

آنزیم Pfu نو ترکیب (Recombinant Pfu)

(Cat-No: □ M1113-100, □ M1113-500)

الف) مقدمه

آنزیم DNA پلیمراز Pfu یک آنزیم پایدار در برابر دمای بالاست که دارای وزن مولکولی نسبی ۹۲ kDa می باشد. این آنزیم دارای منشا پیروکوکوس فیوریوس (Pyrococcus furiosus) می باشد و سنتز نوکلئوتیدها را در جهت ۳' → ۵' کاتالیز می کند. به علاوه آنزیم Pfu دارای فعالیت اگزونوکلازی ۵' → ۳' نیز می باشد (Proof reading) نوکلئوتیدهای غلط در حین سنتز DNA توسط فعالیت تصحیح خطای آن حذف می شود. این آنزیم در واکنش های PCR که نیاز به سنتز با صحت بالا دارند کاربرد وسیع دارد. میزان خطای آنزیم ۲/۶ نوکلئوتید در تکثیر یک میلیون جفت باز می باشد.

ب) کاربردهای آنزیم

۱- PCR با صحت بالا

۲- تکثیر محصول PCR برای کلونینگ یا بیان ژن

۳- جهش زایی هدفدار

ج) منبع آنزیم

ژن آنزیم نو ترکیب باکتری پیروکوکوس فیوریوس در *E. coli* بیان و تخلیص شده و در بافر ذخیره حاوی گلیسرول و سایر نگهدارنده ها ذخیره شده است.

د) محتویات کیت

ردیف	اجزا کیت	مقدار
۱	آنزیم Pfu (۲ U/μl)	۱۰۰ یا ۵۰۰ واحد
۲	بافر ۱۰X	۱ میلی لیتر
۳	MgCl ₂	۱ میلی لیتر
۴	نمونه کنترل مثبت برای آنزیم و PCR	۱۰ میکرو لیتر

نگهداری: کیت Pfu در روی یخ ارسال می شود و بلافاصله بعد از رسیدن در دمای ۲۰ °C - نگهداری شود.

ه) معرف هایی که توسط محقق باید تامین شود:



۱- مخلوط dNTP

۲- پرایمرهای پیشرو (Forward) و معکوس (Reverse)

۳- DNA الگو

۴- آب بدون نوکلئاز

و) روش کار

در یک میکروتیوپ استریل و بدون نوکلئاز اجزای زیر را مطابق جدول زیر مخلوط کنید.

غلظت نهایی	واکنش ۵۰ μl	واکنش ۲۵ μl	اجزا
۱X	۵ μl	۲/۵ μl	بافر ۱۰ X Pfu
۲۰۰ μM	۱ μl	۰/۵ μl	۱۰ mM dNTPs
۰/۵ μM	۲/۵ μl	۱/۲۵ μl	پرایمر پیشرو (Forward) ۱۰ μM
۰/۵ μM	۲/۵ μl	۱/۲۵ μl	پرایمر معکوس (Reverse) ۱۰ μM
۱/۲-۲۵/۵ U / ۵۰ μl	۱/۲۵ μl	۰/۷۵ μl	Pfu (2 U/μl)
<۲۵۰ ng	متغیر (مطابق با جدول صفحه آخر)	متغیر (مطابق با جدول صفحه آخر)	DNA الگو
	تا حجم ۵۰ μl	تا حجم ۲۵ μl	آب دیونیزه بدون نوکلئاز

نکته ۱: مقدار آنزیم بستگی به مقدار الگو دارد اما به طور کلی برای ۵۰ μl واکنش و تکثیر طولهای کوتاهتر از ۲ kb، ۱/۲-۲۵/۵ U متداول است.

نکته ۲: ضروری است که تمام مراحل بر روی یخ انجام شود و آنزیم Pfu در انتها افزوده شود تا فعالیت اگزونوکلاز آنزیم باعث تجزیه پرایمرها نشود.

نکته ۳: بلافاصله بعد از افزودن آنزیم و اسپین کوتاه میکروتیوپ، آن را در دستگاه ترموسایکلر که دمای آن از قبل در روی ۹۵°C تنظیم شده است، قرار دهید.

نکته ۴: برنامه PCR مطابق جدول فوق تنظیم شود. ممکن است برای تکثیر نیاز به بهینه سازی ترکیب پرایمر و الگو باشد.



شرایط چرخه دمایی پیشنهادی برای تکثیر PCR توسط آنزیم Pfu

این دستورالعمل برای توالی‌های بین ۲۰۰ الی ۲۰۰۰ جفت باز در دستگاه Abi بیوسیستم بهینه‌سازی شده است.

مرحله	دما	زمان
دنا تراسیون اولیه	۹۴-۹۸ °C	۱ دقیقه
چرخه ۳۰-۳۵	۹۴-۹۸ °C	۳۰ ثانیه
	۵۵-۶۸ °C	۳۰ ثانیه
	۷۲ °C	۱-۲/kb دقیقه
طویل سازی نهایی	۷۲ °C	۱۰ دقیقه
ذخیره	۴ °C	نامحدود

(ز) ملاحظات عمومی

۱- غلظت آنزیم

برای واکنش‌هایی که حجم آنها ۵۰ µl است. ۱/۲۵ واحد آنزیم Pfu پیشنهاد می‌شود. زیرا غلظت بالای آنزیم احتمال تجزیه پرایمرها را به دلیل فعالیت اگزونوکلازی آن افزایش می‌دهد.

۲- طراحی پرایمر

توالی پرایمر در تعیین بهترین شرایط برای فعالیت آنزیم حیاتی است. برای پرایمرهایی که T_m بالاتری دارند افزایش دمای اتصال پرایمر توصیه می‌شود. دمای بالا اتصال‌های غیر اختصاصی را به حداقل می‌رساند و مقدار محصول مورد نظر را افزایش و تشکیل دایمرهای پرایمری را کاهش می‌دهد. فعالیت اگزونوکلازی ۵'→۳' آنزیم ممکن است پرایمرها را تجزیه کند. برای غلبه بر این مشکل توصیه می‌شود پرایمرهای طویل با میزان GC بالا استفاده شود. می‌توان با افزودن پیوند فسفوتیولات در انتهای ۳' آن نیز از هضم محافظت کرد.

۳- زمان تکثیر

زمان تکثیر DNA پلیمراز pfu کمتر از DNA پلیمراز Taq می‌باشد. بنابراین در برنامه PCR حدود ۲ دقیقه برای هر یک کیلو باز توصیه می‌شود. تعداد چرخه‌ها ۳۰-۳۵ کافی است.

۴- DNA الگو

تعداد چرخه‌های PCR به مقدار DNA الگو بستگی دارد. برای غلظت‌های پایین الگو ممکن است تعداد ۴۰ چرخه نیاز باشد.



مقادیر پیشنهادی DNA الگو در یک حجم واکنش ۵۰ µl

الگو	مقدار
DNA ژنومی انسان	۱ µg - ۰/۱ µg
DNA پلاسمید	۵ ng - ۰/۵ ng
DNA فاز	۱۰ ng - ۰/۱ ng
DNA ژنومی باکتری E. coli	۱۰۰ ng - ۱۰ ng

۵- dNTPs

مقدار dNTP پیشنهادی برای هر نوکلئوتید ۰/۲ mM می‌باشد و توصیه می‌شود مقدار برابری از هر ۴ نوکلئوتید استفاده شود. هرگاه در برخی از PCR ها مقدار بیشتری dNTP لازم بود، ضروری است که غلظت Mg^{2+} نیز بر اساس آن افزایش یابد.

۶- پرایمرها

غلظت پیشنهادی برای پرایمرها بین ۰/۱-۱ µM است. غلظت بالای پرایمر اتصال غیر اختصاصی آنها و تولید محصولات PCR غیراختصاصی را افزایش می‌دهد. در مورد پرایمرهای degenerate و پرایمرهای مورد استفاده در PCR های طولانی غلظت بالایی از پرایمرها در محدوده ۰/۱-۳ µM توصیه می‌شود.

نکته: آنزیم DNA پلیمراز pfu قادر است نوکلئوتیدهای تغییر یافته مثل نوکلئوتیدهای متصل به بیوتین، دیژوکسیژنین و فلورسنت را بعنوان سوبسترا در سنتز DNA مورد استفاده قرار دهد.