University of Isfahan

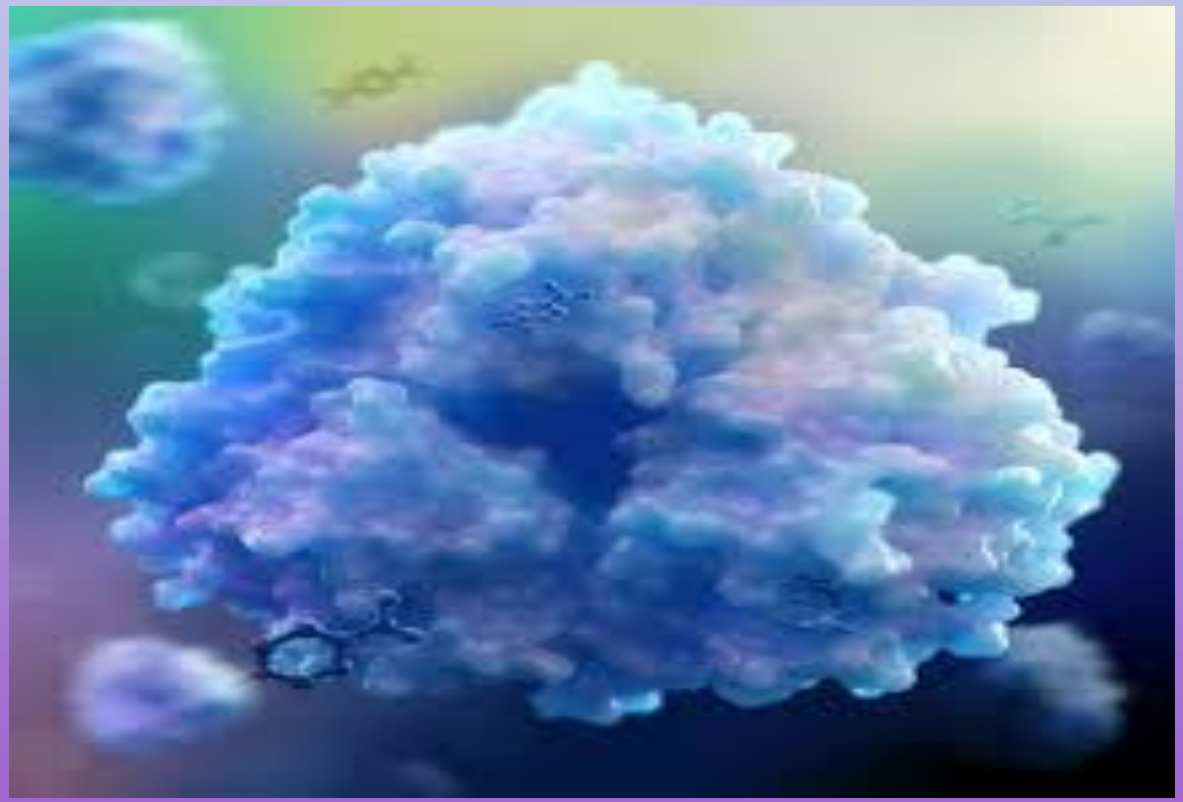
Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

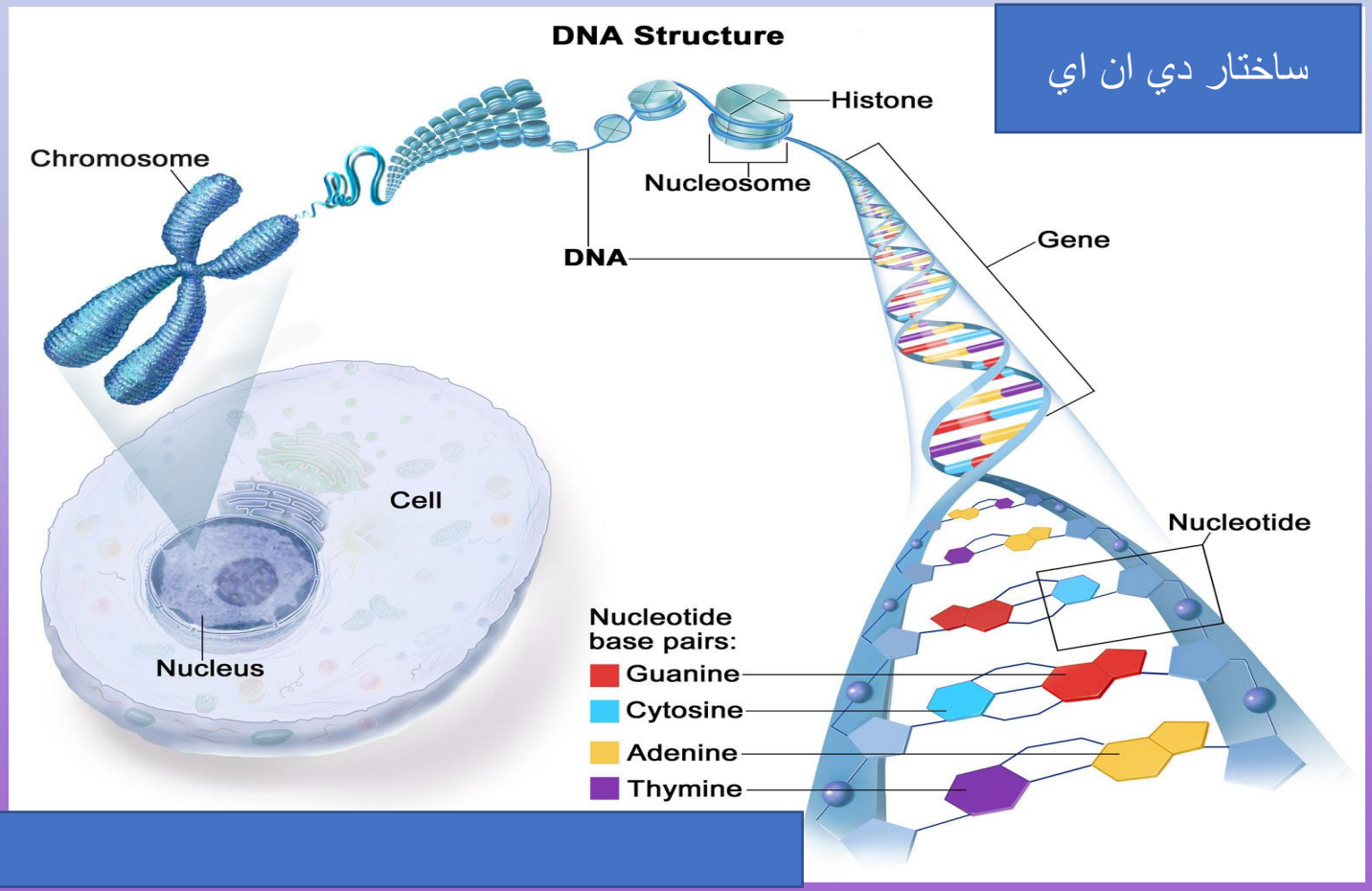
Farzaneh Forouharfar

هضم آنزیمی
(Enzymatic Digestion)

Farzaneh Forouharfar



ساختار دي ان اي



مقدمه

محصول PCRدر دو انتهای خود دارای جایگاه برش آنزیم EcoRI می‌باشد. وکتور PSVM dhfr نیز که برای کلونینگ این قطعه استفاده شد دارای یک جایگاه منفرد EcoRI می‌باشد.

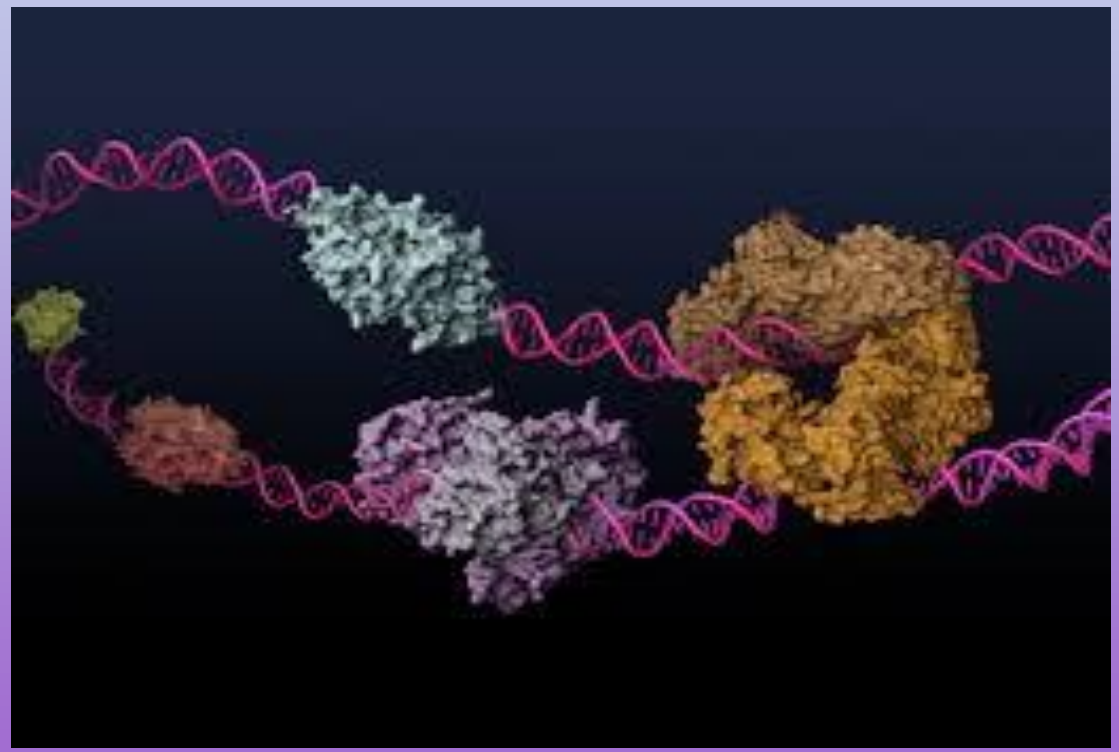
آنزیم محدود کننده EcoRI:

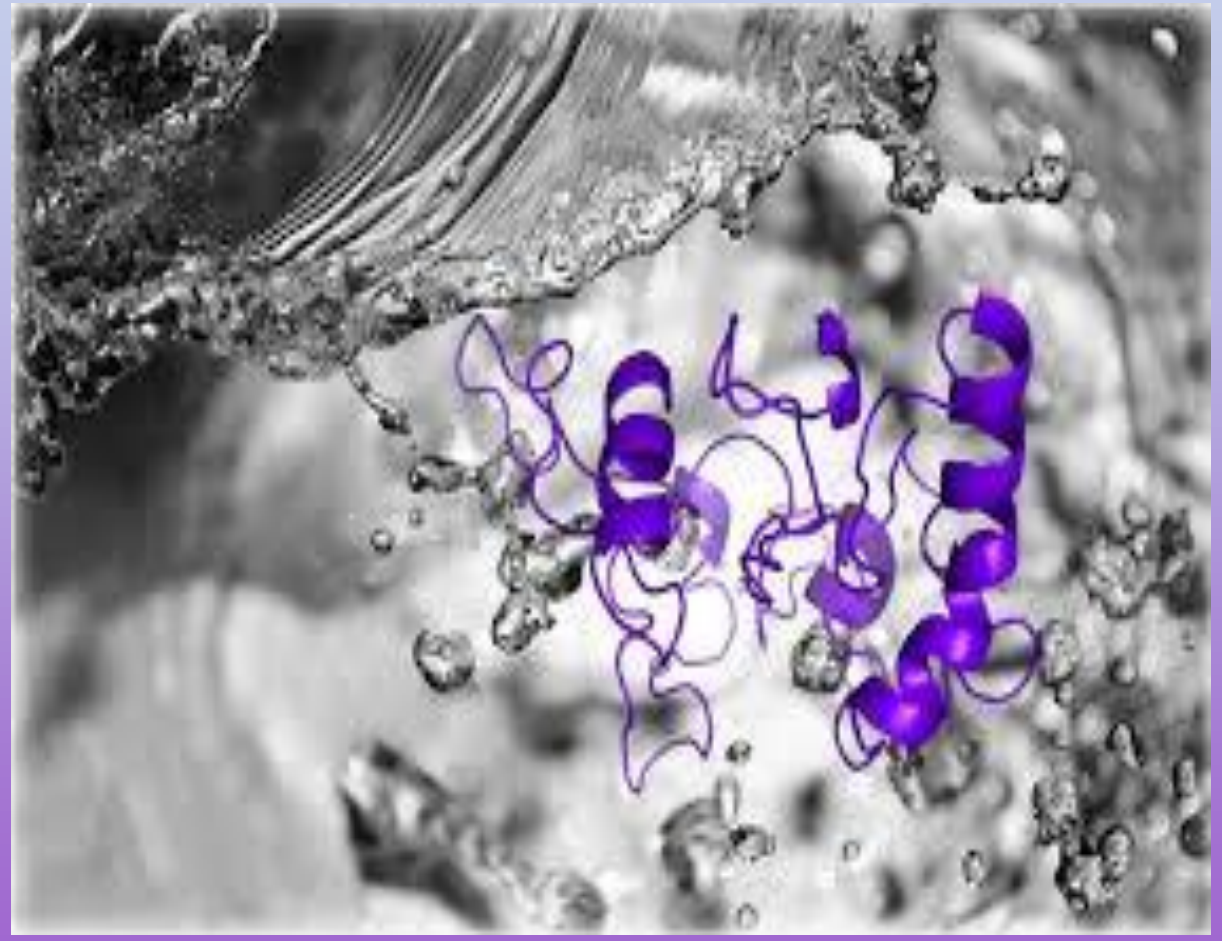
۱) جایگاه شناسایی و برش این آنزیم 5’ G|AATTC 3’ می باشد.

۲) درجه حرارت مناسب برای فعالیت آنزیم ۳۷ درجه سانتیگراد است.

۳) در بافر 10X buffer EcoRI فعالیت آنزیمی ۱۰۰٪ دارد.

۴) این آنزیم در شرایط نامناسب star activity نشان می‌دهد.





نکته: زمانیکه می خواهیم از دو آنزیم متفاوت برای هضم آنزیمی استفاده کنیم ممکن است بافر با دمای اپتیمم فعالیت دو آنزیم متفاوت باشد. در صورتیکه آنزیم ها بافر متفاوتی داشته باشند در ابتدا سعی می شود برای آن یک بافر مشترک تهیه گردد. در حال حاضر بافرهایی به نام tango طراحی شده‌اند که در آنها، اکثر آنزیم ها فعالیت خود را حفظ می‌کنند.

در صورتی که بافر مشترکی وجود نداشته باشد، باید پس از هضم DNAبا آنزیم اول، DNA برش یافته را در معرض برش با آنزیم دوم قرار داد.

مشکل دیگر در کار با آنزیم‌ها، دمای اپتیمم متفاوت آنهاست که اگر در خارج از این دما قرار گیرند ممکن است star activity ایجاد کنند. برای رفع این مشکل در بعضی موارد می توان از Heat inactivation استفاده کرد. بعضی از آنزیم‌ها در درجه حرارت های بالا (۶۵ درجه به بالا) غیر فعال می شوند، بنابراین به راحتی می توان آنها را پس از مدت لازم جهت digestion توسط حرارت غیر فعال نمود و پس از آن از آنزیم دوم در درجه حرارت مورد نیاز آن استفاده شود.

مراحل کار:

ترکیبات زیر را به ازای 1µg از DNA در اپندروف با هم مخلوط کنید:

EcoRI: 0.5 µg
Template (Plasmid/insert): 1 µg
EcoRI buffer (10X): 4 µl
H_2O : up to 40 µl

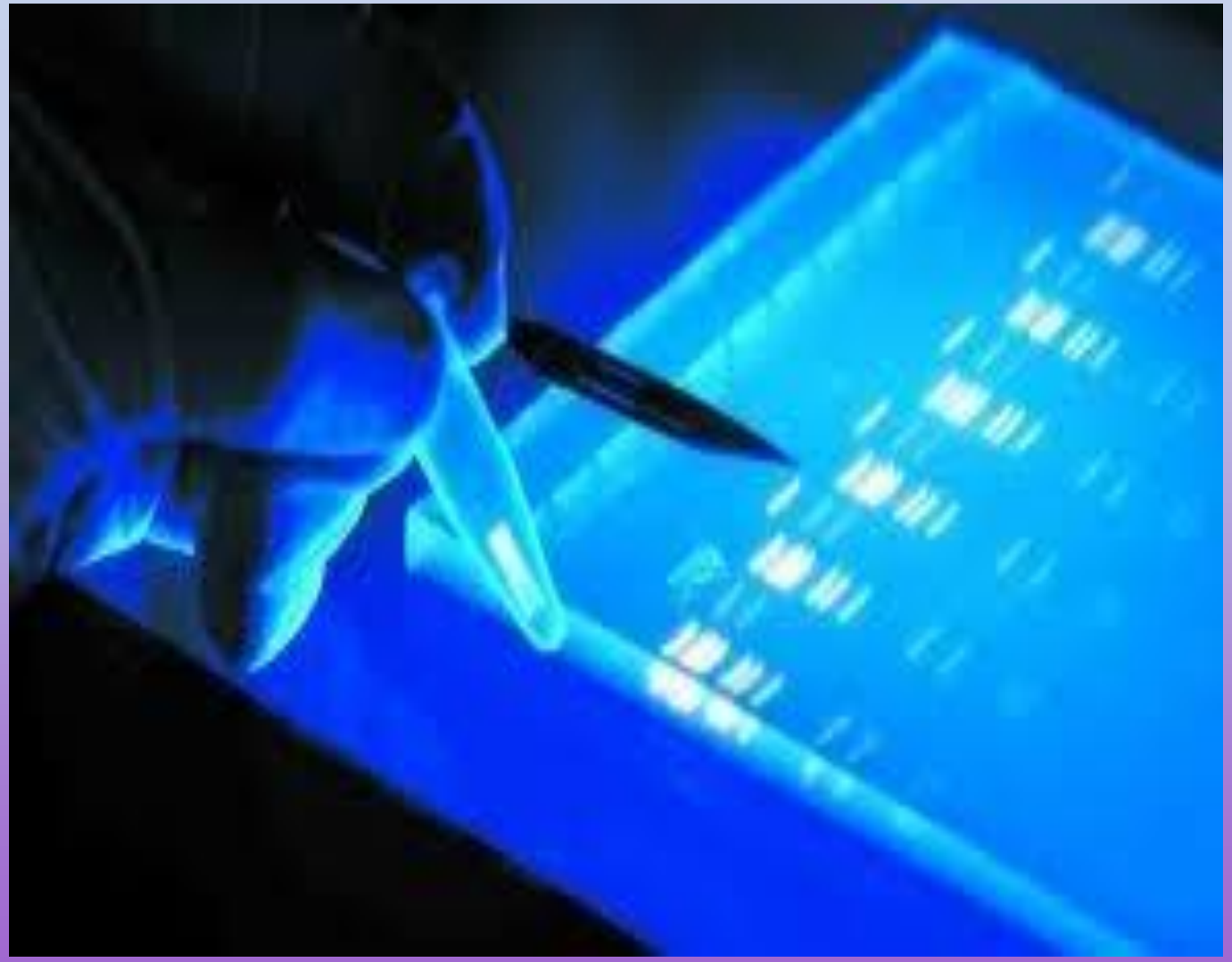
نمونه های برش یافته باید به مدت ۱۶-۱ ساعت در دمای مناسب آنزیم (برای EcoR1 ۳۷ درجه) قرار گیرند.

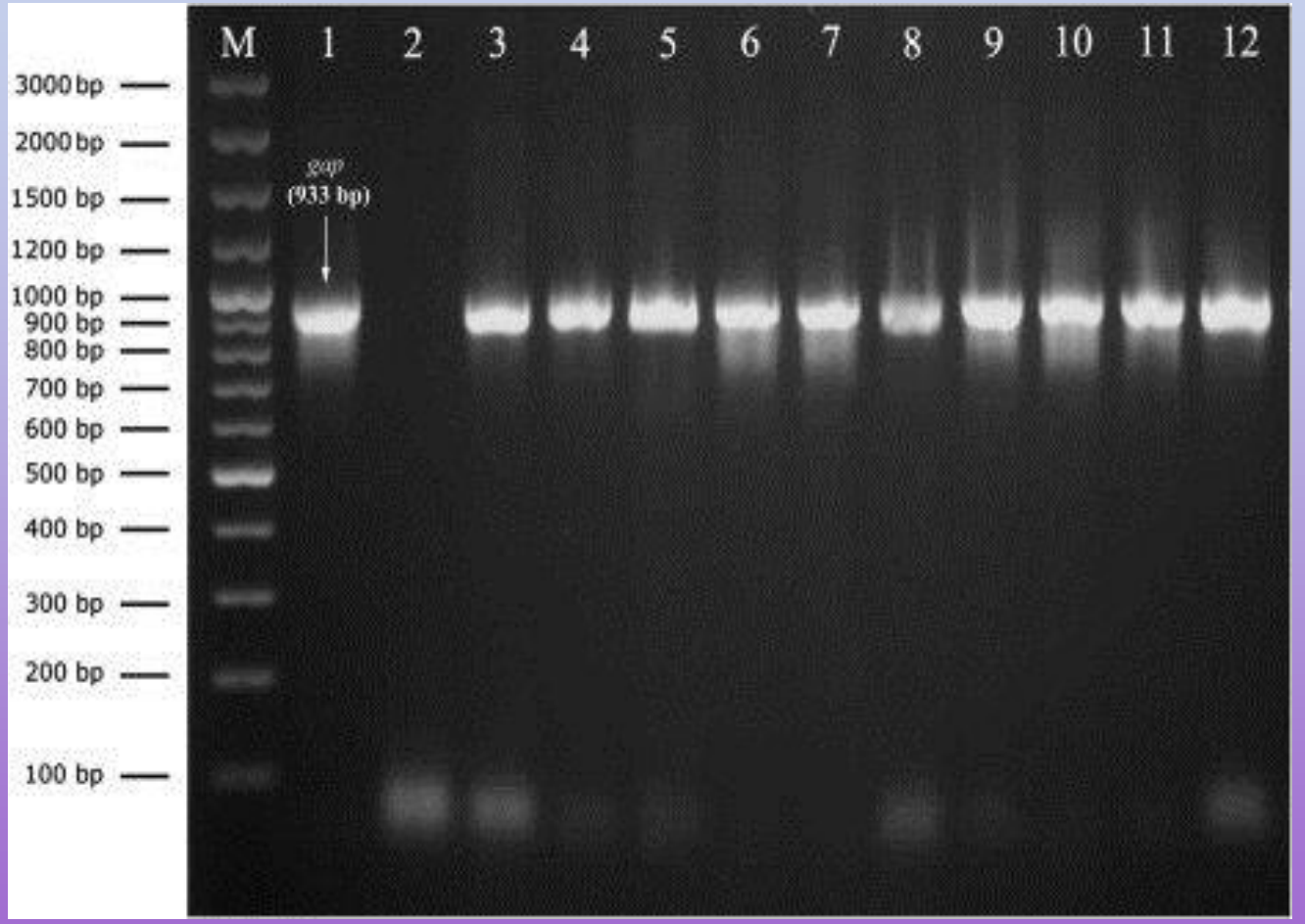
۲. این مرحله آماده کردن ژل TAE ۱% است که در اینجا چون نمونه شما ۴۰ میکرو لیتر است باید چاهک‌های بزرگتری داشته باشید. برای تهیه این چاهک‌ها با دانستن این مورد که هر چاهک چه حجمی را در بر می گیرد ، می توان تعداد معینی از آنها را به هم متصل کرد تا حجم مطلوب ایجاد شود .

نکته: مقدار آنزیم مورد نیاز جهت هضم کل DNAمورد استفاده بستگی به غلظت DNA و آنزیم (unit/ µl) دارد. هرunit آنزیم مقداری از آنزیم است که ۱ نانوگرم از DNA را به مدت ۱ ساعت در شرایط اپتیمم آنزیم، برش می دهد.

بنابراین میزان مورد نیاز هر آنزیم به غلظت خود آنزیم (تعداد unit در میکرولیتر) نیز بستگی دارد. به هر حال اگر به دلیل زیاد بودن میزان DNA به میزان زیادی از آنزیم نیاز است ، خصوصا در مورد double digestion چون از دو آنزیم نیز استفاده می‌شود، بنابراین بهتر است میزان مورد نیاز آنزیم در طی دو مرحله مجزا به محلول DNA اضافه شود (۲/۳ میزان مورد نیاز در هنگام شروع digestion و بقیه بعد از ۱.۵ ساعت به محلول اضافه می شود.)

۳. پس از پایان ژل الکتروفورز با مقایسه محل قرارگیری باندها با مارکر می‌توان جایگاه ژن مورد نظر برای انتقال و قطعه حامل از آن را که بعدا مورد نیاز است پیدا کرد. در مرحله بعد، استخراج DNA از ژل صورت می‌گیرد و پس از آن غلظت DNA استخراج شده برای انجام Ligation محاسبه می‌گردد.




M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
3000 bp
2000 bp
1500 bp
1200 bp
1000 bp
900 bp
800 bp
700 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp
gap
(933 bp)