه سطح معنی داری داده های ریل تایم

در مرحله قبل در مورد آماده سازی داده های برای محاسبه Fold change و آنالیز آماری توضیحاتی را ارائه نمودیم.

آموزش کاربرد آزمون T جفت شده (paired T-test) در آنالیز داده های ریل تایم

در مثال قبل در مورد آزمون T جفت نشده توضیحات لازم را ارائه دادیم در این بخش می خواهیم کاربرد آزمون T جفت شده را در آنالیز نتایج ریل تایم توضیح دهیم.

آزمون T جفت شده که با عناوینی چون آزمون تی با نمونه های زوج ، تی وابسته، آزمون نمونه های همبسته و آزمون نمونه های جفتی نیز شناخته، زمانی در آنالیز نتایج ریل تایم به کار می رود که یک گروه را بیش از یک بار آزمایش می کنیم مانند میزان بیان ژن هدف در ۱۰ فرد قبل و بعد از تزریق یک داروی خاص. به عبارت دیگر یا ما روی یک گروه یک آزمون (یا تیمار) انجام می دهیم و در نهایت با روش تی وابسته نتایج بیان ژن هدف را قبل و بعد از تیمار با هم مقایسه می کنیم تا ببینیم که آیا تفاوت معناداری در بیان ژن (یا ژن های هدف) ایجاد شده است یا خیر.

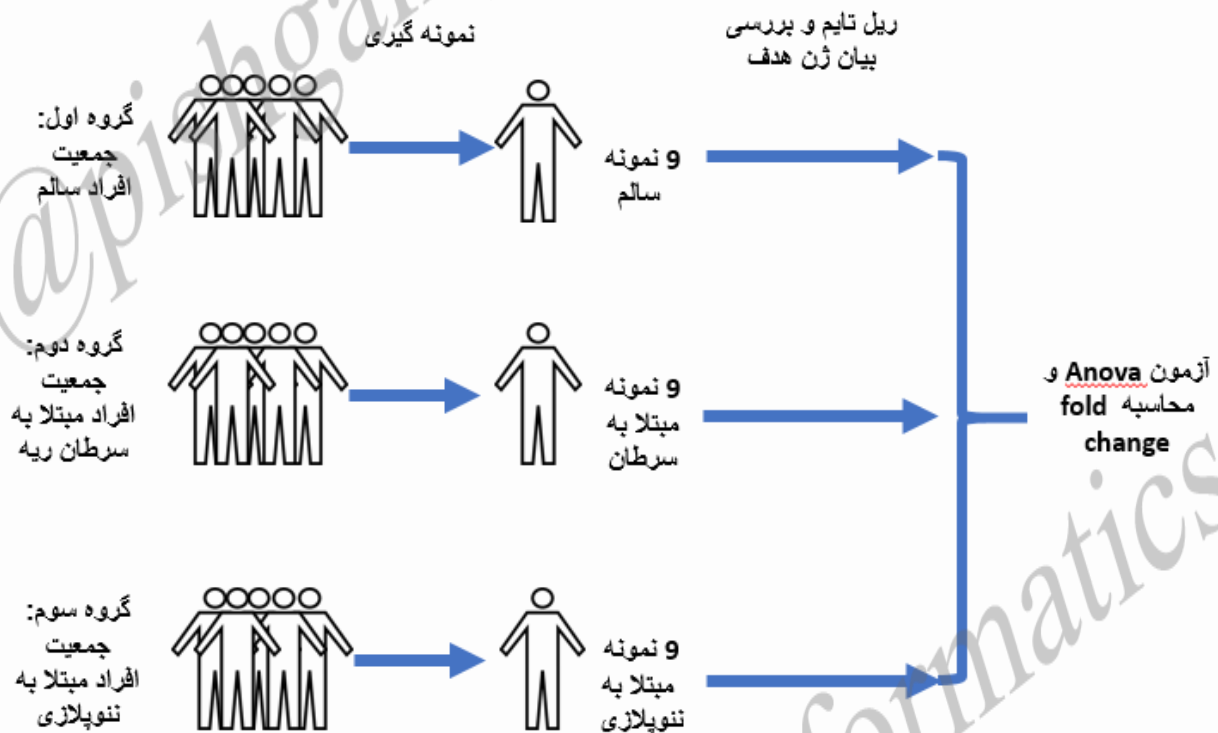


در آزمایش فوق ۴ تکرار بیولوژیک از یک رده سلولی با ویتامین D تیمار شده اند سپس تغییرات بیانی دو ژن هدف bcl1 و p53 در این نمونه ها بررسی شده است. این آزمایش دارای دو تکرار تکنیکال می باشد (منظور از تکرار تکنیکال تکرار مراحل استخراج RNA تا سنتز cDNA و ریل تایم می باشد)

از آنجایی که در این آزمایش میزان بیان ژن ها در قبل و بعد از تیمار با ویتامین D مورد بررسی قرار می گیرند، بنابراین باید از آزمون T جفت شده برای آنالیز آماری استفاده نمود.

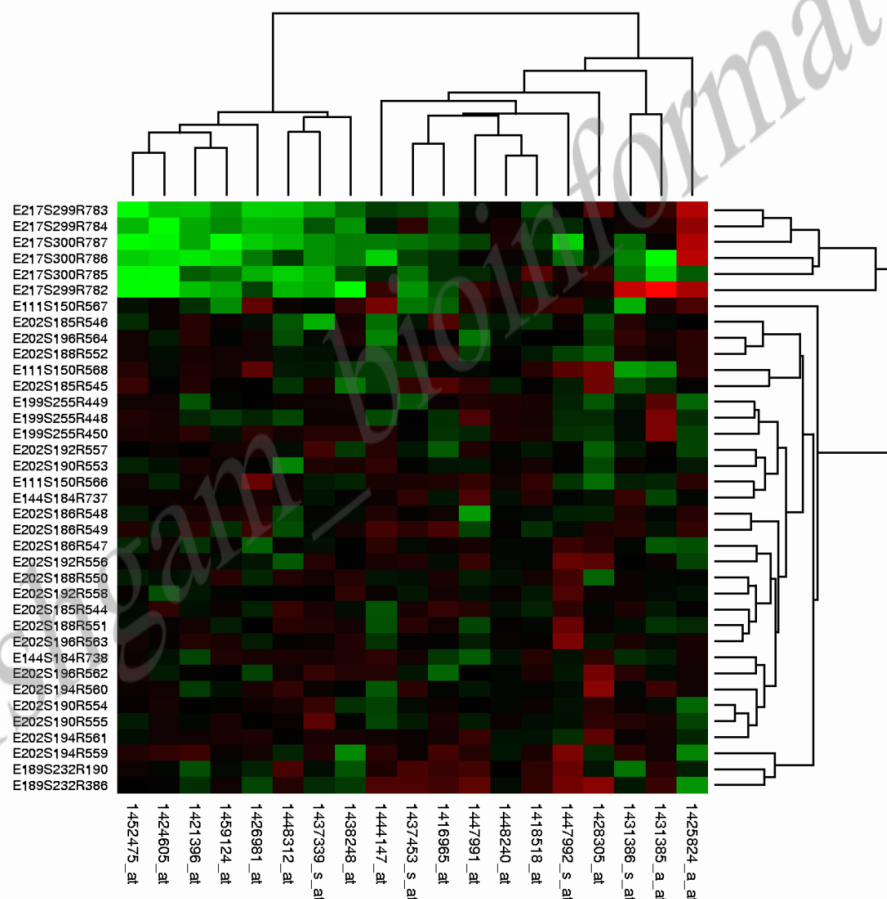
آموزش کاربرد آزمون one-way Anova در آنالیز داده های ریل تایم

در صورتی که بیان یک یا چند ژن هدف را در بیش از دو گروه بررسی نماییم و در آنالیز آماری بیش از دو گروه داشته باشیم برای بررسی سطح معنی داری ژن ها باید از آزمون Anova استفاده نماییم. با استفاده از آزمون Anova می توان سطح معنی داری تغییرات بیان یک یا چند ژن هدف را در بیش از دو گروه مستقل مورد بررسی قرار داد. بدین معنی که از سه (یا بیشتر) جمعیت مختلف مانند گروه افراد مبتلا به سرطان ریه، افراد مبتلا به نئوپلازی و گروه افراد سالم، نمونه هایی اعم از اینکه تعداد نمونه مساوی یا غیر مساوی باشند، به طور تصادفی انتخاب کرده و سطح معنی داری اختلاف میانگین های این سه جمعیت را با هم مقایسه می کنیم (شکل زیر).



آموزش کاربرد heatmap برای داده های ریل تایم (ژن ها و نمونه ها)

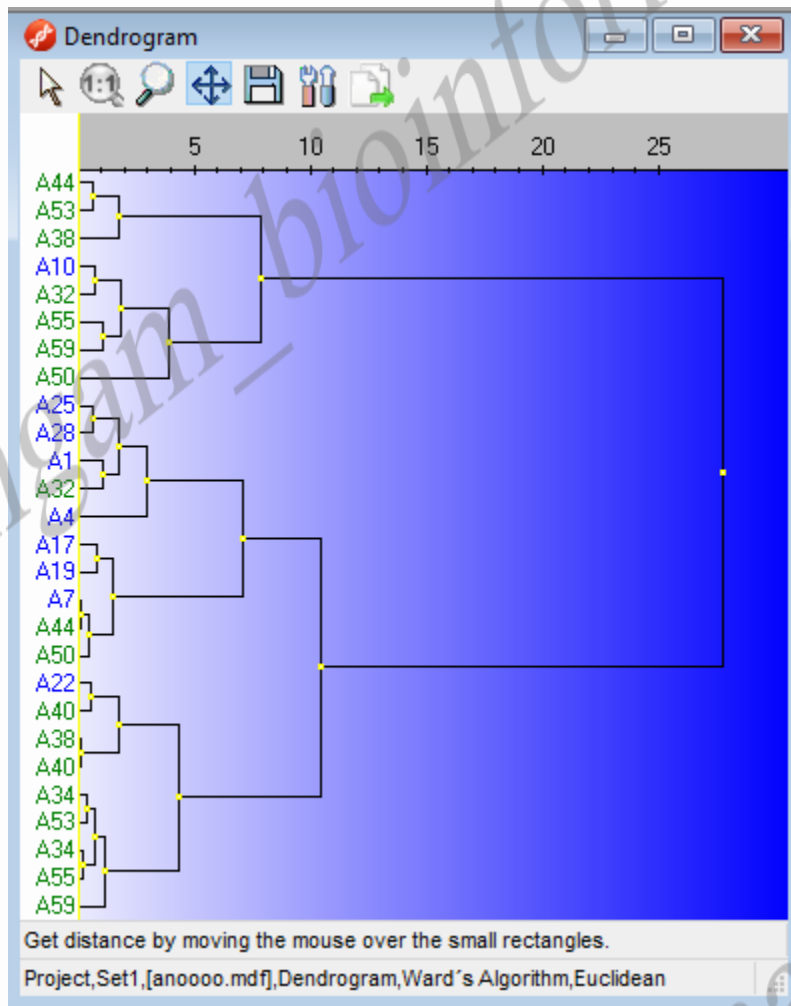
یکی از روش های بسیار مفید در نمایش تغییرات بیان ژن ها بر حسب گروه ها (مخصوصا در مواقعی که تعداد ژن ها و یا نمونه ها زیاد است) تصاویر heatmap می باشند.



در ترسیم تصاویر heatmap همانند شکل فوق، ابتدا ژن ها و نمونه ها بر اساس الگوهای بیانی دسته بندی می شوند به عنوان مثال ژن هایی که افزایش بیان یافته اند در یک دسته قرار می گیرند. سپس ژن ها در یکی از محور ها مختصات و نمونه ها در محور مختصات دیگر قرار می گیرند. سپس میزان بیان هر ژن در هر نمونه با رنگ ها مشخص خواهد شد. به عنوان مثال بیشتر بیان با مربع قرمز، کمترین بیان با مربع آبی و سایر بیان ها با رنگ های بین آبی و قرمز نمایش داده خواهند شد.

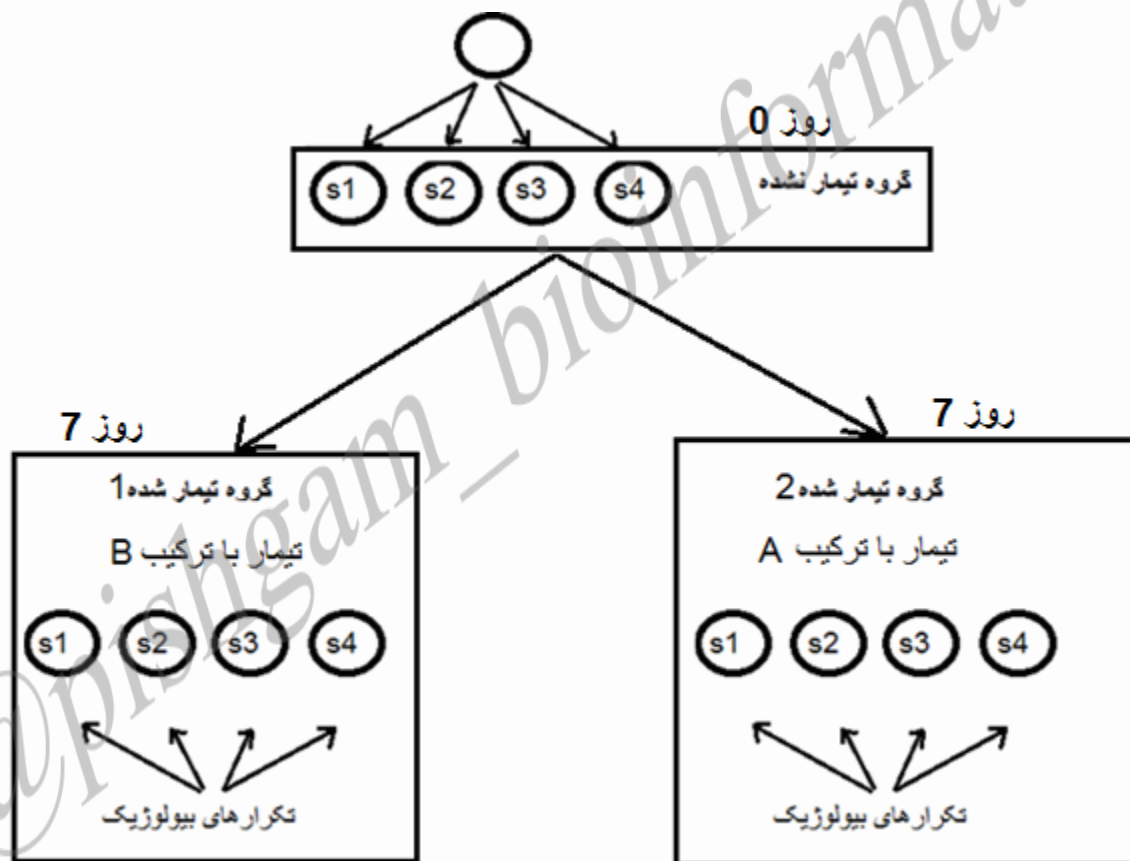
آموزش کاربرد دندروگرام برای داده های ریل تایم (نمونه ها)

ترسیم دندروگرام یک روش برای دسته بندی نمونه ها می باشد. با استفاده از نرم افزار GenEx می توان برای نمونه های مورد بررسی بر حسب داده های بیان ژن دندروگرام ترسیم نمود به عبارت دیگر بر اساس داده های بیانی ژن ها نمونه ها را دسته بندی نمود.



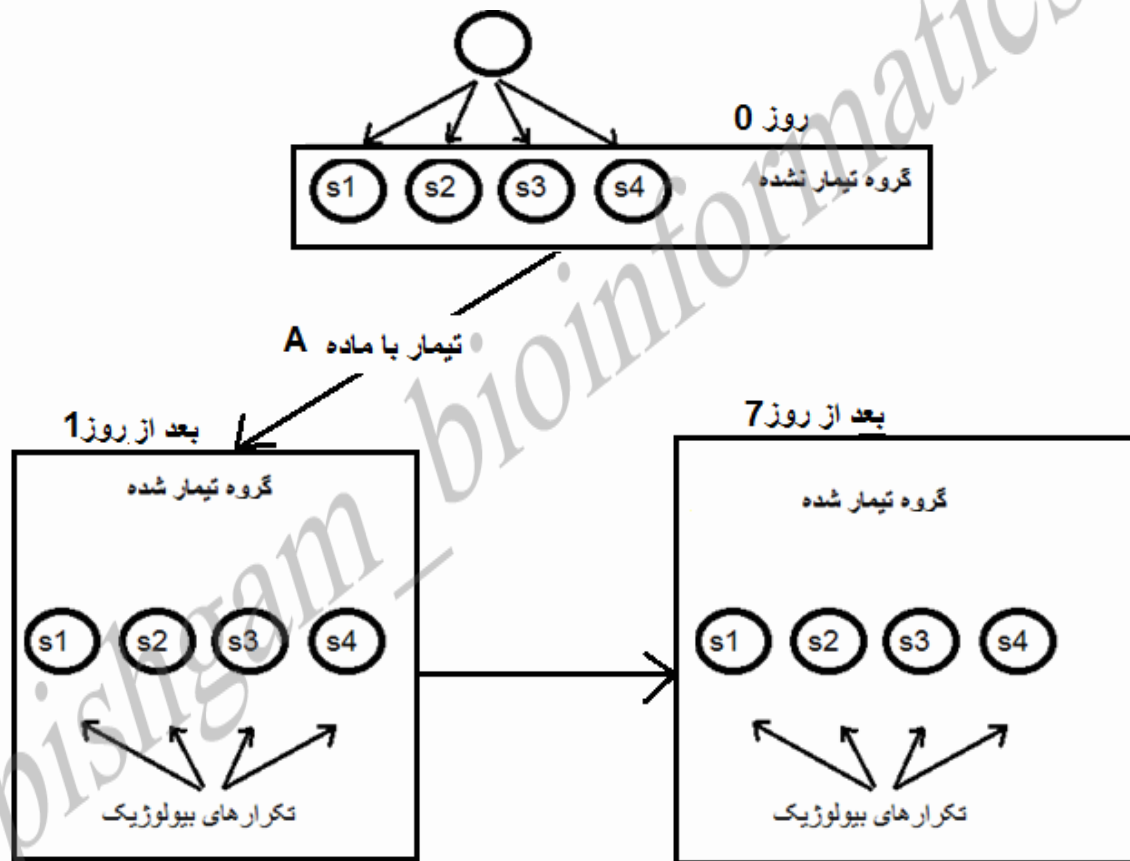
آموزش کاربرد آزمون **Repeated measures ANOVA** در آنالیز داده های ریل تایم و محاسبه آن در نرم افزار **GenEx**.

در بخش های قبلی توضیح دادیم که در صورتی که بیان ژن ها در دو گروه مرتبط با هم بررسی شوند باید از **T-test** جفت شده برای آنالیز آماری داده ها استفاده شود اما اگر بیان ژن ها در بیش از دو گروه مرتبط با هم بررسی شوند باید از روش **Repeated measures ANOVA** برای بررسی آماری داده ها استفاده شود.

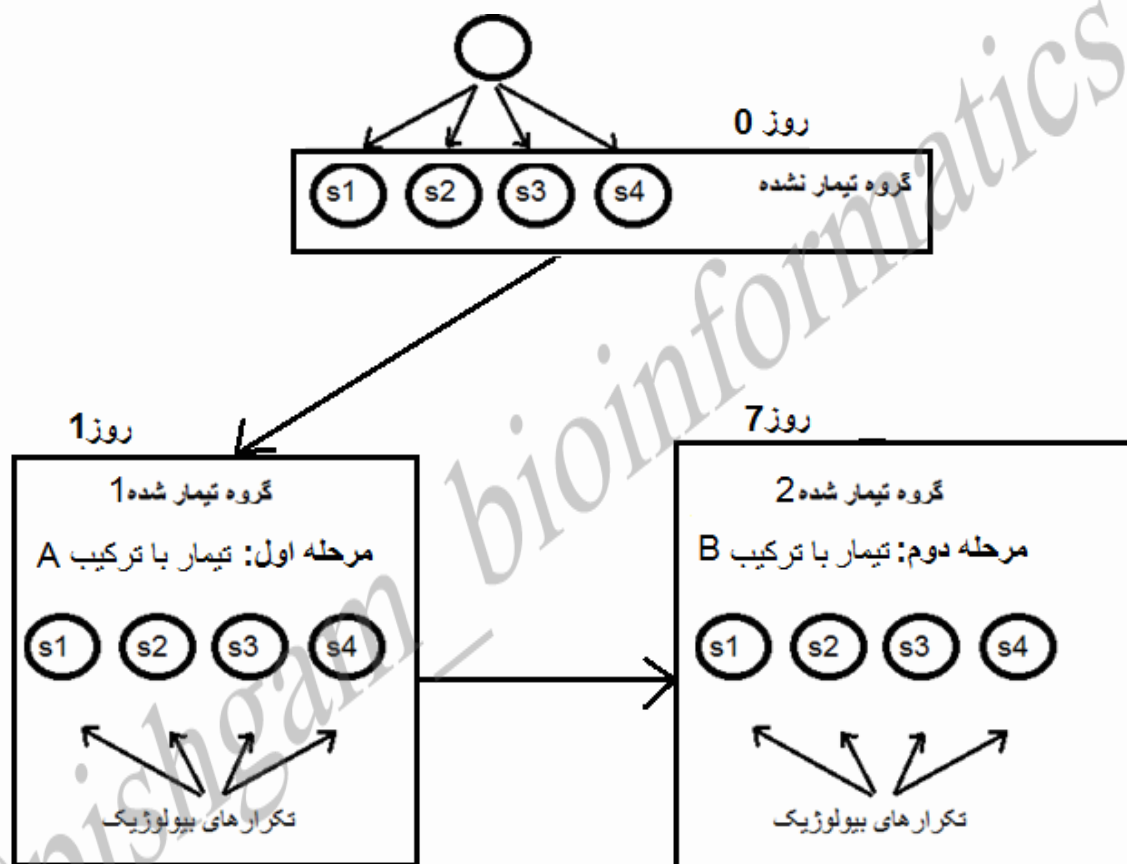


آزمایش فوق یک نمونه از گروه های جفت شده را نمایش می دهد. در آزمایش فوق ۴ تکرار بیولوژیک از یک رده سلولی با ترکیب A و ۴ تکرار دیگر با ترکیب B تیمار شده اند سپس تغییرات بیانی ژن هدف

در این نمونه ها بعد از ۷ روز بررسی شده است. بنابراین سه گروه جفت شده داریم. ۱- گروه تیمار نشده، ۲- گروه تیمار شده با ترکیب A در روز هفتم، ۳- گروه تیمار شده با ترکیب B در روز هفتم.



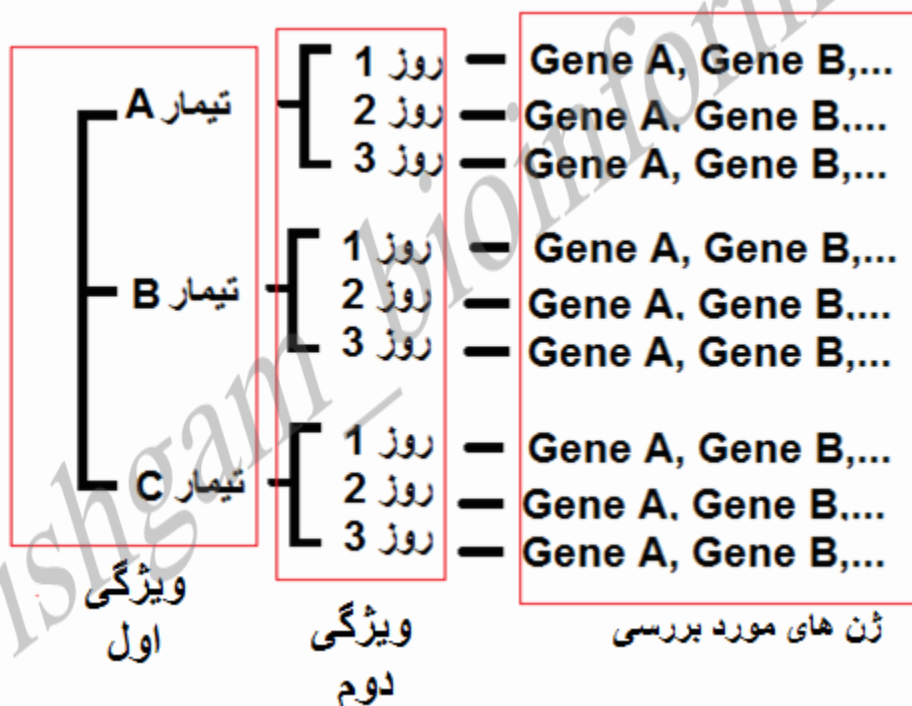
آزمایش فوق نیز یک نمونه از گروه های جفت شده را نمایش می دهد. در آزمایش فوق ۴ تکرار بیولوژیک از یک رده سلولی با ترکیب A تیمار شده اند سپس تغییرات بیانی ژن هدف در این نمونه ها بعد از روز ۱ و روز ۷ بررسی شده است. بنابراین سه گروه جفت شده داریم. ۱- گروه تیمار نشده، ۲- گروه تیمار شده با ترکیب A در روز اول، ۳- گروه تیمار شده با ترکیب A در روز هفتم.



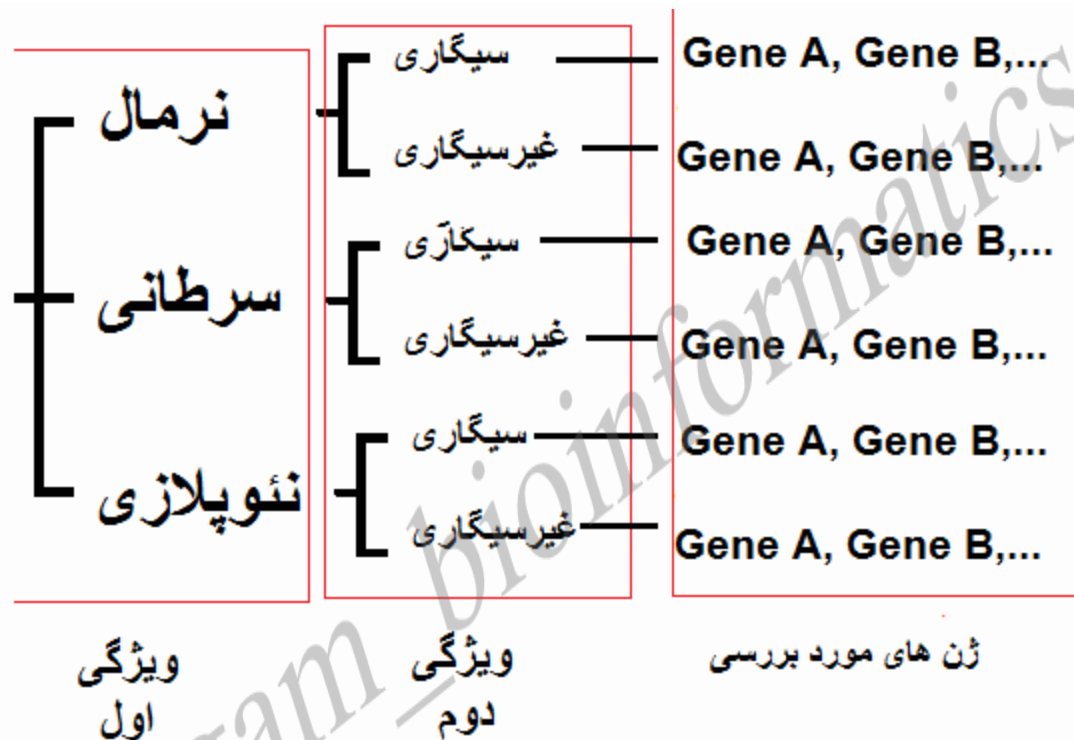
آزمایش فوق نیز یک نمونه از گروه های جفت شده را نمایش می دهد. در این آزمایش ۴ تکرار بیولوژیک از یک رده سلولی با ترکیب A تیمار شده اند سپس تغییرات بیانی ژن هدف در این نمونه ها بعد از روز ۱ بررسی شده است. در مرحله بعد نمونه هایی که با ترکیب A تیمار شده بودند مجدداً با ترکیب B تیمار شده و سپس تغییرات بیانی ژن هدف در این نمونه ها بعد از روز ۷ بررسی شده است. در این آزمایش نیز سه گروه جفت شده داریم. گروه اول: گروه تیمار نشده، گروه دوم: گروه تیمار شده با ترکیب A در روز اول، ۳ گروه سوم: گروه تیمار شده با ترکیب B در روز هفتم. نکته قابل توجه در این آزمایش این است که نتایج گروه سوم متأثر از گروه دوم می باشد بنابراین گروه های مورد بررسی در این آزمایش به همدیگر وابسته می باشند (گروه ها از یکدیگر مستقل نمی باشند) به این نکته در آنالیز داده ها باید توجه شود.

آموزش کاربرد آزمون 2-wayanova در آنالیز داده های ریل تایم و محاسبه آن در نرم افزار GenEx.

در مثال هایی که برای آنالیز داده ها ریل تایم تا این مرحله ذکر نمودیم، نمونه ها را تنها بر اساس یک ویژگی گروه بندی می نمودیم. به عنوان مثال بر اساس ویژگی وضعیت سلامت (که شامل حالت های نرمال، تومری و ... بوده است) و یا ویژگی تیمار بودن/نبودن نمونه ها. در صورتی که ما نمونه ها را بر اساس دو ویژگی دسته بندی نماییم برای آنالیز داده ها باید از روش 2-wayanova استفاده نماییم.



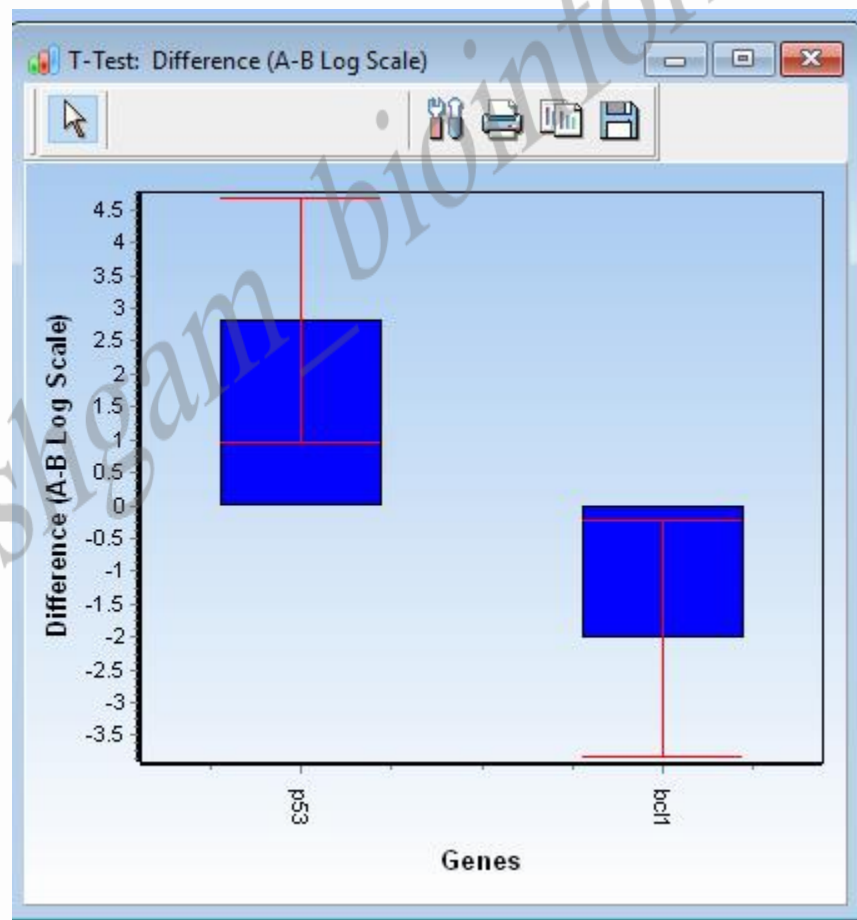
در آزمایش فوق بر روی یک رده سلولی سه تیمار مختلف صورت گرفته است و بیان ژن های هدف در روز ۱، ۲ و ۳ بعد از تیمار بررسی شده است. بنابراین در آزمایش فوق ما می توانیم نمونه ها را بر اساس ویژگی نوع تیمار و ویژگی روز دسته بندی نماییم.



در آزمایش فوق بیان ژن های هدف در سه نوع بافت نرمال، سرطانی و نئوپلازی بررسی شده است و افراد مورد بررسی بر اساس مصرف سیگار دسته بندی شده اند. بنابراین در آزمایش فوق ما می توانیم نمونه ها را بر اساس ویژگی وضعیت سلامتی و ویژگی مصرف سیگار دسته بندی نماییم. در مجموع با دسته بندی نمونه های فوق ما $6 (3 \times 2)$ گروه خواهیم داشت

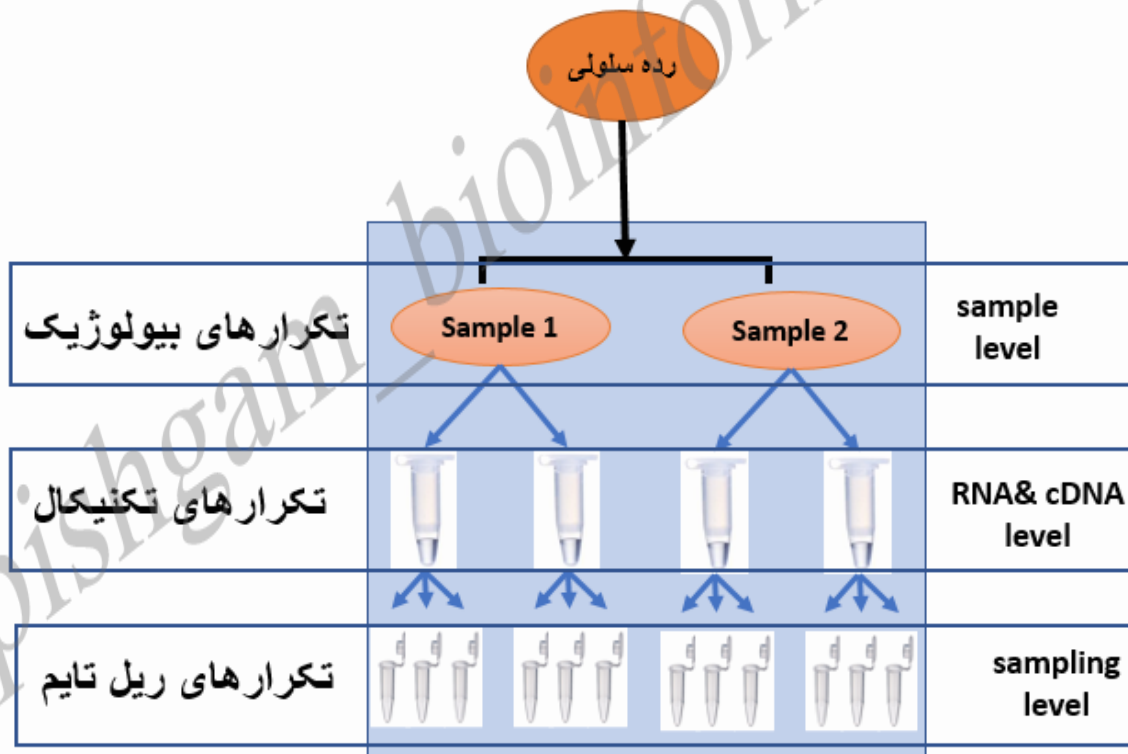
بررسی علت پراکنده بودن و error bar زیاد داده های ریل تایم با استفاده از نرم افزار GenEx

میزان پراکندگی (واریانس) داده ها در ریل تایم متأثر از کیفیت آزمایش و روش کار می باشد. در صورتی که در نتایج ریل تایم بیان یک ژن تغییرات مورد نظر را نشان می دهد اما از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد و یا میزان error bar در نمودارها زیاد می باشد علت پراکندگی داده های ریل تایم می باشد. به شکل زیر توجه نمایید.



در شکل فوق پراکندگی بالای داده ها سبب افزایش error bar در نمودار شده است بنابراین منظور از پراکندگی وجود اختلاف در تکرارهای یک آزمایش می باشد که سبب افزایش error bar در نمودارها می گردد.

در مواقعی که میزان باید نتایج error bar در نمودار بالا می باشد باید نتایج ریل تایم در سطح تکرار های بیولوژیک، تکنیکال و ریل تایم مورد بررسی قرار گیرد تا معلوم شود هر سطح چه میزان در پراکندگی مشاهده شده در داده ها دارای نقش می باشد سپس آن مرحله اصلاح و بهینه شود.

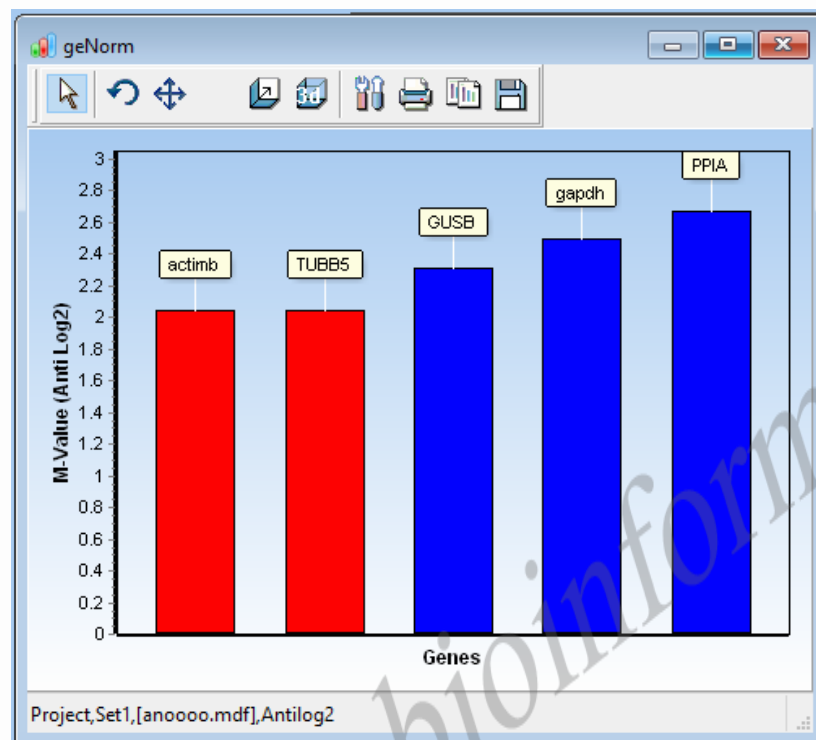


قبلا ذکر کردیم که تکرارها در ریل تایم شامل سه سطح تکرارها بیولوژیک، تکرارهای تکنیکال و ریل تایم می باشد. عدم تشابه داده ها در هر یک از سطح های فوق می تواند سبب افزایش error bar و عدم معنی دار نتایج گردد. در شکل فوق دو تکرار بیولوژیک از یک رده سلولی با ترکیب A تیمار شده است و سپس تغییر بیان ژن ها هدف با دو تکرار تکنیکال و سه تکرار ریل تایم مورد بررسی قرار گرفته است. در صورتی که تکرارهای بیولوژیک با یکدیگر تفاوت داشته باشند دلیل آن عدم یکسان بودن نتیجه تیمارها می باشد در صورت اختلاف زیاد بین تکرارهای بیولوژیک احتمال عدم تکرار پذیر بودن نتایج نیز وجود دارد. در صورتی که پراکندگی مشاهده شده به دلیل اختلاف نتایج در تکرارهای تکنیکال باشد بنابراین

مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA باید بهینه گردد و در صورتی که پراکندگی مشاهده شده به دلیل اختلاف تکرارهای ریل تایم می باشد بنابراین باید در سمپلینگ نمونه ها توجه بیشتری نمود. با استفاده از نرم افزار GenEx می توان نقش هر یک از تکرارهای بیولوژیک، تکنیکال و ریل تایم را در میزان پراکندگی (error bar) داده ها تعیین نمود.

تعیین بهترین ژن رفرنس برای نرمال سازی داده های ریل تایم با استفاده از نرم افزار GenEx

یکی از فاکتورهای بسیار مهم در آنالیز داده های ریل تایم استفاده از یک ژن رفرنس مناسب برای نرمال کرده داده ها و محاسبه dCt می باشد. و در مطالعاتی که از تکنیک Real-time PCR کمی استفاده می شود، به منظور کمی سازی داده های حاصل از اندازه گیری سطوح mRNA می بایست میزان mRNA ژن هدف را نسبت به میزان mRNA یک ژن رفرنس، نرمال کرد. از آنجا که سطح بیان ژن رفرنس می بایست در بین بافت های مختلف و نیز تمامی مراحل رشد یک موجود زنده ثابت بوده و نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایش قرار نگیرد، در هر یک از آزمایش های بیان ژن می توان ثبات و پایداری بیان چندین ژن رفرنس را مورد آزمایش و ارزیابی قرار داد تا مناسب ترین ژن رفرنس به منظور نرمال سازی داده های حاصل از بیان ژن هدف انتخاب گردد.



آموزش ترسیم منحنی Roc و محاسبه حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity)

برای ژن ها به عنوان بیومارکر در تشخیص بیماری ها

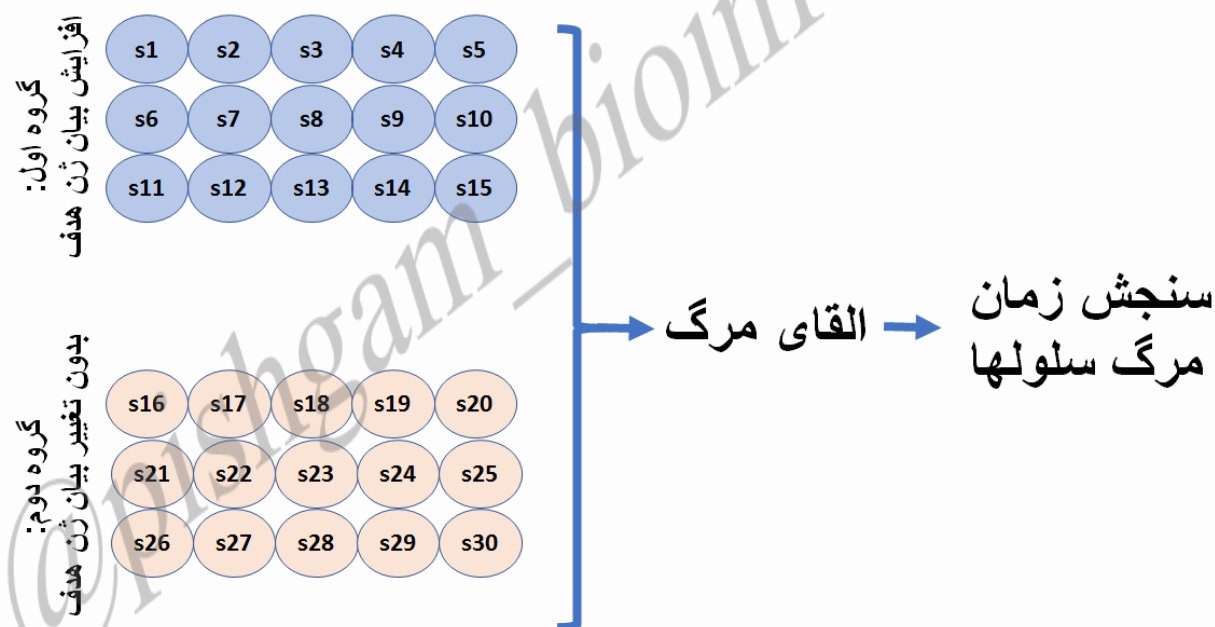
در صورتی که آنالیز نتایج نشان دهد که بیان یک یا چند هدف در یک بیماری و یا سرطان در بافت، خون و یا سایر بافت های افراد تغییر می نماید با استفاده از بررسی تغییر بیان آن ژن ها در نمونه هایی نوع آن مشخص نیست می توان می توان نوع نمونه را تعیین نمود و از ژن های هدف به عنوان بیومارکر در تشخیص بیماری ها استفاده نمود. هنگامی که از تغییر بیان ژن ها در نمونه های نرمال و غیرنرمال (به عنوان مثال سرطان) به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص یک بیماری و یا سرطان استفاده می گردد تعیین میزان حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) برای بیومارکر (ژن مربوطه)، تعیین کننده کیفیت بیومارکر می باشد.

حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) بین ۰ تا ۱ متغیر می باشند و در صورتی که یک بیومارکر دارای حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) نزدیک به ۱ باشد دارای ارزش تشخیصی می باشد. در صورتی که حساسیت یک بیومارکر پایین باشد ممکن یک نمونه تومری و یا بیمار را به اشتباه نرمال شناسایی نماید و در صورتی که میزان اختصاصیت (Specificity) یک بیومارکر کم باشد امکان دارد یک نمونه نرمال را به اشتباه تومری و یا بیمار تشخیص دهد.

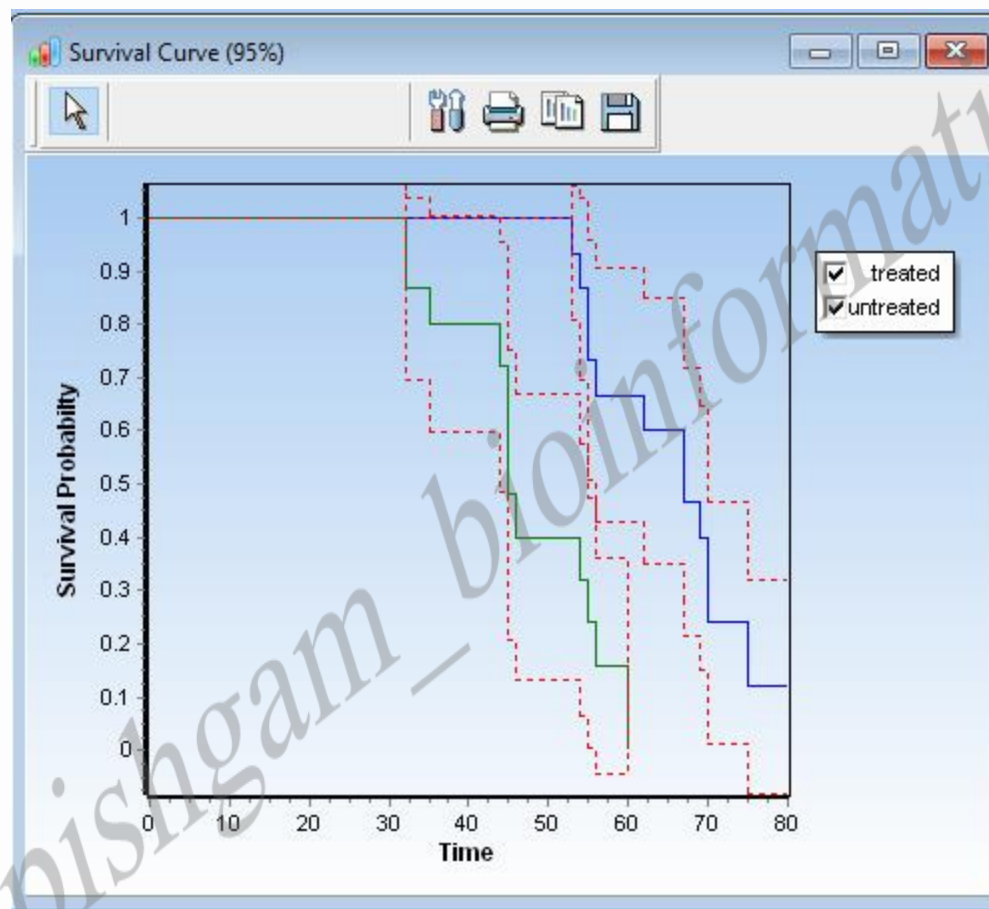
برای تعیین حساسیت و اختصاصیت یک بیومارکر از ترسیم منحنی ROC استفاده می گردد.

آموزش سنجش تاثیر بیان ژن ها در Survival بر اساس داده ها ریل تایم در نرم افزار GenEx

ژن ها در تنظیم همه فرایندهای زیستی و مسیرهای سلولی دارای نقش می باشند که یکی از این مسیرهای زیستی فرایند مرگ می باشد. سوالی اصلی اینجاست که اگر بیان یک ژن به عنوان مثال در سرطان ریه افزایش داشته باشد آیا این افزایش بیان سبب افزایش نرخ مرگ در بیماران خواهد شد؟. برای پاسخ گویی به این سوال از آزمون Survival استفاده خواهیم نمود. به آزمایش زیر توجه نمایید:



در آزمایش فوق با تیمار نمودن ۱۵ نمونه رده سلولی، بیان یک ژن را هدف در آن ها افزایش داده ایم و از ۱۵ نمونه نیز به عنوان کنترل استفاده شده است. در مرحله بعد در سلول های هر دو گروه مرگ القا شده است و سپس زمان مرگ هر رده سلولی سنجش شده است. حال سوال این است که آیا افزایش بیان ژن هدف در سلول ها سبب تاخیر و یا تسریع زمان مرگ خواهد شد؟.

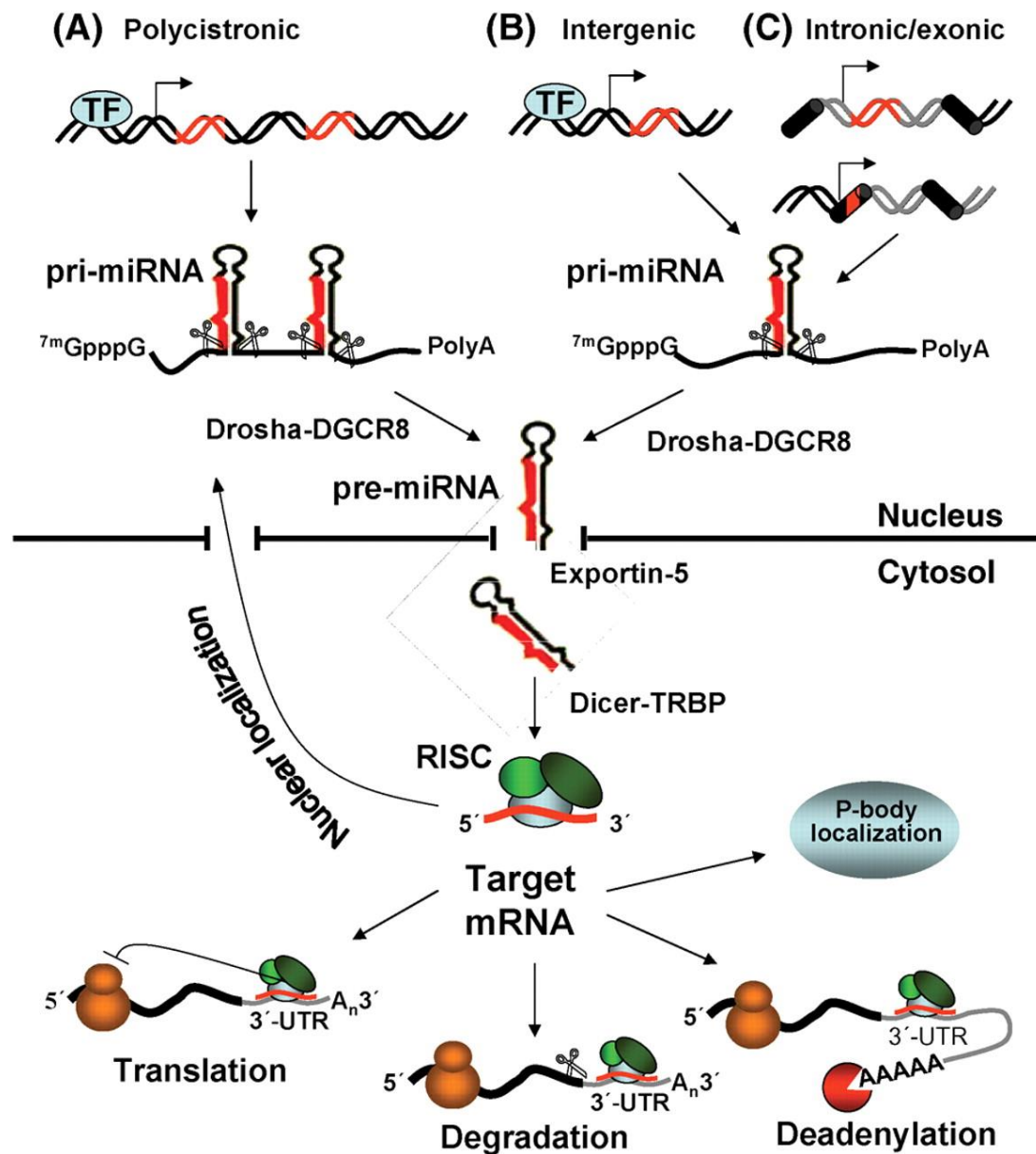


شکل فوق بیانگر نتیجه آزمون Survival می باشد. در پنجره فوق خطوط آبی و سبز بیانگر زمان مرگ برای نمونه های گروه تیمار شده و تیمار نشده می باشد.

بررسی میانکنش ژن ها و میکروRNAها با استفاده از داده های ریل تایم در نرم افزار GenEx

میکروRNAها یا به اسم دیگر miRNAها در حدود ۲۲ نوکلئوتید طول دارند و وظیفه ی اصلی آن ها در تنظیم پس از رونویسی است؛ که با برهمکنش با mRNA و خاموش کردن ژن هدف این کار را انجام می دهند. ژنوم انسان می تواند حدود ۲۰۰۰۰ نوع از آن ها را رمزدهی کند

میکروRNAها مکمل قسمتی از یک یا چندین mRNA هستند که در جانوران معمولاً با 3UTR و در گیاهان معمولاً با ناحیه ای که رمز دهنده گی دارد جفت می شوند. ایجاد جفت باز در ناحیه ی پروموترباعث بریدگی mRNA هدف می شود؛ که این یک مدل اولیه برای گیاهان است. ایجاد جفت باز سبب جلوگیری از ترجمه و مهار آن می شود. گاهی میزان جفت شدگی بسیار کم و در حدود ۷ جفت باز است در موارد این چنین، قدرت میکروRNAها کمتر است و هرچه میزان جفت شدگی بیشتر باشد قدرت عمل آن بیشتر است. میکروRNAها در یاخته با تاثیر بر متیله شدن ژن و تغییرات هیستونی و چندین روش دیگر روی بیان ژن مؤثر خواهند بود.



شکل فوق: طریقه پردازش miRNA ها و روش های ممانعت از بیان ژن توسط miRNA ها را نشان می دهد. همانگونه که قابل مشاهده می باشد یکی از روش های تنظیم ژن ها توسط میکرو RNA ها تخریب mRNA ژن هدف می باشد. در صورتی که یک میکرو RNA با تخریب mRNA ژن هدف سبب تنظیم آن شود بنابراین با افزایش بیان میکرو RNA باید بیان mRNA ژن هدف کاهش می یابد. در صورتی که

در نمونه ها بیان میکرو RNA و ژن هدف به وسیله ریل تایم مورد بررسی قرار گیرد می توان ارتباط این دو را با هم بررسی نمود.

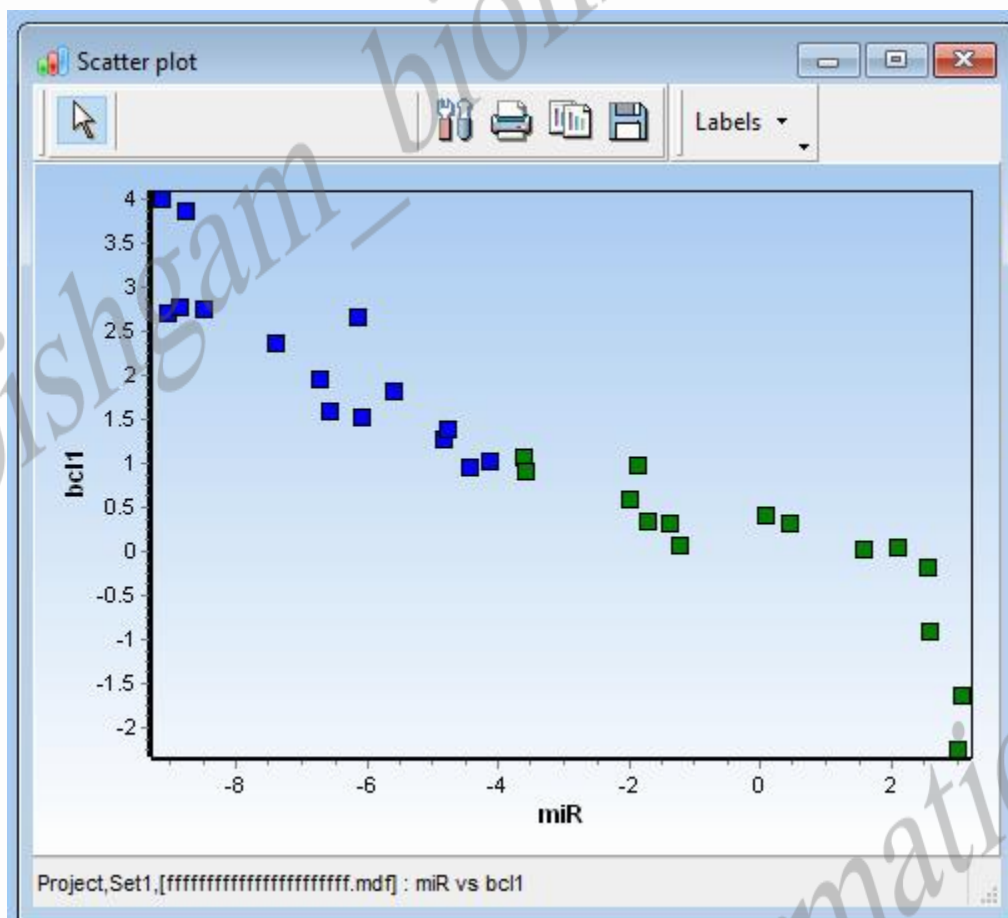
محاسبه ضریب همبستگی بین ژن هدف و میکرو RNA با استفاده از نتایج ریل تایم

همانگونه که قبلا ذکر شد یکی از روش های تنظیم ژن ها توسط میکرو RNA ها تخریب mRNA ژن هدف می باشد. در صورتی که یک میکرو RNA با تخریب mRNA ژن هدف سبب تنظیم آن شود بنابراین با افزایش بیان میکرو RNA باید بیان mRNA ژن هدف کاهش می یابد بنابراین باید بین سطح بیان میکرو RNA و ژن هدف یک همبستگی (correlation) وجود داشته باشد. ضریب همبستگی یک روش آماری برای تعیین نوع و میزان ارتباط یک متغیر کمی (سطح بیان میکرو RNA) با متغیر کمی دیگر (سطح بیان ژن هدف) است. ضریب همبستگی شدت رابطه و همچنین نوع رابطه (مستقیم یا معکوس) را نشان می دهد. این ضریب را با r نشان می دهند و میزان آن بین ۱ تا -۱ است. میزان $r=1$ بیانگر رابطه مستقیم کامل بین دو متغیر است، رابطه مستقیم یا مثبت به این معناست که اگر یکی از متغیرها افزایش (یا کاهش) یابد، دیگری نیز افزایش (یا کاهش) می یابد. $R=-1$ نیز وجود یک رابطه معکوس کامل بین دو متغیر را نشان می دهد. رابطه معکوس یا منفی نشان می دهد که اگر یک متغیر افزایش یابد متغیر دیگر نیز کاهش می یابد و بالعکس. زمانی که ضریب همبستگی برابر صفر است این نشان می دهد که بین دو متغیر ارتباطی وجود ندارد.

ضرایب همبستگی را با دو روش می توان محاسبه نمود: Pearson Correlation و Spearman Correlation. ضریب همبستگی Pearson روشی پارامتری برای داده هایی با توزیع نرمال یا تعداد داده های زیاد استفاده می شود و در صورتی که تعداد داده ها کم و فرض نرمال بودن آنها معقول نباشد، از

ضریب همبستگی اسپیرمن (Spearman) استفاده می‌شود. قبلاً در مورد نحوه بررسی نرمال بودن داده‌ها توضیحات لازم را ارائه نموده ایم.

در صورتی که در نمونه‌ها بیان میکرو RNA و ژن هدف به وسیله ریل تایم مورد بررسی قرار گرفته باشد می‌توان ضریب همبستگی این دو را با هم بررسی نمود.



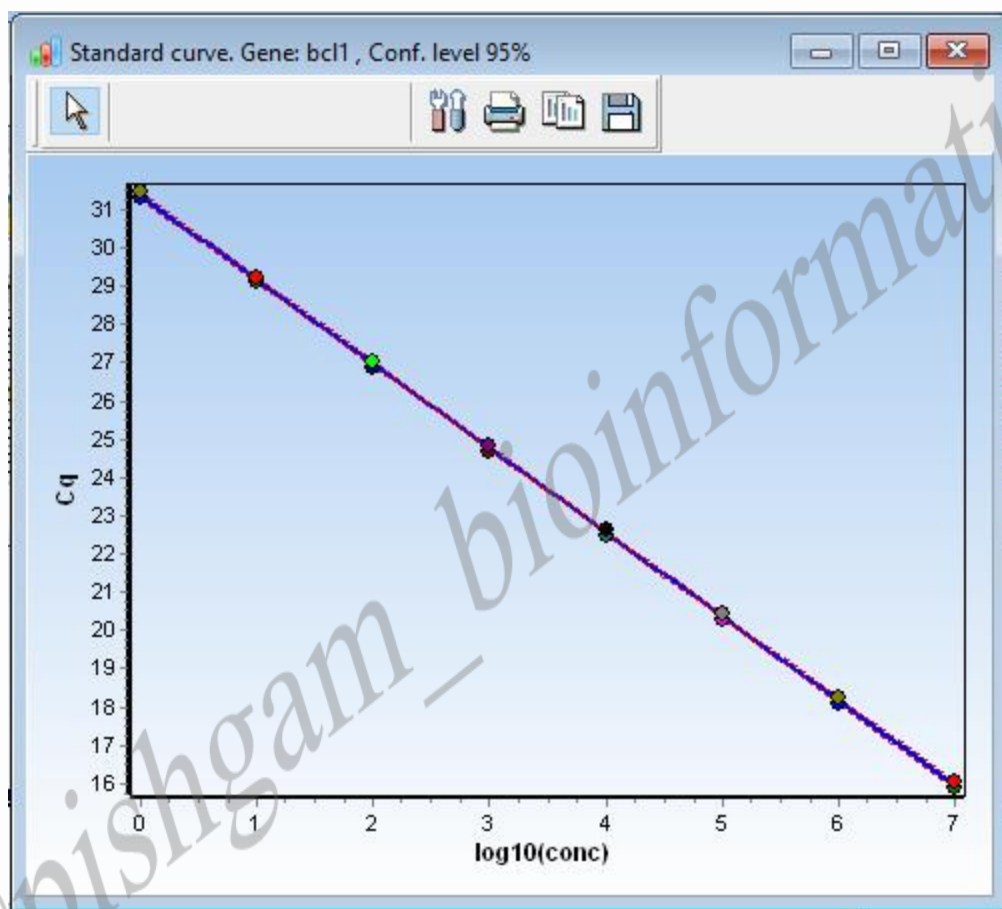
نمودار فوق نمونه‌ها را بر اساس سطح بیان ژن هدف و میکرو RNA نشان می‌دهد. در نمودار فوق نمونه‌های نرمال با رنگ آبی و نمونه‌های گروه تومری با رنگ سبز نمایش داده می‌شود. همانگونه که

قابل مشاهده می باشد با افزایش سطح بیان miR از ۸- به ۲ سطح بیان bcl1 از ۴ به ۲- کاهش می یابد که بیانگر وجود همبستگی منفی بین این دو ژن می باشد.

آموزش ترسیم منحنی استاندارد جهت تعیین کارایی پرایمر برای داده های ریل تایم با نرم افزار GenEx

روش ترسیم منحنی استاندارد (مقایسه مطلق) یک روش برای تعیین میزان کارایی PCR و پرایمرها می باشد علاوه بر این از این روش در محاسبه تعداد نسخه های یک ژن نیز کار برد دارد. برای تعیین میزان کارایی پرایمرها از یک نمونه RNA یا DNA با غلظت مشخص به عنوان نمونه مرجع برای رسم منحنی استاندارد استفاده می شود. ابتدا غلظت RNA یا DNA این نمونه مرجع تعیین می شود و سپس چند رقت متوالی از این نمونه با غلظت های مشخص تهیه می شود. در مرحله بعد با استفاده از روش ریل تایم میزان Ct برای این رقت های متوالی تعیین می گردد. سپس با نتایج ریل تایم حاصل، یک نمودار استاندارد از نمونه های رقیق شده ترسیم می شود در این نمودار محور X میزان رقیق سازی به صورت لگاریتمی بر پایه ۱۰ و محور Y میزان CT حاصل از ریل تایم می باشد. سپس با تعیین شیب خط ترسیم شده می توان با استفاده از قرمول زیر کارایی پرایمرها و PCR را تعیین نمود.

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

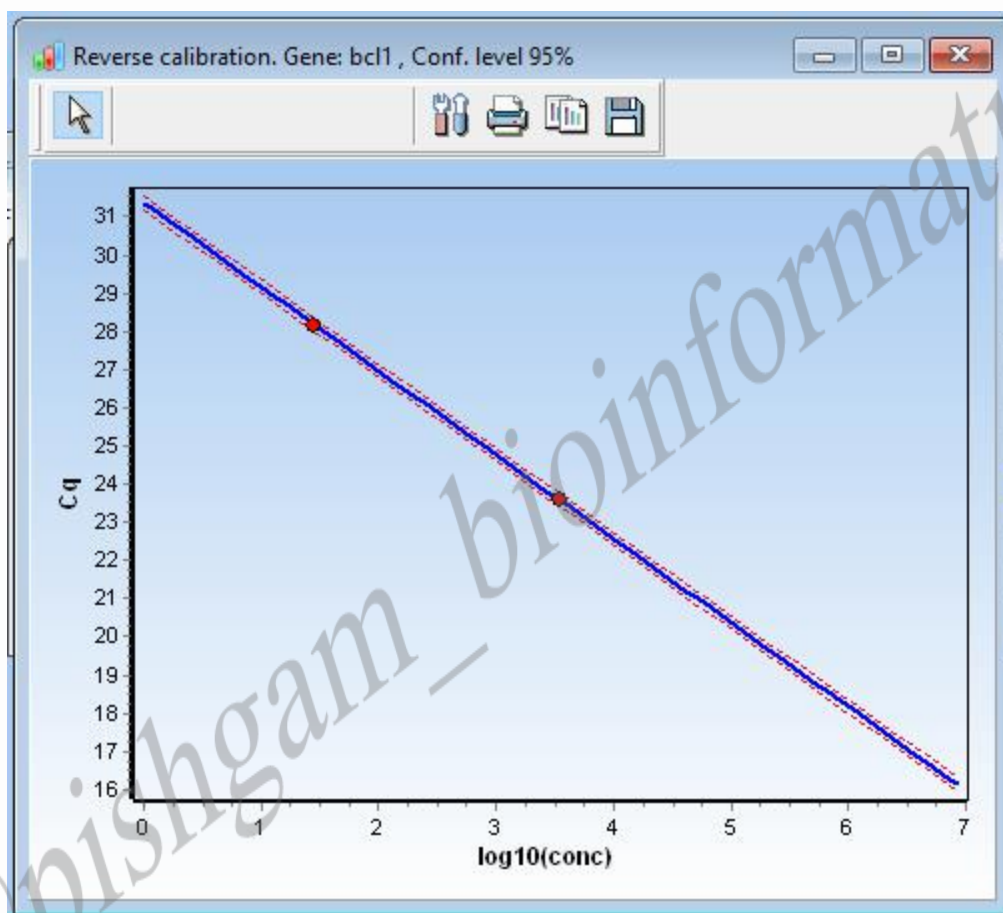


شکل فوق نشان دهنده منحنی استاندارد ترسیم شده می باشد از شیب منحنی فوق برای محاسبه کارایی پرایمر استفاده خواهد شد.

آموزش ترسیم منحنی استاندارد برای داده های ریل تایم جهت تعیین میزان مطلق ژن هدف با نرم افزار

GenEx

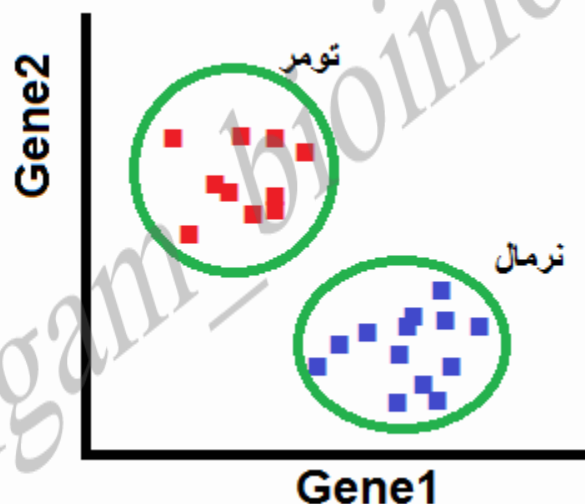
یکی از روش های آنالیز داده های ریل تایم ترسیم منحنی استاندارد جهت سنجش میزان مطلق ژن هدف در نمونه ها می باشد. در این روش نیز همانند روش ترسیم منحنی استاندارد برای تعیین کارایی پرایمرها از یک نمونه RNA یا DNA با غلظت مشخص برای رسم منحنی استاندارد استفاده می شود. ابتدا غلظت RNA یا DNA استاندارد با روش اسپکتروفتومتر تعیین می شود و سپس با استفاده از وزن مولکولی RNA یا DNA می توان تعداد نسخه های RNA یا DNA را در نمونه استاندارد تعیین نمود. سپس از نمونه استاندارد یک سری رقت متوالی که تعداد نسخه های ژن هدف و یا میزان آن به نانوگرم مشخص است تهیه می شود و از آن ها برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده می شود. در این روش علاوه بر نمونه های حاصل از رقت های متوالی، نمونه های مورد بررسی (که تعداد نسخه ژن هدف باید در آن ها تعیین گردد) نیز با ریل تایم بررسی و میزان Ct برای همه نمونه ها مشخص خواهد شد. در مرحله بعد یک نمودار از نمونه های رقیق شده ترسیم می گردد بدین صورت که محور X بیانگر میزان رقیق سازی یا تعداد کپی ژن هدف و محور Y میزان Ct هر نمونه می باشد، در ادامه با مقایسه Ct نمونه هدف با نمودار استاندارد ترسیم شده می توان میزان کپی و یا غلظت ژن هدف را آن نمونه ها به دست می آوریم.



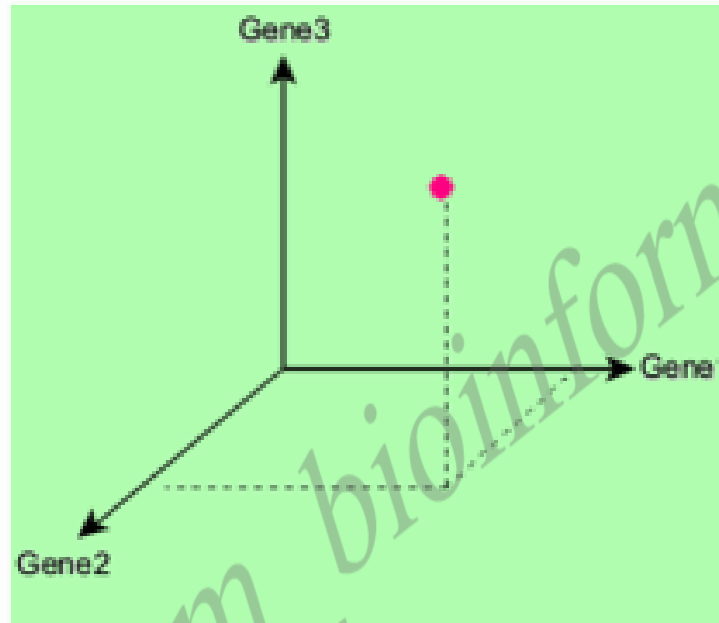
شکل فوق نشان دهنده منحنی استاندارد ترسیم شده می باشد از این نمودار برای محاسبه میزان مطلق ژن هدف در نمونه های مورد بررسی استفاده خواهد شد.

آنالیز دسته بندی ژن ها و نمونه ها بر اساس داده های ریل تایم با روش PCA

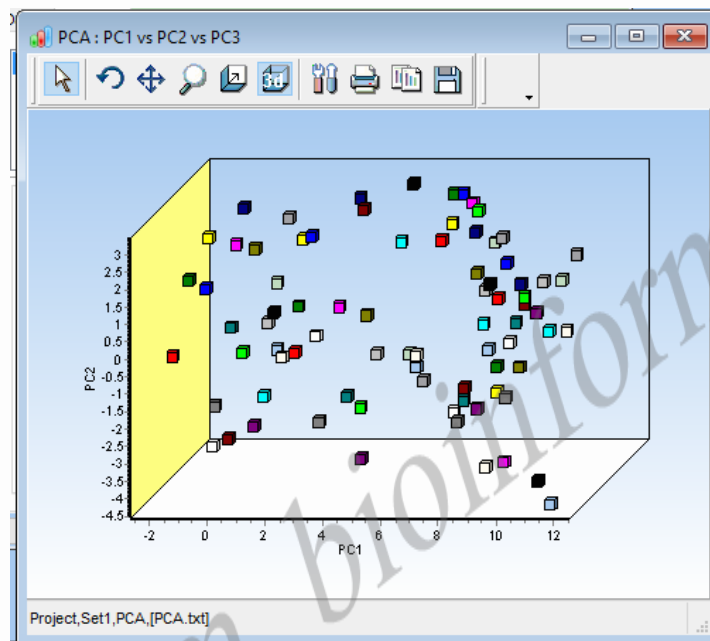
روش PCA دارای کاربردهای فراوانی در آنالیز داده ها می باشد اما آنچه بیشتر در علم زیست شناسی مورد توجه قرار گرفته است استفاده از روش PCA برای دسته بندی نمونه ها می باشد. فرض نمایید بیان چندین ژن را در ۵۰ نمونه تومری و ۵۰ نمونه نرمال مورد بررسی قرار داده ایم و اکنون می خواهیم از بیان ژن ها برای گروه بندی نمونه ها استفاده نماییم.



اگر برای بررسی نمونه ها از دو ژن استفاده کرده باشیم برای گروه بندی نمونه ها باید از دو محور مختصات استفاده نماییم و هر محور را به یک ژن اختصاص بدهیم.



اگر برای بررسی نمونه ها از ۳ ژن استفاده کرده باشیم برای گروه بندی نمونه ها باید از ۳ محور مختصات استفاده نماییم و هر محور را به یک ژن اختصاص بدهیم. حال فرض نماییم که بیش از ۳ ژن (به عنوان مثال ۱۰ ژن را در نمونه ها) مورد بررسی قرار داده ایم اکنون برای نمایش نمونه ها بر حسب این ۱۰ ژن نیازمند ۱۰ محور مختصات در فضای سه بعدی هستیم که این امری غیر ممکن است حال اگر ۱۰۰ ژن را مورد بررسی قرار داده باشیم کار ترسیم نمونه ها بر اساس همه ژن ها بسیار دشوار خواهد بود. روش PCA این مشکل را حل می نماید. در این روش ژن هایی که دارای الگو و رفتار یکسان می باشند به عنوان یک مولفه (component) در نظر گرفته می شوند. ممکن است بر اساس تعداد ژن ها چندین component ساخته شود در مرحله بعد دسته بندی نمونه ها بر اساس دو یا سه component اصلی در فضای دو بعدی و یا سه بعدی نمایش داده می شوند. به component های اصلی Principal component و یا به صورت مخفف PC گفته می شود و به فرایند آنالیز Principal component analysis به انگلیسی و یا به صورت مخفف PCA گفته می شود.

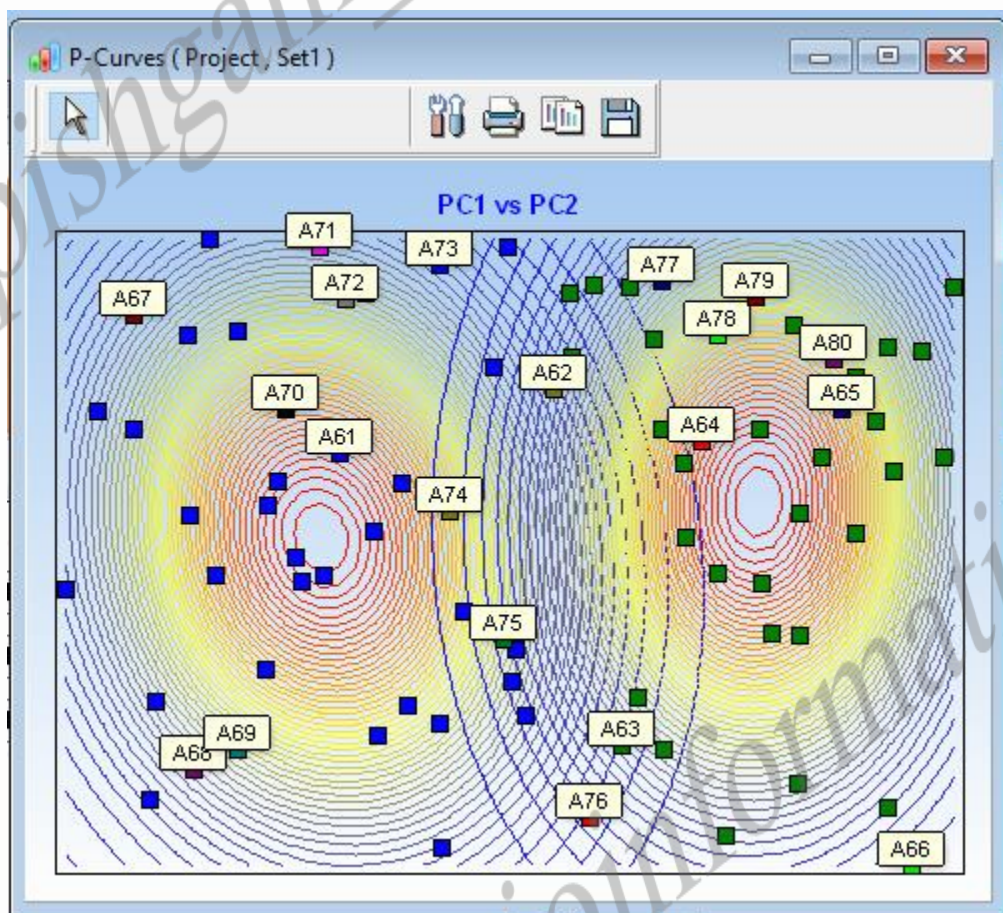


نمودار فوق نمایش دهنده نمونه ها بر اساس سه مولفه اصلی و به صورت سه بعدی می باشد.

آنالیز و پیش بینی نوع نمونه ها(سالم، بیمار،...) بر اساس داده های ریل ریل تایم با روش **Potential**

curves

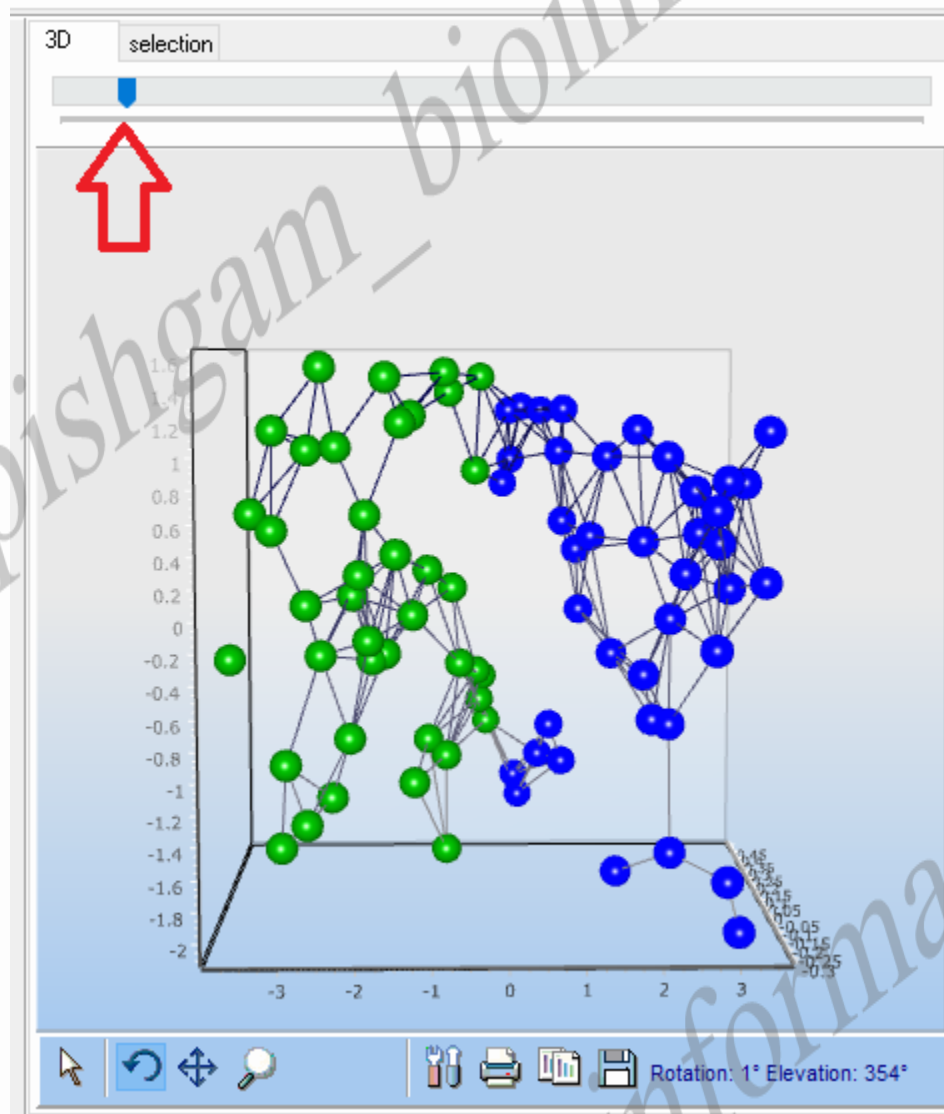
روش **Potential curves** یا به صورت مخفف **P curve** شامل دو مرحله می باشد. مرحله اول آن شبیه روش **PCA** معمولی می باشد که در فوق آموزش داده شد. در مرحله اول با استفاده از بررسی نمونه هایی که نوع (مثلا تومری و یا نرمال) آن ها مشخص می باشد، برای ژن های سنجش شده الگوهایی (مولفه های اصلی) شناسایی می گردد که در مرحله دو با استفاده از این الگوها نوع نمونه های ناشناخته مشخص خواهد شد. پس در این روش ما دارای نمونه ها با نوع مشخص و نمونه های نا مشخص می باشیم که باید نوع نمونه های نامشخص را شناسایی نماییم. به نمونه هایی که نوع آن ها مشخص می باشد نمونه های **training** و به نمونه هایی که باید نوع آن ها را مشخص نمود نمونه های **Test** گفته می شود.



در شکل فوق نمودار نقطه ای همه نمونه ها بر اساس مولفه اصلی اول (PC1) و مولفه اصلی دوم (PC2) نمایش داده شده است. نمونه های تومری با رنگ آبی و نمونه های نرمال با رنگ سبز و نمونه های ناشناخته با سیار رنگ نمایش داده شده اند. اسم نمونه های ناشناخته شده نیز نمایش داده شده است. خطوط دایره ای محدوده گروه بندی نمونه های تومری و نرمال را نشان می دهد اگر یک نمونه ناشناخته در محدوده نمونه های نرمال قرار بگیرد آن نمونه در نوع نرمال گروه بندی می شود و اگر در محدوده نمونه های تومری قرار بگیرد در این گروه دسته بندی خواهد شد.

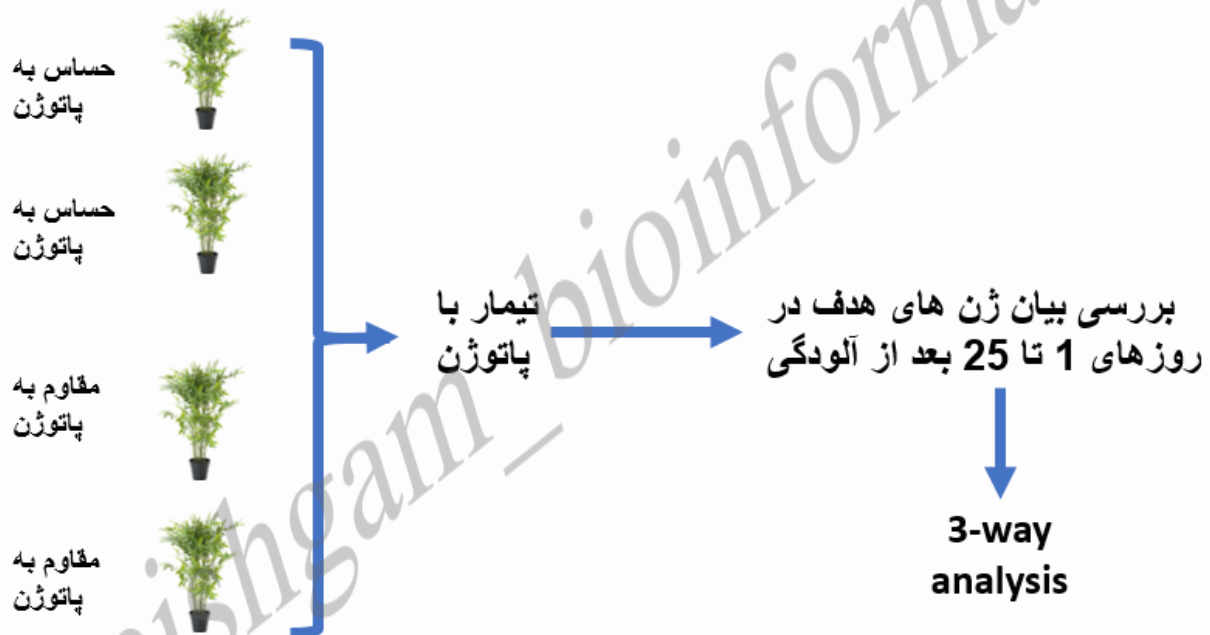
آموزش شناسایی ژن های برتر در تفکیک نمونه ها (بیمار، سالم، ...) با روش Dynamic PCA

روش Dynamic PCA شبیه روش PCA معمولی اما به صورت پیشرفته تر می باشد. در این روش می توان با خارج نمودن ژن هایی که نقش چندانی در دسته بندی صحیح نمونه های ندارند، ژن های اصلی در تفکیک نمونه ها را شناسایی نمود.



آنالیز داده ها ریل تایم با روش 3-way

آنالیز داده های ریل تام با روش 3-way تا حدودی شبیه روش PCA می باشد اما روش 3-way یک گام فراتر رفته و بعد از تعیین مولفه های اصلی، امکان مقایسه مولفه ها را بین گروه ها فراهم می آورد.



در شکل فوق دو نمونه گیاه مقاوم به پاتوژن و دو نمونه گیاه حساس به پاتوژن، با پاتوژن مورد نظر آلوده شده اند و سپس بیان ۱۵ ژن هدف بین همه نمونه ها از روز اول تا روز ۲۵ پس از آلودگی با روش ریل تایم مورد بررسی قرار گرفته است. هر چه تعداد ژن های هدف و تعداد روزها مورد بررسی بیشتر باشد بهتر می توان از آزمون 3-way استفاده نمود و در اصل این آزمون برای آنالیز داده های با حجم زیاد به کار می رود. پس در صورتی که تعداد ژن ها و یا تعداد روزها کم باشد می توان از روش ها Anova و آزمون T برای آنالیز داده ها استفاده نمود.

کاربرد نرم افزار GenEx در بررسی و آنالیز داده های ریل تایم

نرم افزار GenEx

نرم افزار GenEx کامل ترین نرم افزاری برای آنالیز داده های ریل می باشد. از کاربردهای این نرم افزار در آنالیز داده ها ریل تایم می توان به موارد زیر اشاره نمود.

❖ بررسی کیفیت داده های ریل تایم به صورت خودکار که شامل مراحل زیر می باشد:

۱. بررسی داده های تکرارهای ریل تایم برای همه نمونه ها و یافتن تکرارهایی که با سایر تکرارها همخوانی ندارد.
۲. مقایسه داده های ریل تایم با داده های نمونه های کنترل منفی و no-RT برای یافتن داده هایی که دارای Ct بالاتر از حد مجاز می باشند.
۳. ترسیم نمودار Ct هر ژن برای نمونه ها جهت یافتن نمونه هایی که دارای داده مخدوش می باشند.

❖ بررسی و اصلاح داده های مخدوش ریل تایم به صورت خودکار

❖ پردازش اولیه داده های ریل تایم و آماده سازی داده ها جهت محاسبه Fold change و آنالیز آماری

در نرم افزار GenEx که شامل موارد زیر می باشد:

۱. پردازش داده های ریل تایم که در چند ریل تایم مختلف (چند پلیت مختلف) انجام شده اند
۲. پردازش داده های ریل تایم بر اساس میزان کارایی پرایمرها
۳. پردازش داده های ریل تایم بر اساس میزان RNA استفاده شده در سنتز cDNA
۴. میانگین گرفتن از تکرارهای ریل تایم برای هر نمونه
۵. پردازش داده های ریل تایم بر اساس داده های نمونه های no-RT و حذف اثر آلودگی DNA از داده ها
۶. نرمال نمودن داده ها ریل تایم با داده های ژن رفرنس (محاسبه dCt)
۷. میانگین گرفتن از داده های تکرارهای تکنیکال
۸. محاسبه میزان ddCt
۹. محاسبه میزان Fold change برای هر نمونه
۱۰. تبدیل های Fold change به حالت لگاریتمی بر پایه دو برای آنالیز آماری و محاسبه Fold change گروه ها

❖ محاسبه fold change برای گروه ها و تعیین سطح معنی داری اختلاف بیان مشاهده شده با آزمون

های:

۱. آزمون Kolomogorov-Smirnov جهت بررسی نرمال بودن داده ها

۲. آزمون T (T-test)

۳. آزمون T جفت شده (paired T-test)

۴. آزمون های Wilcoxon و Mann-Whitney

۵. آزمون one-way Anova

۶. آزمون two-way Anova

۷. آزمون nested Anova برای بررسی علت پراکندگی داده های ریل تایم

۸. آزمون Repeated measures Anova

❖ تعیین بهترین ژن رفرنس برای نرمال سازی داده ها ریل تایم با استفاده از روش های:

۱. geNorm

۲. Normfinder

❖ دسته بندی نمونه ها با استفاده از آنالیز مولفه های اصلی با روش های:

۱. PCA

۲. Potential curve

۳. Dynamic PCA

❖ دسته بندی ژن ها و نمونه ها با استفاده از روش های:

۱. Hierarchical Clustering

۲. Heatmap Analysis

❖ ترسیم منحنی استاندارد برای نتایج ریل تایم با روش های زیر:

۱. ترسیم منحنی استاندارد جهت تعیین کارایی پرایمرها در ریل تایم

۲. ترسیم منحنی استاندارد جهت تعیین میزان مطلق ژن هدف در روش ریل تایم

❖ محاسبه ضریب همبستگی (correlation coefficients) بین ژن ها و نمونه ها با استفاده از روش های:

۱. روش پیرسون (Pearson)

۲. روش اسپیرمن (Spearman)

۳. ترسیم منحنی نقطه ای برای نمونه ها بر حسب ژن ها

❖ انجام آزمون های تشخیصی شامل:

۱. بررسی اثر ژن ها بر روی نرخ مرگ با روش Survival Analyse

۲. ترسیم منحنی ROC جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت ژن ها به عنوان بیومارکر در

تشخیص بیماری ها

❖ آنالیز داده های با حجم بالا با روش 3-way analysis

آنالیز داده های ریل تایم توسط نرم افزار GenEx شامل چهار مرحله می باشد.

مرحله اول: فرمت بندی داده های ریل تایم برای وارد نمودن در نرم افزار GenEx

مرحله دوم: بررسی کیفیت داده ها ریل تایم و اصلاح داده های مخدوش

مرحله سوم: پردازش اولیه داده های ریل تایم و آماده سازی داده ها جهت محاسبه Fold change و آنالیز آماری

مرحله چهارم: محاسبه Fold change و آنالیز آماری تغییرات بیانی ژن های هدف.

که کلیه مراحل فوق به صورت خودکار توسط نرم افزار انجام می گردد.

شما با تهیه آموزش پیشرفته نرم افزار GenEx می توانید بررسی، اصلاح، پردازش و آنالیز آماری داده های ریل تام با ارائه ۱۹ مثال (جهت آنالیزهای مختلف آماری) فرا بگیرید. در فایل آموزشی پیشرفته تمام تکنیک های توضیح داده شده در فهرست بالا و ضرورت هر روش و موارد استفاده هر تکنیک آماری ابتدا به صورت تصویری آموزش داده شده است و سپس به صورت مرحله به مرحله به آموزش نحوه آنالیز داده ها با تکنیک مربوطه در نرم افزار Genex پرداخته شده است.

در این آموزش ابتدا اصول بررسی کیفیت و آنالیز داده های ریل تایم به صورت دستی آموزش داده شده است و در ادامه نرم افزار GenEx به عنوان کاملترین نرم افزار بررسی، اصلاح، پردازش و آنالیز آماری داده های ریل تام با ارائه ۱۹ مثال (جهت آنالیزهای مختلف آماری) آموزش داده شده است.

لینک تهیه آموزش "آموزش نرم افزار GenEx: جامعترین نرم افزار برای بررسی کیفیت، اصلاح و آنالیز آماری داده های ریل تایم (real time PCR)"

تعداد صفحات آموزش: ۴۶۰ صفحه

<http://pishgam-bio.ir/product/%D8%A2%D9%85%D9%88%D8%B2%D8%B4-%D9%86%D8%B1%D9%85-%D8%A7%D9%81%D8%B2%D8%A7%D8%B1-genex-%D8%AC%D8%A7%D9%85%D8%B9%D8%AA%D8%B1%DB%8C%D9%86-%D9%86%D8%B1%D9%85-%D8%A7%D9%81%D8%B2%D8%A7%D8%B1-%D8%A8%D8%B1>

آموزش کامل آنالیز آماری داده های
ریل تایم (PCR real time)
توسط نرم افزار REST

جزوه آموزشی: آموزش کامل آنالیز آماری داده های ریل تایم (real time PCR) توسط نرم افزار REST

تعداد صفحات آموزش اصلی: ۷۲ صفحه

توضیح آموزش: در این آموزش ابتدا مفاهیم پایه آنالیز داده های ریل تایم مانند C_t ، C_p ، ΔC_t و fold change توضیح داده شده است. سپس به آموزش بررسی کیفیت داده های ریل تایم پرداخته شده و در ادامه فرمول های محاسبه اختلاف بیان ژن در نمونه ها مانند فرمول محاسبه fold change آموزش داده شده است و با ارائه چندین جدول داده ریل تایم، آنالیز داده ها به صورت عملی توضیح داده شده است. در ادامه آموزش نرم افزار REST برای آنالیز آماری داده های ریل تایم و محاسبه p-value و میزان اختلاف بیان ژن ها به صورت تصویری و با داده های واقعی آموزش داده شده است.

فهرست کامل آموزش:

- ❖ آشنایی با اساس روش ریل تایم (real time PCR)
- ❖ آشنایی با مفهوم ژن کنترل داخلی (ژن رفرنس) در روش ریل تایم
- ❖ آشنایی با مفهوم Fold change و نحوه محاسبه دلتا دلتا C_t ($\Delta\Delta C_t$) در ریل تایم
- ❖ آموزش آنالیز داده های ریل تایم (Real time) به صورت عملی
- ❖ آموزش نحوه بررسی کیفیت نتایج ریل تایم
- ❖ ضرورت محاسبه میزان کارایی PCR و پرایمرها برای آنالیز نتایج ریل تایم
- ❖ آموزش نرم افزار REST جهت آنالیز آماری داده های ریل تایم (Real time PCR)
- ❖ آموزش آنالیز آماری نتایج ریل تایم چند ژن به وسیله نرم افزار REST
- ❖ آموزش آنالیز آماری نتایج ریل تایم یک ژن در چند گروه به وسیله نرم افزار REST
- ❖ آنالیز داده های ریل تایم در حالت REST RG نرم افزار REST

قیمت خرید: ۱۲۵۰۰ تومان

لینک خرید:

<http://pishgam-bio.ir/product/%d8%a2%d9%85%d9%88%d8%b2%d8%b4-%da%a9%d8%a7%d9%85%d9%84-%d8%a2%d9%86%d8%a7%d9%84%db%8c%d8%b2-%d8%a2%d9%85%d8%a7%d8%b1%db%8c-%d8%b1%db%8c%d9%84-%d8%aa%d8%a7%db%8c%d9%85/>

**آموزش محاسبه کارایی PCR و
پرایمرها (E یا PCR
Efficiency) در ریل تایم با
استفاده از نرم افزار
LinRegPCR**

**جزوه آموزشی: آموزش محاسبه کارایی PCR و پرایمرها
(E یا PCR Efficiency) در ریل تایم با استفاده از
نرم افزار LinRegPCR**

تعداد صفحات آموزش اصلی: ۱۰۰ صفحه

توضیح آموزش: این فایل PDF شامل آموزش کامل و
تصویری نحوه دریافت داده های ریل تایم، تصحیح فرمت
دادهها، وارد نمودن دادهها در نرم افزار LinRegPCR ،
محاسبه کارایی PCR و پرایمرها، و بررسی کیفیت داده
ها با استفاده از نرم افزار LinRegPCR می باشد.

فهرست کامل آموزش:

- ❖ **ضرورت محاسبه کارایی پرایمرها (E یا PCR Efficiency) و آشنایی با نرم افزار LinRegPCR**
- ❖ **مراحل محاسبه کارایی پرایمرها و PCR (E یا PCR Efficiency) بوسیله نرم افزار linregPCR**
- ❖ **آموزش دریافت RAW DATA نمونه ها در نرم افزار Bio-Rad CFX Manager برای دستگاه های Bio-Rad**
- ❖ **آموزش دریافت داده های ریل تایم در نرم افزار Rotor-Gene 6000 Series برای تعیین کارایی PCR و پرایمرها در نرم افزار linregPCR**
- ❖ **آموزش دریافت داده های ریل تایم در نرم افزار StepOne Software برای تعیین کارایی PCR و پرایمرها در نرم افزار linregPCR**
- ❖ **آموزش وارد نمودن داده های ریل تایم از نرم افزار MJ Research در linregPCR برای تعیین کارایی PCR و پرایمرها**
- ❖ **آموزش وارد نمودن داده های ریل تایم از نرم افزار Rotor-Gene (Corbett Research) در نرم افزار linregPCR برای تعیین کارایی PCR و پرایمرها**
- ❖ **اصلاح baselines داده های ورودی، تعیین ناحیه W-o-L و کارایی PCR و پرایمرها توسط نرم افزار linregPCR**
- ❖ **محاسبه کارایی PCR و پرایمر برای چند پرایمر به صورت هم زمان در نرم افزار linregPCR**
- ❖ **محاسبه میانگین، SD و SEM کارایی PCR برای مجموعه پرایمرها برای ریل تایم به وسیله نرم افزار linregPCR**

قیمت خرید: ۱۲۵۰۰ تومان

لینک خرید:

<http://pishgam-bio.ir/product/%d8%a2%d9%85%d9%88%d8%b2%d8%b4-%d9%85%d8%ad%d8%a7%d8%b3%d8%a8%d9%87-%da%a9%d8%a7%d8%b1%d8%a7%db%8c%db%8c-pcr-%d9%88-%d9%be%d8%b1%d8%a7%db%8c%d9%85%d8%b1%d9%87%d8%a7/>

**آموزش طراحی پرایمر برای
ریل تایم به روش سایبرگرین**

exon-exon junction primer

intron-spanning primer

با نرم افزارهای

primer blast

primer3

oligo analyzer(IDT)

جزوه آموزشی: آموزش طراحی پرایمر اختصاصی برای ریل تایم real time pcr (روش سایبر گرین) با استفاده از نرم افزارهای primer blast و primer 3

تعداد صفحات آموزش اصلی: ۸۵ صفحه

توضیح آموزش: در این آموزش اصول طراحی پرایمر را برای بررسی ژن ها در ریل تایم به روش سایبرگرین شرح داده شده است و این فایل PDF شامل آموزش دریافت توالی mRNA مرجع ژن ها جهت آموزش کامل طراحی پرایمرهای exon-junction و intron-spanning برای ریل تایم به روش سایبرگرین (real time pcr) با استفاده از نرم افزارهای primer blast و primer3 می باشد.

موارد اصلی آموزش داده شده:

۱. آموزش طراحی پرایمرهای exon-exon junction برای روش ریل تایم به روش سایبرگرین با استفاده از نرم افزار primer blast سایت NCBI
۲. آموزش طراحی پرایمرهای intron-spanning (intron inclusion) برای روش ریل تایم به روش سایبرگرین با استفاده از نرم افزار primer blast و نرم افزار primer3

فهرست کامل آموزش:

بخش اول: مقدمه

- ✓ آموزش مقدماتی ریل تایم پی سی آر (Real Time PCR) و کاربرد رنگ سایبر گرین (SYBR Green)
- ✓ آموزش اختصاصی طراحی پرایمر برای ریل تایم (Real Time PCR) به روش SYBR Green
- ✓ آموزش نکات طراحی پرایمرهای intron-spanning (intron inclusion) برای بررسی بیان ژن ها در ریل تایم (Real Time PCR) به روش SYBR Green
- ✓ آموزش نحوه طراحی پرایمرهای exon-exon junction برای بررسی بیان ژن ها در ریل تایم (Real Time PCR) به روش SYBR Green
- ✓ آموزش نحوه طراحی پرایمرهای داخل اگزونی برای بررسی بیان ژن ها در ریل تایم (Real Time PCR) به روش SYBR Green

بخش دوم: دریافت توالی mRNA یک ژن جهت طراحی پرایمر برای ریل تایم

بخش سوم: آموزش طراحی پرایمرهای exon-exon junction و intron inclusion برای ریل تایم با استفاده از نرم افزار primer blast سایت NCBI

بخش چهارم: آموزش طراحی پرایمرهای intron-spanning (intron inclusion) برای ریل تایم با استفاده از نرم افزار پرایمر ۳ (Primer3)

آموزش طراحی پرایمرهای ریل تام با نرم افزار آنلاین پرایمر ۳ (Primer3)

بخش پنجم: بررسی ساختارهای ثانویه پرایمرهای ریل تایم با استفاده از نرم افزار Oligo analyzer (IDT)

قیمت خرید: ۱۲۵۰۰ تومان

لینک خرید:

<http://pishgam-bio.ir/product/%D8%A2%D9%85%D9%88%D8%B2%D8%B4-%D8%AA%D8%AE%D8%B5%D8%B5%DB%8C-%D8%B7%D8%B1%D8%A7%D8%AD%DB%8C-%D9%BE%D8%B1%D8%A7%DB%8C%D9%85%D8%B1%D9%87%D8%A7%DB%8C-%D8%B1%DB%8C%D9%84-%D8%AA%D8%A7%DB%8C%D9%85/>

تماس با گروه پیشگامان بیوانفورماتیک

اعضای گروه پیشگامان بیوانفورماتیک را جمعی از دانشجویان Ph.D و کارشناسی ارشد که به حوزه های مختلف بیوانفورماتیک آگاه می باشند تشکیل داده اند. هدف این گروه ارائه آموزش های اختصاصی جهت یادگیری بیوانفورماتیک و کمک به سایر دانشجویان جهت حل مسائل بیوانفورماتیکی خود می باشد.

در صورت علاقه مند بودن به یادگیری آموزش های بخش های فوق و یا آموزش های تکمیلی هر بخش به صورت کلاس خصوصی، و یا هر گونه پیشنهاد در مورد افزودن آموزش های مورد نظر خود می توانید از طریق روش های زیر با ما تماس بگیرید. همچنین می توانید با عضویت در کانال تلگرام ما جزوات جدید آموزش بیوانفورماتیک که توسط گروه نویسندگان تهیه می گردد را به صورت رایگان دانلود و مطالعه فرمایید.

تماس با گروه پیشگامان بیوانفورماتیک فقط از طریق زیر ممکن می باشد و گروه فاقد هر گونه شعبه و یا مرکزی برای مراجعه و شمار تلفن جهت تماس حضوری می باشد.

کانال تلگرام

[@pishgam_bioinformatics](https://t.me/pishgam_bioinformatics)

سایت

<http://pishgam-bio.ir>

ایمیل: pishgaman.bioinformatics@gmail.com