

A decorative border composed of numerous small, colorful cartoon figures in various poses, arranged in a semi-circular arc at the top of the slide. The figures are in shades of blue, green, yellow, pink, and purple.

GIỚI THIỆU KỸ THUẬT PCR VÀ REAL-TIME PCR

Nguyen Le Thanh (MRes)

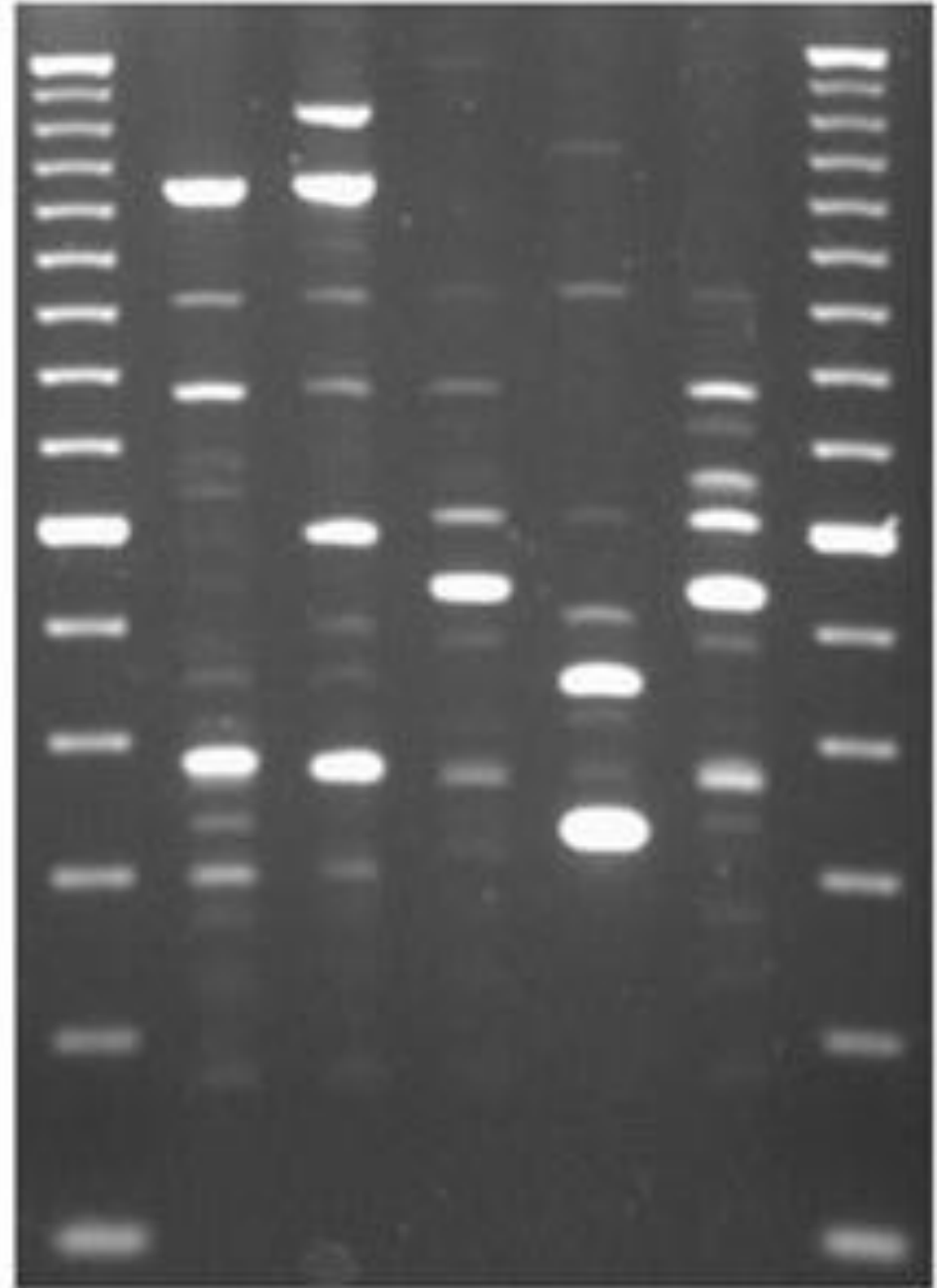
thanhnl@pnt.edu.vu

MỤC LỤC

1. Kỹ thuật PCR
2. Đọc kết quả PCR
3. Thiết kế đoạn mồi (primer)
4. Kỹ thuật Real-time PCR
5. Một số câu hỏi trắc nghiệm



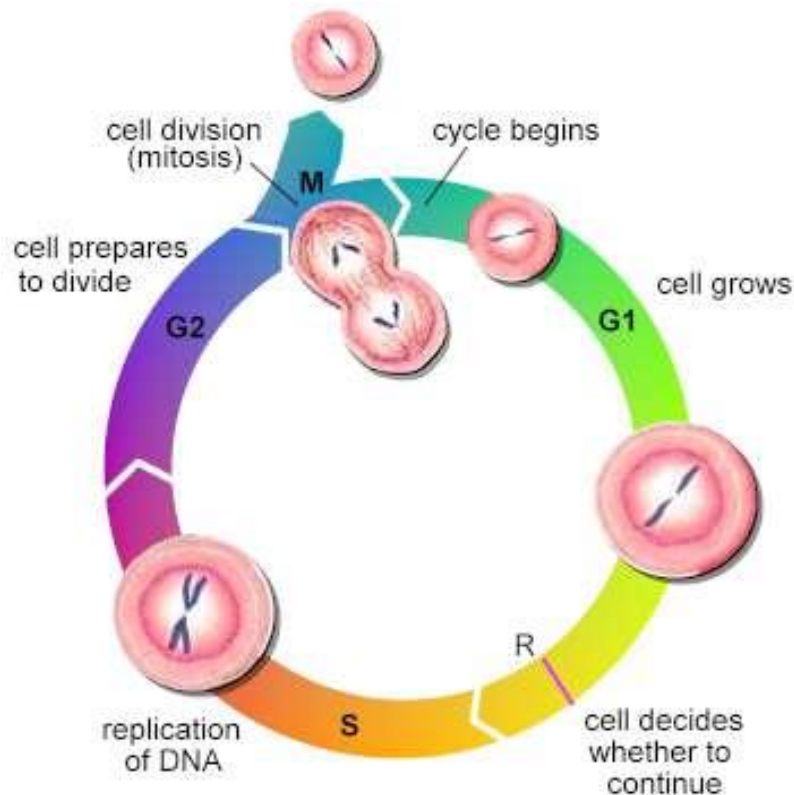
1. PCR



Khái niệm chung về PCR

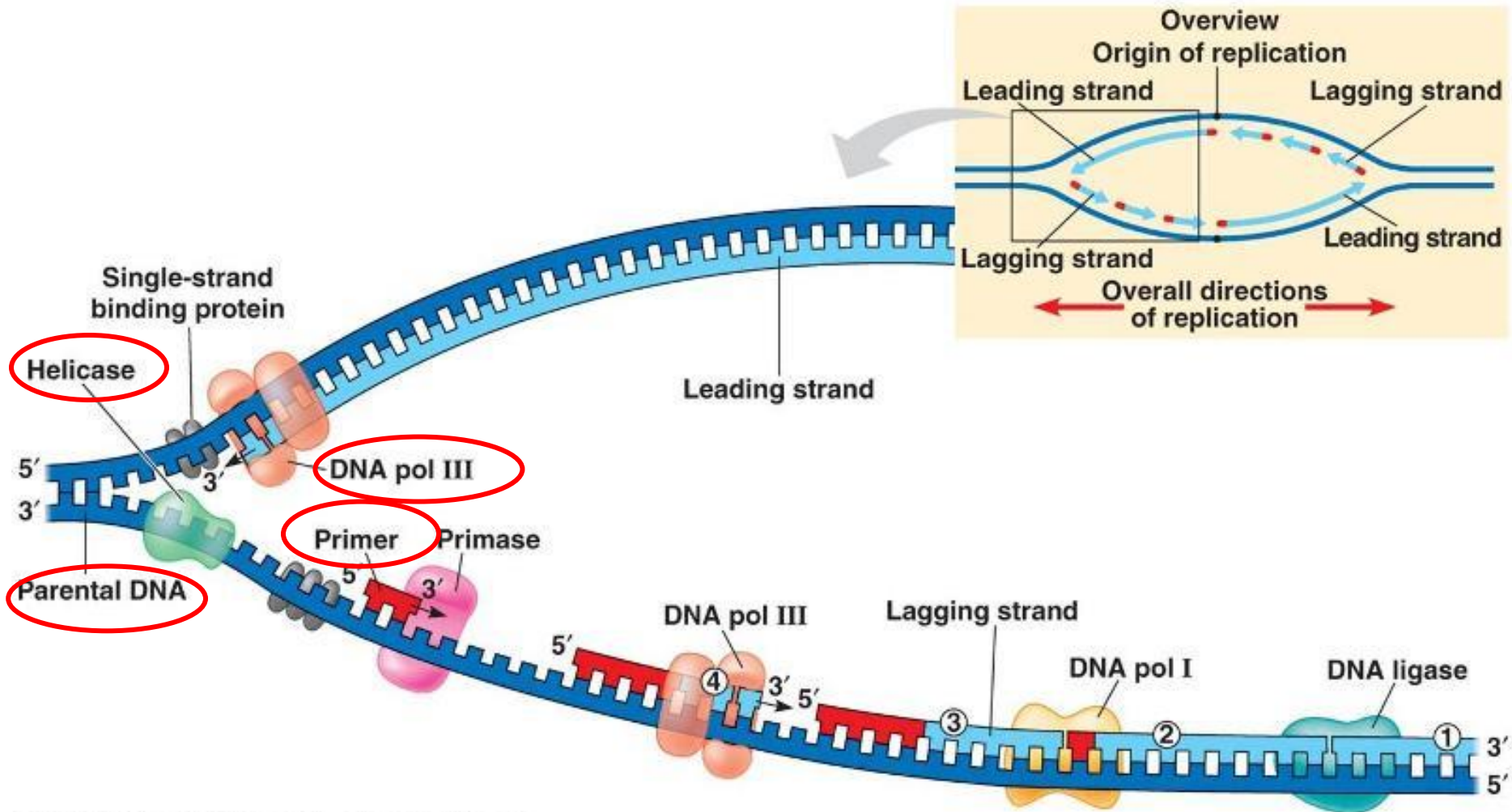
- Phương pháp **PCR (Polymerase Chain Reaction): Khuếch đại** một đoạn DNA quan tâm
- **Sử dụng DNA polymerase để:**
 - Sao chép DNA
 - Liên kết với sợi DNA mạch đơn bị tách ra để tạo mạch DNA bổ sung.
- **Thời gian ngắn cho nhiều bản sao DNA**
- **Độ nhạy (sensitivity) cao**
- **Kỹ thuật PCR có thể được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực:** chẩn đoán, xét nghiệm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh, xác định giới tính của phôi, giải mã di truyền, tạo giống mới với các đột biến định hướng, hoặc nghiên cứu sự tiến hoá của sinh vật ở mức độ phân tử.

Cơ chế sao chép DNA



- i. Quá trình bán bảo tồn (Semi-conservative)
- ii. Gốc sao chép (origins of replication - ori)
- iii. **Chiều 5' → 3'**
- iv. Gián đoạn ở một trong hai chuỗi
- v. **“Mồi” (RNA primer)**
- vi. **Protein enzyme đặc hiệu.**

Sao chép DNA – Nhân sơ



Cơ chế khuếch đại DNA - PCR

- Kỹ thuật **tổng hợp DNA ngoài cơ thể** ứng dụng trong kỹ thuật PCR cũng tuân thủ **những nguyên tắc cơ bản của sao chép DNA** trong cơ thể nhưng có sự khác biệt:
 - Dùng **hiệt độ cao tháo xoắn** thay cho helicase.
 - Kết hợp với **enzyme DNA polymerase chịu nhiệt (Taq DNA polymerase)** để tổng hợp DNA mới trong môi trường thích hợp.
 - Hệ thống điều nhiệt thích hợp cùng với các **đoạn mồi** được thiết kế **chuyên biệt, chủ động**.

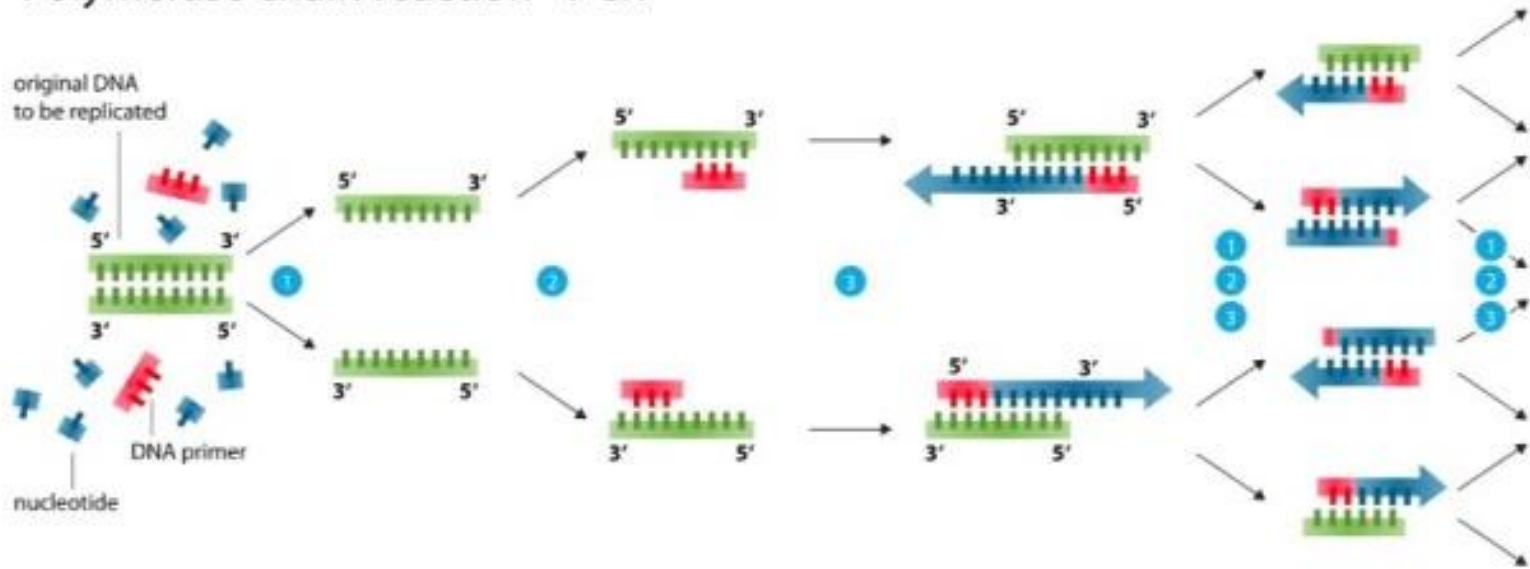
Cơ chế khuếch đại DNA - PCR

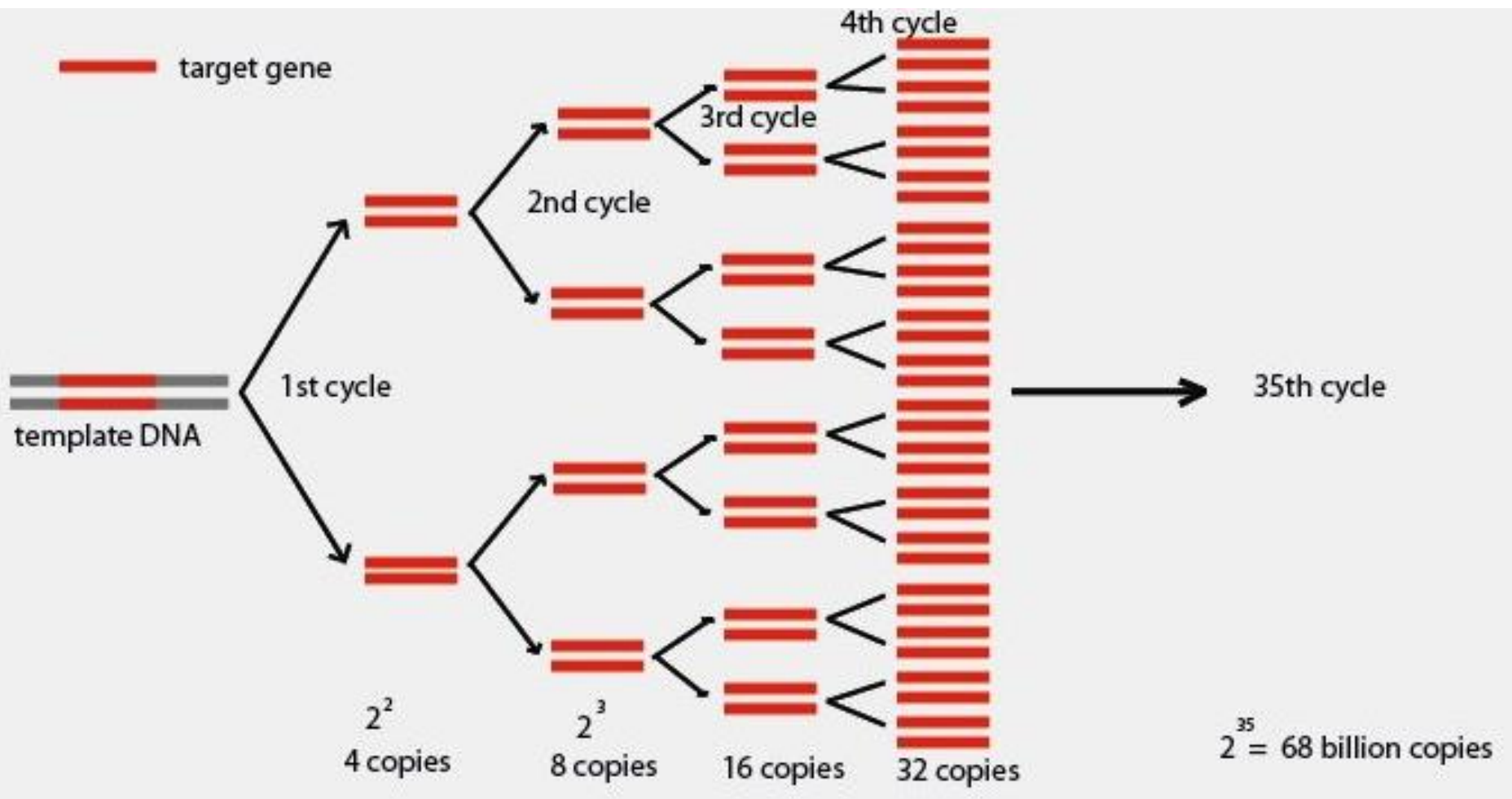
Biến tính
Tháo xoắn
94-96oC

Bắt cặp
60-68oC

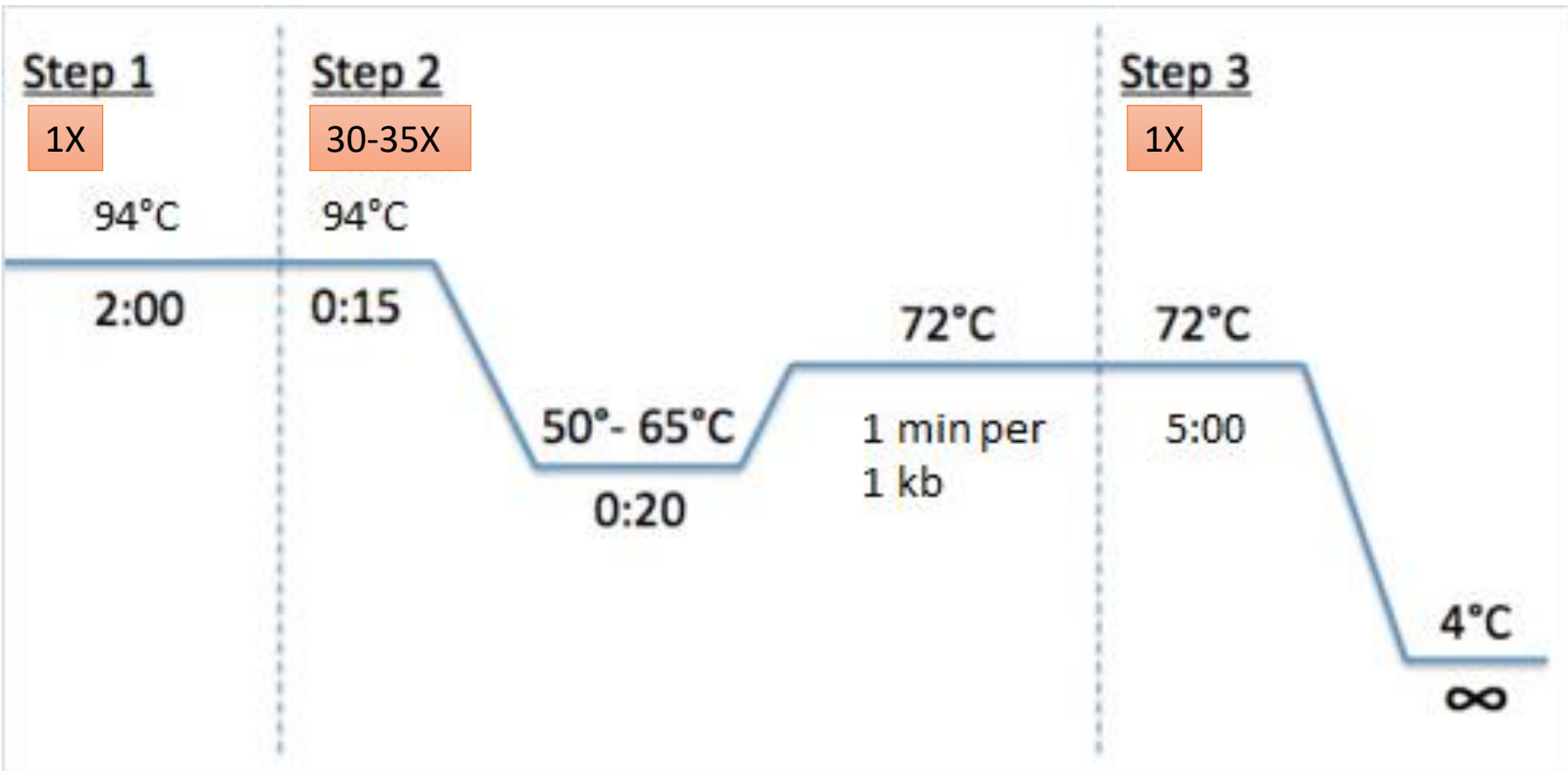
Kéo dài chuỗi
70-72oC

Polymerase chain reaction - PCR





Các giai đoạn của một phản ứng PCR trong phòng thí nghiệm



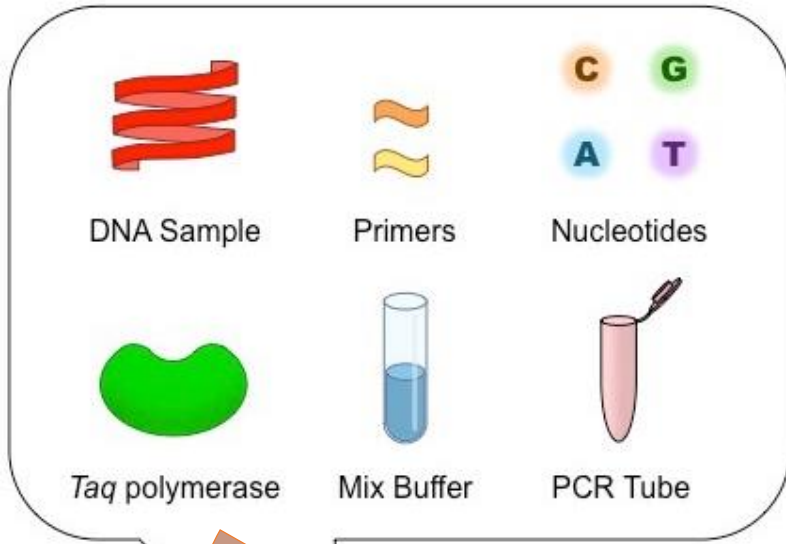
Tổng kết các bước PCR (Tham khảo)

- **Giai đoạn khởi đầu:**
 - Giai đoạn cần tăng nhiệt độ lên 94-96°C (hay 98°C nếu sử dụng polymerases cực kỳ bền nhiệt)
 - 1-9 phút.
- **Giai đoạn biến tính:**
 - 94-98°C
 - 20-30 giây.
 - Phá vỡ liên kết hydro giữa các bazo → DNA đơn
- **Giai đoạn gắn mồi:**
 - 50-65°C
 - 30-40 giây để mồi gắn vào
 - Nhiệt độ này cần phải đủ thấp để cho phép mồi bắt cặp với DNA nhưng cũng đủ cao cho quá trình bắt cặp đặc hiệu
 - Liên kết hydro bền vững → mồi bổ sung hoàn toàn với khuôn
- **Giai đoạn kéo dài:**
 - Phụ thuộc vào các DNA polymerase sử dụng; Taq polymerase có nhiệt độ hoạt động tối ưu ở 75-80°C, và nhiệt độ 72°C thường được sử dụng với enzyme này.
 - Chiều 5' đến 3'
- **Giai đoạn kết thúc kéo dài:**
 - 70-74 °C (đây là nhiệt độ cần thiết cho hoạt động tối ưu của hầu hết các enzyme polymerase dùng trong phản ứng PCR)
 - 5-15 phút sau chu kỳ PCR cuối cùng
- **Giai đoạn bảo quản:**
 - 4-15°C trong một thời gian để bảo quản ngăn hạn sản phẩm của phản ứng ở cuối chu kỳ
 - 35 vòng → 90-120m

Máy luân nhiệt



Nguyên liệu cho PCR

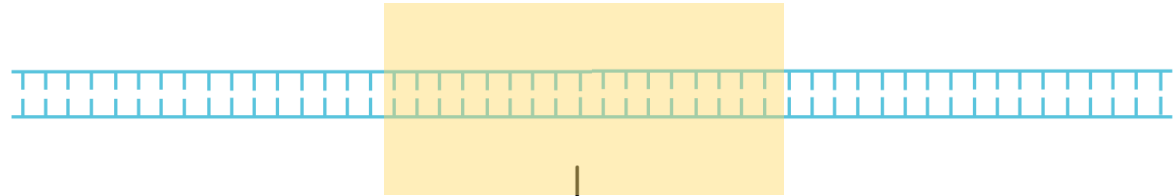


Nguyên liệu cho PCR

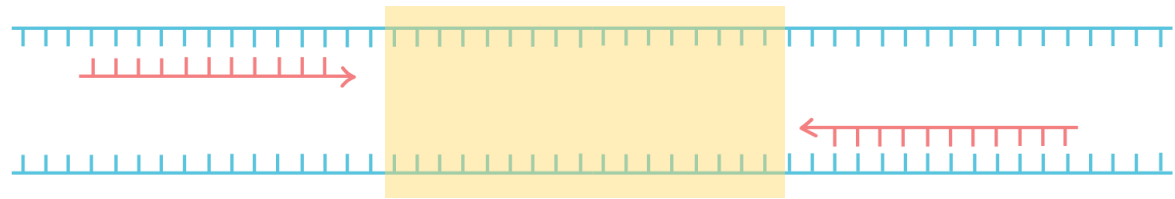
Nước	Dung môi, tinh khiết, không chứa ion nào, không chứa DNAase, RNAase (Nucleases free)
DNA mẫu (DNA template)	DNA khuôn có độ nguyên vẹn cao tránh lẫn tạp chất → phản ứng tốt. Phản ứng PCR tối ưu xảy ra khi mẫu DNA không dài quá, 1-1,5kb.
Muối đệm: MgCl₂	Chính ion Mg ²⁺ gắn liên kết dNTP với DNA polymerase, 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
Free dNTP (deoxy-nucleoside triphosphate)	Năng lượng để cho phản ứng hình thành liên kết phosphodiester xảy ra được lấy từ các nối phosphate giàu năng lượng của triphosphate trên dNTP. Đó cũng chính là lý do tại sao phải là dNTP chứ không phải là dNDP (diphosphate) hay dNMP(monophosphate).
Mồi (primer)	Gắn vào DNA đích → hình thành chuỗi DNA bổ sung. Các mồi này có chiều ngược nhau, một mồi xuôi (forward primer) và một mồi ngược (reverse primer) → Quyết định nên tính đặc hiệu của thí nghiệm. Khởi động enzyme polymerase.
Enzyme DNA polymerase	Xúc tác cho quá trình lắp ráp các nucleotide A, T, G, C vào mạch DNA mới tổng hợp. Kết quả của phản ứng PCR phụ thuộc vào khả năng chịu nhiệt của enzyme polymerase → Taq

ĐOẠN MỒI – PRIMER???

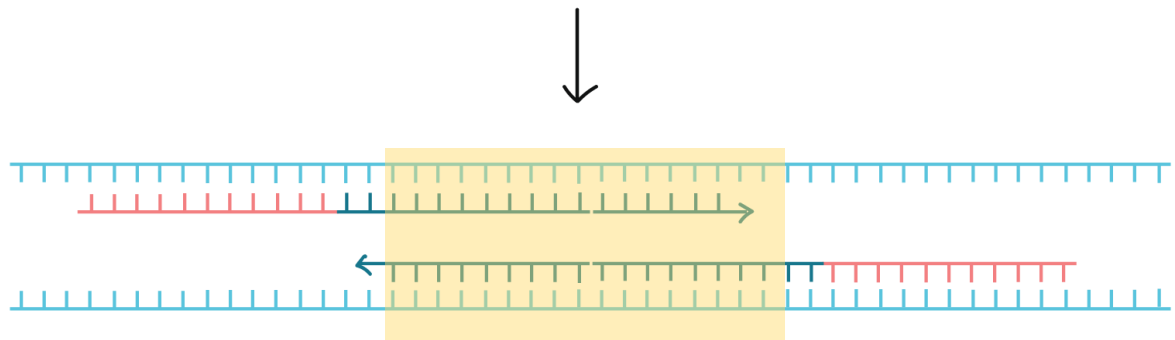
Template
DNA



Primers bind
to template



Tag polymerase
extends primers

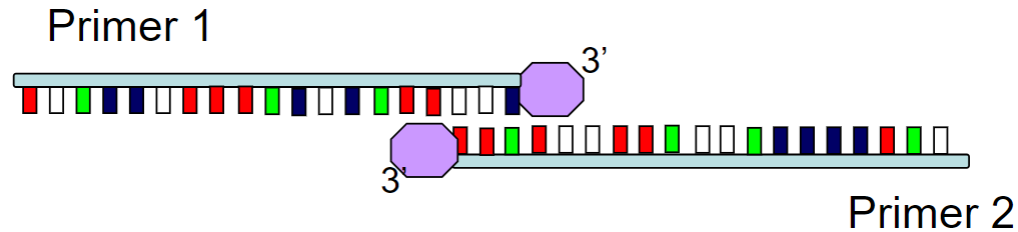


Các yếu tố ảnh hưởng đến 1 phản ứng PCR

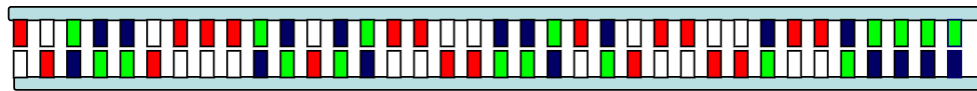
- Primer và nhiệt độ lai: Chìa khóa quan trọng
- Việc lựa chọn/thiết kế primer cần tuân thủ theo một số nguyên tắc sau:
 - Độ dài: minimum ~ 15 nu, maximum ~ 30 nu.
 - Trình tự: Tỷ lệ GC khoảng 50%. Nên thiết kế để hạn chế misprime (bắt cặp lỗi)
 - i. Không được có trình tự nu bổ sung lẫn nhau giữa 2 mồi
 - ii. Hạn chế lặp lại kéo dài của một hoặc hai cặp nu
 - iii. GC ở 5 nu cuối (đầu 3')
 - Nhiệt độ của đoạn mồi: Tm của 2 mồi không nên cách nhau quá xa (maximum 5°C)
 - Đoạn gene cần khuếch đại: > 1 kb và < 3 kb

Bắt cặp lỗi (misprime)

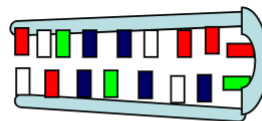
1



2



3



Primer secondary structure

Các yếu tố ảnh hưởng đến 1 phản ứng PCR

- **Nhiệt độ nóng chảy (T_m):** Primer Melting Temperature (T_m) by definition is the temperature at which one half of the DNA duplex will dissociate to become single stranded and indicates the duplex stability.
 - Primer 18 – 25 nu
 - $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$
- **Nhiệt độ bắt cặp (T_a):** Annealing temperature – hybridization temperature generally about 5°C below the T_m of your primers.
 - $T_a = T_m (\text{primer}) - 5$
- Tools for calculation:
 - **NCBI**
 - <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>
 - http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php?formula=Base-Stacking
 - V.v...

Các yếu tố ảnh hưởng đến 1 phản ứng PCR

- **Số lượng chu kỳ:**

- Trong thực tế số chu kỳ cho một phản ứng PCR không nên vượt quá 40.
- Số chu kỳ cho một phản ứng PCR tùy thuộc số lượng mẫu DNA ban đầu.
 - Mẫu 10^5 thì cần 25 – 30 chu kỳ
 - Mẫu $10^2 - 10^3$ thì số chu kỳ phải là 35 – 40 chu kỳ

Các yếu tố ảnh hưởng đến 1 phản ứng PCR

- **Nồng độ dNTP (các deoxynucleotide triphosphate)**
 - 20 – 200 μM .
 - Nồng độ cao hơn \rightarrow khuếch đại “kỳ sinh”
 - Mất cân bằng trong thành phần các dNTP \rightarrow tăng các lỗi sao chép của DNA polymerase.

Checklist nếu PCR lỗi

A) If no product (of correct size) produced:

- 1 Check DNA quality
- 2 Reduce annealing temperature
- 3 Increase magnesium concentration
- 4 Add dimethylsulphoxide (DMSO) to assay (at around 10%)
- 5 Use different thermostable enzyme
- 6 Throw out primers - make new stocks

B) If extra spurious product bands present

- 1 Increase annealing temperature
- 2 Reduce magnesium concentration
- 3 Reduce number of cycles
- 4 Try different enzyme

Ưu điểm PCR

- Tốc độ nhanh nhạy
- Đơn giản:
 - Một lượng nhỏ DNA để làm việc
 - DNA hoàn chỉnh và không bị hư hại
 - Mất ít thời gian hơn để đào tạo
 - Không cần phải có trình tự của vùng DNA hướng đến để khuếch đại → những trình tự ở hai bên của gene quan tâm → đột biến trong bộ gene vùng quan tâm sẽ không ảnh hưởng đến sự khuếch đại → đột biến có thể được sao chép và phân tích.

Nhược điểm PCR

- Độ dài chuỗi DNA cần khuếch đại: 200–1000 bp
- Tỷ lệ sao chép sai cao (in vivo) $1/10^9$ nu
- Ngoại nhiễm
- Không phân biệt được tế bào sống (viable cell) hay đã chết (dead cell)
 - Quy trình định danh vi khuẩn vẫn dựa vào nuôi cấy
 - PCR khẳng định lại và xây dựng hồ sơ phân tử của vi sinh vật
- Khắc phục?
 - Tách chiết DNA bảo đảm DNA khuôn tinh khiết
 - Sử dụng DNA polymerase tốt
 - Lưu ý khi sử dụng các dụng cụ thí nghiệm/ hạn chế thao tác thừa thải
 - Các chất phụ trợ: DMSO, BSA, v.v...

Các loại PCR

- **PCR cổ điển**
- **Multiplex PCR:** bao gồm nhiều cặp mồi trong một hỗn hợp PCR duy nhất để tạo ra bản sao kích thước khác nhau đặc trưng cho các trình tự DNA khác nhau. Với nhiều đoạn DNA đích được khuếch đại cùng một lúc, nhiều thông tin thu được từ một lần chạy mà không đòi hỏi nhiều hóa chất và thời gian thực hiện. Nhiệt độ gắn mồi phải được tối ưu hóa
- **Nested PCR:** PCR lồng làm tăng độ đặc hiệu của phản ứng PCR bằng cách giảm độ nhiễu do sự khuếch đại DNA không đặc hiệu. Sử dụng hai cặp mồi trong hai phản ứng PCR liên tiếp. PCR lồng thường thành công hơn phản ứng PCR thông thường đặc biệt trong trường hợp khuếch đại các đoạn DNA dài, nhưng nó cũng đòi hỏi thông tin chi tiết hơn về các trình tự đích.
- **Hot start PCR:** kỹ thuật làm giảm sự khuếch đại không đặc hiệu trong quá trình PCR. Nó có thể được thực hiện bằng cách gia nhiệt các thành phần phản ứng ở nhiệt độ biến tính (ví dụ, 95°C) trước khi thêm các polymerase. Hoạt động của polymerase bị ức chế bởi enzyme đặc hiệu, hoặc kháng thể hoặc bởi sự hiện diện của các liên kết cộng hóa trị với chất ức chế có khả năng phân ly khi được kích hoạt ở nhiệt độ cao.
- **Digital PCR (dPCR):** được sử dụng để định lượng số lượng của một sợi DNA đích trong một mẫu DNA.
- **Droplet Digital PCR (ddPCR):** ứng dụng công nghệ giọt dầu (water-oil emulsion droplet). Mẫu sẽ được chia nhỏ trong 20,000 droplet, phản ứng khuếch đại các phân tử DNA khuôn sẽ được diễn ra trong từng droplet. Định lượng DNA, độ chính xác cao.
- **V.v...**
 - **Tùy theo mục đích sử dụng mà lựa chọn loại PCR phù hợp**

Ứng dụng PCR

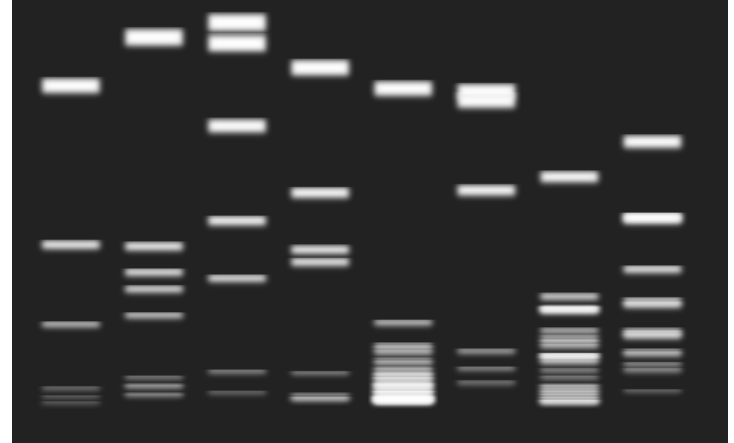
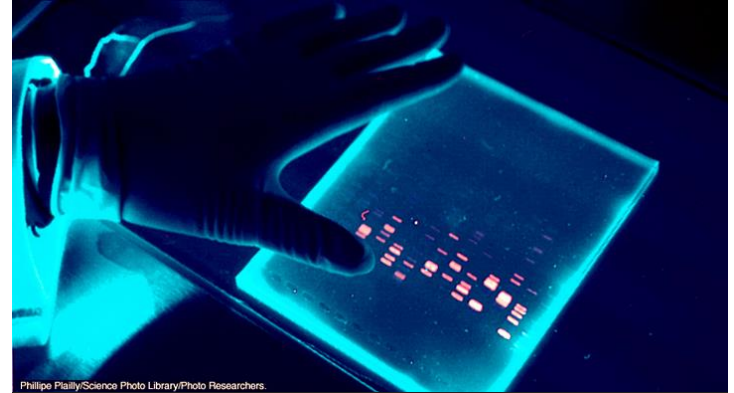
- Nghiên cứu biểu hiện gene
- Nghiên cứu bệnh di truyền
- Truy nhận huyết thống
- Chẩn đoán, theo dõi điều trị các bệnh do vsv
- Tầm soát và theo dõi điều trị một số bệnh ung thư

Một số câu hỏi

- So sánh PCR và cơ chế sao chép DNA trong tế bào?
- Nhiệm vụ của Taq DNA polymerase
- Nhiệm vụ của primer?
- Sau một số chu kỳ nhất định, số lượng bản sao sản phẩm PCR bị giới hạn, vì sao?
- Các yếu tố cần điều chỉnh để tối ưu hóa một phản ứng PCR?



2. ĐIỆN DI ĐỌC KẾT QUẢ PCR



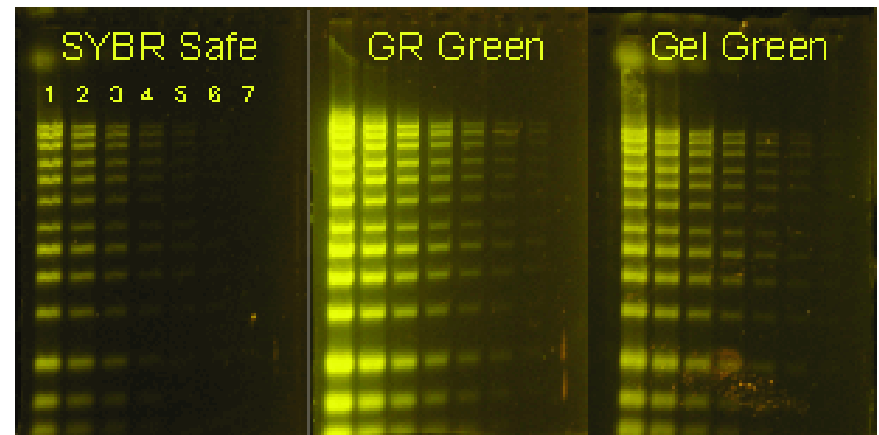
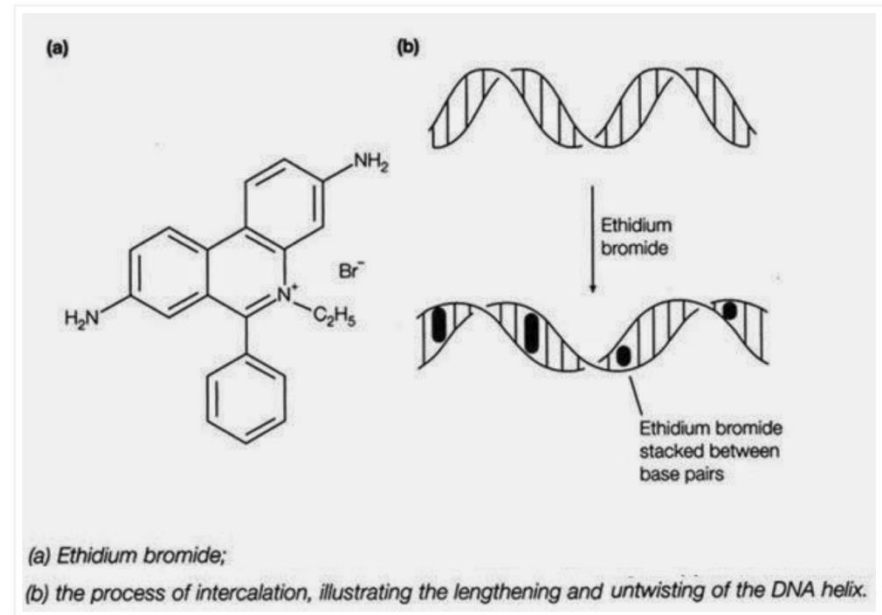
Làm thế nào để đọc kết quả PCR?

- PCR cổ điển:
 - Thu thập kết quả sau 35-40 chu kỳ
 - Kết quả ở đây là gì?



Làm thế nào để đọc kết quả PCR?

- Kết quả PCR = DNA quan tâm
- Kiểm chứng:
 - Sự hiện diện
 - Độ dài
 - Lượng???
- Trực quan kết quả PCR:
 - Nhuộm DNA
 - Điện di trên một khuôn đỡ (gel)
- Các loại thuốc nhuộm
 - Ethidium Bromide (EtBr): rẻ, phổ biến, độc hại
 - SYBR® Gold và SYBR® Safe
 - GelRed™ và GelGreen™
 - V.v...

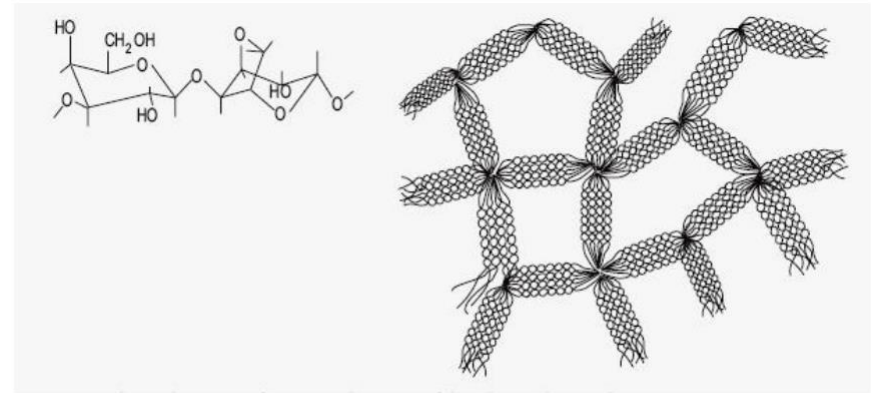


Nguyên tắc điện di

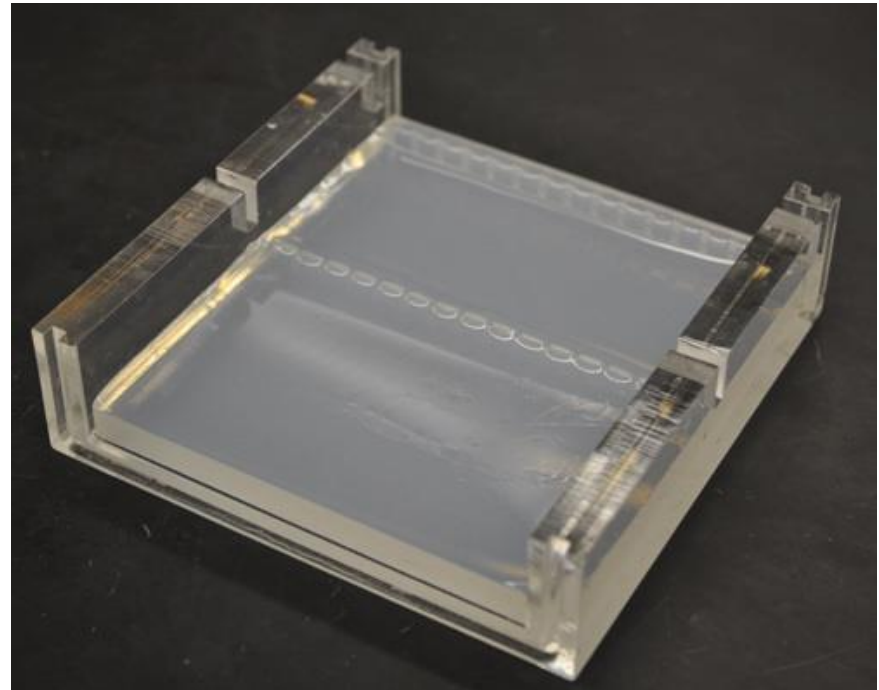
- Điện di: hiện tượng dịch chuyển của các phân tử tích điện dưới tác động của điện trường
 - Phân chia các phân tử DNA, RNA, hay protein
 - Khối lượng, điện tích
- Khi các phân tử tích điện được đặt trong một điện trường, chúng sẽ dịch chuyển về các cực (+) hoặc (-) tùy theo điện tích của chúng.
- Khuôn đỡ (support matrix): giấy, cellulose acetate, gel tinh bột, agarose hoặc polyacrylamide gel.
- Kỹ thuật điện di trên giá rắn (agarose hoặc polyacrylamide):
 - Dung dịch đệm để dẫn điện
 - Gel để phân tách các phân tử
 - Chất nhuộm phát hiện vị trí các phân tử trên gel
- **Agarose gel** phân tách hiệu quả các phân tử DNA hoặc RNA có kích thước từ 20 bp-20 kb.
- **Polyacrylamide gel** được dùng để phân tách các phân tử protein và các phân tử DNA có chiều dài <1 kb

Điện di gel Agarose (Không biến tính)

- Agarose gel là một chất trong suốt hoặc trong mờ
 - agarose và đệm điện di được đun nóng tới $>100\text{ }^{\circ}\text{C}$ \rightarrow đông
- Gắn nhiều gốc monomer tạo thành polymer nhờ nhiệt độ.
- Các chuỗi polymer liên kết chéo với nhau tạo thành một hệ thống mạng lưới với kích thước các mắt lưới tùy thuộc vào nồng độ agarose và phản ứng polymer hoá.
- Dung dịch đệm: TAE hay TBE để tạo môi trường thích hợp cho các ion di chuyển



Hình 1. Cấu trúc hoá học của agarose và cấu trúc agarose gel



EthBr

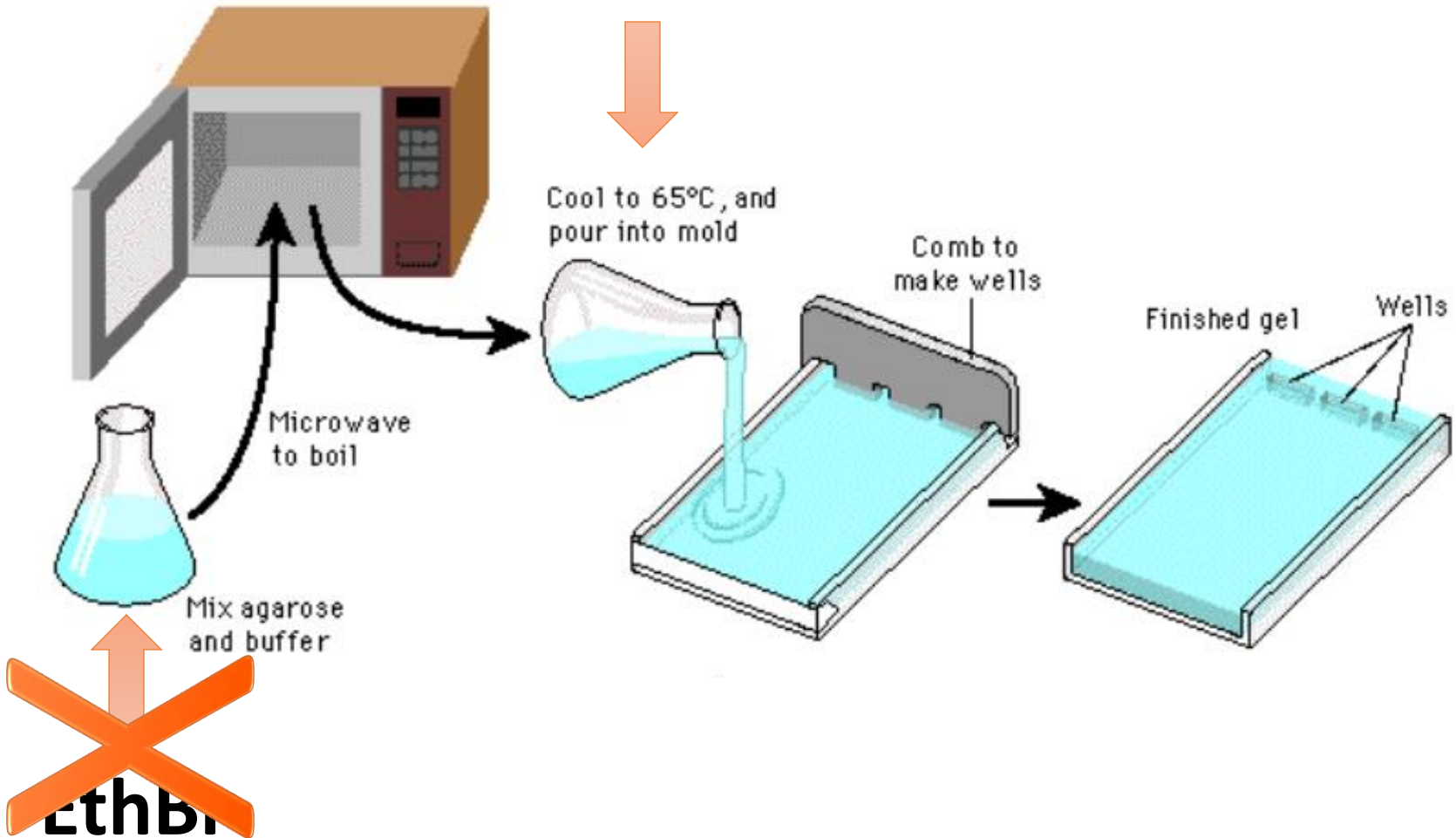


Cool to 65°C, and pour into mold

Comb to make wells

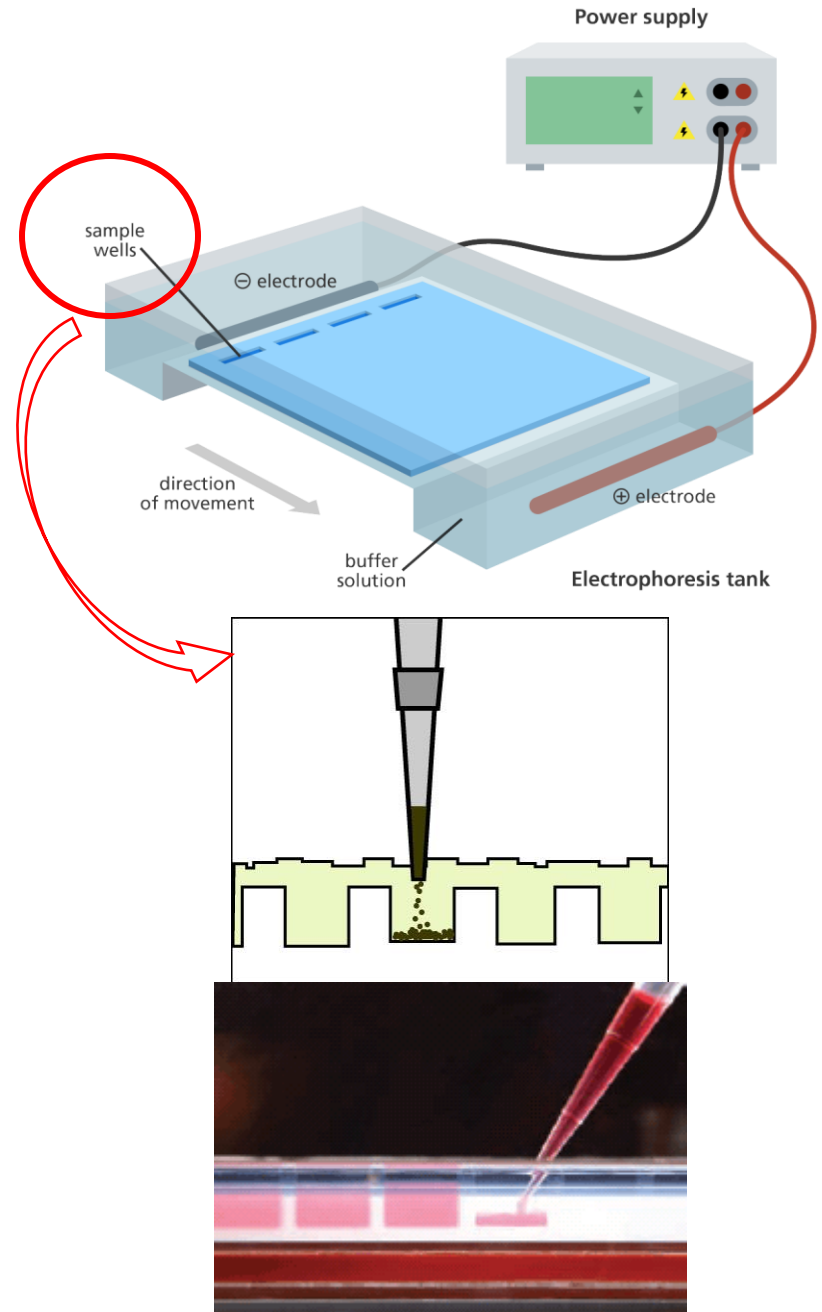
Finished gel

Wells



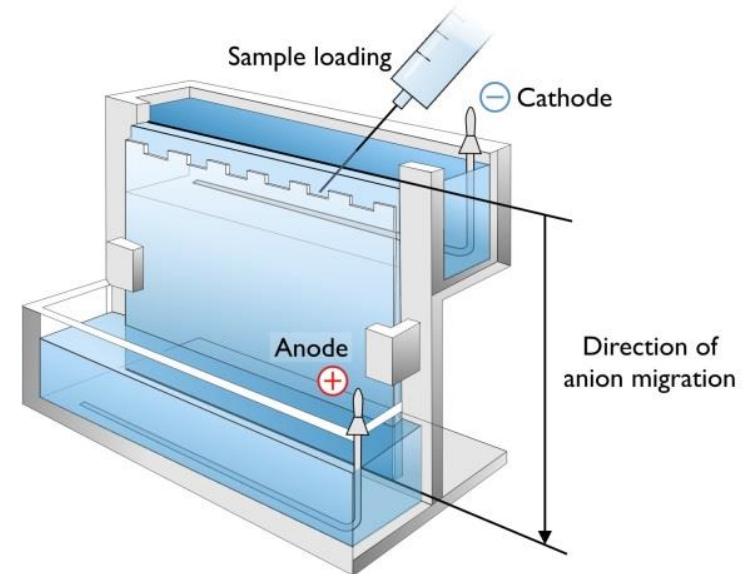
Điện di gel Agarose (Không biến tính)

- Mặt phẳng ngang
- DNA mang điện tích (-) nên đi chuyển từ cực (-) sang (+) trong điện trường
 - Tách các đoạn DNA với kích thước khác nhau
 - Tốc độ dịch chuyển phụ thuộc vào kích thước, cấu hình phân tử, nồng độ gel, lực điện trường, v.v..
 - Thường: DNA kích thước nhỏ sẽ di chuyển nhanh và xa hơn trên gel, DNA kích thước lớn sẽ di chuyển chậm hơn và gần hơn trên gel
 - Các phân tử nucleic acid có khối lượng và điện tích khác nhau được tách ra
- Vị trí của DNA trong gel được xác định trực tiếp
- Nhuộm ethidium bromide (EtBr) nồng độ thấp và có thể phát hiện dưới tia UV



Điện di polyacrylamide (Không biến tính và Biến tính)

- Không biến tính: Không phá vỡ cấu trúc phân tử
- Biến tính: Phá vỡ cấu trúc phân tử (Protein 3D → mạch thẳng)
- Dùng để phân tách các phân tử protein, các đoạn DNA, RNA. Gel được rót vào giữa hai tấm kính được ngăn cách bởi các miếng đệm để ngăn không cho polyacrylamide tiếp xúc với không khí.
- Chiều dài của gel: 10 – 100 cm.
- Nồng độ gel: 3.5% – 20% (tùy thuộc vào kích thước của phân tử protein hoặc DNA).



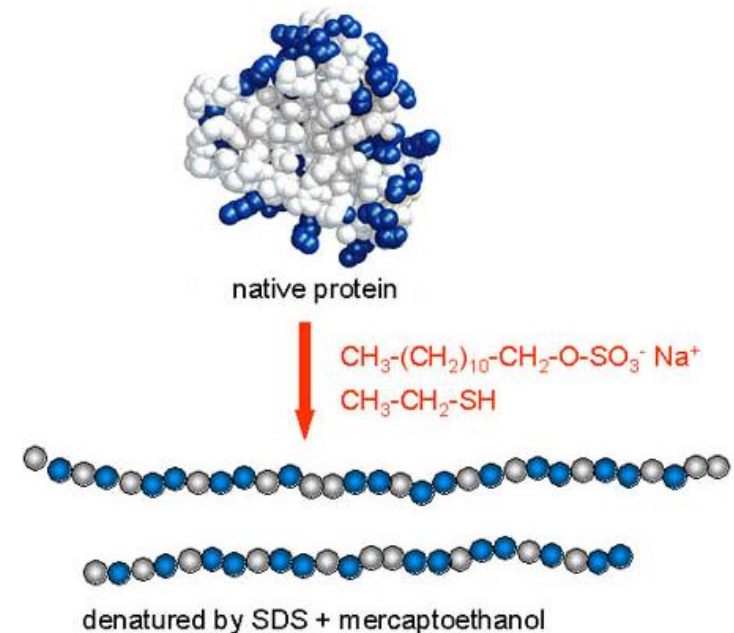
Điện di polyacrylamide (Không biến tính và Biến tính)

Điện di không biến tính

- Ít ảnh hưởng đến hoạt tính, cấu trúc của các chất cần phân tách.
- Điện di trong môi trường đệm ở pH kiềm (8-9) nhằm để các protein tích điện âm.
- Đối tượng: protein, DNA

Điện di biến tính

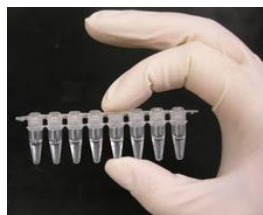
- Trong điện di biến tính: đệm mẫu và đệm chạy protein được bổ sung thêm các chất sau:
- SDS (Sodium dodecyl sulphate): phá vỡ cấu trúc bậc 2, 3 của protein và làm cho cấu trúc hcuooix protein duỗi thẳng ra và toàn bộ phận tử tích điện âm.
- Các chất khử: β – mecaptoethanol (β -ME) hay DTT có tác dụng cắt cầu ddisulfide (-S-S-) ở nhiệt độ 95oC – 100oC à giúp protein tồn tại ở dạng chuỗi polypeptide tách rời nhau.
- Đối tượng: protein.



Ví dụ:

Dùng PCR để phát hiện *Mycobacterium tuberculosis* trong máu bệnh nhân

- Đoạn trình tự **IS6110** đặc thù cho Mtb (**419bp**)
- Primer có sẵn
- Thiết kế phản ứng PCR
- Điện di trên gel agarose



Mẫu kiểm tra

DNA từ máu bệnh nhân



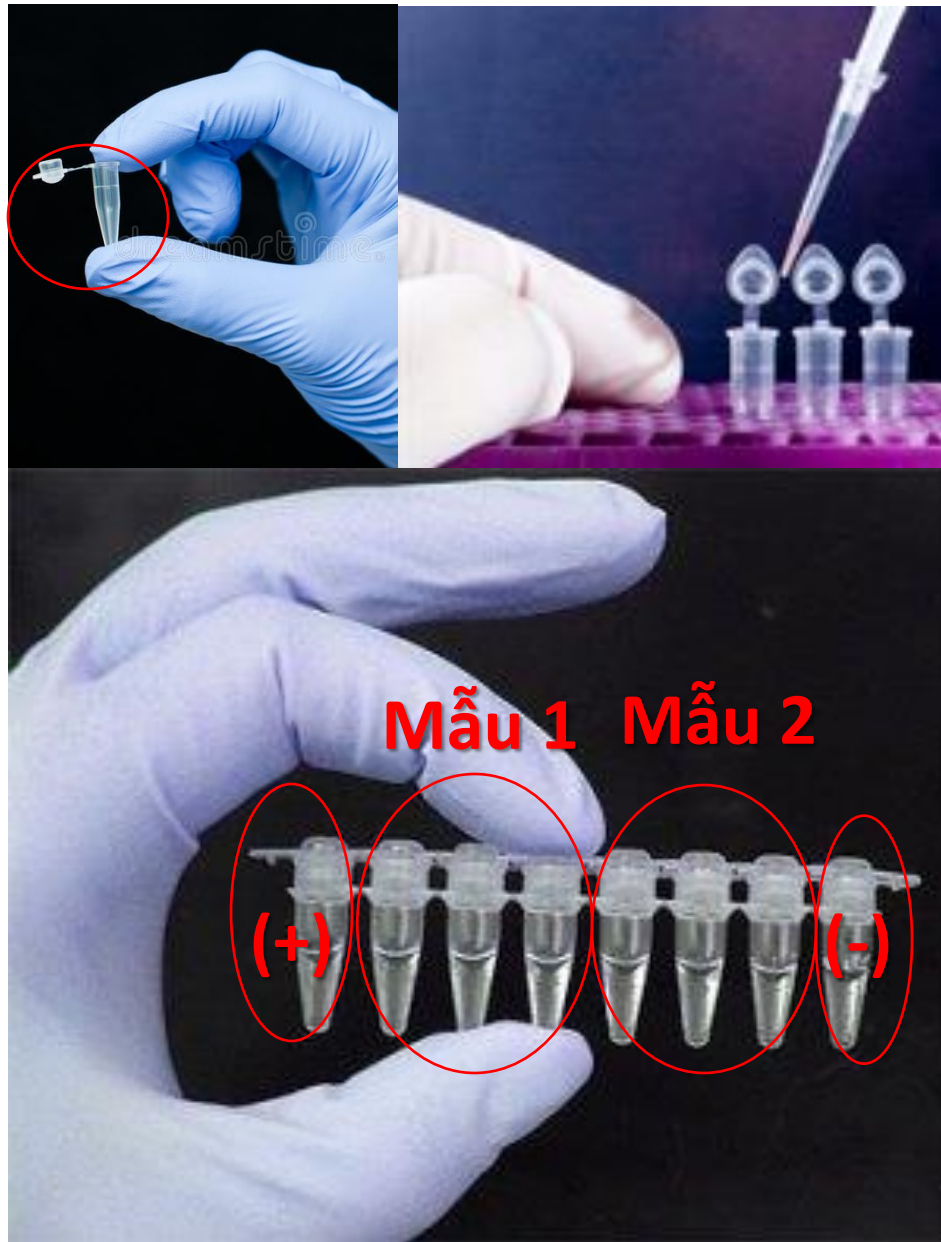
Chứng dương

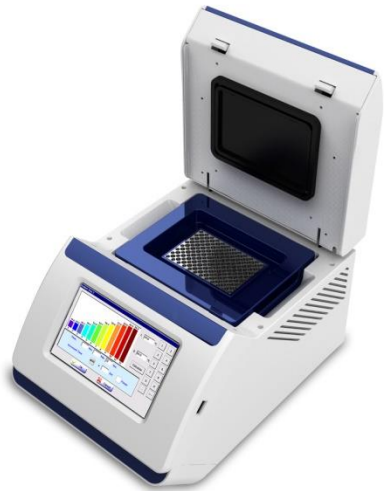
Mẫu DNA Mtb



Chứng âm

Nước, **không DNA khuôn**



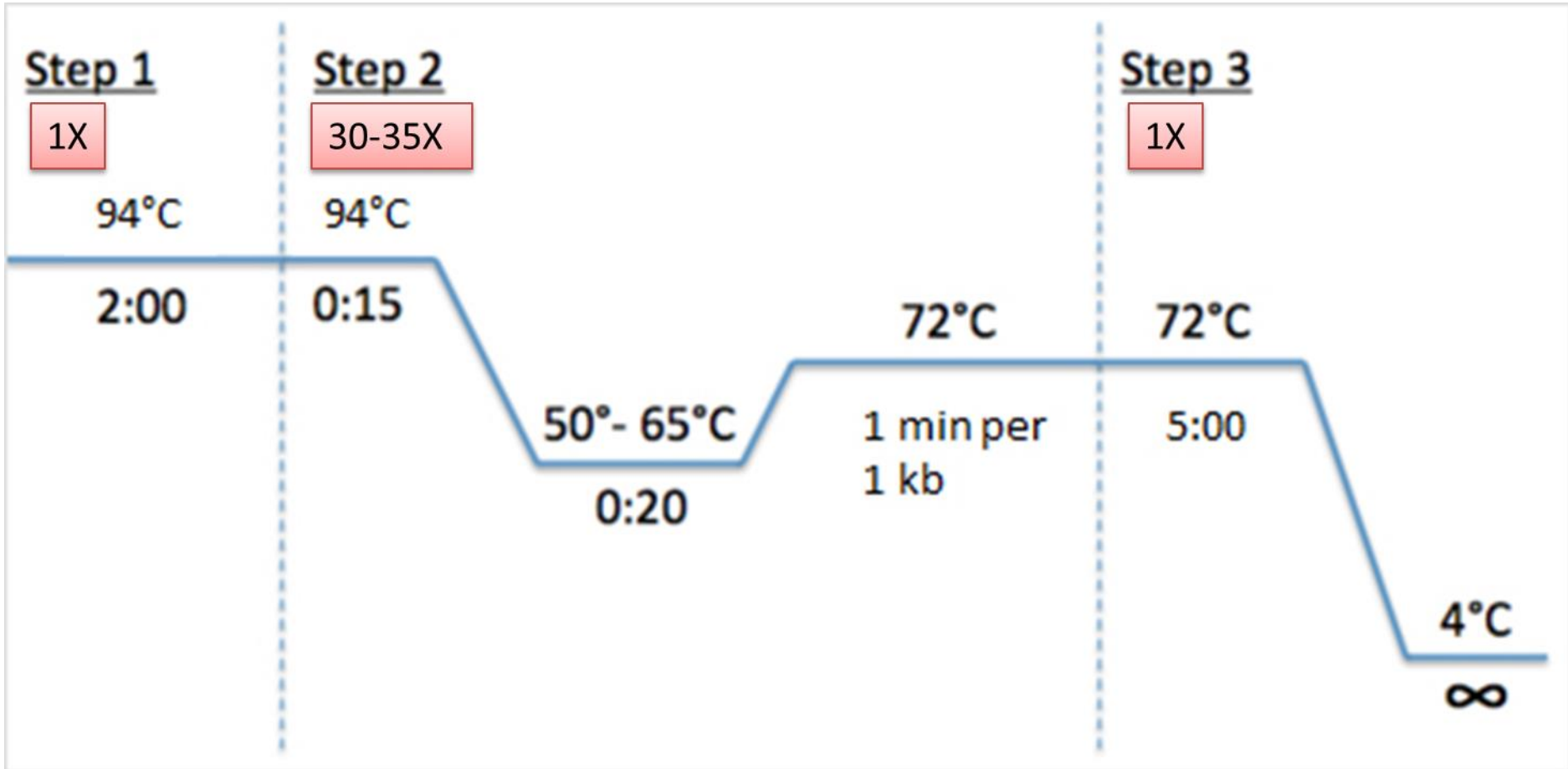


25/10/2018

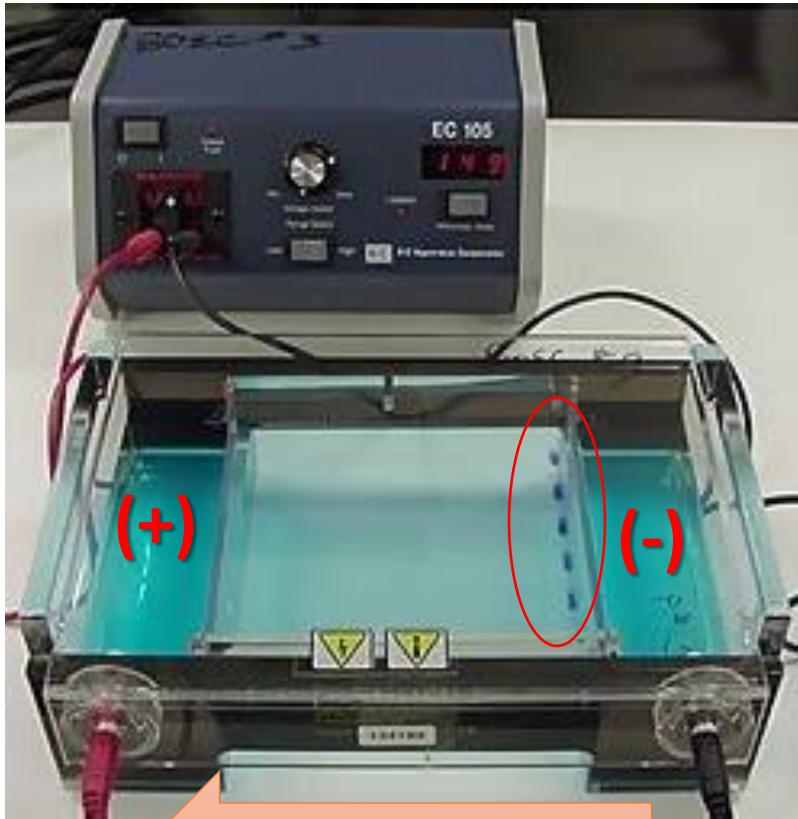


TT NCYSH DHYK PNT

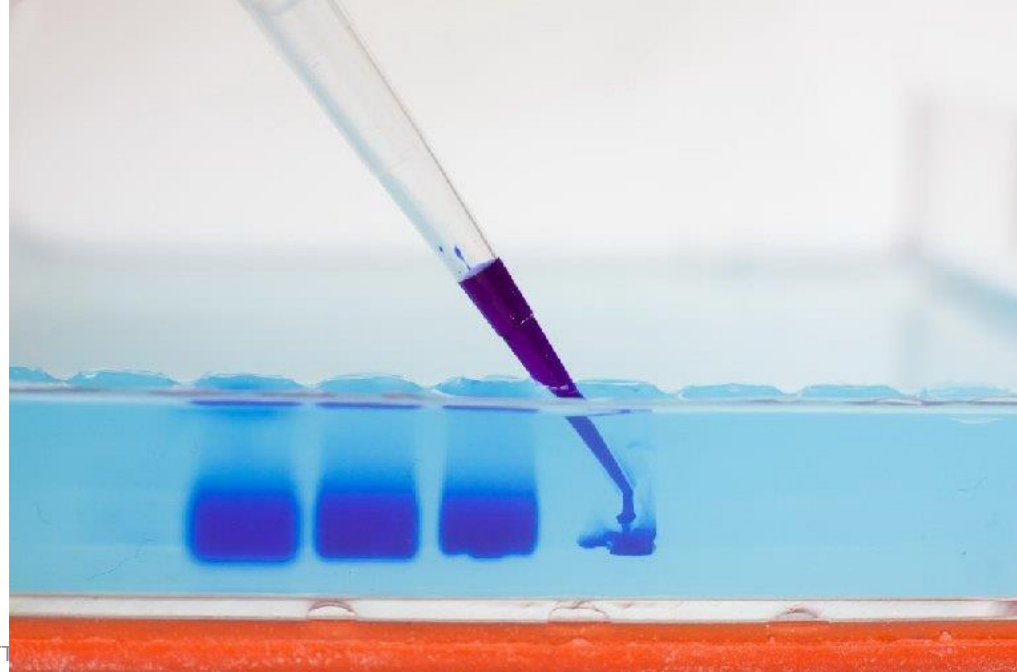
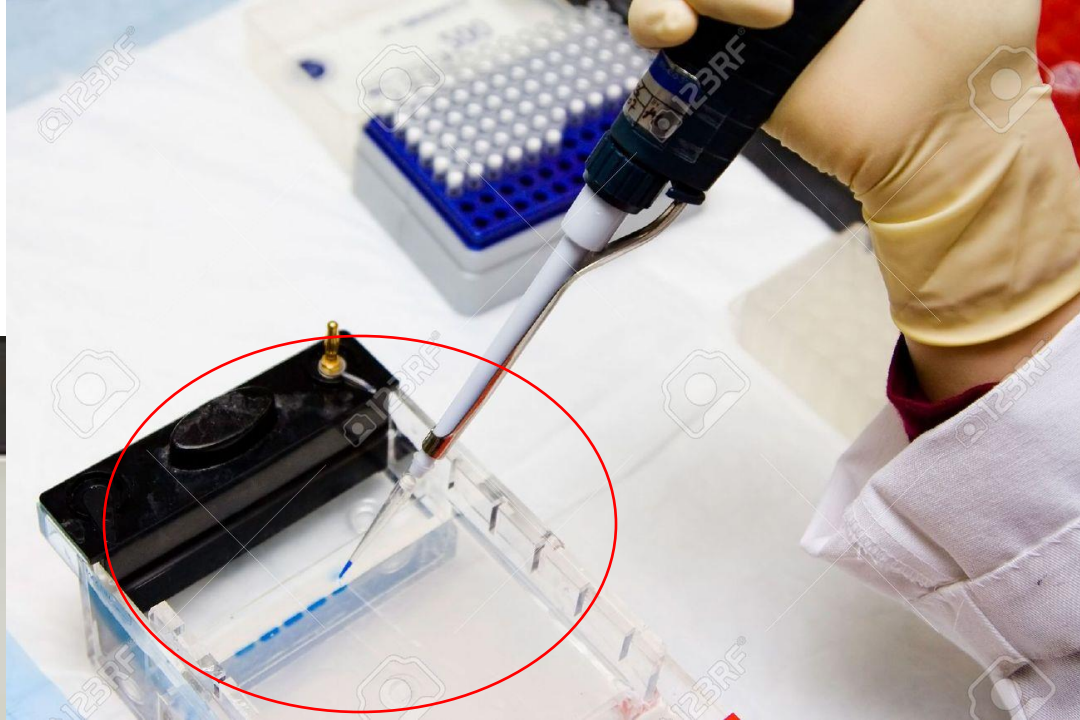
38



Điện di



- Chứng dương: thang DNA/RNA (marker/ladder)
 - Chứng âm: nước
 - Để làm gì?
- 25/10/2018



Xét Nghiệm:

Chạy điện di PCR của 01 mẫu máu để phát hiện trình tự IS6110 419bp của *M. tuberculosis*

(+)
PCR

S1

S2

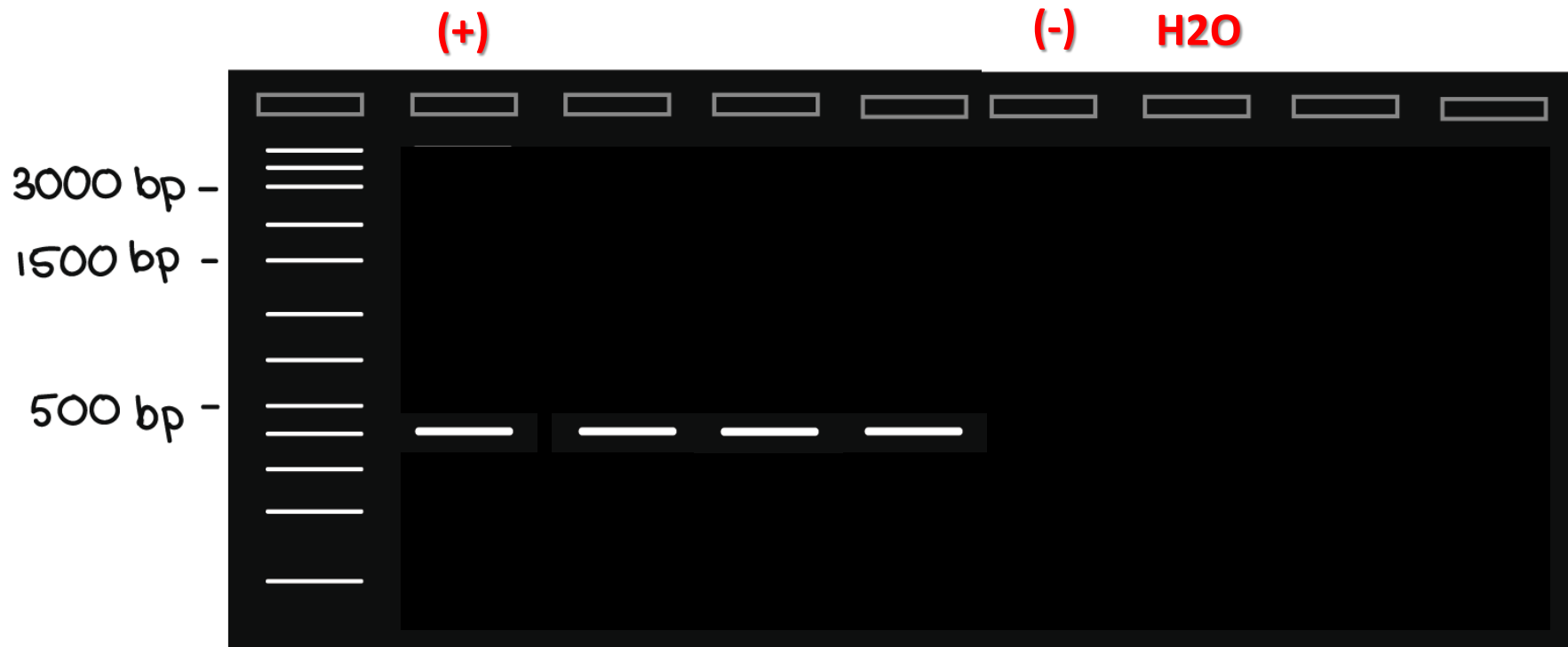
S3

(-)
PCR

H2O



Đọc kết quả PCR: Nhận diện sự hiện diện của gene quan tâm là trình tự 419bp IS6110, có sự đối chiếu với thang đo và chứng dương, để xác định là bệnh nhân có nhiễm vi khuẩn lao, ở ngưỡng có thể phát hiện được.



Monoplex PCR

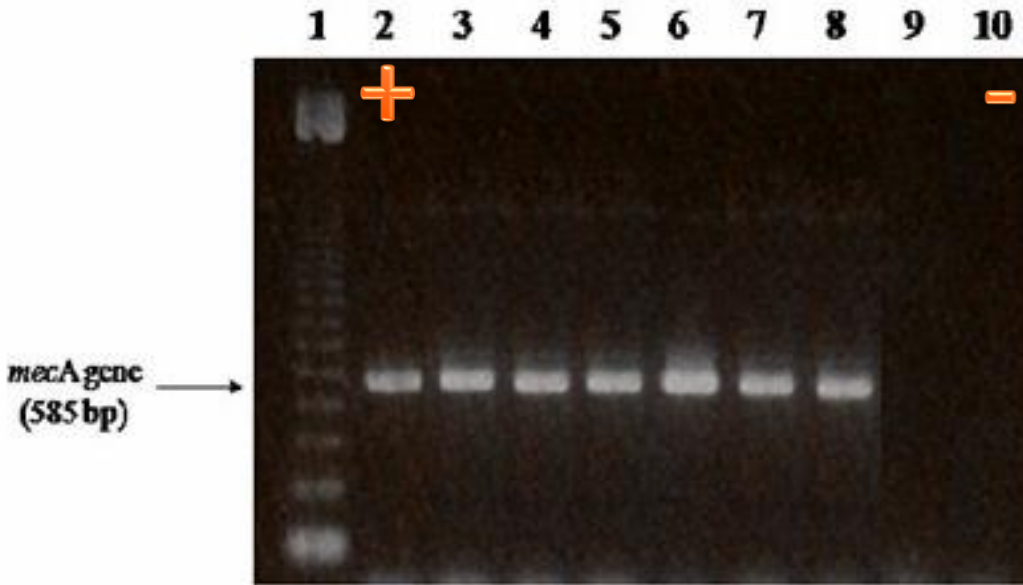
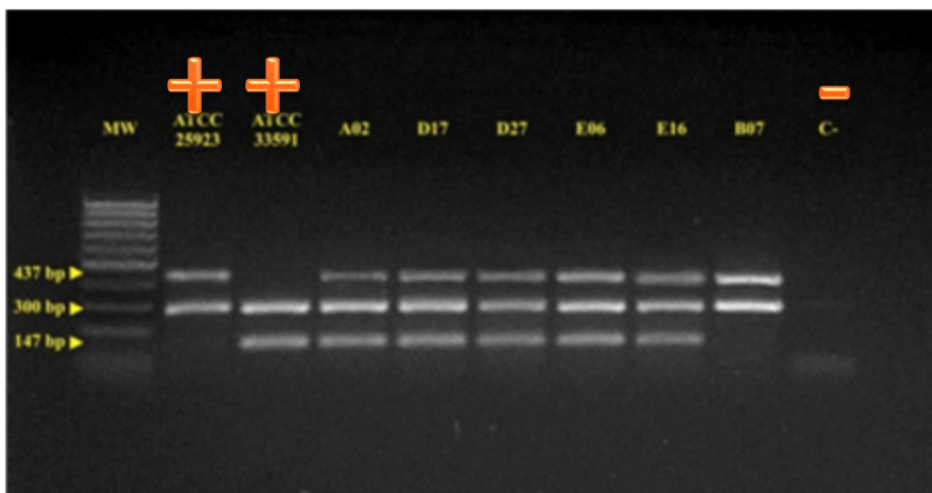


Figure 1. Gel image of representative PCR *mecA* gene products (585bp), Lane 1: molecular size marker (123bp); Lanes 2-10: isolates BMB9393 (a positive control), NT05, NT11, NT42, NT76, NT80, NT99, NT21 and ATCC 25923 (a negative control).

- 1 gene quan tâm/ 1 phản ứng PCR
- Lưu ý:
 - DNA ladder/marker
 - Positive control (chứng dương)
 - Negative control (chứng âm)
- Dễ có:
 - Kết quả âm/dương sai
 - Thời gian, công sức

Multiplex PCR

Figure 1. Multiplex PCR for detecting *nuc*, *mecA* and PVL genes in *S. aureus* isolates

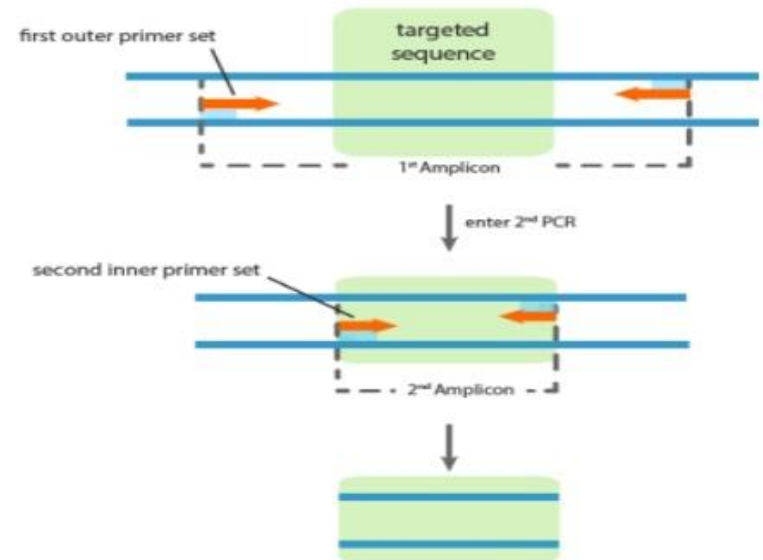


Multiplex PCR was carried out to detect the presence of *nuc*, *mecA* and PVL genes in isolates from nasal carriers to confirm *Staphylococcus aureus* species (*nuc* gene), methicillin resistance (*mecA* gene) and PVL gene presence. Lanes 1: MW (DNA molecular weight marker). Lanes 2 and 3 : ATCC 25923 reference strain (*nuc*+, *mecA*-, PVL+) and ATCC 33591 reference strain (*nuc*+, *mecA*+, PVL-) respectively. Lanes 4 to 9: representative isolates from the study. Lane 10: negative PCR reaction control.

- Nhiều gene quan tâm/1 phản ứng PCR
 - Có đối chiếu âm dương trong từng mẫu và giữa các mẫu với nhau
 - Tiết kiệm thời gian công sức
- Tuy vậy:
 - Thiết kế mỗi phải qua thử nghiệm để chắc chắn độ đặc hiệu

Nested PCR

- Cùng một gene hai cặp mồi:
 - Cặp mồi 1: để vào trước ~15 chu kỳ → khuếch đại đoạn dài hơn
 - Cặp mồi 2: để vào sau → ngắn hơn
- Ưu:
 - Có thể khuếch đại với số lượng DNA mẫu ít → tăng độ nhạy
 - Tăng tính đặc hiệu
- Nhược:
 - Dễ ngoại nhiễm
 - Mất thời gian



Một số câu hỏi

- Trong quá trình điện di trên gel agarose, đoạn DNA quan sát sẽ di chuyển như thế nào? Tại sao?
- Khi đọc kết quả điện di, cần phải quan tâm những gì để đảm bảo độ chính xác của kết quả thu được? Tại sao?



3. Thiết kế primer

Target Sequence #1

Primer sequence not complimentary = **No Recognition**

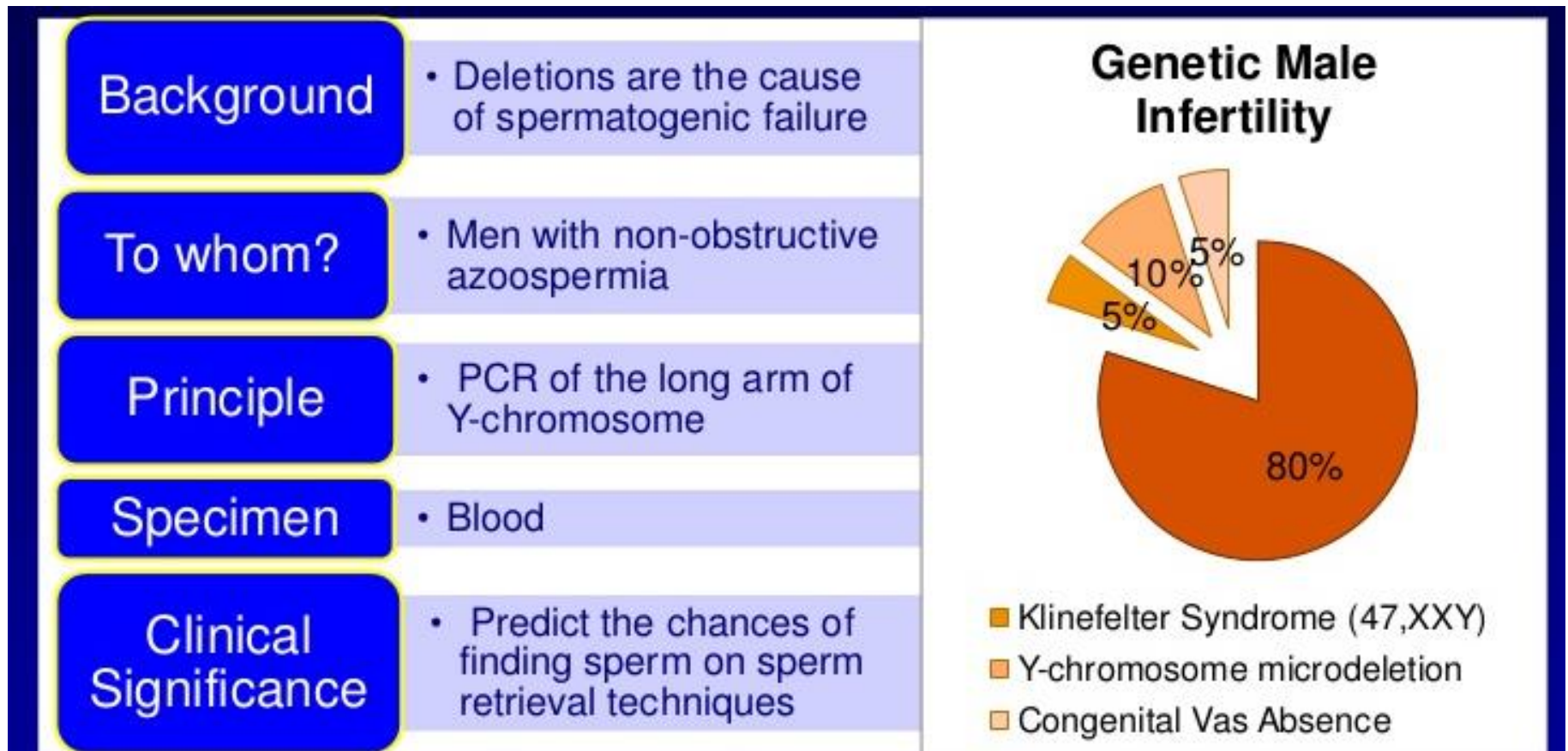


Target Sequence #2

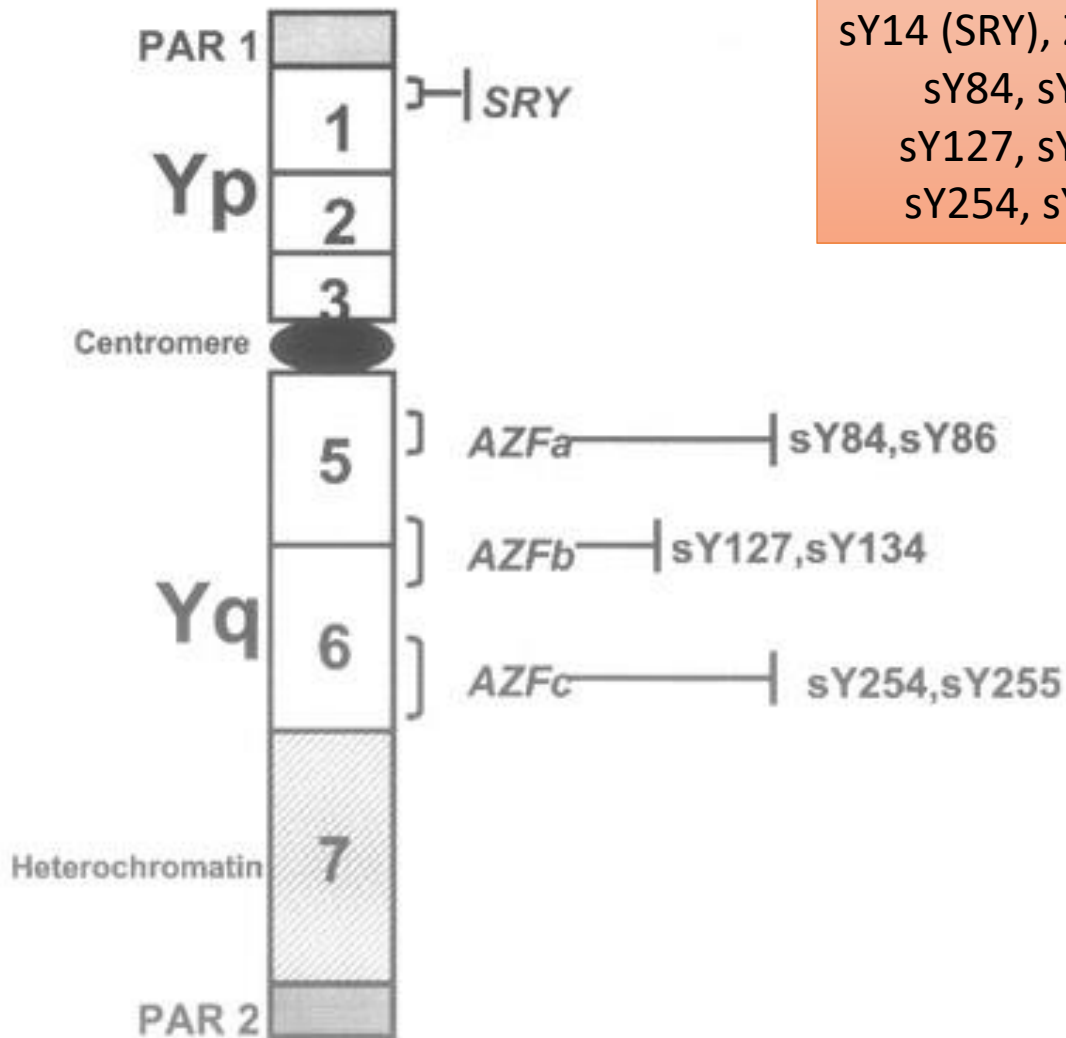
Primer sequence complimentary = **Recognition**



Đột biến đứt đoạn nhỏ trên NST Y



Đột biến đứt đoạn nhỏ trên NST Y



sY14 (SRY), ZFX/ZFY,
sY84, sY86,
sY127, sY134,
sY254, sY255.

Practice finding sY82


Genomes

Assembly	0	Genome assembly information
BioCollections	0	Museum, herbaria, and other biorepository collections
BioProject	1	Biological projects providing data to NCBI
BioSample	0	Descriptions of biological source materials
Clone	0	Genomic and cDNA clones
Genome	0	Genome sequencing projects by organism
GSS	0	Genome survey sequences
Nucleotide	2	DNA and RNA sequences
Probe	1	Sequence-based probes and primers
SRA	0	High-throughput sequence reads
Taxonomy	0	Taxonomic classification and nomenclature

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)  [Clear](#)

G49210.1

Range


Forward primer From To  [Clear](#)
Reverse primer

Or, upload FASTA file

No file chosen


Primer Parameters

Use my own forward primer
(5'->3' on plus strand)



[Clear](#)

Use my own reverse primer
(5'->3' on minus strand)




[Clear](#)

PCR product size


Min Max

of primers to return


Primer melting temperatures
(T_m)

Min Opt Max Max T_m difference 

Exon/intron selection


A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section 

Exon junction span




Exon junction match

Exon at 5' side Exon at 3' side

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction 

Intron inclusion

Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA 

Intron length range

Min Max 

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Detailed primer reports

Default score = 8.0

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTAATCCAAATACATGGGCTT	Plus	22	43	64	55.74	36.36	5.00	2.00
Reverse primer	ACAACATGGTGGTCTATTAATGCT	Minus	24	116	93	58.49	37.50	6.00	0.00
Product length	74								

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTGTAATCCAAATACATGGGCT	Plus	22	42	63	55.74	36.36	5.00	2.00
Reverse primer	ACAACATGGTGGTCTATTAATGCT	Minus	23	116	94	57.16	39.13	6.00	2.00
Product length	75								

Primer pair 3

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTTGTAAATCCAAATACATGGGCTT	Plus	24	41	64	57.13	33.33	7.00	2.00
Reverse primer	TGGTGGTCTATTAATGCTACTGTCA	Minus	25	110	86	59.58	40.00	6.00	3.00
Product length	70								

Primer pair 4

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTTGTAAATCCAAATACATGGGCT	Plus	23	41	63	56.47	34.78	7.00	2.00
Reverse primer	TGGTGGTCTATTAATGCTACTGTC	Minus	24	110	87	58.09	41.67	6.00	1.00
Product length	70								

Primer pair 5

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTAATCCAAATACATGGGCTTT	Plus	23	43	65	56.47	34.78	5.00	2.00
Reverse primer	AACAACATGGTGGTCTATTAATGCT	Minus	25	117	93	59.05	36.00	6.00	0.00
Product length	75								

Primer pair 6

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTGTAATCCAAATACATGGGCTT	Plus	23	42	64	56.47	34.78	5.00	2.00
Reverse primer	CAACATGGTGGTCTATTAATGCT	Minus	23	115	93	56.90	39.13	6.00	0.00
Product length	74								

Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions.

Simoni M¹, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Müller CR, Vogt PH.

Primers

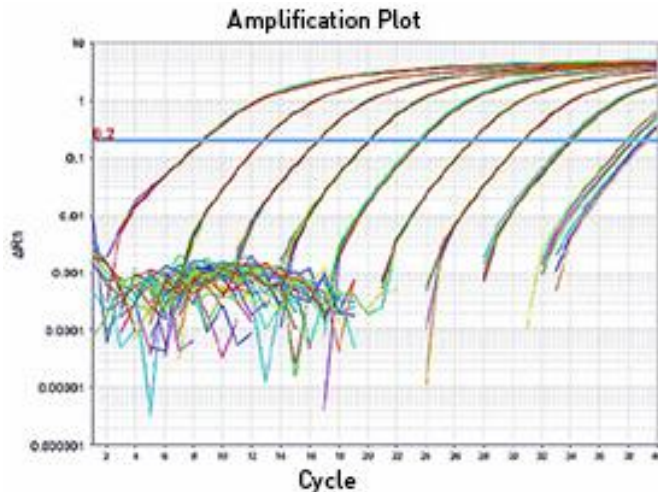
ZFY-F:	5'-ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C-3'
ZFY-R:	5'-GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T-3'
SRY-F:	5'-GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA-3'
SRY-R:	5'-GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG-3'
sY86-F:	5'-GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC-3'
sY86-R:	5'-ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT-3'
sY127-F:	5'-GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA-3'
sY127-R:	5'-CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA-3'
sY254-F:	5'-GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA-3'
sY254-R:	5'-GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C-3'
sY84-F:	5'-AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT-3'
sY84-R:	5'-GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC-3'
sY134-F:	5'-GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG-3'
sY134-R:	5'-ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA-3'
sY255-F:	5'-GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT-3'
sY255-R:	5'-CTC GTC ATG TGC AGC CAC-3'

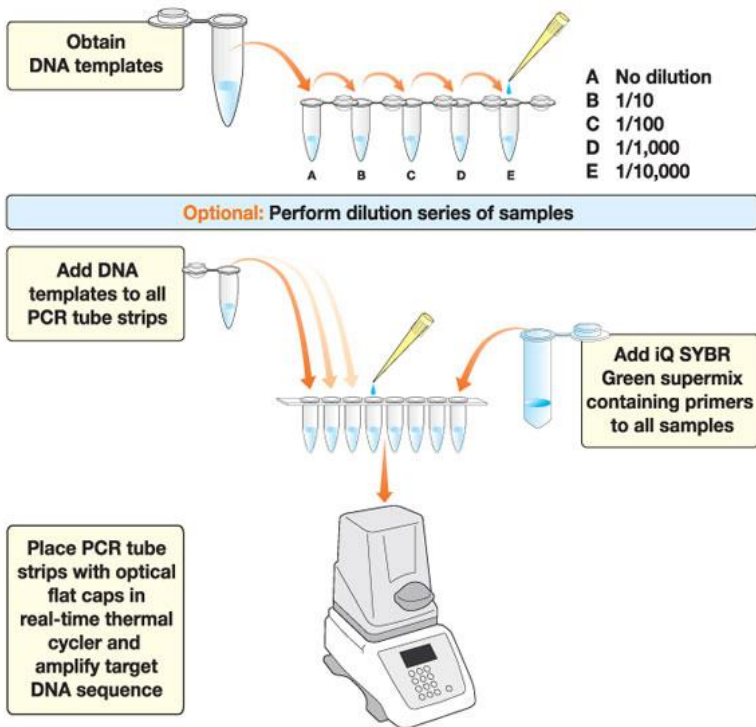
4. REAL TIME PCR



Nguyên lý

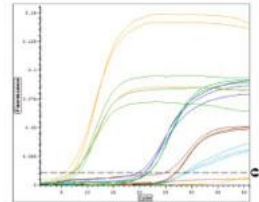
- Giống PCR, nhưng:
 - Máy luân nhiệt đặc biệt
 - Thiết bị đo cường độ phát huỳnh quang từ giếng mẫu
 - Chương trình vi tính cho phép xử lý kết quả → xác định sự biến đổi
 - Có thể theo dõi quá trình khuếch đại khi nó đang diễn ra (in real time)



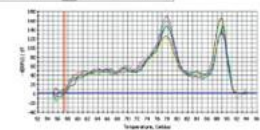


Set up PCR reactions and amplify using a real-time thermal cycler

Use dilution series to optimize real time PCR conditions. Determine starting quantities using real-time PCR results



Perform melt-curve analysis to distinguish specific PCR products from non-specific products such as primer dimers

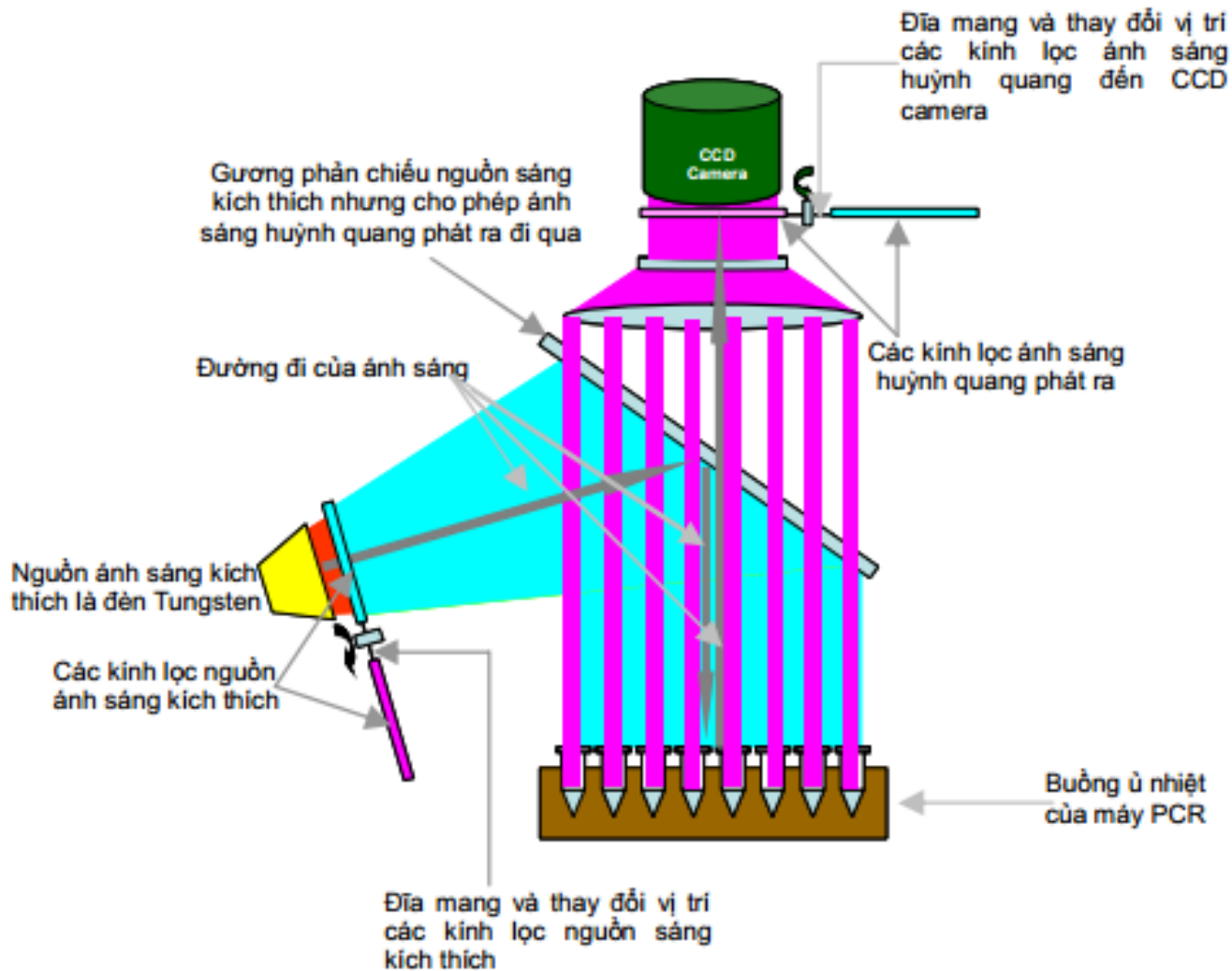


Analyze the results

Optional: Electrophoresis of PCR products and gel staining

Compare and contrast data obtained from real-time PCR to data obtained from conventional PCR

Lab 1



Hình 20: Minh họa sơ đồ một thiết bị real-time dùng đèn tungsten làm nguồn sáng kích thích và CCD camera ghi nhận toàn bộ tín hiệu huỳnh quang của các tube phản ứng bị chiếu sáng bởi nguồn sáng kích thích.

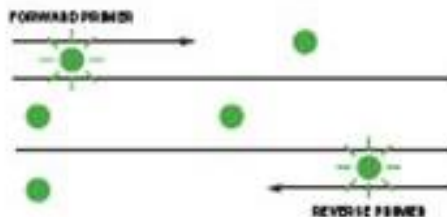
1. Reaction setup: The SYBR[®] Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



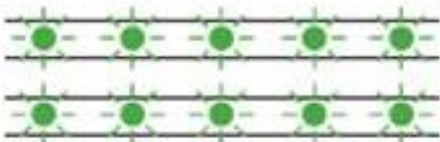
2. Denaturation: When the DNA is denatured, the SYBR[®] Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



3. Polymerization: During extension, primers anneal and PCR product is generated.



4. Polymerization completed: When polymerization is complete, SYBR[®] Green I Dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the 7900HT system.

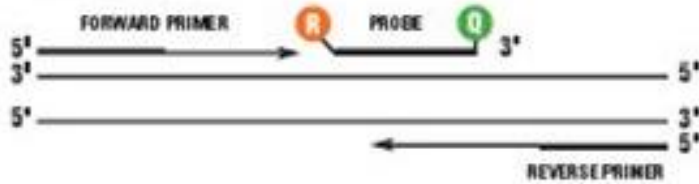


Huỳnh quang nhuộm non-specific detection

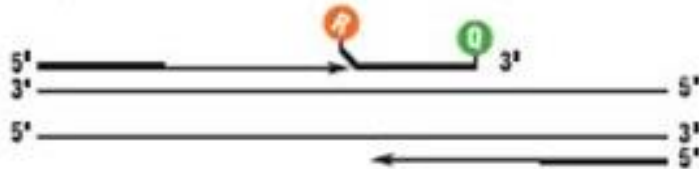
- SYBR green
 - Không bám vào mạch đơn DNA
 - Mạch kép DNA hình thành → bám vào và phát tín hiệu huỳnh quang
 - Tín hiệu huỳnh quang tăng → cặp DNA mới được hình thành
- Tại sao không đặc hiệu?

Huỳnh quang probe specific detection

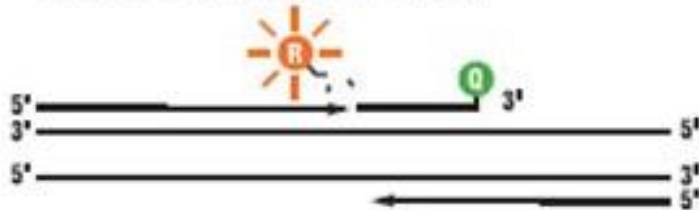
1. Polymerization: A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan[®] probe, respectively.



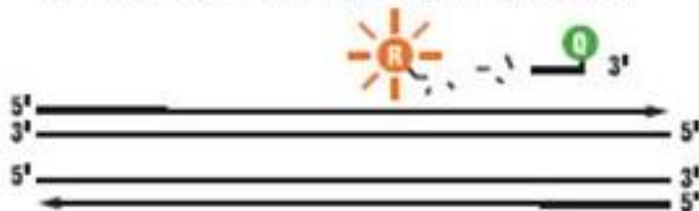
2. Strand displacement: When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. Cleavage: During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. Polymerization completed: Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.

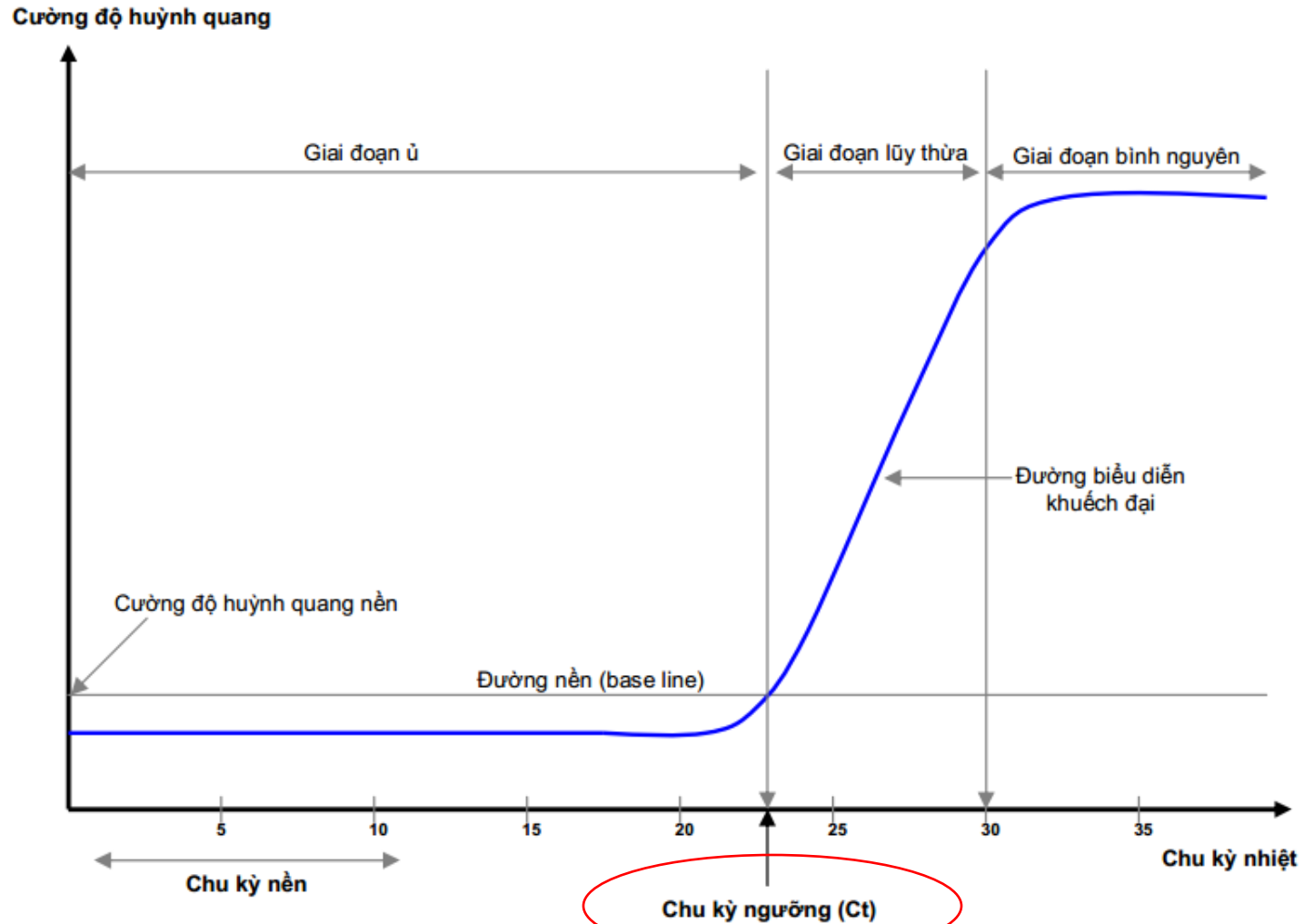


- Taq man probe:
 - Probe: đoạn dò → bắt cặp bổ sung với DNA đích
 - Đoạn nucleotide ngắn có 2 đầu đặc biệt: 5' gắn huỳnh quang (reporter), 3' gắn chất hấp thụ tương ứng (quencher)

- (1) Probe gắn vào DNA đích
- (2) Bình thường: Quencher hấp thụ huỳnh quang → không tín hiệu
- (3) Khuếch đại bắt đầu, Taq polymerase cắt bỏ đoạn probe → tách đôi 2 đầu → phát sáng
- (4) 1 phát sáng → 1 cặp DNA mới hình thành

- Tại sao đặc hiệu?

Đọc kết quả realtime PCR

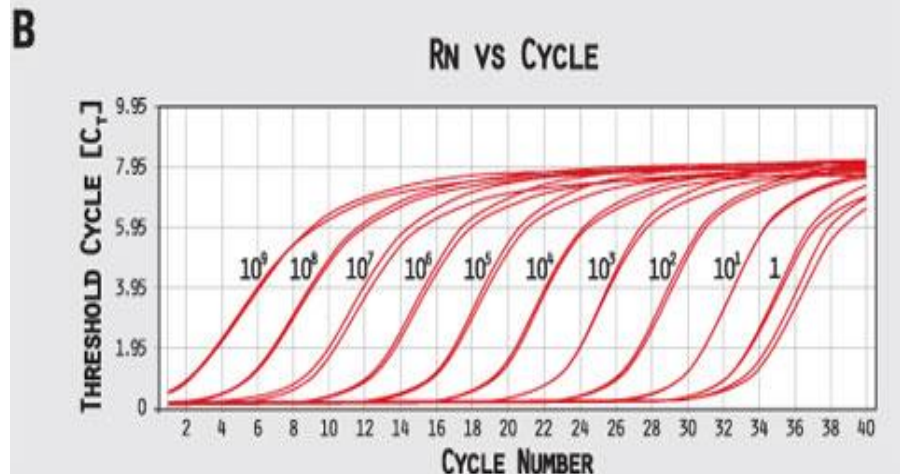
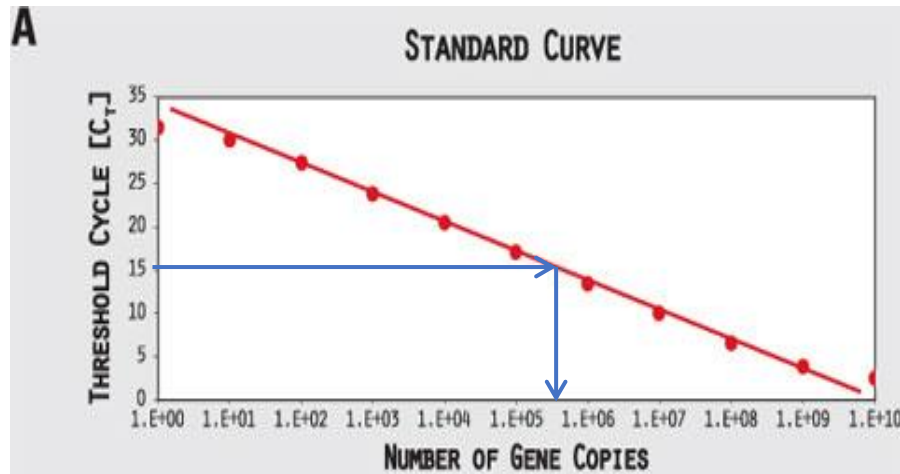


Ứng dụng

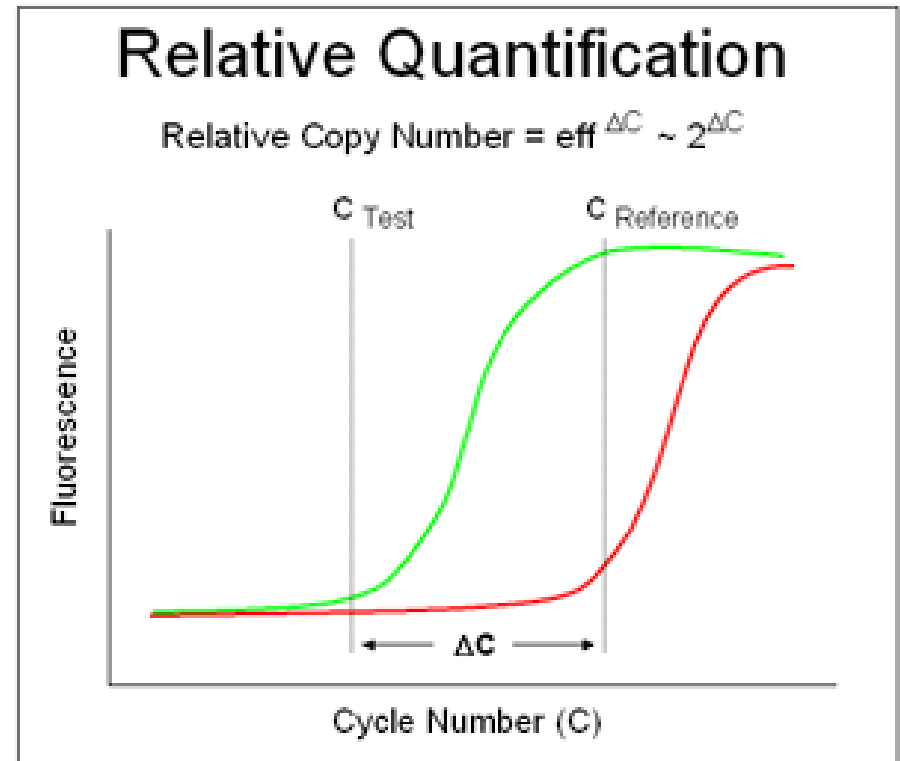
- Định tính gene (Giống PCR cổ điển)
 - Gene quan tâm có mặt trong mẫu thử hay không
- Định lượng gene (qPCR):
 - Dựa vào Ct:
 - Số lượng DNA ban đầu có trong mẫu
- Định lượng tuyệt đối:
 - Biết rõ số lượng của DNA quan tâm có trong mẫu là bao nhiêu (mẫu qua các thời kỳ khác nhau của bệnh) → virus HIV, v.v...
- Định lượng tương đối:
 - So sánh số lượng của gene quan tâm với gene tham chiếu từ đó đánh giá biểu hiện gene (mẫu thí nghiệm với mẫu control, v.v...)

Ứng dụng

Absolute Quantification Định Lượng Tuyệt Đối



Relative Quantification Định Lượng Tương Đối

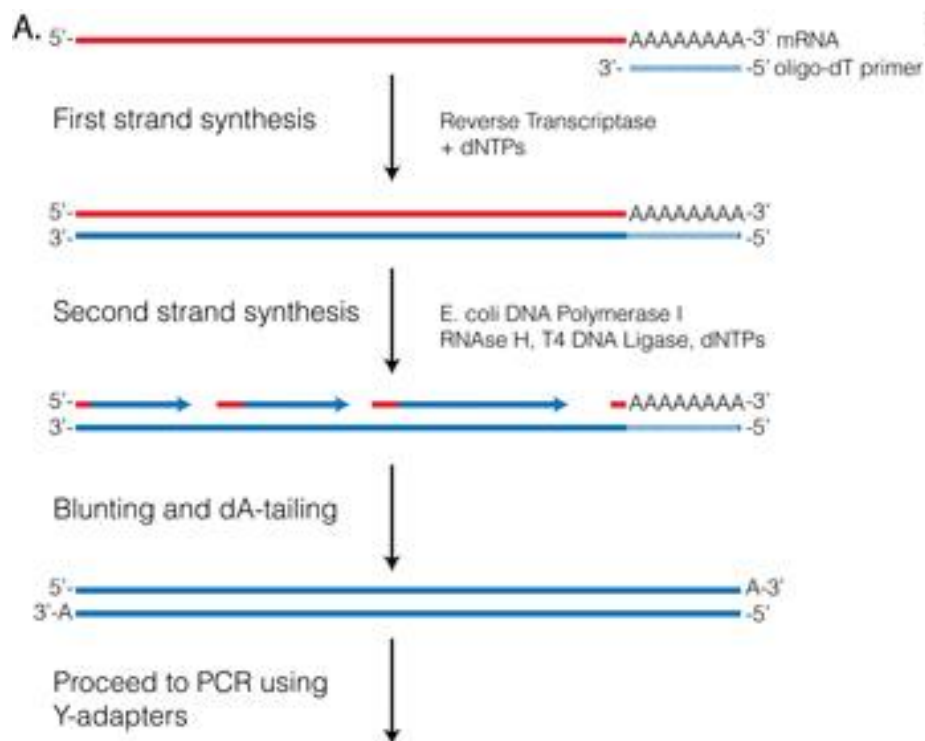


Phiên mã ngược

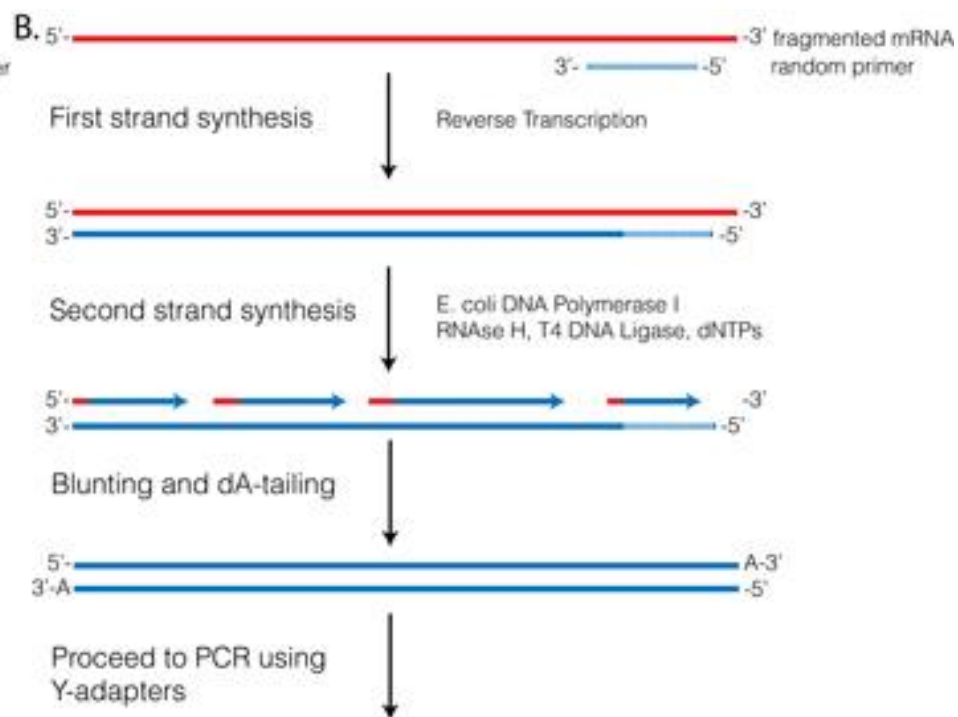
MỘT SỐ VẤN ĐỀ

- Định lượng một số virus, mRNA, nhưng PCR sử dụng DNA làm nguyên liệu bắt đầu???
- Biểu hiện gene → Tế bào điều hòa biểu hiện gene giai đoạn nào? Phiên mã? Dịch mã? Hậu phiên mã dịch mã???
- Cần phải chuyển hóa mRNA → DNA. Như thế nào?
 - mRNA → Tách chiết RNA
 - Phiên mã ngược thành DNA
 - Định lượng

Phiên mã ngược



- Đoạn trình tự ngắn bám vào đuôi A của mRNA
- Nếu mRNA không có đầu A sẽ không được khuếch đại?

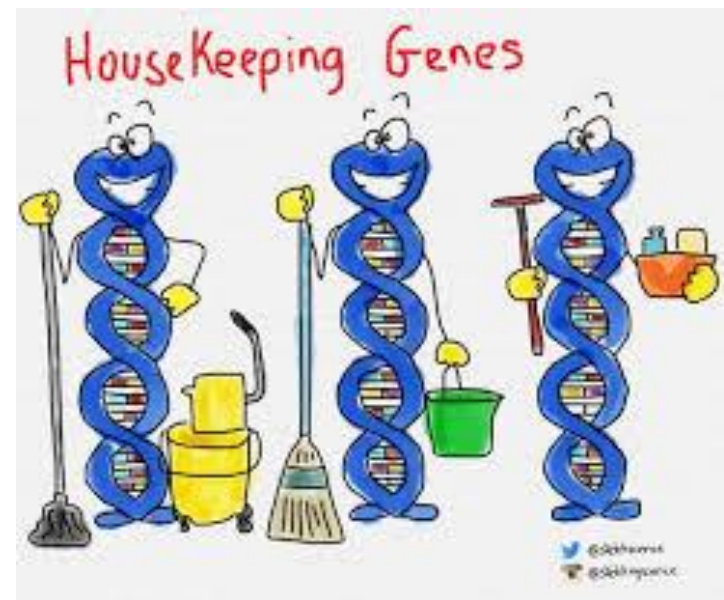


- Những đoạn trình tự tự do bám vào mRNA
- Có khả năng bám vào bất cứ chỗ nào trên mRNA → bao quát cao

qPCR = Realtime quantitative PCR một số lưu ý

- Làm thế nào để kết quả đáng tin và có ý nghĩa?
 - Điều kiện phản ứng đã được tối ưu hóa hay chưa và đồng nhất giữa những lần phản ứng?
 - Optimize
 - Đường tiêu chuẩn?
 - Efficiency value ~ 99%?
 - Gene tham chiếu?
 - Cùng lúc với gene quan tâm?

Gene tham chiếu = Gene giữ nhà?

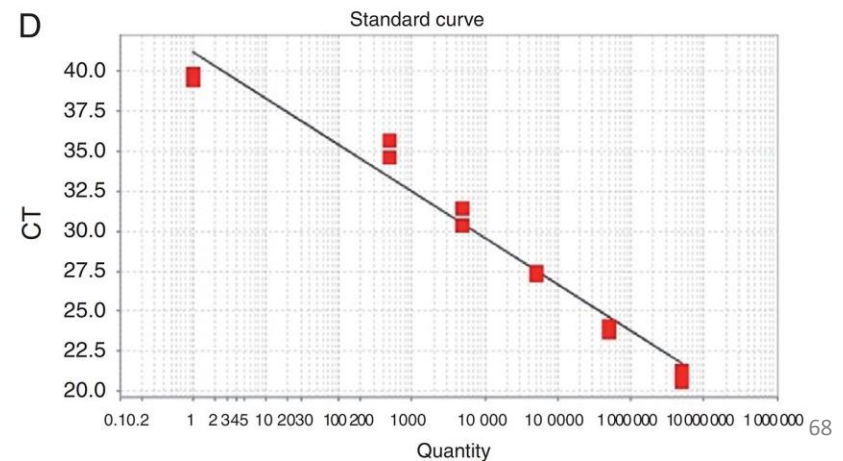
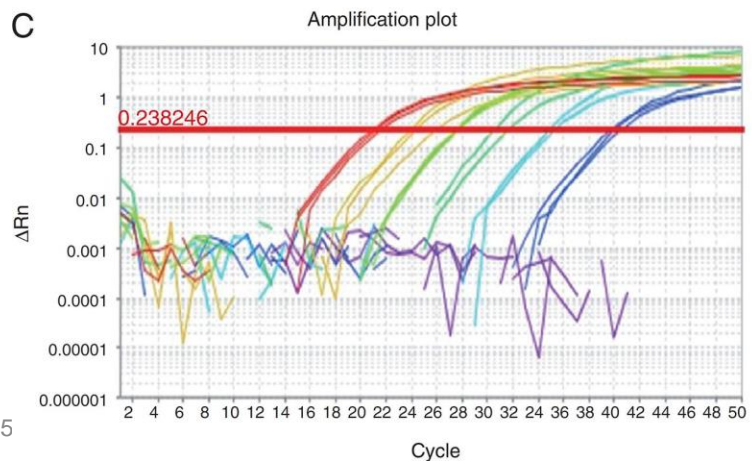
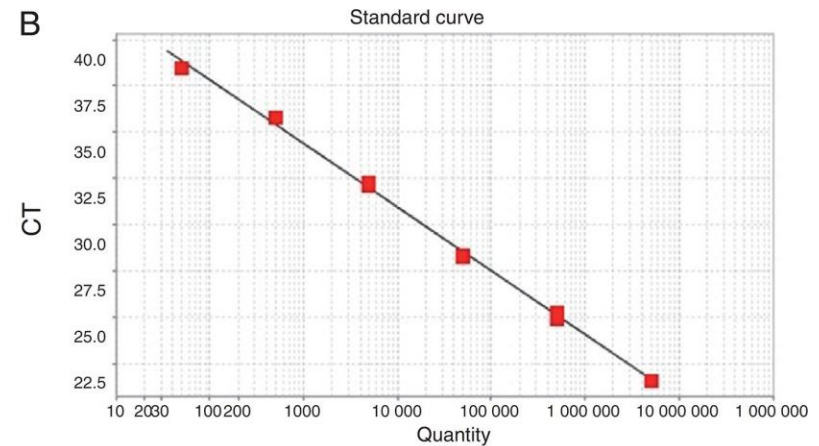
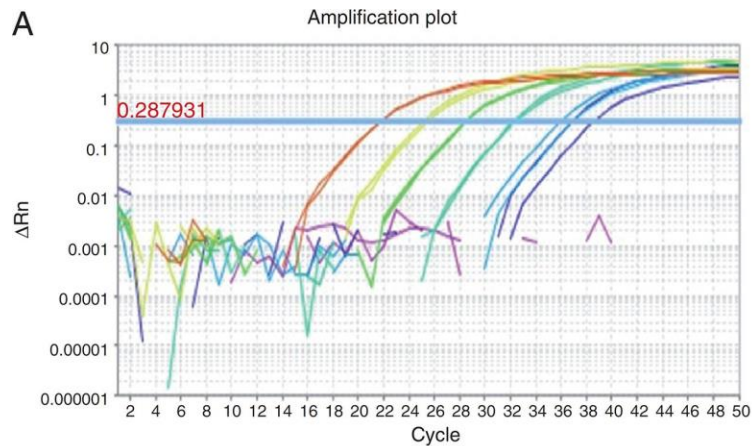


Gene name	Symbol
β -Globin region on chromosome 11	<i>HBB</i>
Phosphoglycerate kinase 1	<i>PGK1</i>
Ribosomal protein L4	<i>RPL4</i>
Large ribosomal protein P0	<i>RPLP0</i>
β -Actin	<i>ATCB</i>
Eukaryotic elongation factor 1 α 1	<i>EEF1A1</i>
Eukaryotic translation elongation factor 1 γ	<i>EEF1G</i>
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPD</i>
TATA box binding protein	<i>TBP</i>
β -2-Microglobulin	<i>B2M</i>
Succinate dehydrogenase complex A	<i>SDHA</i>
Muscleblind-like 2	<i>MBNL2</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i> chlorophyll A-B binding protein 2	<i>CAB</i>
28S Ribosomal RNA	<i>28S</i>
18S Ribosomal RNA	<i>18S</i>

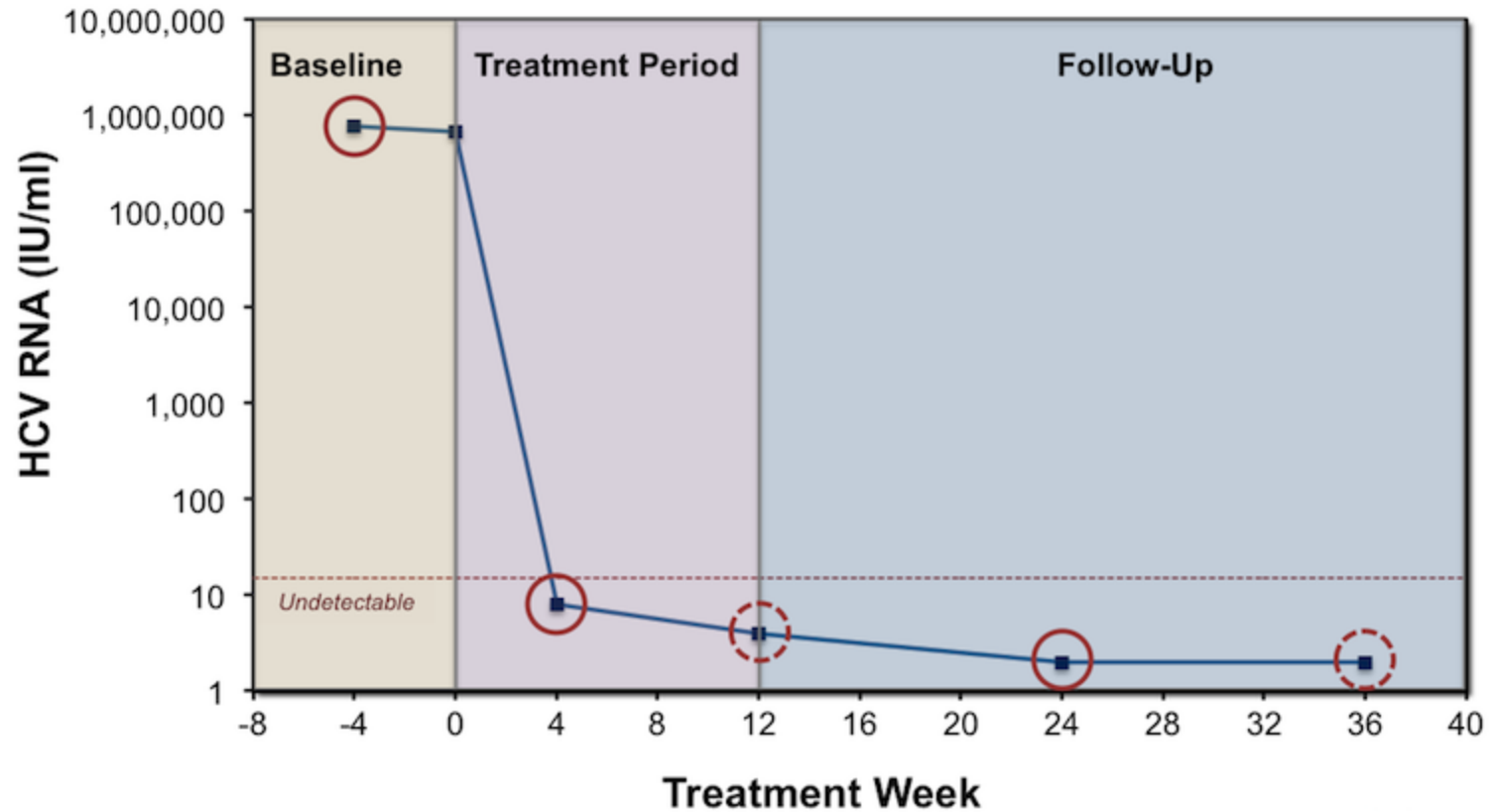
Kỹ thuật realtime PCR định lượng HCV theo nguyên lý đầu dò Taqman

- **Định lượng nồng độ virus trong máu** được khuyến cáo sử dụng trong chẩn đoán, điều trị bệnh nhân nhiễm HBV và HCV bởi tất cả các hiệp hội gan mật và truyền nhiễm trên thế giới. Tất cả các bệnh nhân tham gia điều trị bằng các phác đồ kháng virus HBV, HCV đều phải định lượng virus trước và trong quá trình điều trị để theo dõi đánh giá phác đồ điều trị và tiên lượng kết quả điều trị.
- **Định lượng virus → Định lượng tuyệt đối Realtime PCR (Absolute quantification)**
- Dựa vào tín hiệu huỳnh quang thu được của mẫu bệnh phẩm và các mẫu chuẩn, phần mềm sẽ tính toán ra **nồng độ ban đầu của vật chất di truyền trong mẫu thử** → Lượng virus trong mẫu (viral load = International Units per milliliter (IU/mL).) → Đánh giá điều trị → Kháng thuốc?

- Định lượng HCV-RNA sử dụng kỹ thuật Realtime PCR Taqman Probe nhằm xác định số bản copy của virus viêm gan C trong 1ml huyết tương của bệnh nhân nhiễm HCV.
- Mồi và probe được thiết kế trong vùng 5'UTR có tính bảo tồn cao của bộ gene HCV và khuếch đại một trình tự có kích thước 244 bp.



HCV RNA Monitoring in Patients Receiving Antiviral Therapy



Nghiên cứu biểu hiện gene



Step 1:
Isolate RNA



Step 2:
Design and
optimize primers



Step 3:
Reverse
transcription



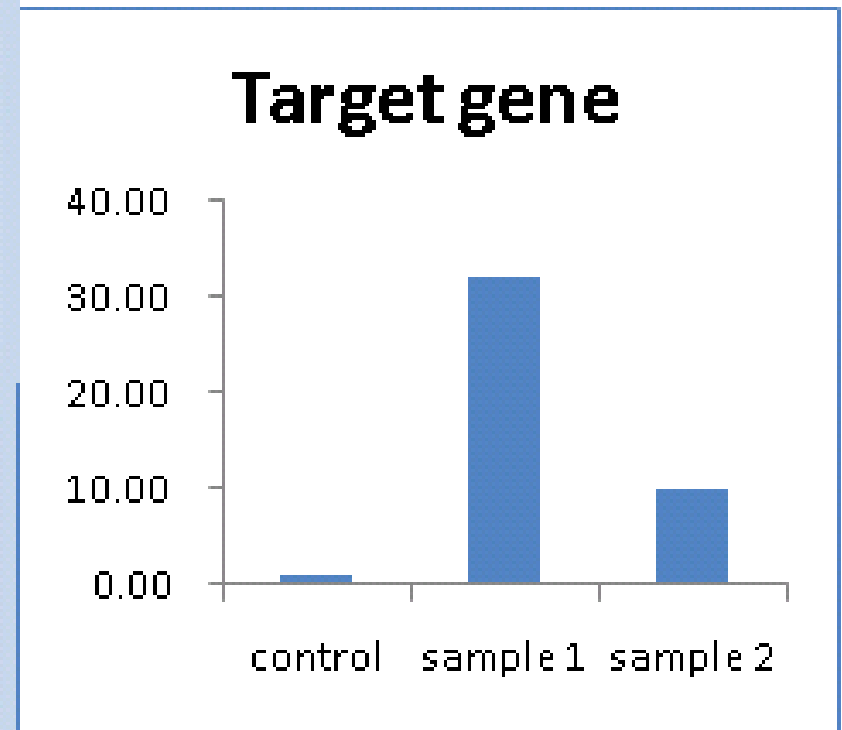
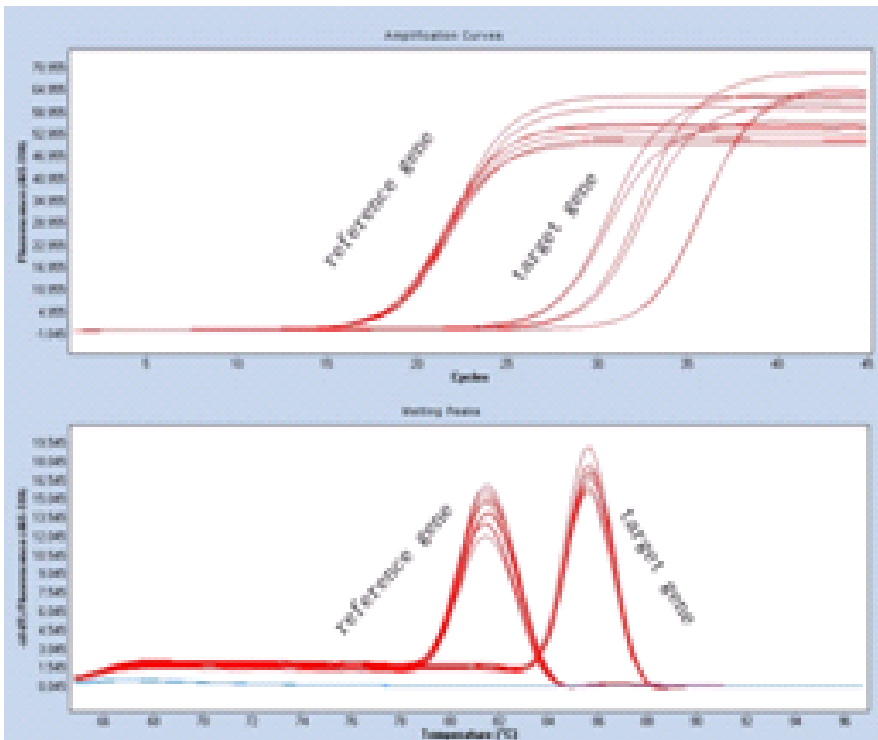
Step 4:
Amplify cDNA



Step 5:
Run qPCR



Step 6:
Analyze



So sánh realtime PCR với PCR thông thường

	PCR thông thường	Realtime PCR
Tổng quan	Đo lượng DNA tích lũy vào chu kỳ cuối	Đo lượng DNA khuếch đại lúc nó đang tiến hành
Định lượng?	Rất ít, chỉ có thể nhìn độ dày band mà đoán	Có khả năng định lượng dựa vào Ct
Ứng dụng	Ít	Nhiều
Sử dụng	Đơn giản, nhanh và đòi hỏi ít thời gian đào tạo	Phức tạp, đòi hỏi kỹ năng tay nghề cao để làm thí nghiệm và phân tích kết quả
Giá thành	Có thể rẻ hơn	Chi phí máy móc thiết bị cao

Một số câu hỏi

- PCR là kỹ thuật gì?
- PCR có thể dùng để chẩn đoán đột biến, đúng hay sai?
- Độ nhạy của PCR phụ thuộc vào cái gì?
- Độ đặc hiệu của PCR phụ thuộc vào cái gì?
- Trong chẩn đoán tác nhân gây bệnh truyền nhiễm, ưu điểm của Polymerase Chain Reaction (PCR) là gì?
- Làm thế nào để nhận định được kết quả PCR chính xác trên gel?
- Định lượng tuyệt đối Realtime-PCR dùng để làm gì?
- Định lượng tương đối Realtime PCR dùng để làm gì?
- Ưu/nhược điểm PCR thông thường so với Realtime PCR?



5. Một số câu hỏi trắc nghiệm

During "RNA processing" what takes place?

- a) all of the exons are removed and discarded
- b) the RNA molecule is made from a DNA template.
- c) introns are cut from the RNA and the exons are spliced together.
- d) the RNA molecule is translated into a protein molecule.

Which of these DNA fragments will have a higher melting temperature?

- a) GCATTGACCGGAGGGACT // CGTAACTGGCCTCCCTGA
- b) GGATTTCAATTACTTAAT //CCTAAAGTTAATGAATTA

How do miRNAs regulate gene expression?

- a) miRNAs bind to target mRNAs leading to degradation of the mRNA
- b) miRNAs bind to target promoters leading to degradation of the mRNA
- c) miRNA bind to target mRNAs leading to inhibition of the transcription
- d) miRNAs bind to target promoters leading to inhibition of the transcription
- e) miRNA bind to target mRNAs leading to inhibition of nuclear export
- f) A and B
- g) A and C
- h) B and C
- i) C and D

- **What would the generally expected effect on the PCR reaction be of adjustments that increase the temperature of the annealing phase and the length of the elongation phase?**

- a) Precision and yield will be reduced
- b) Precision will be reduced, but yield will be increased
- c) Precision will be increased, but yield will be reduced
- d) Precision and yield will be increased

- **What outcome would you least expect if the amount of template in a multiplex PCR fell significantly below the optimal amount?**

- a) Longer targets amplify poorly or fail to amplify
- b) Allelic drop out
- c) Increased yield
- d) Heterozygote imbalance

What would the expected effect be on a PCR reaction if the primers used were slightly shorter and more variable than the intended oligonucleotide sequences?

- a) The PCR reaction would not commence
- b) The PCR reaction would end after one cycle
- c) The reaction would generate a single short PCR product
- d) The reaction would yield a mixture of non-specific products

Realtime PCR is a method that is used for:

- a) forensic analysis of DNA.
- b) amplification of genomic DNA sequences.
- c) amplification of mRNA sequences.
- d) analysis of mRNA expression.

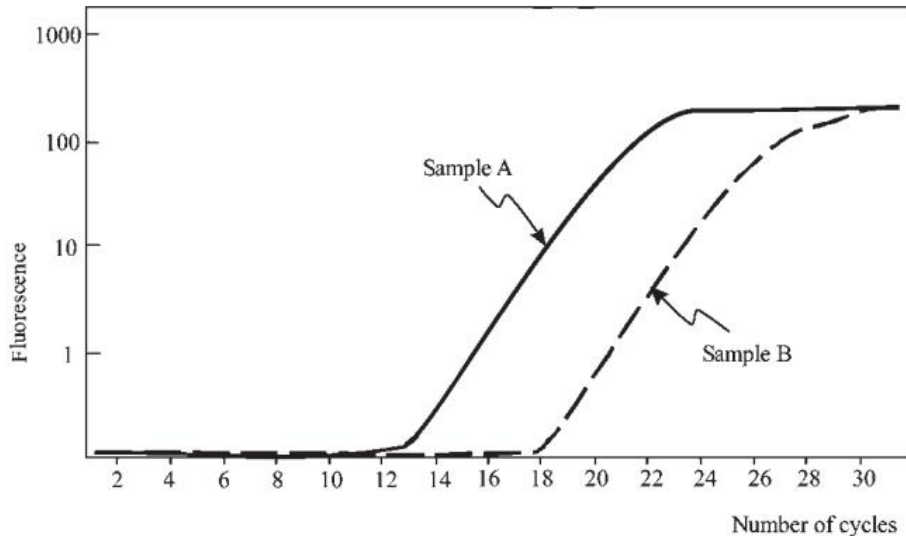


FIG. 2. Real-time PCR performed with a breast cancer (A) and a normal (B) genomic DNA sample from the same patient (details in the text).

Why fluorescence does not increase after cycle 30 in either samples?

- A. Because all primer molecules have been used
- B. Because all TaqMan probe molecules have been used.
- C. Because all template molecules have been used.
- D. A and B.
- E. A, B and C.

What happened to the HER2 gene in the breast tumor cells?

- A. Its copy number increased approximately 30-fold.
- B. Its copy number increased approximately 5-fold,
- C. Its copy number decreased approximately 30-fold,
- D. Its copy number decreased approximately 5-fold,
- E. Its expression decreased approximately 5-fold

Giai đoạn phiên mã ngược trước khi chạy Realtime PCR cần phải xử lý mẫu với enzyme Dnase, tại sao?

- a) Enzyme DNase ly giải DNA làm ảnh hưởng đến sự toàn vẹn và tổng số DNA thu được
- b) Enzyme Dnase ly giải DNA tạp trong mẫu để tránh làm nhiễu kết quả Realtime PCR
- c) Enzyme DNase ly giải RNA làm ảnh hưởng đến sự toàn vẹn và tổng số DNA thu được
- d) Enzyme Dnase ly giải RNA tạp trong mẫu để tránh làm nhiễu kết quả Realtime PCR

Realtime PCR làm được những gì mà PCR cổ điển không thể?

- a) Xác định được độ dài của đoạn DNA đích
- b) Xác định được nhiều đoạn DNA đích
- c) Định tính DNA
- d) Định lượng DNA

THE END

Any questions?