

شماره SOP: 26		ناظر علمی: دکتر زهرا سعادتیان
بخش مربوط: از مایشگاه جامع تحقیقات		کارشناس آزمایشگاه: زهرا رجب زاده
عنوان دستگاه: Real-Time PCR		تاریخ تهیه: تیر 1403

عنوان دستگاه: Real-Time PCR

مدل: ABI StepOnePlus

برند: Applied Biosystems

محل نصب: از مایشگاه جامع تحقیقات

هدف: تکثیر و آنالیز DNA/RNA در زمان واقعی با استفاده از نشانگرهای فلورسانس

ایمنی و آماده سازی:

1. از روپوش، دستکش و عینک ایمنی استفاده شود.
2. محل کار، دستگاه و ابزار باید تمیز و بدون آلودگی باشد (استفاده از UV و اسپری ضد RNA توصیه می شود)
3. (از نوک سمپلر فیلتردار استفاده شود).
4. از آلودگی متقاطع در هنگام آماده سازی مستر میکس و الگو جلوگیری شود (استفاده از اتاق های جدا برای آماده سازی توصیه می شود).

آماده‌سازی واکنش

1. مستر میکس (Master Mix) را مطابق دستورالعمل کیت یا پروتکل آزمایش تهیه کنید.
2. DNA یا cDNA برای qRT-PCR را به مخلوط اضافه کنید.
3. واکنش را در لوله‌های مخصوص qPCR (0.2 ml) یا پلیت 96 چاهک بریزید.
4. درب‌ها را محکم ببندید یا از فیلم مخصوص چسباندن استفاده کنید.
5. پلیت را اسپین کنید (با میکروسانتریفیوژ پلیت) تا حباب‌ها حذف شود.

آماده‌سازی و راه‌اندازی دستگاه

1. دستگاه StepOnePlus را روشن کنید.
 2. نرم‌افزار StepOne Software را باز کنید.
 3. گزینه New Experiment را انتخاب نمایید.
 4. پارامترهای زیر را وارد کنید:
- نوع آنالیز (مثلاً Standard Curve ، Comparative Ct یا Presence/Absence)
 - (Cycle): تعداد چرخه معمولاً 40
 - دما و زمان مراحل (Denaturation, Annealing, Extension)
 - Fluorophore مثلاً FAM, SYBR Green, VIC
 - نوع قالب و هدف (Target)

قرار دادن نمونه در دستگاه و اجرای آزمایش

1. پلیت یا لوله‌ها را در ترموبلاک دستگاه قرار دهید.
2. درب دستگاه را ببندید و قفل کنید.
3. از طریق نرم‌افزار گزینه Start Run را انتخاب نمایید.
4. در حین اجرای چرخه‌ها، دستگاه به‌صورت خودکار سیگنال فلورسانس را ثبت می‌کند.

پایان فرآیند و آنالیز داده‌ها

1. پس از اتمام، نمودار Amplification Curve و Melt Curve برای SYBR Green را بررسی کنید.
2. مقدار Ct (Threshold Cycle) برای هر نمونه را یادداشت و تحلیل آماری را انجام دهید.
3. در صورت نیاز، داده‌ها را در قالب Excel یا PDF ذخیره یا خروجی بگیرید.
4. پلیت را از دستگاه خارج کرده و با احتیاط دفع یا نگهداری کنید.

خاموش کردن و نظافت دستگاه

1. نرم افزار را ببندید و دستگاه را خاموش کنید.
2. درب دستگاه را باز گذاشته تا خشک شود.
3. سطح خارجی دستگاه را با دستمال خشک یا الکل 70% پاک کنید.
4. فایل‌ها و گزارش‌ها را در پوشه مشخص شده ذخیره نمایید.

نکات مهم

- ✓ از ترکیب رنگ‌های فلورسانس تداخلی در یک ران خودداری کنید.
- ✓ به هیچ وجه در طول کار با دستگاه درب آن را باز نکنید.
- ✓ دقت در سمپل گذاری و عدم ایجاد حباب در واکنش بسیار مهم است.
- ✓ از صحت کالیبراسیون دستگاه و سلامت لامپ‌ها اطمینان حاصل شود (سرویس دوره‌ای).