مسترمیکس آنزیم DNA پلیمراز pfu نوترکیب (۲X)

(Recombinant Pfu Mastermix 2X)

(Cat-No: ☐ M1116-100, ☐ M1116-500)

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 فعال‌سازی افزوده شده است به طوری که نسبت به Pfu معمولی هم طول‌های بیشتر ژن را تکثیر و هم سرعت سنتز بالاتری دارد.

مسترمیکس (۲x) آنزیم DNA پلیمراز سوپر pfu یک محلول آماده است که دارای آنزیم سوپر pfu، dNTPs، سولفات منیزیم و بافر واکنش در غلظت های بهینه می باشد. به طوری که برای تکثیر کارآمد الگوهای DNA توسط PCR بهینه سازی شده است. برای آماده سازی واکنش PCR کافی است که پرایمرهای پیشرو (Forward) و معکوس (Reverse) و DNA الگو افزوده شود. به کمک مسترمیکس از احتمال خطاهای پیپتینگ (Pipeting)، محاسبات اشتباه و آلودگی ممانعت می شود.

ب) کاربردها

PCR ،کلونینگ، تکثیر قطعات طولانی و سخت، تکثیر دقیق توالی‌های ژنی باکتری‌ها به منظور تعیین توالی، جهش زایی هدفدار.

ج) محتویات کیت

ردیف	اجزا کیت	مقدار
۱	مسترمیکس(۲x) دارای سوپر pfu (۲ U/µl)	۱ میلی لیتر
۲	نمونه کنترل مثبت برای آنزیم و PCR	۱۰ میکرولیتر

د) شرایط نگهداری

محلول مسترمیکس (2x) بر روی یخ ارسال می شود. به محض دریافت در ۲۰ ^{o}C- نگهداری شود. این مسترمیکس در ۴ ^{o}C به مدت سه ماه و یا ۱۵ بار ذوب و انجماد پایدار است. هرگاه روزانه چند بار از محلول مسترمیکس استفاده گردد، از ذوب و انجماد پرهیز و در یخچال نگهداری شود.

ه) ترکیب مسترمیکس سوپر pfu

آنزیم DNA پلیمراز سوپر pfu در بافر 2x ، dNTPs، $MgSO_4$ 3mM و بروموفنول بلو مخلوط شده است.

و) روش کار

تمامی محلول ها باید بر روی یخ ذوب شود و به آرامی مخلوط و سانتریفیوژ شود.

۱- میکروتیوب PCR روی یخ قرار داده شود و مطابق با جدول زیر حجم واکنش برای ۵۰ µl مخلوط شود.

۱x	۲۰µl	Super Pfu mix (2x)
۰/۱-۱µM	متغییر	پرایمر پیشرو(Forward)
۰/۱-۱µM	متغییر	پرایمر معکوس (Reverse)
۱ µg- ۱۰pg	متغییر	DNA الگو
-	تا ۵۰µl	آب بدون نوکلئاز

نکته: DNA الگوی پیشنهادی برای حجم ۵۰ µl به شرح جدول زیر است.

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

۲- نمونه را مخلوط و spin کرده تا مخلوط PCR در ته میکروتیوب جمع شود.

۳- براساس جدول زیر برنامه دمایی PCR تنظیم و اجرا شود.

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

۴- بعد از اتمام PCR می توانید محصول آن را روی ژل برده یا در ^{o}C ۲۰- نگهداری شود.

ز) توصیه های عمومی

در طول PCR بیشتر از ۱۰ میلیون کپی از DNA الگو تولید می شود بنابراین به منظور پرهیز از آلودگی با سایر الگوهای DNA که ممکن است در محیط آزمایشگاه وجود داشته باشد، احتیاط‌های عمومی باید بکار گرفته شود. توصیه‌های عمومی زیر به منظور کاهش احتمال آلودگی توصیه می شود.

۱-در فضاهای جداگانه نمونه DNA، مخلوط PCR، چرخه های دمایی و آنالیز محصولات PCR شده، انجام شود.

۲- مخلوط PCR در زیر کابینت های لامینار که مجهز به لامپ UV ، انجام شود.

۳- در استخراج پلاسمید و مخلوط کردن اجزا PCR دستکش نو پوشیده شود.

۴- همیشه واکنش کنترل منفی [کنترل بدون DNA الگو (No template control= NTC)] در کنار سایر نمونه‌ها برای بررسی آلودگی وجود داشته باشد.