دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۷، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۳۸-۱۳۲ (۱۳۸۸)

روش تولید آنزیم‌های DNA پلیمراز *Taq* و *Pfu*

حسین میرزایی ندوشن

استاد پژوهش، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران پست الکترونیک: nodoushan2003@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۰/۱۴

چکیده

آنزیم‌های پلیمر کننده DNAی *Taq* و *Pfu* از آنزیم‌های بسیار مهم در مطالعات ژنتیک مولکولی هستند و در آزمایشگاه‌های مولکولی در حجم زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این تحقیق به منظور تامین آنزیم‌های یاد شده جهت آزمایشگاه‌های پرمصرف و یک روش ساده خالص کردن این آنزیم‌ها از بقایای باکتری انجام گردید. ابتدا پلاسمیدهای حامل ژن‌های تولید کننده آنزیم‌های *Taq* و *Pfu* به طور جداگانه به نژادی از باکتری *E. coli* منتقل شد. باکتری‌های تراریخته بر روی محیط‌کشت 2x SOB به مدت ۴/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شده و بعد آنزیم تولید گردید، آنزیم‌های مورد نظر با روش خاصی که در تحقیق حاضر ارائه گردیده استخراج و خالص سازی گردیدند. به منظور آزمون کارآیی و تعیین میزان پرکننده مورد نیاز جهت رساندن غلظت آنزیم به سطح مطلوب از ماده رنگ‌آمیزی Bradford استفاده گردید. کارآئی و خلوص آنزیم‌های تولید شده در مقایسه با آنزیم تجاری موجود در آزمایشگاه در تکثیر قطعه‌ای از DNA ژنوم گیاه آرابیدوپسیس اکوتیپ کلمبیا توسط PCR مورد تأیید قرار گرفت. بنابراین روش ارائه شده در این تحقیق برای تولید آزمایشگاهی و محلی آنزیم‌های*Taq* و *Pfu* با خلوص بالا توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم *Taq*، آنزیم *Pfu*، انتقال ژن، تخلیص آنزیم.

مقدمه

آنزیم پلیمر کننده DNAی *Taq* آنزیمی مقاوم به گرما ست که جهت تکثیر قطعه‌ای خاص از DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده می‌شود. عمل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کاربردهای زیادی دارد از جمله بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن بخصوص در ژنوم موجود مورد نظر، آزمون تعیین والدین، تشخیص نقائص ژنتیکی یا بیماری، کلن کردن ژن، تجزیه و تحلیل DNAی گونه-های منقرض شده و ده‌ها کاربرد دیگر. این آنزیم ابتدا از باکتری *Thermus aquaticus* که در چشمه‌های آب‌گرم زندگی می‌کند استخراج شد. به همین دلیل نام آن از مخفف نام جنس و گونه باکتری یاد شده گرفته شد (*Thermus aquaticus* = *Taq*). این آنزیم به عنوان یکی از اولین آنزیم‌هایی که دمای بالای واسرشت کردن در فرایند PCR را تحمل می‌کند شناخته شد. نیمه عمر این آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد ۴۰ دقیقه می‌باشد.

یکی از ویژگیهای منفی آنزیم *Taq* این است که فاقد مکانیسم تصحیح (proof reading) است و به همین دلیل ممکن است صحت کامل در تکرار واکنشها را نداشته باشد. آنزیم‌های *Taq* که به صورت تجاری به فروش

Archive of SID

www.SID.ir

می‌رسند احتمال خطایی حدود یک در ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید را دارند. مطالعات متعددی در خصوص میزان خطای آنزیم‌های پلیمر کننده مقاوم به دمای بالا انجام شده و میزان این خطا را بین $۱۰^{-۴} * ۲/۱$ تا $۱۰^{-۶} * ۱/۶$ به ازای هر نوکلئوتید در هر مرحله از تکثیر برآورد نموده‌اند (Barnes, 1992; Cariello *et al.*, 1991; Cha &Thilly, 1993; Eckert & Kunkel, 1990). این آنزیم یک زنجیره یک کیلوبازی DNA را در دمای ۷۲ درجه تقریبا در ۳۰ ثانیه تکثیر می‌کند.

آنزیم دیگری به نام آنزیم پلیمر کننده *Pfu* که هم نسبت به دمای بالا مقاوم‌تر از *Taq* است و هم قابلیت تصحیح کردن دارد و احتمال کمتری در ایجاد خطاهای نوکلئوتیدی دارد معرفی شده است. این آنزیم در تکثیر DNA که به منظور تعیین توالی صورت می‌گیرد اغلب به جای آنزیم *Taq* استفاده می‌شود. صحت عمل آنزیم *Taq* را می‌توان با تغییراتی در روشهای خالص‌سازی این آنزیم افزایش داد. یکی از روشهای مناسبی که جهت خالص‌سازی این آنزیم ارائه شده روشی است که توسط Lawyer و همکاران (۱۹۹۳) ارائه شده است و هنوز پس از سالها توسط آزمایشگاه‌های مختلف جهت تولید آنزیم در آزمایشگاه‌های پر مصرف استفاده می‌شود.

حضور مواد وراثتی باکتری در آنزیم *Taq* خالص سازی شده یکی از موانع بازدارنده در استفاده از این آنزیم است و انتخاب روش مناسب در خالص‌سازی آن از اهمیت زیادی برخوردار است. چرا که حضور این گونه مواد وراثتی می‌تواند به‌عنوان DNA هدف در تکثیر مورد استفاده قرارگیرد. به‌ویژه زمانی که آغازگرهایی با طیف وسیع به‌کاربرده شوند که همخوانی با توالیهای نوکلئوتیدی هدف داشته باشند، زمانی که این آغازگرها کوتاه و دارای تعداد کمی نوکلئوتید باشند، احتمال تکثیر مواد وراثتی غیر هدف افزایش می‌یابد. حضور این گونه مواد وراثتی در آنزیم *Taq* که موجب کاهش دقت عمل آنزیم می‌گردد توسط تعداد زیادی از محققان به اثبات رسیده است (Hughes *et al*., 1994; Maiwald et al., 1994). در نتیجه، حذف این‌گونه موارد از نتایج *PCR* دارای اهمیت بسزایی است. از این رو، روش‌های متعددی برای حذف این‌گونه ناخالصی‌ها پیشنهاد شده است (Carroll et al., 1999; Li *et al*., 1999; Meier et al., 1993; Rand & Houck, 1990; Sarka & Sommer 1993).

این آزمایش جهت تولید آنزیم‌های *Taq* و *Pfu* و بهینه کردن روش تولید آزمایشگاهی آن به منظور تأمین محلی آنزیم و بدون ارزبری جهت آزمایشگاه‌های پرمصرف و نیز خالص کردن آنزیم تولیدی از بقایای باکتری انجام گردید.

مواد و روشها

سوش باکتری

سوشی از باکتری *E. coli* به نام P-magic جهت انتقال پلاسمید حامل ژن‌های *Taq* و *Pfu* مورد استفاده قرار گرفت.

محیط‌های کشت و بافرهای مورد استفاده

I – محیط 2x SOB (Ausubel *et al.*, 1999)

ابتدا اجزاء سه‌گانه زیر فراهم گردید.

۱ – تریپتون ۴ درصد (4% Tryptone)

۲ – عصاره مخمر ۲ درصد (2% Yeast Extract)

۳ – NaCl یک درصد

Archive of SID

www.SID.ir

بعد جهت تهیه ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت 2x-SOB، ابتدا ۵ گرم عصاره مخمر دو درصد با ۲/۵ گرم NaCl مخلوط شده و ۲۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر فاقد یون به آنها اضافه گردید. مخلوط حاصل جهت سترون‌سازی اتوکلاو شد. پس از سرد شدن محیط‌کشت، آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و آمپی‌سیلین به مقدار ۵۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر محیط‌کشت به آن اضافه گردید.

II – بافر 1x Lysis

به منظور تهیه بافر 1x Lysis به نحوه زیر عمل گردید:

۱ – تهیه بیست میلی‌لیتر محلول ۵۰ میلی‌مولار گلوکز (۱۸۰/۱۶ میلی‌گرم گلوگز در ۲۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر فاقد یون شده).

۲ – تهیه Tris-HCl ده میلی‌مولار، (۲۰۰میکرولیتر Tris-HCl با pH = ۷/۵).

۳ – تهیه EDTA یک میلی‌مولار با pH = ۸، (چهل میکرولیتر EDTA نیم مولار با pH = ۸).

سه محلول فوق با هم مخلوط شد تا بافر مورد نظر آماده استفاده گردد.

III – بافر متعادل کننده یا (10x Flow-Thru):

۱ – جهت تهیه تریس استات ۱۰۰ میلی‌مولار (100 mM Tris-Acetate)، مقدار ۱۲۱/۱ میلی‌گرم تریس استات توزین شد.

۲ – جهت تهیه استات پتاسیم (KOAc) ۱/۵ مولار، مقدار ۱/۴۷۲ گرم استات پتاسیم توزین شد.

۳ – جهت تولید Tween-20 دو درصد، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر Tween-20 آماده شد.

۴ –در نهایت جهت تهیه NP-40 دو درصد، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر NP-40 آماده شد.

موارد فوق با آب مقطر فاقد یون مخلوط شده و پس از رساندن حجم محلول به ۱۰ میلی‌لیتر، pH آن با اسید استیک روی ۷/۵ تعدیل گردید.

انتقال پلاسمید حامل ژن *Taq* به *E. coli*

جهت تهیه محیط‌های کشت و نیز انتقال پلاسمید به باکتری از روش پیشنهادی توسط Ausubel و همکاران (۱۹۹۹) استفاده گردید. در همه مراحل کشت و تکثیر باکتری حامل پلاسمید مورد نظر از دو آنتی‌بیوتیک‌کانامایسین و آمپی‌سیلین جهت انتخاب باکتریهای تراریخت و پلاسمید مورد نظر استفاده گردید.

سوش باکتری حامل ژن تولیدکننده آنزیم مورد نظر، به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت 2x-SOB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های گزینشی کانامایسین و آمپی‌سیلین تلقیح شد و به مدت ۴/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. محیط‌کشت توسط دستگاه اسپکتروفتومتری جهت OD نیم چک گردید و در صورت حصول این عدد، ۳۱/۳ میلی‌گرم IPTG به محیط اضافه شده و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

استخراج و خالص‌سازی آنزیم‌ها

پس از سپری شدن مدت زمان لازم در تأثیر IPTG، سلول‌های باکتری توسط سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه رسوب گردیدند. این سلول‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر بافر Lysis شناور شدند و ابتدا به وسیله فرنچ پرس و بعد سونیکیشن دیواره سلولی باکتری‌ها شکسته شد. در ادامه، مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بعد به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه

Archive of SID

www.SID.ir

سانتریفوژ گردید. لایه فوقانی محلول لوله سانتریفوژ جدا شده و مقدار ۱/۱ میلی‌لیتر بافر 10x Flow-Thru به آن اضافه گردید و مخلوط حاصل تا مرحله بعد روی یخ نگهداری گردید.

به منظور تهیه ستون تصفیه آنزیم، ۱۰ میلی‌لیتر DEAE-Sepharose به ستونی که قبلا به فیلتری مجهز شده بود بار گردید. در ادامه کار جهت ایجاد تعادل و نیز تنظیم pH ستون، ۲۵ میلی‌لیتر بافر 1x Flow-Thru به آرامی و از طریق دیواره ستون به مجموعه اضافه شد، به نحوی که مواد بار شده قبلی به هم نخورد و متلاطم نگردد. پس از گذشتن این بافر از ستون، مخلوط آنزیم به آرامی به ستون بار گردید و از همان لحظه، خروجی ستون در لوله‌های یک میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید. پس از گذشتن آخرین قطرات آنزیم از ستون، ۱۰ میلی‌لیتر دیگر از بافر 1x Flow-Thru به آرامی به ستون اضافه شد و خروجی آن از ستون در لوله‌های یک میلی‌لیتری جمع-آوری گردید. لوله‌های حاوی آنزیم جمع‌آوری شده به‌ترتیب جمع‌آوری، شماره‌گذاری شدند.

مقایسه کارایی آنزیم‌ها

به منظور آزمون کارآیی و تعیین میزان پرکننده مورد نیاز جهت رساندن غلظت آنزیم به سطح مطلوب از ماده رنگ‌آمیزی Bradford استفاده گردید. این ماده متناسب با میزان آنزیم موجود در مخلوط رنگ می‌گیرد. دو میکرولیتر از هر لوله آنزیم به ۲۰ میکرولیتر ماده رنگ-آمیزی اضافه گردید و رنگ حاصل که طیفی از خاکستری تا آبی بسیار پر رنگ بود با رنگ نمونه‌ای که با آنزیم با غلظت شناخته شده تهیه شده بود مقایسه گردید. برخی از لوله‌های آنزیم (خروجی‌های ابتدایی و انتهایی) حذف گردیده و مابقی با یکدیگر مخلوط گردیدند.

جهت تکمیل ارزیابی، آنزیم حاصل با استفاده از یک نمونه DNA ی آرابیدوپسیس، اکوتیپ کلمبیا و پرایمر شناخته شده‌ای که انتظار می‌رفت قطعاتی از DNA به طول ۵۰۰ جفت باز را تکثیر کند با غلظت‌های متفاوتی از آنزیم جدید و نیز آنزیم تجاری موجود در آزمایشگاه در کنار نمونه‌ای از شاهد که بدون DNA بود آزمون گردید. غلظت مورد نظر تعیین گردید و متناسب با آن گلیسرول به آنزیم اضافه شد (چیزی حدود ۵۰٪ حجم آنزیم تولید شده). در طی این مدت آنزیم حاصل روی یخ نگهداری گردید. لازم به تذکر است که آنزیم خالص نباید در فریزر نگهداری شود، در غیر این صورت یخ زده و از بین می-رود. مخلوط شدن آن با گلیسرول ضمن تنظیم غلظت، مانع از یخ‌زدگی نیز می‌شود. این اعمال برای هر آنزیم سه بار تکرار گردید تا ضمن اطمینان از حصول نتیجه واحد در انجام مکرر این روش در استحصال آنزیم‌ها، به میزان کافی نیز آنزیم تولید شود. از آنزیم‌های حاصل در اجرای آزمایش‌های متعددی (Mirzaie-Nodoushan, 2004, 2007) از جمله کلن کردن ژن RGL2 استفاده شد و نتایج رضایت‌بخشی حاصل گردید.

نتایج و بحث

برای انتقال پلاسمید حامل ژن تولیدکننده آنزیم‌ها به باکتری *E. coli* از سوش P-magic باکتری مذکور استفاده گردید. به دلیل استفاده از دو آنتی‌بیوتیک کانامایسین و آمپی‌سیلین که جهت انتخاب باکتریهای واجد پلاسمید مورد نظر به‌کار گرفته شده بودند، کلنی‌های مناسبی از باکتری‌های تراریخته ایجاد شد و در ادامه چندین ظرف با تراکم‌های متفاوتی از باکتری‌های تراریخته بر روی محیط‌کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر بدست

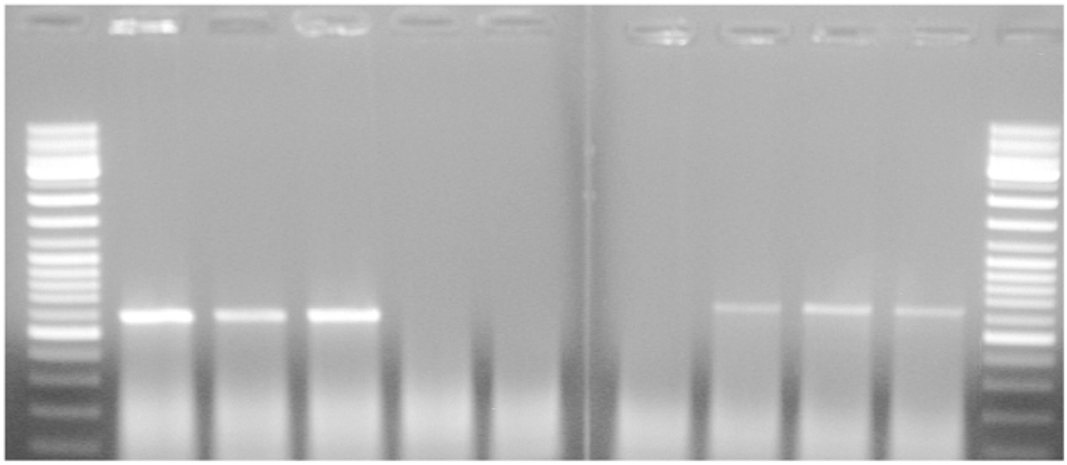
Archive of SID

www.SID.ir

آمد. با جدا کردن آنزیم از سایر بقایای باکتری و اضافه کردن بافر 10x Flow-Thru به مخلوط، حدود ۱۵ میلی-لیتر آنزیم ناخالص حاصل گردید که با استفاده از ستون حامل DEAE-Sepharose خالص گردید. این عمل با موفقیت انجام شد و در مجموع با گذراندن بافر 1x Flow-Thru جهت استحصال آخرین بقایای آنزیم از ستون، ۱۸ ظرف یک میلی‌لیتری آنزیم حاصل گردید. در آزمون آنزیمهای حاصل توسط ماده رنگ‌آمیزی Bradford ظروف شماره ۱، ۲ و ۱۸ نامناسب تشخیص داده شده و حذف گردیدند. در نهایت ۱۵ میلی‌لیتر آنزیم از این آزمون گذشت. با به غلظت رساندن این مقدار آنزیم در نهایت ۳۰ میلی‌لیتر آنزیم تازهDNA پلیمراز *Taq* حاصل شد.

در ارزیابی تکمیلی آنزیم حاصل با استفاده از DNA و پرایمر شناخته شده و در کنار آنزیم تجاری موجود در آزمایشگاه قطعاتی از DNA به طول ۵۰۰ جفت باز تولید شد. با این تفاوت که توان تولید آنزیم جدید به مراتب بیش از آنزیم تجاری و قدیمی موجود در آزمایشگاه بود. شدت و وضوح باندهای ایجاد شده توسط آنزیم جدید در شکل شماره ۱ شاهد این مدعا می‌باشد. در نمونه بدون DNA نیز باندی تشکیل نگردید. تولید آنزیم *Pfu* نیز به همین ترتیب و با موفقیت انجام شد. در تولید آنزیم *Pfu* نیز در هر دور تولید به طور متوسط ۲۵ میلی‌لیتر آنزیم حاصل گردید که آزمون‌های لازم حاکی از صحت و دقت لازم در انجام کار بود.

با توجه به اهمیت و سطح کاربرد آنزیم‌های *Taq* و *Pfu* در مطالعات زیست‌شناسی مولکولی، روش مورد استفاده در تولید این آنزیم‌ها روشی کاربردی و مقرون به صرفه می‌باشد. علاوه بر این، سهولت تولید آنزیم‌ها در روش به‌کار رفته و نیز صحت و دقت عمل آنزیمهای تولید شده تولید محلی آنها را در سطح آزمایشگاه‌ها به خوبی توجیه می‌کند.



شکل ۱ – مقایسه شدت باندهای تولید شده ۵۰۰ جفت بازی توسط آنزیم تولید شده در این بررسی و آنزیم تجاری *Taq* موجود در آزمایشگاه با و بدون نمونه DNA

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولان محترم موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور که امکان اجرای این پروژه را در اختیار اینجانب قرار دادند قدردانی می‌شود. همچنین از پروفسور کاتلر (استاد دانشگاه تورونتو از کانادا) که ضمن راهنمایی و همکاری بی‌دریغ، سخاوتمندانه امکانات مورد نیاز این تحقیق را فراهم نمودند بی‌نهایت سپاسگزارم.

منابع مورد استفاده

–Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K., 1999. Short Protocols In Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc. USA.

–Barnes, W. M., 1992. The fidelity of *Taq* polymerase catalyzing PCR is improved by n N-terminal deletion, Gene, 112: 29-35 .

–Cariello, N. F., Swenberg, J. A. and Skopek, T. R., 1991. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis, Nucleic Acids Res., 19: 4193-4198.

–Carroll, N. M., Adamson, P., and Okhravi, N., 1999. Elimination of bacterial DNA from *Taq* DNA polymerases by restriction endonuclease digestion. J. Clin. Microbiol., 37: 3402–3404.

–Cha, R. S. and Thilly, W. G., 1993. Specificity, efficiency and fidelity of PCR. PCR Methods Appl., 3: 18-29.

–Eckert, K. A., and Kunkel T. A., 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase, Nucleic Acids Res., 18: 3739-3744 .

–Hughes, M. S., Beck, L. A., and Skuce, R. A., 1994. Identification and elimination of DNA sequences in *Taq* polymerase. J. Clin. Microbiol., 32:2007–2008.

–Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S. Y., Landre, P. A., Abramson, R. D., and Gelfand, D. H., 1993. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity, PCR Methods Appl., 2: 275-287.

–Li, Y., Mitaxov, V., and Waksman, G., 1999. Structure-based design of *Taq* DNA polymerases with improved properties of dideoxynucleotide incorporation . Proc. Natl. Acad. Sci., 96: 9491–9496.

–Maiwald, M., Ditton, H. J., Sonntag, H. G., and von-Knebel-Doeberitz, M., 1994. Characterisation of contaminating DNA in *Taq* polymerase which occurs during amplification with a primer set for Legionella 5S ribosomal RNA. Mol. Cell Probes., 8: 1–14.

–Meier, A., Persing, D. H., Finken, M., and Bottger, E. C., 1993. Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. J. Clin. Microbiol., 31: 46–652.

–Mirzaie-Nodoushan, H., 2004. Discrimination of sequences flanking T-DNA insertions using TAIL-PCR in *Arabidopsis thalina* genome. Pajouhesh & Sazandegi, 65: 67-77.

–Mirzaie-Nodoushan, H., 2007. Cloning the *RGL2* gene from *Arabidopsis thalina* genomic DNA. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetics Research. 15: 265-272.

–Rand, H. R., and Houck, H., 1990. *Taq* polymerase contains bacterial DNA of unknown origin. Mol. Cell Probes., 4:445–450.

–Sarkar, G., and Sommer, S. S., 1993. Removal of DNA contamination in polymerase chain reaction reagents by ultraviolet irradiation. Methods Enzymol., 218: 381–388.

Archive of SID

www.SID.ir

Pilot production of *Taq* and *Pfu* DNA polymerases

H. Mirzaie-Nodoushan

Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R.Iran. E-Mail: nodoushan2003@yahoo.com

Received:16.06.2008 Accepted: 03.01.2009

Abstract

Taq and *Pfu* DNA polymerases are two important enzymes in molecular biology studies. They are widely used in all molecular biology laboratories. Simple method of production and purification of the two enzymes is reported here to locally supply laboratories with high consumption level. Plasmids containing the *Taq* and *Pfu* genes were separately transformed to an *E. coli* strain. The transformed bacteria were grown on liquid 2x SOB culture medium for 4.5 hours. Bacterial cultures were induced to produce the enzymes. Extraction and purification of the enzymes was conducted as presented in this study. Bradford assay was used to determine the enzyme concentration. The activity and efficiency of *Taq* and *Pfu* enzymes produced here were compared to a commercial enzyme by amplifying a known genomic fragment of *Arabidopsis thaliana* ecotype Colombia. Therefore, the enzyme production method adopted in this study was efficient in producing high purity *Taq* and *Pfu*.

Keywords: *Taq* enzyme, *Pfu* enzyme, DNA polymerase, Gene transformation, Enzyme purification.

Archive of SID

www.SID.ir