

## استخدام تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز بالزمن الحقيقي Qrt-PCR لتقدير كمية التعبير الجيني لـ بروتين C-Flip

عدنان علي اسبر<sup>1</sup>، رشا مسعود<sup>2</sup>

1. طالب دكتوراه في قسم الهندسة الطبية جامعة دمشق

2. أستاذ في جامعة دمشق - قسم الهندسة الطبية

### الملخص

يعد التنبؤ بالسرطان من خلال بيانات التعبير الجيني مجالاً مهماً وصعباً للبحث في مجال البيولوجيا الحاسوبية والمعلوماتية الحيوية، هدفت هذه الدراسة إلى تقدير كمية الرنا المرسال في عينات نسيجية سرطانية وأخرى من عينات نسيجية سليمة وبالتالي قياس التعبير الجيني لـ بروتين C-FLIP كميًا في النسيج عن طريق تحري عدد المنتسخات transcripts، باستخدام تقنية qRT-PCR وذلك بغرض استخدامه في التشخيص والكشف المبكر عن الأمراض (سرطان القولون). وبحسب الأدبيات الطبية، توافق قيمة الأمثال fold التي تزيد عن 1.5 زيادة في التعبير الجيني overexpression، في حين أن نقصانها عن 0.7 يوافق انخفاض في التعبير.

حيث أظهرت نتائج هذه الدراسة زيادة في التعبير الجيني لبروتين C-FLIP لمجموعة العينات النسيجية السرطانية، فيما أظهرت بأن قيم التعبير الجيني لبروتين C-FLIP في العينات النسيجية السليمة تقع ضمن المجال (1.5 - 0.7). يمكن عد هذه النتيجة مؤشراً تنبؤياً يعطي الفرصة لإجراء دراسات مستقبلية على عدد أكبر من العينات ومقارنة النتائج مع دراسة ضمن عينات دموية لمرضى سرطان القولون والمستقيم.

**الكلمات المفتاحية:** بروتين C-FLIP، التعبير الجيني، تقنية qRT-PCR، سرطان القولون

تاريخ الإيداع: 2022/08/10

تاريخ الموافقة: 2022/11/20



حقوق النشر: جامعة دمشق

- سورية، يحتفظ المؤلفون

بحقوق النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

## Using real-time polymerase chain reaction (Qrt-PCR) to quantify C-Flip gene expression

Adnan Ali Asber<sup>1</sup>, Rasha massoud<sup>2</sup>

<sup>1</sup>PhD Student -Biomedical Engineering Department- Damascus University.

<sup>2</sup>Professor - Biomedical Engineering Department- Damascus University.

2022/08/10: Received

2022/11/20 Accepted:



Copyright:Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

### Abstract:

Cancer prediction from gene expression data is an important and challenging area of research in the field of computational biology and bioinformatics, This study aimed to estimate the amount of messenger RNA in cancerous tissue samples and others from healthy tissue samples, and thus quantitatively measure the gene expression of C-FLIP protein in the tissue by investigating the number of transcripts, using qRT-PCR technology, with the purpose of using it in diagnosis and early detection of diseases. (Colon Cancer). According to the medical literature, a fold value of more than 1.5 corresponds to an increase in gene overexpression, while a fold value of less than 0.7 corresponds to a decrease in expression. The results of this study showed an increase in the gene expression of C-FLIP protein for a group of cancerous tissue samples, while it showed that the gene expression values of C-FLIP protein in healthy tissue samples fall within the range (0.7-1.5). This result can be considered as a predictive indicator that gives the opportunity to conduct future studies on a larger number of samples and compare the results with a study within blood samples for colorectal cancer patients.

**Keyword:** C-FLIP, Gene Expression, Qrt-PCR Technology, Colon Cancer.

## 1. المقدمة: Introduction

في كثير من التجارب البحثية يحتاج الباحث لتقدير التعبير الجيني لجين معين او البحث عن الجينات التي قد زاد او قل تعبيرها، ويعتبر تقدير التعبير الجيني أداة اساسية لدراسة التأثير على الخلايا عند التعرض للمرضات او الادوية او المواد السامة او الهرمونات او الظروف الفيزيائية وغيرها (Khan *et al.*, 2001)، حيث تم في هذا البحث دراسة بروتين الـ C-FLIP الذي هو عبارة عن بروتين ينظم تفعيل الكاسازات 8 و 10، له 13 ثلاثة عشر متغير تضافري spliced variants، ثلاثة منها فقط يتم التعبير عنها كبروتين، ويعتبر واصم حيوي بالنسبة لسرطان القولون، وله علاقة بتفعيل الصفة الورمية (Ryu *et al.*, 2001)، وتشير الدراسات إلى أن الـ C-FLIP يثبط الموت المبرمج للخلايا وأن استهدافه قد يكون له إمكانات علاجية لسرطان القولون والمستقيم. تقسم هذه التجارب لقسمين رئيسيين وحسب التطبيق.

**القسم الاول:** هو كون الباحث لا يعرف اي الجينات قد تتأثر: هنا يحتاج الباحث لتقدير التعبير الجيني لكل الجينات الموجودة في الخلية ويمكن القيام بهذا النوع المعقد من الدراسات بعدة تقنيات منها:

1. 2D gel electrophoresis الترحيل الكهربائي ثنائي البعد متبوعاً بطريقة مناسبة للتشخيص مثل المطياف الكتلي mass spectrometry او غيرها (Alonn *et al.*, 1999).

2. Gene expression microarray بواسطة هذه التقنية الحديثة نسبياً يمكننا التنبؤ بالتغيرات في التعبير الجيني لكل الجينات الموجودة بالخلية. كما توفر في هذه التقنية مؤخراً قياس التعبير للاكسونات expression exons ويمكننا هذا الاخير بالإضافة لتغير كمية التعبير الجيني كذلك يمكننا من معرفة التغير الذي يحصل في تضفير الرنا المرسل mRNA splicing (Konishi *et al.*, 2012).

كلا الطريقتين مكلفة نسبياً ومعقدة من حيث الاجهزة المستعملة. ولكنها تؤدي للحصول على معلومات قيمة وأصيلة.

**القسم الثاني:** هو كون الباحث يريد تقدير التعبير الجيني لجين معين هنا يمكن استعمال عدة تقنيات منها:

تقنية الـ Real time PCR هنا يمكن قياس التعبير الجيني بدلالة كمية وتركيز الرنا المرسل الموجود بالخلية، وبالتالي قياس التعبير الجيني كميّاً في النسيج عن طريق تحريّ عدد المنتسحات transcripts، حيثُ يسمحُ بقياس كميات الحمض النوويّ إمّا بشكلٍ مطلقٍ لعدد النسخ أو وفق كميةٍ متوازيةٍ مع كميةٍ معلومةٍ من الحمض النوويّ المدخّل (Bustin *et al.*, 2009).

هناك العديد من الدراسات المرجعية التي تناولت الكشف المبكر عن سرطان القولون والمستقيم، ويمكن تصنيف هذه الدراسات إلى ثلاثة أقسام حسب البيانات المستخدمة لبناء نظام التنبؤ: فمنها ما استخدم بيانات وراثية مثل المصفوفة الميكروية أو تسلسل الـ DNA و هذا النوع من الدراسات يعتمد على طرق الذكاء الصناعي وتقنيات إيجاد الحل الأمثل في إيجاد الجينات المرتبطة بالمرض وانتقائها وطرق التصنيف المختلفة للتنبؤ، والمشكلة الأساسية التي تواجه هذا النوع من الدراسات هي أن عدد الجينات يكون أكبر من عدد العينات المدروسة (Khan *et al.*, 2001; Alonn *et al.*, 1999) ومنها ما استخدم عوامل الخطورة والبيانات السريرية لبناء نموذج قادر على التنبؤ باحتمال الإصابة بالمرض وحساب مؤشر ذو درجات لهذا الاحتمال وهناك العشرات من هذه النماذج، وتعتمد هذه النماذج على التحليل الخطي وإيجاد كثيرات حدود تحدد علاقة هذه العوامل مع بعضها وبدرجة الخطورة (Ma *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2012).

**القسم الثالث:** ويشمل أنظمة للتنبؤ تعتمد على نوعي البيانات معاً الوراثي مع السريري وهي دراسات كثيرة، حيث قام الباحث Byung - Kyu Ryu وزملائه في قسم علم الامراض (كلية الطب في جامعة كيونغ هي في كوريا الجنوبية)

في عام 2001 بدراسة زيادة التعبير الجيني لبروتين c-FLIP في نسيج القولون الغدية، حيث تم اخذ 52 عينة لسرطان قولون متباينة المراحل و15 من الأورام الحميدية الغدية، وتم دراسة مستويات التعبير الجيني لهذه العينات ومقارنتها مع الجينة الاستتبابية الثابتة التعبير، تم اجراء التحليلات الاحصائية وفق اختبار Wilcoxon test وتم استنتاج ان التعبير الجيني لبروتين C-FLIP مرتفع جدا في العينات السرطانية وبالتالي ان بروتين الـ C-FLIP هو واصم حيوي لسرطان القولون (Ryu et al., 2001). كما قام الباحث Wilson, T. R وزملائه في مركز أبحاث السرطان وبيولوجيا الخلية، جامعة كوينز بلفاست في أيرلندا الشمالية عام 2007 بدراسة حول التحقق من دور بروتين الـ C-FLIP في جدوى تنظيم خلايا سرطان القولون والمستقيم، والتحقق في الآليات التي من خلالها تمارس تأثيراتها. واستنتجوا أن الـ C-FLIP ينظم الموت المبرمج للخلايا بواسطة مستقبلات الموت في المختبر وفي الجسم الحي، وهو واصم حيوي لسرطان القولون والمستقيم (Wilson et al., 2007).

## 2. هدف البحث:

هو قياس مستوى التعبير الجيني لبروتين C-FLIP كميًا في النسيج المستأصل من القولون من اجل استخدامه في التشخيص والكشف المبكر عن سرطان القولون.

## 3. مواد وطرائق البحث: Materials and Methods

### 1. جمع العينات:

أجريت هذه الدراسة خلال الفترة الواقعة بين (شهر شباط 2017 وحتى كانون الاول 2017)، شملت 24 مريضاً من المقبولين في شعبة الجراحة العامة بمشفيي الأسد الجامعي والمواساة بدمشق، جرى الحصول على خزعتين مستقلتين من كل مريض، كانت الأولى من لب الورم (النطاق الإيجابي)، والثانية أقرب ما تكون إلى حواف القطع (النطاق الخالي). جرى اعتماد معايير الاشتمال inclusion Criteria التالية:

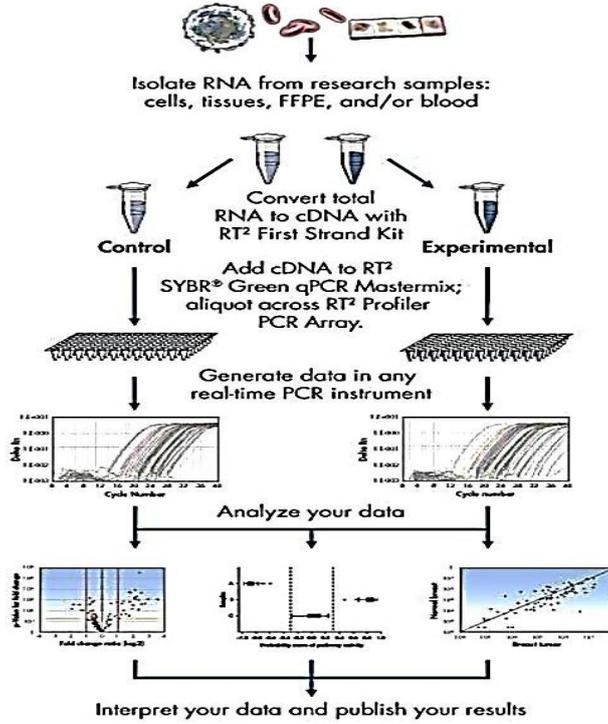
مرضى مشخصين بسرطانات غدية قولونية Adenocarcinoma وفق معايير التشخيص المتعارف عليها (إخضاع المريض لفحص المس الشرجي DRE، تنظير القولون Colonoscopy، تنظير القولون الافتراضي المحوسب)، تم الاستعانة بتقارير التشريح المرضي بغية تحديد درجة تطور الحالات الورمية، يلخص الجدول (1) بعض المتنبات الخاصة بالمرضى والورم.

الجدول (1) يعرض بعض البيانات الخاصة بالمرضى و الورم.

الدرجة	تاريخ العينة	رقم العينة	الدرجة	تاريخ العينة	رقم العينة
N	17/4/2017	13	N	19/2/1017	1
II	17/4/2017	14	III	19/2/1017	2
II	17/4/2017	15	II	19/2/1017	3
IV	4/5/2017	16	II	19/2/1017	4
II	9/5/2017	17	N	19/3/1017	5
III	9/5/2017	18	I	19/3/1017	6
II	4/5/2017	19	N	8/3/2017	7
N	4/5/2017	20	N	8/3/2017	8
N	4/5/2017	21	N	8/3/2017	9
N	11/5/2017	22	N	8/3/2017	10
N	11/5/2017	23	N	17/4/2017	11
N	11/5/2017	24	II	17/4/2017	12

## 2. الحفظ:

ألقيت العينات في وعاء Dewar المملوء بالآزوت السائل ذي الدرجة -197م، الذي سرعان ما يقوم بتثبيت أنزيمات الريبونكلياز، وتثبيت الفعالية البيولوجية للخلايا (الصعق). يبين الشكل (1) الخطوات العامة لتفاعل الـ qRT-PCR، مُقتبس من (Khan *et al.*, 2001).



الشكل (1) الخطوات العامة لتفاعل الـ qRT-PCR ، مُقتبس من [1].

## 3.4 عزل الرنا الكلي Total RNA Isolation

- عُرِلَ الرنا باستخدام العتيدة InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit المصنَّعة من قبل شركة STRATEC الألمانية وفق تعليمات الشركة الصانعة، تم تحويل RNA الى cDNA باستخدام أنزيم FIREPOL reverse transcriptase من شركة Solis Biodyne (Alonn *et al.*, 1999).
- وبما ان اي تفاعل qRT-PCR يحتاج الى مشارع (primer) كان لا بد من تصميم المشارع بالخطوات التالية (Konishi *et al.*, 2012):

1. ايجاد تسلسل جينة *C-FLIP* باستخدام قاعدة بيانات NCBI nucleotide BLAST .

2. يشترط في تضخيم التسلسل المنشود إنتقاء المشارع الصحيحة، لذلك تم أخذ بعض الاعتبارات بالحسبان، حيث تتماشى المنتاببات الترموديناميكية مع معايير تفاعل الـ PCR المتفق عليها، فكان متوسط طول المشارع المستعملة من 18- 30 أساس نكليوتيدي، بدرجة انصهار  $T_m$  (55-75) درجة مئوية، مع توزع متوازن للـ GC والـ AT، وفق محتوى GC ما بين 40- 60% (Alberts *et al.*, 2002)،

جرى العمل على التطبيق الحاسوبي primer3 بعد ايجاد تسلسل الجينة باستخدام قاعدة بيانات NCBI nucleotide BLAST وفقاً لما سبق، يبين الشكل (2) تسلسلات المشارع المعتمدة في تفاعل الـ qRT-PCR.

	Sequence (5'→3')	T <sub>M</sub>
c-FLIPL forward	CCTAGGAATCTGCCTGATAATCGA	55.6°
c-FLIPL Reverse	TGGGATATACCATGCATACTGAGATG	56.0°
c-FLIPS forward	GCAGCAATCCAAAAGAGTCTCA	53.7°
c-FLIPS Reverse	ATTTCCAAGAATTTTCAGATCAGGA	54.4°

الشكل (2) تسلسلات المزارع المعتمدة في تفاعل qRT-PCR

#### 4.4 انجاز تفاعل البلميراز التسلسلي بالزمن الحقيقي

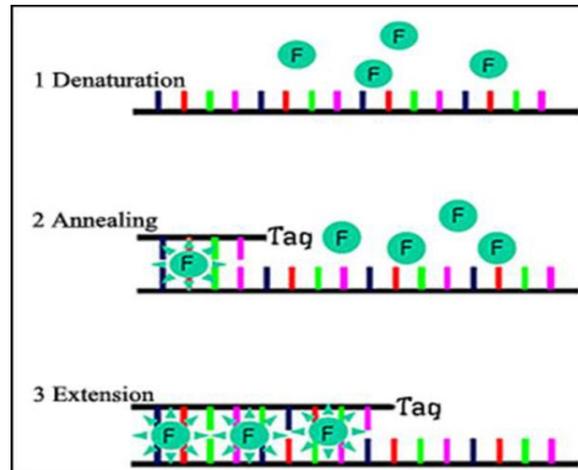
يكنُ جوهرُ تقنية الـ RT-PCR في التغيرات المتتابعة المضبوطة لدرجات الحرارة، فالدور الحراري Thermal Cycler الذي يحتضنُ التفاعل، يمتلكُ قدرةً محكمةً دقيقةً على تسخين العينات وتبريدها دورياً بشكلٍ سريعٍ بالاستفادة من الخصائص الفيزيوكيميائية للحموض النووية والبلميراز (Bustin *et al.*, 2009)، تتألف الدورة الواحدة من 3 مراحل:

1- مرحلة التفكيك الحراري Denaturation: يتم رفع درجة الحرارة إلى 95 درجة مئوية، في هذه المرحلة يحدث تمسخ او تحلل شريط الدنا بانفصاله الى شريطين مفردين اي يتحول من شريط مزدوج الى اشربة منفردة

2- مرحلة التحام البرايمرات Primers annealing: وهي المرحلة التي يتم فيها ارتباط الـ PRIMER كي يوفر طرف الهيدروكسيل ليتمكن انزيم الـ DNA polymerase من بناء شريط الدنا ويتم ذلك عن طريق تخفيض درجة الحرارة إلى 55 - 60 درجة مئوية.

3- مرحلة الاستطالة Extension: يتم فيها رفع درجة الحرارة إلى 68 - 72 درجة مئوية، وفي هذه المرحلة يبدأ انزيم الـ POLYMERASE بأضافة النيوكليوتيدات لبناء اشربة الدنا.

بالإضافة لطور حراري رابع في كل دورة (80) درجة مئوية يدوم بضع ثوان، يقاس خلاله ومضان الفلورة ، بغية الحد من الإشارة المحدثة بالـ primer-dimer (خاصة عند استخدام مشعر غير نوعي)، ويبين الشكل (3) هذه المراحل الثلاث التي تمثل دورة كاملة يتضاعف فيها الحمض النووي الأصل، وتعتمد كمية الناتج على عدد الدورات وفقاً لتابع أسي (من 25 - 50 دورة غالباً).



الشكل (3) مراحل الدورة الواحدة في تفاعل الـ PCR ، مُقتبس من [6]

يحسب عامل التضخيم بالعلاقة التالية:  $X = n(1+E)$

حيث  $X$  تمثل عدد دورات PCR، و  $E$  تمثل فعالية التضخيم، و  $n$  تمثل كمية الحمض النووي.

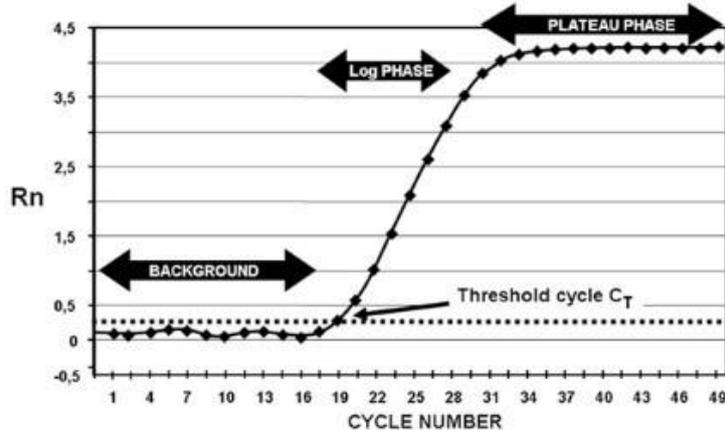
هنالك عدة متغيرات يعتمد تصميم التفاعل وضبط الجهاز عليها منها: انزيم البلمرة للدنا، تركيز كل من الشوارد ثنائية التكافؤ، والـ dNTPs في التفاعل، درجة الحرارة التي تلتصق وفقها البوداي، يبين الجدول (2) مكونات تفاعل الـ PCR والحجوم الموافقة (Khan et al., 2001).

تم العمل على جهاز الـ Mxpro 3005p المصنوع من قبل شركة STRATAGENE، وفقاً للبروتوكول التالي:

الجدول (2) مكونات تفاعل الـ PCR والحجوم الموافقة

1	cDNA 50 ng/μL	3μL
2	Master mix	μL 24
3	Primers For ward 400 nM Reverse 400 nM	μL 3
4	Taq Hot	μL 0.2
5	Syber Green	μL 0.15
	Total volume =	30 μL

نستطيع متابعة نتائج كل دورة من rtPCR من خلال استخدام صبغات متفلورة او Florescenc dyes هذه الصبغات تعطي توهج او تألق يتم تحسس التوهج الناتج من الصبغات المتألقة في كل دورة عن طريق حساس معين موجود في الجهاز (Mori et al., 2018)، ثم تترجم النتائج بشكل مخططات بيانية كما في الشكل التالي:



الشكل (4) بين الاطوار الثلاثة التي يمر بها تفاعل الـ rtPCR ، مُقتبس من [6]

يمثل محور  $X$  والخط الافقي يمثل عدد الدورات CYCLE NUMBER وتتراوح في الرسم ما بين الدورة الاولى الى الدورة التاسعة والاربعون ويمثل محور  $Y$  او المحور العامودي يمثل مقدار التوهج المنبعث من قبل الـ SYBER GREEN او الـ TAQ MAN ويمثل المنحني المرسوم مقدار التوهج المنبعث من كل دورة، يوضح الشكل (4) الاطوار الثلاثة التي يمر بها تفاعل الـ rtPCR ينقسم المخطط الى ثلاث اطوار:

#### ➤ الطور الأول: Background Phase

كما موضح بالرسم وهذا الطور يمثل بداية التفاعل او الدورات الاولى ويكون التوهج المنبعث في هذا الطور قليل جدا لان عدد اشربة الدنا المزدوجة ما يزال قليل جدا ومن المهم معرفة ان مقدار التوهج في هذه الحالة يكون قليل لدرجة انه لا يكون محسوس من قبل الحساس الضوئي، هناك مقدار معين من التوهج يسمى THRESHOLD كما موضح بالرسم او يسمى حد العتبة عندما يكون التوهج اقل من هذا الحد لا يكون محسوس من قبل الجهاز وهذا ما يحدث في

الطور الاول ويزيادة الدورات وزيادة عدد اشربة الدنا المزدوجة يزداد التوهج تدريجيا الى ان يصل حد العتبة فيبدأ الحساس الضوئي بتحسس كمية الضوء المنبعث حد العتبة او THRESHOLD موضح بالرسم بشكل خط متقطع (Dheda et al., 2005).

#### ➤ الطور الثاني: Log Phase

ما ان يصل الضوء المنبعث الى حد العتبة حتى يبدأ الطور الثاني ويستمر التوهج بالزيادة ويستمر المنحني بالصعود حتى نصل الى الطور الثالث.

#### ➤ الطور الثالث: Plateau Phase

يمثل هذا الطور طور الاشباع اي ان التوهج في هذه المرحلة يصل الى مرحلة الثبات اي انه لا يزداد اكثر مما هو عليه ونلاحظ ان المنحني في هذا الطور يأخذ الشكل المستقيم كما موضح بالرسم (يعود ذلك الى ان اي تفاعل rtPCR ينتهي بنهاية المواد التي تضاف لحدوث التفاعل وهي القواعد النتروجينية والبرامرات)، وما الى ذلك وعندما تستهلك جميع الكميات المضافة من هذه المواد يبدأ التفاعل بالانتهاء اي ان انزيم البوليميراز سوف يتوقف عن اضافة قواعد جديدة لعدم وجود القواعد اصلا وبالتالي سوف لن تتكون اشربة دنا جديدة فلا يزداد التوهج وهذه هي المرحلة الاخيرة من التفاعل والتي سوف يصل التوهج فيها الى مرحلة الاشباع ومن غير الممكن ان يزداد اكثر وهناك مصطلح مهم جدا يذكر دائما في مخطط rtPCR وهو ما يعرف بـ CT وتمثل الدورة التي يبدأ فيها كمية الضوء المنبعث بالوصول الى حد العتبة ويبدأ الحساس الضوئي بتحسسه ومن ملاحظة المخطط نستطيع معرفة قيمة Ct (Peirson et al., 2003).

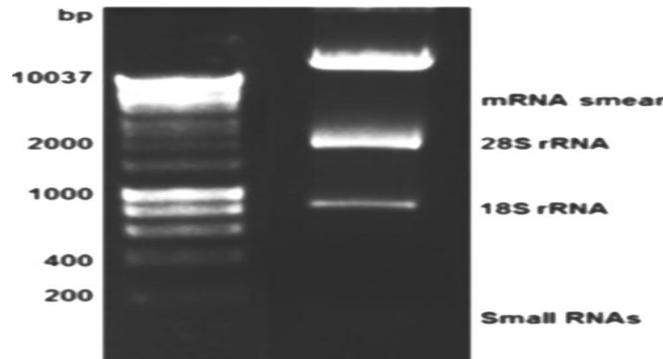
#### 5.4 الصبغات المتفلورة المستخدمة في Qrt-Pcr (Syber Green Dye)

تم استخدام هذه الصبغة المتفلورة لأنها تمتلك خصوصية لشريط الدنا المزدوج اي انها لا تستطيع الارتباط بشريط الدنا عندما يكون مفرد SINGLE STRAND واذا لم ترتبط بالدنا فأنها لا تعطي اي توهج، وترتبط به عندما يكون DOUBLE STRANDED فقط، وتبدأ بإعطاء التوهج نلاحظ انه بتقدم الدورات يزداد تألق هذه الصبغة أكثر فأكثر لان بتقدم الدورات تزداد عدد اشربة الدنا المزدوجة فيزداد التوهج.

#### 4. النتائج و المناقشة:

##### 1.5 نتائج استخلاص الحمض النووي RNA

- بينت نتائج استخلاص الحمض النووي RNA ان الحمض المستخلص كان بجودة عالية، حيث أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز الحزم التي تدل على ( 28S rRNA ، 18S rRNA ) لدى غالبية العينات بشكل اكثر وضوحاً على يمين الصورة وعلى اليسار يظهر الـ Markers كما في الشكل (5).



الشكل (5) يوضح الرنا المعزول عالي الجودة حيث العصابات 18S و 28S

- حدد تركيز الحمض النووي باستخدام جهاز الـ Nanodrop، كما هو موضح بالجدول (3).

الجدول (3) يبين تراكيز الرنا المعزول حسب جهاز الـ Nanodrop

رقم العينة	التركيز	رقم العينة	التركيز
1	1.45 مكغ   مك	13	0.61 مكغ   مك
2	0.97 مكغ   مك	14	1.42 مكغ   مك
3	0.63 مكغ   مك	15	1.69 مكغ   مك
4	0.42 مكغ   مك	16	1.39 مكغ   مك
5	2.06 مكغ   مك	17	1.06 مكغ   مك
6	1.17 مكغ   مك	18	1.22 مكغ   مك
7	1.88 مكغ   مك	19	1.01 مكغ   مك
8	0.83 مكغ   مك	20	1.28 مكغ   مك
9	0.49 مكغ   مك	21	1.61 مكغ   مك
10	1.60 مكغ   مك	22	1.38 مكغ   مك
11	1.28 مكغ   مك	23	0.31 مكغ   مك
12	1.86 مكغ   مك	24	0.49 مكغ   مك

### 2.5 منحنيات الـ qRT-PCR الناتجة

في البداية تم اختيار جملة مقارنة داخلية وهي غالباً تكون جينة استتبابيه ثابتة التعبير *Housekeeping gene* هي جينة  $\beta$ -actin حيث يتم التعبير عنها في جميع الخلايا ويكون مستوى تعبيرها ثابتاً طيلة حياة الخلية، بالتساوي بين النسيج المختلفة، تتيح هذه الطريقة معالجة النتائج و الحصول عليها وفق قيمة تقديرية لأمثال تعبير الجينة الهدف بالنسبة للجينة الشاهدة *calibrator*، ففي بعض الحالات ليس من الضروري تحديد العدد الصريح من المنتسخات، إنما تكفي مقارنة تغير تعبير الجينة المدروسة بين نسيجين بالنسبة للجينة مرجعية (Dheda *et al.*, 2005). تم إيجاد قيم Ct لمورثة الـ c-FLIP المدروسة، بالنسبة إلى الجينة المرجعية  $\beta$ -actin، بمقارنة كمية مدخلة متكافئة "equivalent amount" من الرنا بين نسيجين أحدهما سليم والآخر ورمي، على التوازي مع مكرّر تم أخذه من نفس النسيج (Dheda *et al.*, 2005)، ثم حساب الانحراف المعياري والمتوسط للعينة و المكرر، تعرف هذه الطريقة بـ Livak أو  $\Delta\Delta Ct$  method، وتتم عملية تحليل نتائج qRT-PCR بالطريقة التالية:

أولاً: نوجد قيمة Ct Value من المخطط البياني الخاص qRT-PCR والذي يظهر عادة على جهاز الكمبيوتر اثناء التفاعل لكل من الجين المراد دراسته والـ reference gene.

ثانياً: نحسب قيمة  $\Delta Ct$  وفق قاعدة Livak لكل من الخلية الطبيعية والخلية السرطانية وفق العلاقة :

$$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{reference}$$

ثالثاً: نحسب قيمة  $\Delta\Delta Ct$  من العلاقة التالية:

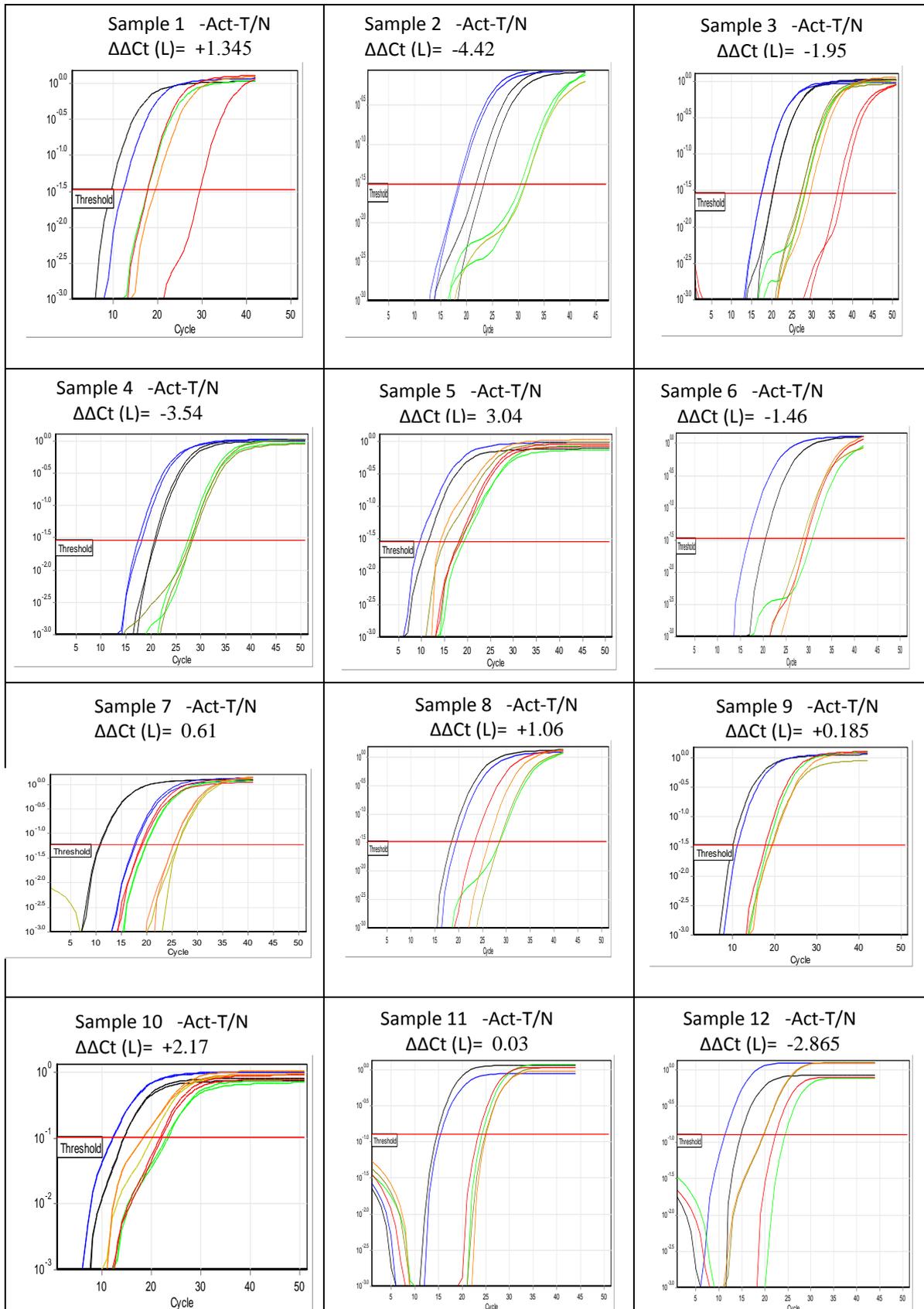
$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{reference})_{test} - (Ct_{target} - Ct_{reference})_{calibrator}$$

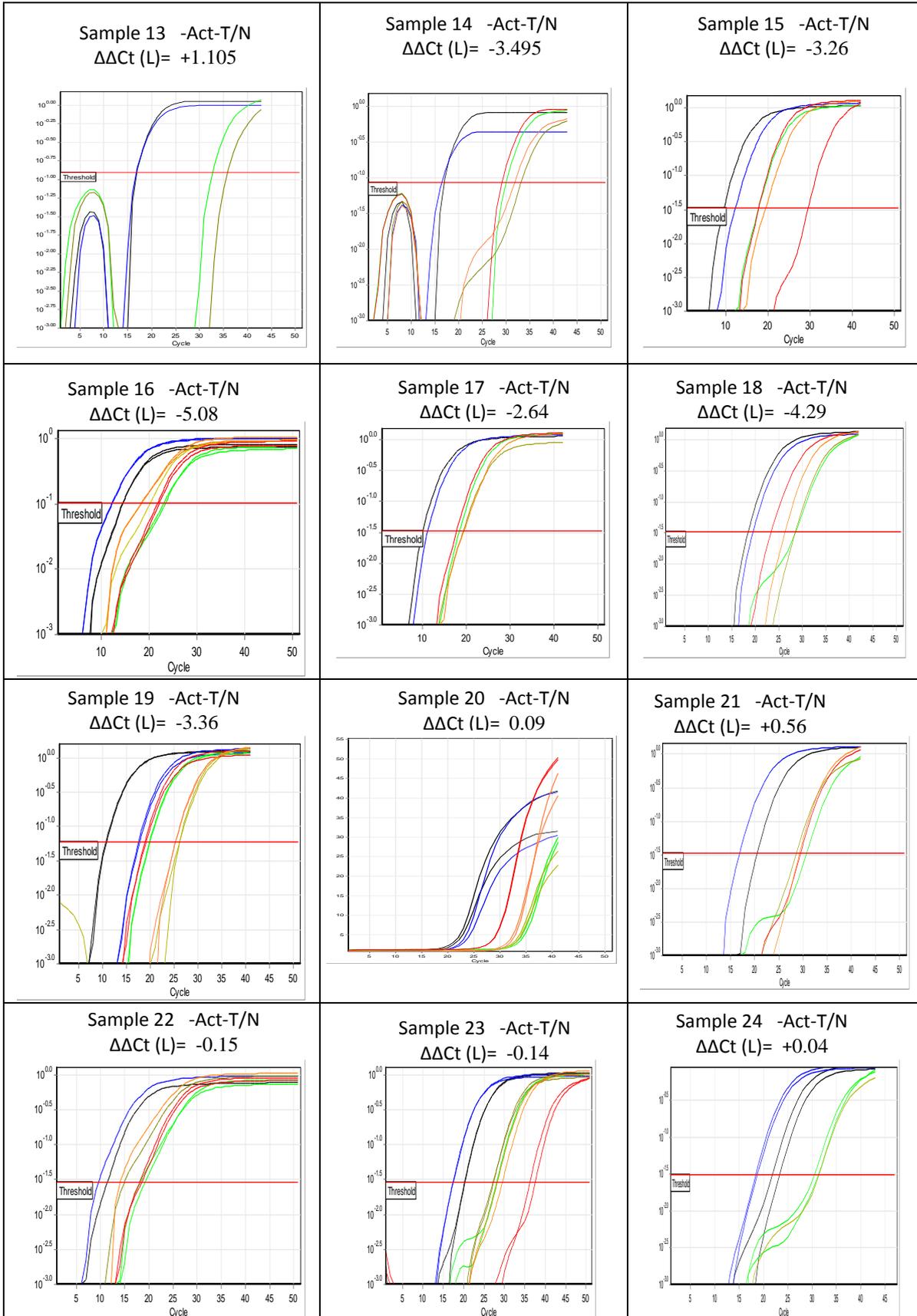
Calibrator هو شاهد مقارنة بالنسبة للمعاملة المدروسة، و target هي المورثة المدروسة، و reference (Housekeeping gene) هي مورثة المقارنة الداخلية للمورثة المدروسة.

رابعاً: نحسب قيمة  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  نجد هذه القيمة بأخذ رقم 2 ورفعها إلى أس سالب، والرقم الذي نحصل عليه يسمى fold difference in expression gene ويستخدم هذا الرقم في المقارنة بين العينة والكонтроل.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{normalized expression ratio} = \text{fold difference in expression}$$

نعرض في الشكل (6) منحنيات الـ qRT-PCR الناتجة عن تفاعل RT-PCR متبوعة بالعمليات الحسابية التي طبقت وفق معادلة Livak.





الشكل (6) يبين منحنيات الـ qRT-PCR الناتجة عن تفاعل RT-PCR

الالوان في المنحنيات السابقة تشير (اللون الاحمر يدل على الورم واللون الاخضر الحالة الطبيعية واللون الاسود الى الجينة المرجعية)، يبين الجدول (4) قيم التعبير الجيني لبروتين C-FLIP بعد اجراء العمليات الحسابية حسب معادلة Livak.

الجدول (4) يعرض العمليات الحسابية المطبقة وفق معادلة Livak على منحنيات الـ qRT-PCR

$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta\Delta Ct (T-N)$	$\Delta Ct (L-Act)$	Ct C-FLIP – L	Ct $\beta$ –actin	
0.393	1.345	8.008	17.745	9.74	Sample 1-T
0	0	6.66	18.955	12.295	Sample 1-N
21.406	-4.42	8.32	30.89	22.57	Sample 2-T
0	0	12.74	31.31	18.57	Sample 2-N
3.863	-1.95	7.84	27.87	20.03	Sample 3-T
0	0	9.79	26.99	17.2	Sample 3-N
11.63	-3.54	6.4	26.99	20.59	Sample 4-T
0	0	9.94	27.46	17.52	Sample 4-N
0.12	3.04	7.91	18.28	10.73	Sample 5-T
0	0	4.87	13.21	8.34	Sample 5-N
2.75	-1.46	8.65	29.57	20.92	Sample 6-T
0	0	10.11	28.29	18.18	Sample 6-N
0.655	0.61	9.15	19.81	10.66	Sample 7-T
0	0	8.54	26.07	17.53	Sample 7-N
0.32	1.06	10.35	28.82	18.47	Sample 8-T
0	0	9.29	28.73	19.44	Sample 8-N
0.277	0.185	8.35	18.58	10.23	Sample 9-T
0	0	8.165	19.44	11.275	Sample 9-N
0.22	2.17	8.72	23.22	14.5	Sample 10-T
0	0	6.55	18.78	12.23	Sample 10-N
0.979	0.03	9.5	24.14	14.64	Sample 11-T
0	0	9.47	24.84	15.37	Sample 11-N
7.285	-2.865	7.2	21.92	14.72	Sample 12-T
0	0	10.065	21.145	11.08	Sample 12-N
0.4649	1.105	16.805	32.2	15.395	Sample 13-T
	0	15.7	31.4	15.7	Sample 13-N
11.275	-3.495	15.675	33.075	17.4	Sample 14-T
	0	19.17	36.355	17.185	Sample 14-N
9.579	-3.26	13.5	29.84	16.69	Sample 15-T
	0	16.76	33.25	16.49	Sample 15-N
33.824	-5.08	13.75	30.76	17.01	Sample 16-T
	0	18.83	34.41	15.58	Sample 16-N
6.32	-2.64	12.56	28.65	16.1	Sample 17-T
	0	15.2	31.55	16.35	Sample 17-N
19.562	-4.29	10.93	27.8	16.87	Sample 18-T
	0	15.22	32.47	17.25	Sample 18-N
10.267	-3.36	9.35	26.64	17.29	Sample 19-T
	0	12.71	30.27	17.56	Sample 19-N
0.933	0.09	6.67	21.44	14.77	Sample 20-T
	0	6.58	24.67	11.5	Sample 20-N
0.678	0.56	7.08	25.11	18.03	Sample 21-T
	0	6.52	25.2	18.26	Sample 21-N
1.109	-0.15	6.98	22.87	15.89	Sample 22-T
	0	7.13	22.97	15.84	Sample 22-N
1.101	-0.14	8.76	21.51	12.75	Sample 23-T
	0	8.9	22.65	13.745	Sample 23-N
0.97	0.04	8.81	21.91	13.1	Sample 24-T
	0	8.77	21.26	12.485	Sample 24-N

### 3.5 علاقة قيمة CT بالتعبير الجيني:

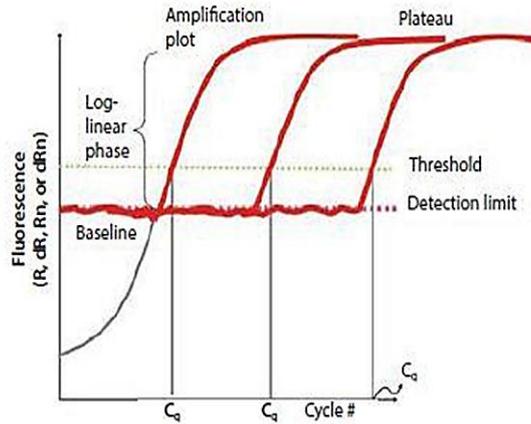
هناك تناسب عكسي بين مقدار التعبير الجيني وبين قيمة CT كلما قلت قيمة CT نستنتج ان مستوى التعبير الجيني عالي والعكس صحيح اي ان زيادة قيمة CT تدل على نقصان مستوى التعبير الجيني.

### 4.5 تفسير التناسب العكسي بين قيمة CT وبين مستوى التعبير الجيني

ان نقصان قيمة CT يعني ان الجهاز قد تحسس التوهج في الدورات الاولى وهذا يعني ان كمية mRNA المستخلصة من الخلايا كانت كمية كبيرة وهذا يعني وجود كميات كبير ايضا من cDNA وتحوله الى اشربة مزدوجة بسرعة اكبر وعندما يتحول الى شرائط مزدوجة بسرعة اكبر سوف يزداد مقدار التوهج المنبعث من الشرائط بسرعة فتزداد السرعة التي يتحسس فيها الجهاز ويظهر التحسس في الدورات الاولى والعكس صحيح في حالة زيادة قيمة CT الزيادة تعني هنا ان الجهاز قد تحسس التوهج في الدورات المتأخرة ذلك لان التعبير الجيني قليل ويعني هذا ان قيمة mRNA المستخلصة من الخلايا كانت قليلة جدا فيكون مقدار cDNA الناتج عنها قليلاً ايضاً فنحتاج الى دورات كثيرة لتكوين كميات اكبر من الدنا المزدوج كي يزداد التوهج ويصل الى حد العتبة.

اي كل ما زاد التعبير الجيني كل ما زادت كمية mRNA المتكونة والمستحصل عليها من الاستخلاص وكلما زاد mRNA كل ما زاد الـ cDNA المتكون منه وفي هذه الحالة تكون قيمة CT قليلة وهذا يعني زيادة التعبير الجيني للجين المراد دراسته.

تتم معالجة البيانات وفقاً لتابع يربط الفلورة وما يقابلها من عدد الدورات الحرارية على مقياس لوغاريتمي، حيث تظهر النتيجة على شكل قيمة رقمية تعرف بـ Ct (threshold cycle) وهي عدد الدورات التي تتجاوز فيها الفلورة العتبة المفترضة، كما هو موضح في الشكل (7).



الشكل (7) معالجة النتائج لوغاريتمياً وفقاً لقيم الفلورة، مقتبس من [6]

## 6. الاستنتاجات:

تمت في هذه الدراسة استخدام تقنية qRT-PCR في قياس كمية التعبير الجيني لبروتين C-FLIP في عينات نسيجية سرطانية وأخرى من عينات نسيجية سليمة، وذلك بهدف استخدامه للتشخيص والكشف المبكر عن سرطان القولون. وبحسب الأدبيات الطبية توافق قيمة الأمثال fold التي تزيد عن 1.5 زيادة في التعبير الجيني overexpression ، في حين أن نقصانها عن 0.7 يوافق انخفاض في التعبير (Ryu *et al.*, 2001). حيث أظهرت نتائج هذه الدراسة زيادة في التعبير الجيني لبروتين C-FLIP لمجموعة العينات النسيجية السرطانية، فيما أظهرت بأن قيم التعبير الجيني لبروتين C-FLIP في العينات النسيجية السليمة تقع ضمن المجال (0.7 – 1.5)، وكانت هذه الدراسة متوافقة مع الدراسات المرجعية السابقة (Ryu *et al.*, 2001) و (Wilson *et al.*, 2007)، بالتالي يمكن عد هذه النتيجة مؤشراً تنبؤياً يعطي الفرصة لإجراء دراسات مستقبلية على عدد أكبر من العينات ومقارنة النتائج مع دراسة ضمن عينات دموية لمرضى سرطان القولون والمستقيم.

## معلومات التمويل :

هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

## المراجع:

## المراجع الأجنبية:

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
2. Alon, U., Barkai, N., Notterman, D. A., Gish, K., Ybarra, S., Mack, D., & Levine, A. J. (1999). Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 6745-6750.
3. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.
4. Collins, G. S., & Altman, D. G. (2012). Identifying patients with undetected colorectal cancer: an independent validation of Qcancer (Colorectal). *British Journal of Cancer*, 107(2), 260-265.
5. Dhanasekaran, S., Doherty, T. M., Kenneth, J., & TB Trials Study Group. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of immunological methods*, 354(1-2), 34-39.
6. Dheda, K., Huggett, J. F., Chang, J. S., Kim, L. U., Bustin, S. A., Johnson, M. A., & Zumla, A. (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical biochemistry*, 344(1), 141-143.
7. Khan J, Wei JS, Ringnér M, et al (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nature medicine*, 7(6), 673-679
8. Konishi A, Yasukawa K, Inouye K (2012). "Improving the thermal stability of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase  $\alpha$ -subunit by site-directed mutagenesis". *Biotechnol. Lett.* 34 (7): 1209–15.
9. Ma, E., Sasazuki, S., Iwasaki, M., Sawada, N., Inoue, M., & Shoichiro Tsugane for the Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. (2010). 10-Year risk of colorectal cancer: development and validation of a prediction model in middle-aged Japanese men. *Cancer epidemiology*, 34(5), 534-541.
10. Mori Y, Kudo SE, Misawa M, et al. Real-time use of artificial intelligence in identification of diminutive polyps during colonoscopy: a prospective study. *Ann Intern Med* 2018;169:357–66
11. Peirson, S. N., Butler, J. N., & Foster, R. G. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic acids research*, 31(14), e73-e73.
12. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
13. Ryu, B. K., Lee, M. G., Chi, S. G., Kim, Y. W., & Park, J. H. (2001). Increased expression of cFLIPL in colonic adenocarcinoma. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 194(1), 15-19
14. Wilson, T. R., McLaughlin, K. M., McEwan, M., Sakai, H., Rogers, K. M., Redmond, K. M & Longley, D. B. (2007). c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death. *Cancer research*, 67(12), 5754-5762