

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

****000****



CÁC KỸ THUẬT PCR VÀ ỨNG DỤNG

**Giáo viên hướng dẫn:
PGS.TS. NGUYỄN NGỌC HẢI**

Ngành : CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**Sinh viên thực hiện:
LÊ THỊ THÚY DUNG**

Thành Phố Hồ Chí Minh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

PCR là một kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm nhân bản (tạo ra nhiều bản sao) một đoạn DNA trong ống nghiệm mô phỏng bộ máy sinh tổng hợp DNA của tế bào sống. Kỹ thuật này được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sinh học và y học phục vụ nhiều mục đích khác nhau, như phát hiện các bệnh di truyền, nhận dạng vân tay DNA, chuẩn đoán những bệnh nhiễm trùng, tách dòng gene, và xác định huyết thống. Các áp dụng của nó hiện nay trong nhiều lãnh vực đã và đang làm được những kết quả thật sự kỳ diệu, đã làm cho các công trình nghiên cứu sinh học phân tử trở nên nhẹ nhàng và dễ dàng hơn gấp nhiều lần so với trước kia. Nếu trước đây một thử nghiệm sinh học phân tử phải kéo dài hàng tuần, thậm chí hàng tháng, thì nay cũng thí nghiệm có cùng mục đích như vậy, với PCR chỉ thực hiện trong vài ngày. Nếu trước đây có những mục đích thí nghiệm không thể thực hiện được, thì ngày nay với PCR mục đích này lại có thể thực hiện được một cách dễ dàng. Chính nhờ PCR mà ngày nay, sinh học phân tử đã làm được những bước tiến nhảy vọt trong mọi lãnh vực. Vậy có thể nói không ngoa là PCR đã thực sự làm một cuộc đại cách mạng trong sinh học phân tử.

II. TỔNG QUAN

A. Phương pháp PCR

1. Định nghĩa

Phương pháp PCR (polymerase chain reaction) là phương pháp khuếch đại nhanh nhiều bản sao các đoạn DNA mà không qua tạo dòng. Phương pháp này được Kary Mullis đưa ra năm 1985 và Saiki hoàn thiện năm 1988. Phương pháp PCR được thực hiện hoàn toàn trong các eppendoff và trong thời gian ngắn ta có thể thu nhận rất nhiều bản sao DNA. Kỹ thuật PCR có thể được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực: chẩn đoán, xét nghiệm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh, xác định giới tính của phôi, giải mã di truyền, tạo giống mới với các đột biến định hướng, nghiên cứu sự tiến hoá của sinh vật ở mức độ phân tử,....

2. Nguyên tắc của kỹ thuật PCR

Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) là một phương pháp tổng hợp DNA dựa trên mạch khuôn là một trình tự đích DNA ban đầu, khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme polymerase và một cặp mồi (primer) đặc hiệu cho đoạn DNA này.

Primer là những đoạn DNA ngắn, có khả năng bắt cặp bổ sung với một mạch của đoạn DNA khuôn và nhờ hoạt động của DNA polymerase đoạn primer này được kéo dài để hình thành mạch mới. Kỹ thuật PCR được hình thành dựa trên đặc tính này của DNA polymerase, đoạn DNA nằm giữa hai primer sẽ được khuếch đại thành số lượng lớn bản sao đến mức có thể thấy được sau khi nhuộm bằng ethidium bromide và có thể thu nhận đoạn DNA này cho các mục đích khác nhau bằng các thao tác trên gel. Như vậy, để khuếch đại một trình tự DNA xác định, cần phải có những thông tin tối thiểu về trình tự của DNA, đặc biệt là trình tự base ở hai đầu đoạn DNA đủ để tạo các primer bổ sung chuyên biệt (trích dẫn bởi Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, 2003).

Phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ lặp lại nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm 3 bước như sau :

Bước 1: (Biến tính tách đôi sợi DNA, denaturation)

Giai đoạn này được thực hiện ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ nóng chảy của phân tử (94 – 95 °C) trong vòng 30 giây đến 1 phút, làm cho phân tử DNA mạch

kép tách thành 2 mạch đơn. Chính 2 mạch đơn này đóng vai trò là mạch khuôn cho sự tổng hợp 2 mạch bổ sung mới.

Bước 2: (bắt cặp, annealing)

Trong bước này ở nhiệt độ được hạ thấp hơn nhiệt độ nóng chảy (T_m) của các primer, cho phép các primer bắt cặp với mạch khuôn. Trong thực nghiệm nhiệt độ này dao động trong khoảng 55 – 65 °C. Tùy thuộc vào T_m của các primer mà thời gian bắt cặp kéo dài từ 30 – 60 giây.

Bước 3: (kéo dài, elongation – extension)

Nhiệt độ được tăng lên 72 °C giúp cho DNA polymerase hoạt động tốt nhất. Dưới tác động của DNA polymerase, các nucleotide lần lượt gắn vào primer theo nguyên tắc bổ sung với mạch khuôn. Thời gian của giai đoạn này tùy thuộc vào độ dài của trình tự DNA khuếch đại, thường kéo dài từ 30 giây đến vài phút.

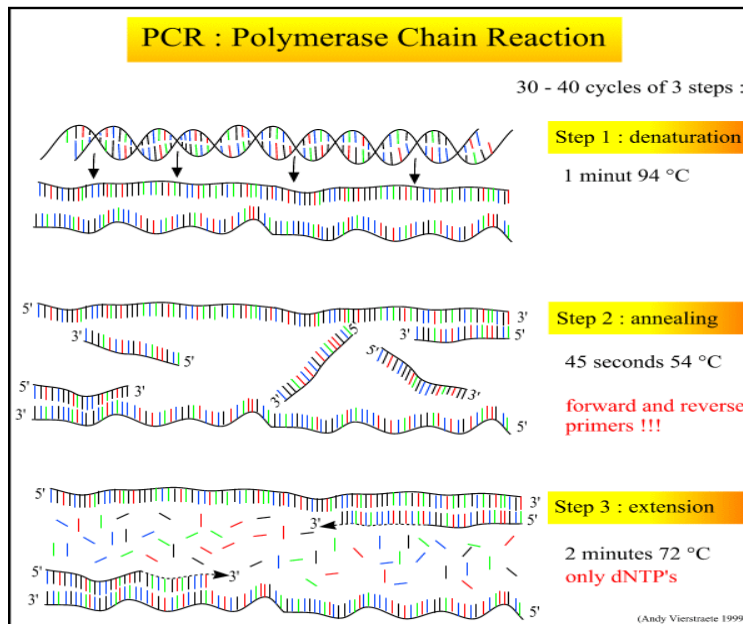
Sự khuếch đại này có thể được tính như sau:

$$\text{Tổng lượng DNA khuếch đại} = m \times 2^n$$

m: Là số bản sao của chuỗi mã hóa.

n: Là số chu kỳ.

Như vậy, qua một chu kỳ nhiệt, một DNA đích đã được nhân bản thành hai bản sao; và nếu chu kỳ này được lặp đi lặp lại liên tục 30 đến 40 lần thì từ một DNA đích đã nhân bản được thành 2³⁰ đến 2⁴⁰ bản sao, tức là đến hàng tỷ bản sao.



Nguyên tắc phản ứng PCR (nguồn Andy Vierstraete, 1999)

3. Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR

3.1. DNA mẫu

Phản ứng khuếch đại tối ưu xảy ra trên DNA thật tinh sạch. Nhiều kỹ thuật chẩn đoán bằng PCR vẫn đạt kết quả tốt với DNA thu nhận được trực tiếp từ dịch chiết tế bào. Lượng DNA mẫu sử dụng cũng có xu hướng giảm (1 μ g xuống còn 100ng) với việc sử dụng các DNA polymerase có hiệu quả cao. (trích dẫn bởi Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2003)

3.2. Enzyme

Taq polymerase chịu nhiệt được tách chiết từ vi khuẩn sống ở các suối nước nóng *Thermus aquaticus*. Enzyme này không bị phá vỡ ở nhiệt độ biến tính. Ngày nay, nhiều polymerase chịu nhiệt khác được đưa ra thị trường với nhiều chức năng chuyên biệt và hoàn thiện hơn.

3.3. Primer và nhiệt độ lai

Primer là chìa khóa quan trọng cho sự thành công hay thất bại của một thí nghiệm PCR. Nếu primer được thiết kế một cách chính xác thì thí nghiệm sẽ mang lại kết quả về sự khuếch đại của một mảnh DNA đơn. Việc lựa chọn primer cần tuân thủ theo một số nguyên tắc sau:

- Độ dài của đoạn mỗi khoảng từ 17-30 Nu. Các đoạn mỗi không nên chứa hơn 3 Nu giống nhau xếp liên tiếp.
- Tỷ lệ GC lý tưởng trong đoạn mỗi vào khoảng 50% để nhiệt độ bắt cặp của đoạn mỗi là không quá thấp.
- Hai đoạn mỗi không được có trình tự Nu bổ sung lẫn nhau.
- Nhiệt độ lúc bắt đầu phản ứng, nghĩa là lúc đã cho enzyme tổng hợp DNA vào, không nên thấp hơn nhiệt độ bắt cặp của đoạn mỗi.
- Nhiệt độ nóng chảy của 2 mỗi không nên cách nhau quá xa, vì nếu sự chênh lệch nhiệt độ lớn thì primer có T_m cao hơn sẽ bắt cặp không đặc hiệu, còn primer có T_m thấp hơn sẽ không thể lai được với DNA.
- Đoạn gene cần khuếch đại không nên lớn hơn 3kb và chiều dài lý tưởng là nhỏ hơn 1kb.
- Vị trí đầu 3' của primer rất quan trọng trong việc kiểm soát hiện tượng "mismatch" – bắt cặp không đặc hiệu. Cần tránh trình tự A hay T ở đầu 3', mà

thay vào đó là G hoặc C vì mỗi liên kết hydro giữa G – C mạnh hơn A – T sẽ bảo đảm cho sự bắt cặp đặc hiệu.

3.4. Các thành phần khác

a. Nồng độ dNTP (các deoxynucleotide triphosphat)

Nồng độ dNTP thường được sử dụng là 20 – 200 μM . Nồng độ cao hơn dễ dẫn đến sự khuếch đại “kỳ sinh”. Bên cạnh đó, sự cân bằng trong thành phần các dNTP cũng ảnh hưởng đến phản ứng PCR. Sự mất cân bằng trong thành phần các dNTP sẽ làm tăng các lỗi sao chép của DNA polymerase.

b. Nồng độ MgCl_2

Nồng độ MgCl_2 cũng là một nhân tố ảnh hưởng mạnh đến phản ứng PCR. Mg^{2+} rất cần cho quá trình liên kết các dNTP, xúc tác cho enzyme Taq polymerase, làm tăng T_m của DNA mạch kép. Mg^{2+} là Co – factor của Taq polymerase nên nếu lượng Mg^{2+} quá thấp thì Taq polymerase sẽ không thể hoạt động bình thường trong giai đoạn kéo dài (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 1999), hạn chế quá trình kéo dài. Ngược lại nồng độ Mg^{2+} cao sẽ giúp ổn định dây đôi DNA và ngăn ngừa sự biến tính hoàn toàn (do sự mở dây đôi DNA) của sản phẩm trong mỗi chu kỳ, làm cho sản phẩm PCR ít đi; đồng thời, có thể làm cho hiện tượng bắt cặp giả xảy ra ổn định hơn và cho ra những sản phẩm mong muốn với số lượng quá lớn nhưng mức độ chuyên biệt thấp.

c. Dung dịch đệm

Một nồng độ cao của dung dịch đệm PCR được sử dụng để tăng cường hiệu quả cho phản ứng PCR. Sau đây là dung dịch đệm PCR được xem là tốt hơn đối với các đệm đang có mặt trên thị trường

- 16,6 mM ammoniumsulfate
- 67,7 mM TRIS – HCl, pH 8,89
- 10 mM beta – mercaptoethanol
- 170 micrograms/ml BSA
- 1,5 – 3 mM MgCl_2

d. Số lượng chu kỳ của phản ứng PCR

Trong thực tế số chu kỳ cho một phản ứng PCR không nên vượt quá 40. Sở dĩ như vậy vì phản ứng PCR diễn tiến qua hai giai đoạn :

- Giai đoạn đầu: Số lượng bản sao tăng lên theo cấp số nhân, tỉ lệ với lượng mẫu ban đầu.
- Giai đoạn sau: Hiệu quả khuếch đại giảm hẳn do sự phân hủy và cạn kiệt các thành phần của phản ứng, sự xuất hiện các sản phẩm phụ ức chế phản ứng, hoặc các bản sao vừa được tổng hợp không kết hợp với môi mà bắt cặp với nhau.

Số chu kỳ cho một phản ứng PCR tùy thuộc số lượng mẫu DNA ban đầu. Nếu số lượng mẫu ban đầu là 10^5 thì cần 25 – 30 chu kỳ. Nếu số lượng mẫu ban đầu là $10^2 - 10^3$ thì số chu kỳ phải là 35 – 40 chu kỳ.

4. Ứng dụng của PCR

Hiện nay thành tựu của PCR mở ra nhiều triển vọng cho sinh học phân tử với nhiều ứng dụng trong sinh học, y khoa, nông nghiệp, kiểm nghiệm vi sinh vật gây bệnh: thực phẩm, bệnh phẩm, mỹ phẩm, nước, phát hiện pháp y... Xin đưa ra một ví dụ sau:

Phát hiện *Clostridium perfringens* ở bò bằng PCR

Giới thiệu

Clostridium perfringens là một tác nhân gây bệnh phân bố rộng biết là gây ra nhiều bệnh của con người và động vật. Động vật trong nước đang được biết là nguồn của ngộ độc thực phẩm con người; để giảm hoặc loại trừ nguy cơ này, chiến lược phải được phát triển để ngăn ngừa động vật bị nhiễm bệnh từ chuối thức ăn ăn vào.

C. perfringens sản xuất nhiều loại độc tố: alpha, beta, epsilon, và iota được coi là độc tố chính và được sử dụng để nhóm vào năm loại A, B, C, D, E. và độc tố Alpha được sản xuất bởi tất cả các chủng và tham gia vào bệnh sinh bệnh. Người ta sử dụng PCR bằng cách sử dụng bộ mồi để phát hiện sự hiện diện của gen mã hóa chất độc alpha.

Vật liệu và phương pháp

Chuẩn bị mẫu

1 đến 5 khuẩn lạc *C. perfringens* lấy từ BHI blood agar cultures được ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút, và phần tủa được hòa trong 50 μ l 10mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 2% Triton X-100. Hỗn hợp được vortex, đun sôi trong

10 phút để ly giải tế bào, ly tâm 13000 vòng/phút trong 2 phút, và 5 μ l dịch nổi được dùng là khuôn.

Polymerase chain reaction – PCR

Mỗi oligonucleotide Alpha toxin gen (cpa) đã được lựa chọn từ trình tự (19): 5' GCT AAT GTT ACT GCC GTT GACC 3' và 3' TCT GAT ACA TCG TGT AAG 5'. Phản ứng PCR được thực hiện ở một thể tích cuối cùng 50 μ L với các thuốc thử sau đây: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 10 pmol của mỗi mồi, 2U *Taq* DNA polymerase, và 5 μ l của mẫu DNA. Hỗn hợp được ủ trong một thermalcycler PTC-200 DNA Engine. Mẫu được biến tính ở 95 °C trong 5 phút và sau đó thực hiện 35 chu kỳ gồm 1 phút tại 94 °C, 1 phút tại 53 °C, và 1 phút ở 72 °C, với một chu trình mở rộng hơn nữa trong 10 phút ở 72 °C. *C. perfringens* type A ATCC 3624 được dùng như đối chứng dương và nước là đối chứng âm.

Điện di

Đối với những phát hiện của các sản phẩm PCR, 10 μ l mẫu DNA khuếch đại đã được kiểm tra bằng điện di trong 2% agarose gel với TBE 0,5 X (0.045M Tris-borate và 1mM EDTA, pH 8,0) chạy buffer. Gel đã được nhuộm màu với 0,5 μ g / ml ethidium bromide. Kích thước phân tử được xác định dựa trên một thang đánh dấu 100 bp khối lượng phân tử.

Các sản phẩm phản ứng được phân tích và chụp ảnh dưới tia UV.

Kết quả

Tổng cộng có 89 chủng *C. perfringens* được định type sử dụng PCR. Gen mã hóa alpha-toxin (cpa) đã được phát hiện (loại A ATCC 3624) và trong tất cả các chủng được phân lập

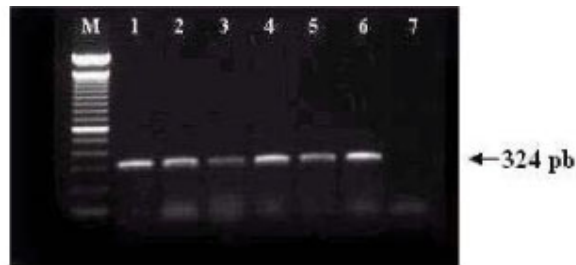


Figure 1. Detection of *C. perfringens* alpha toxin gene amplified by PCR. M= 100 bp molecular weight marker ladder; 1-5= clinical samples; 6= *C. perfringens* ATCC 3624 (Type A); 7= negative control.

Trong nghiên cứu genome học

Nhân bản vô tính với PCR.

Phát hiện các khiếm khuyết gene

Định type các mô

Phát hiện các vi sinh vật gây bệnh

Recombinant PCR.

Kỹ thuật footprinting DnaseI.

HLA DNA (các kháng nguyên bạch cầu người)

B. Phương pháp RT-PCR

1. Phương pháp

RT- PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) là một phương pháp dùng để khuếch đại cDNA được tạo ra từ RNA dựa vào đặc tính phiên mã ngược. RT- PCR thường được sử dụng để tạo ra thư viện cDNA (complementary DNA) lớn từ một lượng rất nhỏ mRNA, sử dụng trong việc nhận biết các đột biến và đa hình dựa vào những trình tự phiên mã ngược và sử dụng trong việc định lượng mức độ phân tử của gene. Ngoài ra, RT- PCR còn có một ứng dụng quan trọng nữa đó là chúng được sử dụng trong việc chẩn đoán các bệnh do virus RNA.

2. Nguyên tắc

Trong kỹ thuật RT-PCR có sự tham gia của 2 loại enzyme tổng hợp chuỗi oligonucleotide: enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase) và DNA polymerase. Enzyme reverse transcriptase cần cho quá trình tổng hợp sợi cDNA từ RNA và enzyme cần cho sự tổng hợp sợi DNA từ cDNA. Do enzyme reverse

transcriptase chịu nhiệt kém nên quá trình phiên mã ngược để tạo ra cDNA phải được thực hiện ở nhiệt độ thấp (thường khoảng từ 42-45⁰C). Điều này gây ra những trở ngại:

- Sự tạo thành các sản phẩm khuếch không mong muốn do sự bắt cặp không đặc hiệu của các primers.
- Giảm hiệu quả kéo dài chuỗi gen do sự hình thành RNA cấu trúc bậc hai.

Tuy nhiên những trở ngại này có thể được giải quyết nhờ vào việc sử dụng enzyme DNA polymerase chịu nhiệt được chiết từ vi khuẩn *Thermus thermophilus*. Enzyme này trong những điều kiện nhất định, có đặc tính sinh học đặc biệt là có thể thực hiện cùng lúc 2 chức năng: chức năng của reverse transcriptase và chức năng của DNA polymerase.

3. Ứng dụng

Chẩn đoán bệnh lở mồm long móng ở gia súc: Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử RT- PCR

Lở mồm long móng là một bệnh virus cấp tính lây lan rất nhanh ở động vật. Loại dịch bệnh này tại nước ta vẫn chưa tìm ra được phương pháp chẩn đoán, điều trị thích hợp. Mới đây, Viện Thú y quốc gia (Bộ NN&PTNT) kết hợp cùng Viện Công nghệ sinh học (Trung tâm Khoa học tự nhiên & công nghệ quốc gia) đã nghiên cứu thành công phương pháp chẩn đoán bệnh mới bằng kỹ thuật sinh học phân tử giúp người chăn nuôi sớm phát hiện và phòng trừ bệnh kịp thời cho vật nuôi.

Nguyên liệu và phương pháp tiến hành RT- PCR

TS. Tô Long Thành- Phó Bộ môn Hoá sinh miễn dịch bệnh lý (Viện Thú y) cho biết: “Phương pháp chẩn đoán bệnh lở mồm long móng phổ biến hiện nay ở nước ta vẫn là nhìn bằng mắt thường hay dùng kit ELISA nhập ngoại. Các phương pháp này vừa không chính xác, chi phí lại cao, dùng kỹ thuật RT- PCR sẽ có nhiều ưu điểm hơn”.

Nguyên liệu tạo được RT- PCR gồm: mẫu ARN chiết tách từ bệnh phẩm nghi lở mồm long móng của Việt Nam. Mẫu bệnh phẩm ở bò nghi mắc bệnh thu thập từ quốc tế gồm 3 mẫu. Các loại hoá chất, vật liệu cần thiết để tiến hành

phản ứng, tách dòng và một số cặp mồi. Phương pháp tạo RT- PCR gồm 5 bước khác nhau:

- Tách chiết ARN từ bệnh phẩm biểu mô
- Tạo ADN bằng phản ứng sao chép ngược
- Gây phản ứng bằng PCR với các cặp mồi
- Kiểm tra sản phẩm
- Tách dòng và giải trình tự sản phẩm.

RT- PCR cho độ chính xác cao

Hiện chúng ta đang có 3 phương pháp chẩn đoán định type gây bệnh lở mồm long móng thường được áp dụng là phương pháp kết hợp bổ thể, phương pháp ELISA và RT- PCR. Hai phương pháp đầu mới chỉ dừng lại ở việc trả lời câu hỏi type gây bệnh thuộc loại gì. Phương pháp RT- PCR không dừng lại ở đó, chúng còn có thể phân biệt được sự khác biệt biến chủng có trong bệnh phẩm đã xác định có cùng một type huyết thanh, thông qua việc định chuỗi các sản phẩm PCR và so sánh trình tự đoạn ADN với các trình tự ADN khác của virus lở mồm long móng được chứa sẵn trong ngân hàng dữ liệu gen.

Với những ưu điểm mà RT- PCR mang lại, đến nay Viện Thú y đã tiến hành làm chẩn đoán thử nghiệm tại một số địa phương trên một số con vật như trâu, bò, lợn, dê, cừu... Thông thường thời gian chẩn đoán bệnh phải mất trên 10 giờ đồng hồ đối với kỹ thuật soi bằng mắt, 5- 6 giờ đối với kỹ thuật ELISA (kỹ thuật này độ nhạy còn kém và chi phí khá cao). Áp dụng kỹ thuật RT- PCR vào chẩn đoán thời gian đã được rút ngắn xuống còn 4- 5 giờ với độ chính xác cao, an toàn. TS Tô Long Thành cho biết: "Bình thường để biết con vật có mắc bệnh hay không, chúng ta phải đợi đến khi chúng phát bệnh ra ngoài với các hiện tượng chảy nước bọt ở mồm, mũi hay nứt toác móng chân. Kỹ thuật RT- PCR cho phép phát hiện bệnh ngay trong giai đoạn đầu tiên".

Sở dĩ RT- PCR nhận biết được bệnh nhanh như vậy vì nhờ việc kết hợp PCR với cặp mồi 1F/1R khả năng xác định các type O, A, C và ASIA- 1 gây bệnh của virus lở mồm long móng diễn ra rất nhanh. Theo TS. Tô Long Thành,

khi tiến hành dùng RT-PCR nhất thiết phải làm trên 14 mẫu ARN vào cùng một thời điểm. Từ đây, chúng ta tiến hành theo dõi các thay đổi của bệnh lý trên phác đồ điều trị. Trong thời gian này chỉ cần một trong số các mẫu có sự thay đổi lên, xuống bất thường là chúng ta đã có thể xác định được nguồn bệnh.

Dùng phương pháp này nhất thiết phải có các cặp mồi vì tính đặc hiệu của chúng. Ngoài cặp mồi 1F/1R đã được áp dụng, những cặp mồi khác như P33/P38 (type O), P33/P87 (type A), P33/P40 (type C), P33/P74 (type ASIA- 1) cũng đóng vai trò rất quan trọng vì mỗi loại có một loại phản ứng đa dạng khác nhau.

Ngoài ra còn có các ứng dụng như:

- Chẩn đoán các loại virus ARN như virus dịch tả heo (Hog Cholera – Classical Swine Fever), virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PSSR)
- Sử dụng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng (Semi quantitative Reverse Transcript – Polymerase Chain Reaction) để đánh giá mức độ sao chép HIV ở mô ung thư biểu mô tuyến giáp so sánh với mô giáp lành tính.

Phan Thị Minh Phương, *Đại học Y Dược Huế*,

Trần Văn Khánh, Tạ Thành Văn, Trần Thị Chính, *Đại học Y Hà Nội*

- Phát hiện virus cúm H5N1 bằng RT-PCR (Theo WHO – 2007)

C. Phương pháp Real time PCR

1. Định nghĩa

Kỹ thuật Real time PCR là một phương pháp khuếch đại gene và đọc kết quả được thực hiện đồng thời trong cùng một ống hay một giếng mẫu. Phương pháp này đòi hỏi phải có một máy luân nhiệt đặc biệt, có thiết bị đo cường độ phát huỳnh quang từ giếng mẫu và được trang bị chương trình vi tính cho phép xử lý kết quả, xác định sự biến đổi cường độ huỳnh quang trong từng phản ứng khuếch đại.

2. Nguyên tắc

Thực chất hệ thống Real time PCR gồm máy luân nhiệt (PCR) được nối với máy quang phổ huỳnh quang và máy vi tính.

→ Real-Time PCR cho biết kết quả lượng DNA hình thành ở từng thời điểm trong suốt tiến trình phản ứng

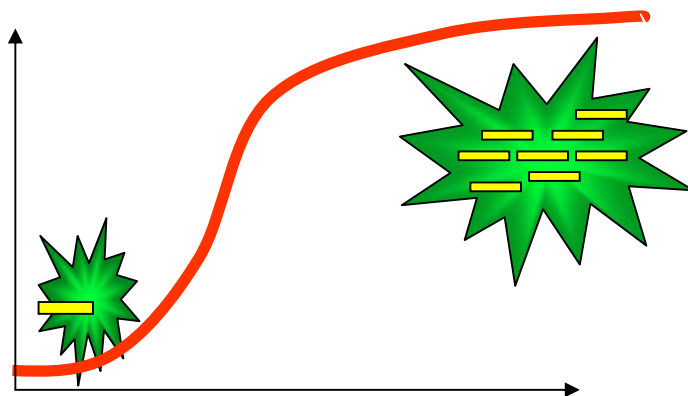
Quang phổ huỳnh quang

Máy luân nhiệt



Real time PCR gồm hai quá trình diễn ra đồng thời: nhân bản DNA bằng phản ứng PCR và đo độ phát huỳnh quang tỷ lệ thuận với số lượng đoạn DNA tạo thành.

Huỳnh quang



3. Ưu điểm của Real-time PCR

- Nhanh
- Cho phép theo dõi tiến trình phản ứng và biết được lượng DNA đã tạo thành ở từng thời điểm.
- Không cần điện di >>> tiến hành được nhiều mẫu (gần 200 mẫu/ngày).
- Hạn chế tạp nhiễm.
- Độ nhạy cao (3pg DNA).
- Lượng mẫu biến động (10-10¹⁰ copies).
- Độ lặp lại cao (CV < 2,0%).

4. Vấn đề đối với Real-time PCR

- Không phân biệt được tác nhân gây bệnh còn sống hay chết
- Đòi hỏi kỹ năng
- Thiết bị

5. Ứng dụng

Kỹ thuật Real time PCR chẩn đoán sớm HIV trên trẻ em

Eric Nerrienet

HIV/Hepatitis Laboratory

IP Cambodia, Phnom Penh

Nếu không có sự tầm soát sớm nhiễm HIV ở trẻ, BS Nhi Khoa phải chờ đợi đến tháng thứ 15 để có thể biết tình trạng huyết thanh học thực sự của trẻ sinh ra từ bà mẹ HIV(+)

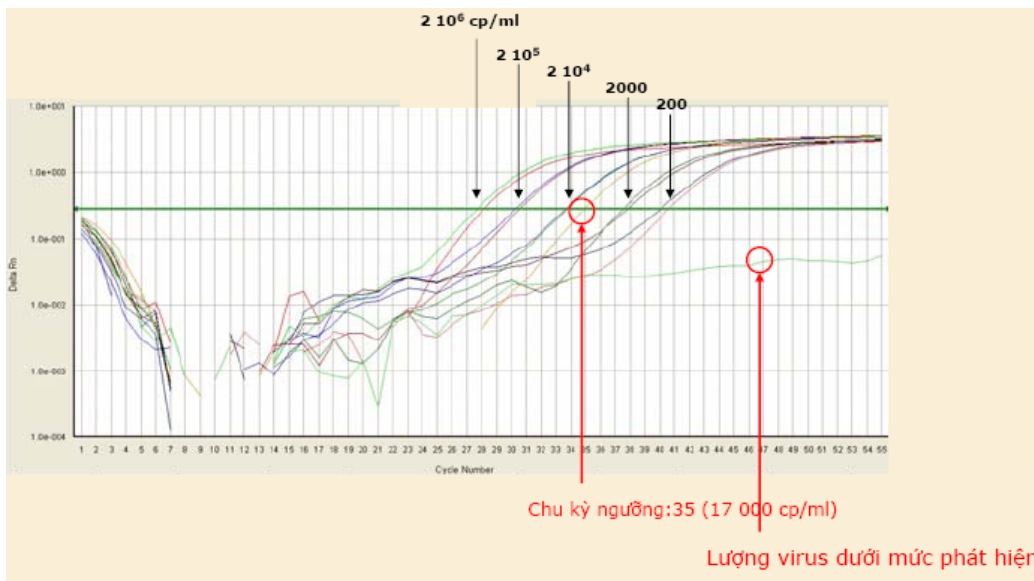
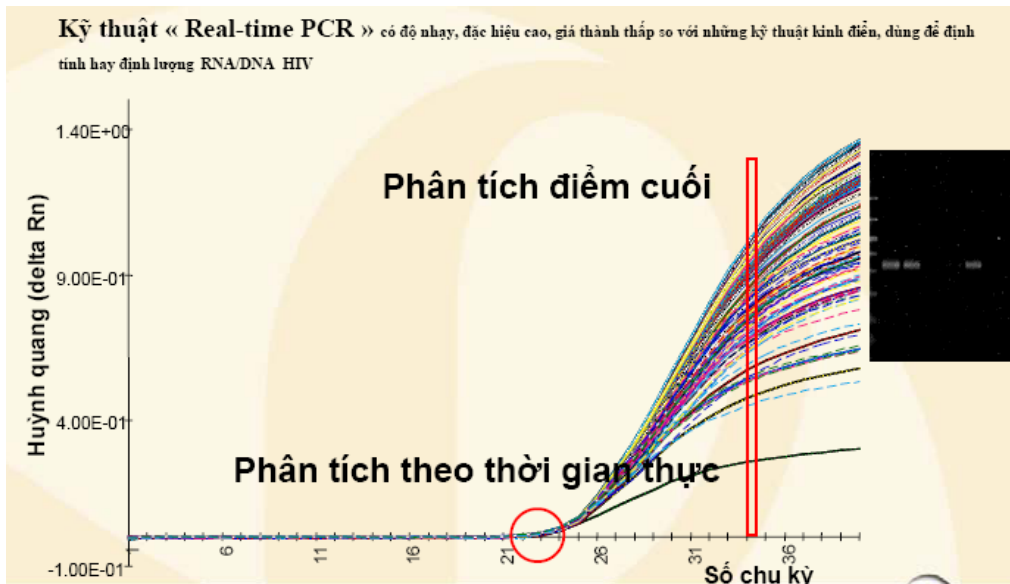
Nếu trẻ không được phát hiện sớm và điều trị thuốc kháng virus, trẻ có nguy cơ tử vong là 50% trong 02 năm đầu tiên của cuộc sống

Kỹ thuật kinh điển trong chẩn đoán nhiễm HIV ở trẻ

- RT PCR/b-DNA: Giá thành đắt
- Nested-DNA PCR (gen: Gag, Pol và/hoặc Env): Đắt, kỹ thuật phức tạp
- Nuôi cấy và phân lập virus: Đắt, kỹ thuật phức tạp, mất nhiều thời gian, Cần labo an toàn mức độ 3
- Kỹ thuật real time PCR

Để chẩn đoán sớm, giá thành thấp ở trẻ sinh ra từ mẹ nhiễm HIV

- Phương pháp:
 - Kỹ thuật real time RT PCR thực hiện trên gene LTR (theo ANRS protocol)
- Mẫu bệnh phẩm:
 - Huyết thanh của nhóm trẻ được chẩn đoán HIV (+) và nhóm trẻ HIV(-) ở Campuchia (n=226) và Việt Nam (n=38)
 - 145 trẻ em gái và 119 trẻ trai
 - Độ tuổi từ 1-28 tháng, độ tuổi trung bình 7,2 tháng)



- Độ đặc hiệu và độ nhạy tốt so với kỹ thuật kinh điển: kỹ thuật nested DNA PCR, RT PCR và kỹ thuật bDNA)
- Ngưỡng phát hiện : 400 cp/mL*, kỹ thuật thực hiện trên 200 μ l huyết thanh.
- Không cần giai đoạn sau khuếch đại
- Độ lặp lại cao : trong cùng lần thử nghiệm, giữa các phòng xét nghiệm khác nhau.
- Đơn giản
- Nhanh
- Giá thành rẻ

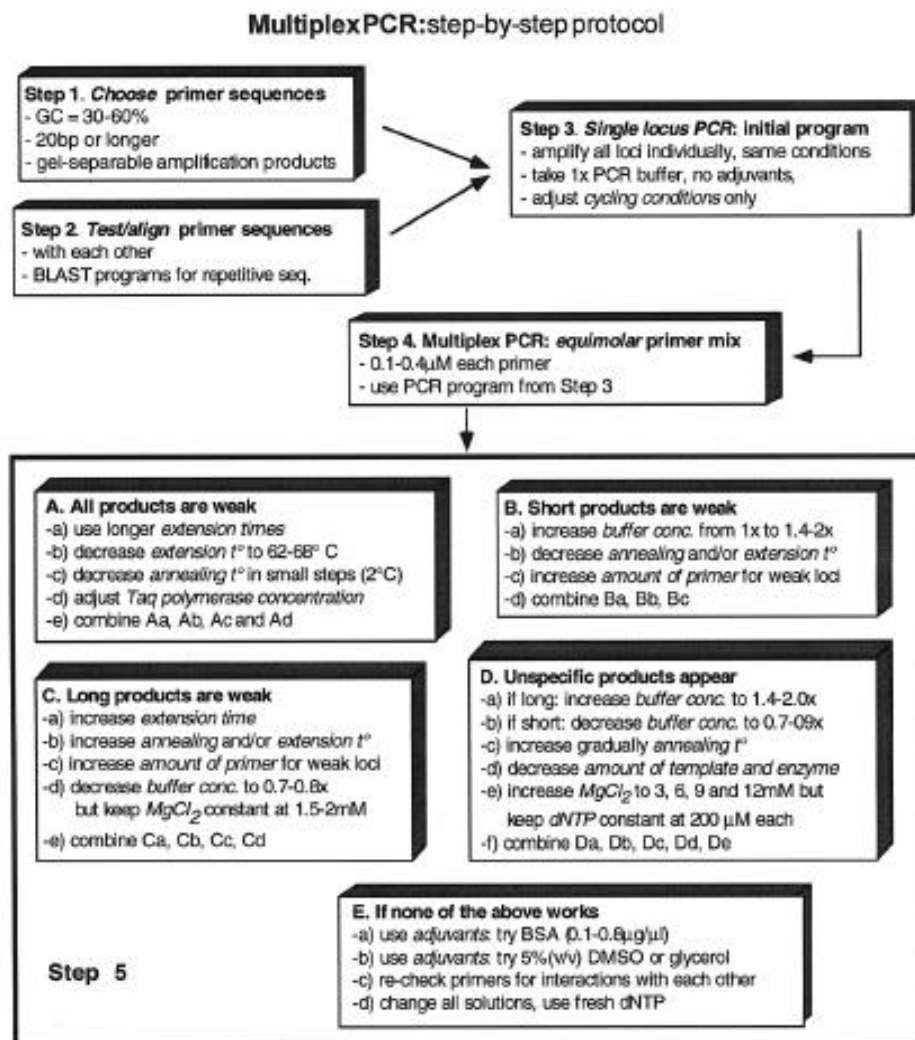
Ngoài ra, Bệnh viện Nhi đồng 1 (TPHCM) đã thực hiện thành công kỹ thuật Realtime – PCR để chẩn đoán xác định các tác nhân gây viêm não ở trẻ em.

Kỹ thuật PCR có ý nghĩa ứng dụng rất quan trọng trong chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm mãn tính, như các bệnh do nhóm retrovirus (bệnh leukaemia trên bò bonvine leukamia virus, bệnh viêm khớp/ viêm não trên dê- caprine arthritis/ encephalitis virus...) hoặc các bệnh có thời gian phát hiện chậm do nhóm herpesvirus (bệnh viêm mũi khí quản truyền nhiễm trên bò-infectious bovine rhinotracheitis và bệnh Aujeszky's...)

D. Multiplex PCR

1. Giới thiệu

Phản ứng multiplex PCR là một dạng thay đổi của phản ứng PCR thông thường, ở đó hai hoặc hơn hai locus được nhân lên đồng thời trong cùng một phản ứng.



2. Ứng dụng

2.1. Multiplex-PCR phát hiện và định type HSV

Herpes sinh dục là một bệnh do virus Herpes Simplex HSV₁ và HSV₂ gây nên nhưng chủ yếu là HSV₂. Là bệnh cấp tính lây truyền qua đường tình dục. Bệnh tái phát dai dẳng, người lành mang mầm bệnh và người bệnh kín đáo truyền bệnh cho người khác. Bệnh có triệu chứng hoặc không có triệu chứng. Khi có triệu chứng: đối với Herpes sinh dục nguyên phát. Mụn nước thành chàm ở vị trí tiếp xúc kết hợp đau và viêm hạch bạch huyết. Tuổi mắc bệnh: ở người trẻ đang ở độ tuổi hoạt động tình dục.

- Các xét nghiệm như Tzanck smear có thể thấy Tế bào đa nhân khổng lồ.

- HSV-Multiplex-PCR: Sử dụng hỗn hợp 3 primers, cho kết quả dương tính và có thể phân biệt được type 1 hay type 2 qua độ dài sản phẩm PCR: HSV-1 có độ dài 503bp và HSV-2 có độ dài 435bp.

- Hoặc HSV - PCR riêng biệt cho mỗi type HSV-1 cho sản phẩm 395bp và HSV-2 cho sản phẩm 302bp.

2.2. Chẩn đoán bệnh rối loạn tiêu hóa ở dê

Sự phát hiện bằng kháng thể kết hợp kháng nguyên bệnh rối loạn tiêu hóa.

HLA typing sử dụng multiplex PCR và phát hiện với biosensors.

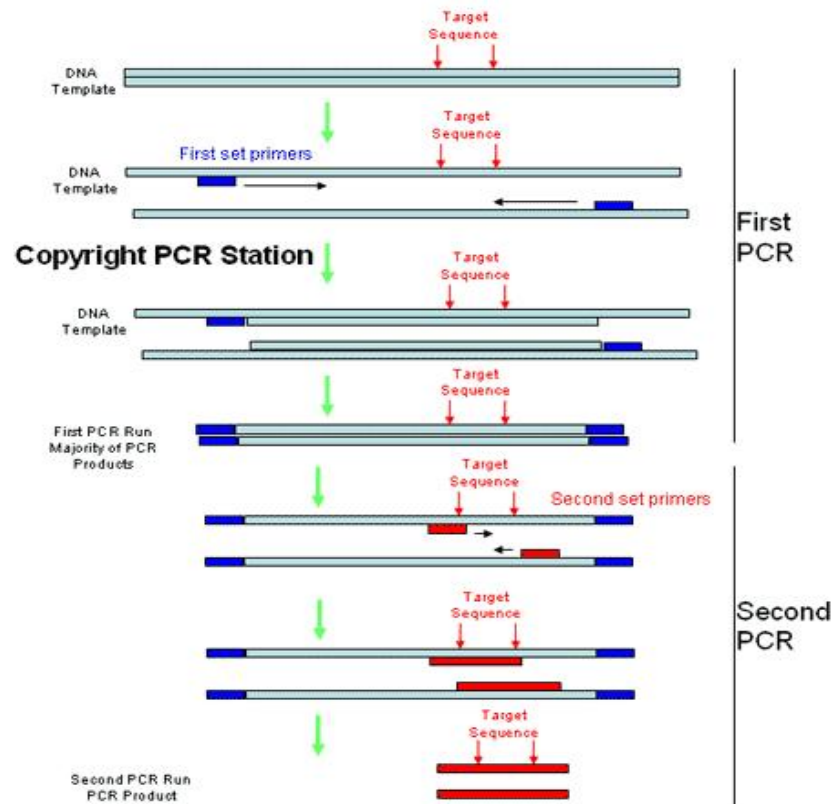
E. Nested PCR

1. Định nghĩa:

Nested PCR là một dạng thay đổi của PCR thường, trong đó hai cặp mồi PCR được dùng để khuếch đại đoạn DNA.

Phản ứng nested PCR phải được thực hiện hai lần. Lần đầu, phản ứng PCR được thực hiện trong 15 đến 30 chu kỳ, với cặp mồi thứ 1, cho phép khuếch đại đoạn gen dài hơn đoạn gen cần xác định nằm trong đoạn gen được khuếch đại lần 1. Sản phẩm PCR lần 1 sau đó sẽ là mẫu cho PCR lần 2, cặp mồi thứ 2 sẽ bắt cặp phía trong của sản phẩm PCR lần 1 và khuếch đại đoạn gen cần xác định.

2. Nguyên tắc



3. Ưu điểm

- Tăng tính đặc hiệu là do sự bắt cặp của primer thứ hai chỉ xảy ra chủ yếu với đoạn gen được nhân lên bởi phản ứng PCR thứ nhất. Nếu ban đầu khuôn DNA bị khuếch đại sai thì khả năng khuếch đại ở lần thứ hai sẽ rất thấp

- Tăng độ nhạy nhờ tổng số chu kỳ được thực hiện nhiều hơn

Nested PCR áp dụng trong trường hợp có rất ít mẫu gốc

4. Nhược điểm lớn nhất của nPCR là gia tăng mức độ tạp nhiễm trong

quá trình chuyển mẫu giữa hai lần chạy PCR. Tuy nhiên có thể khắc phục bằng cách cải tiến chạy nPCR trong một ống.

5. Ứng dụng

Sử dụng nested PCR để phát hiện virus lở mồm long móng trên amidan của trâu bò bị giết mổ với biểu hiện lâm sàng bình thường xuất hiện ở Iran

Aliasghar Bahari^{1*}, Taghi Taghipour-Bazargani², Otfried Marquardt³, Seyed Ali Ghorashi⁴, and Saied Bokaie²

¹*Junior School of Veterinary Medicine, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran*

²*Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

³*Federal Research Center for Virus Diseases of Animals, Tübingen, Germany*

⁴*National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran*

Vật liệu và phương pháp

Mẫu: Amidan được lấy từ 2 bò bản xứ (giống *Bos taurus* và giống *Bos indicus*), cũng như từ Holstein-Friesians và con lai của chúng. Các con vật, cả hai cùng giới tính và tuổi khác nhau, có lâm sàng bình thường. Mỗi mẫu được chuyển vào một tube chứa PBS-glycerol (1:1) và giữ lạnh cho đến khi được kiểm tra tại Federal Research Center đối với bệnh virus ở động vật, Tübingen, Đức.

Phân tách RNA: một mảnh nhỏ (30-50mg) của mỗi mẫu amidan được cắt nhỏ và ly giải trong buffer RLT được cung cấp bởi RNA extraction kit RNeasy (QIAGEN, Germany). RNA được chiết xuất từ 350 µl của mô đồng chất, và tái huyền phù trong 20 µl DEPC-H₂O. 5 µl của tổng RNA đã chiết được dùng cho phản ứng RT-PCR ngay lập tức. Nước cất được dùng như đối chứng âm.

Sự chọn lọc oligonucleotide: trình tự primer được chọn từ trình tự bộ gen được bảo tồn của gen virus RNA polymerase. MOSS và HASS (1999) miêu tả rằng vùng ít biến động trong số kiểu huyết thanh FMDV và lý tưởng để khuếch đại và phát hiện tất cả 7 kiểu huyết thanh. Tên và trình tự primer như sau:

PCR (external) primer: 3C1 antisense 5'-CGC TCT TCC ACA TCT CTG GT-3' (nucleotide position O1 Kaufb.: 6329-6348) và 3A1 sense 5'-CCA CAA GCT GAA GGA CCC T-3' (nucleotide position O1 Kaufb.: 5450-5468).

Nested-PCR (internal) primers: 3C3 antisense 5'-GGC CTC ACC AGA GAA AATCA-3' (nucleotide position O1 Kaufb.: 6054-6073) và 3C5 sense primer 5'-TAG AGC CAT GAC AGA CAG TG-3' (nucleotide position O1 Kaufb.: 5851-5871).

Mẫu được khuếch đại bằng RT-PCR một bước đến thể tích cuối cùng 25 µl chứa 5 µl RNA và 1 µl mỗi môi external sử dụng QIAGEN® OneStep

RT-PCR kit. Chu trình nhiệt (1) 30 min. at 50 °C, (2) 15 min. at 95 °C, (3) 45 s. at 94 °C, (4) 45 s. at 55 °C, (5) 1 min. at 72 °C, (6) 10 min. at 72 °C; bước (3)-(5) được lặp lại 40 chu kỳ. Một µl sản phẩm RT-PCR sau đó được khuếch đại bằng nested PCR, sử dụng môi 3C3 và 3C5. Điều kiện chu trình nhiệt tương tự như miêu tả ở trên. Mỗi phản ứng được phân tích bởi điện di trên gel và nhuộm ethidium bromide (4µg/ml). Sản phẩm nPCR được tinh sạch như đề nghị của Freiberg và ctv (1999) và nhuộm huỳnh quang để củng cố tính đặc hiệu của thử nghiệm.

Phân tích thống kê: Phân tích dữ liệu thống kê được làm dựa trên Fischer's exact test sử dụng phần mềm SPSS 11 .

Kết quả

Kết quả band mẫu chạy nPCR có kích thước mong đợi (222bp) thì dương tính. (hình 1)

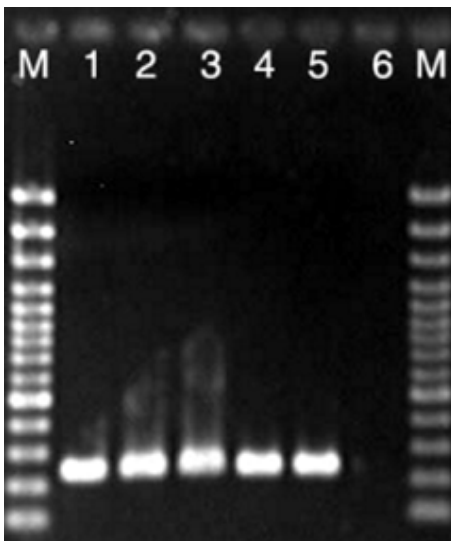


Fig. 1. Nested-PCR for detection of FMD viral genome in tonsil tissue samples.

M: DNA molecular marker (Ladder 100).

Lane 1-5: Amplification of a 222 bp DNA fragment in positive tonsil tissue samples.

Lane 6: Negative control.

III. KẾT LUẬN

Do các ứng dụng cực kỳ to lớn và kỳ diệu trong mọi lĩnh vực, PCR đã thật sự làm được một cuộc đại cách mạng trong sinh học phân tử trong thời điểm hiện nay. Với kỹ thuật và công nghệ ngày càng tiến bộ, các thuốc thử ngày càng rẻ hơn và tốt hơn, giá máy chu kỳ nhiệt ngày càng hạ và đặc biệt là việc sử dụng hệ thống nội tại chống ngoại nhiễm, thử nghiệm PCR không còn là một thử nghiệm quá cao cấp chỉ thực hiện được tại các phòng thí nghiệm hiện đại. Có thể nói PCR hiện nay hoàn toàn có thể triển khai tại các phòng thí nghiệm trung bình tại các nước đang phát triển như chúng ta.

IV. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Ngọc Hải, 2007, Công Nghệ Sinh Học Trong Thú Y, NXB Nông Nghiệp
2. Sinhhocvietnam.com
3. <http://vi.wikipedia.org/wiki/PCR>
4. Khóa luận tốt nghiệp, HOÀNG TUẤN DŨNG niên khóa 2003 – 2007, **ẢNH HƯỞNG CỦA NẤM *GLOMUS* sp. VÀ BỐN MỨC PHÂN LÂN ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN BẮP C919 VÀ XÁC ĐỊNH NẤM CỘNG SINH MYCORRHIZA BẰNG KỸ THUẬT PCR.**
5. <http://khuyentaiclub.net/4rum/showthread.php?t=1837>
6. [http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/bt/BT\(23\)504.pdf](http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/bt/BT(23)504.pdf)
7. http://thuvienkhoahoc.com/tusach/S%C3%A1ch:C%E1%BA%A9m_nang_SHPT/Ch%C6%B0%C6%A1ng_18._K%E1%BB%B9_thu%E1%BA%ADt_PCR_c%C4%83n_b%E1%BA%A3n
8. www.pcrstation.com/nl/nested-pcr/
9. www.etseq.urv.es_cdmedics_vse_q=system_files_Multiplex%20PCR%20and%20real%20time%20PCR%20course%2020090220.pdf

MỤC LỤC

I. ĐẶT VẤN ĐỀ	2
II. TỔNG QUAN	3
A. Phương pháp PCR	3
1. Định nghĩa	3
2. Nguyên tắc của kỹ thuật PCR	3
3. Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR	5
3.1. DNA mẫu	5
3.2. Enzyme	5
3.3. Primer và nhiệt độ lai	5
3.4. Các thành phần khác	6
a. Nồng độ dNTP (các deoxynucleotide triphotphat)	6
b. Nồng độ MgCl ₂	6
c. Dung dịch đệm	6
d. Số lượng chu kỳ của phản ứng PCR	6
4. Ứng dụng của PCR	7
B. Phương pháp RT-PCR	9
1. Phương pháp	9
2. Nguyên tắc	9
3. Ứng dụng	10
C. Phương pháp Real time PCR	12
1. Định nghĩa	12
2. Nguyên tắc	12
3. Ưu điểm của Real-time PCR	13
4. Vấn đề đối với Real-time PCR	14
5. Ứng dụng	14
D. Multiplex PCR	16
1. Giới thiệu	16
2. Ứng dụng	17
E. Nested PCR	17
1. Định nghĩa	17
2. Nguyên tắc	18
3. Ưu điểm	18
4. Nhược điểm	18
5. Ứng dụng	18
III. KẾT LUẬN	21
IV. TÀI LIỆU THAM KHẢO	22