



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

تعیین خلوص و غلظت DNA توسط نانودراپ NanoDrop

اهداف

۱. معرفی دستگاه نانو دراپ ویژگی‌ها و کاربرد
۲. اندازه‌گیری خلوص و غلظت DNA
۳. تحلیل نتایج میزان جذب و ارزیابی خلوص DNA

مقدمه

DNA یکی از مولکول‌های اساسی در سلول‌ها است که اطلاعات ژنتیکی را منتقل می‌کند. در بسیاری از تحقیقات ژنتیکی و بیولوژیکی، استخراج DNA و سنجش غلظت و کیفیت آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. برای تعیین غلظت DNA، یکی از رایج‌ترین روش‌ها استفاده از طیف‌سنجی UV است که در آن جذب نور در طول موج‌های خاص اندازه‌گیری می‌شود.

دستگاه NanoDrop یک دستگاه طیف‌سنجی UV است که برای اندازه‌گیری غلظت و کیفیت نمونه‌های بیولوژیکی مانند DNA، RNA، پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های زیستی استفاده می‌شود. این دستگاه به ویژه برای اندازه‌گیری غلظت DNA و RNA در مقیاس‌های بسیار کوچک (چند میکرولیتر) طراحی شده است و به دلیل دقت بالا، راحتی استفاده و سرعت در نتایج، در بسیاری از آزمایشگاه‌ها کاربرد دارد.



تعیین غلظت DNA پس از استخراج

بررسی وجود DNA با استفاده از روش نانودراپ و اسپکتوفتومتری نانودراپ یکی از پیشرفتهایی که در زمینه دستگاههای اسپکتوفتومتری صورت گرفته، ساخت نانو دراپ می باشد. این دستگاه سرعت پردازش بالایی دارد و توانایی اندازه گیری طیف مرئی و UV را دارد و برای اندازه گیری، فقط به ۱ میکرولیتر از نمونه مورد نیاز است. بعلاوه در اندازه گیری به این روش به وسایل دیگری به جز سر میکروپیت نیازی نیست. نانودراپ همچنین برای اندازه گیری غلظت پروتئین و رنگ های فلورسنت بکار می رود.

اسپکتروفتومتر نانودراپ، NanoDropTM این دستگاه بدون نیاز به کووت و تنها با استفاده از ۱ الی ۲ میکرولیتر از نمونه قادر است در زمانی کمتر از ۱۰ ثانیه کلیه طول موج های موجود در طیف مورد نظر را با دقت ۱ نانومتر، اسکن نماید و غلظت یا جذب نوری ماده مورد نظر را نیز تعیین کند. با توجه به سرعت بسیار بالای دستگاه و میزان کم نمونه مصرفی، کاربران این دستگاه قادر خواهند بود ضمن صرفه جویی در زمان و هزینه، بسیاری از آزمایشات ژنومیکس، پروتئومیکس و بیوشیمی را کنترل کیفی و بهینه نمایند.

جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به تنهایی اطلاعات کمی را در زمینه خلوص و کیفیت نمونه فراهم می‌کند. در صورت وجود آلودگی پروتئینی، آلودگی به حلال‌های آلی و نمک‌ها و کربوهیدرات‌ها، میزان جذب به طور معنی‌داری تغییر می‌کند. بنابراین محاسبه نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ و نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ تعیین‌کننده خلوص اسیدهای نوکلئیک استخراجی می‌باشد.

- برای نمونه‌های RNA نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ برابر 1 ± 2 و برای نمونه‌ها DNA نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ برابر $1 \pm 1/8$ قابل قبول است. غلظت ۲۶۰ به ۲۸۰ پایین‌تر از ۸/۱ عموماً نشان‌دهنده آلودگی پروتئین در طی مراحل استخراج می‌باشد. یکی از مشکلات در استخراج DNA و RNA حذف ناکامل پروتئین‌ها از عصاره سلولی می‌باشد. پروتئین جذب در طول موج ۲۸۰ را افزایش می‌دهد، بنابراین نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ کاهش می‌یابد و خلوص آر. ان. ای از بین می‌رود. برای نمونه‌های DNA و RNA نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ باید بالاتر از ۲ و کمتر از ۴/۲ باشد. نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ پایین‌تر نشان‌دهنده آلودگی به پلی‌ساکاریدها می‌باشد. نسبت ۲۶۰ به ۲۴۰ برای اسیدهای نوکلئیک خاص باید حدود ۴/۱ باشد، این نسبت برای تعیین مقدار نمک‌ها به کار می‌رود. وقتی نسبت ۲۶۰ به ۲۴۰ کمتر از ۴/۱ باشد، اسیدهای نوکلئیک باید چند بار با اتانول ۷۰ درصد و در نهایت با اتانول ۹۵ درصد شستشو شوند.

ویژگی‌های دستگاه NanoDrop

۱. اندازه‌گیری نمونه‌های کوچک: NanoDrop قادر است بدون نیاز به رقیق‌سازی یا استفاده از کووت (کاسه‌های شیشه‌ای) برای اندازه‌گیری نمونه‌ها، مقادیر بسیار کم (معمولاً ۱-۲ میکرولیتر) از محلول را اندازه‌گیری کند.
۲. فناوری استفاده از نوار نوری: دستگاه NanoDrop از یک فناوری خاص به نام nanosample استفاده می‌کند که نمونه به طور مستقیم بین دو لایه شیشه‌ای قرار می‌گیرد و بدون نیاز به ابزار اضافی اندازه‌گیری انجام می‌شود.
۳. دقت بالا: این دستگاه قادر است جذب در طول موج‌های مختلف (۲۶۰ نانومتر برای DNA، RNA، ۲۸۰ نانومتر برای پروتئین‌ها و ۲۳۰ نانومتر برای آلودگی‌های ارگانیک) اندازه‌گیری کرده و به طور خودکار غلظت نمونه را محاسبه کند.
۴. سرعت بالا: دستگاه به سرعت قادر به ارائه نتایج می‌باشد، که این ویژگی برای آزمایشگاه‌هایی که نیاز به اندازه‌گیری‌های سریع دارند، بسیار مفید است.
۵. کاربرد گسترده: کاربرد در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی از جمله بیولوژی مولکولی، ژنتیک، بیوشیمی و زیست‌شناسی سلولی.

کاربردها

۱. اندازه‌گیری غلظت DNA/RNA:

یکی از کاربردهای اصلی دستگاه NanoDrop، اندازه‌گیری غلظت DNA و RNA است. برای تعیین غلظت DNA، این دستگاه جذب محلول را در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری کرده و سپس غلظت را محاسبه می‌کند.

۲. تعیین خلوص DNA/RNA:

با استفاده از نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر، می‌توان خلوص DNA یا RNA را ارزیابی کرد. نسبت ۲۶۰/۲۸۰ باید در حدود ۱.۸ تا ۲.۰ باشد تا نشان‌دهنده خلوص بالا باشد. نسبت‌های پایین‌تر ممکن است به وجود آلودگی با پروتئین‌ها یا مواد دیگر اشاره کنند.

۳. اندازه‌گیری پروتئین‌ها:

دستگاه NanoDrop همچنین برای اندازه‌گیری پروتئین‌ها کاربرد دارد. جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر برای تعیین غلظت پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش در بررسی نمونه‌های پروتئینی، به‌ویژه در تحقیقات زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، بسیار مفید است.



۴. آلودگی‌ها و مواد دیگر:

همچنین این دستگاه می‌تواند برای بررسی آلودگی‌های ارگانیک مانند فنول‌ها و سایر مواد شیمیایی در محلول‌های زیستی (با استفاده از نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰) مفید باشد.

۵. آنالیز نمونه‌های بیولوژیکی:

دستگاه NanoDrop در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و پزشکی برای آنالیز نمونه‌های بیولوژیکی مانند خون، بافت‌های حیوانی و گیاهی، و سایر نمونه‌ها که نیاز به اندازه‌گیری دقیق غلظت و کیفیت دارند، استفاده می‌شود.

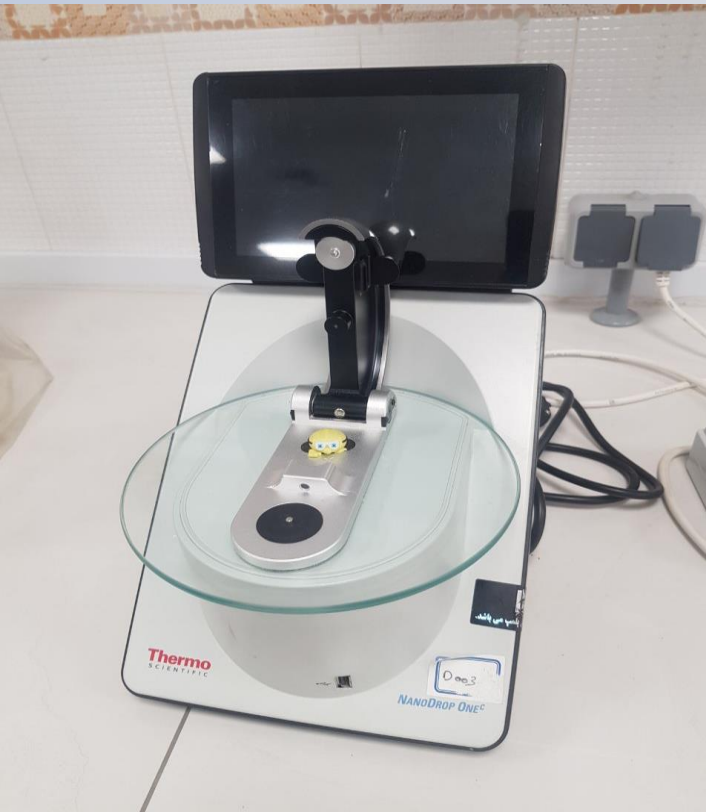


وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



مواد و وسایل تجهیزات مورد نیاز:

- نمونه زیستی (خون، بافت گیاهی یا حیوانی)
- معرف استخراج DNA (مانند کیت استخراج DNA)
- بافر (PBS یا بافر TE)
- دستگاه طیف‌سنج UV-Vis (مثلاً دستگاه NanoDrop)
- لوله‌های آزمایش (برای محلول‌های DNA)
- پیت و نوک پیت
- وسترن یا کیت برای تهیه استاندارد DNA
- شیشه‌های پتری و لوازم جانبی
- دستگاه سانتریفیوژ
- بن‌ماری
- هود میکروبیولوژی (در صورت نیاز)
- یخچال (برای نگهداری نمونه‌ها)



روش کار



روش کار

استخراج DNA به طور کلی از یک کیت استخراج DNA استفاده می‌شود. مراحل شامل شکستن غشاء سلولی، جداسازی DNA و رسوب آن با استفاده از اتانول است. پس از استخراج، DNA را در بافر TE یا PBS حل کنید.

تهیه محلول DNA



کیفیت DNA استخراج شده با نانو دراپ بررسی می شود

برای اندازه‌گیری دقیق غلظت DNA، ابتدا باید محلول DNA را به درستی آماده کنید. مراحل:

۱. انتقال DNA به لوله آزمایش:
مقداری از DNA استخراج‌شده (مثلاً ۵ میکرولیتر) را با دقت به لوله آزمایش منتقل کنید. اگر حجم محلول DNA زیاد باشد، می‌توانید حجم مورد نیاز را با استفاده از پیپت دقیق انتخاب کنید.

۲. تنظیم حجم محلول:

محلول DNA باید به حجم معینی با استفاده از بافر TE یا PBS تنظیم شود. به عنوان مثال، برای داشتن یک حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر، باید به ۵ میکرولیتر DNA، ۹۵ میکرولیتر بافر اضافه کنید. این کار کمک می‌کند تا غلظت نهایی DNA برای اندازه‌گیری به مقدار صحیح برسد.

۳. مخلوط کردن محلول:

محلول را به آرامی با استفاده از پیپت هم بزنید تا DNA به طور یکنواخت در محلول حل شود.

۴. حفظ نمونه:

برای جلوگیری از تجزیه DNA، بهتر است محلول را در دمای یخچال نگهداری کنید. به هیچ عنوان DNA را در دمای اتاق برای مدت طولانی نگهداری نکنید.

اندازه‌گیری غلظت DNA:

در این مرحله، از دستگاه طیف‌سنج UV برای اندازه‌گیری غلظت و خلوص DNA استفاده می‌شود.

مراحل:

۱. کالیبراسیون دستگاه طیف‌سنج:

دستگاه NanoDrop باید قبل از استفاده کالیبره شود. ابتدا دستگاه را روشن کنید و آن را با استفاده از یک بافر یا آب مقطر (که هیچ آلودگی نداشته باشد) کالیبره کنید. برای این کار، مقدار ۱-۲ میکرولیتر از بافر یا آب مقطر را روی صفحه شیشه‌ای دستگاه قرار دهید و خوانش صفر را ثبت کنید.

۲. قرار دادن نمونه:

۱-۲ میکرولیتر از محلول DNA آماده‌شده را روی سطح شیشه‌ای دستگاه NanoDrop قرار دهید. برای این کار از پپیت دقیق استفاده کنید تا نمونه به اندازه کافی روی سطح شیشه قرار گیرد و دستگاه بتواند به درستی جذب نور را اندازه‌گیری کند.

شروع اندازه‌گیری:

دستگاه به طور خودکار جذب محلول DNA را در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌کند. این مقادیر به طور همزمان در نرم‌افزار نمایش داده می‌شوند.

خواندن نتایج:

غلظت DNA: از مقدار جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر برای محاسبه غلظت DNA استفاده می‌شود. دستگاه به طور خودکار این محاسبه را انجام می‌دهد و نتیجه را به صورت نانوگرم بر میکرولیتر (ng/μL) نمایش می‌دهد.

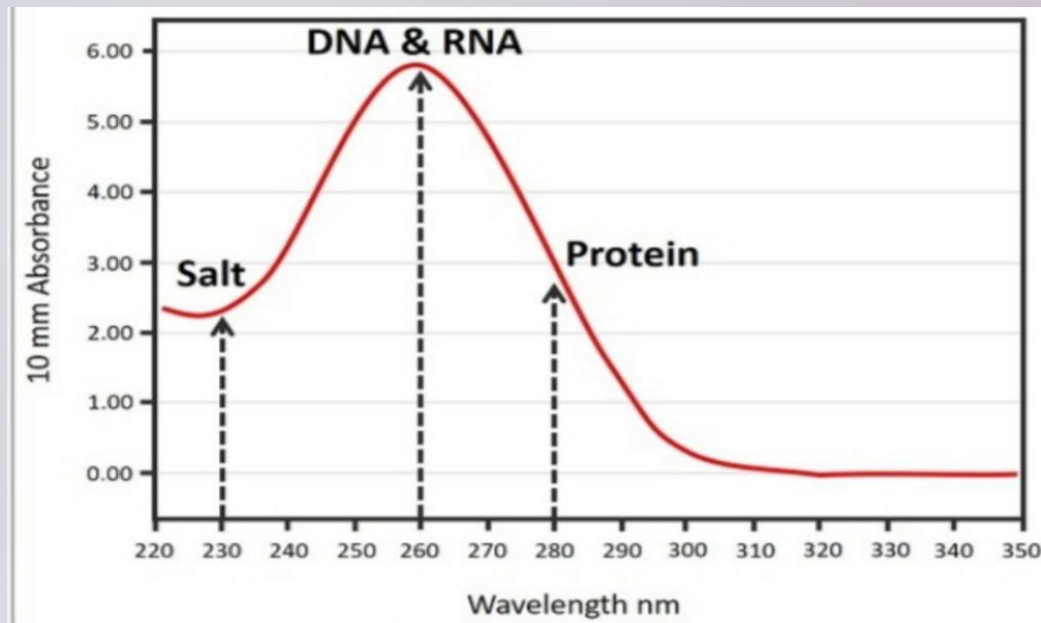
خلوص DNA: نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر (۲۶۰/۲۸۰) برای ارزیابی خلوص DNA استفاده می‌شود. یک نسبت مناسب معمولاً بین ۱.۸ و ۲.۰ است. این عدد نشان‌دهنده این است که DNA به طور عمده خالص است و هیچ آلودگی پروتئینی (که جذب در ۲۸۰ نانومتر دارد) یا سایر مواد آلی (که جذب در ۲۳۰ نانومتر دارند) وجود ندارد.

نسبت ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر نیز برای شناسایی آلودگی‌های ارگانیکی (مانند فنول‌ها) استفاده می‌شود. یک نسبت مناسب برای این پارامتر معمولاً بالاتر از ۱.۸ است.

مستندسازی نتایج:

تمام داده‌های اندازه‌گیری شده (غلظت DNA و نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰) را ثبت کرده و در گزارش آزمایش ذکر کنید.

با این روش، شما می‌توانید غلظت و خلوص DNA استخراج‌شده را به طور دقیق اندازه‌گیری کرده و آن را برای مراحل بعدی تحقیقاتی (مانند PCR یا sequencing توالی‌یابی) آماده کنید.



مقایسه با روش اسپکتروفتومتری

از روش دیگری نیز برای تعیین غلظت اسیدهای نوکلئیک استخراج شده استفاده می‌گردد و آن گرفتن جذب نوری نمونه‌ها در اسپکتروفتومتری است. در این روش بر اساس مقدار جذب نوری در طول موج‌های خاصی از اشعه گاما می‌توان مقدار دقیق DNA یا RNA و درصد خلوص آن‌ها را در نمونه تعیین کرد. از این روش به طور متداول برای تعیین خلوص و مقدار اسید نوکلئیک در نمونه‌ها استفاده می‌شود. اسیدهای نوکلئیک با ترکیبی از ۴ نوکلئوتید، عمدتاً نور فرابنفش با طول موج ۲۶۰ نانومتر را جذب می‌کنند. پروتئین‌ها که متداول‌ترین آلوده کننده‌ی اضافی در نمونه‌های DNA و RNA می‌باشند، نور فرابنفش را در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر را جذب می‌کنند. زنجیره‌های پلی‌پپتیدی که معمولاً دارای ۳ اسیدآمینو حلقوی باشند طول موج ۲۸۰ نانومتر را جذب می‌کنند. اما برخی دیگر از پروتئین‌ها چون هیستون‌ها و یا پروتئین‌ها که فاقد و یا دارای تعداد اندکی از اسیدآمینو حلقوی می‌باشند در طول موج ۲۸۰ نانومتر فاقد و یا دارای حداقل جذب نوری می‌باشند. نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بایستی در دامنه ۲ – ۸/۱ باشد تا بیانگر کیفیت مناسب DNA باشد. نسبت‌های بالاتر از ۲ بیانگر آلودگی RNA و نسبت‌های زیر ۸/۱ بیانگر آلودگی پروتئینی می‌باشد. که هر یک واحد جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر متناظر است با حدود ۵۰ نانوگرم در یک سی‌سی از DNA دو رشته‌ای در یک کویت، لذا از فرمول زیر می‌توان برای تعیین غلظت DNA استفاده نمود.

ضریب رقت $\times 50$ نانو گرم بر میلی‌لیتر $\times OD_{260} =$ DNA (نانوگرم بر میکرولیتر)