آزمایشگاه گیاهپزشکی و بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه جیرفت **دستورالعمل کار با دستگاه اندازه‌گیری غلظت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ ۲۰۰۰**	**AG-PP-E-0003** **شماره بازنگری:** **تاریخ تنظیم و بازنگری: ۱۴۰۵/۰۷/۲۷** **تعداد صفحه: ۳**	وزارت علوم، تحقیقات و فناوری دانشگاه جیرفت

هدف: این دستور العمل نحوه اندازه‌گیری مقدار DNA در مقادیر میکرولیتری از نمونه‌های محلول را با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) شرح می‌دهد.

دامنه کاربرد: : اسپکتروفوتومتر نانودراپ ۲۰۰۰ قادر است طول موج‌های مشخصی از نور را از نمونه عبور داده و مقدار نور جذب شده توسط نمونه را اندازه‌گیری نماید. اسیدهای نوکلئیک مانند DNA نور را در طول موج ۲۶۰nm جذب می‌کنند. لذا دستگاه می‌تواند مقدار DNA یک نمونه را کمی سنجی نماید. این دستورالعمل، روش کار کلی با دستگاه نانودراپ ۲۰۰۰ و استفاده از آن را برای اندازه گیری غلظت DNA شرح می‌دهد.

مسئولیت:کارشناس آزمایشگاه در هنگام کار با دستگاه نانودراپ مسئولیت اجرای این دستورالعمل را به عهده دارد.

کارشناس: نسرین سیدی - کارشناس آزمایشگاه گیاهپزشکی و بیماری شناسی گیاهی

شماره تماس: ۴۳۲۱۳۰۰۰-۰۳۴ داخلی ۱۸۲- ۱۴۱ ایمیل: Seyyedeenasrin@ujiroft.ac.ir

ارائه خدمات: شنبه تا چهارشنبه ۰۷:۰۰ الی ۱۳:۰۰

مشخصات فنی دستگاه:

شرکت سازنده: Thermo Scientific, USA

مدل دستگاه: NanoDrop 2000

مفاد دستورالعمل:

۱- دستگاه را به برق متصل نموده و روشن نمائید.

۲- نرم افزار نانودراپ را با دو مرتبه کلیک روی آیکون آن در کامپیوتر مربوطه باز نمائید.

۳- در پنجره ظاهر شده، از میان کاربری‌های مختلف ارائه شده، گزینه اسیدهای نوکلئیک را انتخاب نموده و کلیک نمائید. اگر پنجره تائید طول موج باز شد، از بالا بودن بازوی دستگاه اطمینان حاصل نموده و دکمه "Ok" را کلیک نمائید.

۴- گزینه فایل "File" و سپس "New Workbook"را انتخاب نموده، نام دلخواه و مسیر دلخواه را برای فایل خود وارد نموده و گزینه "Save" را کلیک نمائید.

۵- از پنجره کشویی، نوع نمونه را انتخاب نمائید. پیش فرض دستگاه DNA دو رشته‌ای است.

۶- تیک گزینه ''Add to report'' را فعال نمائید تا داده‌های حاصل از اندازه‌گیری نمونه‌هایتان در گزارش حاضر گنجانده شود.

۷- اگر بیش از یک نمونه برای قرائت دارید و می‌خواهید نمودار طیفی همه آنها روی یک صفحه و گراف نمایش داده شود، گزینه ''Overlay spectra'' را تیک بزنید.

۸- بازوی بالایی دستگاه را بالا بیاورید و ۲µl از محلول شاهد (Blank) را روی جایگاه نمونه بازوی پائینی دستگاه قرار دهید.

۹- بازوی بالایی را به آرامی پائین بیاورید و گزینه Blank را در نرم افزار کلیک نمائید و اجازه دهید دستگاه به طور کامل نمونه Blank را ثبت نماید.

۱۰- بازو را بالا برده و نمونه شاهد را به طور کامل با دستمال کاغذی تمیز بدون پرز تمیز نمائید.

۱۱- در قسمت ''Sample ID'' برای نمونه خود یک نام یا کد شناسایی وارد نمائید. مقدار ۲µl از نمونه DNA همگن را روی جایگاه نمونه قرار دهید و بازوی بالا را به آرامی پائین بیاورید.

۱۲- گزینه Measurment را در نرم افزار کلیک نمائید.

۱۳- پس از کامل شدن اندازه گیری، بازوی دستگاه را بالا برده، محلول را از هر دو بازو با استفاده از دستمال تمیز بدون پرز تمیز نمایید.

۱۴- مراحل قرائت نمونه را برای نمونه‌های بعدی انجام دهید.

۱۵- داده‌ها را ذخیره نموده و با استفاده از گزینه ''File'' صفحه را ببندید و صفحه ''Home'' برگردید.

۱۶- پس از پایان کار دستگاه را به این صورت که بازوی دستگاه را بالا ببرید، µl ۵- ۳ آب دوبار تقطیر استریل را روی جایگاه نمونه بازوی پائین قرار دهید و بازوی بالایی دستگاه را پایین آورید. به مدت ۳-۲ دقیقه در همین وضعیت نگه داشته و سپس بازو را بالا آورده و آب را از روی هر دو بازو با استفاده از دستمال تمیز بدون پرز تمیز نمائید و بازوی دستگاه را پائین بیاورید، شستشو دهید.

محاسبات:

۱- نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰: نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰nm به طول موج ۲۸۰nm برای ارزیابی خلوص DNA و RNA استفاده می‌شود. اگر این نسبت در حدود ۱،۸ باشد، نمونه DNA از خلوص مطلوبی برخوردار است در حالی که مقدار این نسبت برای یک نمونه RNA دارای خلوص مطلوب حدود ۲ می‌باشد. اگر این نسبت در هر یک از این موارد کمتر از عدد ذکر شده باشد نشان دهنده وجود پروتئین فنل یا سایر آلودگی‌هایی است که در طول موج ۲۸۰nm جذب نوری بالایی دارند.

۲- نسبت ۲۶۰/۲۳۰: نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰nm به طول موج ۲۳۰nm به عنوان یک معیار ثانویه برای خلوص نمونه اسیدنوکلیئک به کار می‌رود. مقدار این نسبت برای نمونه خالص اسیدنوکلئیک اغلب

بیشتر از مقدار نسبت ۲۶۰/۲۸۰ متناظر آن است. مقدار مورد انتظار برای نسبت ۲۶۰/۲۳۰ معمولاً بین ۲ تا ۲,۲ است. اگر این نسبت کمتر از مقدار مورد انتظار باشد، نشان دهنده آلودگی‌هایی است که در طول موج ۲۳۰nm جذب نور دارند.

دانشگاه جیرفت