

۱-هدف: استفاده از دستگاه Real time PCR مدل Step One plus ساخت شرکت ABI آمریکا .

۲-دامنه عملکرد: تشخیص و اندازه گیری دقیق و حساس DNA و RNA ، حتی در مقادیر بسیار کم است. این روش برای آنالیز بیان ژن، تشخیص پاتوژن ها و بررسی تمایز آلی به کار می رود. علاوه بر این، این دستگاه در بررسی جهش ها و حذف و اضافه شدن های نوکلئوتیدی نیز کاربرد دارد. دستگاه Time Real PCR به جهت بررسی کمی مقادیر الگوهای اولیه در نمونه های DNA به هدف مثال اندازه گیری طول تلومر و یا شمارش میتوکندری و یا نمونه های RNA با هدف سنجش بیان ژن موجودات زنده توسعه یافته است نیز کاربرد دارد.

۳-مسئولیت: مسئولیت اجرای این دستورالعمل با کارشناسان آزمایشگاه مربوطه می باشد.

۴- روش کار:

۱. دستگاه توسط کلید پاور که در پشت آن قرار دارد روشن شود.
۲. با باز کردن برنامه دستگاه بر روی لپ تاپ و انتخاب Advanced setup برنامه جدید بسازید.
۳. از قسمت Experiment نوع تست را مشخص کنید.
۴. سپس با انتخاب گزینه plate setup از طریق سربرگ define target نوع رپورتر را مشخص کرده و از سربرگ Assign target جایگاه نمونه ها را مشخص کنید.
۵. در بخش Run Method پروتکل دمایی مورد نظر را وارد نموده و حجم نمونه و تعداد سیکل را مشخص کنید.
۶. با زدن دکمه Save برنامه را ذخیره کنید.
۷. بر روی دکمه start کلیک کرده و دستگاه را Run کنید.
۸. پس از اتمام کار دستگاه را از طریق کلید پاور در پشت دستگاه خاموش کنید.

تاریخ و امضاء:	تاریخ و امضاء:	تأیید کننده: دکتر محمدرضا عربستانی	تصویب کننده:	تاریخ اجرا:	تهیه کننده: حسین فضلی
		سمت: مدیر گروه میکروبیشناسی	سمت:	تاریخ بازنگری:	سمت: سوپر وایزر آزمایشگاه
شماره صفحه: ۱ از ۲		تاریخ و امضاء:	تاریخ و امضاء:		تاریخ و امضاء:

اطمینان از صحت آزمایش:

- کنترل مثبت و منفی: استفاده از کنترل های مثبت (نمونه ای با DNA هدف شناخته شده) و کنترل های منفی (بدون DNA) برای اطمینان از صحت آزمایش ضروری است.
- کنترل بدون آنزیم: برای اطمینان از اینکه فلورسانس گزارش شده ناشی از واکنش نیست، از کنترل بدون آنزیم استفاده کنید.
- رعایت دمای صحیح: دمای Annealing را به دقت تنظیم کنید تا از تکثیر غیر اختصاصی جلوگیری شود.
- تحلیل نمودار ذوب: نمودار ذوب را تحلیل کنید تا صحت محصول PCR و احتمال وجود دایمرهای پرایمر را بررسی کنید.

چنانچه دستگاه نیاز به تنظیمات خاصی دارد حتماً کارشناس مربوطه را مطلع سازید.

۵-ایمنی:

- ایمنی کار با Real-Time PCR شامل حفاظت از خود، اطمینان از صحت آزمایش و جلوگیری از آلودگی نمونه هاست که این شامل استفاده از تجهیزات ایمنی مناسب، رعایت پروتکل های استاندارد و نظافت مداوم آزمایشگاه می شود.
- تجهیزات ایمنی: استفاده از دستکش، کلاه و ماسک هنگام کار با نمونه ها ضروری است.

۶-نحوه نگهداری:

- حتماً جهت محافظت دستگاه از نوسانات برق آن را به استابلایزر و UPS متصل نمایید.
- چنانچه در پایان کار، در چاهک ها آب یا رنگ مازیک وجود داشت با دستمال نرم یا سوآپ الکلی آن را تمیز نمایید.

تهیه کننده: حسین فضلی	تأیید کننده: دکتر محمدرضا عربستانی	تصویب کننده:	تاریخ اجرا:
سمت: سوپر وایزر آزمایشگاه	سمت: مدیر گروه میکروبیشناسی	سمت:	تاریخ بازنگری:
تاریخ و امضاء:	تاریخ و امضاء:	تاریخ و امضاء:	شماره صفحه: ۱ از ۲