

# Giải đáp thắc mắc sinh học phân tử

STT	TÊN BÀI	NỘI DUNG CÂU HỎI	NỘI DUNG HƯỚNG DẪN GIẢI ĐÁP															
1	Kỹ thuật Realtime PCR	Thầy cô giúp em phân biệt lại định lượng tuyệt đối và định lượng tương đối của Real Time PCR	<p>Trong qPCR có 2 phương pháp định lượng tuyệt đối và định lượng tương đối:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Giống nhau: đều là realtime PCR (bao gồm nhiều thứ)</li> <li>-Khác nhau:</li> </ul> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiêu chí khác nhau cơ bản</th> <th>Realtime PCR định lượng tuyệt đối</th> <th>Realtime PCR định lượng tương đối</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Đối tượng mục tiêu muốn đo đạc</td> <td>Thường là VSV hoặc các DNA mà trong cơ thể đối tượng quan tâm không hiện diện trong điều kiện sinh lý</td> <td>Thường là các đoạn gene mà trong cơ thể có biểu hiện ở một mức độ nào đó trong điều kiện sinh lý</td> </tr> <tr> <td>Kết quả đo</td> <td>Nồng độ tác nhân cụ thể (thường là copies/mL; mIU/mL)</td> <td>Một tỷ lệ (so với gene tham chiếu)</td> </tr> <tr> <td>Thiết kế kỹ thuật</td> <td>Cần đường chuẩn</td> <td>Cần gen tham chiếu (reference gene, house-keeping gene) hoặc tác nhân chuẩn (calibrator)</td> </tr> <tr> <td>...</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Tiêu chí khác nhau cơ bản	Realtime PCR định lượng tuyệt đối	Realtime PCR định lượng tương đối	Đối tượng mục tiêu muốn đo đạc	Thường là VSV hoặc các DNA mà trong cơ thể đối tượng quan tâm không hiện diện trong điều kiện sinh lý	Thường là các đoạn gene mà trong cơ thể có biểu hiện ở một mức độ nào đó trong điều kiện sinh lý	Kết quả đo	Nồng độ tác nhân cụ thể (thường là copies/mL; mIU/mL)	Một tỷ lệ (so với gene tham chiếu)	Thiết kế kỹ thuật	Cần đường chuẩn	Cần gen tham chiếu (reference gene, house-keeping gene) hoặc tác nhân chuẩn (calibrator)	...		
Tiêu chí khác nhau cơ bản	Realtime PCR định lượng tuyệt đối	Realtime PCR định lượng tương đối																
Đối tượng mục tiêu muốn đo đạc	Thường là VSV hoặc các DNA mà trong cơ thể đối tượng quan tâm không hiện diện trong điều kiện sinh lý	Thường là các đoạn gene mà trong cơ thể có biểu hiện ở một mức độ nào đó trong điều kiện sinh lý																
Kết quả đo	Nồng độ tác nhân cụ thể (thường là copies/mL; mIU/mL)	Một tỷ lệ (so với gene tham chiếu)																
Thiết kế kỹ thuật	Cần đường chuẩn	Cần gen tham chiếu (reference gene, house-keeping gene) hoặc tác nhân chuẩn (calibrator)																
...																		
2	Kỹ thuật PCR cổ điển	Bộ môn cho em hỏi là tại sao khi làm PCR mình không tạo ra được sản phẩm có chiều dài bằng nhau mà phải tạo ra các sản phẩm có chiều dài ngắn khác nhau vậy ạ? Em cảm ơn	Câu hỏi thể hiện SV hiểu sai: nếu PCR cổ điển chỉ dùng 1 cặp primer, sản phẩm PCR là các đoạn polynucleotid có chiều dài bằng nhau. Nếu PCR đa môi thì mới có các sản phẩm khác nhau, tương ứng với các đoạn môi khác nhau.															
3	Kỹ thuật PCR	Thầy/ Cô có thể giải thích rõ giúp em cơ chế dùng kỹ thuật PCR trong tìm đột biến lặp đoạn và đảo đoạn với ạ. Em cảm ơn	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. PCR cổ điển không có ưu thế trong việc phát hiện đột biến đảo đoạn hoặc lặp đoạn.</li> <li>2. SV hãy đọc kỹ nguyên lý của PCR để hiểu mâu chốt giúp phát hiện các sai khác trên vùng gen quan tâm là dựa vào <b>sự bắt cặp đặc hiệu của đoạn môi với vùng gen này.</b></li> </ol>															

			<p>Do đó: nếu vùng gen này có đột biến lặp đoạn thì sẽ tạo ra 1 sản phẩm dài hơn sản phẩm nếu vùng gen không bị lặp đoạn.</p> <p>Còn nếu vùng đảo đoạn nằm lọt bên trong vùng bắt cặp của cặp mồi thì không thể phát hiện được bằng PCR cổ điển, lúc đó, cần thêm 1 số kỹ thuật phụ trợ khác.</p> <p>Ngoài ra, nếu đoạn bị đảo hoặc lặp quá dài sẽ vượt quá hiệu suất của polymerase, làm cho hiệu suất PCR cổ điển kém.</p> <p>Vì thế, nếu nghi ngờ có đột biến đảo hoặc lặp đoạn, người ta sẽ dùng kỹ thuật khác.</p>
4	Kỹ thuật PCR	Bắt cặp đặc hiệu và không đặc hiệu là sao vậy ạ?	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. “Bắt cặp” ở đây hiểu là bắt cặp nucleotid theo nguyên tắc bổ sung đôi base: A với T, C với G.</li> <li>2. “Đặc hiệu” hay “không đặc hiệu” đang ám chỉ sản phẩm tạo thành có phải sản phẩm mà thiết kế kỹ thuật kỳ vọng hay không.</li> </ol> <p>-Nếu cặp mồi bắt cặp đúng vào vùng gen muốn khuếch đại → tạo ra đúng sản phẩm mong muốn → Bắt cặp đặc hiệu</p> <p>-Nếu cặp mồi (1) bắt cặp vào 1 vùng gen khác vùng gen muốn khuếch đại, hoặc (2) cặp mồi tự bắt cặp với nhau → sẽ tạo ra các sản phẩm không mong muốn → bắt cặp không đặc hiệu.</p>
5	Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ	Dạ thầy có thể phân tích rõ hơn về kỹ thuật Fish k ạ?	<p>Kỹ thuật FISH là một loại kỹ thuật lai phân tử, được xây dựng dựa trên nguyên tắc bắt cặp bổ sung đặc hiệu, sử dụng một đoạn dò (probe) đặc hiệu được tổng hợp, có gắn tính hiệu huỳnh quang, cho bắt cặp với một vùng gen đích quan tâm.</p> <p>Cái đặc trưng của kỹ thuật FISH là tiến hành trên mẫu mô hoặc tế bào đã qua một số xử lý.</p>
6	Kỹ thuật giải tự gen	Đoạn DNA nhỏ nhất sẽ chạy xa nhất trên gel, nên khi đọc trình tự chuỗi trên gel sẽ đọc từ dưới lên theo chiều 5'-3'. câu này là sao ạ em đọc không hiểu lắm, sách shtp đầu trang 49 ạ.	<p>Trong quy trình giải trình tự Sanger, sau khi kết thúc các phản ứng giải trình tự với ddNTP, sẽ tạo thành các đoạn DNA có chiều dài khác nhau. Tiếp theo, các đoạn DNA này sẽ được đem đi điện di, nguyên tắc kỹ thuật điện di sẽ là di chuyển từ cực âm sang cực dương, DNA càng dài sẽ di chuyển càng chậm. Như vậy nếu sản phẩm DNA chỉ có 1 Nucleotide sẽ di chuyển nhanh nhất và nằm ở phía cuối của miếng gel điện di, và tương ứng là Nucleotide đầu tiên ở đầu 5'. Do đó, khi đọc kết quả chúng ta sẽ đọc từ phía cuối miếng gel lên đầu các giếng.</p>
7	Nguyên lý chung kỹ thuật SHPT	cho em hỏi tại sao sử dụng chất chống đông không chính xác thì gây âm tính	<p>Trong thực hành lâm sàng, mẫu máu toàn phần/huyết tương thường được sử dụng cho kỹ thuật sinh học phân tử. Tuy nhiên, chỉ có một vài chất chống đông</p>

		giả a. còn chất chống đông chính xác thì sao a.	phù hợp cho kỹ thuật SHPT, ví dụ: EDTA, citrate, do không ức chế hay làm ảnh hưởng đáng kể đến các kỹ thuật. Ngược lại, một số chất như heparin sẽ làm ức chế phản ứng PCR, dẫn đến hiệu quả PCR kém hoặc bị ức chế hoàn toàn dẫn đến khả năng âm tính giả cao.
8	Kỹ thuật PCR	Dạ thầy ơi, cho em hỏi là nếu độ đặc hiệu trong PCR là khả năng gắn kết hoàn toàn của môi với phân trình tự bổ sung trên DNA, vậy thì độ nhạy của PCR sẽ được quy ước như thế nào vậy ạ	Độ nhạy của phản ứng PCR được dựa vào nồng độ tác nhân đích quan tâm có trong mẫu, ví dụ: kỹ thuật nuôi cấy vi sinh cần có tối thiểu 100X các tác nhân đích có trong mẫu mới thực hiện được kỹ thuật, trong khi đó kỹ thuật SHPT chỉ cần 1X nồng độ tác nhân đích đã có thể phát hiện thông qua PCR, lúc này chúng ta kết luận kỹ thuật PCR có độ nhạy cao hơn.
9	Kỹ thuật Realtime PCR	Em chào thầy cô ạ. Thầy cô cho em hỏi trong kỹ thuật PCR định lượng thời gian thực thì mình có cần phải lưu ý giai đoạn của bệnh khi đang lấy mẫu thử không ạ. Và em không rõ trong các bệnh về đột biến số lượng NST thì mình có thể ứng dụng kỹ thuật PCR không ạ do em nghĩ khuếch đại số lượng bản sao DNA. Em cảm ơn ạ.	-Trong kỹ thuật PCR định lượng thời gian thực giai đoạn của bệnh có vai trò ảnh hưởng đến kết quả cuối cùng của kỹ thuật. Ví dụ xét nghiệm Covid, giai đoạn ủ bệnh có thể diễn tiến đến 14 ngày, theo đó, số lượng bản sao của siêu vi sẽ tăng dần lên, do đó bệnh nhân cần phải được thực hiện xét nghiệm ít nhất 2-3 lần trong 14 ngày này để tránh bỏ sót bệnh. -Chẩn đoán đột biến số lượng NST không phải là ưu thế của PCR, vì (1) PCR cổ điển chỉ chẩn đoán có hay không có vùng gen quan tâm hay không thôi, không cho biết được số lượng. (2) qPCR thì chỉ cho biết số copy của vùng gen chứ không cho biết bội số theo số lượng. Để chẩn đoán số lượng NST, thường dùng kỹ thuật lai huỳnh quang hoặc NST đồ.
12	Kỹ thuật Realtime PCR	Dạ trong PP realtime PCR, em có tìm hiểu thêm có HEX và FAM ạ, có phải 2 chất này là đầu dò hay là chất nhuộm ạ, tại e cũng tìm hiểu nhưng chưa tìm thấy tài liệu nào nói rõ 2 chất này lắm ạ	Trong kỹ thuật Realtime PCR, HEX và FAM là 2 kênh màu được quy định bởi tính chất của đầu dò. HEX và FAM chỉ là 2 cái tên đại diện do 2 màu sắc khác nhau được biểu hiện ở 2 bước sóng nhất định (vật lý: màu ánh sáng được quy định bởi bước sóng).
13	Kỹ thuật PCR cổ điển	Dạ e có thắc mắc về điện di ạ, cụ thể là tốc độ điện di ngoài khối lượng DNA, chiều dài DNA ra thì có thứ gì ảnh hưởng đến nó nữa k ạ, như gel dùng điện di như arogele hay dd đệm hay cường độ dòng điện các kiểu ấy ạ	Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến tốc độ điện di: chiều dài đoạn DNA, nồng độ gel, cường độ dòng điện, tính chất gel... Do đó, khi thực hiện kỹ thuật tùy theo yêu cầu và kết quả mong muốn đạt được mà chúng ta sẽ tối ưu hóa điều kiện phản ứng.