

Cq Değeri Nedir?

Kantitatif PCR (qPCR) gerçekleştiriyorsanız, ct değerinin ne olduğunu bilmeniz ve anlamanız çok önemlidir. Bu ayki bültende ct değerinin qPCR'deki kritik rolünü, değişen isimlendirmelerini, nasıl hesaplandığını ve işler bazen ters gittiğinde neler olduğunu anlatacağız.

Tüm İsimlendirmeleri

Bir ct değeri yıllar içinde teknoloji geliştikçe ve değiştikçe aşağıda listelediklerimiz de dahil olmak üzere birçok isim verildiğini vurgulamak isteriz. Türkçeye çevrildiğinde anlamları biraz garipleşse de bu değerlerin hepsi aynıdır. qPCR terminolojisini standardize etmek amacıyla MIQE (Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yayınlanması için Asgari Bilgi kılavuzları) Cq değerinin kullanılmasını önerir.

Ct – (threshold cycle) eşik döngüsü

Cp – (crossing point) geçiş noktası

TOP – (take-off point) kalkış noktası

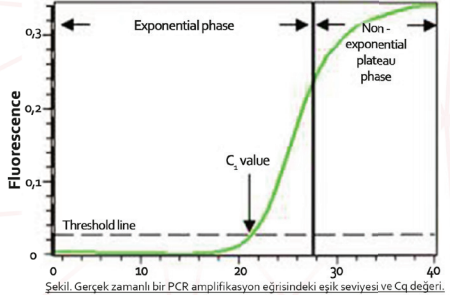
Cq – (quantification cycle) nicelme döngüsü

Nedir bu Cq Değeri?

Gerçek zamanlı PCR (qPCR) bir hedef dizinin mutlak miktarını ölçmek veya numuneler arasında bir hedef dizinin nispi miktarlarını karşılaştırmak için kullanılır. Bu teknik, hedef diziye bağlanan özel bir floresan sinyalinin amplifikasyonu ile gerçek zamanlı olarak izlenir. Floresan problemleri sekansa özgü olmasına rağmen çoğu qPCR deneyi esnasında arka plan floresanları da meydana gelebilir. Hedef sekans ile ilgili anlamlı bilgiler toplamak istiyorsak bu arka plan sinyallerini göz ardı etmek veya hesaba katabilmek çok önemlidir. Bu sorun qPCR'daki iki faktör ile ele alınır: Eşik çizgisi ve Cq değeri.

Eşik çizgisi; hedef sekansın tespit seviyesindeki bir floresan yoğunluğuna ulaştığı noktadır. Otomatik ya da manuel olarak hesaplanabilen, istatistiksel olarak anlamlı bir artışı yansıtan sinyaldir.

Cq değeri; numunenin reaksiyon eğrisinin eşik çizgisiyle kesiştiği PCR döngü sayısıdır. qPCR cihazının yazılımı, umunenin her biri için Cq değerini hesaplar ve çizelgeler. Cq başlangıç DNA kopya sayısını hesaplamak için kullanılır, çünkü Cq değeri hedefin başlangıç miktarı ile ters orantılıdır. Her döngü sonunda qPCR cihazınız floresan verilerini toplayacaktır ve ilk PCR döngüsünden yaklaşık 15 PCR döngüsüne kadar düz bir çizgi olarak gördüğünüz floresan sinyali, 15. döngüden sonra eşik çizgisinin üzerine çıkarak logaritmik olarak amplifikasyon göstermeye başlayacaktır.



Şekil. Gerçek zamanlı bir PCR amplifikasyon eğrisindeki eşik seviyesi ve Cq değeri.

Cq Değerini Etkileyen Faktörler

Bu değeri etkileyebilecek birçok faktör vardır.

- Floresans emisyonu, bir çözeltideki pH ve tuz konsantrasyonundan etkilenebilir. Bu nedenle yüksek kaliteli, son kullanım tarihleri geçmemiş ve uygun koşullarda saklanmış PCR bileşenleri kullandığınızdan emin olmalısınız.
- ROX gibi pasif referans boyalar kullanıyorsanız ROX'ın FAM boyasına olan oranı reaksiyon değerlerini belirleyecektir. Düşük ROX miktarı yüksek reaksiyon değeri üretir.
- PCR verimliliği; primerlerin özgüllüğüne, primer Tm sıcaklığına ve numunenin başlangıç konsantrasyonu ve saflığına bağlıdır. %90'ın üzerinde çıkan bir verimlilik PCR etkinliği için kabul edilebilir. Mükemmel bir PCR'ı 10 katlık dilüsyonlar arasındaki Cq farkının yaklaşık 3,3 döngüye denk gelmesiyle tespit edebiliriz.
- Yine korelasyon katsayısının (R^2) 1 olması PCR çalışmasının mükemmel olduğunu gösterir.
- Standart eğri çalışması yapılırken en az 4 noktayı 3 tekrarlı çalışmak en sağlıklı sonuçları almanızı sağlayacaktır.
- RNA/cDNA çalışmalarında alanın RNase kontaminasyonunu engellemek için sürekli steril tutmanız ve numuneleri dondur çöz yapmaktan kaçınınız.

Referanslar

- Bustin SA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009; 55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Schrader, et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. J Applied Microbiology. 113(5):1014-26. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x