

آنزیم فیوژن نو ترکیب (Recombinant Phusion)

(Cat-No: □ M1111-100, □ M1111-500)

الف) مقدمه

آنزیم‌های DNA پلیمراز با صحت بالا (High fidelity DNA polymerases) برای تکثیر توالی‌هایی که نیاز به تصحیح جهش در حین انبوه سازی دارند، حیاتی هستند. آنزیم DNA پلیمراز فیوژن یک آنزیم دارای عملکرد قوی و صحت بالایی می‌باشد که در تمامی کاربردهای PCR می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. این آنزیم دارای یک ساختار خاص می‌باشد، یعنی به دلیل داشتن دُمین اضافی سرعت و صحت را افزایش می‌دهد. این آنزیم برای تکثیر قطعات DNA در کلون‌سازی ژن و قطعات طولی ایده‌آل می‌باشد. فیوژن با میزان خطای ۵۰ برابر کمتر از DNA پلیمراز Taq و ۶ برابر کمتر از آنزیم DNA پلیمراز Pfu، یکی از آنزیم‌های دقیق در تکثیر ژن توسط PCR است. این آنزیم دارای فعالیت پلیمرازی ۳' → ۵' و فعالیت اگزونوکلئازی ۵' → ۳' می‌باشد و تولید محصولاتی با انتهای صاف (blunt) می‌کند. به همراه آنزیم فیوژن یک بافر استاندارد 5X Phusion HF، به علاوه یک بافر 5X Phusion GC ارسال می‌شود که برای الگوهای پیچیده یا غنی از GC می‌توان مورد استفاده قرار داد. هر کدام از بافرها دارای $MgCl_2$ نیز می‌باشند. به علاوه، واکنش‌های PCR را می‌توان با استفاده از DMSO و $MgCl_2$ که همراه آنزیم ارسال می‌شود، نیز بهینه سازی کرد.

ب) کاربردهای فیوژن

- ۱- کلونینگ
- ۲- PCR با صحت بالا
- ۳- تکثیر قطعات طولانی و سخت
- ۴- جهش زایی هدفدار
- ۵- تکثیر دقیق توالی‌های ژنی باکتری‌ها به منظور تعیین توالی

ج) محتویات کیت

ردیف	اجزای کیت	مقدار
۱	آنزیم فیوژن (۲ U/μl)	۱۰۰ یا ۵۰۰ واحد
۲	بافر 5X HF	۱ میلی لیتر
۳	بافر 5X GC	۱ میلی لیتر
۴	DMSO	۵۰۰ میکرولیتر
۵	$MgCl_2$	۱ میلی لیتر
۶	نمونه کنترل مثبت برای آنزیم و PCR	۱۰ میکرولیتر

نگهداری: کیت فیوژن بر روی یخ منتقل می‌شود و بلافاصله پس از رسیدن در دمای $20^{\circ}C$ - نگهداری شود.

د) معرف‌هایی که توسط محقق باید تامین شود:



۱- مخلوط dNTPs

۲- پرایمرهای پیشرو (Forward) و معکوس (Reverse)

۳- DNA الگو

۴- آب عاری از نوکلئاز

۵- روش انجام PCR

دستورالعمل حاضر برای واکنش‌های معمولی PCR می‌باشد. تکثیر الگوهایی با GC بالا، ساختارهای ثانویه بالا و غلظت‌های پایین الگو یا قطعات طویل نیاز به بهینه‌سازی بیشتری دارد.

۱- راه‌اندازی واکنش (Reaction Setup)

توصیه می‌شود اجزای واکنش PCR را در روی یخ مخلوط شود و سریع به ترموسایکلر منتقل شود. توجه شود که ترموسایکلر قبل از انتقال اجزای واکنش در دمای دناتوراسیون 98°C تنظیم شده باشد سپس تمامی اجزا مخلوط شده و قبل از استفاده سانتیفریوژ شود. قابل ذکر است ممکن است پروتکل فیوژن با پروتکل پلیمرزهای استاندارد کمی متفاوت باشد.

شرایط پیشنهادی زیر برای PCR های معمولی است و برای سایر PCR ها باید بهینه‌سازی شود.

غلظت نهایی	واکنش ۵۰ μl	واکنش ۲۵ μl	اجزا
۱X	۱۰ μl	۵ μl	بافر (5X Phusion HF) یا GC
۲۰۰ μM	۱ μl	۰/۵ μl	۱۰ mM dNTPs
۰/۵ μM	۲/۵ μl	۱/۲۵ μl	پرایمر پیشرو (Forward) ۱۰ μM
۰/۵ μM	۲/۵ μl	۱/۲۵ μl	پرایمر معکوس (Reverse) ۱۰ μM
(۳٪)	(۱/۵ μl)	(۰/۷۵ μl)	DMSO (اختیاری)
/ واحد ۱/۰ ۵۰ μl PCR	۰/۵ μl	۰/۲۵ μl	DNA پلیمرز فیوژن
<۲۵۰ ng	متغیر	متغیر	DNA الگو
	به حجم ۵۰ μl	به حجم ۲۵ μl	آب دیونیزه بدون نوکلئاز

۲- برنامه PCR

زمان	دما	مرحله
۳۰ ثانیه	98°C	دناتوراسیون اولیه
۵-۱۰ ثانیه	98°C	۳۰-۳۵ چرخه
۳۰-۱۰ ثانیه	$72-45^{\circ}\text{C}$	
۱۵-۳۰ /kb ثانیه	72°C	

تکثیر نهایی	۷۲°C	۵-۱۰ دقیقه
نگهداری	۴°C	نامحدود

۳- توصیه‌های عمومی

استفاده از الگوهای DNA با خلوص بالا و کیفیت بالا موفقیت واکنش PCR را افزایش می‌دهد. مقادیر DNA الگو برای یک واکنش با حجم ۵۰ μl به صورت زیر است.

DNA	مقدار
ژنوم	۲۵۰-۵۰ ng
پلاسمید یا ویروس	۱ pg - ۱۰ ng

توجه شود اگر الگو cDNA است حجم الگوی مورد استفاده کمتر از ۱۰٪ از حجم کل واکنش باشد.

۴- پرایمرها

طول پرایمرهای مورد استفاده بهتر است ۲۰-۴۰ نوکلئوتید باشد و مقادیر GC آنها بین ۴۰-۶۰٪ می‌باشد. غلظت نهایی هر پرایمر در واکنش PCR برای DNA پلیمرز فیوژن بین ۱-۲ μM می‌تواند متغیر باشد. توصیه می‌شود غلظت ۰/۵ μM استفاده شود.

۵- منیزیم و سایر افزودنی‌ها

Mg²⁺ برای فعالیت DNA پلیمرز فیوژن ضروری است غلظت Mg²⁺ در بافر HF 1X و GC ۱/۵ میلی مولار است. غلظت بالای Mg²⁺ از دناتوراسیون DNA ممانعت می‌کند و باعث اتصال غیرویزه پرایمر می‌شود.

غلظت بهینه Mg²⁺ تحت تاثیر غلظت dNTP، DNA الگو و مکمل‌های موجود در واکنش، قرار می‌گیرد. اگر در محیط شلاتوری مثل EDTA وجود داشته باشد، غلظت Mg²⁺ را باید افزایش داد. می‌توان غلظت Mg²⁺ را با افزایش فاصله غلظتی ۰/۵ mM بهینه سازی کرد.

تکثیر DNA های پیچیده مثل DNA های دارای GC بالا یا ساختار ثانویه پیچیده را می‌توان با افزودن DMSO در غلظت نهایی ۳٪ بهینه سازی کرد. توجه شود که می‌توان غلظت DMSO را با افزایش فاصله غلظتی ۲٪ تا حداکثر ۱۰٪ بهینه سازی کرد. توصیه می‌شود که در غلظت بالای DMSO باید دمای اتصال پرایمر را پایین تر تنظیم کرد زیرا DMSO دمای T_m پرایمر را افزایش می‌دهد. فیوژن با افزودنی‌های دیگر از قبیل فرمامید و گلیسرول سازگار است.

۶- داکسی نوکلئوتیدها

غلظت dNTPs معمولاً ۲۰۰ μM برای هر نوکلئوتید است. آنزیم فیوژن قادر به استفاده از dUTP نمی‌باشد و بنابراین برای پرایمرها یا الگوهای دارای یوراسیل توصیه نمی‌شود.

۷- غلظت آنزیم فیوژن

توصیه می‌شود برای یک واکنش ۵۰ μl یک واحد آنزیم استفاده شود. اما ممکن است بر حسب شرایط واکنش به ویژه برای قطعات با طول بیشتر از ۵ kb، ۲-۵ واحد نیز معتبر باشد.

۸- بافر



بافرهایی که به همراه آنزیم ارسال می شوند شامل بافر HF 5x و بافر GC می باشند. برای واکنش های معمولی PCR بافر HF 5x توصیه می شود. اما برای الگوهای پیچیده مثل DNA های دارای GC بالا، برای تکثیر بهتر بافر GC ضروری است. در آزمایشاتی که بافر HF جواب نداد باید از بافر GC استفاده کرد. برای واکنش هایی که نیاز به شرایط بدون دترجنت دارند بافر بدون دترجنت نیز موجود است. (واکنش هایی مثل میکرو آری، DHPLC)

۹- دناتوراسیون

دناتوراسیون اولیه در 98°C به مدت ۳۰ ثانیه برای بسیاری از DNA های خالص کافی است. اما برای الگوهای پیچیده می توان زمان دناتوراسیون را تا ۳ دقیقه نیز افزایش داد. در مرحله چرخه ای PCR تا حد امکان باید زمان دناتوراسیون را کاهش داد. بطور معمولی ۱۰-۵ ثانیه دناتوراسیون در 98°C توصیه می شود.

۱۰- اتصال (Annealing)

دمای اتصال پرایمر در صورت استفاده از فیوزن باید بالاتر از دمای اتصال سایر پلیمرها باشد. بطور کلی پرایمرهای بلندتر از ۲۰ نوکلئوتید ۳ درجه سانتی گراد بالاتر از T_m پرایمر دارای پایین ترین T_m مدت ۳۰-۱۰ ثانیه متصل می شوند. هرگاه طول پرایمر کمتر از ۲۰ نوکلئوتید است T_m پایین تر پرایمر در نظر گرفته می شود. با وجود این می توان از شیب دمایی برای بهینه سازی اتصال پرایمر کرد.

۱۱- مرحله سنتز (Extension)

بطور کلی برای سنتز DNA دمای 72°C توصیه می شود. زمان سنتز بر حسب طول و پیچیدگی قطعه مورد نظر متفاوت است. عموماً برای هر کیلوباز ۱۵ ثانیه کافی است برای تکثیر قطعات پیچیده مثل DNA ژنومی برای هر کیلوباز ۳۰ ثانیه زمان توصیه می شود. زمان تکثیر برای cDNA می تواند تا ۴۰ ثانیه به ازای هر کیلوباز افزایش یابد.

۱۲- تعداد چرخه ها

عموماً ۳۰-۳۵ چرخه، برای تولید محصول کافی می باشد. هرگاه دمای اتصال پرایمر 72°C یا بیشتر از 72°C بود PCR دو مرحله ای توصیه می شود.

مرحله	دما	زمان
دناتوراسیون اولیه	98°C	۳۰ ثانیه
۳۰-۳۵ چرخه	98°C 72°C	۱۰-۵ ثانیه ۳۰-۱۵ ثانیه به ازای هر kb
تکثیر نهایی	72°C	۱۰-۵ دقیقه
نگهداری	4°C	نامحدود

۱۳- محصول PCR



محصول PCR تکثیر یافته توسط فیوژن انتهای کور (blunt) ایجاد می کند. اگر محصول حاصله در کلونینگ استفاده می شود کلونینگ انتهای کور توصیه می شود. هرگاه TA کلونینگ انجام شود، توصیه می شود قبل از افزودن A، محصول تکثیر یافته تخلیص شود و سپس اضافه شود چون فیوژن هرگونه باز اضافی را تجزیه می کند.

نکته: افزودن باز dA توسط DNA پلیمراز Taq انجام می شود.