

# Polymerase Chain Reaction

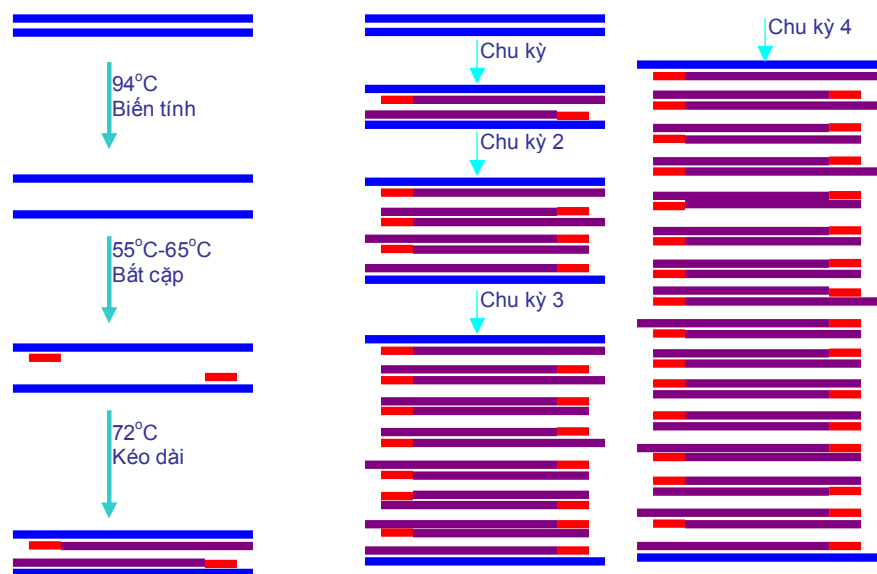
## Các vấn đề cơ bản

### PCR là gì?

PCR là thử nghiệm nhân bản một đoạn DNA trong ống nghiệm dựa vào các chu kỳ nhiệt. Thử nghiệm được thực hiện trong một ống nghiệm nhỏ chứa dung dịch phản ứng (gọi là PCR mix) có thể tích vào khoảng từ 10 $\mu$ l đến 50 $\mu$ l với các thành phần chủ yếu là: (1) enzyme polymerase chịu nhiệt, thường được gọi là Taq polymerase, có hoạt tính tối đa ở 72°C và bền được với nhiệt độ; (2) 4 loại desoxyribonucleotide (dNTP) là Adenine, Thymine, Guanine, và Cytosine (dATP, dTTP, dGTP, và dCTP); (3) DNA chứa các đoạn DNA đích sẽ được nhân bản trong ống phản ứng; (4) các đoạn mồi (primer) xuôi và ngược là các đoạn oligonucleotide có chiều dài khoảng 20 – 30 nucleotide có trình tự bổ sung một cách đặc hiệu với trình tự của 2 đầu đoạn DNA sẽ được nhân bản; (5) ion Mg<sup>++</sup> trong muối MgCl<sub>2</sub> ở nồng độ thích hợp, (6) dung dịch đệm Tris-KCl để làm dung môi thích hợp cho phản ứng. Khi ống nghiệm phản ứng này được cho vào buồng ủ chu kỳ nhiệt của máy luân nhiệt (thermal cycler), mà chúng ta thường gọi là máy PCR, chương trình nhiệt độ trong máy sẽ làm cho nhiệt độ trong buồng ủ nhiệt của máy thay đổi theo chu kỳ, nhờ vậy mà phản ứng nhân bản DNA sẽ xảy ra.

### Nguyên tắc của PCR

Về mặt nguyên tắc, một chu kỳ nhiệt độ sẽ bao gồm 3 giai đoạn nhiệt độ (*hình 1*): (1) Đầu tiên nhiệt độ sẽ được đưa lên 94°C, ở nhiệt độ này các liên kết hydro của mạch đôi DNA sẽ bị mất đi, nhờ vậy DNA đích bị biến tính thành các mạch đơn; giai đoạn



**Hình 1:** Nguyên tắc của PCR là nhân bản DNA đích qua các chu kỳ nhiệt

nhệt độ này được gọi là *giai đoạn biến tính*. (2) Kế đó nhiệt độ sẽ được hạ đến 55°C-65°C là nhiệt độ thích hợp để các đoạn môi tìm đến bắt cặp bổ sung vào hai đầu của đoạn DNA đích, giai đoạn nhiệt độ này được gọi là *giai đoạn bắt cặp*. (3) Cuối cùng, nhiệt độ được đưa lên 72°C là nhiệt độ thích hợp cho hoạt tính của enzyme *Taq polymerase* để kéo các dNTP lại đầu 3' của đoạn môi đang bắt cặp trên đầu 5' của sợi DNA đích để bắt nguồn cho sự tổng hợp nên mạch bổ sung. 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  $2^{30}$  đến  $2^{40}$  bản sao, tức là đến hàng tỷ bản sao.

### **Lịch sử phát minh PCR**

Thử nghiệm PCR được một nhà khoa học người Mỹ tên là Kary Mullis phát minh vào năm 1985. Lúc đó Kary Mullis chỉ là một nhà hoá sinh học khá tầm thường, làm việc tại một phòng thí nghiệm cũng không hiện đại mấy. Ý tưởng của phát minh này đến trong đầu K. Mullis một cách tình cờ khi ông lái xe qua một vùng đồi núi tại bắc California vào một buổi chiều mà trong đầu vẫn cứ miên man suy nghĩ về công trình nhân bản ADN mà ông đang làm tại phòng thí nghiệm, và rồi ông bị chạy lố đường nên phải lùi xe quay về lối cũ. Khi lùi xe như vậy, ông chợt thấy rõ hai làn bánh xe mới bị tách khỏi hai làn bánh xe cũ!!..Hình ảnh này chợt làm loé sáng ra trong đầu ông ý tưởng dùng nhiệt độ để làm biến tính sợi đôi DNA thành hai mạch đơn...Nhờ đó ông đã phát minh ra thử nghiệm PCR. Công trình nghiên cứu này được ông gửi đến tờ Nature nhưng bị từ chối vì ban biên tập cho ông là một tác giả vô danh. Do vậy ông gửi bài đến tờ Scientific American và ban biên tập tạp chí khoa học này đã nhận diện được đây là một phát minh lớn, họ đăng tải ngay trong số báo (1985) Vol. 253, 34-157. Chỉ một thời gian ngắn sau đó, K. Mullis lập tức được nổi tiếng trong giới khoa học thời bấy giờ vì đã thực hiện được ước mơ của nhiều nhà khoa học thời đó là nhân bản được DNA trong ống nghiệm mà không cần phải nhờ đến các tế bào chủ như vi khuẩn hay nấm men, đồng thời mở ra được rất nhiều triển vọng trong nghiên cứu và ứng dụng. Tám năm sau, phát minh này đã đem lại cho tác giả một nửa giải Nobel hóa học (1993). Có thể nói trong lịch sử khoa học, hiếm có một nhà khoa học nào có được một kỳ tích như vậy: Đạt được giải Nobel chỉ 8 năm sau phát minh!!.. Mà quả thật kỳ tích này cũng rất xứng đáng, vì PCR chính là một công cụ cách mạng nhất trong nghiên cứu và ứng dụng y sinh học.

## **Các chìa khóa kỹ thuật đã giúp hoàn thiện PCR**

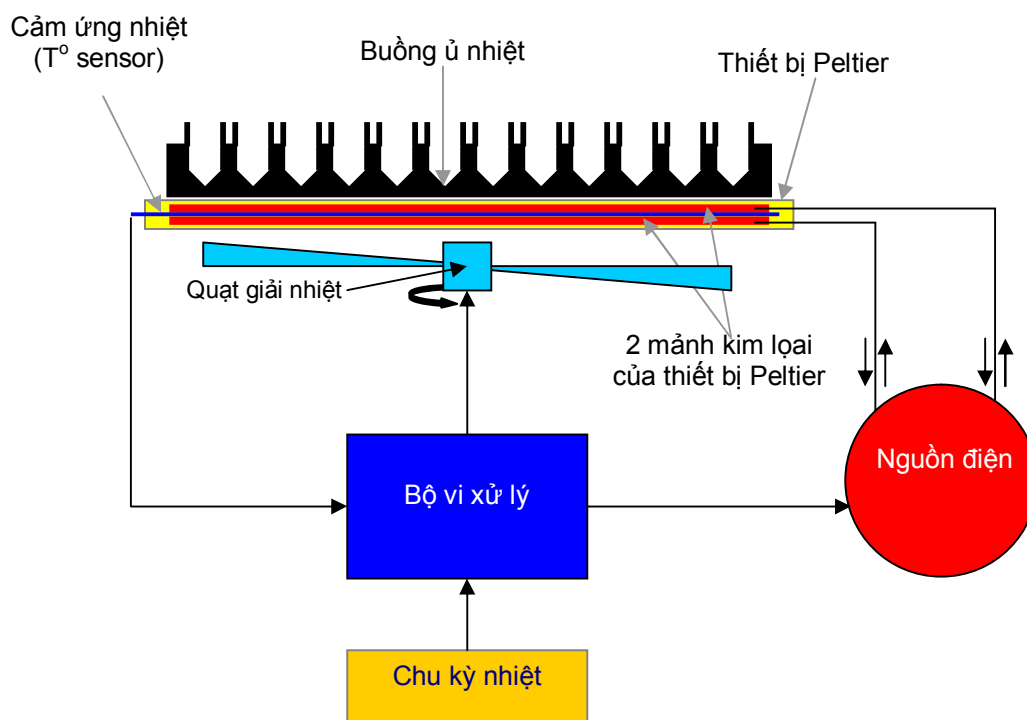
Cho đến ngày hôm nay, để có thể trở thành một công cụ không thể thiếu được trong nhiều phòng thí nghiệm y sinh học dùng trong nghiên cứu cũng như phòng thí nghiệm lâm sàng dùng trong chẩn đoán, đã có 3 tiến bộ kỹ thuật đã đóng góp vào làm cho kỹ thuật PCR nguyên thủy của K. Mullis vốn dĩ khá phức tạp trở thành kỹ thuật PCR ngày nay khá đơn giản và hiệu quả. Ba tiến bộ kỹ thuật đó là:

### **1. Phát hiện và sản xuất được các enzyme polymerase chịu nhiệt**

Enzyme polymerase chịu nhiệt đầu tiên được tách chiết từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* phân lập được trong bùn đất của các suối nước nóng tại Hoa Kỳ, chính vì vậy mà polymerase chịu nhiệt thường được gọi là *Taq polymerase* (*Taq* viết tắt từ *Thermus aquaticus*) dù ngày nay đa số có nguồn gốc từ vi khuẩn *E. coli* hay các vi khuẩn không chịu nhiệt khác được tái tổ hợp di truyền với gene chịu trách nhiệm sản xuất polymerase chịu nhiệt. Nhờ có polymerase chịu nhiệt mà người làm thí nghiệm không phải mở nắp tube phản ứng để bổ sung enzyme polymerase sau mỗi giai đoạn biến tính (94°C) của mỗi chu kỳ nhiệt. Cũng nhờ có enzyme polymerase chịu nhiệt mà người làm thí nghiệm có thể có kết quả PCR đặc hiệu hơn nhờ có thể thực hiện được giai đoạn bắt cặp của mỗi trên sợi khuôn ở nhiệt độ bắt cặp tối hảo của mỗi thay vì phải luôn luôn để nhiệt độ bắt cặp của mỗi và nhiệt độ kéo dài sợi bổ sung ở 37°C như là trong kỹ thuật PCR nguyên thủy của K. Mullis, phải dùng enzyme polymerase không chịu nhiệt tách chiết từ *E. coli*.

### **2. Chế tạo được các máy luân nhiệt hoạt động hiệu quả hơn**

Đó là các máy tạo chu kỳ nhiệt với buồng ủ nhiệt có nhiệt độ lên xuống chính xác và đồng nhất, tốc độ gia giảm nhiệt cực nhanh theo chu kỳ. Một trong các chìa khóa kỹ thuật góp phần làm được điều này là ứng dụng công nghệ Peltier trong chế tạo các máy điều hòa nhiệt độ cho phi thuyền không gian Hoa Kỳ vào chế tạo các buồng ủ nhiệt của máy luân nhiệt (còn gọi là máy chu kỳ nhiệt), mà hãng MJ research chính là sở hữu chủ của sáng chế này. Buồng ủ nhiệt của các máy luân nhiệt sử dụng hiệu ứng Peltier này được làm bằng kim loại dẫn nhiệt cao, đặt trên một thiết bị Peltier có cấu tạo là hai mảnh kim loại đặc biệt đặt áp vào nhau. Hai mảnh kim loại của thiết bị này được nối với hai cực của nguồn điện và được điều chỉnh tự động để chiều của dòng điện đi qua

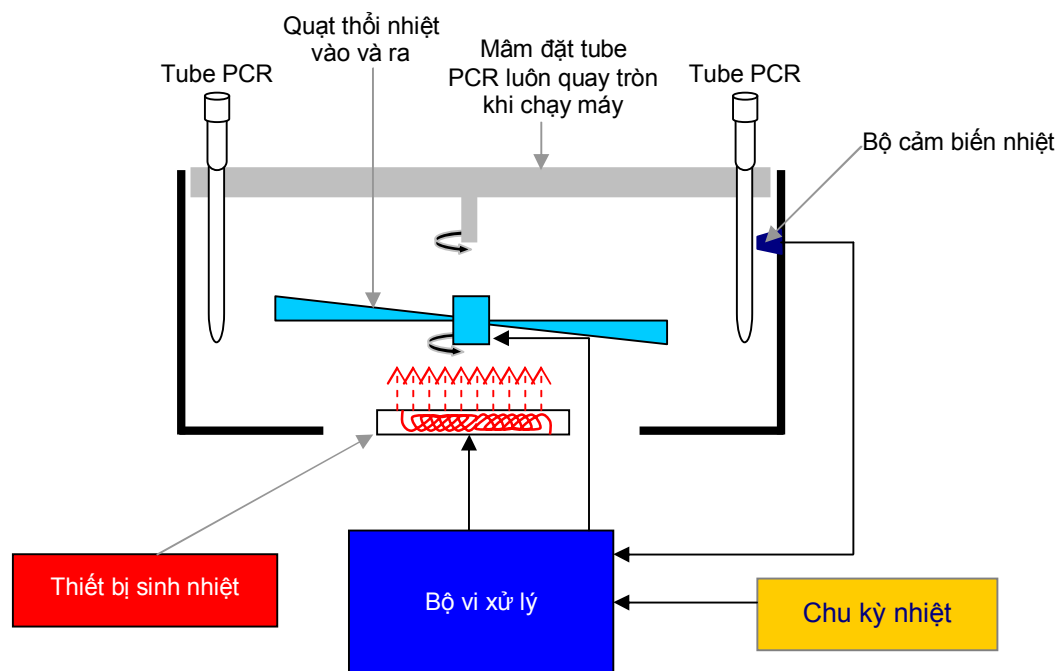


**Hình 2:** Sơ đồ khối minh họa nguyên tắc hoạt động của máy luân nhiệt với buồng ủ nhiệt Peltier

thiết bị được thay đổi theo chiều này hay theo chiều ngược lại. Chính sự đổi chiều dòng điện đã làm cho hai mảnh kim loại của thiết bị Peltier bị nóng lên ở mặt này và lạnh đi ở mặt khác sẽ bị đảo ngược lại nhiệt độ, nghĩa là mặt nóng sẽ bị lạnh đi và mặt lạnh sẽ bị nóng lên. Như vậy, chu kỳ nhiệt mà người sử dụng nhập vào sẽ được bộ vi xử lý của máy sử dụng để điều khiển chiều và cường độ dòng điện đi qua hai mảnh kim loại của thiết bị Peltier, làm cho buồng ủ nhiệt được lên xuống nhiệt độ theo chu kỳ nhiệt đã nhập vào (**hình 2**).

Hiện nay, đa số các máy luân nhiệt đều sử dụng buồng ủ nhiệt bằng kim loại hoạt động theo nguyên lý Peltier nhờ có thể thiết kế máy ngày càng gọn nhẹ hơn, có nhiều chức năng hơn, kể cả chức năng gradient tức là chức năng thực hiện nhiệt độ bất cập mỗi thay đổi một cách tuyến tính theo hàng ngang hay theo hàng dọc trên buồng ủ nhiệt. Ngoài ra, nhờ thiết kế buồng ủ nhiệt phù hợp cũng như sử dụng các kim loại dẫn nhiệt và thoát nhiệt nhanh để làm buồng ủ nhiệt nên các máy luân nhiệt Peltier vẫn có thể thực hiện PCR với thời gian nhanh hơn.

Một loại buồng ủ nhiệt khác đã được hãng Idaho phát triển, đó là buồng ủ khí. Với loại buồng ủ này, các ống nghiệm phản ứng được treo và quay ly tâm nhẹ liên tục trong buồng ủ với nhiệt độ trong buồng được làm nóng lên và nguội xuống nhờ quạt thổi khí nóng hay mát vào buồng ủ theo chu kỳ được điều khiển từ một bộ vi xử lý nhận lệnh từ

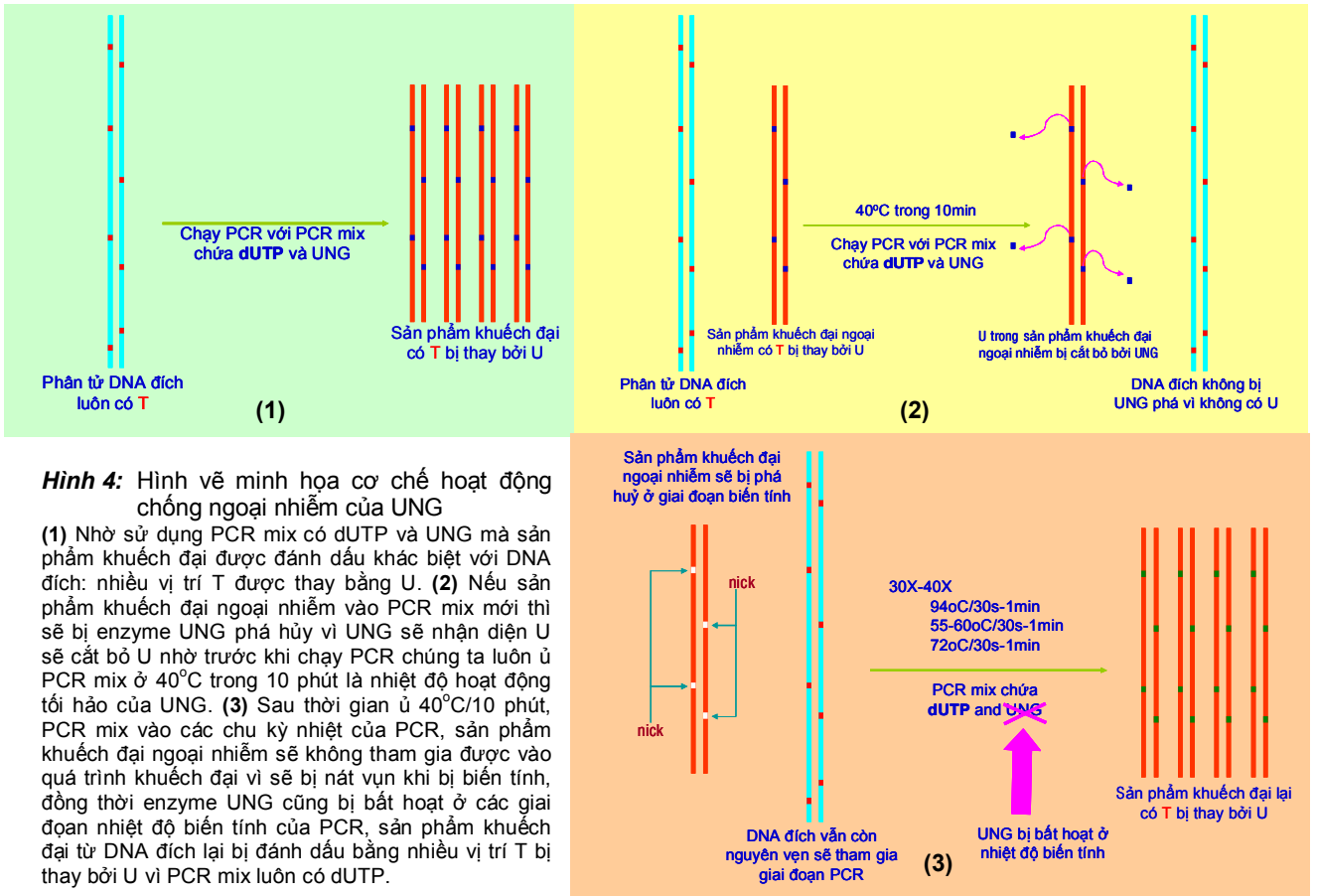


**Hình 3:** Sơ đồ khối minh họa nguyên tắc hoạt động của máy luân nhiệt với buồng ủ nhiệt bằng khí

chương trình nhiệt được nhập vào máy (**hình 3**). Ưu điểm của các máy PCR sử dụng buồng ủ khí là có thể thực hiện PCR với các giai đoạn nhiệt độ rất ngắn chỉ trong vài giây, đặc biệt khi PCR được thực hiện trong ống phản ứng mao quản (LightCycler của Roche). Tuy nhiên loại buồng ủ này không thể có chức năng gradient cũng như không thể đưa nhiệt độ buồng ủ nhiệt xuống nhiệt độ lạnh nếu muốn thực hiện giữ lạnh ống phản ứng trong buồng ủ sau khi thực hiện PCR.

### **3. Tìm được phương pháp loại trừ ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại**

PCR rất nhạy cảm nhờ bản chất của kỹ thuật này là khuếch đại một DNA đích thành hàng tỷ bản sao, và cũng chính do bản chất này mà thách thức lớn nhất của việc ứng dụng PCR trong các phòng thí nghiệm chẩn đoán là chống được ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại, được gọi là PCR carry-over. Ngày hôm nay, thách thức này đã được các nhà khoa học giải quyết với một giải pháp kỹ thuật rất hữu hiệu, đó là giải pháp dùng enzyme UNG (Uracil-DNA glycosilase). Nguyên tắc của giải pháp này là dùng các PCR mix có thêm dUTP và enzyme UNG ngay từ khi bắt đầu sử dụng PCR trong chẩn đoán để các sản phẩm PCR khuếch đại từ DNA đích sẽ được đánh dấu khác biệt với DNA đích nhờ nhiều vị trí T trên trình tự chuỗi của sản phẩm khuếch đại bị thay thế bởi U do enzyme polymerase nhầm lẫn giữa T và U khi thực hiện khuếch đại. Chính nhờ vậy mà sản phẩm khuếch đại nếu bị ngoại nhiễm vào PCR mix mới sẽ



không thể tham gia vào phản ứng khuếch đại vì sẽ bị enzyme UNG phá hủy trước khi thực hiện PCR (*hình 4*).

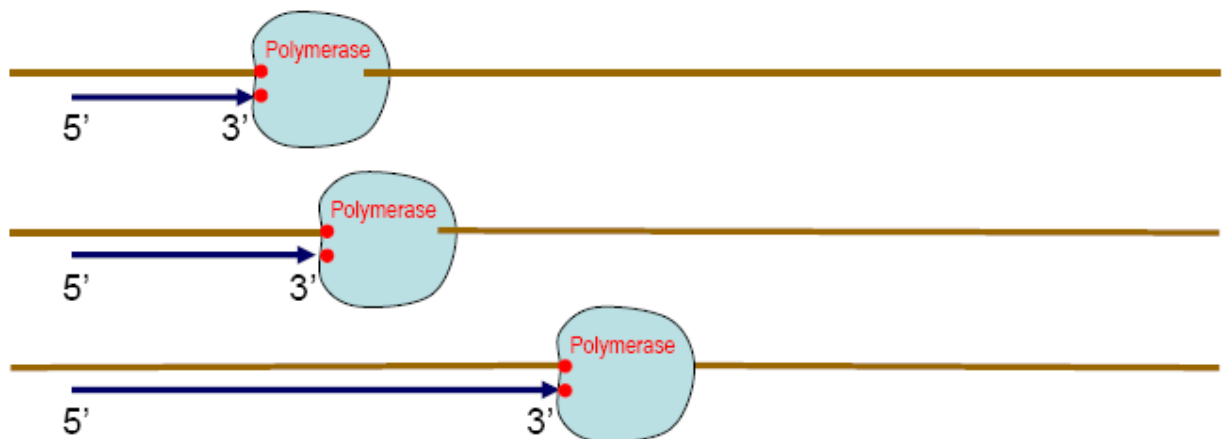
Chính nhờ giải pháp chống ngoại nhiễm bằng enzyme này mà ngày hôm nay các phòng thí nghiệm có thể dễ dàng ứng dụng PCR trong chẩn đoán, chỉ cần thực hiện trong các hood làm việc chuyên biệt ở trong cùng một phòng thí nghiệm, không nhất thiết phải thiết kế lại phòng thí nghiệm để có các phòng chuyên biệt như đòi hỏi trước đây nữa. Có thể nói giải pháp chống ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại bằng UNG đã tạo cơ hội để các phòng thí nghiệm lâm sàng tại các quốc gia có thu nhập thấp thực hiện được ước mơ mà trước đây họ không bao giờ nghĩ có thể làm được, đó là ứng dụng được PCR trong chẩn đoán.

**Vai trò của môi (primers)**

Môi là những đoạn oligonucleotides dài khoảng 20-30 bases có trình tự bổ sung với hai đầu của đoạn DNA mà người làm thí nghiệm muốn nhân bản. Môi giữ vai trò quyết định để polymerase tổng hợp được sợi bổ sung vì để có thể trượt được trên sợi khuôn tổng hợp sợi bổ sung, polymerase phải nhận diện được nucleotide ở đầu 3' của môi bắt cặp được

với một nucleotide ở sợi khuôn (**hình 5**). Nếu không có môi hay nucleotide ở đầu 3' của môi không bắt cặp được với một nucleotide trên sợi khuôn thì polymerase không nhận diện được đầu 3' của môi, không thể trượt được trên sợi khuôn để tổng hợp được sợi bổ sung (**hình 6**). Do vậy có thể nói môi đóng vai trò quyết định tính đặc hiệu của PCR để nhân bản một đoạn DNA đặc hiệu nào đó. Vd: Muốn chẩn đoán lao bằng PCR thì phải thiết kế cho được cặp môi chỉ bắt cặp được một đoạn DNA đặc hiệu chỉ có trên bộ gene DNA của vi khuẩn lao mà không có trên các vi khuẩn khác và cả DNA từ cơ thể vật chủ.

Để cho môi có thể bắt cặp một cách hoàn toàn đặc hiệu trên sợi khuôn thì phải duy trì giai đoạn bắt cặp của chu kỳ nhiệt ở nhiệt độ tối hảo cho sự bắt cặp của môi, gọi là nhiệt độ bắt cặp ( $T_a$ ), thường thấp hơn nhiệt độ chảy ( $T_m$ ) của môi khoảng  $10^\circ\text{C}$ . Nhiệt độ chảy phụ thuộc rất nhiều vào chiều dài và nhất là phụ thuộc vào tỷ lệ G và C trong thành phần của môi, do vậy muốn môi có  $T_a$  cao, phải thiết kế môi sao cho có tỷ lệ G và C cao. Để thiết kế được môi, người làm thí nghiệm có thể sử dụng các phần mềm chuyên dùng cho thiết kế môi (ví dụ phần mềm Primer Premier 5.0). Phần mềm này sẽ dò trên trình tự DNA đích được đưa vào để tự động lựa chọn các cặp môi tối ưu theo các thông số mà người làm thí nghiệm mong muốn (ví dụ: chiều dài của môi,  $T_a$  của môi, chiều dài sản phẩm khuếch đại...). Trình tự DNA đích được đưa vào có thể là trình tự của gene đích



**Hình 5:** Polymerase nhận diện được nucleotide ở đầu 3' của môi bắt cặp với nucleotide ở sợi khuôn nên trượt được trên sợi khuôn để tổng hợp sợi bổ sung



**Hình 6:** Một khi nucleotide ở đầu 3' của môi không bắt cặp được với nucleotide trên sợi bổ sung thì polymerase sẽ không nhận diện được nên không thể trượt được trên sợi khuôn để tổng hợp sợi bổ sung

hay đoạn DNA đích tải từ ngân hàng dữ liệu gene, hay từ kết quả nghiên cứu giải trình tự của đoạn gene mà người làm thí nghiệm quan tâm. Người làm thí nghiệm cũng có thể dùng phần mềm thiết kế mồi để tự dò trên trình tự DNA đích và lựa chọn cặp mồi theo các thông số mà mình mong muốn, đặc biệt là các thông số như nhiệt độ bắt cặp mồi là bao nhiêu và chiều dài sản phẩm khuếch đại mà mình mong muốn là bao nhiêu. Sau khi đã có được các trình tự của các cặp mồi, người làm thí nghiệm phải blast search với các trình tự DNA có trên ngân hàng dữ liệu gene của NCBI để xác định các trình tự mồi thiết kế là đặc hiệu cao với DNA đích.

### **Cách pha PCR mix**

Thể tích của một PCR mix = Thể tích phản ứng – Thể tích mẫu được cho vào. Ví dụ nếu thể tích phản ứng chúng ta muốn pha là 50  $\mu$ l và thể tích mẫu cho vào là 10  $\mu$ l, thì thể tích một PCR mix sẽ phải là 40  $\mu$ l. Một PCR mix thông thường chứa các thành phần được liệt kê sau đây:

- PCR buffer 1X được pha từ PCR 10X (Tris HCl 100 mM và KCl 500 mM).
- $MgCl_2$  có thể từ 1.5 mM đến 5 mM tùy thăm dò để xác định nồng độ tối ưu.
- Mồi xuôi và mồi ngược có thể từ 10 pm đến 50 pm cho một thể tích phản ứng.
- *Taq polymerase* có thể từ 1.25 U đến 2.5 U tùy nhà sản xuất.
- dNTP với nồng độ 200  $\mu$ M cho từng loại.
- Nếu muốn chống ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại thì thêm dUTP đạt nồng độ 200  $\mu$ M và UNG với hàm lượng 0.1 đến 1U cho một thể tích phản ứng.

Để pha được PCR mix, người làm thí nghiệm phải chuẩn bị tất cả mọi thuốc thử và dụng cụ cần thiết trong một hood sạch, tốt nhất là một clean bench, đặt trong một phòng tách biệt với phòng làm xét nghiệm PCR. Các dụng cụ được sử dụng như các micropipette, đầu micropipette, các tube, chai...phải chuyên biệt không được mang ra khỏi phòng cũng như đem từ các phòng thí nghiệm khác vào. Các thuốc thử phải được giữ lạnh hay giữ đông trong các tủ lạnh hay tủ đông chuyên biệt trong phòng. Phải dùng nước khử ion tuyệt đối đạt chất lượng 18.2 mega-Ohm và khử trùng để pha các PCR mix. Phải dùng các micropipette tuyệt đối chính xác để pha các PCR mix và các micropipette này phải được lau sạch bằng cồn và để khô trong clean bench trước và sau khi dùng. Nên sử dụng các đầu micropipette có lọc được sản xuất bởi các hãng có tiếng về chất lượng



(như Eppendorf, Greiner, Axygen...) vì các đầu micropipette này không bị bám nước bên trong thành khi lấy các thể tích dung dịch. Trước khi tiến hành pha PCR mix, các thuốc thử phải được giữ trong các giá giữ lạnh hay các giá đặt trong các hộp đựng đá bào. Các thuốc thử cần phải rã đông sẽ để chúng tự rã đông trong đá bào hay trong các giá lạnh. Người làm thí nghiệm không nên pha chỉ một PCR mix vì phải lấy một số thuốc thử với thể tích dưới 1  $\mu\text{l}$ , và như vậy thì sẽ khó chính xác. Do vậy, nên pha một master mix với tối thiểu 5 hay 10 PCR mix. Tính toán như thế nào để thể tích thuốc thử được lấy sẽ không có số lẻ của  $\mu\text{l}$ . Nên lập một bảng như minh họa trong **bảng 1** dưới đây để tính toán và kiểm soát không để thiếu các thành phần được cho vào để pha một PCR master mix.

**Bảng 1:** Bảng được thiết lập trước khi pha một master mix cho 100 PCR mix với thể tích phản ứng là 25  $\mu\text{l}$  và thể tích mẫu cho vào PCR mix là 5  $\mu\text{l}$ .

STT	Thành phần gốc	Nồng độ hay hàm lượng gốc	Nồng độ hay hàm lượng trong 1 thể tích pứ	Nồng độ hay hàm lượng trong 100 thể tích phản ứng	Thể tích phải lấy để pha master mix
1	PCR buffer 10X*	10X	1X	1X	250 $\mu\text{l}$
2	MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5mM	1.5mM	75 $\mu\text{l}$ **
3	Taq polymerase	5U/ $\mu\text{l}$	1.25U	125U	25 $\mu\text{l}$
4	dNTP	25mM/each	200 $\mu\text{M}$ /each	200 $\mu\text{M}$ /each	20 $\mu\text{l}$ **
5	Mỗi xuiđi	100 $\mu\text{M}$ / $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{l}$
6	Mỗi ngược	100 $\mu\text{M}$ / $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{l}$
7	dUTP	100mM	200 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{l}$
8	UNG	1U/ $\mu\text{l}$	1U	100U	100 $\mu\text{l}$
9	Nước khử ion		Cho đủ (qsp) 20 $\mu\text{l}$	Cho đủ (qsp) 2000 $\mu\text{l}$	1505 $\mu\text{l}$

\*Nếu PCR 10X được cung cấp có sẵn MgCl<sub>2</sub> 15 mM thì sẽ không thêm MgCl<sub>2</sub> vào nữa vì nồng độ MgCl<sub>2</sub> đòi hỏi ở đây chỉ 1.5 mM. Nhưng nếu nồng độ MgCl<sub>2</sub> đòi hỏi trên 1.5 mM thì phải thêm MgCl<sub>2</sub> vào. \*\*Được tính toán theo công thức  $CV = C'V'$ , với C là nồng độ gốc, V là thể tích gốc cần phải lấy, C' là nồng độ cần phải pha, và V' là tổng thể tích phản ứng (trong ví dụ này là 2500  $\mu\text{l}$ , tổng thể tích của 100 phản ứng, mỗi phản ứng 25  $\mu\text{l}$ ).

Sau khi đã pha, vẫn giữ master mix trong đá bào, lấy một ít PCR mix cho vào tube PCR để thực hiện kiểm tra chất lượng PCR master mix được pha xem có đạt độ nhạy mong muốn hay không (được trình bày trong phần kế tiếp). Nếu kết quả đạt, phân nhỏ PCR master mix đã pha thành từng thể tích PCR mix cho vào các tube PCR được đặt sẵn trên các giá lạnh hay các giá ngâm trong đá bào. Sau khi đã phân thành các PCR mix, đậy chặt các nắp tube PCR lại và giữ trong tủ đông -18°C đến -30°C (không nên giữ -70°C vì sẽ làm cho enzyme *Taq polymerase* trong PCR mix bị hỏng) cho đến khi đưa vào sử dụng. Thời gian giữ được PCR mix bao lâu là tùy thuộc rất nhiều vào chất lượng các

thuốc thử được dùng để pha PCR master mix, kể cả chất lượng nước khử ion. Do vậy người làm thí nghiệm, nếu muốn pha nhiều PCR mix để dùng dần, thì phải thường xuyên kiểm tra độ nhạy của PCR mix để biết được thời gian lưu trữ các PCR mình đã pha.

Người làm thí nghiệm cũng có thể pha sẵn PCR master mix 2X (đậm đặc 2 lần) chưa có môi, MgCl<sub>2</sub>, dUTP và UNG, rồi phân nhỏ vào các tube sạch, mỗi tube có thể dùng để pha các master mix 50 hay 100 PCR mix, giữ ở tủ đông -18°C đến -30°C để dùng dần.

**Bảng 2** dưới đây hướng dẫn các pha PCR master mix 2X cho 2000 PCR mix.

**Bảng 2:** Bảng hướng dẫn cách pha một PCR master mix 2X cho 2000 PCR mix với thể tích phản ứng là 25 µl.

STT	Thành phần gốc	Nồng độ hay hàm lượng gốc	Nồng độ hay hàm lượng trong 1 thể tích pứ	Nồng độ hay hàm lượng trong 2000 thể tích phản ứng	Thể tích phải lấy để pha master mix
1	PCR buffer 10X*	10X	2X	2X	5.000µl
3	Taq polymerase	5U/µl	1.25U	125U	500µl
4	dNTP	25mM/each	200µM/each	200µM/each	400µl**
9	Nước khử ion		Cho đủ (qsp) 12.5µl	Cho đủ (qsp) 25.000µl	19.100µl

\*Nếu PCR 10X được cung cấp có sẵn MgCl<sub>2</sub> 15mM thì PCR master mix 2X được pha sẽ có sẵn 3 mM. \*\*Được tính toán theo công thức  $CV = C'V'$ , với C là nồng độ gốc, V là thể tích gốc cần phải lấy, C' là nồng độ cần phải pha, và V' là tổng thể tích phản ứng (trong ví dụ này là 25.000 µl, tổng thể tích của 2000 phản ứng, mỗi phản ứng 12.5 µl).

**Bảng 3:** Bảng được thiết lập trước khi pha một PCR master mix từ PCR master mix 2X để sau đó phân thành 100 PCR mix với thể tích phản ứng là 25 µl và thể tích mẫu cho vào PCR mix là 5 µl.

STT	Thành phần gốc	Nồng độ hay hàm lượng gốc	Nồng độ hay hàm lượng trong 1 thể tích pứ	Nồng độ hay hàm lượng trong 100 thể tích phản ứng	Thể tích phải lấy để pha master mix
1	PCR master mix 2X*	2X	1X	1X	1250µl
2	MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5mM	1.5mM	75µl**
5	Môi xuôi	100pm/µl	10pm	1000pm	10µl
6	Môi ngược	100pm/µl	10pm	1000pm	10µl
7	dUTP	100mM	200µM	200µM	5µl
8	UNG	1U/µl	1U	100U	100µl
9	Nước khử ion		Cho đủ (qsp) 20µl	Cho đủ (qsp) 2000µl	550µl

\*Nếu PCR master mix 2X được cung cấp có sẵn MgCl<sub>2</sub> 3 mM thì sẽ không thêm MgCl<sub>2</sub> vào nữa vì nồng độ MgCl<sub>2</sub> đòi hỏi ở đây chỉ 1.5mM. Nhưng nếu nồng độ MgCl<sub>2</sub> đòi hỏi trên 1.5 mM thì phải thêm MgCl<sub>2</sub> vào. \*\*Được tính toán theo công thức  $CV = C'V'$ , với C là nồng độ gốc, V là thể tích gốc cần phải lấy, C' là nồng độ cần phải pha, và V' là tổng thể tích phản ứng (trong ví dụ này là 2500 µl, tổng thể tích của 100 phản ứng, mỗi phản ứng 25 µl).

**Bảng 3** minh họa một cách pha PCR master mix 1X từ PCR master mix 2X đã pha sẵn này (nếu không muốn tự pha, có thể mua từ các nhà sản xuất có uy tín). Người làm thí nghiệm có thể pha các PCR mix để sử dụng bằng cách thêm môi, MgCl<sub>2</sub>, dUTP, UNG và bổ sung thêm nước khử ion vào.

## Kiểm tra độ nhạy của PCR mix đã pha

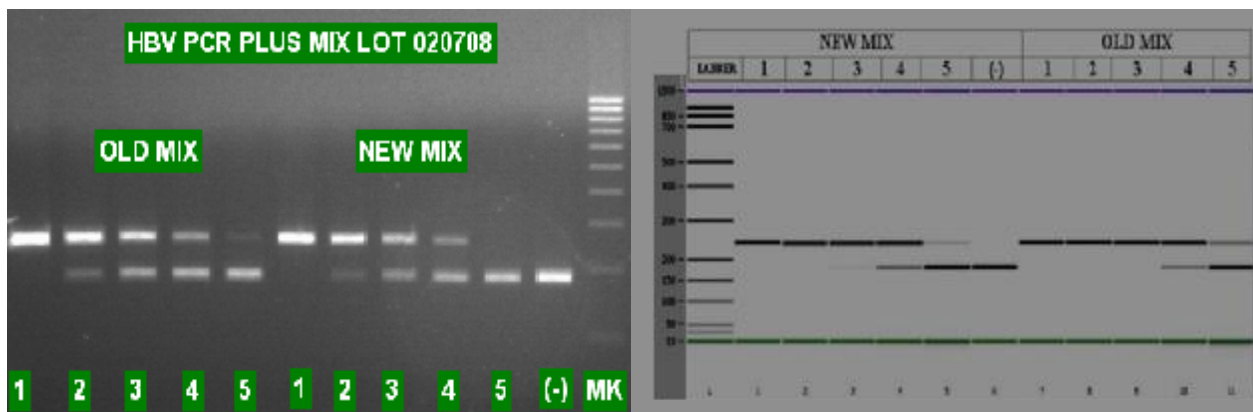
Để có thể kiểm tra được độ nhạy của PCR mix đã pha, trước hết người làm thí nghiệm phải có các dung dịch DNA đích đã biết sẵn số copies. Dung dịch DNA đích có thể chuẩn bị trong phòng thí nghiệm bằng cách tách chiết toàn bộ genomic DNA của tác nhân đích (vi khuẩn hay virus) đã biết số lượng, hay là dung dịch chứng [+] là plasmid DNA đã chèn DNA đích. Với dung dịch genomic DNA của tác nhân đích thì tùy thuộc vào số copies của đoạn DNA đích hiện diện trong genomic DNA mà chúng ta có thể biết được 1 tác nhân đích mang 1 hay nhiều hơn 1 copies DNA đích (ví dụ với PCR mix phát hiện *M. tuberculosis*, nếu DNA đích là đoạn chèn IS 6110 thì một vi khuẩn hay 1 genomic DNA sẽ mang đến 16-25 copies IS 6110; nhưng nếu DNA đích là 16s rDNA thì 1 genomic DNA chỉ mang 1 copy, do vậy 1 vi khuẩn sẽ chỉ tách chiết được 1 copy của DNA đích), nhờ vậy mà có thể tính được số copies DNA đích có trong dung dịch genomic DNA được tách chiết từ huyền dịch chứa số lượng tế bào tác nhân đích đã biết. Với dung dịch chứng [+] là plasmid DNA chứa đoạn chèn DNA đích, chúng ta có thể tính được số copies plasmid DNA có trong dung dịch từ lượng C ng của plasmid DNA. Cách tính như sau:

- 1 mole của một cặp base trên đoạn DNA là có khối lượng # 650gr, do vậy plasmid dài L base (kể cả đoạn DNA chèn vào) sẽ có khối lượng  $(650 \times L)$  gr hay  $(650 \times 10^9 \times L)$  ng.
- Theo định luật Avogadro, 1 mole sẽ có  $(6.022 \times 10^{23})$  phân tử (hay là số copies plasmid)
- Do vậy nếu dung dịch plasmid DNA có nồng độ C ng/ml thì số copies plasmid DNA có trong dung dịch này sẽ là:  $N (\text{copies/ml}) = (6.022 \times 10^{23}) \times C / (650 \times 10^9 \times L) \text{ copies/ml}$

Để kiểm tra độ nhạy của PCR mix, người làm thí nghiệm sẽ pha loãng liên tiếp các dung dịch DNA đích đã biết được số copies này trong dung dịch TE 1X để đạt các nồng độ DNA đích 1000, 100, 10, 1 và 1/10 copies trong một thể tích sẽ được cho vào PCR mix. Cho các nồng độ DNA đích đã pha loãng này vào các PCR mix. Phải dùng một PCR mix làm chứng [-] và dung dịch cho vào PCR mix này là TE 1X. Cho tất cả các PCR mix đã chuẩn bị xong này vào buồng ủ nhiệt của máy luân nhiệt. Chạy chương trình luân nhiệt thích hợp. Độ nhạy của PCR mix được xác định là số lượng copies của DNA đích thấp nhất được cho vào ống phản ứng mà vẫn cho được sản phẩm khuếch đại mong muốn

thấy được trên điện di. Độ nhạy của PCR mix còn được gọi là LOD (giới hạn phát hiện: Limit Of Detection) của PCR mix.

Để có thể dùng được trong chẩn đoán thì PCR mix phát hiện tác nhân vi sinh gây bệnh nhiễm trùng phải đạt được LOD = 1 copies DNA đích cho vào ống phản ứng. Nếu không đạt được độ nhạy này thì không nên sử dụng PCR mix đã pha vào trong xét nghiệm PCR chẩn đoán vì chỉ cần giảm độ nhạy một độ pha loãng cũng sẽ làm cho xét nghiệm PCR giảm độ nhạy gấp 10 lần cho dù các khâu khác của xét nghiệm vẫn có độ nhạy cao. **Hình 7** dưới đây là hai kết quả kiểm tra độ nhạy của PCR mix được công ty Nam Khoa sản xuất để phát hiện HBV (đọc kết quả bằng điện di trong thạch) và *M. tuberculosis* (đọc kết quả bằng điện di trên chip).



**Hình 7:** Kết quả kiểm tra chất lượng PCR mix phát hiện HBV (HBV-PCR mix, bên trái) đọc trên điện di agarose và PCR mix phát hiện *M. tuberculosis* (MTB-PCR mix, bên phải) đọc trên điện di bằng chip bio-analyzer của Agilent. Khi làm kiểm tra chất lượng, luôn luôn so sánh giữa PCR mix mới sản xuất với PCR mix đã sản xuất và đang dùng để xem chất lượng có tương đương không. DNA đích để kiểm tra chất lượng HBV-PCR mix là dung dịch plasmid DNA biết rõ số copies được pha loãng liên tiếp và giếng số 4 là giếng chứa 1 copy (plasmid DNA, tức là tương đương 1 copy DNA đích) trong thể thích 10  $\mu$ l cho vào PCR mix. DNA đích để kiểm tra chất lượng MTB-PCR mix là dung dịch genomic DNA biết rõ số copies được pha loãng liên tiếp và giếng số 4 là giếng chứa 1 fg (tương đương khối lượng 1 genomic DNA, chứa 16-25 copies IS6110) trong thể thích 10  $\mu$ l cho vào PCR mix. Kết quả cho thấy HBV-PCR mix đạt độ nhạy phát hiện 1 copy DNA đích (giếng số 4, vạch điện di kích thước 259 bps), MTB-PCR mix đạt độ nhạy 1 copy DNA đích (giếng số 5, vạch điện di kích thước 249 bps). Trong hai kết quả kiểm tra chất lượng này, chúng ta đều thấy có hiện diện vạch điện di kích thước 190 bps, đó là sản phẩm khuếch đại của chứng nội tại sử dụng chung mỗi với DNA đích để chứng minh là PCR mix vẫn đạt chất lượng dù có khuếch đại của chứng nội tại.

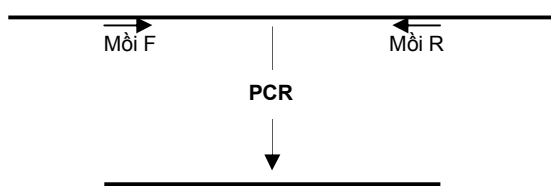
## Các PCR thường được sử dụng trong chẩn đoán phát hiện tác nhân nhiễm trùng

Tùy vào cách thiết kế để đạt được độ nhạy và độ đặc hiệu mà nhà nghiên cứu hay người làm thí nghiệm có thể sử dụng một trong nhiều loại PCR khác nhau để áp dụng trong chẩn đoán phát hiện các tác nhân gây nhiễm trùng. Xin nêu ra sau đây một số thường được sử dụng trong các phòng thí nghiệm hay trong các kit thương mại.

### 1. PCR đơn môi (monoplex PCR)

Chính là PCR kinh điển nhất chỉ sử dụng có một cặp môi đặc hiệu để khuếch đại một đoạn DNA đích đặc hiệu từ vi sinh vật muốn được phát hiện. Ví dụ PCR phát hiện HBV sử dụng cặp môi đặc hiệu một đoạn DNA trên gene S của virus viêm gan B.

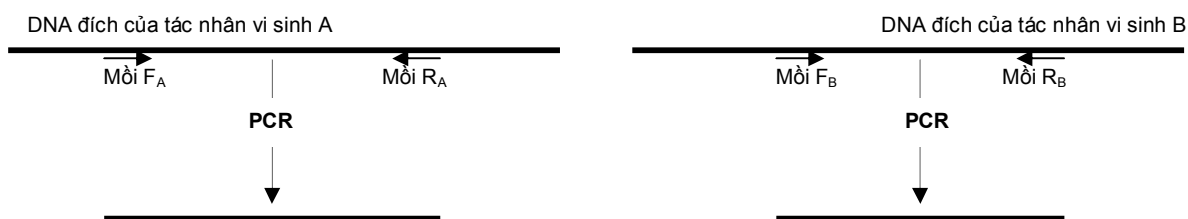
**Hình 8** theo đây minh họa nguyên tắc của PCR đơn môi.



**Hình 8:** Minh họa nguyên tắc PCR đơn môi

### 2. PCR đa môi (multiplex PCR)

Là PCR sử dụng nhiều cặp môi đặc hiệu cho các đoạn DNA đích đặc hiệu từ nhiều vi sinh vật muốn được phát hiện đồng thời. Để thiết kế được Multiplex PCR thì quan trọng nhất là phải làm sao thiết kế được các môi có cùng nhiệt độ bắt cặp ( $T_a$ ) lên DNA đích, đồng thời các môi này cũng không được bắt cặp với nhau, và quan trọng nhất là độ nhạy phát hiện từng tác nhân đích không bị giảm mà vẫn tương đương như độ nhạy của PCR đơn môi. Tuy nhiên rất khó để đạt được các điều kiện như vậy, nhất là khi muốn phát hiện trên 2 tác nhân vi sinh trực tiếp trong bệnh phẩm. Do vậy, PCR đa môi phát hiện trên 2 tác nhân vi sinh chỉ có thể áp dụng để phát hiện nhiều tác nhân vi sinh cùng một lúc trong các môi trường nuôi cấy tăng sinh vi khuẩn từ thực phẩm vì lượng DNA của vi khuẩn đích nếu có mặt sẽ hiện diện khá nhiều trong các môi trường tăng sinh này. **Hình 9** minh họa nguyên tắc PCR đa môi.

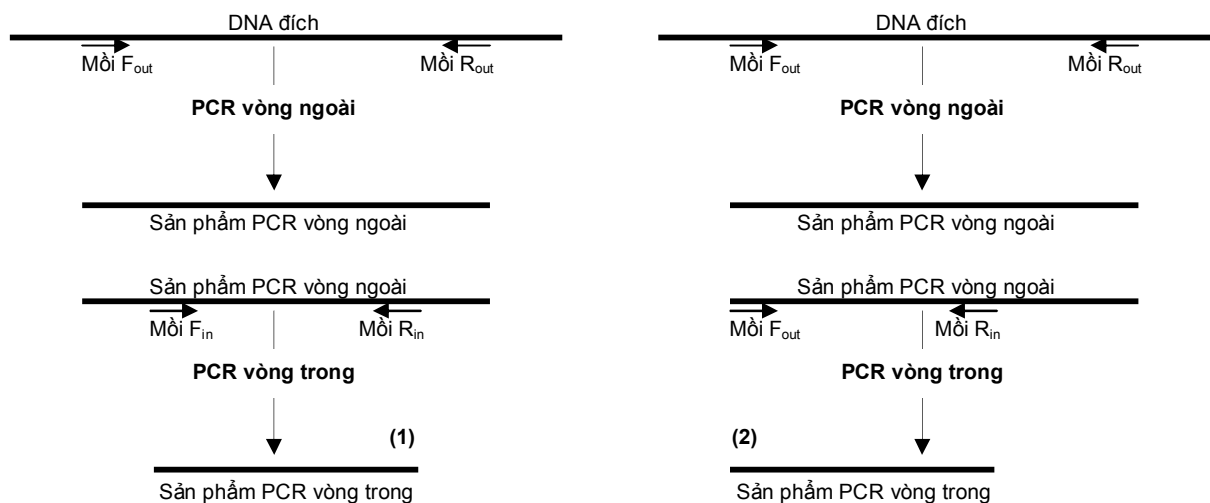


**Hình 9:** Minh họa nguyên tắc PCR đa môi phát hiện hai tác nhân vi sinh cùng một lúc

### 3. PCR tổ (nested PCR)

Là PCR có hai giai đoạn: giai đoạn đầu là PCR dùng một cặp môi ngoài (gọi là PCR vòng ngoài) để khuếch đại một đoạn DNA trong đó có chứa các trình tự đặc hiệu muốn tìm, sau đó dùng sản phẩm PCR vòng ngoài này làm khuôn cho vào ống PCR có cặp môi trong (gọi là PCR vòng trong) để khuếch đại trình tự đặc hiệu muốn tìm này

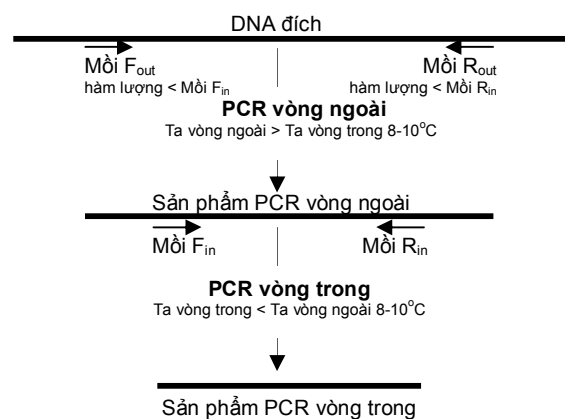
(*hình 10-1*). Ngoài nested PCR, còn có semi-nested hay hemi-nested PCR là biến thể của nested PCR với một môi vòng ngoài được dùng làm một trong hai môi của cặp môi vòng trong (*hình 10-2*). Ưu điểm của nested PCR (và cả semi-nested hay hemi-nested PCR) là làm tăng độ nhạy của PCR khi mà môi cho trình tự đặc hiệu muốn tìm có độ nhạy thấp (như trong các trường hợp phải dùng môi có degenerative base). Tuy nhiên, nhược điểm lớn nhất của phương pháp này là nguy cơ ngoại nhiễm cao do phải mở tube PCR vòng trong để cho sản phẩm PCR vòng ngoài vào.



**Hình 10:** Minh họa nguyên tắc (1) nested PCR và (2) semi-nested/hemi-nested PCR

#### 4. PCR tổ không dừng (non-stop nested PCR)

Là PCR tổ nhưng được thiết kế để cả hai giai đoạn PCR vòng ngoài và PCR vòng trong đều được thực hiện trong cùng một tube PCR nhờ vậy mà sau khi hoàn tất PCR vòng ngoài thì chạy tiếp chương trình PCR vòng trong chứ không cần dừng lại nhờ sản phẩm khuếch đại của PCR vòng ngoài trở thành bản gốc cho PCR vòng trong ngay trong cùng tube phản ứng (*hình 11*). Để có thể làm được non-stop nested PCR, nhà nghiên cứu phải thiết kế môi vòng ngoài sao cho có nhiệt độ bắt cặp cao hơn 8°C đến 10°C so với môi vòng trong để khi chạy PCR vòng ngoài với nhiệt độ bắt cặp thích hợp cho PCR vòng ngoài sẽ không có sự bắt cặp của môi PCR vòng trong lên DNA đích; đồng thời nhà nghiên cứu cũng phải tối ưu

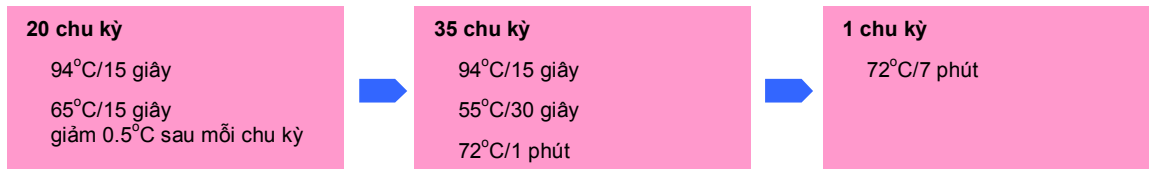


**Hình 11:** Minh họa nguyên tắc non-stop nested PCR

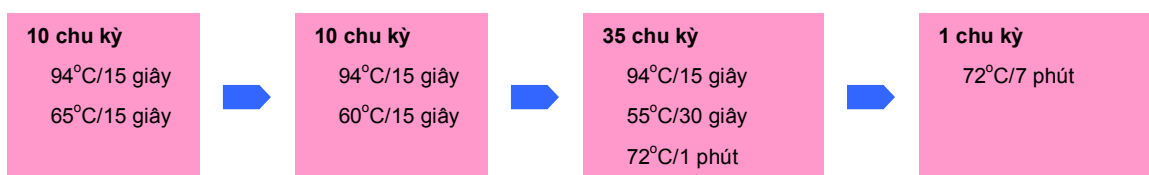
cho được tỷ lệ mỗi vòng ngoài so với mỗi vòng trong sao cho sau khi chạy PCR vòng trong sẽ không còn mỗi vòng ngoài để có thể tiếp tục bắt cặp lên DNA đích. Ưu điểm của non-stop nested PCR là vừa có độ nhạy cao, vừa tránh được nguy cơ ngoại nhiễm mà nested PCR phải gặp vì phải mở nắp tube PCR vòng trong để cho sản phẩm PCR vòng ngoài vào, và đồng thời có thể áp dụng phương pháp chống ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại bằng cách thêm dUTP và UNG vào PCR mix (phương pháp này không thể áp dụng được cho nested PCR).

### 5. Touch-down PCR

Là PCR có chương trình luân nhiệt có nhiệt độ bắt cặp giảm dần trong 10 hay 20 chu kỳ đầu, cứ sau mỗi chu kỳ giảm 0.5°C đến 1°C, hay chỉ qua 1 đến 2 bước giảm nhiệt độ với mỗi bước giảm 5°C, để đạt đến nhiệt độ bắt cặp thích hợp nhất của mỗi. Trong 10-20 chu kỳ có nhiệt độ bắt cặp giảm dần này, chương trình luân nhiệt chỉ có hai bước nhiệt độ là biến tính và bắt cặp chứ không có bước kéo dài. Hai sơ đồ sau đây minh họa chương trình luân nhiệt cho Touch-down PCR có nhiệt độ bắt cặp giảm dần (*sơ đồ 1*) hay giảm 2 bước (*sơ đồ 2*) đến nhiệt độ bắt cặp thích hợp nhất của mỗi:



**Sơ đồ 1:** Một ví dụ minh họa chương trình luân nhiệt Touch-down PCR với nhiệt độ bắt cặp giảm dần



**Sơ đồ 2:** Một ví dụ minh họa chương trình luân nhiệt Touch-down PCR với nhiệt độ bắt cặp giảm 2 bước

Touch-down PCR thường được nhà nghiên cứu sử dụng để làm tăng độ đặc hiệu của mỗi khi bắt cặp vào DNA đích. Lý do là nhờ nhiệt độ bắt cặp hạ xuống dần sẽ làm cho mỗi được đưa dần đến vị trí bổ sung nhất với nó trên mạch khuôn của DNA đích, tránh được hiện tượng mỗi bắt cặp vào các vị trí không đặc hiệu. Chúng tôi thường sử dụng touch-down PCR một khi PCR cho nhiều sản phẩm khuếch đại không đặc hiệu biểu hiện trên điện di thấy quá nhiều vạch phụ mà các giải pháp điều chỉnh khác không giải quyết được.

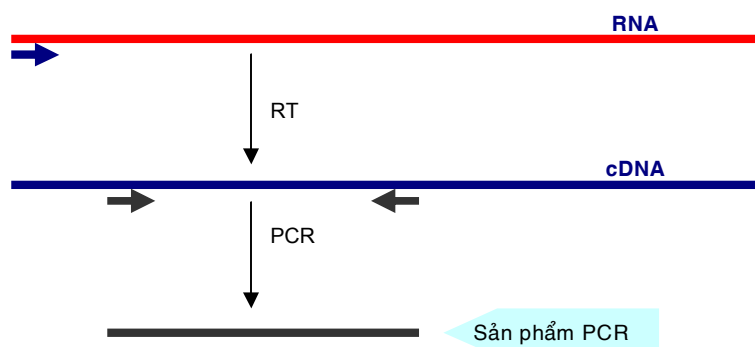
## 6. RT-PCR

Là phương pháp PCR mà nucleic acid đích cần phải phát hiện là RNA. Để có thể thực hiện được PCR này thì trước hết RNA đích phải được phiên mã ngược (RT, reverse transcription) thành cDNA, rồi sau đó sẽ dùng PCR để khuếch đại trình tự đích trong cDNA bằng cặp mồi đặc hiệu cho trình tự này. Vì phải thực hiện hai giai đoạn RT rồi mới đến PCR, nên kỹ thuật này được gọi là kỹ thuật RT-PCR.

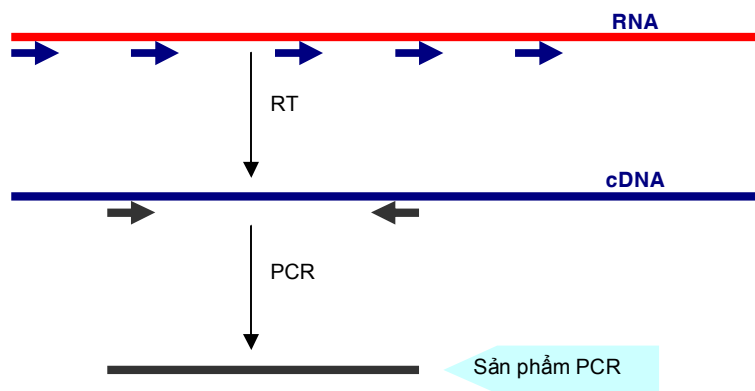
Giai đoạn phiên mã ngược (RT) là một giai đoạn hết sức quan trọng quyết định sự thành công của RT-PCR. Enzyme được sử dụng trong giai đoạn này là Reverse transcriptase được tách chiết từ Moloney murine leukemia virus (M-MLV) gây bệnh ung thư bạch cầu trên chuột, hay từ Avian myeloblastosis virus (AMV) gây bệnh ung thư tủy trên gia cầm. Enzyme reverse transcriptase là một loại DNA polymerase không chịu nhiệt, sử dụng mạch RNA đơn làm sợi khuôn để tổng hợp nên sợi DNA bổ sung (cDNA, complementary DNA), do vậy giai đoạn RT còn được gọi là giai đoạn tổng hợp cDNA.

Để enzyme reverse transcriptase có thể tổng hợp được cDNA từ sợi khuôn là mạch đơn RNA, cần phải có mồi đặc hiệu bám lên trên sợi khuôn RNA và cũng cần dNTP để enzyme reverse transcriptase khi trượt trên mạch khuôn RNA có thể kéo dài được mạch cDNA.

Mồi được sử dụng trong giai đoạn RT có thể là mồi đặc hiệu cho trình tự RNA sẽ được phiên mã ngược thành cDNA (*hình 12*), và mồi này có thể là mồi xuôi hay mồi



**Hình 12:** RT-PCR với giai đoạn RT dùng mồi đặc hiệu



**Hình 13:** RT-PCR với giai đoạn RT dùng mồi ngẫu nhiên

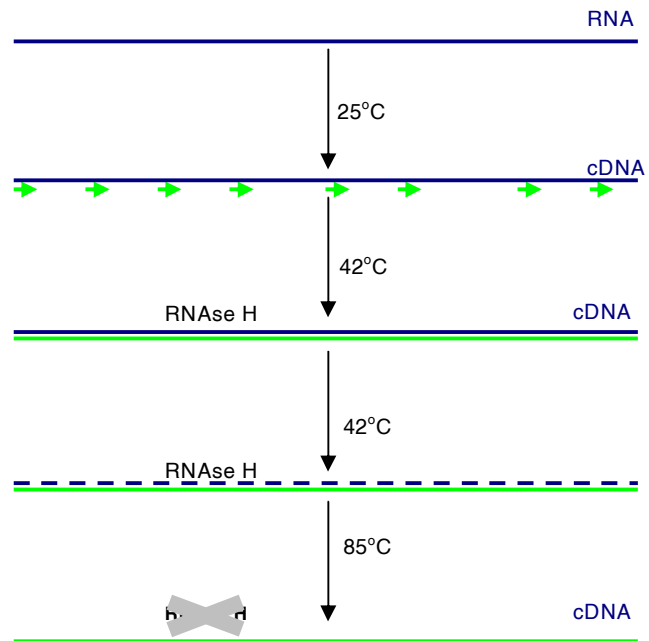


ngược của giai đoạn PCR tùy chiều 5' đến 3' của RNA đích bắt cặp được mỗi nào. Nhà nghiên cứu cũng có thể sử dụng một loại mồi chỉ có 6 nucleotide có thứ tự ngẫu nhiên gọi là *mồi ngẫu nhiên* (random hexamer) để phiên mã ngược toàn bộ RNA có trong mẫu thành các cDNA (**hình 13**). Tuy nhiên mồi ngẫu nhiên chỉ có hiệu quả để phiên mã ngược được các đoạn cDNA dài dưới 600 bases, còn nếu muốn có những đoạn cDNA dài trên 600bps thì phải dùng mồi đặc hiệu mới hiệu quả. Ngoài mồi đặc hiệu và mồi ngẫu nhiên, nếu muốn có cDNA của mRNA biểu hiện từ một gene, nhà nghiên cứu có thể dùng *mồi Oligo(dT)15* (gọi là mồi poly T) vì mRNA luôn có đuôi là poly(A)+. Mồi Oligo(dT)15 thường được dùng để làm thư viện cDNA của biểu hiện gene hay là dùng để phát hiện vi khuẩn sống trong bệnh phẩm (ví dụ phát hiện vi khuẩn lao sống trong mẫu đờm).

Đối tượng của RT là RNA đích. Bản chất của RNA là rất dễ bị phân hủy trong môi trường cũng như bị enzyme RNase tiết ra từ các vi sinh vật ở trong môi trường, chai lọ, thiết bị, dụng cụ và dung dịch. Enzyme RNase lại rất bền, khó hủy bởi nhiệt độ. Do vậy thao tác trong pha chế các thuốc thử để pha phản ứng RT phải tuyệt đối tôn trọng nguyên tắc vô trùng và thực hiện với các dụng cụ, thiết bị, thuốc thử...tinh sạch. Để pha dung dịch RT, phải chuẩn bị đầy đủ các điều kiện như là cách pha PCR mix. Tùy thuộc vào enzyme reverse transcriptase là loại nào, do hãng nào sản xuất mà có thể pha dung dịch phản ứng RT. Dưới đây là một ví dụ minh họa thành phần cơ bản của một phản ứng RT thể tích 20  $\mu$ l:

- $MgCl_2$  5mM
- Reverse Transcription Buffer (10mM Tris-HCl [pH 9.0 at 25°C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-100) 1X
- dNTP/each 1mM
- Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (RNasin) 1U/ $\mu$ l
- AMV Reverse Transcriptase (High Conc.) 15U/ $\mu$ g RNA
- Mồi đặc hiệu 15pm – 100pm  
(nếu dùng mồi ngẫu nhiên hay mồi poly T thì cho 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ g RNA được phiên mã)
- Thể tích nước khử ion (đã xử lý DEPC) cho vào đến 15 $\mu$ l  
(để thể tích mẫu chứa RNA được phiên mã thành cDNA sẽ cho vào là 5 $\mu$ l)

Dung dịch RT sau khi pha xong nên được sử dụng ngay bằng cách cho mẫu chứa RNA đích vào. Sau đó, ống nghiệm phản ứng được giữ ở nhiệt độ 42°C trong 10-15 phút để môi bắt cặp vào sợi khuôn RNA và enzyme reverse transcriptase tổng hợp được cDNA. Nếu dùng môi ngẫu nhiên thì trước khi ủ 42°C, nên để ống nghiệm phản ứng ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 10 phút để môi bắt cặp vào sợi RNA khuôn. Nếu dùng môi đặc hiệu thì thời gian ủ



**Hình 14:** Nguyên tắc hoạt động của bộ thuốc thử tổng hợp cDNA do công ty Nam Khoa sản xuất

42°C có thể kéo dài đến 60 phút. Sau khi hoàn tất tổng hợp cDNA ở 42°C, enzyme reverse transcriptase phải bị hủy đi bằng cách đưa ống nghiệm phản ứng lên 85°C trong vòng 5 phút. Sản phẩm cDNA này sẵn sàng được đưa vào khuếch đại bằng PCR với cặp môi đặc hiệu. Nếu chưa thực hiện PCR thì có thể giữ sản phẩm cDNA ở tủ đông.

Công ty Nam Khoa đã nghiên cứu và sản xuất được một bộ thuốc thử sẵn sàng được sử dụng để tổng hợp cDNA. Sản phẩm này là các ống nghiệm PCR chứa sẵn các thành phần cho phản ứng tổng hợp cDNA. Người sử dụng chỉ cần cho vào trong ống nghiệm một thể tích tách chiết RNA từ mẫu thử và tiến hành ủ ống nghiệm qua các giai đoạn nhiệt độ và thời gian theo đúng hướng dẫn thì sẽ có sản phẩm cDNA để thực hiện bước PCR tiếp theo. Nguyên tắc của bộ thuốc thử tổng hợp cDNA này là sử dụng môi ngẫu nhiên và môi Oligo(dT)15 để tổng hợp toàn bộ RNA từ mẫu thử thành cDNA từ RNA nhờ enzyme Reverse Transcriptase. Ngoài ra trong hệ thống phản ứng còn có enzyme RNase H để cắt bỏ RNA bị bắt cặp vào cDNA sau khi phiên mã ngược thành cDNA. Thành phần của bộ thuốc thử là các ống nghiệm PCR 0.2 chứa trong mỗi ống 3µl RT mix bao gồm đủ các hóa chất và thuốc thử cần thiết cho một phản ứng tổng hợp cDNA theo nguyên tắc đã nêu trên. Các ống nghiệm phản ứng này được giữ ở nhiệt độ từ -18°C đến -30°C. Phương pháp thực hiện tổng hợp cDNA là: người làm thí nghiệm chỉ cần cho 9 µl dịch tách chiết RNA của mẫu thử (hay bệnh phẩm) vào ống nghiệm

phản ứng, pipette lên xuống nhẹ nhàng vài lần để trộn đều. Sau đó đặt ống nghiệm vào máy luân nhiệt để chạy chương trình luân nhiệt 25°C trong 5 phút để môi ngẫu nhiên bắt cặp vào RNA đích, rồi 42°C trong 30 phút để enzyme reverse transcriptase tổng hợp cDNA đồng thời RNaseH cắt bỏ RNA đích khỏi cDNA, cuối cùng ở 85°C trong 5 phút để phá hủy enzyme reverse transcriptase và enzyme RNase H sau khi chúng đã hoàn tất nhiệm vụ. **Hình 14** minh họa nguyên tắc hoạt động của bộ thuốc thử tổng hợp cDNA này.

Có hai phương pháp thực hiện RT-PCR. Đó là phương pháp RT-PCR hai bước, và phương pháp RT-PCR một bước.

Trong phương pháp RT-PCR hai bước, người làm thí nghiệm thực hiện giai đoạn RT để tổng hợp cDNA trong một ống nghiệm, sau đó lấy sản phẩm cDNA cho vào ống nghiệm PCR chứa PCR mix với môi đặc hiệu để chạy giai đoạn PCR khuếch đại trình tự DNA đích muốn tìm. Phương pháp này sẽ có nguy cơ ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại do phải mở nắp tube PCR để cho sản phẩm cDNA của giai đoạn RT vào. Tuy nhiên ngày nay nguy cơ này hoàn toàn có thể bị loại bỏ nhờ việc cho dUTP và UNG vào PCR mix của giai đoạn PCR.

Trong phương pháp RT-PCR một bước, người làm thí nghiệm thực hiện cả hai giai đoạn RT và giai đoạn PCR trong cùng một ống phản ứng, nghĩa là sau khi cho tách chiết RNA từ mẫu thử vào ống phản ứng, giai đoạn RT sẽ được thực hiện trước và sau đó giai đoạn PCR sẽ đi liền theo sau. Để thực hiện được RT-PCR một bước, trong ống phản ứng phải có đủ các thành phần hóa chất và thuốc thử để chạy RT và PCR, tức là phải có cả enzyme reverse transcriptase sử dụng cho RT và enzyme *Taq polymerase* sử dụng cho PCR. Ngoài ra cũng có một loại DNA polymerase tách chiết từ vi khuẩn chịu nhiệt *Thermus thermophilus*, được đặt tên là *TthPol*, có hai khả năng: có thể thực hiện phiên mã ngược khi có sự hiện diện của  $Mn^{++}$  và khả năng nhân bản DNA khi có sự hiện diện của  $Mg^{++}$ , do vậy có thể dùng enzyme này làm RT-PCR một bước. Trong phương pháp RT-PCR một bước, toàn bộ sản phẩm cDNA đều tham gia vào PCR và không nhất thiết phải có môi riêng cho RT vì chính môi của PCR sẽ được sử dụng làm môi cho RT. RT-PCR một bước được nhiều người thích hơn là RT-PCR hai bước vì tiện lợi hơn và tránh được nguy cơ ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại do phải mở tube PCR để cho sản phẩm cDNA vào. Tuy nhiên trong RT-PCR một bước, không thể sử

dùng phương pháp chống ngoại nhiễm bằng cách cho dUTP và enzyme UNG vào dung dịch phản ứng vì UNG sẽ cắt bỏ toàn bộ cDNA tổng hợp được trong giai đoạn RT.

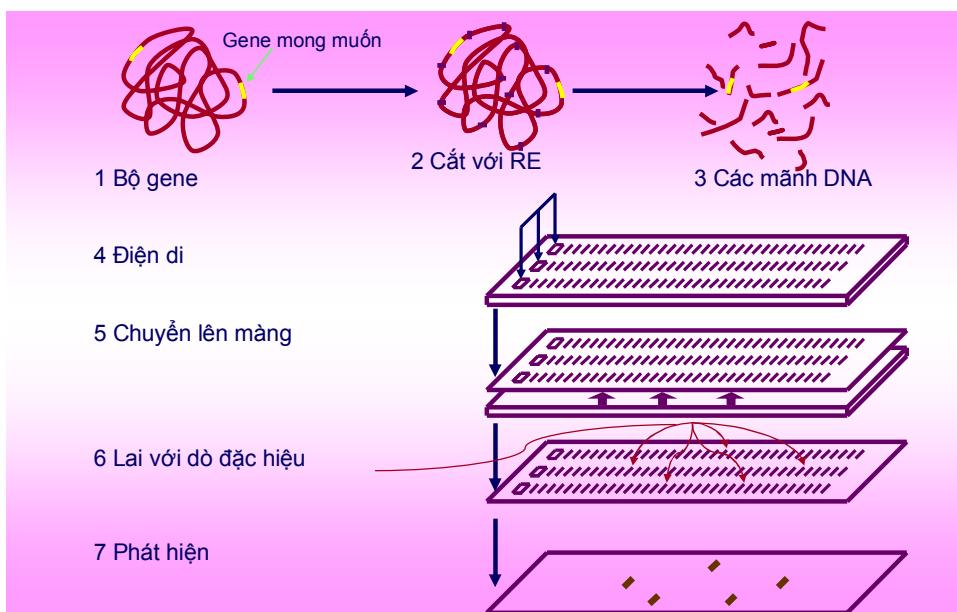
## PCR và các ứng dụng trong y sinh học

### 1. PCR và công nghệ gene

Nói một cách tóm tắt, công nghệ gene là công nghệ sản xuất được protein mong muốn từ một gene được chèn một vector (plasmid, phage hay virus) để chuyển thể tái tổ hợp vào các tế bào vi khuẩn, vi nấm hay tế bào có nhân và sử dụng các tế bào tái tổ hợp này để làm nhà máy sinh học sản xuất ra protein mong muốn này. Trong công nghệ sinh học phân tử, chìa khóa kỹ thuật chính là phải làm thế nào cô lập được gene mong muốn. Đối với các gene không có intron thì nhà nghiên cứu có thể cô lập được gene từ DNA bộ gene tách chiết từ tế bào đích. Đối với các gene có intron thì gene phải được cô lập từ cDNA phiên mã ngược từ mRNA tách chiết từ những tế bào có biểu hiện tính trạng từ gene hay có hoạt động chức năng đặc trưng cho gene.

Trước khi có PCR, việc cô lập được một gene mong muốn từ DNA bộ gene rất là công phu. Các nhà nghiên cứu phải tách chiết được DNA bộ gene phải còn nguyên vẹn của một lượng lớn tế bào đích rồi dùng enzyme cắt hạn chế để cắt nhỏ DNA bộ gene thành những đoạn có kích thước khác biệt nhau. Sau đó điện di trên agarose để tách biệt các đoạn

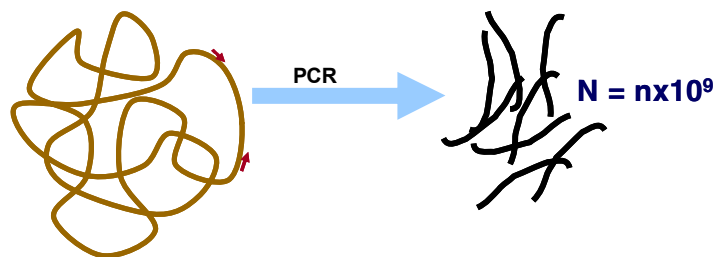
DNA này theo kích thước trải dài trên toàn bộ chiều dài gel điện di. Dùng phương pháp thấm mao quản hay thấm qua hút chân không để chuyển toàn bộ các vạch DNA trên gel



**Hình 15:** Kỹ thuật Southern blotting và lai bằng các dò đánh dấu để biết được vị trí các đoạn DNA chứa trình tự đặc hiệu của gene mong muốn

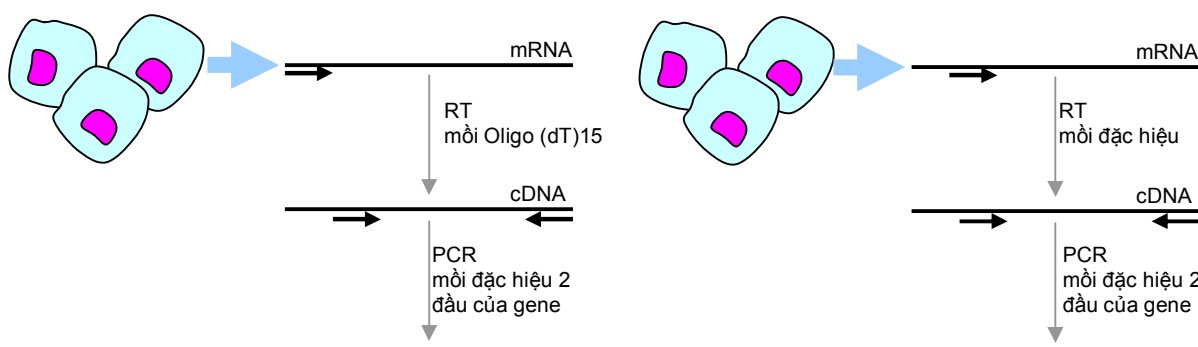
điện di qua màng nylon (gọi là kỹ thuật Southern blotting). Dùng cách đoạn dò đặc hiệu gene muốn tìm đã đánh dấu enzyme hay đồng vị phóng xạ phủ trên màng nylon để lai tìm vị trí của đoạn DNA có mang trình tự đặc hiệu gene (**hình 15**). Từ vị trí được xác định trên màng lai này, cắt mảnh gel điện di (được thực hiện song song với gel dùng trong Southern blotting) tại đúng vị trí đã xác định được trên màng, và như vậy là có hy vọng bắt được đoạn DNA chứa gene mong muốn. Tuy nhiên để có được trọn vẹn gene mong muốn, nhà nghiên cứu phải thực hiện kỹ thuật này rất nhiều lần, không chỉ trên DNA bộ gene đã cắt bằng một enzyme cắt hạn chế mà phải thử trên nhiều enzyme cắt hạn chế, không chỉ trên DNA bộ gene mà cả trên các đoạn DNA thôi ra từ các vị trí gel được xác định có mang trình tự đặc hiệu của gene... Và còn phải kết hợp với nhiều kỹ thuật sinh học phân tử khác nữa. Công trình như vậy có khi kéo dài hàng chục năm mới thành công. Nếu muốn cô lập được gene mong muốn từ mRNA, các nhà nghiên cứu cũng phải tách chiết thành công mRNA từ một lượng lớn các tế bào có biểu hiện gene, thực hiện phiên mã ngược các mRNA tách chiết được này thành cDNA với mỗi Oligo(dT)15, sau đó chèn vào vector với điều kiện thật tối ưu để mỗi vector chỉ nhận được một cDNA, rồi cuối cùng chuyển thể vào tế bào vi khuẩn để lập được thư viện cDNA cũng ở điều kiện tối ưu sao cho một vi khuẩn tái tổ hợp chỉ nhận được 1 vector mà thôi. Từ thư viện cDNA này, chọn lọc để biết được tế bào vi khuẩn nào mang đúng cDNA của gene mong muốn.

Với sự phát minh ra kỹ thuật PCR và các tiên bộ đã làm cho PCR ngày nay trở thành một công cụ rất dễ dàng thực hiện tại các phòng thí nghiệm thì việc cô lập một gene mong muốn trở thành khá dễ dàng. Để có thể có được trọn vẹn một gene mong muốn từ DNA bộ gene, nhà nghiên cứu chỉ cần thiết kế một cặp mồi đặc hiệu cho trình tự hai đầu đoạn gene trên DNA bộ gene, rồi chỉ cần tách chiết một lượng rất nhỏ DNA bộ gene, không cần phải nguyên vẹn, từ một lượng nhỏ tế bào hay mô đích, thực hiện PCR, thế là đã có được gene mong muốn với số lượng hàng tỷ bản

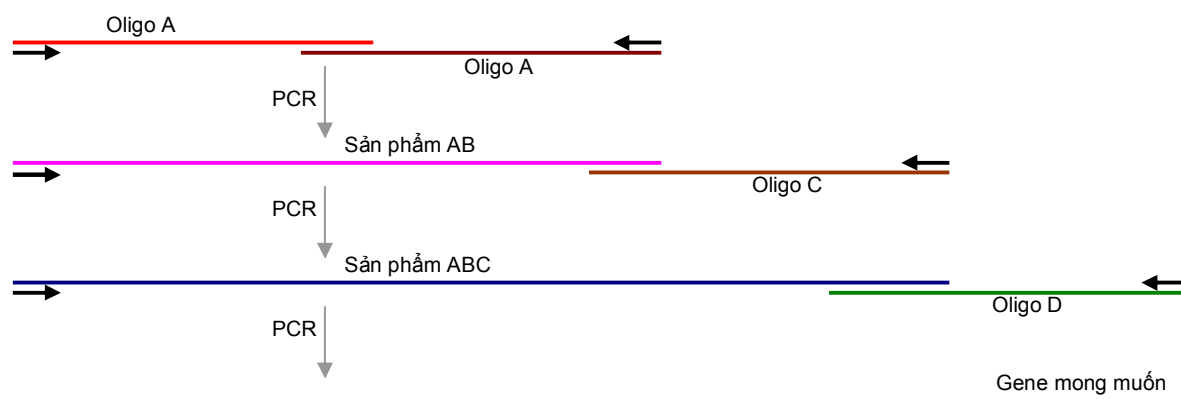


**Hình 16:** Với PCR, dễ dàng để có hàng tỷ gene mong muốn nhờ khuếch đại trình tự gene từ một lượng rất nhỏ DNA bộ gene với cặp mồi đặc hiệu cho trình tự hai đầu của gene

sao (*hình 16*). Cũng như vậy, để có thể có một gene mong muốn từ mRNA, nhà nghiên cứu chỉ cần tách chiết được mRNA từ một lượng nhỏ tế bào hay mô đích có biểu hiện gene rồi thực hiện RT-PCR với mỗi đặc hiệu cho trình tự hai đầu đoạn gene, thế là có được hàng tỷ bản sao của gene mong muốn (*hình 17*). Thậm chí nếu không có được tế bào hay mô đích, nhà nghiên cứu vẫn có thể dùng PCR để khuếch đại được gen mong muốn từ các đoạn oligo ngắn được đặt tổng hợp sao cho chúng có trình tự bổ sung một phần lên nhau ở một đầu để dùng chúng làm mồi cho nhau, kết hợp với các mồi đặc hiệu cho từng đoạn tổng hợp (*hình 18*).



**Hình 17:** Phương pháp cô lập được gene mong muốn từ mRNA với giai đoạn RT có thể dùng mồi Oligo(dT)15 hay dùng một trong hai mồi đặc hiệu cho hai đầu đoạn gene của giai đoạn PCR



**Hình 18:** Phương pháp tổng hợp gene mong muốn từ các đoạn oligo ngắn được tổng hợp dài khoảng 80-100 bps.

Như vậy, nhờ công cụ PCR mà giai đoạn khó khăn nhất trong công nghệ gene, là có được trong tay gene mong muốn, được thực hiện khá dễ dàng với thời gian rất ngắn có thể chỉ trong một vài ngày, thay vì phải cần nhiều năm như trước khi có công cụ PCR. Chính nhờ vậy, hiện nay công nghệ gene đã có nhiều tiến bộ rất đáng kể qua các sản phẩm protein được sản xuất và đưa vào sử dụng trong y học, trong dược phẩm, trong nông nghiệp, trong thủy sản và cả trong môi trường. Chúng tôi sẽ trình bày cơ

bản và chi tiết hơn về công nghệ này trong cuốn sách “**Các kỹ thuật sinh học phân tử thường được áp dụng trong nghiên cứu y sinh học**” sẽ được sớm xuất bản sau cuốn sách này.

## **2. PCR trong pháp y**

Hiện nay, PCR cũng là một công cụ rất hiệu quả trong giám định pháp y để xác định tông tích nạn nhân qua di thể để lại, truy tầm và xác định thủ phạm qua các dấu vết sinh học để lại tại hiện trường hay trên nạn nhân, xác định quan hệ huyết thống qua xác định dấu vân tay DNA của các cá nhân và mối liên hệ huyết thống của các dấu vân tay DNA này, và cuối cùng là xác định hài cốt lâu năm là thuộc gia đình nào có người thân bị mất tích. Cơ sở của việc ứng dụng này là nhờ có PCR mà các dấu vết DNA muốn tìm trong các mẫu sẽ được khuếch đại và phân tích. Các dấu vết DNA đó thường là các đoạn lặp đi lặp lại ngắn (short tandem repeat, STR) hiện diện trong DNA bộ gene của các cá thể và di truyền theo định luật Mendel qua các thế hệ, hay là trình tự vòng D của ty thể di truyền theo bên ngoài của mỗi cá nhân. Chúng tôi sẽ trình bày nội dung này trong bài “**PCR và dấu vân tay DNA**” trong cuốn sách này.

## **3. PCR trong chẩn đoán và sàng lọc bệnh lý di truyền**

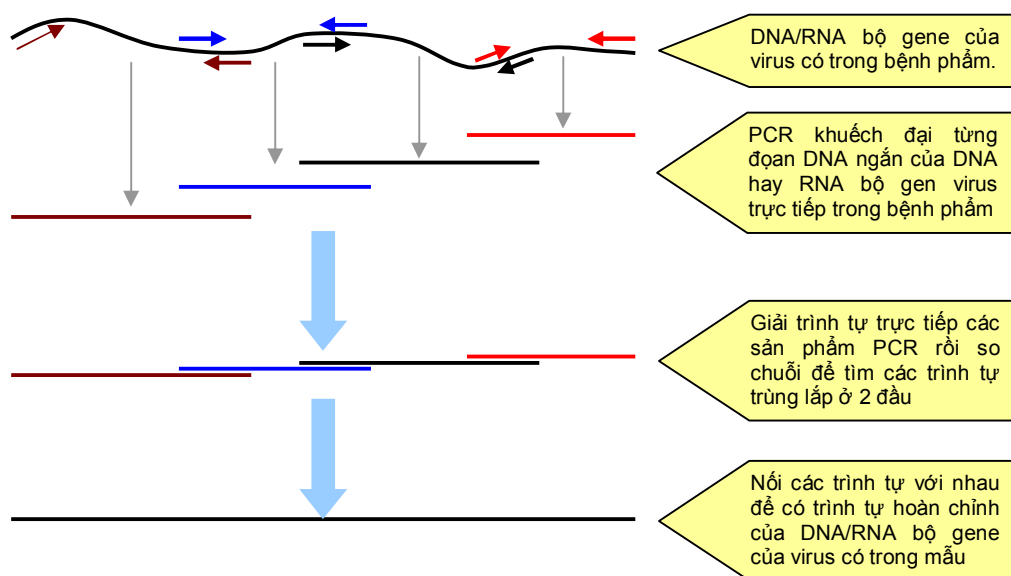
Có thể nói PCR là một công cụ duy nhất hữu hiệu trong phát hiện và sàng lọc các bệnh lý di truyền do sự biến đổi gene ở mức độ phân tử mà các phương tiện di truyền tế bào không thể phát hiện được. Không chỉ vậy, PCR còn là một công cụ hữu hiệu để sàng lọc trước sanh các bệnh lý di truyền qua sự phát hiện các biến đổi gene ở mức độ phân tử về mặt cấu trúc, ví dụ Thalassemia, Duchene... hay về số lượng như bệnh lý tam thể 13, 18, 21... trên các mẫu tế bào lấy từ gai nhau, từ dịch ối của sản phụ ngay trong những thời kỳ còn rất sớm của thai kỳ để giúp các nhà điều trị có biện pháp can thiệp như chấm dứt thai kỳ sớm nhờ vậy mà gia đình không phải chịu gánh nặng vì phải sinh những đứa con bị bệnh lý di truyền. Ngoài ra, PCR còn được dùng để phát hiện các cá nhân khỏe mạnh nhưng mang gene tiềm ẩn bệnh di truyền, ví dụ bệnh Thalassemia, Duchene... để có thể có tham vấn tiền hôn nhân hay trước sanh, nhờ vậy mà sẽ có thể làm giảm đi hay loại trừ một bệnh lý di truyền trong quần thể, giảm được gánh nặng xã hội vì phải đối phó với bệnh lý di truyền này. Chúng tôi sẽ trình bày chi tiết hơn về các công cụ này trong cuốn sách “**Các kỹ thuật sinh học phân tử thường được áp dụng trong nghiên cứu y sinh học**” sẽ được sớm xuất bản sau sách này.

#### 4. PCR trong phát hiện các tác nhân vi sinh vật gây bệnh nhiễm trùng

Nguyên tắc của PCR là khuếch đại đoạn DNA đích trong ống nghiệm phản ứng để sau đó phát hiện chúng, do vậy PCR nay đang trở thành một công cụ chẩn đoán nhạy cảm nhất, cho đến nay chưa có thử nghiệm nào sánh kịp, để phát hiện các tác nhân vi sinh vật gây bệnh (ngay cả các vi sinh vật không thể phát hiện được bằng các xét nghiệm khác) trong các bệnh phẩm khác nhau. Chúng tôi sẽ trình bày cơ bản và chi tiết hơn về vấn đề này trong bài “**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**”

#### 5. PCR là đòn bẩy thúc đẩy nhanh công nghệ giải trình tự

Có thể nói không sai là nếu không có ứng dụng công cụ PCR trong kỹ thuật giải trình tự gen thì các nhà khoa học không thể hoàn tất được công trình giải mã bộ gen người sớm hơn dự định trên 10 năm, và từ kết quả của công trình này, nhiều cánh cửa mới của y sinh học đã được mở với vô vàn các ứng dụng đầy triển vọng trong công nghệ dược phẩm protein, trong sinh-tin học (bio-informatic), trong chẩn đoán bệnh bằng các gen-chip. Lý do để nói PCR là đòn bẩy để thúc đẩy nhanh công nghệ giải trình tự là vì nhờ có PCR mà các nhà khoa học đã thay đổi được phản ứng giải trình tự trong phương pháp giải trình tự bằng enzyme của Sanger thành phản ứng chu kỳ nhiệt giải trình tự với hiệu quả phản ứng tốt hơn rất nhiều và nhạy hơn rất nhiều. Ngoài ra, cũng nhờ có PCR mà các sản phẩm cần giải trình tự sẽ được nhân bản thành nhiều bản



**Hình 19:** Nguyên tắc giải trình tự trực tiếp DNA/RNA bộ gene của virus gây bệnh có trong bệnh phẩm mà không cần phải nuôi cấy phân lập được virus trên cấy tế bào.



sao đồng nhất về chiều dài và trình tự, do vậy mà sẽ có được kết quả giải trình tự chính xác hơn. Với PCR kết hợp với giải trình tự, nhà nghiên cứu có thể giải trình tự trọn vẹn DNA hay RNA bộ gene của virus gây bệnh có trong mẫu thử mà không cần phải nuôi cấy được virus này vào tế bào bằng cách thiết kế các mồi đặc hiệu cho từng đoạn trên bộ gene mà các đoạn này có trình tự ở hai đầu trùng lặp nhau, rồi dùng PCR để khuếch đại các đoạn DNA này lên. Giải trình tự các sản phẩm PCR này, cuối cùng so chuỗi để tìm những trình tự trùng lặp làm cơ sở để lắp ghép nối các đoạn trình tự đã giải được với nhau thành trình tự DNA bộ gene hoàn chỉnh (*hình 19*). Chúng tôi sẽ trình bày chi tiết hơn về công nghệ PCR và giải trình tự ở bài “**PCR và giải trình tự**” trong cuốn sách này.