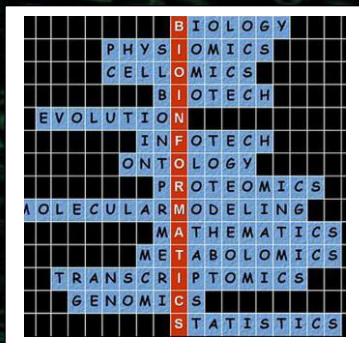


بسم الله الرحمن الرحيم

آموزش مقدماتی آنالیز آماری داده ها در بررسی طول تلومر با روش ریل

تایم (real time PCR)



کانال تلگرام

@pishgam_bioinformatics

سایت

<http://pishgam-bio.ir>

ایمیل: pishgaman_bioinformatics@gmail.com

فهرست آموزش پشرفته

بخش اول مقدمه	1
آشنایی با تلومر، ساختار و عملکردهای آن	2
بخش دوم روش های بررسی طول تلومر	20
نحوه بررسی طول تلومر	21
روش های تعیین طول تلومر با روش ریل تایم	27
۱. روش ترسیم منحنی استاندارد و تعیین میزان مطلق طول تلومر	27
۲. روش مقایسه نسبی طول تلومر	27
آشنایی با اساس روش ریل تایم (real time PCR) در تعیین طول تلومر	29
آشنایی با مفاهیم تخصصی در تکنیک Real time PCR برای محاسبه طول تلومر	32
آموزش Ct در روش ریل تایم (Real time PCR)	32
آشنایی با مفهوم ژن تک نسخه ای رفرنس و T/S برای تعیین طول تلومر	36
آشنایی با مفهوم relative T/S و نحوه محاسبه آن در ریل تایم	40
آموزش آنالیز داده های ریل تایم (Real time) برای طول تلومر به صورت دستی با فرمول های مربوطه	44
آموزش نحوه بررسی کیفیت داده های ریل تایم به صورت دستی	45
ضرورت محاسبه میزان کارایی PCR و پرایمرها برای آنالیز نتایج ریل تایم	51
آموزش محاسبه طول نسبی تلومر با روش ریل تایم GenEx	55
تعیین میزان تکرار پذیری روش تعیین طول تلومر	55
آنالیز داده های ریل تایم برای محاسبه نسبی طول تلومر توسط نرم افزار GenEx باشد.	98
آموزش کاربرد آزمون T (T-test) در تعیین سطح معنی داری طول تلومر	151
آموزش کاربرد آزمون Anova در آنالیز داده های ریل تایم جهت بررسی طول تلومر	178
آموزش ترسیم منحنی استاندارد برای داده های ریل تایم جهت تعیین میزان مطلق طول تلومر	200
آموزش تهیه نرم افزار GenEx و نحوه رفع محدودیت زمانی استفاده از نرم افزار	216

بخش اول مقدمه

آشنایی با تلومر، ساختار و عملکردهای آن

تلومر ساختار انتهایی کروموزوم در یوکاریوت ها می باشد که از تکرار توالی پشت سر هم (TTAGGG) تشکیل شده است. تلومر، یک دومین هتروکروماتینی است که وظیفه اصلی آن حفاظت و پایداری انتهایی کروموزوم و جلوگیری از نوآرایی، شکست الحاق انتهایی و تجزیه و تخریب آن می باشد. در اغلب سلول های سوماتیکی بر اثر تقسیمات متوالی سلول طول توالی تلومری کاهش می یابد، هنگامی که طول توالی تلومری کاهش می یابد، یکسری سیگنال درون سلولی فعال می شود که در پی آن چرخه سلولی متوقف و مرگ برنامه ریزی شده اتفاق می افتد. تلومراز آنزیم درون سلولی که سبب حفظ طول تلومر می شود مانع از کوتاه شدن تلومر و همچنین ادامه یافتن تقسیمات سلولی برخی از سلول های سوماتیکی در محیط آزمایشگاه می شود. بررسی های دقیق ارتباط تلومر و تلومراز می تواند در پیشگیری از فرایند پیری، سندرم های پیری و بیماری های وابسته به پیری کمکهای سودمندی نماید.

تلومر از ریشه یونانی کلمه Telos (به معنی انتها) و MerOS (به معنی بخش)، آمده است و هرمن مول را در سال ۱۹۳۸ آن را نام گذاری کرد. هرمن مولر در سال ۱۹۴۶ موفق به کسب جایزه نوبل شد. چند سال بعد جیمز واتسون " هنگام مطالعه بر روی فرایند همانندسازی DNA خطی در یوکاریوت ها پدیده مشکل انتهایی همانندسازی را عنوان نمود. واتسون فرض کرد که آنزیم DNA پلیمراز یوکاریوتی قادر به همانندسازی DNA در انتهای ۳ نمی باشد، در نتیجه پس از هر بار همانندسازی قسمتی از مولکول DNA (توالی تلومری) کوتاه میشود. در سال ۱۹۶۱ های فیللیک بیان نمود که سلولهای پیکری در حدود ۵۰ بار تقسیم می شوند و پس از آن وارد مرحله عدم فعالیت سلولی می گردند.

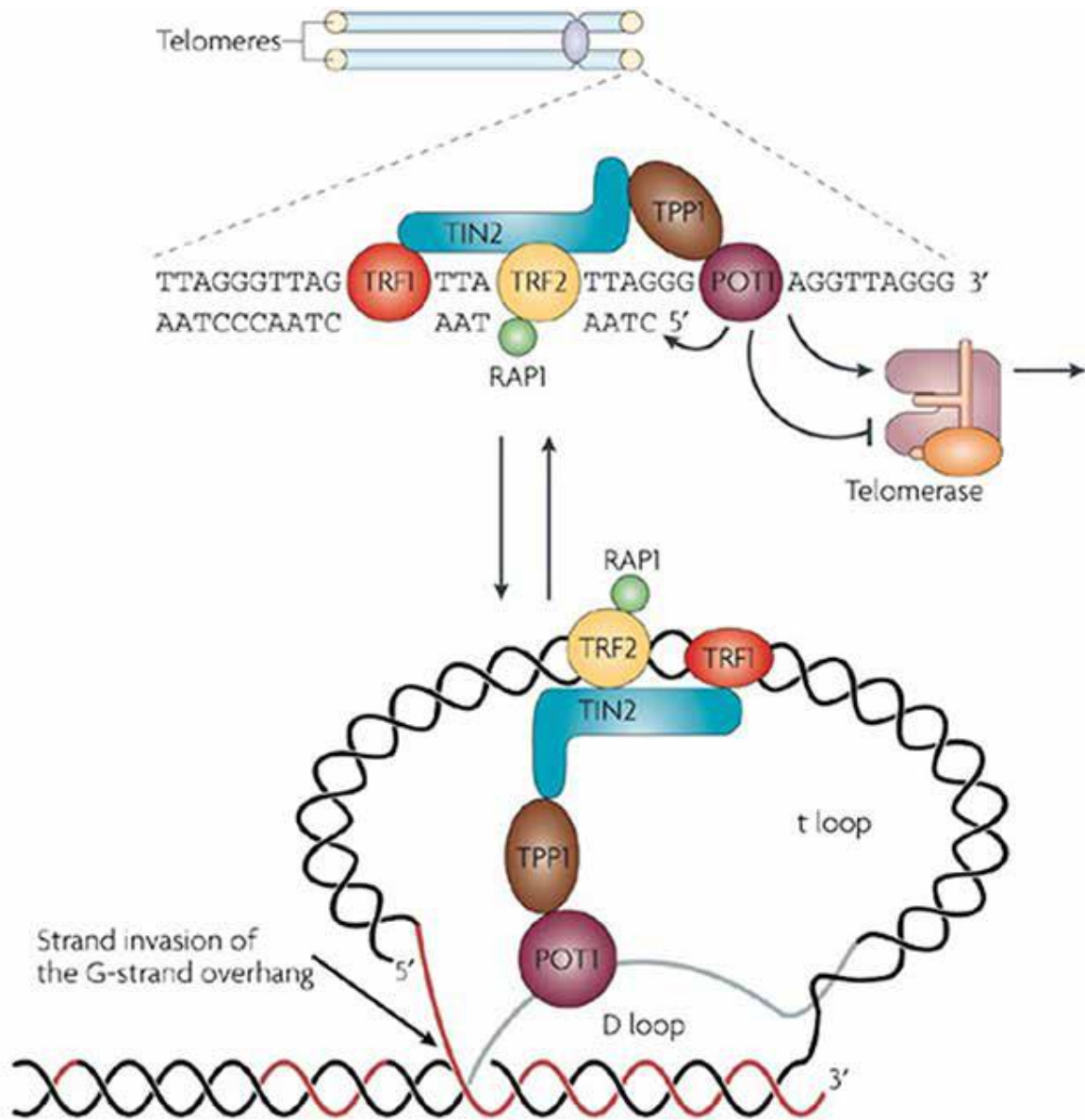
چندی بعد الوینکو توانست بین پدیده end replication problem و Senescence ارتباط معنی داری برقرار کند. او چنین فرض کرد که Endreplication problem موجب کوتاه شدن در طی

تقسیمات متوالی میشود. او متوجه شد که تلومر همانند یک ساعت مولکولی "عمل نموده و تعیین کننده تعداد تقسیمات سلولی است که یک سلول میتواند انجام دهد و بنابراین موجب پدیده فیزیولوژیک پیری" می شود. در سال ۱۹۸۴ الیزابت بلکبورن و کارل گریدر پس از مطالعه بر روی تتراهیمنتا، آنزیمی را شناسایی کردند که موجب حفظ طول تلومر پس از هر بار تقسیم میشد. آنها این آنزیم را ترانسفراز انتهایی تلومر یا همان تلومراز نامیدند. در سال ۲۰۰۹ الیزابت بلکبورن، از دانشگاه کالیفرنیا، و جک سوز تاک از دانشگاه هاروارد، بدلیل مطالعه و کشف آنزیم تلومراز در انسان موفق به کسب جایزه نوبل شدند.

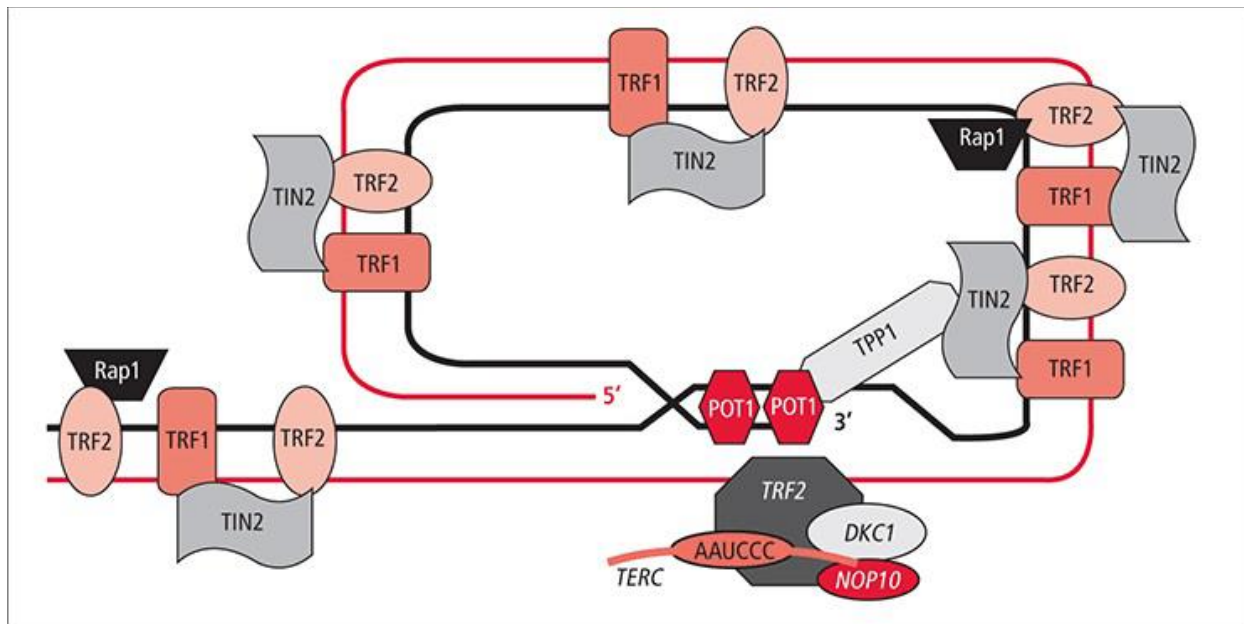
ساختار تلومر

تلومر ساختار انتهایی کروموزوم (DNA دو رشته ای+پروتئینهای ویژه) در یوکاریوتها (پروتوزوا، قارچها، گیاهان، جانوران) میباشد، که وظیفه اصلی آن حفاظت و پایداری از کروموزوم است. با بیانی ساده میتوان تلومر را به ساختار پلاستیکی انتهایی بند کفش تشبیه کرد که مانع تجزیه و تخریب آن می شود. در انسان و مهره داران تلومر از هزاران تکرار توالی ۳- 5 - TTAGGG یا n (T2AG3) که به صورت پشت سر هم "در انتهای کروموزوم قرار دارند، تشکیل شده است. طول تلومر در گونه های مختلف متفاوت است ولی طول آن در سلولهای انسان تقریباً بین ۵۰۰ تا ۱۵۰۰۰ جفت باز می باشد. طول توالی تلومر را معمولاً با روش QFISH اندازه گیری می کنند. تلومر دارای یک رشته غنی از "G" و یک رشته غنی از "C" میباشد. رشته غنی از G که در انتهای ۳ DNA واقع است، عمدتاً به اندازه ۱۸ جفت باز از انتهای ۵ پریم DNA (رشته غنی از C) بلندتر است که به آن رشته پیشامده G گفته می شود. رشته G یکی از عوامل اصلی تعیین کننده ساختمان و عملکرد تلومر است. DNA موجود در ساختار تلومری دارای چندین جایگاه اتصالی برای پروتئینهای شلترین میباشد. انتهای ۳ به کمک مجموعه پروتئینی شلترین، دچار تا خوردگی در ساختار خود میشود. کمپلکس پروتئینی شلترین، شامل ۲ پروتئین اصلی به نام های: TRF، TRF2 1، در اثر تا خوردگی انتهای ۳ پریم در ساختار تلومر، ۲ حلقه به نام های

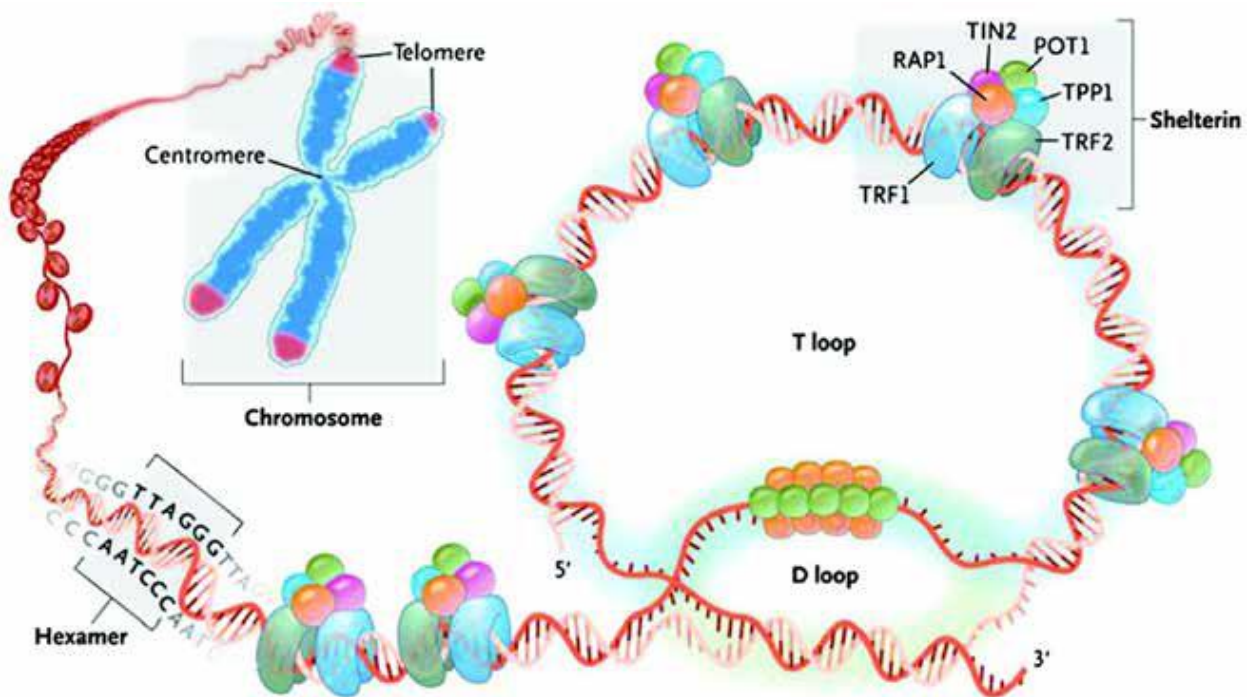
حلقه "T" و حلقه "D" پدید می‌آید. به حلقه آن حلقه تلومری" و حلقه "D، حلقه جایگزینی" می‌گویند. مکانیسم تاخوردگی بدین صورت است که ابتدا انتهای آزاد ۳ به گونه ای خم می شود که DNA تک رشته دوباره بتواند در کنار DNA دورشته قرار گیرد، بدین ترتیب حلقه T ایجاد میشود. سپس هنگامی که DNA تک رشته در جای صحیح خود قرار گرفت، با توالی های تکراری مکمل خود بر روی انتهای ۵ که ۲ رشته ای است، پیوند هیدروژنی برقرار می کند و بدین ترتیب با ایجاد مارپیچی، جانشین رشته دیگر DNA دورشته میشود. به همین دلیل به این حلقه، حلقه جانشینی گفته میشود. در T-Loop، ساختار DNA ۴ رشته ای دیده میشود که موجب پایداری بیشتر حلقه T می شود. تلومر به دو حالت فرم باز" (فرم مناسب برای طویل شدن) و فرم بسته" (غیرقابل دسترس برای تلومراز) می باشد.



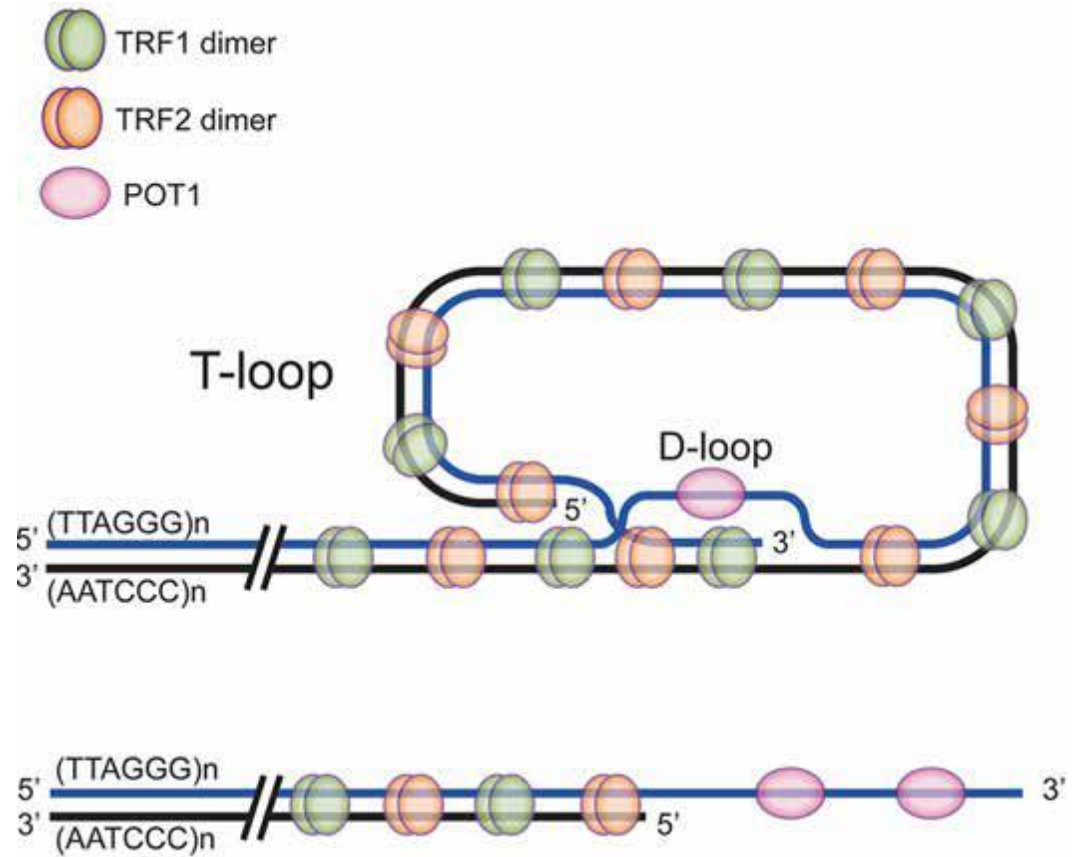
شکل ۱: ساختار تلومر و پروتئین های مرتبط.



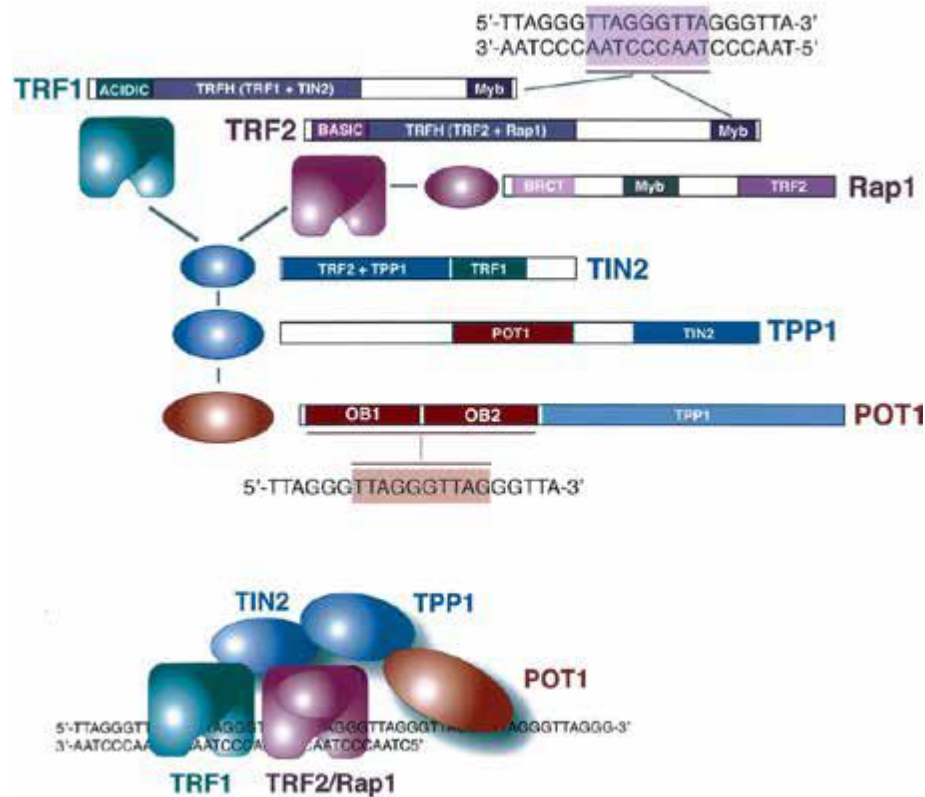
شکل ۲: تلوزوم: شامل مولکول DNA و مجموعه پروتئینی شلترین می باشد. این کمپلکس شامل ۲ پروتئین اصلی به نامهای : TRF1، TRF2 و پروتئینهای فرعی به نامهای TPP1، TIN2، POT1 ، می باشد.



شکل ۳: حلقه تلومری و حلقه جانشینی و پروتئین های مرتبط.



شکل ۴: فرم باز و بسته تلومر.



شکل ۵: مجموعه پروتئینی شلترین

اهمیت تلومر

۱. تلومر انتهای کروموزوم را از تخریب و تجزیه شدن، نوآرایی و الحاق انتهایی "حفظ می کند".
۲. تلومر مانع تخریب انتهای DNA توسط اگزونوکلازها می شود.
۳. تلومر اجازه میدهد تا همانند سازی انتهای DNA به درستی انجام شود. در واقع مشکل انتهای همانندسازی را حل می کند.
۴. تلومر با اتصال به غشای هسته در مکان یابی و جای گیری صحیح کروموزومها در هسته نقش دارد.

۵. تلومر در تنظیم بیان ژن، ژنهایی که در مجاورت خود قرار دارند نقش دارد.

۶. تلومر به عنوان یک ساعت مولکولی عمل کرده و تعداد دفعات تقسیم سلول ها را مشخص می کند. کوتاه شدن تلومر سبب ایجاد سیگنال هایی درون سلول می شود که مرگ برنامه ریزی شده سلول را راه اندازی می شود.

۷. کوتاه شدن طول توالی تلومر به عنوان یک فاکتور سرکوب کننده سرطان عمل می کند. البته کوتاه شدن تلومر همچنین می تواند موجب آسیب دیدن DNA و تومورزایی شود. (به دلیل اثر القایی که بر روی ژن p53 و ATM و ATR می گذارد).

اهمیت حلقه T

۱. با ایجاد حلقه آ انتهای DNA پوشیده میشود و به همین دلیل آزاد نیست.

۲. حلقه آمستقیماً طویل شدن تلومر را کنترل می کند.

۳. حلقه آتلومرها را از عملکرد آنزیمهای ترمیمی محفوظ نگه می دارد یعنی تلومراز دیگر قادر به ترمیم انتهای DNA نمیباشد.

۴. همچنین TRF عمل حفاظت از تلومر را در برابر آگزونوکلئازها بر عهده دارد.

هنگامی که پس از هر بار همانند سازی، مولکول DNA کوتاه میشود تشکیل T-Loop هم مشکل میشود، بدین ترتیب انتهای مولکول DNA آزاد مانده و دستخوش تغییرات گوناگون میشود (۲).

پدیده مشکل انتهای همانندسازی:

در کروموزوم خطی یوکاریوتها وقتی آخرین پرایمر در انتهای ۵ برداشته میشود، انتهای OH3 وجود ندارد که دئوکسی ریبونوکلئوتیدها به آن اضافه شود بنابراین آنزیم DNA پلیمراز قادر به پر کردن جای

خالی RNA پرایمر نیست. در نتیجه پس از هر بار همانند سازی DNA یکی از زنجیرهای آن به اندازه طول RNA پرایمر کوتاهتری شود. این مشکل اولین بار توسط جیمز واتسون مشاهده شد (۱۵).

برای افزایش طول توالی تلومر ۴ مکانیسم وجود دارد:

۱. مکانیسم غالب در اکثر یوکاریوتها و به خصوص در انسان، تلومراز است.
۲. مکانیسم چند شکلی طولی جایگزینی مکانیسمی است که در برخی از سلول های سرطانی دیده میشود.
۳. در مگس سرکه، طول DNA تلومری به وسیله انتقال رترو ترنسپوزون های ویژه به نام HeT-A و TART افزایش می یابد. در پایان هر همانندسازی این ۲ عنصر در انتهای مولکول DNA قرار گرفته و ۵ تا ۶ کیلوباز، انتهای DNA را بسط می دهند.
۴. در ساکارومیسس سرویزیه، طول DNA تلومری به وسیله کروموزوم های هومولوگ و غیر هومولوگ افزایش می یابد.

تلومراز و عملکرد آن

آنزیم تلومراز یک ترانس کریپتاز معکوس است که می تواند RNA موجود در ساختار خود را به عنوان الگو قرار داده و بدین ترتیب انتهای ۳ پریم DNA را بسط دهد. در واقع آنزیم تلومراز یک نوع DNA پلیمرز وابسته به RNA میباشد. آنزیم تلومراز در مرحله G1-S از چرخه سلولی بیان شده و در همین مرحله از چرخه سلولی توالیهای هگزامری (TTAGGG) را به انتهای ۳ پریم DNA اضافه می کند. ماهیت بیوشیمیایی آنزیم تلومراز، ریبونوکلئوپروتئینی بوده و از ۳ جز مهم تشکیل شده است.

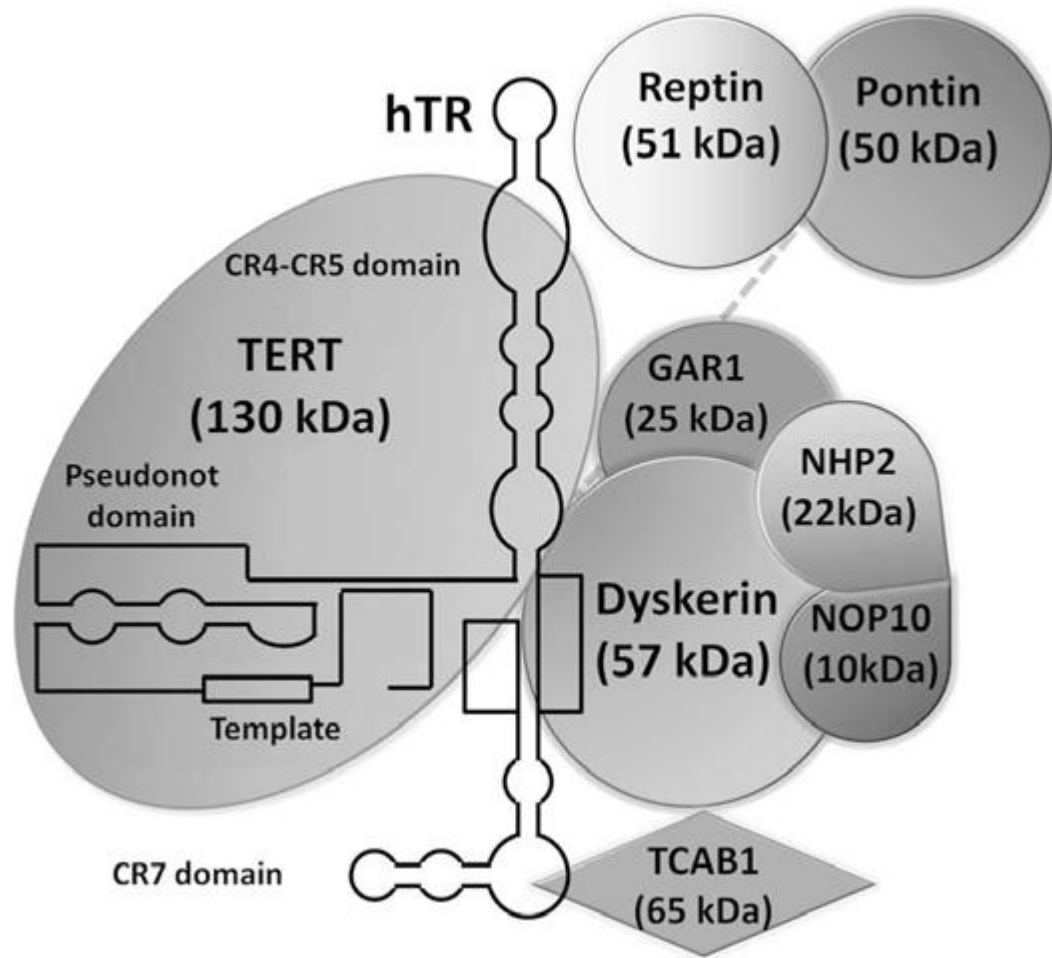
۱. (h)TR or TERC: این بخش از آنزیم شامل یک RNA به طول ۳۲۵ نوکلئوتید می باشد که تنها ۱۱ نوکلئوتید از این RNA به عنوان الگویی برای بسط دادن انتهای ۳ DNA و سنتز توالی تلومری قرار میگیرد.

۲. hTERT: این بخش از آنزیم پروتئینی بوده و مشتمل بر ۱۱۳۲ آمینو اسید با وزن ۱۲۷ کیلودالتون می باشد. این بخش از آنزیم دارای خاصیت کاتالیتیکی و ترانس کریپتازی است.

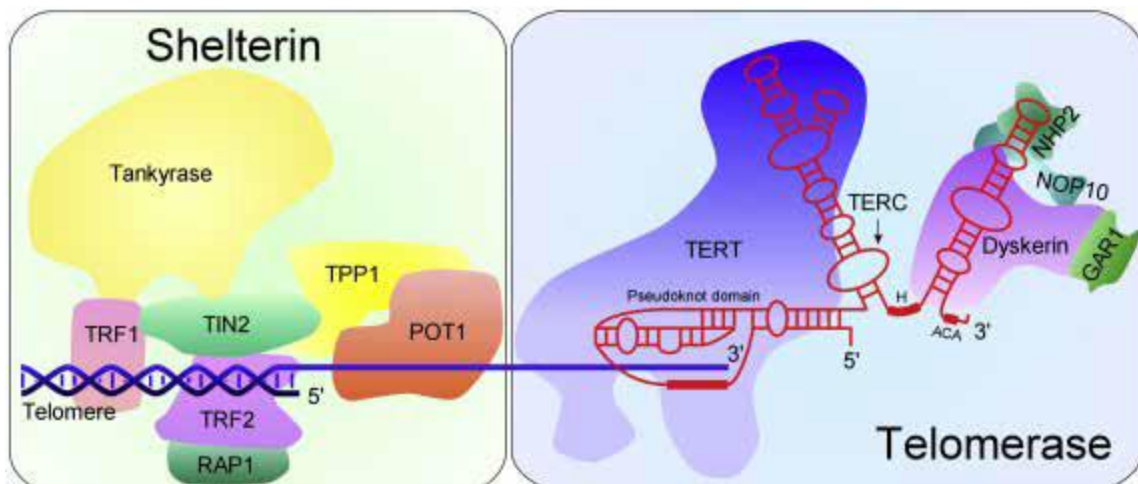
۳. TEP1: این بخش از آنزیم خاصیت تنظیمی در فعالیت آنزیمی دارد (اجزای آن هنوز شناخته نشده است). RNA موجود در ساختمان آنزیم به عنوان الگو قرار گرفته و آنزیم از طریق قسمت TERT خود دزوکسی ریبونوکلئوتیدها را به انتهای ۳ مولکول DNA اضافه میکند. هنگامی انتهای ۳ پیریم مولکول DNA بسط پیدا کرد، جای خالی RNA پرایمر وسیعتر می شود. با ساخته شدن RNA پرایمر جدید در جای خالی، DNA در جهت ۵ پیریم به ۳ پیریم سنتز می شود.

RNA پرایمر جدید برداشته می شود و چون این RNA سمپس دوباره پرایمر جدید مربوط به توالی تلومری است، برداشته شدن آن برای ذخایر ژنتیکی سلول مشکلی ایجاد نمیکند.

ژن تلومراز در سلولهای طبیعی سوماتیک تقریباً بیان نمیشود اما در برخی از سلول ها از جمله سلول های سرطانی، سلول های بنیادی، سلول های زایا، سلول های رویانی، سلول های اپیدرمی پوست، سلول های فولیکولی مو، لنفوسیت های فعال، سلول های روده، ژن آنزیم تلومراز روشن بوده و بیان میشود.



شکل ۶: ساختمان تلومراز. تلومراز از ۲ جز تشکیل شده است. ۱- پروتئین ۲- RNA. تلومراز یک آنزیم ریبونوکلئوپروتئینی است.



شکل ۷: نحوه اتصال تلومراز و تلوزوم**تلومرو پیری**

اگر با گذشت زمان پیر شویم اصطلاحاً آن را پیری «فیزیولوژیک» میگویند. معمولاً پیری را سن بالاتر از ۷۵ سالگی تعریف میکنند. پیری یک فرایند فیزیولوژیکی می باشد که با زوال فعالیت بافتی منجر به مرگ می شود. پیری یک بیماری نیست، بلکه فرایند فیزیولوژیکی است که در آن طول توالی تلومری کاهش مییابد و به موازات آن قدرت رشد و تقسیم سلولی و همچنین دقت ساخت ماکرومولکولها در سلول کاهش مییابد در نتیجه فعالیت ارگان های مختلف مختل میشود. برای پیری مکانیسمهای مختلفی تعریف شده است که در ادامه به توضیح مهمترین تئوریهای توجیه کننده این مکانیسم می پردازیم.

۱. تئوری هورمونی عصبی و پیری: در اثر افزایش سن و پیری هیپوتالاموس آسیب میبیند که یکی از مهمترین علل آن زیاد شدن غلظت هورمون کورتیزول است.

۲. تئوری رادیکالهای آزاد و پیری: این تئوری اولین بار توسط دکتر هارمان " در سال ۱۹۵۶ مطرح شد. عواملی مانند تغذیه، عادت های زندگی، تنباکو، الکل و برخورد با اشعه میتوانند باعث افزایش تولید رادیکال های آزاد در بدن شوند. البته در حالت طبیعی هم رادیکال های آزاد در بدن تولید می شوند. تولید رادیکال های آزاد بیشتر در میتوکندری و شبکه آندوپلاستی صاف رخ میدهد. رادیکالهای آزاد می توانند به ساختار غشای سلول، DNA و پروتئینها متصل شوند و باعث تخریب آنها، پیری و در نتیجه مرگ سلولی میشوند.

۳. تئوری کاهش چربی غشای سلولها و پیری: بر اثر گذشت زمان، کم کم غلظت چربی غشای سلول کم میشود، در نتیجه کارکرد غشای سلول مختل میشود و سلول قادر به تبادل مواد از عرض غشای خود نمی باشد.

۴. تئوری های فلیک: در سال ۱۹۶۱ دکتر های فیللی نشان داد اغلب سلولهای بدن انسان حداکثر ۵۰ بار می تواند تقسیم شود و بعد از آن دچار مرگ سلولی میشوند.

۵. اختلال عملکرد میتوکندری ها و پیری: اختلال در عملکرد میتوکندری های موجود در سلولهای بدن می تواند موجب اختلال در روند سیگنالهای موثر در مرگ برنامه ریزی " شده سلول شود.

۶. تئوری گلیکوزیلاسیون و پیری: " افزایش مصرف قند می تواند روند پیری را تسریع بخشد. افزایش مصرف قند میتواند موجب تجمع آن در فضای خارج و درون سلولی شود که به دنبال آن ماتریکس خارج سلولی، پروتئینها، اسکلت درون سلولی صدمه می بینند.

۷. تئوری مولکولی پیری: در واقع تلومر همانند یک ساعت مولکولی عمل کرده و تعداد دفعات تقسیم سلولی را مشخص می کند. بعد از هر تقسیم سلولی در سلولهای قابل تقسیم، " از طول توالی تلومری کاسته می شود. به طور میانگین پس از هر بار تقسیم حدود ۵۰ تا ۱۰۰ جفت باز از انتهای ۵ کوتاه می شود. کوتاه شدن تلومر بر روی ژن های مجاور تاثیر گذاشته و سبب فعال شدن سیگنالهایی می شود که در پی آن ژن p16, p53, p21 فعال میشود که به دنبال آن چرخه سلولی متوقف و موجب مرگ برنامه ریزی شده سلول میشود. البته لازم به ذکر است برخی از عوامل سرعت پیری را افزایش میدهند مانند: چاقی، سیگار کشیدن، نوشیدن الکل، مصرف زیاد قند و نمک . جالب توجه است که استرس اکسیداتیو

میتواند کوتاه شدن طول توالی تلومر را ۵ برابر تشدید کند.

برخی از تاثیرات کوتاه شدن تلومر و ارتباط آن با اختلالات وابسته

۱. تضعیف قدرت بینایی

۲. آترواسکلروسیز

۲. اختلال در بهبود زخم ها

۲. بیماریهای قلبی

۵. سفید شدن موهای سر

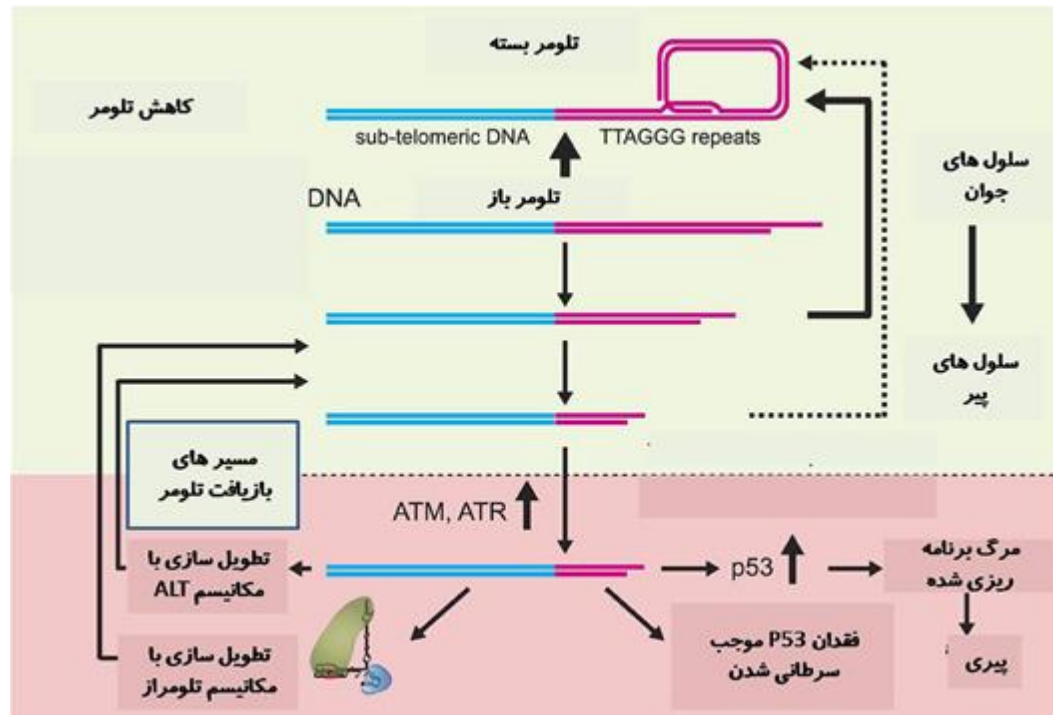
۶. چین و چروک پوست

در بیماری AIDS لنفوسیت‌های آلوده به HIV دارای تلومر کوتاه تری میباشند که همین عامل سبب مرگ آنها و تضعیف سیستم ایمنی فرد میشود. در بیماری AIDS در صورتی که بتوان طول توالی تلومری با ثابت نگه داشت، فعالیت $CD8+$ افزایش مییابد. در سال ۲۰۱۰ نارویی تحت عنوان TAT0002 کشف شد. این دارو سبب افزایش بیان آن تلومراز در سلولهای $CD8+$ و $CD4+$ می شود.

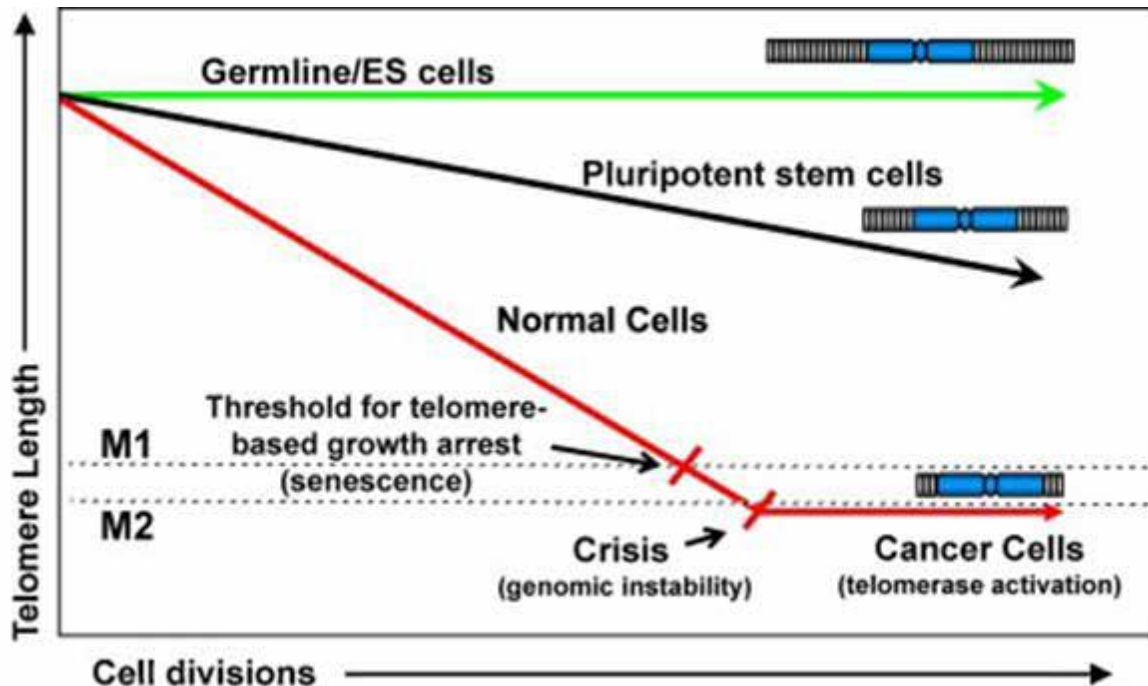
نامیرایی

اگر سلول بتواند به نحوی از کوتاه شدن توالی تلومری خود جلوگیری کند. بدین ترتیب میتواند از مرگ گریخته و به تقسیمات خود ادامه دهد و اصطلاحاً نامیرا شود.

دکتر کراپ" و کلاپر آب مطالعات خود را بر روی یک گونه ماهی به نام راکفیش آغاز کردند و متوجه شدند که این ماهی میتواند به مدت ۲۰۰ سال زندگی کند. آنها با ادامه مطالعه خود، دریافتند که سلولهای سوماتیکی آن دارای سطح بالایی از آنزیم تلومراز می باشند.



شکل ۸: مسیر های باز سازی تلمر در سلول های نامیرا



شکل ۹: مقایسه طول تلمر در سلول های زایا، بنیانی، طبیعی و سرطانی

پیری زودرس

اگر فرایند پیری در سنین پایین تر رخ بدهد، بدان پیری زودرس میگویند. البته این پدیده نادر میباشد. پیری زودرس عمدتاً به دلیل کوتاه شدن سریع تلومر و اختلال در مکانیسم ترمیم DNA می باشد.

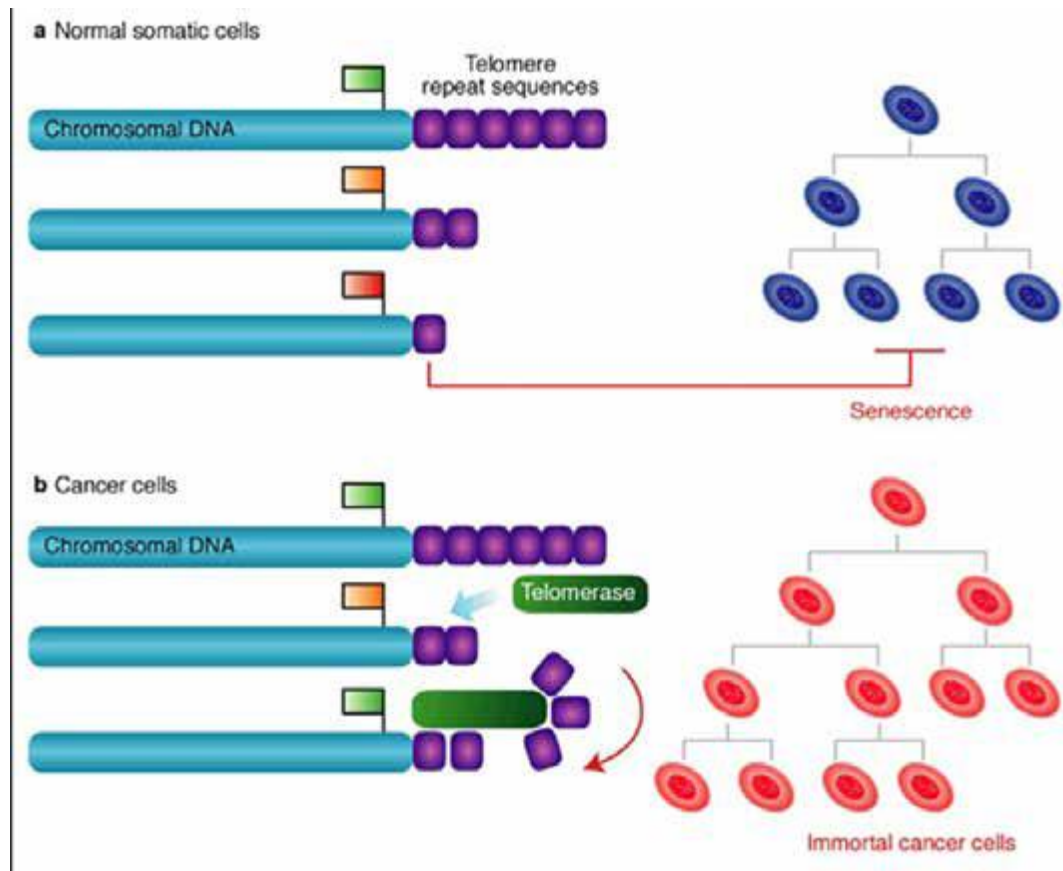
سندرم پروگنیا سندرم پروگنیا یک اختلال بسیار نادر ژنتیکی است که در آن علائم و نشانه های پیری و کهولت در سنین بسیار کم تجلی می نمایند. کلمه پروگنیا از لغت پروگروس " یونانی که به معنای پیری زودرس گرفته شده است که در آن کلمه یونانی پرو به معنای قبل یا پیش، و کلمه گروس به معنی سنین پیری یا کهولت می باشد،

این سندرم در سال ۱۸۸۶ میلادی توسط جان اتان هاجینسون و در سال ۱۸۹۷ نیز توسط هستینگز گیلفورد، به صورت مستقل مورد مطالعه قرار گرفت. میزان بروز این اختلال بسیار کم است و نرخ بروز آن ۱ مورد در هر ۸۰۰۰۰۰۰ تولد زنده میباشد، متوسط طول عمر بیماران ۱۳ سال می باشد و علت مرگ در بیشتر موارد آترواسکلروز زودرس و پیشرونده است علت بیماری، یک جهش جایگزینی نقطه ای در آگرون ۱۱ ژن Lamin A بر روی بازوی بلند کروموزوم یک می باشد.

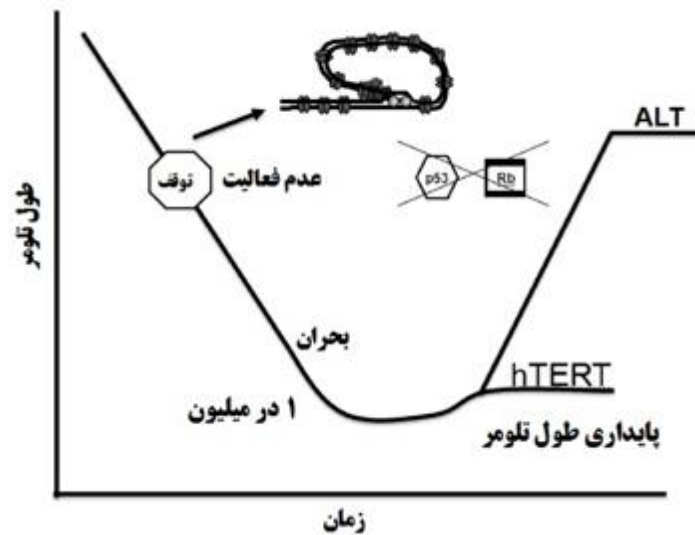
برخی از یافته های بالینی کوتاهی قد، بزرگ بودن چشم، دماغ نولت منقاری، کاهش چربی زیر جلدی، هیپوپلازی و کوچک بودن فلات تحتانی، آترواسکلروز شدید در سالهای ابتدایی زندگی، بزرگی قلب، اسکلرودرماتوز، ریزش مو، اختلال در رشد، آنمی هیپوکروم میکروسیستیک، هیپرلیپیدمی و افزایش کلسترول توتال و LDL.

پیری فرایندی فیزیولوژیکی می باشد که با گذر زمان رخ میدهد. و همان طور که بیان شد عوامل متعددی فرایند پیری را تحت تأثیر قرار میدهند. مهمترین این عوامل عبارتند از: ۱. گذشت زمان، ۲. استرس اکسیداتیو، ۳. افزایش مصرفا قند، ۴. کوتاهی تلومر و عدم فعالیت تلومراز.

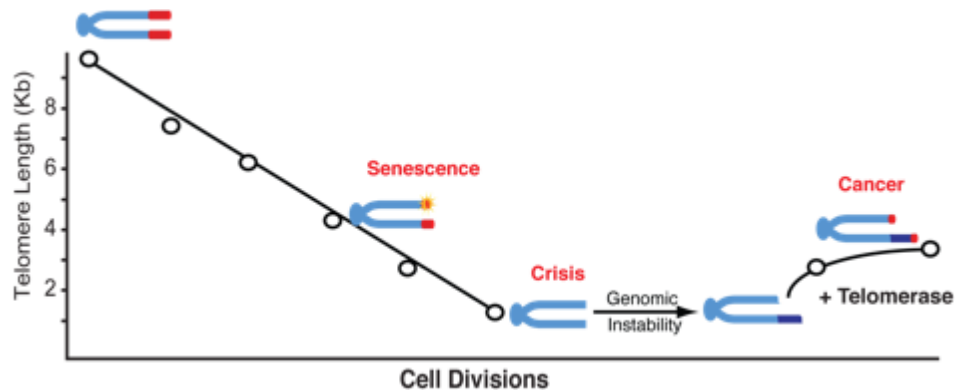
مقالات زیادی ارتباط بین کوتاه شده تلومر و فرایند پیری را بیان کرده اند اما تاکنون نقش تلومر و تلومراز در فرایند پیری به طور کامل شناخته نشده است. این مطالعه نتایج جدیدترین تحقیقات انجام شده را مورد بررسی قرار داده و سعی در شناساندن هرچه بیشتر نقش بیولوژی تلومر، تلومراز و مکانیزمهای دخیل در پیری را دارد.



شکل ۱۰: ارتباط طول تلومر و تعداد دفعات تقسیم سلولی. به دلیل عدم فعالیت تلومراز در سلولهای طبیعی تلومر کوتاه می شود. به دلیل افزایش بیان تلومراز در سلول های زایا و سرطانی تلومر کوتاه نمی شود.



شکل ۱۱ : سلولهای سرطانی توسط عواملی چون، وقوع جهش در ژن تلومراز، p53 و انکوژن ها می توانند بیان ژن تلومراز را افزایش دهند و نامیرا شوند.



شکل ۱۲ : حفظ طول تلومر در سلولهای سرطانی

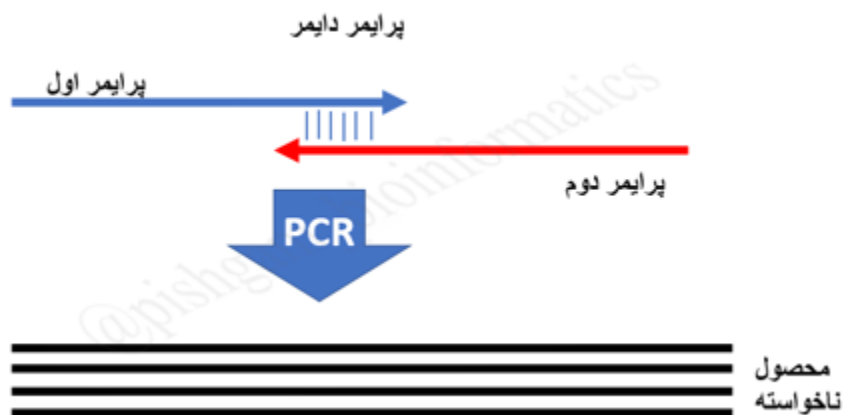
بخش دوم روش های بررسی

طول تلومر

نحوه بررسی طول تلومر

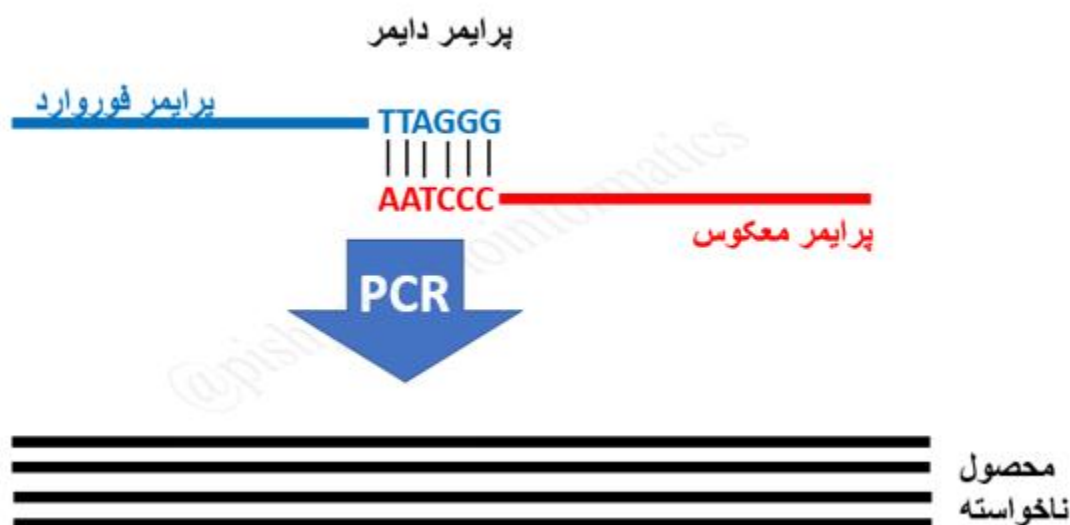
تا قبل از سال ۲۰۰۲ برای بررسی طول تلومر از روش TRF (terminal restriction fragment) استفاده می شد. در این روش ابتدا توالی تلومر توسط آنزیم محدود گر برش زده می شد و در مرحله بعد با استفاده از لگه گذاری سادرن و استفاده از پروب نشاندار طول تلومرها بر روی غشا تعیین می شد. تا سال ۲۰۰۲ روشی برای بررسی طول تلومرها به دلیل وجود پرایمر دایمر بین پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر تلومر، ابداع نشده بود.

پرایمر دایمر: در صورتی که انتهای ۳ پرایمرهایی که در PCR به کار می روند دارای بازهای مکمل باشند و این پرایمرها بتوانند به یکدیگر متصل شوند، در واکنش ریل تایم اتصال پرایمرها سبب ایجاد یک محصول جدید ناخواسته می گردد 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.

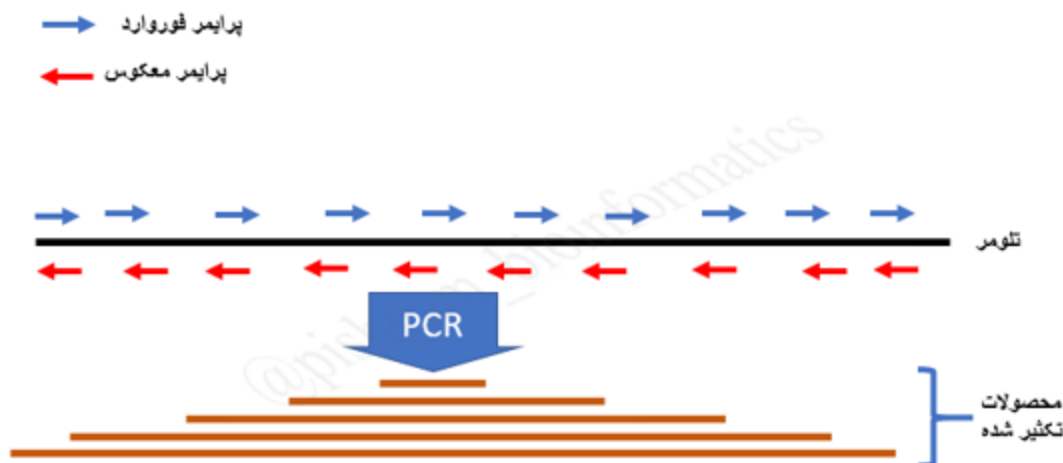
به دلیل اینکه تلمر از توالی های تکراری TTAGGG تشکیل شده است بنابراین پرایمر فرورارد دارای توالی TTAGGG و پرایمر معکوس دارای توالی مکمل آن (AATCCC) می باشد که سبب تشکیل پرایمر دایمر می گردد. شکل زیر این پرایمر دایمر را در پرایمرهای معمولی طراحی شده برای تکثیر تلمر نشان می دهد.



شکل فوق: نحوه تشکیل محصول ناخواسته به وسیله پرایمر های معمولی در تکثیر تلمر.

اما در سال ۲۰۰۲ فردی به اسم Cawthon روشی برای طراحی پرایمر برای تکثیر نواحی تلمری ابداع نمود که مانع از تشکیل پرایمر دایمر می گردید. بنابراین راه برای بررسی طول تلمر به روش ریل تایم هموار گردید. شکل زیر پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر تلمر توسط Cawthon در سال ۲۰۰۲ را نشان می دهد.





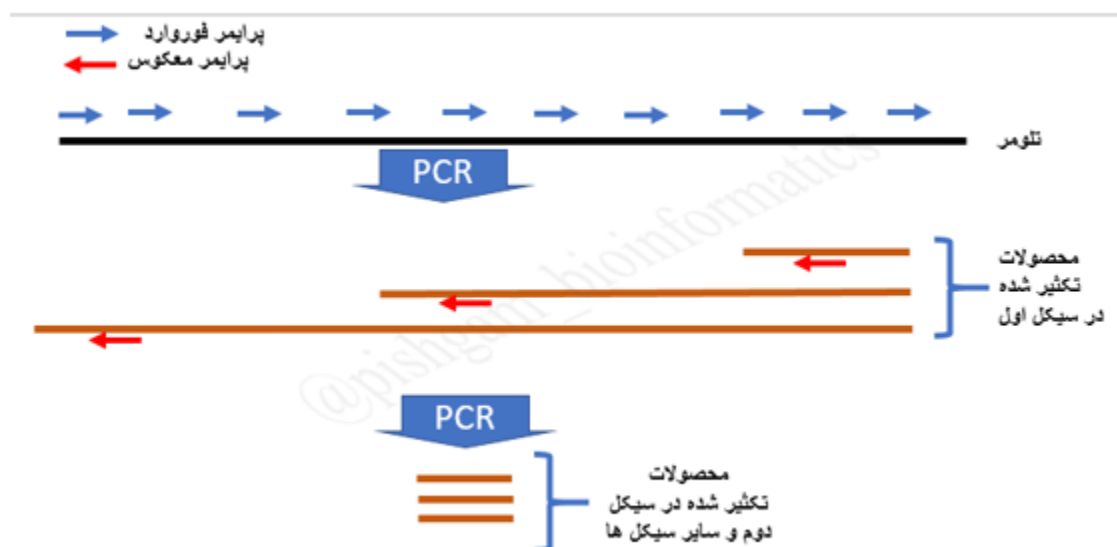
شکل فوق: نحوه اتصال پرایمرهای طراحی شده توسط Cawthon در سال ۲۰۰۲ به توالی ژنومی تلومر. از آن جاییکه توالی تلومر از تکرارهای یکسان تشکیل شده است بنابراین پرایمرهای فرورارد و معکوس طراحی شده می توانند به به نواحی متعددی در کل طول تلومر متصل شوند و هر چه طول تلومر بیشتر باشد میزان این اتصال ها بیشتر می باشد. بنابراین طول تلومر بیشتر به مفهوم الگوی بیشتر برای تکثیر می باشد بنابراین تلومرهای بلندتر محصول بیشتری نسبت به تلومر کوتاه تر تولید می کنند. و با بررسی میزان محصول تکثیر شده در ریل تایم می توان طول تلومر را تخمین زد.

با وجود روش مبتکرانه ابداع شده توسط Cawthon در سال ۲۰۰۲ برای تکثیر توالی تلومر و جلوگیری از تشکیل پرایمر دایمر، این روش دارای یک اشکال بزرگ بود. به دلیل اینکه توالی تلومر از تکرارهای یکسان تشکیل شده است بنابراین پرایمرهای فرورارد و معکوس طراحی شده می توانند به نواحی متعددی در کل طول تلومر متصل شوند و این اتصال سبب تولید انواع محصولات ریل تایم با طول مختلف خواهد شد که شکل فوق این موضوع را نشان می دهد. تولید محصولات با طول مختلف سبب کاهش تکرار پذیری آزمایش و نتایج متنوع در بررسی طول تلومر در نمونه های یکسان خواهد شد. اشکال تولید انواع

[illegible]

۲۶

معکوس (telc) می تواند به محصولاتی که از پرایمر فرووارد در سیکل اول تولید شده اند متصل شود و با این اتصال تنها یک محصول با طول مشخص تولید شود. شکل زیر فرایند تکثیر تلومر را برای پرایمرهای جدید نشان می دهد.



شکل فوق: نحوه عمل پرایمرهای طراحی شده توسط Cawthon در سال ۲۰۰۹ جهت بررسی طول تلومر. در این روش به دلیل اینکه تعداد محصولات تکثیر شده در سیکل اول به طول تلومر بستگی دارد و با افزایش طول تلومر محصولات بیشتری برای سیکل دوم فراهم می شود می توان با بررسی میزان محصولات تکثیر شده بوسیله روش ریل تایم طول تلومر را تخمین زد.

روش های تعیین طول تلومر با روش ریل تایم

۱. روش ترسیم منحنی استاندارد و تعیین میزان مطلق طول تلومر

یکی از روش های تعیین طول تلومر، ترسیم منحنی استاندارد جهت سنجش میزان مطلق تلومر در نمونه ها می باشد. با این روش می توان تعیین نمود که طول تلومر چند کیلوباز می باشد و از چند تکرار TTAGGG تشکیل شده است. در این روش ابتدا توالی تلومر به صورت سنتزی تهیه می شود سپس با استفاده از توالی سنتز شده یک نمونه استاندارد تهیه می شود که طول تلومر در این نمونه به کیلوباز مشخص است. در مرحله بعد از این نمونه استاندارد چند سری رقت متوالی تهیه می گردد که در هر رقت تهیه شده طول تلومر به کیلوباز مشخص می باشد. به عنوان مثال اگر طول تلومر در نمونه استاندارد برابر ۵۰۰ کیلوباز باشد و از این نمونه استاندارد یک نمونه ۱۰ برابر رقیق تر تهیه شود بنابراین طول تلومر در نمونه رقیق شده برابر با ۵۰ کیلوباز (۵۰۰ تقسیم بر ۱۰) می باشد. در مرحله بعد برای این نمونه های سری رقت متوالی ریل تایم گذاشته می شود و در مرحله بعد یک نمودار استاندارد از نمونه های رقیق شده ترسیم می گردد بدین صورت که محور X میزان برابر با طول تلومر برای هر نمونه رقت (به صورت لگاریتمی بر پایه ۱۰) و محور Y میزان Ct هر نمونه می باشد. در این روش بعد از تهیه منحنی استاندارد میزان Ct نمونه های مورد بررسی (که طول تلومر باید در آن ها تعیین گردد) نیز با ریل تایم بررسی می شود و در ادامه با مقایسه Ct حاصل برای نمونه هدف با نمودار استاندارد می توان طول تلومر را برای نمونه ها محاسبه نمود.

۲. روش مقایسه نسبی طول تلومر

در این روش طول تلومر بین دو یا چند گروه (به عنوان مثال تومری و نرمال) مقایسه می گردد و در این روش معمولاً طول تلومر در همه گروه ها نسبت به یک گروه مرجع محاسبه می گردد و در واقع میزان

تغییر طول تلومر در یک گروه نسبت به گروه مرجع به صورت نسبی گزارش می گردد به عنوان مثال عبارت "طول تلومر در افراد سالم دو برابر افراد بیمار می باشد" بیانگر محاسبه طول تلومر به روش نسبی می باشد بنابراین در این روش نیازی به محاسبه طول دقیق تلومر نمی باشد بلکه میزان کاهش و یا افزایش طول تلومر را در یک یا چند گروه نسبت به گروه مرجع مقایسه می نماییم.

برای حذف نوسانات مقادیر DNA وارد شده در واکنش و خطاهای دستگاه ها و افراد در این روش از یک ژن تک نسخه ای مانند ژن 36B4 به عنوان مرجع استفاده می شود. از آن جایی که تعداد نسخه این ژن در همه نمونه های مورد بررسی یکسان می باشد از مقایسه Ct حاصل از بررسی طول تلومر با Ct حاصل از ژن تک نسخه ای می توان داده ها را نرمال سازی نمود. سپس با مقایسه داده های نرمال شده بین گروه ها تغییرات طول تلومر را مورد بررسی قرار داد.

در این روش هنگامی که میزان طول تلومر را در چند گروه مقایسه می نماییم بهترین راه گزارش میزان تغییرات طول تلومر در یک نمونه نسبت به نمونه دیگر Relative T/S می باشد. مفهوم Relative T/S به نوعی همان "چند برابر" می باشد، به عبارت بهتر طول تلومر 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 بلندتر و یا کوتاهتر شده است؟ این جمله به این مفهوم است که اگر طول تلومر را در گروه اول برابر ۱ در نظر بگیریم، طول تلومر در گروه دوم برابر چه میزانی خواهد بود؟

در توضیحات بالا در مورد اهمیت بررسی طول تلومر و روش های بررسی آن توضیحاتی را ارائه دادیم. مقالات زیادی ارتباط بین کوتاه شده تلومر و بسیاری از پدیده های زیستی مانند فرایند پیری، نامیرایی، بروز سرطان، بیماری های عصبی و ... را بیان کرده اند بنابراین بررسی طول تلومر دارای ارزش بسیاری می باشد و آنالیز صحیح داده های حال از بررسی طول تلومر نیازمند دانش کافی می باشد. در آموزش پیشرفته آنالیز آماری داده ها در بررسی طول تلومر با روش ریل تایم (real time PCR)، نحوه آنالیز داده های طول تلومر که با روش ریل تایم مورد بررسی قرار گرفته اند از اصول اولیه تا محاسبه میزان relative T/S و سطح معنی داری به صورت جزء به جزء و تصویری آموزش داده شده است به صورتی که فردی که هیچ آشنایی با تکنیک ریل تایم و بررسی طول تلومر نیز نداشته باشد قادر به آنالیز داده ها باشد.

مشخصات این فایل آموزشی به شرح زیر می باشد:

نوع فایل: PDF شامل متن، تصویر (رنگی) و جدول

□ تعداد صفحات آموزش اصلی: ۲۴۰ صفحه

موارد اصلی آموزش داده شده:

در این آموزش ابتدا اصول بررسی طول تلومر در سلول ها با استفاده از روش ریل تایم آموزش داده شده است و در ادامه آنالیز آماری داده های طول تلومر به صورت دستی و همچنین نرم افزار GenEx آموزش داده شده است.

۱. آشنایی با اساس روش ریل تایم (real time PCR) در تعیین طول تلومر

۲. محاسبه تغییرات طول تلومر به صورت نسبی با استفاده از محاسبه relative T/S و سطح معنی

داری آن

۳. محاسبه طول مطلق تلومر در یک سلول دیپلوئید با استفاده از ترسیم منحنی استاندارد

فهرست کامل موارد آموزش داده شده را می توانید در فهرست ارائه شده در اول این فایل مشاهده نمایید.

لینک تهیه:

<http://pishgam-bio.ir/product/%D8%A2%D9%85%D9%88%D8%B2%D8%B4->

[%D8%A2%D9%86%D8%A7%D9%84%DB%8C%D8%B2-](#)

[%D8%A2%D9%85%D8%A7%D8%B1%DB%8C-%D8%AF%D8%A7%D8%AF%D9%87-](#)

[%D9%87%D8%A7-%D8%AF%D8%B1-%D8%A8%D8%B1%D8%B1%D8%B3%DB%8C-](#)

[%D8%B7%D9%88%D9%84/](#)