جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

استخراج و خالص سازی آنزیم DNA پلی‌مراز باسیلوس کالدوتناکس جدا شده از آب گرم قاینارجه سبلان

دکتر محمّد اصغرزاده ♣ دکتر عبداناصر رفیع ♠
دکتر محمّدعلی حسین‌پور فیضی ♦ دکتر علی‌اکبر محمّدی ♥
دکتر محمّد ارجمند ● دکتر محمّد عزیزی ▫

آنزیم DNA پلی‌مراز همانندسازی DNA را به عهده دارد و در تحقیقات مولکولی آنزیم‌های DNA پلی‌مراز خصوصاً انواع مقاوم به حرارت از اهمّیّت بسزایی برخوردارند. در این تحقیق، از باکتری باسیلوس کالدوتناکس مقاوم به حرارت جدا شده از آب گرم قاینارجه منطقهٔ سبلان، آنزیم DNA پلی‌مراز مقاوم به حرارت استخراج گردید. برای این کار باکتری‌ها در محیط Luria-Bertani کشت و در فاز لگاریتمی برداشته شدند ، عصارهٔ خام سلّولی با استفاده از لیزوزیم و سونیکاسیون تهیّه گردید خالص‌سازی به کمک رسوب با سولفات آمونیوم و سه مرحلهٔ کروماتوگرافی به ترتیب با DEAE سفادکس، فسفوسلولز و هپارین سفاروز صورت گرفت و آنزیم DNA پلی‌مراز ۱۲٤ برابر تخلیص گردید و در نهایت آنزیم با فعّالیّت ویژه (U/mg) ۲۱٦/۷ تهیّه شد. DNA پلی‌مراز استخراجی بیشترین فعّالیّت را در ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد داشت. وزن مولکولی آنزیم DNA پلی‌مراز استخراجی حدود ۹۲۰۰۰ دالتون تعیین گردید و مشخّص گردید که یک پروتئین مونومر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس کالدوتناکس؛ آنزیم DNA پلی‌مراز؛ خالص‌سازی.*

♣ – مربی گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
♠ – دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
♦ – استاد گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه تبریز
♥ – دانشیار مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی
● – استادیار انستیتو پاستور ایران
▫ – مربی انستیتو پاستور ایران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدّمه

DNA پلی‌مرازها (EC2.7.7.7)، عمل همانندسازی و ترمیم DNA را در موجودات زنده به عهده دارند. DNA پلی‌مراز سنتز DNA مکمّل را در جهت ۵ به ۳ (۳-۵) و از روی رشتهٔ الگو انجام می‌دهد. DNA پلی‌مراز همانندسازی را در حضور دراکسی ریبونوکلئوزید تری‌فسفات و کاتیون دو ظرفیّتی Mg^{2+} انجام می‌دهد (۱).

موجودات زنده به تناسب ویژگی‌های ساختاری محیط‌های متفاوتی برای تداوم حیات طلب می‌کنند، از آن جمله میکروارگانیسم‌هایی مثل ترموفیل‌ها در شرایط دمایی بالا قادر به زندگی می‌باشند (۲) و لذا آنزیم DNA پلی‌مراز ترموفیل‌ها، همانندسازی را در دمای بالا انجام می‌دهد و در نتیجه مقاوم به حرارت می‌باشد. DNA پلی‌مرازهای مقاوم به حرارت اهمّیّت بسزایی در تحقیقات در زمینهٔ بیولوژی مولکولی دارند (۳).

آنزیم DNA پلی‌مراز مقاوم به حرارت از باکتری‌های مختلف مانند :

(4) Aquaticus YT - 1 - Thermus
(5) Thermus Thermoplasma HB - 8
(6)Thermoplasma acidophilum,sulfolobus solfataricus
(7) Bacillus stearothermophilus.
(8) Thermus caldophilus GK24.

caldophilus GK ۲٤ (۳) استخراج و خالص شده است. از باکتری‌های مقاوم به حرارت می‌توان از باسیلوس کالدوتناکس نام برد که ترموفیل‌ترین باسیلوس می‌باشد و قادر به رشد در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۹). در این مطالعه، از باکتری باسیلوس کالدوتناکس جدا شده از آب گرم معدنی قاینارجه منطقه سبلان با دمای C ۸۲ آنزیم DNA پلی‌مراز استخراج و خالص گردید و خصوصیّات آن تعیین شد.

روش پژوهش

موّاد مورد نیاز: DEAE – سفادکس، فسفوسلولز، هپارین سفاروز CL - 6B ،کیت DNA Polymerase Assay, PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) ، لیزوزیم، DTT, Tris , Twee - 20 ، EDTA ، گلیسرول، KCI و سایر موادّ لازم.

استخراج و تخلیص آنزیم DNA پلی‌مراز شامل مراحل ذیل بود و تمام مراحل خالص‌سازی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

۱ – تهیّهٔ عصارهٔ خام سلّولی

برای این منظور باکتری‌ها در محیط کشت Luria - Bertani (LB) دارای Yeast extract = ۵ gr,bacto - trypton =۱۵ gr Na= Cl ۵ gr (PH =۷) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدّت ٤۸ ساعت بصورت هوازی کشت داده شدند و از کشت فوق به نسبت ۱ به ۱٦ به محیط کشت تازه LB منتقل شد و به مدّت ۲۰ ساعت در ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد بصورت هوازی انکوبه گردید و در g ۷۵۵۰ به مدّت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و در نهایت ۵۰ گرم خمیر باکتری تهیّه گردید و باکتری‌ها دو بار با ml ۲۰۰ از بافر (۱۰ mM EDTA , ۷/۵ mM Tris - HCL, PH= ۵۰) TE شستشو داده شدند و در نهایت باکتری‌ها در ml ۱٦۰ از بافر (PH =۷/۵) ۵۰ mM Tris - HCL و ٤ mM KCL، ۰/۵ mM EDTA، ۱ Mm dTT، ۱ mM PMSF، Tween 20 - ۰/۰۱ (V/V) و گلیسرول ۱۰ درصد (V/V) (بافر A) بصورت سوسپانسیون درآورده شدند و ۱۰۰ mg لیزوزیم

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اضافه شده و ٦٠ دقیقه در ٤ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس سلّول‌ها تحت تأثیر سونیکاتور به مدّت ٢٠ دقیقه قرار داده شدند و در g ٧٥٥٠ به مدّت ٤٥ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. عصارهٔ خام سلّولی جدا شد و تفاله کنار گذاشته شد.

٢ – رسوب با سولفات آمونیوم

به عصارهٔ خام سلّولی تهیّه شده (ml ١٥٠) به آرامی پودر سولفات آمونیوم به مقدار ٨٤/١٥ گرم اضافه گردید، در حالی که به ملایمت بر روی بهم زن مغناطیسی بهم زده می‌شد تا غلظت نهایی سولفات آمونیوم به ٨٠ درصد اشباع برسد و بعد از دو ساعت بهم‌زدن، رسوب با g ٧٤٠٠ به مدّت ٧٠ دقیقه سانتریفوژ بدست آمد و سپس رسوب در

٥٥ ml بافر (PH =٧/٥) Tris - HCL ٥٠ mM ،KCL

٤ mM ،EDTA ٠/٥ mM ،DTT ١ mM ،Tween - 20

٠/٠١(V/V) و گلیسرول ١٠ درصد (V/V) (بافر B) حل گردید. محلول دو بار (بار اوّل ٥ ساعت و بار دوم ١٤ ساعت) با ٣٢٠٠ میلی‌لیتر از بافر فوق دیالیز شد و حجم نهایی بعد از دیالیز به حدود ٨٠ میلی‌لیتر رسید.

٣ – کروماتوگرافی با DEAE – سفادکس

محلول حاصل از مرحلهٔ بالا (ml ٨٠) به ستون DEAE – سفادکس (٥٧ cm ×١/٩ cm) Load گردید و (ستون قبلاً با بافر B متعادل شده بود). ستون با ml ٢٠٠ بافر B شستشو داده شد و elution با ml ٣٠٠ بافر B به صورت گرادیان مرحله‌ای KCL از ١ M ٠/٠٤ M صورت پذیرفت. سرعت جریان ml/h ٤٠ بود و فراکسیونهای ٢٠ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید. محلول جمع‌آوری شده با ٣٠٠٠ میلی‌لیتر از بافر B ، دو مرتبه (بار اوّل ٥ ساعت و بار دوم ١٤ ساعت) دیالیز شد.

٤ – کروماتوگرافی با فسفوسلولز

فسفوسلولز ابتدا با بافر B متعادل شد. سپس محلول حاصل از مرحلهٔ بالا به ستون فسفوسلولز(١٠/٥ cm ×٢/٩ cm) Load گردید و ستون با ml ١٠٠ از بافر B شستشو شد و elution با ml ٢٤٠ بافر B با گرادیان مرحله‌ای KCL ١٠٠ mM ٤٠ mM صورت گرفت. سرعت جریان ml/h ٣٠ بود و فراکسیون‌های ١٥ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید. محلول جمع‌آوری شده با ٣٠٠٠ میلی‌لیتر از بافر B دو بار دیالیز شد.

٥ – کروماتوگرافی هپارین سفاروز CL - 6B

محلول حاصله از مرحله ٤ به ستون هپارین سفاروز (٥/٦ cm ×٢/١ cm) که قبلاً با همان بافر B متعادل شده است، Load گردید و ستون با ml ١٠٠ از بافر B شستشو شد و elution با ٢٢٠ میلی‌لیتر از بافر B به کمک گرادیان مرحله‌ای KCL mM ١٠٠٠ ٤٠ mM صورت گرفت. سرعت جریان ml/h ٢٠ بود و فراکسیون‌های ١٠ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید و دیالیز با ٣٠٠٠ میلی‌لیتر بافر B صورت گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین

میزان پروتئین با روش برادفورد تعیین گردید (١٠) و از آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

سنجش DNA پلی‌مراز

برای سنجش DNA پلی‌مراز از کیت Assay DNA Polymerase غیر رادیواکتیو شرکت Roche استفاده گردید. محاسبهٔ فعّالیّت آنزیم در مقایسه با کنترل مثبت کیت که آنزیم Klenow است و همراه کیت می‌باشد، صورت گرفت و سنجش DNA پلی‌مراز در حرارت ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سایر درجات تعیین شد.

تعیین وزن مولکولی

وزن مولکولی DNA پلی‌مراز با استفاده از تکنیک (PAGE - SDS) SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL- ELECTROPHORESIS به روش Laemmli تعیین شد (۱۱) و برای دیدن باندها رنگ‌آمیزی نیترات نقره صورت گرفت. (۱۲)

یافته‌ها

رشد باکتری باسیلوس کالدوتناکس و تولید DNA پلی‌مراز

از ٤٠ لیتر کشت باکتریایی در محیط LB ، پنجاه گرم خمیر باکتری تهیّه شد و باکتری‌ها از کشت ۲۰ ساعت برداشت شدند که در فاز لگاریتمی رشد هستند و تولید DNA پلی‌مراز در بالاترین حدّ می‌باشد.

خالص سازی آنزیم DNA پلی‌مراز

DNA پلی‌مراز، بر طبق روشی که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد، ١٢٤ برابر تخلیص گردید. خلاصه‌ای از نتای خالص‌سازی DNA پلی‌مراز در جدول ۱ نشان داده شده است.

در طیّ مراحل خالص‌سازی، فعّالیّت ویژه افزایش پیدا کرد و در نهایت به ٢١٦/٧ واحد در هر میلی‌گرم از پروتئین توتال رسید (جدول ۱). در طیّ خالص‌سازی محصول تقریباً خالص از آنزیم تهیّه شد که با الکتروفورز PAGE - SDS مشخّص گردید. در کروماتوگرافی با DEAE – سفادکس و فسفو سلولز بیشترین فعّالیّت آنزیم در فراکسیون حاصل از elution با ۲۰۰ mM KCL مشاهده گردید و در کروماتوگرافی با هپارین سفاروز بیشترین فعّالیّت آنزیم در فراکسیون حاصل از elution با ۳۷۵ mM KCL دیده شد.

اثر حرارت بر روی فعّالیّت

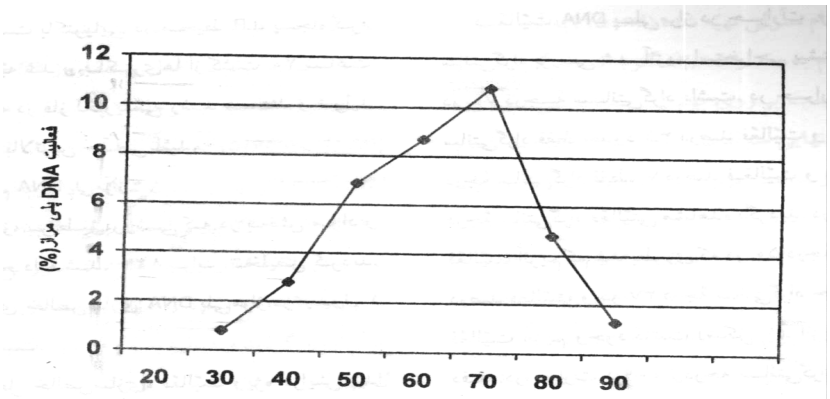
فعّالیّت DNA پلی‌مراز در حرارت ۸۰–۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد بررسی شد. آنزیم استخراجی بیشترین فعّالیّت را در ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد داشت. در حرارت ۷۵ درجهٔ سانتی‌گراد فقط حدود ۳۵ درصد فعّالیّت و در حرارت ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد فقط، ۷ درصد فعّالیّت و در بالاتر از ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد فعّالیّتی مشاهده نگردید. در دمای پایین نیز فعّالیّت آنزیم کم شد بطوری که در ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، ٦٠ درصد فعّالیّت و در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد حدود ۲۰ درصد فعّالیّت آنزیم وجود داشت (شکل ۱). آنزیم همچنین ۳۰ دقیقه در حرارت ۹۵–٦٠ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس در حرارت ۷۰ درجه سانتی‌گراد حرارت فعّالیّت آنزیم بررسی شد و فعّالیّتی مشابه فوق بدست آمد بطوری که بعد از نیم ساعت قرار گرفتن در حرارت ۸۵ درجهٔ سانتی‌گراد، فعّالیّت آنزیم از بین رفت.

وزن مولکولی

وزن مولکولی آنزیم DNA پلی‌مراز استخراجی با استفاده از تکنیک SDS - PAGF حدود ۹۲۰۰ دالتون تعیین گردید و یک پروتئین مونومر می‌باشد.

جدول ۱: خالص سازی آنزیم DNA پلی‌مراز از باسیلوس کالدوتناکس

مراحل خالص‌سازی	حجم (ml)	پروتئین توتال (mg)	فعالیت توتال (U)	فعالیت ویژه (U/mg)	بازده (%)
عصاره خام	۱۵۲	۸۳۶	۱٤۵۷	۱/۷٤	۱۰۰
سولفات آمونیوم	۸۰	۲۵۲	۱۱۶۷	٤/۶۳	۸۰
سفادکس -DEAE	۸۰	۹۶	۱۰۶۷	۱۱/۱۱	۷۳
فسفرسلولز	۶۰	٤/۲	۷۲۵	۱۷۲/۶	۵۰
هپارین سفاروز cl-6 B	۳۰	۱/۵	۳۲۵	۲۱۶/۷	۲۲



نمودار ۱ :فعالیت انزیم در درجه حرارتهای مختلف

بحث

بر اساس روش توصیفی بالا، DNA پلی‌مراز ترموفیل تقریباً خالصی از باکتری باسیلوس کالدوتناکس جدا شده از آب گرم قاینارجه منطقهٔ سبلان، جدا و تخلیص گردید. باکتریها در فاز لگاریتمی رشد (کشت ۲۰ ساعته) برداشته شدند. در این مرحله بیشترین حدّ تقسیم سلّولی و همانندسازی DNA وجود دارد. لذا مقدار DNA پلی‌مراز در بالاترین حد در سلّول باکتری می‌باشد. روش نسبتاً ساده و استانداردی برای خالص‌سازی پروتئین می‌باشد. وزن مولکولی آنزیم استخراجی با SDS - PAGE ، ۹۲۰۰۰ دالتون تعیین گردید و مشخّص شد که آنزیم مونومر می‌باشد.

چندین گزارش وجود دارد که وزن مولکولی DNA پلی‌مرازهای مختلف باکتریایی بویژه DNA پلی‌مرازهای مقاوم به حرارت تقریباً در این حدود می‌باشد، مثلاً وزن مولکولی DNA پلی‌مراز Thermoplasma acidophilum ۸۸۰۰۰ (٦)، DNA

پلی‌مراز Thermus caldophilus GK24 ۹۵۰۰۰(۳)، DNA پلی‌مراز Thermus aquaticus ۹٤۰۰۰ (۱۳) و DNA پلی‌مراز Sulfolobus solfataricus ، ۱۰۰۰۰۰ دالتون (١٤) می‌باشد. DNA پلی‌مرازهای فوق، وزن مولکولی نزدیک به هم و فعّالیّت در درجهٔ حرارت بالایی دارند و احتمال می‌رود که ساختمان DNA پلی‌مراز این باکتریها از نظر اسیدهای آمینه موجود حدّاقل در بعضی موقعیّتها از جمله نواحی اتّصال نوکلئوتیدها و محلّ اتّصال DNA پلی‌مراز به DNA مشابه بوده باشد، بطوری که توسّط Delarue و همکاران، مشابه بودن بخشی از DNA پلی‌مرازها بیان گردیده است (۱۵).

دمای مطلوب برای فعّالیّت آنزیم DNA پلی‌مراز استخراجی ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد می‌باشد، در حالی که دمای مطلوب DNA پلی‌مراز Bacillus stearothermophilus ٦۰ درجهٔ سانتی‌گراد (۸)، DNA پلی‌مراز Thermoplasma acidophilum ٦٥ درجهٔ سانتی‌گراد (٦)، DNA پلی‌مراز Thermus caldophilus GK ٢٤ c ۷۵ درجه (۳) و DNA پلی‌مراز Thermus aquaticus ۸۰ درجه سانتی‌گراد (٤) می‌باشد. در بررسی فعّالیّت آنزیم در دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد به بالا فعّالیّتی مشاهده نشد و از طرفی میکروارگانیسم قادر به تکثیر در دمای ۸۵ درجهٔ سانتی‌گراد می‌باشد. پس در شرایط Invivo در دمای ۸۵ درجهٔ سانتی‌گراد پایداری DNA پلی‌مراز حفظ می‌گردد. واکنش بین اجزاء مختلف سلّول، مسؤول پایداری هر دو پروتئین‌ها و اسیدنوکلئیک باکتری است (۷) احتمالاً اتّصال کوفاکتورها و پروتئین‌های متّصل شونده در این پایداری نقش دارند (١٦).

آنزیم DNA پلی‌مراز توسّط پروتئازها تجزیه می‌شود لذا طیّ استخراج و تخلیص برای جلوگیری از عمل پروتئازها از PMSF استفاده گردید. آنزیمی استخراج نگردید و در تحقیقات قبلی نیز از PMSF استفاده کرده بودند (۸ و ٦،۳).

برای افزایش پایداری آنزیم DNA پلی‌مراز در مقابل حرارت، پایدار کننده‌های مختلفی مانند Tween - 80 ، مانیتول ۵ درصد(۱)، گلیسرول (۱، ٤، ۵، ۷ و ۸)، Tritonx – ۱۰۰ (۱۷ و ۱،٦،١٦)، ژلاتین (۳)، آلبومین سرم گاوی (۸) و ساکاروز (۱۷) استفاده می‌شود که می‌توان از یکی از این مواد یا مجموع آنها استفاده نمود. در این تحقیق از گلیسرول و Tween - 20 به عنوان پایدار کنندهٔ آنزیم در طیّ مراحل تلخیص استفاده گردید و همچنین برای پایداری آنزیم در طیّ نگهداری می‌توان از گلیسرول، آلبومین سرم گاوی و ژلاتین استفاده نمود (۱). البتّه امروزه در اکثر محصولات تجاری از گلیسرول استفاده می‌شود.

برای پاره کردن سلّولها از لیزوزیم و سونیکاسیون استفاده گردید که ایمپسون و همکاران نیز از این روش استفاده کرده بودند (۱) و می‌توان از هموژنایزور تحت فشار kg/cm^2 ٤۰۰ (٦ و ۱۵) و از French press استفاده نمود (۳ و ۸) تا بتوان مقدار بیشتری DNA پلی‌مراز استخراج نمود.

از آنزیم DNA پلی‌مراز فوق می‌توان در همانندسازی DNA ، Site directed mutagenesis و Sequencing در دمای بالا استفاده نمود. به جهت این که آنزیم در شرایط Invivo در دمای ۸۵ درجهٔ سانتی‌گراد قادر به فعّالیّت می‌باشد، پیشنهاد می‌شود که استخراج و تخلیص آنزیم در حضور پایدار کننده‌های دیگری مانند Tritonx - 100 ، مانیتول و ژلاتین صورت گیرد.

تقدیر و تشکّر

از همکاری کارکنان بخش فرآورده‌های سازمان انتقال خون تبریز، آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پیراپزشکی تبریز، خانم شهابی و آقای لطفی تشکّر و قدردانی می‌شود.

Abstract

Extraction and Purifcation of DNA Polymerase Enzyme from Bacillus Caldotenax Isolated from Gainarjah Hot Spa in Sabalan

DNA polymerase enzyme undertakes the DNA replication and in molecular research , DNA polymerase enzymes , especially thermostable enzymes , have great importance . In this reseach , thermostable DNA polymerase is extracted from Bacillus caldotenax isolated from Gainarjah hot spa in Sabalan region . The Bacteria were cultured in Luria-Bertani broth and harvested in logarithm phase . Crude cell extracts were prepared using lysozyme and sonication . Purification was performed by ammonium sulfate precipitation and three steps of chromatography with DEAE-sephadex , phosphocellulose and Heparin sepharose . DNA polymerase enzyme was purified 124-fold and specific activity of the purified enzyme was 216.7 (U/mg). DNA polymerase had the highest activity at 70 ٠c . The molecular weight of the enzyme was determined to be approximately 92000 dalton using SDS-PAGE .

Key Words: *Bacillus Caldotenax ; DNA Polymerase Enzyme ; Purification*

منابع

1 - Simpson, H. D. Coolbear, T. Vermue, M. & Daniel, R. M. Purification and some properties of a thermostable DNA polymerase from a thermotoga species. Biochem. Cell. Biol 1990 ; 68:1292_1295.

2 - Brock, T. D. Life at high temperatures. Science 1985 ; 230:132-138.

3 - Park, J. H. Kim, J. S. Kwon, S. T. & Lee, D. S. Purification and characterization of Thermus caldophilus Gk24 DNA polymerase. Eur. J. Biochem 1993; 214 : 135-140.

4 - Chien, A. Edgar, D. B. & Trela, J. M. Deoxyribonucleic acid polymerase from extreme thermophile Thermus aquaticus. Journal of Bacteriology 1976 : 127(3) : 1550-1557.

5 - Ruttimann, C. , Cotoras, M. , Zaldivar, J. & Vicuna, R. DNA polymerases from extremely thermophilic bacterium Thermus thermophilus HB-8. Eur. J. Biochem 1985 ; 149:41-46.

6 - Hamal, A. Forterre, P. & Elie. C. Purification and characterization of a DNA polymerase from the archaebacterium Thermoplasma acidophilum. Eur. J. Biochem 1990; 190(3): 517-521.

7- Rella, R. Raia, C. A, Pisani, F. M. D, Auria, S. Nucci, R. Gambacorta, A. De Rosa, M. & Rossi, M. Purification and properties of a thermophilic and thermostable DNA polymerase from the archaebacterium Sulfolobus solfataricus. Ital. j. Biochem 1990 ; 39(2): 83-99.

8- Kaboev, O. K. Luchkina, L. A. Akhmedov, A. T. & Bekkev, M. L. Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from Bacillus stearothermophilus. Journal of Bacteriology 1981; 145 (1):21-26.

9- Sharp, R. J. Bown, K. J. & Tkinson, A. A. phenotypic and genotypic characteization of some thermophilic species of bacillus. Journal of General Microbiology 1980; 117 : 201-210.

10- bradford, M. MA rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein of protein_dye binding. Analytical Biochemistry 1976 ; 72 : 248-254.

11- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bactriophage T4. N ature 1970; 227 : 680-685.

12- Switzer, R. C. Merril, C. R. & Shifrin, S. A highly sensitive silver stain for detecting protein and peptides in polyacrylamid gels. Analytical Biochemistry 1979 ; 98 : 231-237.

13- Lawyer, T. C. Stoffel, S. Saiki, R. K. Myambo, K. Drummond, R. & Gefand, D. H. Isolation, characterization and expression in Escherichia.

14- Pisani, F. M; De Martino, C. & Rossi, A DNA Polymerase from the archaeon Sulfolobus solfataricus shows sequence similarity to family B DNA Polymerases. Nucleic Acid Research 1992; 20 (11): 2711 - 2716.

15- Delarue, M; Poch, O; Tordo, N; Moras, D. & Argos, P. An attempt to unify the structure of polymerases. Protein Engineering 1990; 3 (6): 461 - 467.

16- Elie, C; De Recondo, A. M. & Forterre, P. Thermostable DNA Polymerase from the archaebacterium Sulfolobus acidocaldarius. Eur. J. Biochem 1989; 178: 619 - 626.

17- Salhi, S; Elie, C; Jean - Jean, D; Meurier - Rotival, M; Forterre, P; Rossignol, J. M. & De Recondo, A.M. DNA polymerase from the archaebacterium sulfolobus acidocaldarius: A thermophilic and The thermoresistant enzyme which can perform automated polymerase chain reaction - Biochemical an Biophysical Research communications 1990; 167(3):1341 - 1347.