



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

عنوان

تعیین کمیت و غلظت DNA به روش طیف سنجی نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر



اهداف

1. ارزیابی خلوص و کمیت DNA
2. تعیین غلظت DNA

بررسی وجود DNA با استفاده از اسپکتروفتومتری

DNA مولکولی است که اطلاعات ژنتیکی را در موجودات زنده ذخیره می‌کند. برای بررسی و استفاده از DNA استخراج شده در آزمایش‌های بعدی مانند PCR یا توالی‌یابی، ضروری است که غلظت و خلوص آن به دقت اندازه‌گیری شود. یکی از روش‌های رایج برای این کار، استفاده از اسپکتروفتومتر و اندازه‌گیری جذب در طول موج مشخص ۲۶۰ نانومتر برای DNA است.

به منظور ارزیابی کمیت DNA و آگاهی از میزان غلظت و خلوص آن به روش اسپکتروفتومتری بصورت ساده و دقیق، میزان جذب اشعه UV توسط بازهای الی DNA اندازه‌گیری می‌شود. مولکول‌های DNA به علت حضور بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین دارای جذب نوری در محدوده ماوراء بنفش می‌باشند. بنابراین اندازه‌گیری جذب نوری مولکول‌های DNA شاخص خوبی برای تعیین درجه خلوص آن می‌باشد.

حداکثر جذب مولکول DNA در طول موج ۲۶۰ nm است. از طرفی معمولاً محلول‌های DNA مقداری آلودگی پروتئینی دارند که حداکثر جذب محلول‌های پروتئینی نیز به علت حضور اسیدهایمانند تریپتوفان، فنل، تیروزین و آلانین در طول موج ۲۸۰ nm می‌باشد. بنابراین نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ معیار مناسبی برای تعیین نسبت Protein/DNA در یک نمونه و به عبارتی درجه خلوص خواهد بود.

وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



مواد و وسایل مورد نیاز

- نمونه زیستی (خون، بافت گیاهی یا حیوانی)
- معرف استخراج DNA (مانند کیت استخراج DNA)
- بافر (بافر TE)
- اسپکتروفتومتر (برای اندازه‌گیری جذب)
- لوله‌های آزمایش
- پیت و نوک پیت
- محلول‌های استاندارد DNA برای کالیبراسیون
- شیشه‌های پتری و لوازم جانبی



تجهیزات مورد نیاز

- دستگاه سانتیفریوژ
- اسپکتروفتومتر UV
- بن‌ماری
- یخچال (برای نگهداری نمونه‌ها)
- لوله‌های کووت برای اسپکتروفتومتر

روش کار



روش کار

استخراج DNA

از یک کیت استخراج DNA استاندارد استفاده کنید. پس از استخراج، DNA را در بافر TE حل کنید.

تهیه محلول DNA

برای اندازه‌گیری دقیق غلظت DNA، باید محلول DNA به درستی آماده شود.

۱. انتقال DNA به لوله آزمایش: مقدار مورد نیاز از محلول DNA استخراج‌شده (معمولاً ۱۰ میکرولیتر) را با دقت به لوله آزمایش منتقل کنید.

۲. تنظیم حجم محلول: حجم محلول DNA را با استفاده از بافر TE به حجم معینی (مثلاً ۱۰۰ میکرولیتر) تنظیم کنید.

۳. مخلوط کردن : محلول را با استفاده از پیپت به آرامی هم بزنید تا DNA به طور یکنواخت حل شود.

۴. حفظ نمونه: برای جلوگیری از تجزیه DNA، محلول را در یخچال نگهداری کنید.

اندازه‌گیری غلظت DNA

در این مرحله، از اسپکتروفوتومتر برای اندازه‌گیری غلظت DNA و بررسی خلوص آن استفاده می‌شود.

1. کالیبراسیون دستگاه اسپکتروفوتومتر: دستگاه اسپکتروفوتومتر را روشن کرده و با استفاده از یک بافر TE دستگاه را کالیبره کنید.

2. ۱ میلی‌لیتر بافر را در لوله کووت ریخته کالیبراسیون را انجام دهید.

۲. قرار دادن نمونه در اسپکتروفوتومتر: یک میلی‌لیتر از محلول DNA آماده‌شده را در لوله کووت قرار دهید و لوله را در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار دهید.

۳. انتخاب طول موج‌ها: دستگاه اسپکتروفوتومتر را روی طول موج ۲۶۰ نانومتر تنظیم کنید، زیرا این طول موج مربوط به جذب DNA است. همچنین طول موج ۲۸۰ نانومتر برای بررسی آلودگی پروتئینی و ۲۳۰ نانومتر برای بررسی آلودگی‌های ارگانیک اندازه‌گیری می‌باشد.

دستگاه جذب نمونه را در طول موج‌های مختلف (۲۶۰ نانومتر، ۲۸۰ نانومتر و ۲۳۰ نانومتر) اندازه‌گیری کرده و نتایج را نمایش می‌دهد.

تمامی داده‌ها، شامل غلظت DNA و نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰، را ثبت کنید.

خواندن نتایج

غلظت DNA : از جذب ۲۶۰ نانومتر برای محاسبه غلظت DNA استفاده می‌شود. دستگاه نتیجه غلظت را به صورت نانوگرم بر میکرولیتر ($\text{ng}/\mu\text{L}$) گزارش می‌کند.

خلوص DNA: برای بررسی خلوص، نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ اندازه‌گیری و گزارش می‌شود.

تحلیل و تفسیر نتایج

۱. غلظت DNA: میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به طور مستقیم به غلظت DNA بستگی دارد. از فرمول زیر برای محاسبه غلظت DNA براساس قانون بیر لامبرت استفاده می‌شود. هر واحد OD260، یا جذب (A) معادل با ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر dsDNA یا دی ان ای دو رشته‌ای است که یک ضریب استاندارد می باشد. بنابرین:

غلظت $\text{dsDNA (ng/}\mu\text{L)} = 260 \text{ نانومتر} \times 50 \text{ (ضریب استاندارد)}$
که دستگاه محاسبه کرده و به طور اتوماتیک نمایش می دهد.

این فرمول به طور دقیق در تحلیل نتایج آزمایش برای محاسبه غلظت DNA استفاده می‌شود. فاکتور رقت نیز باید در نتایج نهایی ضرب شود.

۲. کمیت یا خلوص DNA : نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای ارزیابی میزان آلودگی پروتئینی استفاده می‌شود.

یک نسبت مناسب معمولاً بین ۱/۸ تا ۲/۱۰ است که نشان دهنده DNA خالص است. اگر این نسبت کمتر از ۱/۸ باشد، نشان دهنده آلودگی پروتئینی است و بیشتر از ۲/۱۰ نشان دهنده آلودگی دی ان ای با RNA است.

$A < 1/8$ جذب یعنی غلظت پروتئین بالا است.

$A > 2/10$ جذب یعنی غلظت RNA بالا است.

۳. آلودگی به مواد دیگر: نسبت جذب $260/230$ نانومتر برای شناسایی آلودگی‌های ارگانیک مانند فنول‌ها و سایر مواد شیمیایی استفاده می‌شود. نسبت مناسب برای این پارامتر معمولاً بالاتر از $1/8$ است.

با نتایج بدست آمده غلظت و خلوص DNA استخراج‌شده با دقت اندازه‌گیری و برای مراحل بعدی تحقیقاتی آماده می‌شود.