

PHẠM HÙNG VÂN

PCR và real-time PCR
Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC
Chi Nhánh Thành Phố Hồ Chí Minh
2009

Lời nói đầu

Cách đây trên 14 năm, TS. Nguyễn Đức Thái, khi đó là chủ nhiệm chương trình nghiên cứu gene thiên đầu thống (glaucoma) tại UCSF, về thăm và báo cáo về kỹ thuật PCR với mong ước là kỹ thuật này sẽ được ứng dụng trong chẩn đoán - nghiên cứu y học tại Việt Nam, nơi bắt đầu sẽ là Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh. Trong phần thảo luận sôi nổi hôm đó, có nhiều ý kiến rất phấn khích vì ứng dụng quá tuyệt vời của PCR, nhưng cũng có các tiếng nói hoài nghi cho là kỹ thuật này sẽ khó áp dụng được một cách rộng rãi vì Việt Nam chúng ta chưa thể thoát ra được các điều kiện quá hạn chế của một quốc gia có thu nhập thấp, nền tảng khoa học kỹ thuật chưa sẵn sàng cho những kỹ thuật cao cấp như vậy.

Tuy nhiên, chỉ một thời gian ngắn không quá hai năm sau đó, năm 1997 với sự động viên của GS. Đỗ Đình Hồ và sự khuyến khích tạo điều kiện của Ban Giám Hiệu nhà trường thời đó, đơn vị sinh học phân tử y khoa của chúng tôi đã ra đời với ứng dụng PCR đầu tiên được triển khai là PCR phát hiện *M. tuberculosis* trong các bệnh phẩm khác nhau. Một trường hợp xét nghiệm PCR thành công mà chúng tôi không thể quên được là đã giúp chẩn đoán xác định mẹ của một Phó Giám Đốc Bệnh Viện tại TP. HCM là bị lao thận chứ không phải ung thư thận như chẩn đoán lâm sàng, và nhờ vậy chỉ vài tháng sau điều trị, mẹ của anh đã hết hẳn tiểu ra máu, không phải chịu một liệu pháp phẫu thuật quá nặng nề mà không hề trúng đích. Tiếp tục từ thành công của PCR chẩn đoán lao này, chúng tôi đã triển khai thành công PCR phát hiện HBV rồi đến một tác nhân khó nhất là HCV. Thành công trong xây dựng và phát triển kỹ thuật RT-PCR phát hiện HCV vào năm 1998 đã củng cố thêm niềm tin của chúng tôi, đó là nếu nắm chắc kỹ thuật, tìm được nguồn hóa chất cần thiết, có được mẫu thử, và có quyết tâm thì kỹ thuật dù có khó như RT-PCR vẫn có thể đưa vào ứng dụng thành công trong chẩn đoán.

Từ các mầm ban đầu mà đơn vị sinh học phân tử y khoa của trường Đại Học Y Dược TP. HCM đã gieo; trong lĩnh vực y khoa, PCR và thậm chí real-time PCR (gọi là qPCR), đã được nhiều nhà nghiên cứu và cả các nhà lâm sàng tại Việt Nam biết đến và cho chỉ định xét nghiệm để phục vụ cho mục đích chẩn đoán hay theo dõi điều trị. Ngoài ra, trong lĩnh vực chăn nuôi thú y và nuôi trồng thủy sản, do yêu cầu kiểm soát phát hiện các tác nhân gây dịch bệnh, PCR cũng được sử dụng tại nhiều phòng thí nghiệm không chỉ tại các viện nghiên cứu lớn của trung ương mà cả tại các địa phương nữa. Có thể nói nếu so sánh với các nước trong khu vực như Thái Lan, Malaysia, Phillipine, Indonesia... thì ở

lĩnh vực áp dụng PCR và qPCR trong chẩn đoán, Việt Nam chúng ta không hề thua kém. Chỉ có cái khác biệt là tại Thái lan, trong y khoa chẳng hạn, chỉ định xét nghiệm PCR/qPCR chỉ được thực hiện tại các bệnh viện hay các trung tâm lớn vì đa số các xét nghiệm này chỉ được thực hiện trên hệ thống kín như Cobas Taqman, hay Amplicor của Roche. Trong khi đó thì tại Việt Nam, các xét nghiệm này được thực hiện tại nhiều bệnh viện lớn kể cả một vài bệnh viện tuyến tỉnh hay thậm chí tại một số bệnh viện tư nhân, trung tâm/phòng xét nghiệm tư nhân. Lý do tại sao như vậy? Chính yếu là nhờ chúng ta đã khai thác kỹ thuật PCR/qPCR là kỹ thuật mở (open), chỉ cần thiết bị luân nhiệt thích hợp (máy PCR và real-time PCR mà hiện nay giá cả không còn cao ngất ngưỡng nữa) và một số thiết bị thông thường khác có tại phòng thí nghiệm là có thể là xét nghiệm PCR với các thuốc thử tự chế (home-brews) hay do vài công ty trong nước sản xuất dựa trên các mồi (primers) hay đoạn dò (probe) tự thiết kế hay đã được phổ biến trên các tạp chí...Tình hình phát triển như vậy cũng có cái lợi mà cũng có những cái cần chấn chỉnh. Lợi là kỹ thuật phổ biến được và các nhà lâm sàng có thêm phương tiện xét nghiệm để phát hiện bệnh, để theo dõi điều trị với giá thành vừa phải và làm được nhiều nơi...Nhưng vấn đề rất cần phải chấn chỉnh đó là làm thế nào để có thể kiểm soát được chất lượng các xét nghiệm PCR và qPCR được thực hiện tại các nơi. Kiểm soát chất lượng ở đây theo chúng tôi không phải là phải có certificate từ cơ quan nhà nước vì thật ra hiện nay chưa có một cơ quan nhà nước nào thực hiện vấn đề kiểm soát chất lượng của các xét nghiệm này, và chúng tôi nghĩ nếu có đi nữa thì các certificate này cũng chỉ có giá trị trên mẫu được kiểm tra. Do vậy, theo chúng tôi đó là bản thân người làm xét nghiệm cũng như các nhà chế tạo kit phải nhận diện cho được trong xét nghiệm PCR/qPCR, các điểm nào trong các khâu thực hiện xét nghiệm phải được kiểm soát để kết quả xét nghiệm là đúng với chất lượng được người sản xuất thông báo hay người làm xét nghiệm mong muốn. Để làm được như vậy, sự hiểu biết các vấn đề cơ bản trong xét nghiệm PCR/qPCR đối với người làm xét nghiệm cũng như người sẽ nhận kết quả xét nghiệm hay sử dụng xét nghiệm sẽ rất là cần thiết. Đây chính là lý do chúng tôi viết ra cuốn sách này với ước mong đóng góp một phần các kiến thức hạn chế của mình cho sự nghiệp phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học phân tử trong y học và sinh học của nước nhà.

Mục lục

Lời nói đầu.....	3
Mục lục	5
Polymerase Chain Reaction Các vấn đề cơ bản.....	9
PCR là gì?	9
Nguyên tắc của PCR.....	9
Lịch sử phát minh PCR.....	10
Các chìa khóa kỹ thuật đã giúp hoàn thiện PCR.....	11
1. Phát hiện và sản xuất được các enzyme polymerase chịu nhiệt.....	11
2. Chế tạo được các máy luân nhiệt hoạt động hiệu quả hơn.....	11
3. Tìm được phương pháp loại trừ ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại	13
Vai trò của mồi (primers)	14
Cách pha PCR mix	16
Kiểm tra độ nhạy của PCR mix đã pha	19
Các PCR thường được sử dụng trong chẩn đoán phát hiện tác nhân nhiễm trùng	20
1. PCR đơn mồi (monoplex PCR)	21
2. PCR đa mồi (multiplex PCR).....	21
3. PCR tổ (nested PCR)	21
4. PCR tổ không dừng (non-stop nested PCR).....	22
5. Touch-down PCR	23
6. RT-PCR.....	24
PCR và các ứng dụng trong y sinh học	28
1. PCR và công nghệ gene	28
2. PCR trong pháp y.....	31
3. PCR trong chẩn đoán và sàng lọc bệnh lý di truyền.....	31
4. PCR trong phát hiện các tác nhân vi sinh vật gây bệnh nhiễm trùng	32
5. PCR là đòn bẩy thúc đẩy nhanh công nghệ giải trình tự.....	32
Real-time PCR Các vấn đề cơ bản.....	34
Real-time PCR là gì?	34
Các vấn đề kỹ thuật cơ bản cần biết của real-time PCR.....	34
1. Biểu đồ khuếch đại của real-time PCR	34
2. Biểu đồ chuẩn của real-time PCR.....	36
Máy real-time PCR.....	41
1. Sử dụng nguồn sáng kích thích là đèn tungstene và dùng các kính lọc để chiếu nguồn sáng có độ dài sóng nhất định lên toàn bộ các giếng chứa tube phản ứng.....	41
2. Thiết bị real-time dùng sợi quang học (fiber optic cables) để đưa nguồn sáng kích thích đến các tube phản ứng.....	42
3. Thiết bị real-time dùng đèn led làm nguồn sáng kích thích	42
Hóa chất và thuốc thử cho real-time PCR	43
1. Chất phát huỳnh quang là một loại màu huỳnh quang chèn vào sợi đôi DNA	43
2. Real-time PCR sử dụng probe làm chất phát huỳnh quang	51
Các ứng dụng của real-time PCR.....	60
1. Định lượng tác nhân đích có trong mẫu thử.....	60
2. Xác định tỷ lệ biến đổi gene (GMO, Gene Modified Organism) có trong mẫu.....	66
3. Phát hiện khác biệt SNP và xác định kiểu di truyền.....	67
PCR và dấu vân tay DNA	70
Lịch sử	70
Các loại xét nghiệm dấu vân tay DNA.....	70

1. Các tiêu vệ tinh (minisatellite)	71
2. Các vi vệ tinh (microsatellite)	73
3. Trình tự vòng D của ty thể	79
Kết luận.....	80
PCR và giải trình tự.....	81
Giải trình tự là gì?	81
Các phương pháp giải trình tự gene	81
1. Phương pháp hóa học giải trình tự DNA	81
2. Phương pháp enzyme giải trình tự DNA	83
3. Giải trình tự bằng máy tự động (automated sequencer).....	85
PCR là công cụ giúp hoàn thiện và mở rộng phổ áp dụng kỹ thuật giải trình tự.....	88
Giải trình tự bộ gene người.....	88
1. Làm thế nào giải trình tự bộ gene người.....	88
2. Kết quả giải trình tự bộ gene người.....	90
3. Giải trình tự bộ gene người – cuộc đua chưa kết thúc.....	92
4. Việt Nam có thể tham gia vào cuộc đua này không?.....	94
Ứng dụng công nghệ giải trình tự tại phòng thí nghiệm NK-Biotek	95
1. Ứng dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự để định danh vi khuẩn	95
2. Ứng dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự để định danh vi nấm.....	104
3. Ứng dụng PCR-giải trình tự để phát hiện, định lượng và xác định genotype HCV... ..	106
4. Áp dụng PCR-giải trình tự để phát hiện đột biến kháng thuốc của HBV.....	109
5. Áp dụng PCR-giải trình tự phát hiện đột biến precore/ promoter và genotype HBV	111
6. PCR-giải trình tự phát hiện đột biến kháng rifampicine và INH của <i>M. tuberculosis</i>	112
Những vấn đề về kỹ thuật cần được quan tâm khi áp dụng PCR và real-time PCR trong phòng thí nghiệm chẩn đoán.....	115
Sự khác biệt giữa phòng thí nghiệm chẩn đoán và phòng thí nghiệm nghiên cứu	115
Các vấn đề kỹ thuật cần quan tâm áp dụng PCR và real-time PCR trong chẩn đoán.....	116
1. Tiến trình xét nghiệm PCR và real-time PCR.....	116
Xây dựng một phòng thí nghiệm PCR/real-time PCR chẩn đoán	140
1. Phòng tách chiết nucleic acid	140
2. Phòng đặt máy PCR và real-time PCR	141
3. Phòng điện di đọc kết quả	141
4. Phòng pha chế thuốc thử PCR và real-time PCR.....	142
Kinh nghiệm xây dựng và phát triển PCR/real-time PCR và một số kỹ thuật sinh học phân tử khác trong nghiên cứu và chẩn đoán	146
Từ các yêu cầu thực tế phải tiếp cận nền y học hiện đại trong chẩn đoán và điều trị.....	146
1. Cần một giải pháp toàn diện về chẩn đoán sinh học phân tử bệnh viêm gan virus B và viêm gan virus C mạn tính	146
2. Cần xét nghiệm kịp thời và nhạy cảm hơn để chẩn đoán phát hiện các tác nhân vi sinh gây bệnh mà các phương tiện vi sinh hay miễn dịch không hữu hiệu	150
Đến thực tế triển khai kỹ thuật PCR, real-time PCR.....	154
1. Các rào cản.....	154
2. Thử nghiệm PCR và real-time PCR có thật sự khó thực hiện được một cách chuẩn mực tại các phòng thí nghiệm lâm sàng?.....	155
3. Thử nghiệm PCR và real-time PCR có thật sự đắt tiền không?.....	157
4. Thực tế triển khai PCR và real-time PCR.....	158
Và thực tế triển khai kỹ thuật các kỹ thuật sinh học phân tử khác.....	165
Kết luận.....	166
Ứng dụng sinh học phân tử trong chẩn đoán viêm gan siêu vi - Các câu hỏi thường gặp. 167	167
Viêm gan siêu vi B	167

Viêm gan siêu vi C	173
Các phương pháp chuẩn bị mẫu cho PCR và real-time PCR.....	178
Các phương pháp chuẩn bị mẫu trước khi tách chiết	178
1. Thuần nhất và loại trừ tạp nhiễm cho mẫu đàm	178
2. Phương pháp loại bỏ sáp paraffin cho các mẫu cắt sinh thiết	179
3. Phương pháp thủy giải mẫu bằng proteinase K.....	180
Các phương pháp tách chiết nucleic acid	181
1. Phương pháp BOOM để tách chiết DNA.....	181
2. Phương pháp tách chiết DNA dùng CTAB.....	182
2. Phương pháp tách chiết DNA dùng phenol chloroform	184
3. Phương pháp tách chiết DNA bộ gene của bạch cầu.....	186
4. Phương pháp tách chiết thô DNA các mẫu thử tôm cá.....	187
5. Phương pháp tách chiết RNA toàn phần.....	189
6. Phương pháp phiên mã ngược RNA để tổng hợp cDNA.....	191
Tài liệu có liên quan	192
Sách tham khảo	192
Tạp chí đăng các kết quả nghiên cứu có liên quan.....	192
Tác giả.....	197

