



Polymerase Chain Reaction

Bài giảng Y3

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

drnguyenminhha@gmail.com

BM Hóa Sinh – SHPT Y học – Trường ĐH Y PNT

NỘI DUNG

1. Nguyên lý của kỹ thuật PCR

- Bản chất của kỹ thuật PCR
- Ý nghĩa từng thành tố trong PCR
- Các giai đoạn của PCR
- Hiện thị KQ phản ứng PCR

2. Cách đọc KQ một thử nghiệm thực hiện bằng KT PCR

3. Các loại PCR phổ biến

4. Ứng dụng của PCR



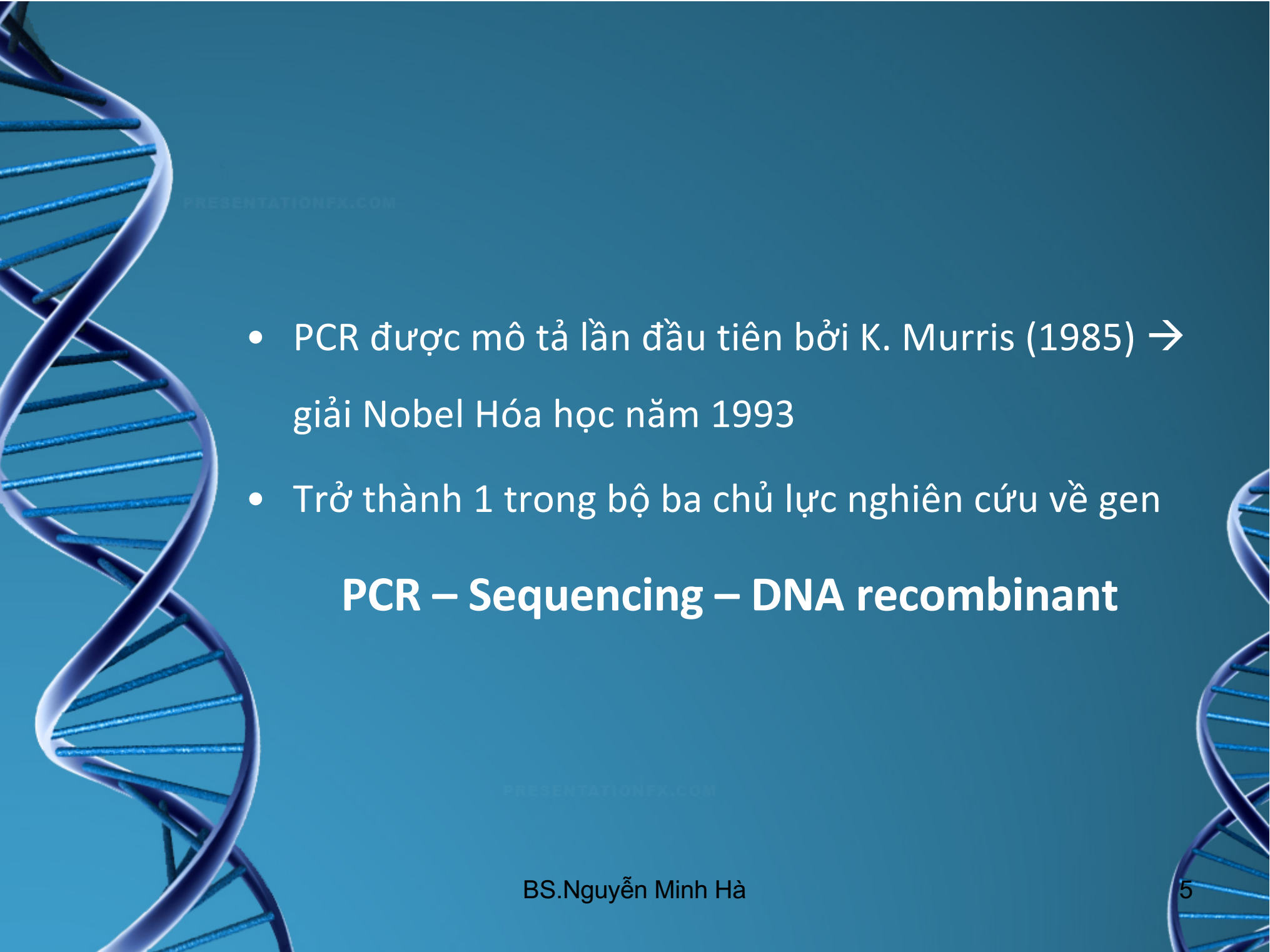
Tài liệu học tập

1. Sách bài giảng Sinh học phân tử của bộ môn HS-SHPT (lưu hành nội bộ)
2. Polymerase Chain Reaction (PCR). National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine.



NHU CẦU TỪ THỰC TẾ

- Nghiên cứu 1 đoạn DNA cụ thể
 - Cần tạo ra một lượng lớn đoạn DNA quan tâm
- Một kỹ thuật tiện lợi để khuếch đại 1 đoạn DNA quan tâm

- 
- PCR được mô tả lần đầu tiên bởi K. Murriss (1985) → giải Nobel Hóa học năm 1993
 - Trở thành 1 trong bộ ba chủ lực nghiên cứu về gen

PCR – Sequencing – DNA recombinant



Một số thuật ngữ

- Nhân bản, khuếch đại gen (polymerization, amplification)
- DNA đích, DNA khuôn (template)
- Chuỗi đơn, chuỗi đôi (chuỗi kép)
- Đoạn mồi (Primer)
- Sản phẩm PCR (PCR product)
- Chu kỳ nhiệt (thermal cycle)
- Biến tính, bắt cặp, kéo dài chuỗi
- Mẫu chứng (control)

NỘI DUNG

1. Nguyên lý của kỹ thuật PCR

- Bản chất của kỹ thuật PCR
- Các giai đoạn của PCR
- Ý nghĩa từng thành tố trong PCR
- Hiện thị KQ phản ứng PCR

2. Cách đọc KQ một thử nghiệm thực hiện bằng KT PCR

3. Các loại PCR phổ biến

4. Ứng dụng của PCR



PRESENTATIONFX.COM

NGUYÊN LÝ CỦA PCR

PRESENTATIONFX.COM

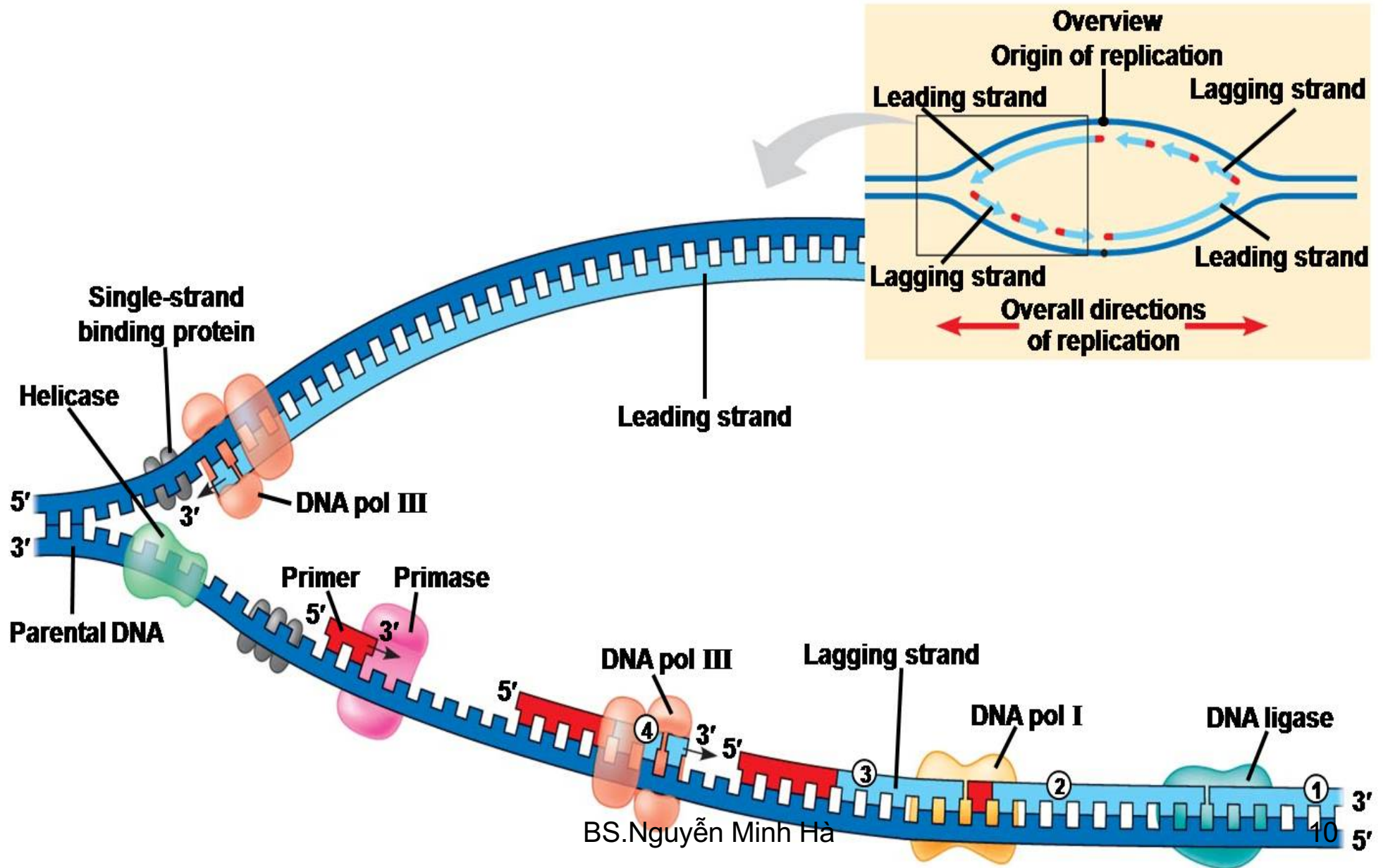
BS.Nguyễn Minh Hà

- Là phản ứng khuếch đại số lượng 1 đoạn acid nucleic (thường là DNA) xác định *in vitro*



- Mô phỏng quá trình nhân đôi của DNA trong tế bào

DNA Replication



Đoạn mồi (primer)

5' ...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'
3' ...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

5' ...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'
3' CCACTTGCACCTACTTCAAC 5'

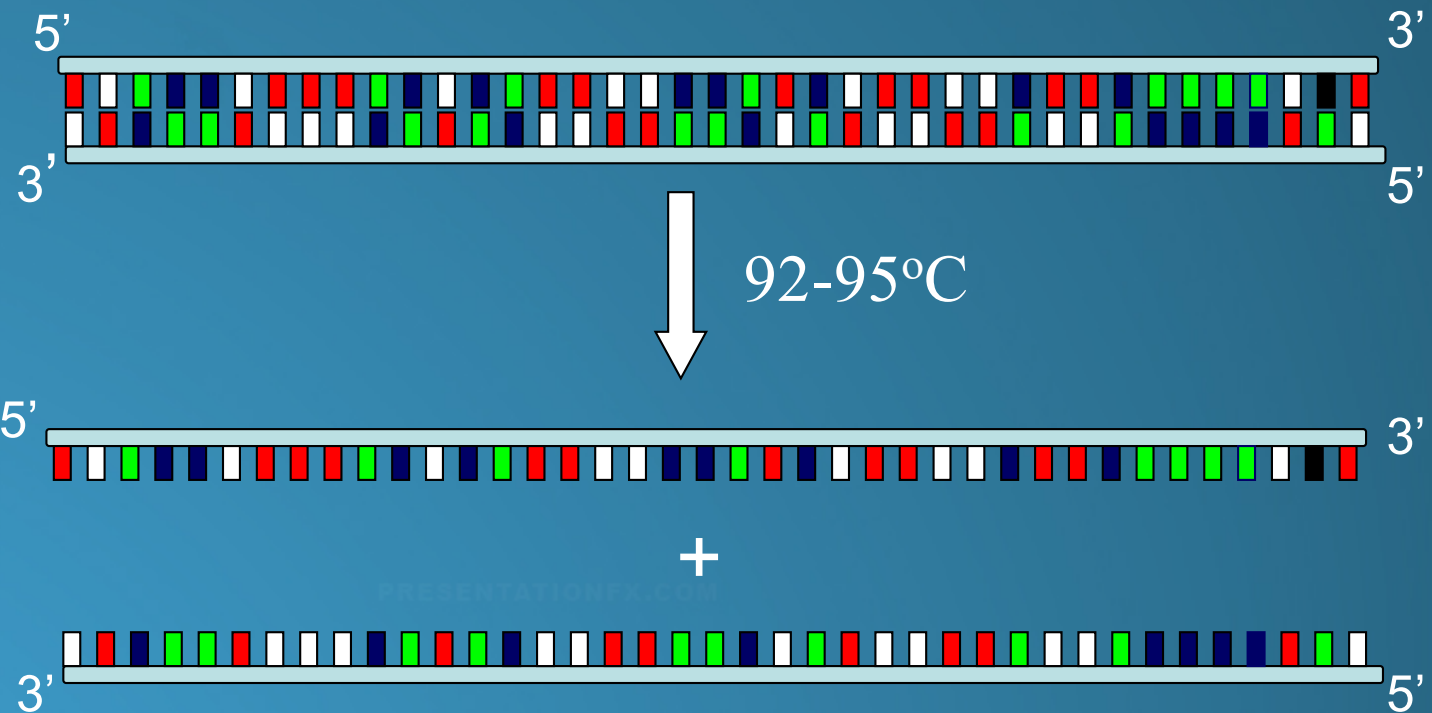
5' ACACAACTGTGTTCACTAGC 3'
3' ...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

- Là đoạn acid nucleic ngắn, được thiết kế sẵn
- Bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung đôi base với DNA đích
- Được DNA polymerase kéo dài để hình thành chuỗi đơn mới
- 1 cặp mồi gồm 2 đoạn mồi xuôi (forward primer) và mồi ngược (reverse primer) cho 2 mạch đơn 3'-5- và 5'-3'
- Độ đặc hiệu của cặp mồi thể hiện tính đặc hiệu về kỹ thuật của PCR.

Các giai đoạn của PCR

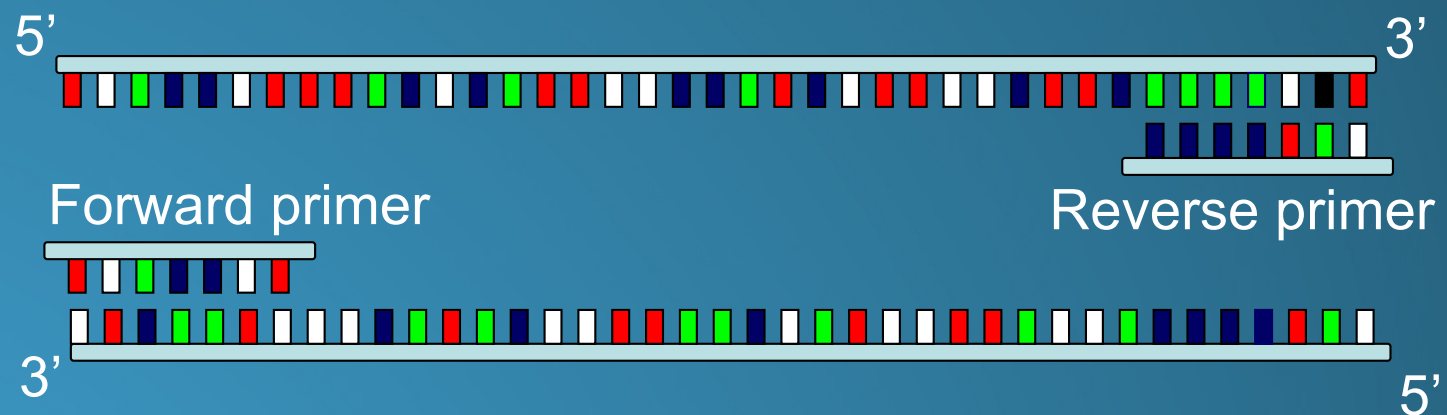
1. Biến tính: 92 – 95°C

–DNA đích (sợi đôi) biến tính bởi nhiệt độ, duỗi xoắn thành 2 sợi DNA đơn



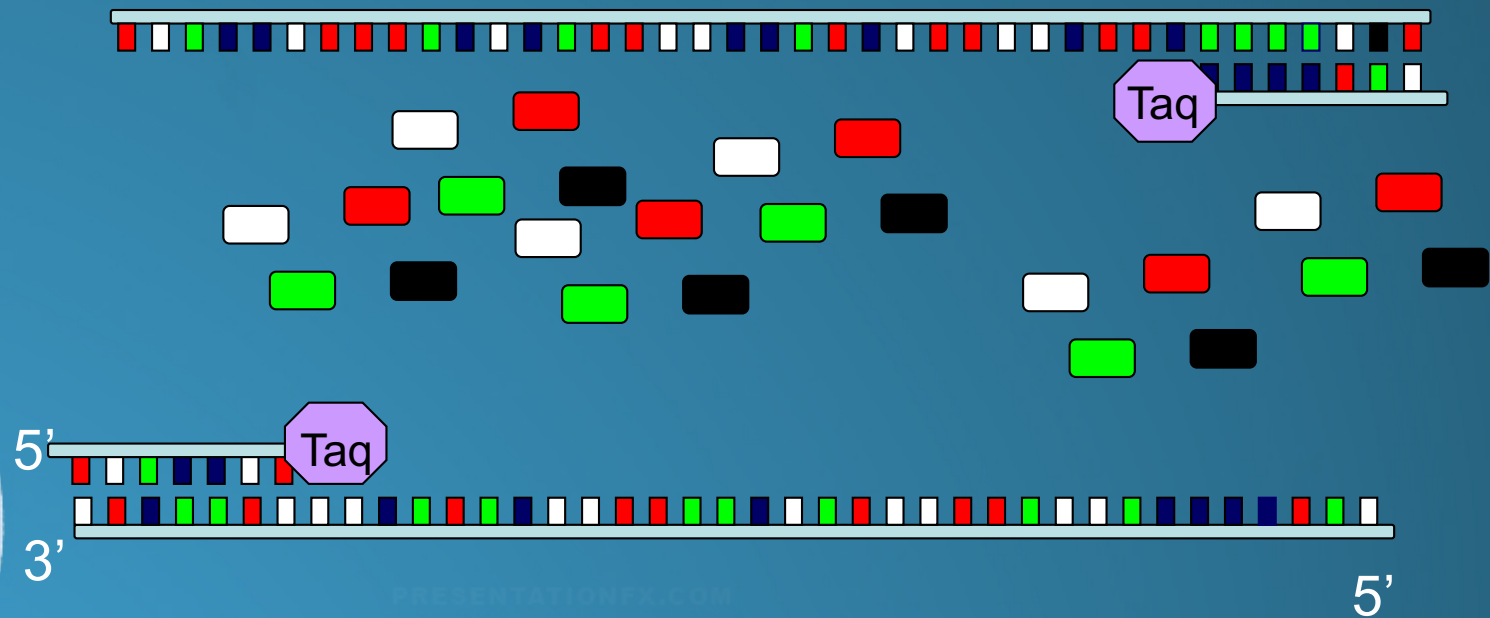
2. Bắt cặp mồi:

- Các đoạn mồi bắt cặp vào đoạn trình tự đặc hiệu trên DNA sợi đơn
- Th của đoạn mồi được tính toán dựa trên trình tự nucleotid của đoạn DNA đích



3. Kéo dài chuỗi: 70-72°C

–DNA polymerase bám vào vị trí đoạn mồi-DNA đích và kéo dài chuỗi từ đầu 3'



A 5' ...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'
 3' ...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

↓ 95°C

B 5' ...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'
 3' ...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

↙ các mồi (30-65°C)

C 5' ...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'
 3' CCACTTGCACCTACTTCAAC 5'

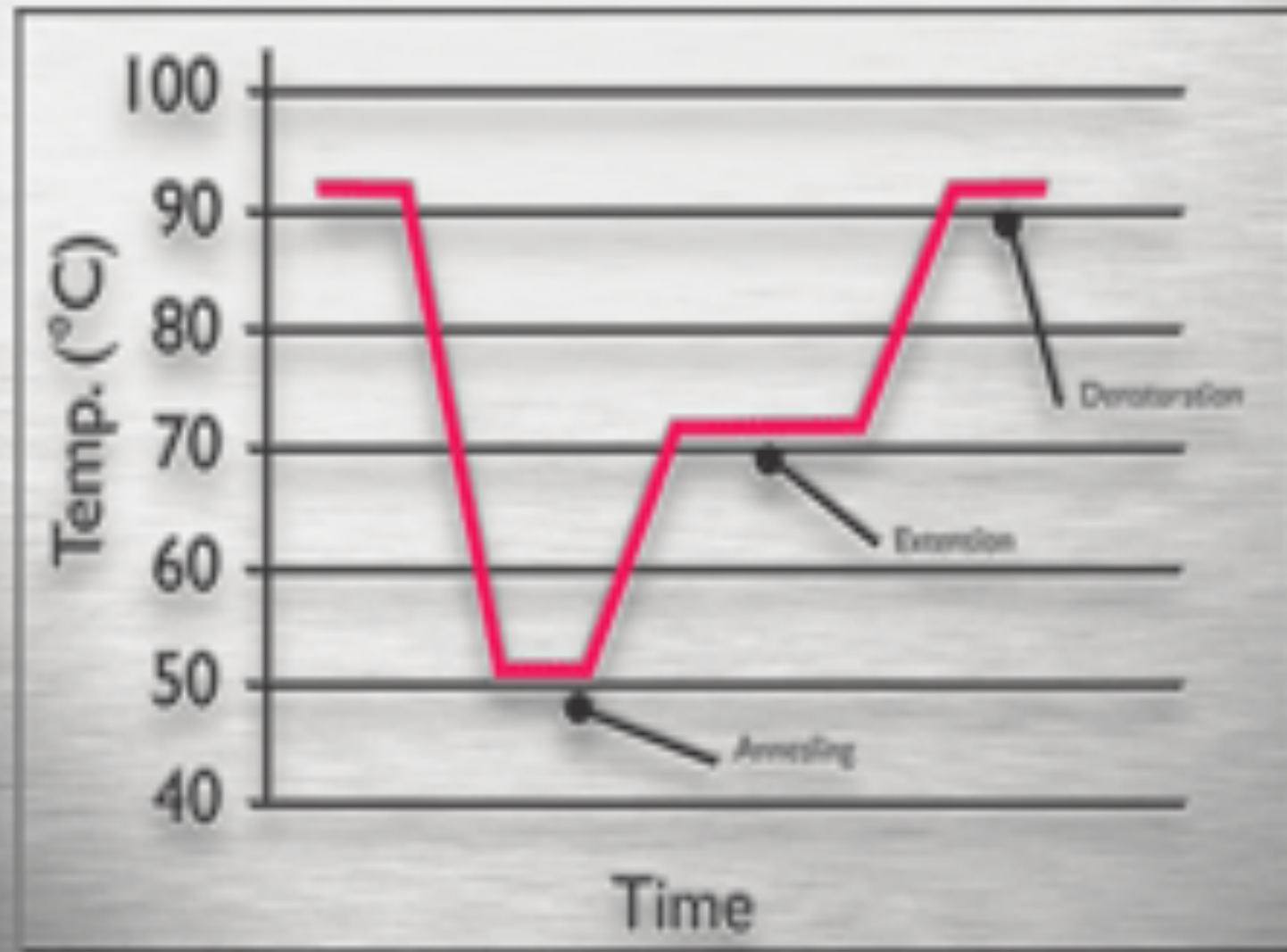
5' ACACAACTGTGTTCACTAGC 3'
 3' ...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

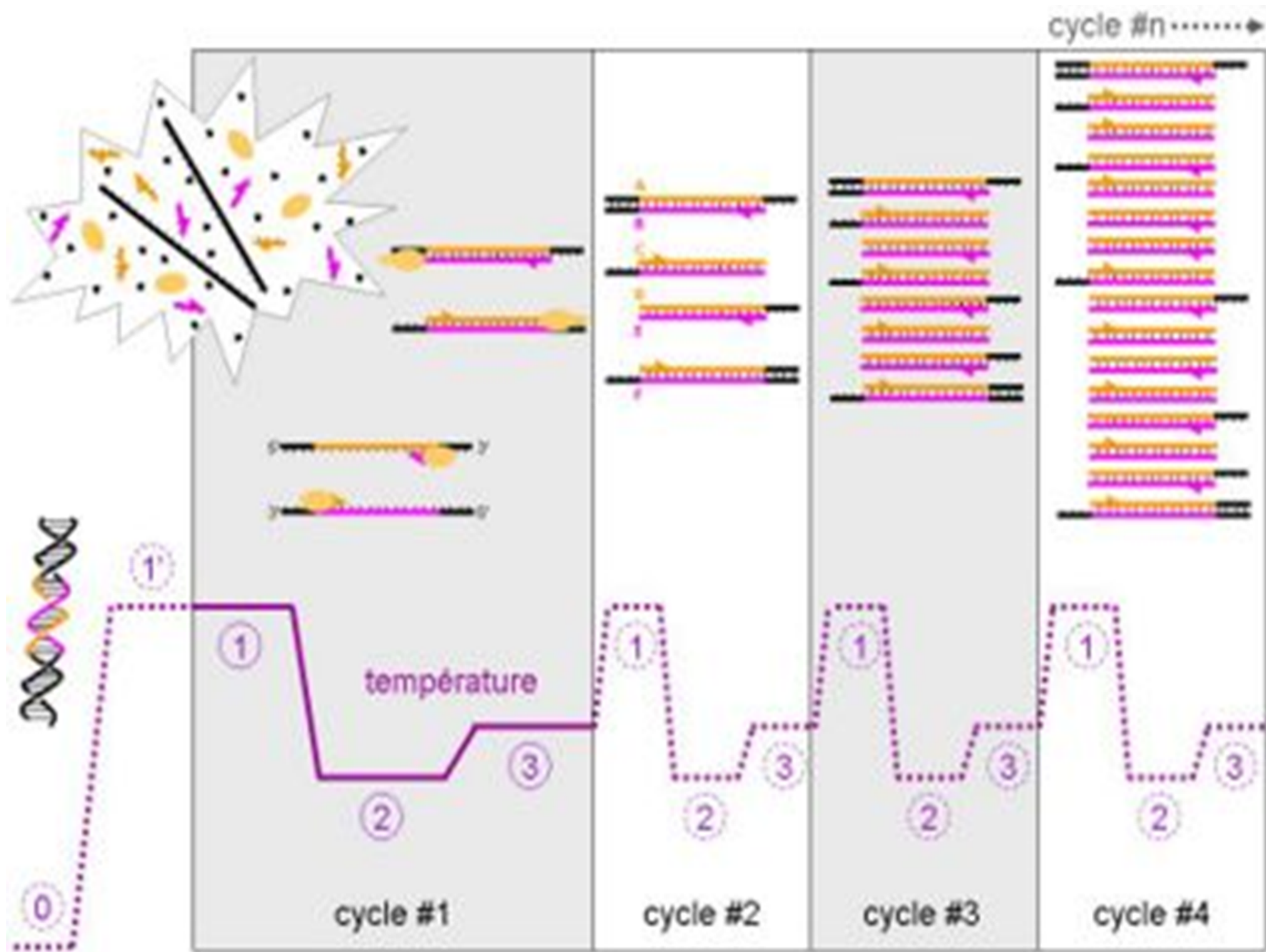
↙ dNTPs + polymérase (65-75°C)

D 5' ...CTGACACAACTGTGTTCACTAGCAA.....AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG...3'
 3' ...TTCCACTTGCACCTACTTCAAC 5'

5' ACACAACTGTGTTCACTAGCAA 3'
 3' ...GACTGTGTTGACACAAGTGATCGTT.....TTCCACTTGCACCTACTTCAACCAC...5'

Chu trình nhiệt PCR





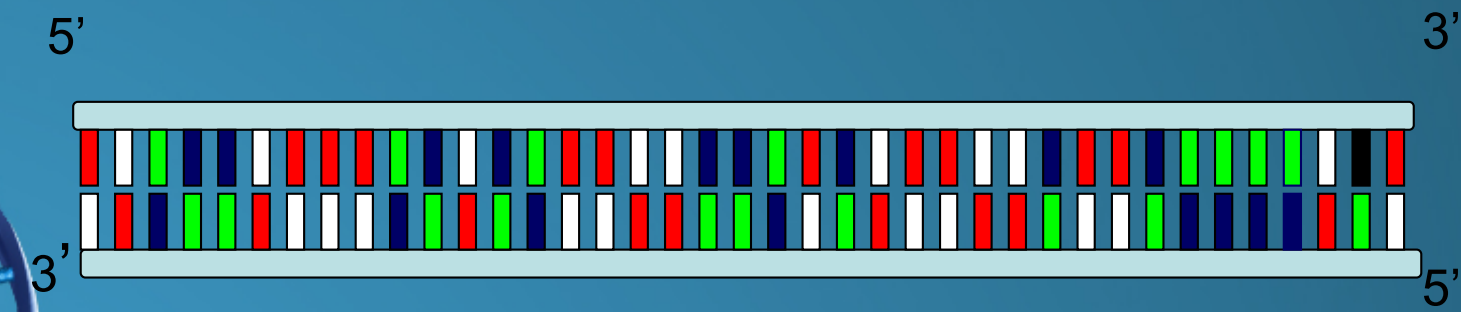
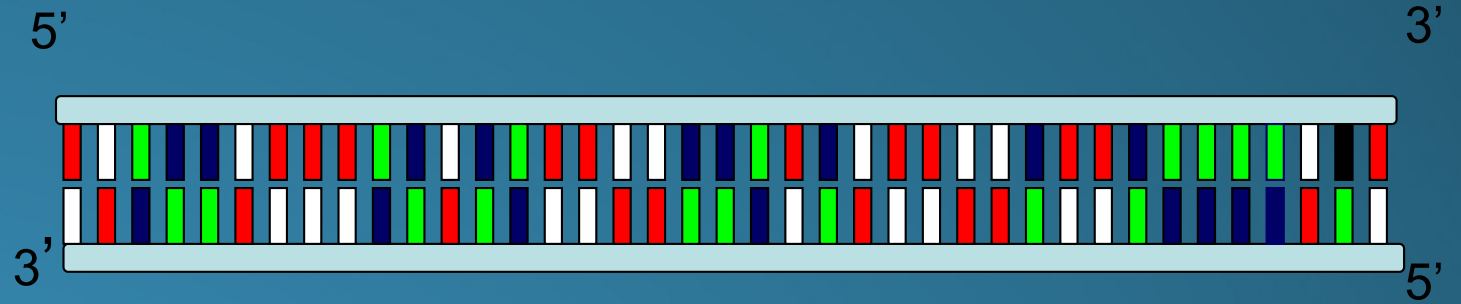
Ý nghĩa của các thành tố trong PCR

Thành tố	Ý nghĩa
DNA đích	DNA sợi đơn, là DNA bộ gen/plasmid
Đoạn mồi	Là 1 đoạn DNA sợi đơn, bổ sung với DNA đích
dNTP	dATP, dTTP, dCTP, dGTP
Polymerase	Kéo dài chuỗi DNA mới thành lập <i>Taq (Thermus aquaticus), Tli (Thermococcus lithoralis), Pfu (Pyrococcus furiosus),....</i>
MgCl ²⁺	Thúc đẩy sự bắt cặp của DNA đích-đoạn mồi, Ổn định phức hợp DNA đích-đoạn mồi-polymerase
Chu trình nhiệt	94°C biến tính và tách DNA thành sợi đơn 30° – 65°C bắt cặp đoạn mồi – DNA đích 65° – 75°C kéo dài chuỗi DNA do polymerase
Công thức nhiệt	$T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ $T_h = T_m - 5^\circ\text{C}$ <i>melting temperature</i> <i>18</i> <i>hybridization temperature</i>

Kết thúc 1 chu kỳ

PRESENTATIONFX.COM

Taq



PRESENTATIONFX.COM

Taq

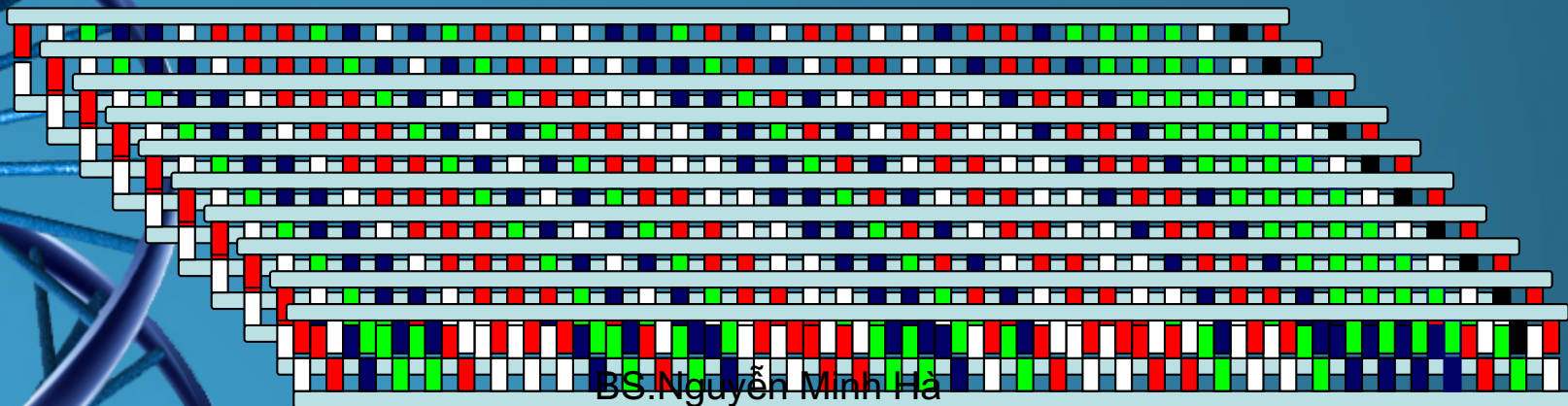
Kết thúc n chu kỳ = 2^n sản phẩm

- DNA – 1 copy



Known sequence Sequence of interest Known sequence


- PCR





Như vậy, PCR là gì?

KT tổng hợp DNA dựa trên mạch khuôn là một trình tự đích DNA ban đầu, khuếch đại số lượng của DNA ban đầu thành hàng triệu bản sao, nhờ hoạt động của enzyme polymerase và cặp mồi đặc hiệu cho đoạn DNA này.



CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000

Đặc tính tự giới hạn của PCR

Khuyết điểm của PCR

- Đặc tính tự giới hạn của PCR
- Tỷ lệ sao chép sai cao: $\frac{1}{2} \times 10^4$ nucleotide (*in vitro*)
Tỷ lệ sao chép sai (*in vivo*) = $1/10^9$ nucleotide
- Cần có thông tin tối thiểu về trình tự của template, đặc biệt là trình tự ở 2 đầu đủ để tạo đoạn mồi đặc hiệu
 - DNA được làm tinh khiết
 - Đoạn cần khuếch đại $\leq 2\text{kb}$
 - Sử dụng DNA Polymerase tốt
 - Máy luân nhiệt tốt
 - Nhiệt độ được tính toán kỹ
 - Chạy ít chu kỳ (25 – 35 chu kỳ)
 - Thêm các chất phụ trợ (BSA, DMSO,...)

Hiển thị kết quả của PCR

- Kết quả chỉ đọc sau khi phản ứng kết thúc.
- PCR cổ điển chỉ định tính, không định lượng
- Kết quả được đọc bằng cách: điện di trên gel agarose → làm hiện hình bằng cách sử dụng các chất nhuộm → thấy được và lưu lại bằng hình ảnh dưới đèn UV.

NỘI DUNG

1. Nguyên lý của kỹ thuật PCR

- Bản chất của kỹ thuật PCR
- Ý nghĩa từng thành tố trong PCR
- Các giai đoạn của PCR
- Hiện thị KQ phản ứng PCR

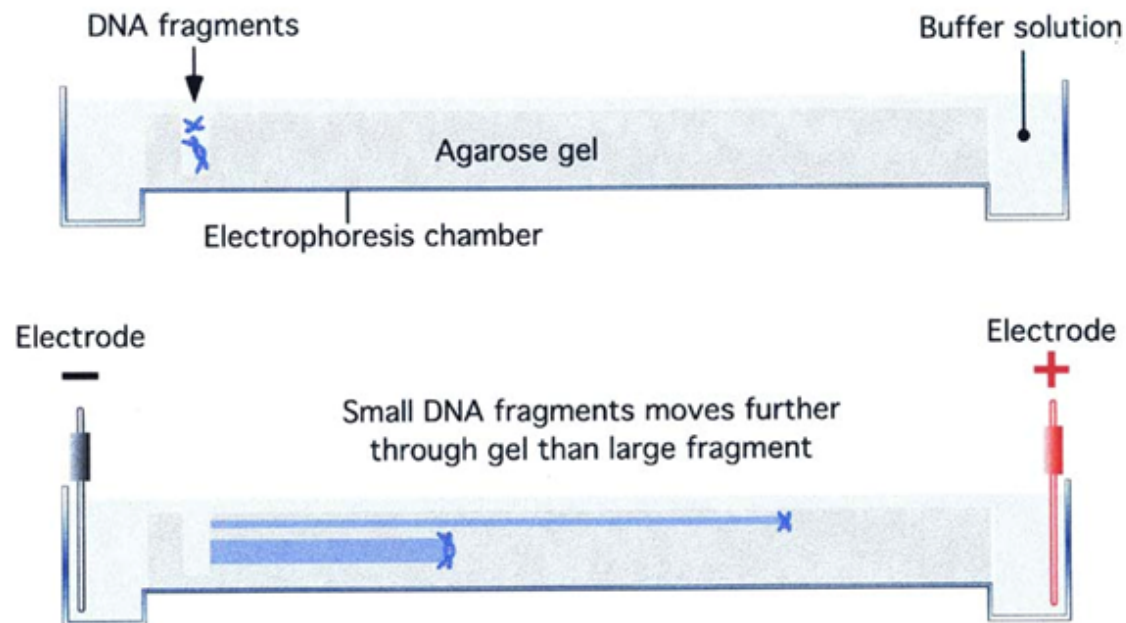
2. Cách đọc KQ một thử nghiệm thực hiện bằng KT PCR

3. Các loại PCR phổ biến

4. Ứng dụng của PCR

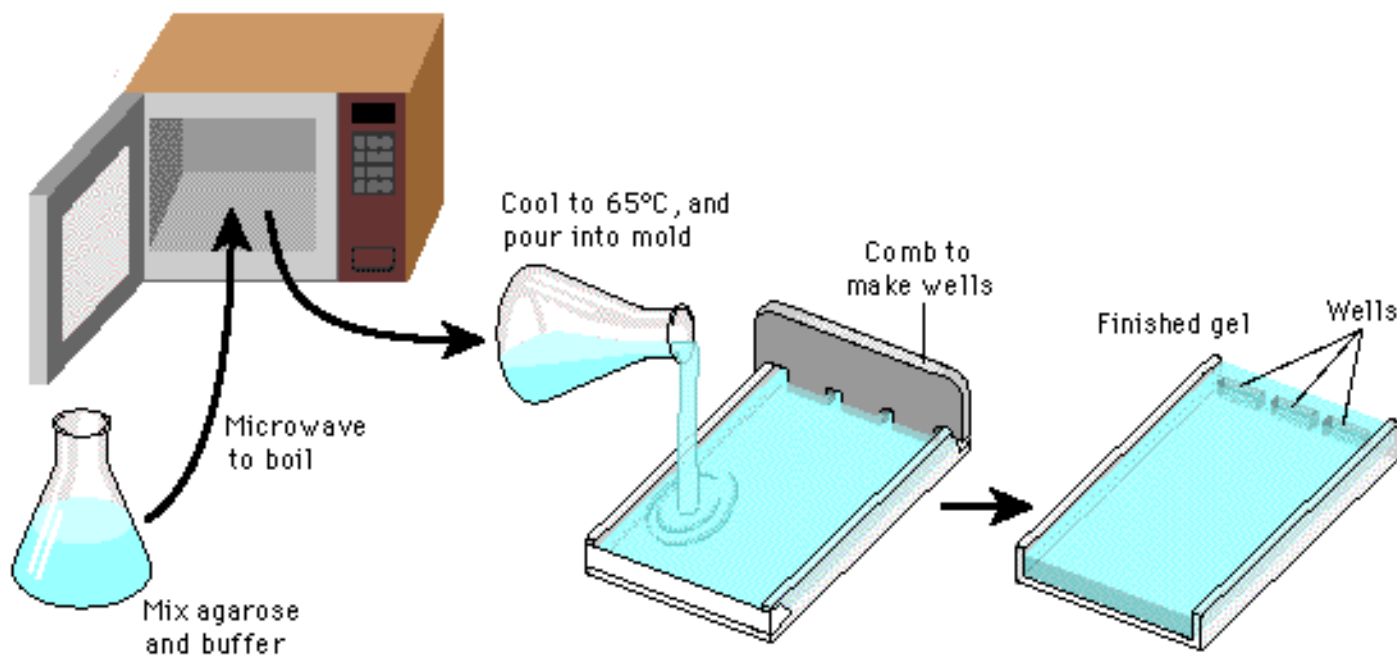
Nguyên lý của việc điện di trên gel agarose

DNA tích điện (-) → di chuyển từ (-) sang cực (+)



Chuẩn bị gel

- Chuẩn bị dụng cụ : bình nón để nấu gel, lò vi sóng, cồng đổ gel, lược tạo giếng, bồn chạy điện di, dd đệm chạy điện di (TBE)
- Chuẩn bị gel : gel agarose, định nồng độ cần sử dụng, pha gel bằng TBE, nấu gel, thêm EtBr, đổ vào khuôn, đặt lược tạo giếng.





Máng điện di gel agarose

Máng điện di gel agarose mini



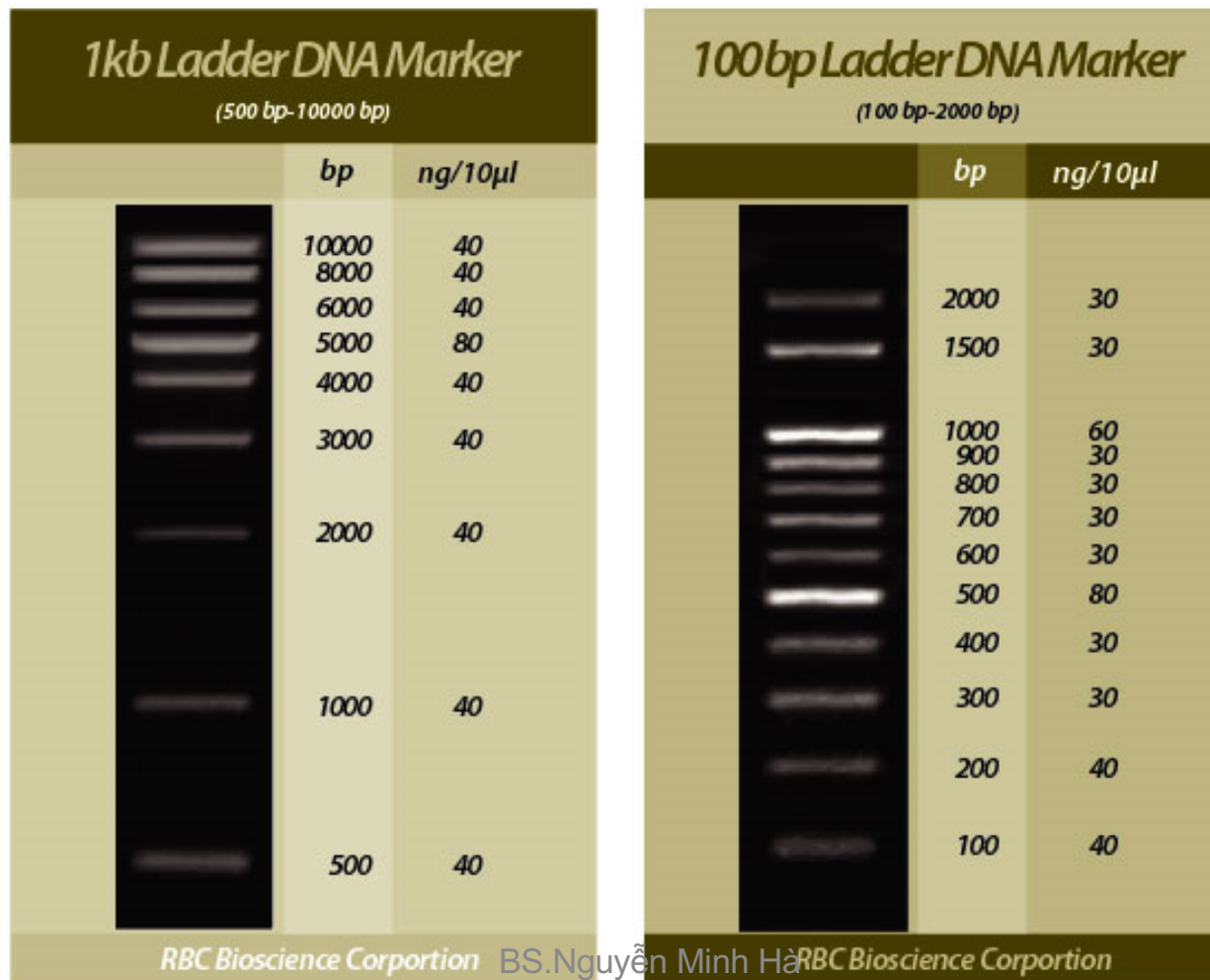
• Chuẩn bị mẫu điện di :

- Ống DNA cần điện di (chứa 1 hoặc nhiều đoạn DNA có kích thước khác nhau)
- Ống chứa thước đo
- Ống chứa dd đệm có màu.
- Chất phát quang (EtBr, SYBR G, midori green...)

Ống chứa thước đo

(DNA ladder, marker) (các đoạn DNA biết trước kích thước)

For best results load 5-10 μ l of marker per well



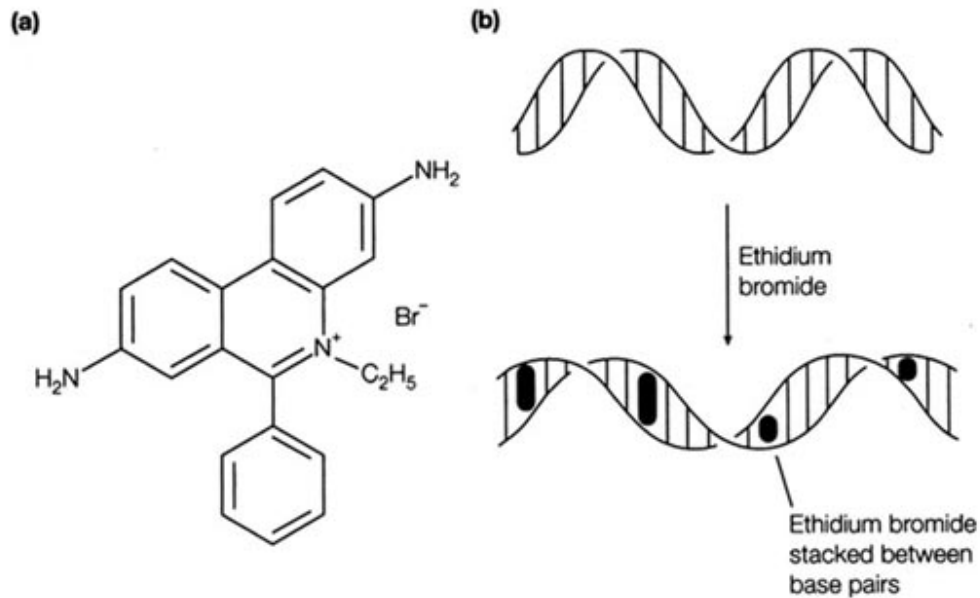


Ống dd đệm có màu (DNA loading buffer/dye)



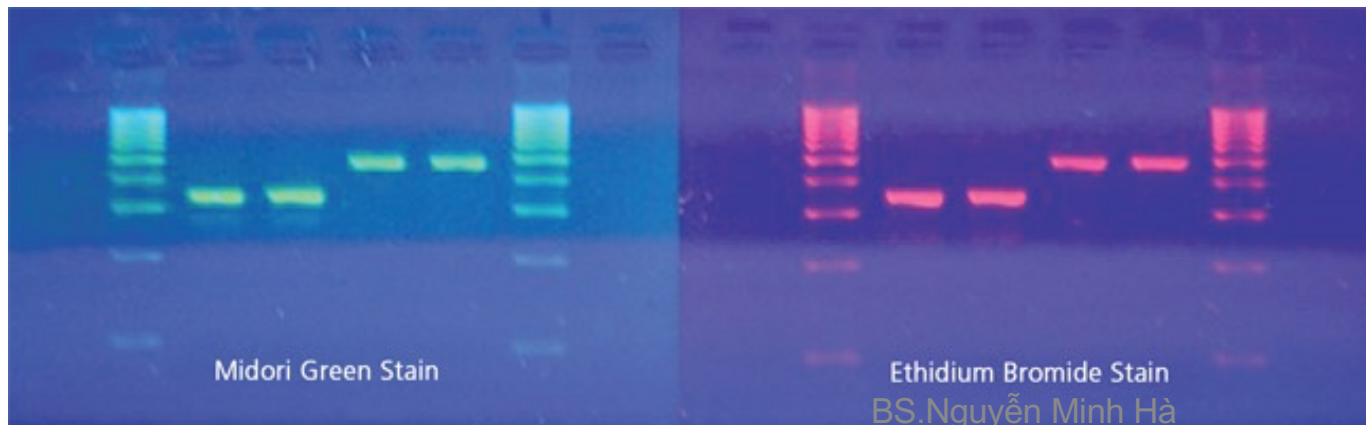
- Thường đi kèm với ladder
- Chứa 1-3 màu.
- Giúp theo dõi sự di chuyển của các đoạn DNA
- Glycerol trong buffer giúp kéo các đoạn DNA lắng xuống đáy giếng.

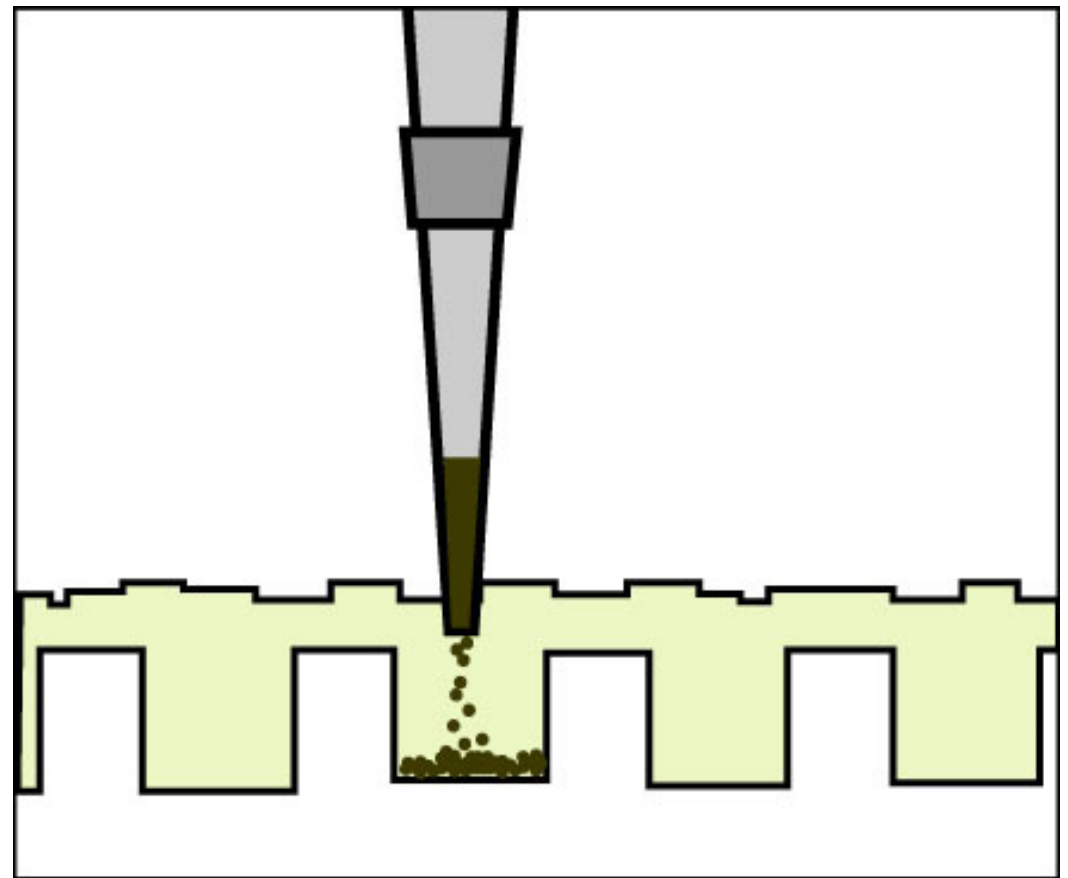
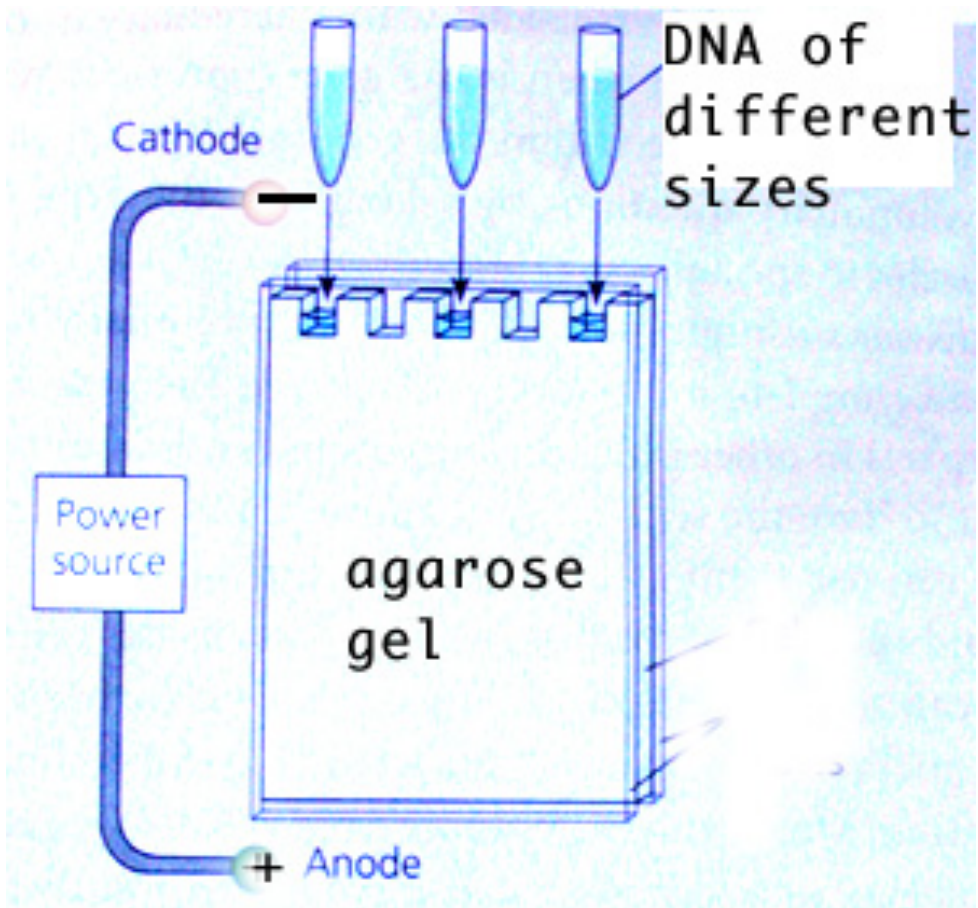
Chất phát quang



- EtBr gây độc cấp và mạn tính, là tác nhân gây đột biến gen, sinh ung và quái thai.
- EtBr **cài xen vào DNA sợi đôi và hiển thị màu cam dưới đèn UV.**

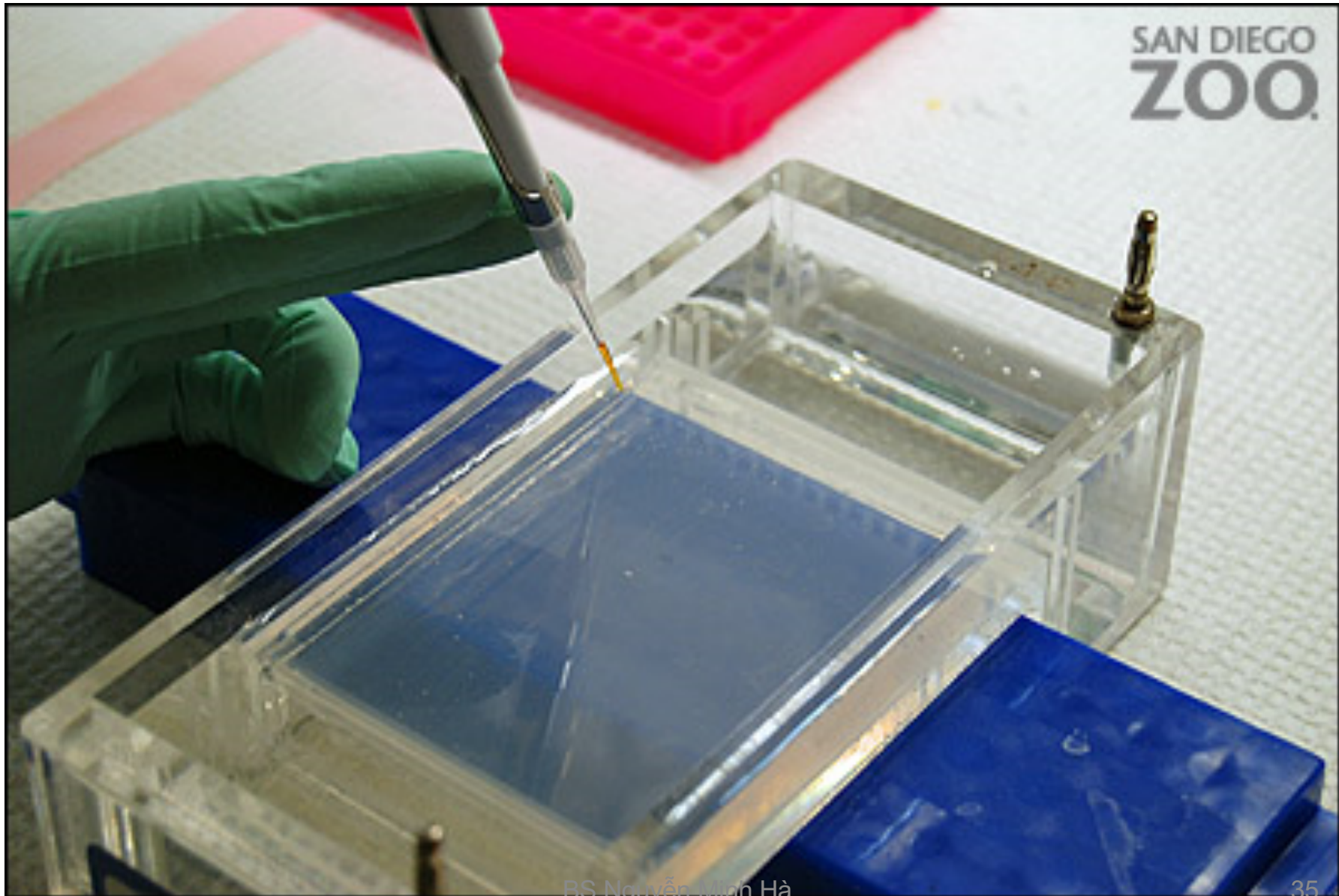
Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.

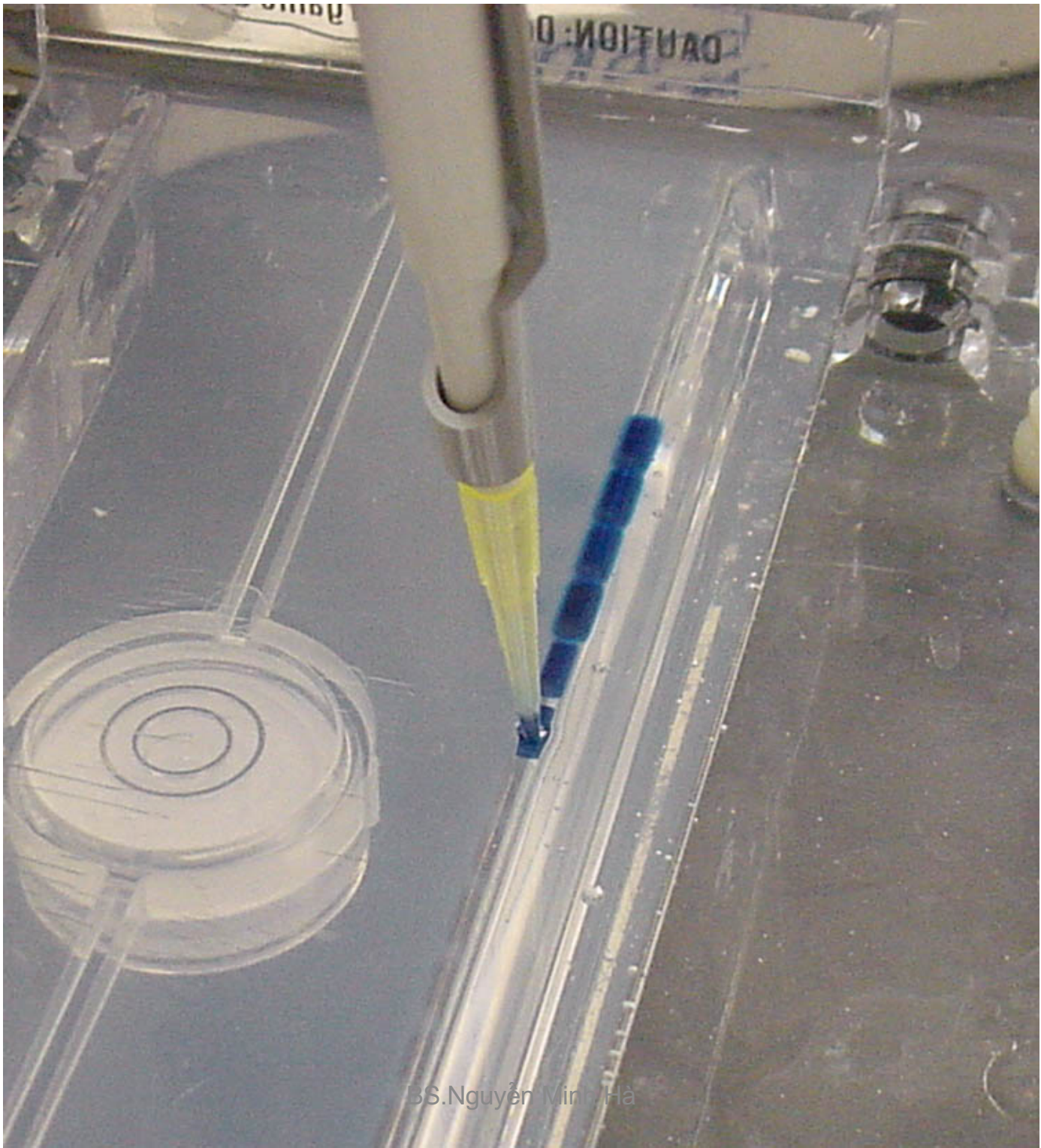




Đưa DNA vào gel agarose

Cách phân phối DNA lên thạch agarose

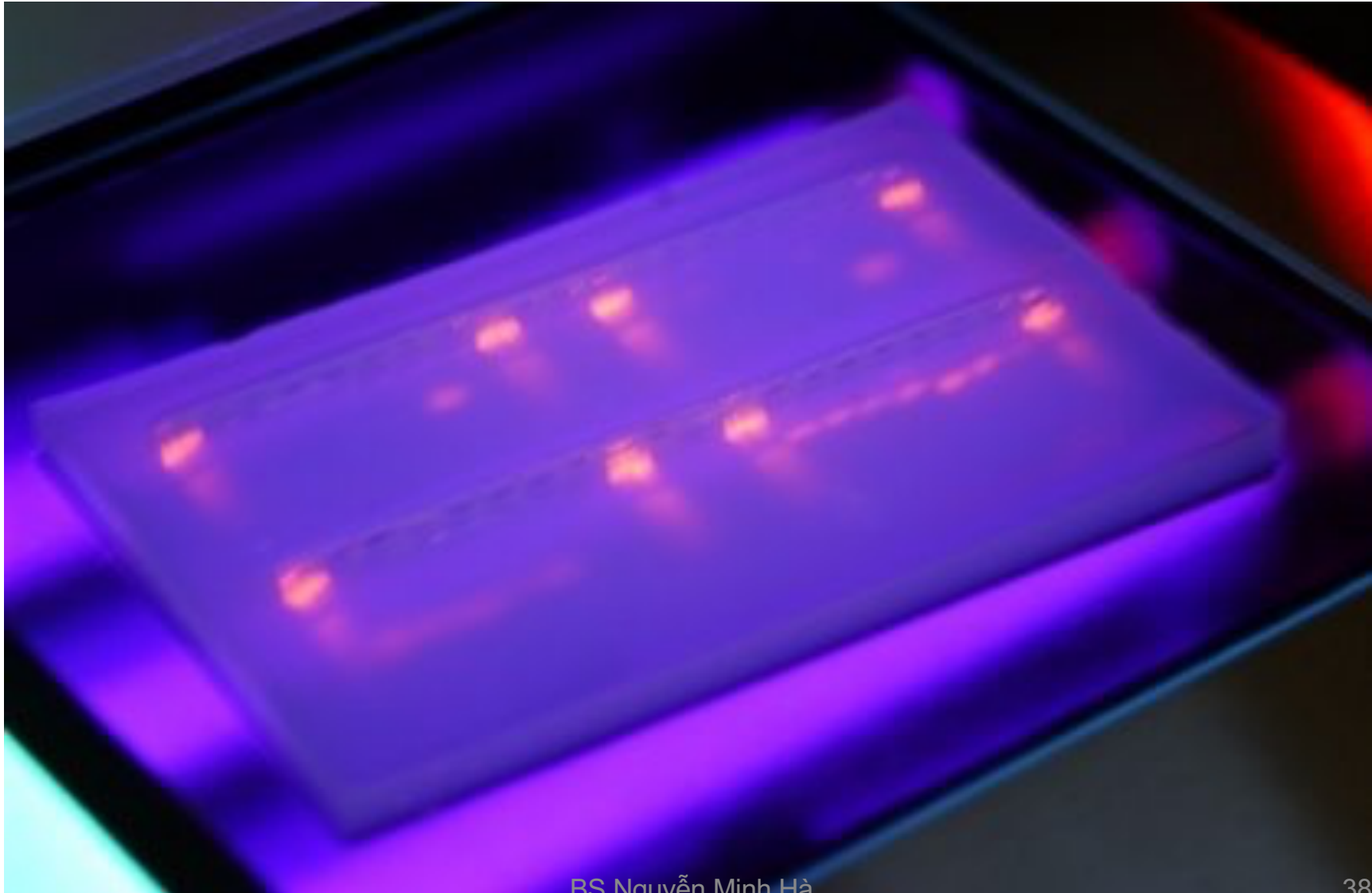


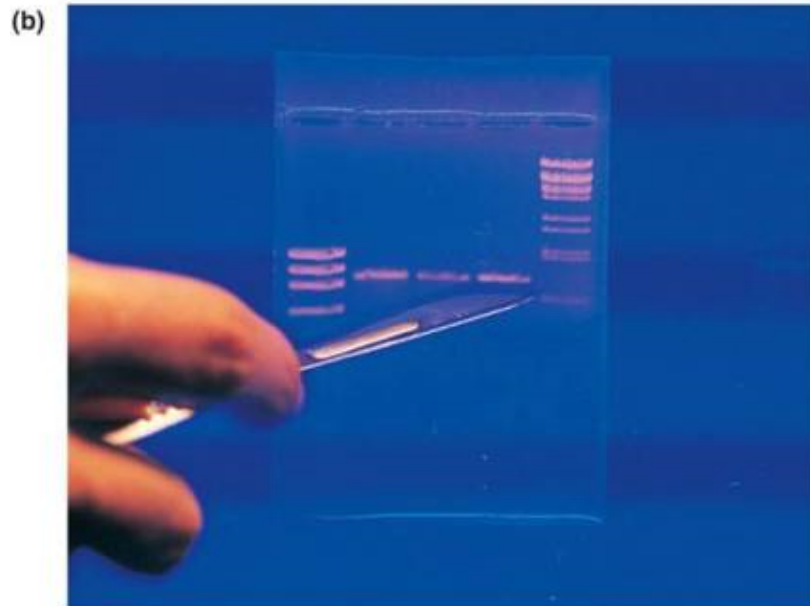
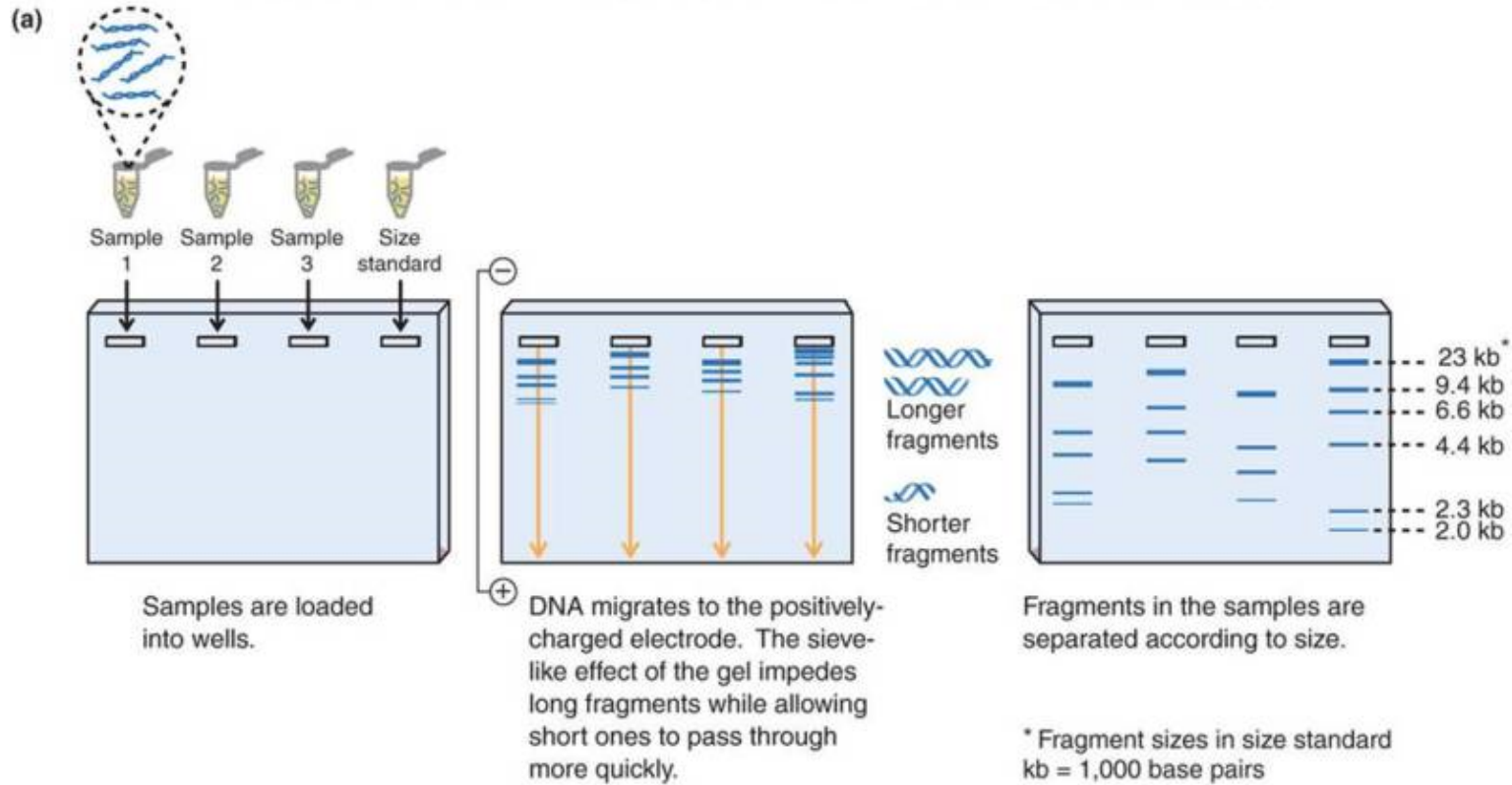


Chụp hình gel dưới đèn UV



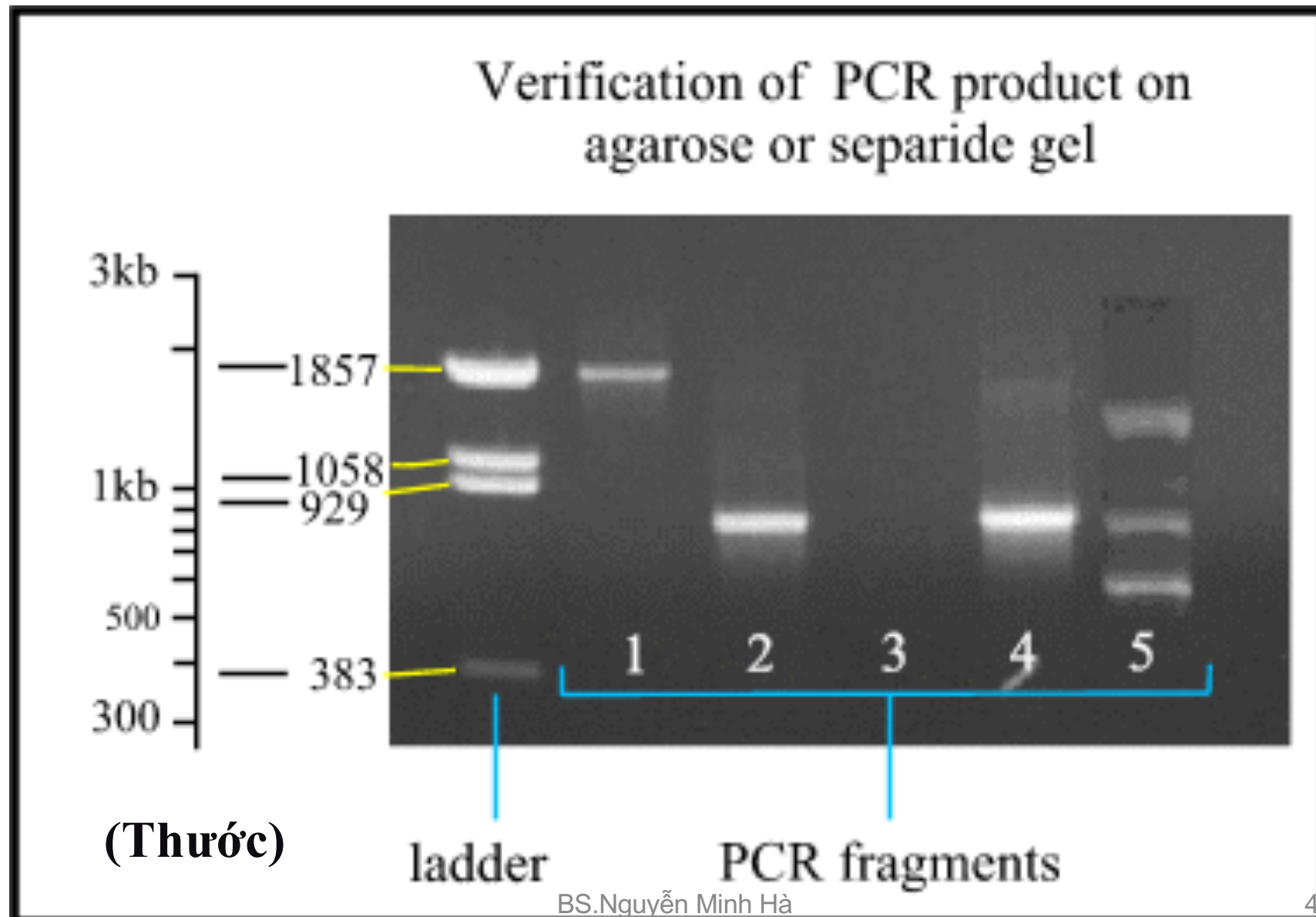
**Phát hiện các đoạn DNA bằng Ethidium bromide,
xem dưới đèn UV, vết DNA có màu cam**





Hình gel agarose dưới đèn UV

Sản phẩm điện di trên gel agarose được chụp hình và in ra (trên giấy)





Phân tích KQ thử nghiệm mẫu bệnh phẩm bằng PCR

- Phải biết kích thước (chiều dài) sản phẩm PCR là bao nhiêu.
- Phải dựa trên thước đo (DNA ladder, marker)
- Đọc kết quả các mẫu chứng trước khi đọc kết quả mẫu bệnh

Vai trò của các mẫu chứng trong PCR



**Chứng
DƯƠNG**



**Chứng
ÂM**



**Chứng
NƯỚC**



**Chứng
NỘI TẠ**



PCR mix



giống kích thước
và trình tự



luôn dương

Mẫu BP từ chủ thể
chắc chắn có chứa
đoạn acid nucleic
quan tâm

Vai trò:

- Chứng minh sự hoạt động của PCR mix đang sử dụng.
- Chứng minh độ đặc hiệu của cặp mồi
- Không kiểm tra được quá trình tách chiết có đạt chuẩn hay không





**luôn âm với
DNA đích**

Mẫu BP từ chủ thể
chắc chắn KHÔNG có
chứa đoạn acid nucle
quan tâm



Chứng
ÂM



Chứng
NƯỚC

Vai trò:

- Chứng minh độ đặc hiệu của cặp mồi
- Không kiểm tra được quá trình tách chiết có đạt chuẩn hay không

Lưu ý: chứng âm khác với **chứng nước**

Nước cất DNase-free + PCR mix

Chứng minh PCR mix không bị ngoại nhiễm hoặc không bị nhiễm chéo

→ Hóa chất và thiết bị không bị ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại

Là DNA được chạy song song với DNA đích

(Không phải là một mẫu riêng)

Thường được thêm vào chung với mẫu chứng âm, **luôn cho kết quả (+)**

Chứng NỘI TẠI

Có kích thước và trình tự khác DNA đích



Có thể sử dụng chung hoặc khác mỗi với mẫu DNA đích



Vai trò:

- Kiểm tra được khâu tách chiết tốt hay không
- Kiểm tra được có tồn lưu chất ức chế khuếch đại trong dung dịch sau tách chiết không
- Kiểm tra được sự hoạt động của hệ thống khuếch đại

NỘI DUNG

1. Nguyên lý của kỹ thuật PCR

- Bản chất của kỹ thuật PCR
- Ý nghĩa từng thành tố trong PCR
- Các giai đoạn của PCR
- Hiện thị KQ phản ứng PCR

2. Cách đọc KQ một thử nghiệm thực hiện bằng KT PCR

3. Các loại PCR phổ biến

4. Ứng dụng của PCR



CÁC LOẠI PCR

1. Classic PCR (PCR cổ điển)
2. Multiplex PCR (PCR đa mồi)
3. Nested PCR (PCR tổ)
4. Quantitative PCR (Real time PCR, ...)
5. Reverse transcriptase PCR
6. PCR RFLP
7. ...

NỘI DUNG

1. Nguyên lý của kỹ thuật PCR

- Bản chất của kỹ thuật PCR
- Ý nghĩa từng thành tố trong PCR
- Các giai đoạn của PCR
- Hiện thị KQ phản ứng PCR

2. Cách đọc KQ một thử nghiệm thực hiện bằng KT PCR

3. Các loại PCR phổ biến

4. Ứng dụng của PCR