ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

BÀI TIỂU LUẬN

KĨ THUẬT PCR

Giảng viên: TS. Nguyễn Huy Thuần

Sinh viên: Đ

Lớp: 43

Khoa: C

Năm học: 20

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

I. Giới thiệu

PCR là chữ viết tắt của cụm từ Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi trùng hợp – phản ứng khuếch đại gen). Đây là kỹ thuật của sinh học phân tử cho phép nhân bản một đoạn DNA mong muốn từ hệ gen DNA của cơ thể sinh vật thành nhiều bản sao, kỹ thuật này được nhà khoa học người Mỹ – Kary Mullis và cộng sự phát minh năm 1985 tại công ty Cetus; mặc dù nguyên tắc này đã được mô tả chi tiết trước đó một thập niên bởi Khorana và ctv., *(Kleppe và* ctv., *1971; Panet và* ctv., *1974), và được giới thiệu lần đầu tiên tại Hội thảo lần thứ 51 ở Cold Spring Harbor vào năm 1986 và ông đã nhận được giải thưởng Nobel Hoá sinh học vào năm 1993. Kể từ đó đã tạo nên một tác động to lớn đối với các nghiên cứu sinh học trên toàn thế giới.*

Hình

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

II. Nguyên lý

Nguyên lý nhân gen trong

DNA là vật chất di truyền của cơ thể sống quy định lên đặc tính của cơ thể (ngoại trừ một số loại virus có vật chất di truyền là RNA). Đối với những sinh vật có cấu trúc tế bào nhân chuẩn, các

phân tử DNA tồn tại dưới dạng kết hợp với protein thành các nhiễm sắc thể trong nhân tế bào. Ngoài ra, tại các cơ quan tử như ty thể và lạp thể (ở thực vật) cũng chứa DNA ở dạng plasmid.

Các phân tử DNA ở những tế bào hoạt động bình thường chỉ được nhân lên trong quá trình phân bào nguyên nhiễm. Để thực hiện được quá trình này, đòi hỏi phải có mặt enzim DNA polymerase, sự tham gia của các đoạn mồi có trình tự bổ sung gắn vào vào sợi DNA khuôn và các dNTPs làm nguồn cung cấp nucleotit. Trong quá trình phân bào nguyên nhiễm, các sợi DNA kép được mở xuắn tách thành các sợi DNA sợi đơn. Dưới tác dụng của enzim DNA polymerase, quá trình tổng hợp DNA được xảy ra theo cách gắn lần lượt các nucleotit vào đoạn mồi để kéo dài chuỗi theo nguyên tắc bổ sung với DNA khuôn.

Nguyên lý của kỹ thuật PCR:

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Kỹ thuật tổng hợp DNA n ững nguyên tắc cơ bản của sao chép sự khác biệt:

+ Dùng nhiệt độ cao th ase.

+ Kết hợp với enzim DN tổng hợp DNA mới trong môi trườ

+ Hệ thống điều nhiệt thích hợp cùng với các đoạn mồi được thiết kế chuyên biệt, chủ động.

Phương pháp PCR cho phép tổng hợp rất nhanh và chính xác từng đoạn DNA riêng biệt. Đây thực sự là phương pháp hiện đại và thuận tiện cho việc xác định sự có mặt của một gen nào đó trong tế bào với độ chính xác cao.

Phương pháp này dựa trên sự khám phá hoạt tính sinh học ở nhiệt độ cao của DNA polymerase được tìm thấy trong các sinh vật ưa nhiệt (vi khuẩn sống trong các suối nước nóng). Phần lớn các DNA polymerase chỉ làm việc ở nhiệt độ thấp. Nhưng ở nhiệt độ thấp, DNA xoắn chặt vì vậy DNA polymerase không có nhiều khả năng làm biến tính phần lớn các phần của phân tử. Nhưng các polymerase chịu nhiệt này hoạt động ở nhiệt độ rất cao, có thể lên đến 100^0C. Ở nhiệt độ này DNA sẽ bị biến tính (DNA dạng xoắn sẽ duỗi ra và ở dạng thẳng).

Một phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm ba giai đoạn: giai đoạn biến tính, giai đoạn bắt cặp, giai đoạn kéo dài.

III. Máy PCR

Trước đây, khi chưa có má ... *rợc phản ứng PCR các nhà khoa học gặp* ...

+ Lúc đầu enzim Klenc ... *ị phân hủy ở 950C nên phải thêm enzim* ... *ỳ ở giai đoạn phân tách chuỗi DNA.*

+ Để thay đổi chu kỳ n ... *dụng 3 water baths ở 3 nhiệt độ khác nh* ... *ến 35 chu kỳ nhiệt khá phiền phức, dễ gâ* ...

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Việc tìm ra enzim Taq polymerase và máy PCR tự động thay đổi các chu kỳ nhiệt đã làm cho kỹ thuật này phát triển nhanh và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu (McPherson và ctv., 1992).

Một cách tổng quát, máy PCR gồm các bộ phận chính như sau :

+ Một bàn phím đơn giản để lập các chương trình chu kỳ nhiệt và ra các mệnh lệnh để máy thực hiện.

+ Một bộ vi xử lý để ghi nhớ các chương trình đã nạp vào máy, thực hiện các mệnh lệnh cũng như ghi nhận cách thay đổi nhiệt độ buồng ủ PCR trong các chu kỳ nhiệt để điều chỉnh cho đúng với chương trình đang được thực hiện.

Buồng ủ PCR là nơi mà các chu kỳ nhiệt được thực hiện qua sự điều khiển của bộ vi xử lý. Trong các chu kỳ nhiệt, nhiệt độ trong buồng ủ PCR có thể đưa lên cao hay hạ xuống thấp trong một thời gian rất ngắn. Để làm thay đổi được nhiệt độ trong buồng ủ PCR, có hai phương pháp :

(1) Liên tục thổi lên buồng ủ những luồng khí nóng sinh ra từ một đèn phát nhiệt, hay luồng khí lạnh sinh ra từ một hệ thống của máy làm lạnh. Với phương pháp này, máy luân nhiệt hãy còn tương đối cồng kềnh, khá đắt tiền và khi máy hoạt động âm thanh cũng khá ồn ào.

(2) Phương pháp thứ hai hoạt động dựa theo hiệu quả Peltier ngược. Hiệu quả Peltier là nguyên [illegible] ện tử : Khi áp hai mãnh kim loại vào nh[illegible] t độ giữa hai mãnh kim loại thì sẽ sinh [illegible] ưu thông của dòng điện này khi đo lường [illegible] t độ giữa hai mãnh kim loại. Hiệu quả Pe[illegible] iều ngược lại, nghĩa là khi tạo ra một dò[illegible] thì sẽ tạo ra được một sự cách biệt nhiệ[illegible] nóng, bên kia lạnh. Khi thay đổi chiều dò[illegible] ính cũng thay đổi ngược lại: bên này lạn[illegible] kỳ nhiệt hiện nay đều được chế tạo dựa [illegible], nhờ vậy mà máy trở nên rất gọn nhẹ, giá thành rẻ hơn gấp nhiều lần so với trước đây.

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Hình 2. Một số hình ảnh máy PCR

IV. Chuẩn bị mẫu DNA

Mẫu DNA của đối tượng cần nghiên cứu được ly trích và tinh sạch, sau đó trữ mẫu ở – 2**0^{0}C.**

V. Thiết kế mồi

- Mồi là những đoạn oligonucleotide (17-30 base) bổ sung với trình tự trên DNA, gồm có mồi xuô

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

- Mồi xuôi (sense prime ch khuôn của DNA và sẽ kéo dài th
- Mồi ngược (anti sense với mạch mã của DNA và sẽ kéo da

+ Trình tự của mồi đượ bắt cặp giữa mồi xuôi và mồi ngược, kể

+ Nhiệt độ gắn mồi của mồi xuôi và mồi ngược không được chênh lệch quá xa (Không nên quá nhiều G hoặc C nối tiếp nhau, thường tỷ lệ G, C nằm trong khoảng 30%< G+C<70%

+ Mồi phải bảo đảm đủ dài để bắt cặp chính xác.

+ Các mồi được chọn phải đặc trưng cho trình tự DNA cần khuyếch đại không trùng với các trình tự lặp lại trên DNA, một mồi chỉ bám vào một vị trí nhất định trên gen.

+ Trình tự nằm giữa mồi xuôi và mồi ngược không quá lớn (<3000 nu

tốt nhất là dưới 1000 nu).

- Đối với mồi ≤ 20 nucleotide thì nhiệt độ gắn mồi được tính như sau:

$$Tm = [2(A+T) + 4 (G+C)]$$

* Ví dụ, đoạn mồi CAGCAAATATCTGTCCTTAC thì nhiệt độ gắn mồi:

$$Tm = [2(6+6) + 4(2+6)] = 56^0C$$

– Đối với mồi >20 nucleotide thì nhiệt độ gắn mồi được tính theo công thức:

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

$$Tm = 22 + 1.46[2(G + C) +$$

VI. Điều kiện phản ứng P

Để thử nghiệm PCR có th đủ các thành phần sau đây:

1. Nước

Nước sử dụng cho phản ứn ông chứa ion nào, không chứa DNAase, RNAase, enzim cắt giới hạn…Nói cách khác là không chứa bất kỳ một thành phần nào khác.

2. Dung dịch đệm cho phản ứng PCR:

Dung dịch đệm cho PCR là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng phản ứng PCR.

Thành phần dung dịch đệm của phản ứng PCR thường phụ thuộc vào loại enzim DNA polymerase sử dụng trong PCR, thường chứa muối đệm Tris HCl 10 mM, KCl50mM và $MgCl_2$ 1.5mM. Ngoài ra dung dịch đệm PCR còn có thể chứa 0.001% BSA hay Gelatine và trong một số phản ứng PCR còn có thể thêm tween hay formamide nữa. Trong các thành phần trên, có lẽ ảnh hưởng lên thử nghiệm PCR nhiều nhất là nồng độ $MgCl_2$, vì vậy để có được một thử nghiệm PCR có độ nhạy cao, phản ứng rõ nét, người ta phải tối ưu hóa phản ứng bằng cách thăm dò một nồng độ $MgCl_2$ thích hợp nhất.

Nồng độ $MgCl_2$ có thể dao động từ 0.5-5 mM. Chính ion Mg^{2+} gắn liên kết dNTP với DNA polymerase, tăng khả năng bám nối của mồi. Nồng độ $MgCl_2$ cao sẽ tạo nhiều sản phẩm không đặc hiệu, nồng độ $MgCl_2$ quá thấp sẽ không tạo sản phẩm PCR.

3. dNTP (deoxy nucleoside triphosphate):

Tức là đơn vị để có thể t a DNA đích. dNTP có cấu tạo gồm một đ base, có thể là Adenine (dATP) hay Th (dCTP) hay Guanine (dGTP) , ở car ử phosphate (triphosphate) được gắn tại deoxyribose này và đây chính là nơi mà bổ sung trên chuỗi DNA đích. Năng lượ a được lấy từ các nối phosphate giàu năng TP. Đó cũng chính là lý do tại sao p hải là dNDP (diphosphate) hay dNMP(m

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

4. Mồi (primer)

Mồi là những đoạn DNA sợi đơn ngắn và cần thiết cho việc xúc tiến phản ứng dây chuyền tổng hợp DNA. Chúng nhận ra phần DNA cần được nhân lên, bắt cặp bổ sung với một đầu của DNA mẫu và tạo ra vị

trí bắt đầu tái bản. Các mồi này có chiều ngược nhau, bao gồm một mồi xuôi (forward primer) và một mồi ngược (reverse primer).

Mồi là yếu tố quan trọng nhất của phản ứng PCR, quyết định tính đặc hiệu của phản ứng.

Trong thử nghiệm PCR, đoạn mồi có hai vai trò chính :

(1) Quyết định nên tính đặc hiệu của thử nghiệm, vì nếu đoạn mồi được chọn càng đặc hiệu cho chuỗi đích, nghĩa là chỉ có thể bắt cặp trên chuỗi đích mà không thể bắt cặp được trên các chuỗi DNA khác ngoài chuỗi đích, thì sản phẩm PCR càng đặc hiệu và thử nghiệm PCR càng đặc hiệu.

(2) Khởi động men polymerase vì men polymerase chỉ có thể bắt đầu tổng hợp sợi bổ sung cho chuỗi DNA đích một khi nó nhận dạng được đầu 3' (là đầu mà nó xúc tác cho một dNTP được gắn vào) đang ở tình trạng sợi đôi.

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

5. Enzim DNA polymerase

Là enzim xúc tác c tide A, T, G, C vào mạch DNA mới tổ se chịu được nhiệt độ cao.

Vào thập niên 1960, nhà V đã đến Công viên Quốc gia Yellowstone ên cứu các vi sinh vật ưa nhiệt sống trong đã phát hiện một loài vi khuẩn phát tri n là *Thermus aquaticus*. Hai mươi năm sau, các nhà khoa học của tập đoàn Cetus (Tập đoàn Công nghệ Sinh học California) đã nhận thấy rằng DNA polymerase từ *Thermus aquaticus* (Taq-polymerase) có khả năng giải quyết vấn đề của enzim biến tính sau mỗi chu kỳ. DNA polymerase chịu

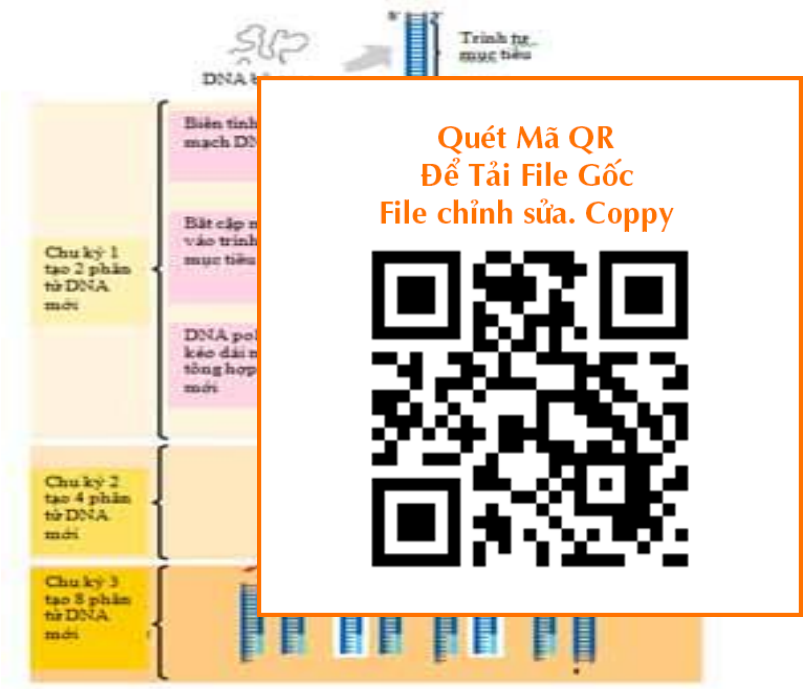
nhiệt sử dụng cho phản ứng PCR lần đầu tiên được bán trên thị trường là Taq-polymerase. Từ đó đến nay, một số vi sinh vật chịu nhiệt khác đã được khám phá và người ta đã tách chiết thêm được các DNA polymerase chịu nhiệt để sử dụng cho phản ứng PCR như *Vent*-polymerase (Tli-polymerase), *Pfu*- polymerase, *rTth*…

6. DNA khuôn (DNA template)

Là mẫu DNA mà chúng ta sẽ khuếch đại. Có thể là DNA kép, đơn, hoặc RNA được tách chiết từ các đối tượng nghiên cứu. DNA khuôn có độ nguyên vẹn cao tránh lẫn tạp chất.

VII. Chu kỳ nhiệt

Có 3 giai đoạn chính trong phản ứng PCR và chúng được lặp đi lặp lại nhiều lần (chu kỳ) (thường từ 25 đến 35 chu kỳ).



Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Hình 3. Sơ đồ chu kì nhiệt phản ứng chuỗi PCR

*** Giai đoạn biến tính** (denaturation): tách chuỗi DNA từ sợi đôi tách thành 2 sợi đơn. Nhiệt độ tăng lên 94-96°C để tách hai sợi DNA ra. Bước này gọi là biến tính, nhiệt độ tăng lên sẽ phá vỡ cầu nối hydrogen của chuỗi DNA. Trước chu kỳ 1, DNA thường được biến tính đến thời gian mở chuỗi để đảm bảo mẫu DNA và mồi được phân tách hoàn toàn và chỉ còn dạng sợi đơn. Thời gian ở giai đoạn này khoảng : 5 phút.

Một số chú ý trong giai đoạn biến tính:

- Việc tăng nhiệt độ hoặc kéo dài thời gian biến tính có thể làm tăng tính đặc hiệu của PCR nhưng làm giảm tuổi thọ của enzyme Taq.
- Khi đã tối ưu của PCR thì cần giảm tối thiểu thời gian biến tính mỗi chu kì để tăng lượng sản phẩm.
  Thông thường từ 10s đến 30s.

*** Giai đoạn bắt cặp** (annealing): gắn cặp mồi đặc trưng theo nguyên tắc bổ sung. Sau khi 2 sợi DNA tách ra, nhiệt độ được hạ xuống để mồi có thể gắn vào sợi DNA đơn. Nhiệt độ giai đoạn này phụ thuộc vào đoạn mồi và thường thấp hơn nhi . Sử dụng sai nhiệt độ trong giai đoạn này gắn hoàn toàn vào DNA mẫu, hay gắn mộ o từ 1-2phút.

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Một số chú ý trong giai đoạ

- Đối với mồi hơn 22 n ạt động ở T_m thấp nhất + 3º C.
- Đới với các cặp T_m ì có thể khắc phục bằng PCR 2 bướ

*** Giai đoạn kéo dài** (extension): tổng hợp chuỗi DNA mới giống chuỗi DNA gốc. DNA polymerase gắn tiếp vào sợi trống. Nó bắt đầu bám vào và hoạt động dọc theo sợi DNA. Nhiệt độ kéo dài phụ thuộc DNA-polymerase. Thời gian của bước này phụ thuộc vào cả DNA-polymerase

và chiều dài mảnh DNA cần khuếch đại. Như một quy tắc 1000bp/ 1 phút .
Các đoạn DNA mới được hình thành lại được sử làm khuôn để tổng hợp cho các chu kỳ tiếp theo.

Như vậy số lượng bản sao sẽ tăng gấp 2 sau mỗi chu kỳ và sau n chu kỳ, tính theo lý thuyết số lượng bản sao là 2n.

Một số chú ý trong giai đoạn kéo dài:

- Thời gian kéo dài phụ thuộc hoạt động của DNase, chiều dài sản phẩm và DNA khuôn

- Nhiệt độ kéo dài thường tiến hành ở 72ºC , tuy nhiên, hoạt tính DNA pol vẫn xảy ra ở nhiệt độ 68ºC.

VI. Các ứng dụng

Kỹ thuật PCR được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau, từ nghiên cứu khoa học đến [illegible]. Những ứng dụng chính của kỹ thuật PC[illegible]

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

- Xác định các đoạn trình tự [illegible]

- Phát hiện đột biến

- Nghiên cứu quá trình tiến [illegible]

- Phục hồi các gen đã tồn tạ[illegible]

- Chọn giống vật nuôi, cây trồng

- Lựa chọn các cặp cha mẹ thuần chủng trong thời gian ngắn

- Xác định các loài mới, các loài đặc hữu bằng phưng pháp di truyền phân tử.
- Y học – Khoa học hình sự.

- Chuẩn đoán chính xác các bệnh nhiễm trùng từ vi khuẩn, nấm, virus

- Chuẩn đoán sớm các bệnh gây ra do ung thư, các bệnh di truyền

- Xác định huyết thống, truy tìm dấu vết tội phạm

- Là kỹ thuật nền cho các kỹ thuật khác như: RAPD, SSR…

+ Nguyễn Thị Thu Lan, Nguyễn Hoàng Chương, Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, Huỳnh Thị Lệ Duyên, Phan Kim Ngọc. 2003. *Xác định giới tính ở heo bằng kỹ thuật PCR*. Tạp chí di truyền & ứng dụng ,Số 4.
+ Tang và ctv (2000) đã dùng kỹ thuật PCR competitive để định lượng WSSV (White Spot Syndrome Virus) nhiễm trong *Penaeus monodon* Fabricius để phân loại giai đoạn nhiễm WSSV thành mức độ nhẹ, trung bình và nặng, từ đó có cách xử lý thích hợp làm giảm thiệt hại trong nghề nuôi tôm (Tang, K. F. J. Lightner D. V. 2000. Quantification of white spot syndrome vir[illegible]e polymerase chain reaction. Aquaculture[illegible]
+ Phát hiện nhanh Sal[illegible] (Phẩm Minh Thu, Phan Thu Dòng, Tru[illegible] Viện Pasteur TP.HCM)

+ Áp dụng kỹ thuật P[illegible]án bệnh đốm trắng trên tôm, bệnh vàng [illegible]ng nghệ Sinh học- Đại học Cần Thơ.

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

PCR ĐÃ LÀM NÊN MỘT CUỘC ĐẠI CÁCH MẠNG TRONG SINH HỌC PHÂN TỬ

PCR và 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 trìng 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 tữ 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 các 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. Có thể xin đơn cử ra đây một số ví dụ :

PCR với kỹ thuật clone tái tổ hợp (cloning of recombinant)

Nếu trước đây, muốn đưa một đoạn gene vào plasmid để chuyển thể plasmid này vào một vi khuẩn thì công việc này đòi hỏi phải tốn nhiều thời gian và công sức. Trước hết là phải có một số lượng tế bào đích để từ đó người ta ly trích toàn bộ bộ gene (genomic DNA). Sau đó dùng nhiều loại restriction enzyme để cắt bộ gene thành nhiều đoạn có kích thước khác nhau, điện thern blotting và phát thiện đoạn gen mu idization) với đoạn dò (probe) đặc hiệu. T và trích được đoạn gen muốn tìm từ bản asmid rồi đưa vào vi khuẩn mang. Tuy nh a đã hoàn tất, vì chưa chắc chúng ta đã gắ ào plasmid vì trên bản thạch chúng ta khô đã định vị mà không lẫn các đoạn gene k khuẩn mang plasmid có gene mong muố t này là clone tái tổ hợp, có khi phải thực hí nhiều năm, mà nhiều khi chưa chắc đã ên cứu có thể dùng kỹ thuật PCR trong thí nghiệm này. Trước hết là từ một vài tế bào đích ban đầu (không cần phải có nhiều tế bào đích như kỹ thuật cũ), có thể sử dụng cặp mồi đặc hiệu để tổng hợp và khuếch đại đoạn gen muốn tìm thành hàng tỷ bản sao giống hệt nhau rồi đưa vào plasmid (không

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

cần phải dùng một lượng lớn tế bào đích để ly trích được bộ gene và phân tích bằng restriction enzyme, rồi Southern blotting,.) Lúc này plasmid mang đúng đoạn gen đích, không thể có lẫn lộn các đoạn gene khác, vì vậy sau khi chuyển thể plasmid vào vi khuẩn mang, không cần phải làm kỹ thuật chọn dòng nữa. Như vậy chúng ta thấy cũng cùng một mục đích, nhưng với PCR, công việc đã gòn lại rất nhiều, có thể chỉ trong vòng vài tuần là xong.

PCR với kỹ thuật ly trích các đoạn DNA mong muốn

Với các kỹ thuật sinh học phân tử king điển, để ly trích được một đoạn DNA mong muốn nào đó, nhà nghiên cứu phải có trong tay một số lượng khá các tế bào đích, để ly trích được bộ gene của tế bào. Sau đó từ bộ gene phức tạp này, ly trích đoạn DNA muốn tìm bằng hàng loạt các kỹ thuật sinh học phân tử phức tạp, tốn thời gian và công sức như đã nói trong phần trên.

Với kỹ thuật PCR, công việc được giải quyết một cách gọn gàng hơn nhiều. Chỉ cần một số lượng nhỏ bộ gene có trong mẫu thử, với một cặp mồi đặc hiệu, có thể tổ NA đích trong bộ gen phức tạp thành hàng g hệt nhau mà không cần phải làm động tá

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Một trường hợp khác là n ược một nhà sinh học phân tử nghiên cứ một plasmid, chuyển thể vào một loại vi hóa học khác muốn có đoạn gene để ngh a nó gởi cho mình vi khuẩn mang với p ông việc này được gọi là "cloning by pho ly trích ngay từ đầu đoạn gen trên, nhưn ờ đợi sự chấp thuận của tác giả, chờ thời gian để chủng vi khuẩn mang được gởi đến. Với PCR thì công việc lại đơn giản hơn gấp nhiều lần, nhà nghiên cứu chỉ cần có đoạn mồi cho gen mong muốn, rồi dùng kỹ thuật PCR để khuếch đại đoạn gen này thành hàng tỷ bản copy giống hệt nhau. Thế là

có tha hồ rất nhiều đoạn gen mong muốn, rất thuần khiết, để làm nghiên cứu mà chẳng cần phải chờ đợi, phải xin phép tác giả,..

Từ cấu trúc của protein với thứ tự các amino acid, nhà sinh học phân tử có thể suy ra được cấu trúc của đoạn mồi cần tổng hợp để khuyếch đại được đoạn gene chịu trách nhiệm trong tổng hợp protein trên. Ngoài ra, nhờ kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transciptate PCR), nhà sinh học phân tử có thể dễ dàng khuếch đại mRNA, nhờ vậy có thể nghiên cứu được **sự biểu hiện gene** mà không cần phải sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trước đây như ly trích mRNA từ một số lượng tế bào đích khá lớn rồi phát hiện nó bằng kỹ thuật Northern blotting. Phát hiện mRNA còn có một ứng dụng khác nữa là phát hiện xem vi sinh vật gây bệnh có kháng được với hóa trị liệu hay không, vì chỉ có vi khuẩn còn hoạt động mới tổng hợp được mRNA, nếu vi khuẩn đã chết thì khó phát hiện được mRNAse vì cấu trúc này không bền dễ bị huỷ

bởi các men RNAse vốn dĩ rất bền và hiện diện sẵn trong môi trường.

PCR Trong Phát Hiện Các Vi Sinh Vật Gây Bệnh

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Bằng các khuếch đạ ủa vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh pl ật hiện vi sinh vật gây bệnh với độ nhạy cả ử nghiệm nào trước đây có thể so sánh đu hỉ cần dưới 1 vi sinh vật gây bệnh có mặ nucleic acid đích và được PCR khuếch đ

Trong các thử nghiệ ọc, chìa khoá chính của thử nghiệm là c ể hay kháng nguyên đặc hiệu. Nếu khó ng mại, nhà miễn dịch học phải tự chế và đây là một công việc rất công phu và tốn thời gian. Trong khi đó với PCR, chìa khóa chính của thử nghiệm là vấn đề tìm cho được các đoạn mồi đặc hiệu. Mà đây chỉ là một trò chơi trước máy vi tính : Với một CD room có đầy đủ các dữ liệu về thư viện DNA

của các vi sinh vật mà các nhà nghiên cứu trước đã nghiên cứu được và với một phần mền chuyên dùng, một nhà vi sinh học hay sinh học phân tử có thể tự chọn những cặp mồi theo đúng trình tự đã chọn. Sau đó chỉ cần viết thư đặt hàng cho một hãng tổng hợp đoạn mồi theo đúng trình tự đã chọn. Sau khi tổng hợp xong, hãng sản xuất có thể gởi đến người sử dụng theo đường bưu điện mà không cần phải có điều kiện bảo quản chặt chẽ, vì các đoạn mồi sau khi tổng hợp xong, làm đông khô có thể giữ rất bền trong điều kiện bình thường. Công việc của nhà nghiên cứu lúc này là thử nghiệm xem các đoạn mồi được chọn có nhạy cảm và đặc hiệu như mong muốn hay không, nếu không thì lại chọn một cặp mồi khác,.

Do thử nghiệm PCR quá nhạy cảm, nên khi áp dụng trong chẩn đoán, một vấn đề rất quan trọng cần phải lưu tâm, đó là hiện tượng dương tính giả, chủ yếu là do mẫu thử bị nhiễm bởi các sản phẩm PCR trước đó. Chỉ cần mẫu thử bị nhiễm một hoặc vài mãnh sản phẩm PCR thì các mãnh này sẽ được khuếch đại và mẫu cho kết quả dương nhưng là dương giả. Để có thể tránh được kết quả dương giả, PCR chẩn đoán phải được thực hiện trong một phòng thí nghiệm có tổ chức chặt chẽ, các giai đoạn thí nghiệm phải c[illegible]ực riêng, với các đồ dùng thí nghiệm riê[illegible] dùng một lần (đầu pipette, ống nghiệm p[illegible] bệnh phẩm,.) Ngoài ra còn phải áp dụng n[illegible] nhiễm. Hiện nay có lẽ hiệu quả nhất là [illegible]oại trừ ngoại nhiễm : đó là trộn sẵn trong [illegible]R men Uracil N Glycosylase (UNG) là m[illegible]n phẩm PCR ngoại nhiễm trước khi phản[illegible] việc sử dụng UNG mà các thử nghiệm P[illegible] vật gây bệnh có thể thực hiện được tại b[illegible]ông cần phải tại một thí nghiệm được thiết kế đặc biệt cho PCR chẩn đoán.

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Ngoài ra, PCR còn có một biến thể là kỹ thuật PCR tổ (Nested - PCR) có thể làm tăng thêm độ nhạy cảm của thử nghiệm một khi nucleic acid đích hiện diện khá ít trong mẫu thử. Đây là một kỹ thuật PCR hai giai đoạn : Giai đoạn đầu dùng một cặp mồi không đặc hiệu mấy để khuếch đại nucleic đích đến một số lượng nào đó đủ để vào giai đoạn kế, khuếch đại đoạn nucleic acid đích bằng cặp mồi đặc hiệu cao có vị trí bắt cặp nằm bên trong các đoạn nucleic acid được khuếch đại trong giai đoạn đầu.

Với kỹ thuật RT-PCR, có thể khuếch đại nucleic đích là RNA, nhờ vậy có thể phát hiện tác nhân gây bệnh mà nucleic acid đích RNA (RNA của ribosome, mRNA, hay là RNA của virus), chứ không chỉ hạn chế với nucleic acid là DNA. Tuy nhiên cần phải lưu ý rằng kỹ thuật RT-PCR cũng như Nested - PCR là những kỹ thuật không thể dùng UNG là yếu tố nội tại chống ngoại nhiễm, vì vậy chỉ có thể thực hiện được trong những phòng thí nghiệm có tổ chức chặt chẽ.

Một ưu điểm khác của PCR trong chẩn đoán bệnh nhiễm khuẩn là PCR chẳng những có thể phát hiện được tác nhân vi sinh vật gây bệnh trực tiếp trong bệnh phẩm mà còn có thể phân loại type di truyền của các vi sinh vật này, không cần . Đây là một đóng góp rất lớn trong ngh nối liên quan của các tác nhân gây bệnh t nh hết sức nổi tiếng trong ứng dụng này là orida dentist) : Nhờ có PCR mà người ta khám điều trị răng đã bị nhiễm HIV từ m ị nhiễm HIV. Ngoài ra PCR còn có thể ph ình ví dụ phát hiện *M. tuberculosis* kháng yếu để bác sĩ điều trị có thể sử dụng phát

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

PCR với tiến hóa và khảo cổ học

Từ năm 1963, các nhà nghiên cứu đã bắt đầu nghiên cứu về tiến hóa dựa trên cấu trúc phân tử của protein (cytochrome c, hemoglobin,

ribonuclease,.) Sau đó họ bắt đầu nghiên cứu tập trung vào trình tự chuỗi của 16S RNA của ribosome trên vi khuẩn hay bộ gen của ty thể và lục lạp của thực vật. Ngày nay PCR đã góp phần làm công việc nghiên cứu về tiến hóa phân tử học trở nên dễ dàng và nhanh chóng hơn. Người ta có thể so sánh các loài với nhau bằng cách dùng các mồi đặc hiệu cho những vùng không đổi bộ gen, nhờ đó khuếch đại các vùng biến đổi, rồi so sánh với nhau. Ưu điểm vượt trội nhất của PCR trong lĩnh vực này là không cần mà chỉ cần một số lượng rất nhỏ mẫu vật là đủ để có thể tiến hành phân tích. Một ví dụ mà các nhà tiến hóa phân tử học đã thực hiện thành công là tìm hiểu được mối liên hệ giữa một loài gấu Bắc Mỹ và gấu Phi Châu. Họ chỉ cần đặt dọc trên đường đi của gấu, trên thân cây, những bàn cào để lấy được các dúm lông của gấu, rồi đem về phòng thí nghiệm phân tích. Nếu như trước kia là phải đặt những bẫy bắt được gấu, lấy một số lượng nhiều máu mới đủ để phân tích.

Trong lĩnh vực khảo cổ học, nhờ DNA là một loại phân tử khá bền vững, có những mãnh DNA có thể tồn tại nguyên vẹn trong thời gian khá dài. Có rất nhiều truờng hợp những mãnh DNA cổ đại đã được PCR khuếch đại thành công, ví dụ người ta có thể khuếch đại DNA ty thể từ một người Châu Mỹ sống cách đây 7000 năm hay từ các mãnh xương của cọp răng chồn sổ

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

PCR với phát hiện các khi

Khiếm khuyết gene g thư là do bị đột biến đoạn hay điểm. Vi phương pháp PCR là một điều hết sức ặc hiệu được khuếch đại lên có kích thướ ay mất đoạn). Với các trường hợp đột bi m độc quyền trong lãnh vực này vì khả n ương đối đơn giản và ít tốn thời gian so c ư không dùng PCR. Vì đọ dài của bài báo có hạn, chúng tôi không thể đăng tải hết một cách cụ thể các nguyên tắc riêng biệt, tuy nhiên tựu chung là người ta dùng PCR với các cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại các đoạn DNA có chứa đột biến điểm rồi phân tích bằng các kỹ thuật sinh học phân tử

khác ; hay dùng cặp primer chỉ khuếch đại được đoạn DNA có đột biến điểm mà không khuếch đại được đoạn gene bình thường.

PCR và việc định type các mô

Các mô được định type khác nhau dựa vào sự khác nhau về các kháng nguyên của phức hợp phù hợp tổ chức chính (MHC), ở người gọi là kháng nguyên HLA. Định type các mô là một việc hết sức cần thiết trong ngân hàng dữ liệu mô ghép và trước khi thực hiện phẫu thuật ghép mô hay cơ quan. Hiện nay định type các mô được dựa vào các phương pháp miễn dịch học. Tuy nhiên PCR cũng là một triển vọng đầy hứa hẹn trong lĩnh vựa này, vì định type các mô dựa vào PCR cho được nhiều thông tin hơn là các phương pháp miễn dịch học.

PCR và việc xác định các dấu ấn di truyền

Dấu ấn di truyền được nói ở đây là những dấu ấn giúp phân biệt các cá thể trong cùng loài, xem có liên hệ với nhau hay không. Các dấu ấn này hoàn toàn không có ý nghĩa gì trong việc biểu hiện kiểu hình thông qua tổng hợp protein.

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Trước đây, để phát à nghiên cứu phải ly trích được bộ gene t ào của cá thể cần khảo sát (mô, máu,.. ày bằng các restriction enzyme, điện di ing, rồi dùng các đoạn dò đặc hiệu được là mỗi cá thể sẽ có một hình ảnh đặc tru dấu bằng các đoạn dò khi lai ghép trên S ỹ thuật này là kỹ thuật phân tích sự đa h DNA bị cắt đoạn, RFLP (Restriction Fragment Lengh Polymorphism).

Với PCR, công việc trở nên đơn giản hơn rất nhiều. Có hai kiểu PCR phát hiện dấu ấn di truyền hiện đang được dùng. Kiểu thứ nhất là

dùng PCR với các đoạn mồi nằm trước và sau các microsatellite, là các cấu trúc CACACA lặp đi lặp lại có rãi rác khoảng 100.000 lần trong bộ gene của động vật có vú và khuếch đại các microsatellite này. Vì các cá thể khác nhau có sự khác nhau về số lượng các cấu trúc CA tạo thành các microsatellite nên sau khi khuếch đại bằng PCR và phân tích các vạch trên thạch điện di, sẽ thấy các kiểu mẫu vạch khác nhau tùy từng cá thể được phân tích. Kiểu thứ hai gọi là phương pháp khuếch đại ngẫu nhiên các DNA đa hình (Random Amplified polymorphic DNA, RAPD) là dùng các đoạn mồi không đặc hiệu, thường ngắn khoảng 10 nucleic, cho bắt cặp với nucleic acid đích trong điều kiện bắt cặp không chặt chẽ, ở nhiệt độ khoảng 30-40 0C chẳng hạn. Nhờ vậy khi thực hiện PCR, sẽ có sản phẩm PCR là những đoạn DNA dài ngắn khác nhau do các đoạn mồi bắt cặp ngẫu nhiên trên DNA đích (ngẫu nhiên nhưng là tất nhiên, vì đoạn mồi sẽ bắt cặp trên chuỗi đích nào tương đối bổ sung nhất với nó) và các kích thước của những đoạn này sẽ được phát hiện trên thạch điện di. Sự giống và khác nhau về hình ảnh trên thạch điện di sẽ cho biết các cá thể được phân tích có giống hay khác nhau, hay có liên hệ với nhau như thế nào ?

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Kỹ thuật PCR phát [illegible] ứng đóng góp rất lớn trong khoa học hình [illegible] n hiện trường rất ít mẫu vật : Một vài giọt [illegible] lông hay tóc, hay thậm chí mẫu tàn thuố [illegible] nạc miệng, là các nhà sinh học phân tử c [illegible] ruyền và phát hiện được ngay đúng tội p [illegible] ãi được. Một minh chứng khác cho áp dụ [illegible] bí mật của cái chết của cả gia đình Sa H [illegible] là đã bị hành quyết sau cách mạng tháng mười của Nga và xác của họ được chôn ở đâu đó. Gần đây theo lệnh của tổng thống Yeslin, địa điểm nghi ngờ chôn xác của họ đã được khai quật, và bằng kỹ thuật PCR dấu ấn di truyền so sánh với DNA của nữ hoàng Victoria Anh quốc, người ta đã

khẳng định được một bộ xương là của hoàng hậu vì bà này là cháu gọi nữ hoàng Victoria bằng dì. Một bộ xương khác được khẳng định là của Sa Hoàng vì so được với DNA từ mẫu xương của một quận công tổ tiên của Sa Hoàng. Riêng hoàng tử và công chúa thì không tìm thấy được. Theo một sĩ quan đã thi hành án thì xác hai vị này đã bị đốt cháy thành than sau khi xử. Tuy nhiên có một bà tên là Maria tự nhận mình là công chúa Natasia thì sao ? Trước đây không thể có một kỹ thuật di truyền nào có thể xác định được việc này và hiện nay thì bà Maria cũng đã qua đời. Các nhà nghiên cứu đã tìm ra được những bệnh viện mà trước đây bà Maria đã đến khám bệnh và điều trị và may mắn thay hãy còn tìm được những mẫu sinh thiết mô của Maria, thế là họ đã dùng kỹ thuật PCR dấu ấn di truyền và bây giờ đã có một trả lời rõ ràng : Maria không phải là công chúa Natasia.

PCR phát hiện đặc hiệu loài

PCR còn có thể xác định loài bằng cách dùng các đoạn mồi đặc hiệu cho những vùng giống nhau gọi là các vùng lặp lại trực tiếp (direct repeat) hiện diện ở huếch đại các vùng thay đổi và phát hiện ợc các cá thể trong loài có giống hay khá y được gọi là kỹ thuật PCR lấy dấu ngón còn gọi là kỹ thuật PCR phát hiện các IRS - PCR (Interpersed repeat sequen người cũng có những đoạn lặp đi lặp lại, g Cũng bằng kỹ thuật trên, các nhà nghiên c n được những áp dụng lớn, ví dụ khuếch giữa các Alu để lấy nguyên liệu di truyền ầy.

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

PCR và kỹ thuật phát hiện trình tự chuỗi của một đoạn DNA (DNA sequencing).

Trước đây, để làm DNA sequencing, người ta phải dùng kỹ thuật Maxam và Gilbert. Kỹ thuật này tương đối phức tạp mà tính lặp lại không cao. Hiện nay làm DNA sequencing bằng kỹ thuật PCR đơn giản hơn nhiều, kỹ thuật này được gọi là kỹ thuật Sanger và rất được nhiều phòng thí nghiệm sinh học phân tử hiện nay sử dụng. Nếu độc giả nào muốn tìm hiểu thêm thì có thể tham khảo tài liệu mà chúng tôi đã liệt kê.

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 rẽ 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.

Ngày nay, bên cạnh p g người ta đã phát triển thêm rất nhiều c dựa trên nền tảng PRC, có thể áp dụng g cật chất di truyền khác nhau, những tiế g thực tiễn sẽ giúp chúng ta có thể phát l ịp thời trước tình hình diễn biến kịp thờ hiểm trên thế giới hiện nay như H_1N_1, H điều trị bệnh đã và đang đe dọa thế giớ n

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

Với chủ trương đi tắt đ triển khai các tiến bộ khoa học và nâng hân dân, Việt Nam đã áp dụng khá rộng rãi phương pháp PRC và kĩ thuật tiên tiến khác trong nghiên cứu sinh học phân tử và bước đầu thu được một số kết quả đáng ghi nhận, tin rằng trong tương lai chúng ta sẽ còn gặt hái được

nhiều thành công hơn nữa trong sự nghiệp nghiên cứu khoa học của nước nhà.

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Văn Phủng. Một số ứng dụng của PCR trong vi sinh vật y học. Trường Đại học y Hà Nội.

2. Hoàng Minh (2001), «Một số kỹ thuật sinh học phân tử hoá sinh và vi sinh trong chẩn đoán bệnh lao». Tạp chí Thông tin y dược, số 12, tháng 12 năm 2001.

3. Richard Frothingham (1996). Applications of the polymerase chain reaction to infectious disease diagnosis. Ann Saudi Med 1996, p. 657 - 665.

4.Tanil K., et al (1993). Detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum Samples by Polymerase Chain Reaction Using a Simplified Procedure. Journal of clinical microbiology, June 1993, p. 1435-1438.

5. Johnson R., et al (2006), Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Issues Mol. Biol. , p. 97-112.

6.Stephanie AC, Robert JO, Louise T, Seth S (2001). PCR-Based Diagnosis of Helicobacter p[illegible] Determination of Clarithromycin Resistanc[illegible] Biopsy Samples. Journal of clinical[illegible]

Quét Mã QR
Để Tải File Gốc
File chỉnh sửa. Coppy