

بسم الله الرحمن الرحيم



- نام استاد : دکتر شریفی زاده
 - نام نام خانوادگی : لیلا عبدالهی _ سونیا تاجیک
 - مشخصات ساعت کلاس : آزمایشگاه ژنتیک مولکولی
- ساعت ۷:۳۰ - ۹
- عنوان آزمایش
1. الکتروفورز DNA با استفاده از ژل آگارز
 2. اندازه گیری غلظت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ
 3. واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR

عنوان آزمایش: الکتروفورز DNA با استفاده از ژل آگارز

هدف: الکتروفورز DNA با استفاده از ژل آگارز

- هدف: جداسازی مولکولهای DNA بر اساس اندازه و بار الکتریکی با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز.

- مقدمه: الکتروفورز یکی از تکنیک‌های مهم در

زیست‌شناسی مولکولی است که به جداسازی و تحلیل

مولکول‌های باردار مانند DNA، RNA و پروتئین‌ها کمک

می‌کند. این تکنیک بر پایه حرکت مولکول‌ها در یک میدان

الکتریکی و عبور آنها از یک ژل نیمه جامد (ژل آگارز)

استوار است. مولکول‌های با بار منفی (مانند DNA) به

سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند و بر اساس اندازه و

جرم خود از یکدیگر تفکیک می‌شوند.

- تئوری آزمایش:

ماتریکس ژل آگارز دارای منافذی است که عبور مولکول‌ها

را امکان‌پذیر می‌کند. با برقراری جریان الکتریکی، DNA به

سمت آند حرکت می‌کند. مولکول‌های کوچکتر سریع‌تر

حرکت کرده و در نتیجه در فاصله دورتری از چاهک قرار

می‌گیرند. استفاده از بافرهایی مانند TBE به حفظ pH و

تسهیل عبور جریان کمک می‌کند.

- مواد و وسایل مورد نیاز

تانک الکتروفورز - دستگاه ژل داک (Doc Gel) - (پودر آگارز

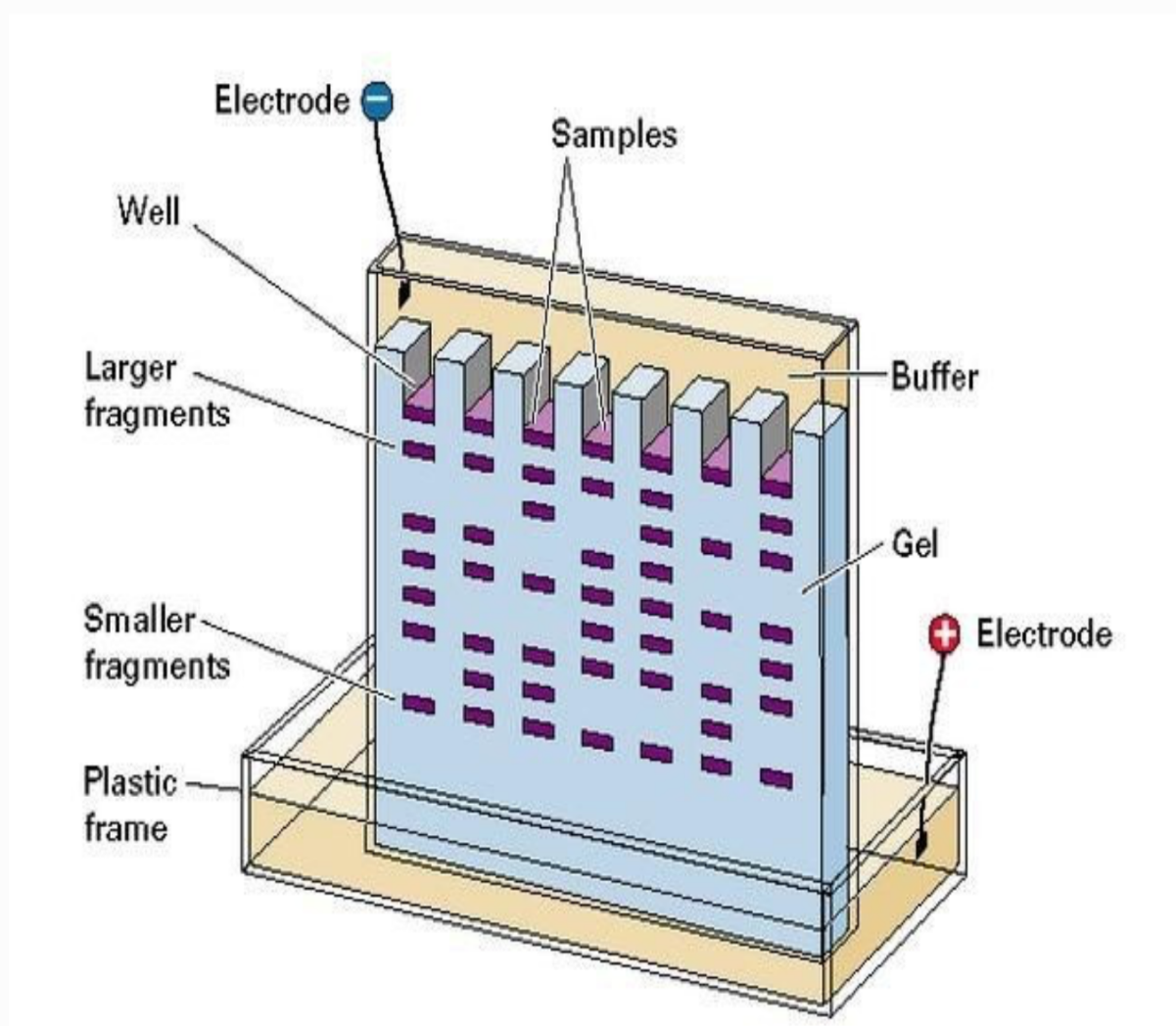
2.0 گرم - بافر 20 TBE میلیلیتر، غلظت 1 X - رنگ
فلورسنت - لودینگ دای حاوی گلیسرول و بروموفنول بلو -
نمونه DNA - نشانگر اندازه Ladder DNA - میکروپیپت و
نوک مربوطه شانه ژل و کاست

- شرح آزمایش :

تهیه ژل آگارز: گرم پودر آگارز را با 20 میلی لیتر بافر 1X
TBE مخلوط کرده و حرارت دهید تا شفاف شود. اضافه
کردن رنگ: پس از خنک شدن تا حدود 60 درجه، رنگ
فلورسنت را به محلول اضافه کنید و آن را درون کاست
ژل بریزید. شکل دهی چاهک ها: شانه را در محلول قرار
دهید تا چاهک ها شکل بگیرند. پس از بسته شدن ژل، شانه
را بردارید. قرار دادن ژل در تانک: ژل را داخل تانک
الکتروفورز قرار داده و تانک را با بافر TBE پر کنید. لود
کردن نمونه ها: نمونه DNA به همراه لودینگ دای را درون
چاهک ها لود کنید. همچنین Ladder را در یک چاهک دیگر
لود کنید. برقراری جریان الکتریکی: جریان الکتریکی را
برقرار کرده و اجازه دهید ژل به مدت 30 تا 45 دقیقه ران
شود.

مشاهده نتایج: پس از اتمام فرایند، ژل را در دستگاه ژل
داک قرار داده و با تابش UV باندهای DNA را مشاهده و
تصویربرداری کنید.

نتیجه‌گیری با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز، مولکول‌های DNA بر اساس اندازه از یکدیگر جدا شدند. نمونه‌های کوچکتر فاصله بیشتری را طی کرده و در پایین ژل قرار گرفتند. این روش به عنوان یکی از دقیق‌ترین و رایج‌ترین روش‌ها برای بررسی کیفیت و خلوص DNA شناخته می‌شود.



- عنوان: اندازه گیری غلظت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ
- هدف: تعیین غلظت DNA استخراج شده از نمونه‌ها به کمک دستگاه نانودراپ بر پایه جذب نور در طول موج 260 نانومتر

_مقدمه:

- اسپکتروفتومتر نانودراپ یک ابزار دقیق برای اندازه‌گیری غلظت و کیفیت نمونه‌های بیولوژیکی، به ویژه DNA، RNA و پروتئین‌ها است. این دستگاه با استفاده از اصول جذب نور، می‌تواند غلظت مواد را در مقیاس نانو لیتر اندازه‌گیری کند.
- عملکرد نانودراپ
- نمونه‌برداری: نانودراپ به کاربر این امکان را می‌دهد که تنها با قرار دادن 1-2 میکرو لیتر از نمونه بر روی سطح دستگاه، اندازه‌گیری انجام دهد. این ویژگی به کاهش مصرف نمونه کمک می‌کند. اندازه‌گیری: پس از قرار دادن نمونه، دستگاه نور را از طریق نمونه عبور می‌دهد و میزان جذب را در طول موج‌های مختلف اندازه‌گیری می‌کند. سپس، با استفاده از داده‌های جذب، غلظت و خلوص نمونه محاسبه می‌شود.
- مواد و وسایل مورد نیاز:

دستگاه نانودراپ - نمونه DNA استخراج شده - پیپت
میکرولیتر و نوک مربوطه- دستمال نرم برای تمیز کردن
پراب - کامپیوتر یا نمایشگر متصل به نانودراپ جهت ثبت
نتایج
روش کار:

آماده سازی دستگاه: دستگاه نانودراپ را روشن کرده و
اجازه دهید تا کمی گرم شود. مطمئن شوید که دستگاه تمیز
است و هیچ آلودگی روی سطح آن وجود ندارد.

تنظیم دستگاه: از منوی دستگاه، گزینه "DNA" را انتخاب
کنید تا دستگاه برای اندازه گیری DNA تنظیم شود.
نمونه برداری: مقدار 1-2 میکرو لیتر از نمونه DNA را روی
سطح نانودراپ قرار دهید. با استفاده از پد تمیزکننده،
سطح دستگاه را تمیز کنید و از آلودگی های احتمالی
جلوگیری کنید.

اندازه گیری: دکمه "Read" را فشار دهید تا دستگاه غلظت
و جذب نور را اندازه گیری کند. نتایج شامل غلظت DNA
(بر حسب نانوگرم بر میکرو لیتر) و نسبت خلوص (A_{260}/A_{280})
نمایش داده می شود.

260 nm	• Presence of DNA/RNA
280 nm	• Presence of proteins
230 nm	• Presence of salts or organic compounds
260/280 ratio	• Checking protein contamination
260/230 ratio	• Checking salt contamination

قانون بیر-لامبرت

رابطه خطی بین جذب و غلظت

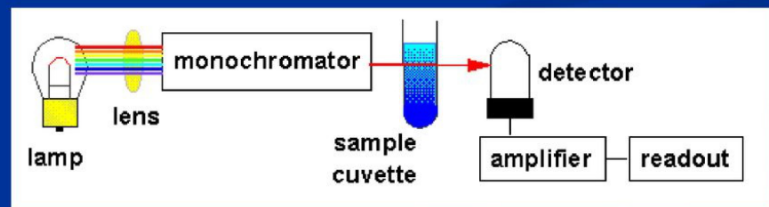
$$A = abc$$

A = جذب

a = ضریب جذب هر ماده

b = اندازه کویت

c = غلظت



عنوان: بررسی و اجرای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR
جهت تکثیر انتخابی DNA هدف

- هدف: هدف از این آزمایش، تکثیر اختصاصی بخشی از DNA ژنومی با استفاده از روش PCR به منظور مطالعه و شناسایی توالی‌های ژنی میباشد. این تکنیک اساس بسیاری از تحقیقات و کاربردهای تشخیصی در ژنتیک مولکولی را تشکیل میدهد.

. مقدمه

یک تکنیک بیولوژیکی است که برای تکثیر سریع و انتخابی بخش‌های خاصی از DNA استفاده می‌شود. این روش به محققان اجازه می‌دهد تا مقادیر زیادی از یک توالی خاص DNA را در آزمایشگاه تولید کنند. PCR در بسیاری از زمینه‌ها از جمله تشخیص بیماری‌ها، تحقیقات ژنتیکی و تجزیه و تحلیل DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد.

وسایل و مواد مورد نیاز

بافر (- dATP ، dGTP ، dCTP ، dTTP شامل) dNTPs

Forward و Reverse پرایمر - Taq DNA

Polymerase آنزیم

الگو - آب مقطر بدون نوکلئاز - DNA - $MgCl_2$ حاوی PCR

در (مستر میکس تجاری) - PCR) دستگاه ترمال سایکلر

صورت استفاده

روش کار

انتخاب و تهیه مواد اولیه: الگو: نمونه‌ای که باید تکثیر شود. پرایمرها: جفتی از پرایمرهای خاص برای توالی هدف. مستر میکس PCR: شامل dNTPs ، MgCl_2 و آنزیم (معمولاً Taq polymerase).

آب مقطر استریل: برای تنظیم حجم نهایی. ترکیب واکنش: در یک میکروتیوب، به ترتیب زیر اجزا را اضافه کنید: الگو (1-5 میکروگرم). پرایمر Forward (0.2 میکرومول). پرایمر Reverse (0.2 میکرومول). مستر میکس PCR (مقدار مشخص برای dNTPs و MgCl_2). آب مقطر استریل (به حجم نهایی 25 میکرو لیتر). مخلوط کردن: مخلوط را به آرامی پیپت زده و از ایجاد حباب‌های هوا جلوگیری کنید.

تنظیم برنامه دمایی دستگاه PCR

- مرحله 1: دناتوراسیون اولیه در 95 درجه به مدت 1 دقیقه
- مرحله 2: دناتوراسیون در 95 درجه به مدت 30 ثانیه
- مرحله 3: آنیلینگ در دمای مناسب به مدت 30-60 ثانیه
- مرحله 4: طولی سازی در 72 درجه به مدت 1-2 دقیقه
- مرحله 5: تکرار مراحل 2 تا 4 برای 30 چرخه
- مرحله 6: طولی سازی نهایی در 72 درجه به مدت 5 دقیقه
3. پایان واکنش و نگهداری:

پس از اتمام چرخه ها، نمونه ها در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری میشوند تا برای آنالیز مثلاً الکتروفورز ژل آگارز آماده شوند.

نتیجه‌گیری

آزمایش PCR به‌طور مؤثری ژن هدف را در نمونه‌ها شناسایی و تکثیر کرد. این تکنیک می‌تواند به عنوان ابزاری کلیدی در تحقیقات ژنتیکی و پزشکی به کار رود.

