آنزیم سوپر Pfu نوترکیب (Recombinant super Pfu)

(Cat-No: ☐ M1115-100, ☐ M1115-500)

الف) مقدمه

آنزیم DNA پلیمراز Pfu یک آنزیم پایدار در برابر دمای بالاست که دارای وزن مولکولی نسبی ۹۲ kDa می‌باشد. این آنزیم دارای منشا پیروکوکوس فیوریوس(Pyrococus furiosus) می‌باشد و سنتز نوکلئوتیدها را در جهت ´۳ → ´۵ کاتالیز می‌کند. به علاوه آنزیم Pfu دارای فعالیت اگزونوکلئازی ´۵→´۳ نیز می‌باشد (Proof reading) نوکلئوتیدهای غلط در حین سنتز DNA توسط فعالیت تصحیح خطای آن حذف می‌شود. 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 می‌باشد. آنزیم سوپر Pfu شکل تغییر یافته Pfu می‌باشد که به آن یک دُمین فعال-سازی افزوده شده است به طوری که نسبت به Pfu معمولی هم طول‌های بیشتر ژن را تکثیر و هم سرعت سنتز بالاتری دارد.

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 نوترکیب باکتری پیروکوکوس فیوریوس در *E. coli* بیان و تخلیص شده و در بافر ذخیره حاوی گلیسرول و سایر نگهدارنده‌ها ذخیره شده است.

د) محتویات کیت

ردیف	اجزا کیت	مقدار
۱	آنزیم سوپر Pfu (۲ U/µl)	۱۰۰ یا ۵۰۰ واحد
۲	بافر 5X	۱ میلی لیتر
۳	MgCl2	۱ میلی‌لیتر
۴	نمونه کنترل مثبت برای آنزیم و PCR	۱۰ میکرولیتر

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

ه) معرف‌هایی 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 ۵۰µl	واکنش ۲۵µl	اجزا
۱X	۱۰ µl	۵µl	بافر سوپر Pfu ۵ X
۲۰۰µM	۱µl	۰/۵µl	۱۰mM dNTPs
۰/۵ µM	۲/۵µl	۱/۲۵µl	پرایمر پیشرو (Forward) ۱۰ µM
۰/۵ µM	۲/۵µl	۱/۲۵µl	پرایمر معکوس (Reverse) ۱۰ µM
۱/۰ واحد / ۵۰µl PCR	۰/۵µl	۰/۲۵ µl	DNA پلیمراز سوپر Pfu (۲ U/µl)
<۲۵۰ ng	متغیر	متغیر	DNA الگو
	به حجم ۵۰µl	به 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 U متداول است.

نکته ۲: ضروری است که تمام مراحل بر روی یخ انجام شود و آنزیم سوپر Pfu در انتها افزوده شود تا فعالیت اگزونوکلئازی 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 سوپر Pfu

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

زمان	دما	مرحله
۳۰ ثانیه	۹۸°C	دناتوراسیون اولیه
۵-۱۰ ثانیه ۱۰-۳۰ ثانیه ۱۵-۳۰/kb ثانیه	۹۴-۹۸ °C ۵۰-۷۲°C ۷۲ °C	۳۰-۳۵ چرخه
۵-۱۰ دقیقه	۷۲ °C	طویل سازی نهایی
نامحدود	۴ °C	ذخیره

ز) ملاحظات عمومی

۱- غلظت آنزیم

برای واکنش هایی که حجم آنها ۵۰ µl است. ۱ واحد آنزیم سوپر Pfu پیشنهاد می‌شود. زیرا غلظت بالای آنزیم احتمال تجزیه پرایمرها را به دلیل فعالیت اگزونوکلئازی آن افزایش می‌دهد.

۲- طراحی پرایمر

توالی پرایمر در تعیین بهترین شرایط برای فعالیت آنزیم حیاتی است. برای پرایمرهایی که Tm 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 اگزونوکلئازی ´۵→´۳ آنزیم ممکن است پرایمرها را تجزیه کند. برای غلبه بر این مشکل توصیه می شود پرایمرهای طویل با میزان GC بالا استفاده شود. می توان با افزودن پیوند فسفوتیولات در انتهای '۳ آن نیز از هضم محافظت کرد.

۳- DNA الگو

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

مقادیر پیشنهادی DNA الگو در یک حجم واکنش ۵۰ µl

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

۴- 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 ۱-۰/۱ 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 ۳-۰/۱ µM توصیه می‌شود.

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