

Phản ứng PCR cơ bản cần Oligo với độ tinh sạch như thế nào?

Tóm tắt: Khi đặt hàng oligo, người sử dụng phải đối mặt với một số vấn đề như sau: **"Nên mua oligo loại nào? Oligo đã được tinh sạch với giá cao hay chọn oligo với giá cả thấp hơn nhưng không được tinh sạch?"** Để trả lời cho câu hỏi này, đội ngũ kỹ thuật của công ty chúng tôi đã thực hiện một số thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của 3 loại primer với độ tinh sạch khác nhau đến sản lượng Amplicon (Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại) được hình thành sau quá trình PCR.

1- TỔNG QUÁT:

Những nhà sản xuất oligo sẽ cung cấp nhiều dòng oligo khác nhau tùy thuộc vào độ tinh sạch, phương pháp tinh sạch và kích thước oligo.

A. **DESALTED Oligos:** là oligo dạng thô được tạo ra bằng cách loại bỏ những nhóm chức bảo vệ từ quá trình tổng hợp, Desalted oligo bao gồm cả trình tự sản phẩm chính (Full length) và những sản phẩm phụ (Short length) được hình thành trong giai đoạn tổng hợp. Độ tinh sạch sẽ dao động từ 80% - 90% đối với oligo từ 20 – 30 mer

B. **PURE Oligos:** Oligo đã qua quá trình tinh sạch để loại bỏ hầu hết những nhóm chức bảo vệ và những Short length được tạo ra từ giai đoạn tổng hợp. Độ tinh sạch phụ thuộc vào qui trình tinh sạch được sử dụng. Có thể chia thành 2 nhóm chính, mỗi nhóm đều có những ưu điểm và khuyết điểm riêng:

(a) Tinh sạch Trityl-ON: qui trình này được tinh sạch dựa trên tương tác kỵ nước giữa nhóm bảo vệ trên oligo, 5'-Trityl và 1 loại chất nền kỵ nước được phát triển bởi công ty Phù Sa. Qui trình này được sử dụng phổ biến bởi vì chi phí hợp lý và độ tinh sạch trung bình đạt từ 90% - 98% đối với oligo từ 40 – 50 mer. Trong quá trình tinh sạch Nhóm Trityl sẽ được loại bỏ khi xử lý bằng acid, bước này có thể dẫn đến sự thủy phân liên kết glycosidic (liên kết giữa gốc đường và Base Nito) của nucleotide thuộc nhóm purine (A và G) (được gọi là quá trình Depurination) thành nucleic tự do A và G. Sự thủy phân này không ảnh hưởng đến phản ứng PCR thông thường nhưng sẽ gây ra đột biến nên như được ứng dụng làm tổng hợp gen.

(b) Tinh sạch Trityl-Off: phương pháp tinh sạch truyền thống sử dụng HPLC trao đổi ion hoặc tinh sạch bằng Gel (PAGE), dựa trên chiều dài và điện tích của oligo. Mặc dù độ tinh sạch cao (khoảng trên 95%) và tránh được quá trình Depurination, nhưng chi phí tinh sạch rất cao và những kỹ thuật được áp dụng cho phương pháp này không được phổ biến rộng rãi. Vì vậy:

Công ty Phù Sa đã đầu tư nghiên cứu và phát triển kỹ thuật Tinh sạch Trityl-OFF theo cách mới, còn gọi là " CLEANUP". Phương pháp này vẫn đảm bảo chất lượng oligo với độ tinh sạch mà không đòi hỏi chi phí cao cao như phương pháp Tinh sạch Trityl-OFF truyền thống. Độ tinh sạch đạt từ 98% - 90% đối với oligo có chiều dài lên đến 45 mer, và 85%+ đối với chiều dài trên 45 mer. Kỹ thuật này cho phép tạo ra oligo với độ tinh sạch cao và tránh được quá trình Depurination , do đó có thể ứng dụng cho quá trình tổng hợp gen.

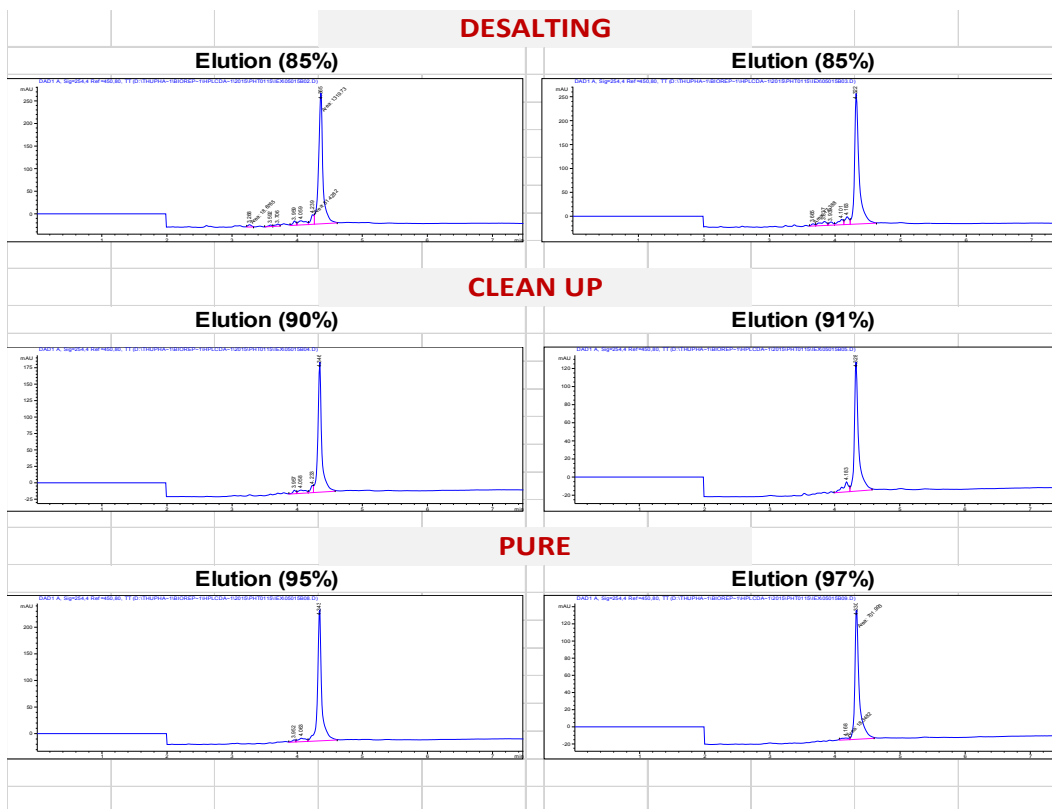
2- QUI TRÌNH THÍ NGHIỆM:

Sau khi qui trình tổng hợp và loại bỏ nhóm bảo vệ, primer tạo ra sẽ có 3 dạng: Desalted, Tinh sạch Trityl-ON và Tinh sạch Trityl-OFF (Cleanup). Tiến hành thí nghiệm khảo sát sự ảnh hưởng của độ tinh sạch của oligo lên sự hình thành Amplicon (Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại) bằng cách khuếch đại đoạn DNA trình tự 215bp với 2 nồng độ DNA template (10^2 copies và 10^4 copies) với 3 loại oligo nêu trên. Mỗi điều kiện được lặp lại 2 lần, tổng cộng có 6 mẫu:

2.1- Thông tin Oligo và độ tinh sạch

Tất cả cặp mồi đều được phân tích bởi sắc ký trao đổi ion để xác định độ tinh sạch, sau đó sẽ sử dụng trong PCR

Sequence (5'-3')	TEST Fw: GCCATGAACGACGTCGAAACAG (22base) TEST Rv: TCGAGGAAACTGTTGTCCCATTTC (24base)		
%GC	46%-55%		
Purity Status	Desalt	Cleanup	Pure oligo
Measured OD	Fw: 4.4 Rv: 4.7	Fw: 3.0 Rv: 3.4	Fw: 3.1 Rv: 3.3
Purity by IEX HPLC	Fw: 85% Rv: 85%	Fw: 90% Rv: 91%	Fw: 95% Rv: 97%



HPLC Chromatograms of the Desalted, Cleanup, DMT-ON Purified Oligos

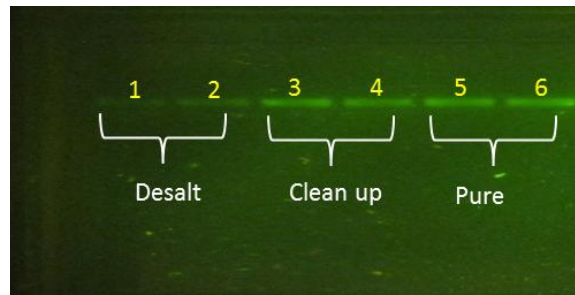
2.2- Kết quả PCR:

Những sản phẩm PCR thì được phân tích bởi điện di gel Agarose và hệ thống sắc ký lỏng cao áp qua cột trao đổi ion (HPLC) để đánh giá lượng sản phẩm khuếch đại

Kết quả phân tích bằng HPLC: peak của sản phẩm khuếch đại (215bp): lượng PCR thể hiện thông qua chiều cao của peak và được ghi nhận như sau:

PCR Conditions	Area of Amplicon Peak		
	Desalted Primers	Trityl-Off Purified Primers	Trityl-On Purified Primers
10² copies	50	90	100
10⁴ copies	195	225	240

Kết quả phân tích bằng điện di: lượng sản phẩm khuếch đại (215bp) được thể hiện thông qua độ sáng của band trên hình chụp gel bởi UV và được ghi nhận như sau:



10^2 copies



10^4 copies

Kết luận: Kết quả cho chúng ta thấy rằng độ tinh sạch của Oligo ảnh hưởng đến lượng PCR (hiệu quả khuếch đại sản phẩm mong muốn), điều này thể hiện rõ ràng trong trường hợp nồng độ DNA mẫu ban đầu cho phản ứng PCR thấp. Oligo Desalt cho hiệu quả PCR thấp nhất, trong khi lượng sản phẩm khuếch đại không có sự khác biệt đáng kể giữa qui trình tinh sạch oligo Trityl-off và qui trình tinh sạch oligo Trityl-on.

(1) PHUSA Biochem's PREMIUM oligos: là oligo được làm sạch theo công nghệ tinh sạch Trityl –OFF hay còn gọi là “clean up” và có độ tinh sạch từ 90-95%, phụ thuộc vào độ dài của oligo từ 15-45mer. Những oligo này đem lại hiệu quả cao cho PCR và đặc biệt là cho tổng hợp gene, có thể có hiệu quả đối với oligo tinh sạch mà không có vấn đề thủy phân liên kết glycosidic của nucleotide khi sử dụng qui trình tinh sạch oligo Trityl-ON

(2) PHUSA Biochem's PURE oligos: là oligo được làm sạch theo công nghệ tinh sạch Trityl –ON đã cấp bằng sáng chế tại Mỹ. Độ tinh sạch từ 96-99% phụ thuộc vào chiều dài của oligo. Những oligo này được sử dụng tốt trong PCR thông thường và đặc biệt là IDV (In Vitro Diagnostic) đòi hỏi oligo có độ tinh sạch cao để cho kết quả chính xác.