

qPCR, kalitatif ve kantitatif bir tespit aracı olarak oldukça popülerdir. Çoğunlukla güvenilir, tekrarlanabilir veriler elde edebilmek için bir standart eğri kullanmanız gerekir. qPCR standart eğrisinin neden ve nasıllarını birlikte inceleyelim:

qPCR Standart Eğrisi: İyi qPCR Verisinin Anahtarı

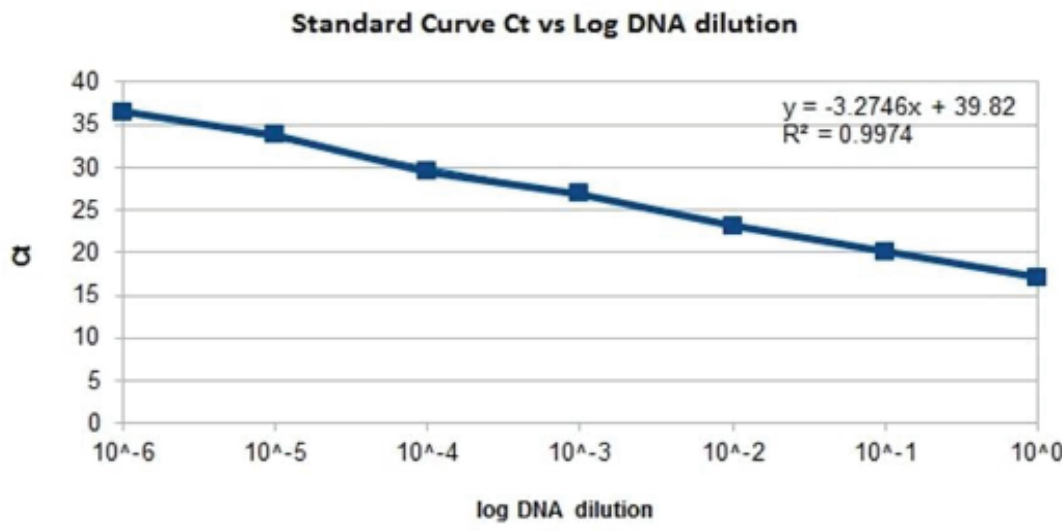
İlk bakışta, qPCR çok basit bir teknik gibi görünür ve optimize edildiğinde harika sonuçlara yol açabilir. Çalışılan örnekte gerçekten neler olduğunu yansıtan tutarlı ve doğru sonuçlar elde ettiğimizden emin olmak için en doğru kontrolleri kullanmalıyız. Bu temel kontrollerden bir tanesi standart eğri grafiği oluşturmaktır. Standart eğri grafiği primerlerimizin verimliliği ve DNA kalitesini kontrol edebilmemizi sağlar.

Mükemmel qPCR Verileri için Verimli Primerler Önemlidir:

Bilgisayar başında bir biyoinformatik yazılımı yardımı ile primer tasarlaması yaptınız, NCBI portalı aracılığı ile spesifik olduğunu gözlerinizle gördünüz, emin bir şekilde tasarladığınız primerlerin sentezlenmesi için siparişlerini verdiniz, primerleriniz elinize ulaştıktan sonra bunu bir qPCR deneyi ile test etmek hata yapmamak, yanlış sonuçlar almamak ve zaman kaybetmemek için bir zorunluluktur.! Bu hiçbir araştırmacının istemeyeceği büyük bir risktir. Çalışmayı hemen yapmak için sabırsız olmayın ve ilk çalışmanız için mutlaka bir deney deseni oluşturun! Elde edilen ct değerlerinin doğru olduğundan ve gerçeği yansıttığından emin olmak önemlidir. Tek bir dilüsyon ile yaptığınız çalışmalarda aldığınız ve iyi görüldüğünü düşündüğünüz logaritmik eğriler her zaman doğru sonuç vermeyebilir ve verimli bir şekilde çoğaldığının garantisini vermezler. Bu nedenle primerlerinizi her zaman bir standart eğri ile test etmelisiniz. Bir standart eğri grafiği primerlerin ilgili hedefe verimli ve hassas bağlandığını ve uzamayı doğru yaptığını gösterebilir ki bu da kritik bir noktadır.

Bir qPCR Standart Eğrisi Nasıl Gerçekleştirilir?

Bir standart eğri grafiği oluşturmak için aynı DNA örneğinin 10 kat dilüe edilmiş en az 5 farklı veri noktasının miktarlarını kullanırız. Teorik olarak bakıldığında doğru tasarlanmış verimli primerler doğru orantılı olarak doz-yanıt eğrisi şeklinde sonuçlanacaktır. Sonrasında elde ettiğimiz Ct değerlerini y eksenine ve mL başına olan log DNA kopyalarını da x eksenine çizmeniz gerekir. Bunun için çok basit bir Excel dokümanı hazırlayabilirsiniz. Aşağıda bir standart eğri örneği verilmektedir.

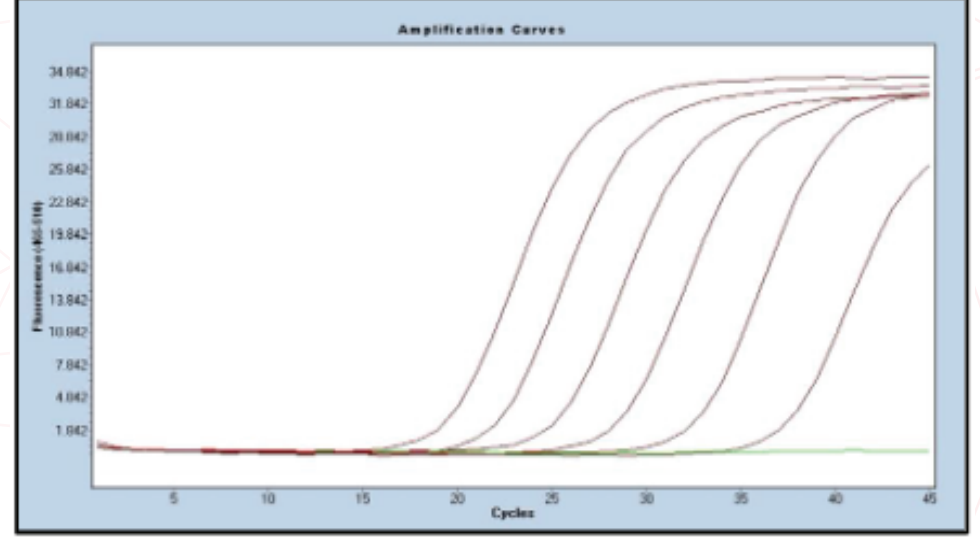


Şekil 1. qPCR Standart Eğri Grafiği

İkinci önemli konu, tekrarlanabilirliği de değerlendirebilmemiz için en az 3 kopya halinde çalışmak kesin sonuç elde etmek adına çok daha doğru olacaktır. Son bir dipnot ise her reaksiyonda saflıklarından emin olduğunuz DNA'yı pipetaj yapmak ve kontaminasyon problemini de ortadan kaldırmak için negatif kontrol kullanmayı unutmayın.

Standart Eğrinizi Analiz Etme

Bazı qPCR yazılımlarında standart eğriyi analiz etmek için uygulamalar bulunsa da birçok cihazda bu seçenek mevcut değildir. Eğrinizi analiz ederken hesaplamak ve değerlendiren dikkat etmeniz gereken birkaç madde vardır:



Şekil 2. Örnek Standart Eğri ve Ct Değerleri

PCR Verimliliği

DNA molekülünün her döngüde ikiye katladığını düşünürsek PR verimlilik aralığı %90 ile %110 arasında olmalıdır. Neden bu değer aralığını veriyoruz? Çünkü reaksiyonlar hiçbir zaman mükemmel değildir. Seyreltmeler nedeni ile bazı hatalar yapıldıysa verimlilik %100'ün üzerine çıkacaktır. %90'ın altındaki değerler için, inhibitör kontaminasyonuna veya düşük primer verimine sahip olduğunuz yorumunu yapabiliriz.

R² Değeri

R² değeri, korelasyon katsayısıdır ve korelasyon içinde iyi bir güven sağlamak için > 0,99 olmalıdır. Bu değer, her örneğin değerleri arasında iyi bir doğrusal ilişki olup olmadığını görmeyi sağlar. Düşük bir değer, zayıf bir seri seyreltmeyi gösterebilir. Bunu önlemek için, seri dilüsyonlarınızı yaparken iyi kalibre edilmiş pipetler kullanarak doğru şekilde pipetleme yaptığınızdan ve dilüsyonları iyice karıştırdığınızdan emin olun.

Cq Değerleri için Standart Sapma

Amplifikasyonu gerçekleştirmek, hataları azaltmaya yardımcı olur ve R² ve PCR verimlilik değerlerinizi daha güvenilir hale getirir. Ancak, tekrarlarınızda çok fazla değişkenlik varsa, bunların güvenilir değerler olduğundan söz edemeyiz. Kopyalarınızın ne kadar güvenilir olduğunu kontrol etmek için standart sapmayı (SD) hesaplayın. İyi kopyalar 0,2 SD birim içinde olmalıdır. Değillerse, standart eğrinizi yeniden yapmanız gerekebilir. qPCR standart eğrinizden güzel veriler alırsanız, primerlerin verimliliğinden memnun kalma yolundasınız demektir! Ancak standart eğri verileriniz çok iyi değilse ne olur? İşte size iki seçenek:

Ya Primerleriniz Verimli değilse?

qPCR standart eğri grafiğinin orantısız sonuçlanması şaşırtıcı bir şekilde sıklıkla olur; her DNA konsantrasyonu yaklaşık olarak aynı Ct değeriyle sonuçlanır. Bu, primerlerin hedefe verimli bir şekilde bağlanmadığı anlamına gelir.

Kötü Bir qPCR Standart Eğrisi Düşük DNA İfadesini Yansıtabilir

Kötü bir standart eğri, primerlerden kaynaklanmıyor olabilir. Numunenizde hedefiniz kötü ifade ediliyorsa standart eğriniz yanlış olabilir. Bu hedefin çalışmakta olduğunuz hücre tipinde ifade edilip edilmediğini doğrulamanız gerekir. Hedefiniz yetersiz ifade ediliyorsa, amplifikasyon için kullanılan DNA miktarını artırın. Ya da tam tersi... Bu, sonraki deneylerinizde kullanacağınız uygun DNA miktarını belirlemenize yardımcı olabilir. 1 ng'de iyi bir amplifikasyon elde etmek varken neden reaksiyon başına 10 ng kullanıyorsunuz? Bu şekilde çok değerli olan DNA örneklerinizi farklı qPCR çalışmalarınızda kullanabilirsiniz. qPCR standart eğri adımını atlamak çoğu zaman cazip gelebilir ama primer verimliliği ve DNA kalitesini değerlendirebilmek için bu adım uzun vadede iyi sonuçlar doğurabilir. Primerlerinizin verimli olmasını sağlamak için başlangıçta zaman ayırmak, uzun sürede çok zaman kazandırabilir ve nihayetinde daha iyi sonuçlara yol açabilir!

Referanslar

1. Korenkova V, et al. (2015) Pre-amplification in the context of high-throughput qPCR gene expression experiment. BMC Mol Biol. 16:5.
2. Van Peer G, Mestdagh P, Vandesompele J. (2012) Accurate RT-qPCR gene expression analysis on cell culture lysates. Sci Rep. 2:222.