

KỸ THUẬT  
**REAL-TIME PCR**

*TS. BS. Nguyễn Minh Hà  
drnguyenminhha@gmail.com  
BM Hoá Sinh-SHPT Y học - Trường ĐH Y khoa PNT*

## **Nội dung**

- Nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR
- Các loại đoạn dò (probe)
- Cách xác định sản phẩm trong real-time PCR
- Real-time PCR định tính
- Real-time PCR định lượng
- Điểm khác biệt giữa PCR cổ điển và realtime PCR

## Các thuật ngữ

- Realtime PCR, quantitative PCR (qPCR), PCR thời gian thực
- Đoạn dò (probe)
- Đường nền (baseline)
- Đường ngưỡng (threshold)
- Chu kỳ ngưỡng (cycle of threshold, Ct)
- Đường chuẩn (Standard curve)
- Mẫu chuẩn (calibrator)
- Mẫu chứng (control)
- Tín hiệu huỳnh quang (signal of fluorescent)

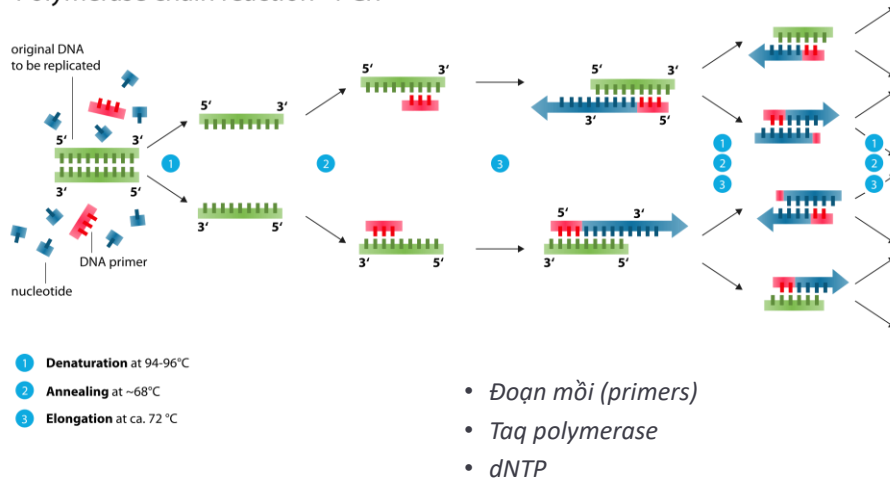
3

## NGUYÊN LÝ REAL-TIME PCR <sup>(1)</sup>

- Là một phản ứng khuếch đại chuỗi (PCR)
- Sự tích lũy sản phẩm PCR được ghi nhận nhờ fluorescence của sản phẩm
- Giúp xác định sự hiện diện (định tính) hoặc nồng độ ban đầu (định lượng) của trình tự DNA/mRNA quan tâm.

4

## Polymerase chain reaction - PCR



5

## NGUYÊN LÝ REAL-TIME PCR (2)

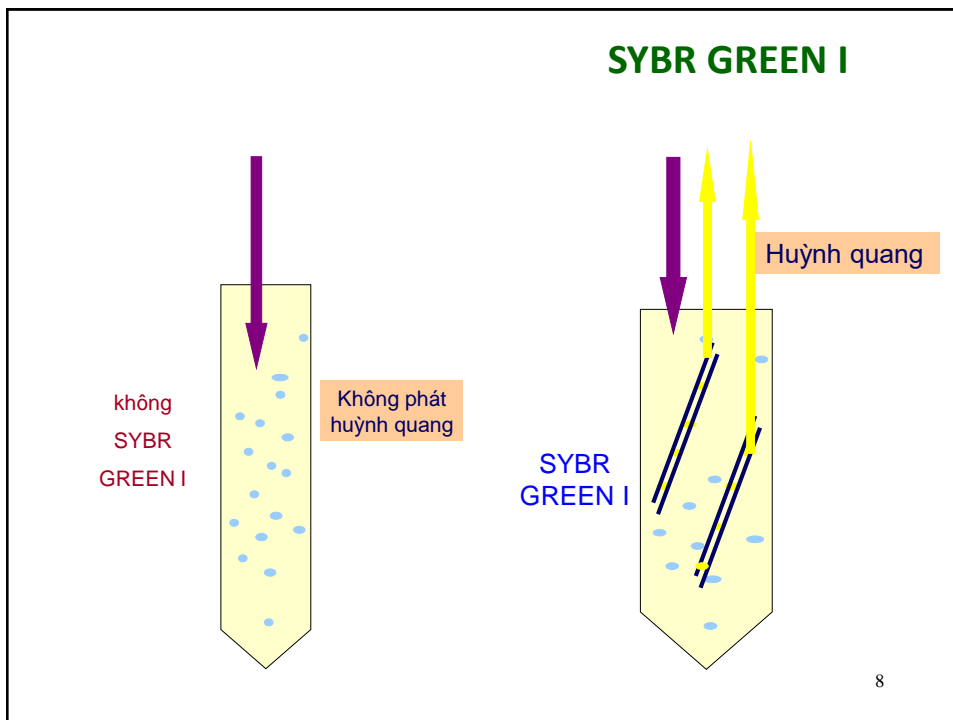
- Là một phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction)
- Sự tích lũy sản phẩm PCR được ghi nhận nhờ fluorescence của sản phẩm
- Giúp xác định sự hiện diện (định tính) hoặc nồng độ ban đầu (định lượng) của trình tự DNA/mRNA quan tâm.

6

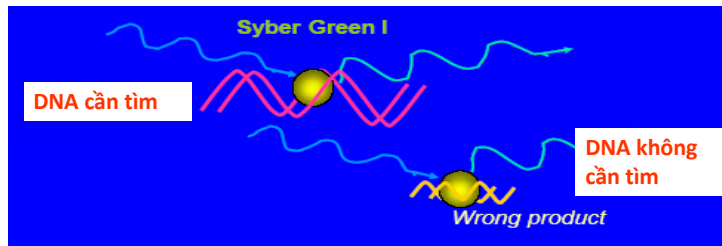
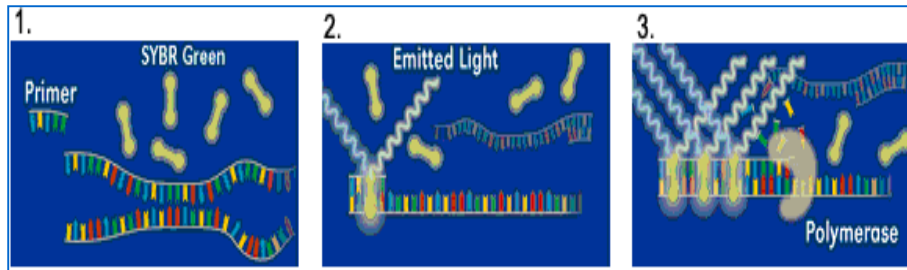
## Tín hiệu huỳnh quang (fluorescence) của sản phẩm (1)

- Chất nhuộm khi chèn vào sợi đôi DNA sẽ phát huỳnh quang: ethidium bromide, Syber green 1...
- Bộ phận phát quang được thiết kế trên **probe (đoạn dò)**, gián tiếp báo hiệu sự tạo thành các phân tử DNA mới

7



## SYBR GREEN I



Không phân biệt được sản phẩm đặc hiệu hay không đặc hiệu

9

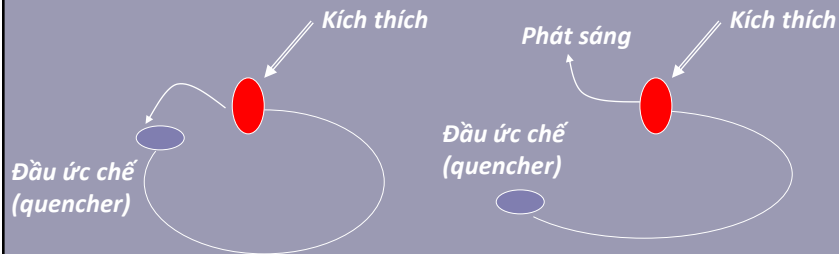
### Tín hiệu huỳnh quang (fluorescence) của sản phẩm (2)

- Chất nhuộm khi chèn vào sợi đôi DNA sẽ phát huỳnh quang: ethidium bromide, Syber green 1...
- Bộ phận phát quang được thiết kế trên **probe (đoạn dò)**, gián tiếp báo hiệu sự tạo thành các phân tử DNA mới (có sự gắn dNTP)

10

## Cấu tạo của đoạn dò (probe)

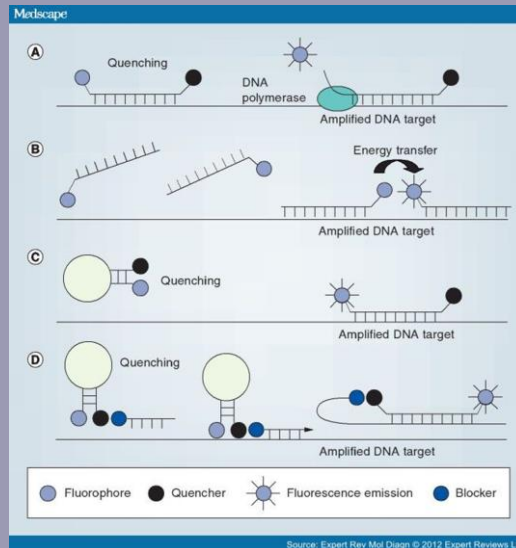
- 1 đoạn nucleotide đặc hiệu, có 1 đầu là bộ phận fluorophore (kích thích) và 1 đầu là bộ phận quencher (ức chế)



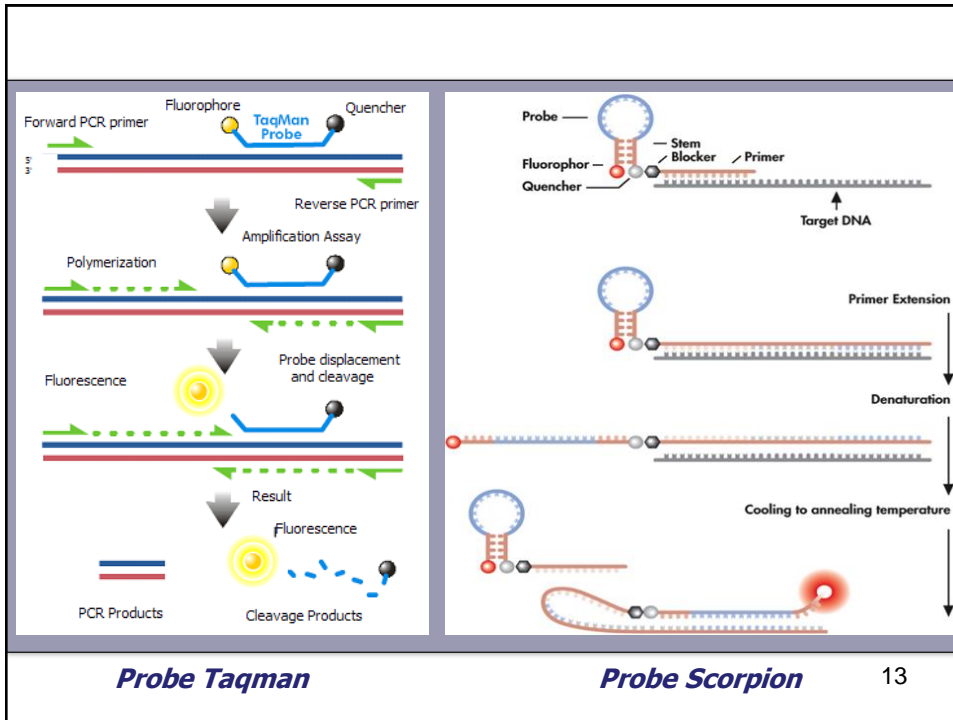
- Các loại probe: Taqman, Beacon, Scorpion

11

## Cơ chế hoạt động của probe



(A) Probe Taqman (B) Probe dual (C) Probe Beacon (D) Probe Scorpion<sup>12</sup>



### NGUYÊN LÝ REAL-TIME PCR (3)

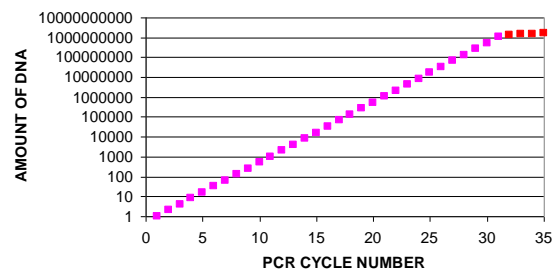
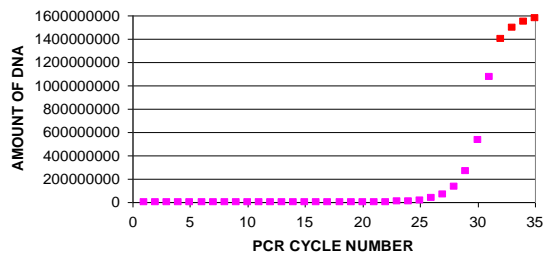
- Là một phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction)
- Sự tích lũy sản phẩm PCR được ghi nhận nhờ fluorescence của sản phẩm
- Giúp xác định sự hiện diện (định tính) hoặc nồng độ ban đầu (định lượng) của trình tự DNA/mRNA quan tâm.

## Cách xác định sản phẩm PCR trong real-time PCR <sup>(1)</sup>

- Sản phẩm PCR được tạo ra theo luật  $2^n$  (n là số chu kỳ nhân đôi)
- Phản ứng PCR tự giới hạn với tỷ lệ tạo sản phẩm chậm dần

15

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

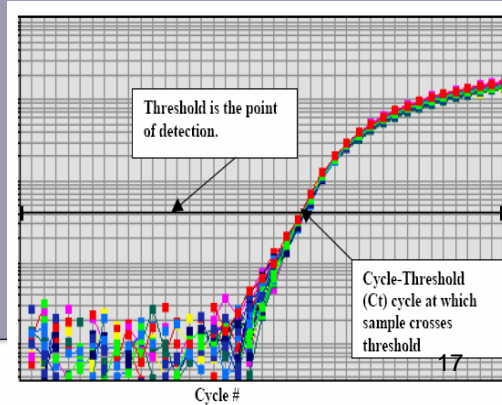


16

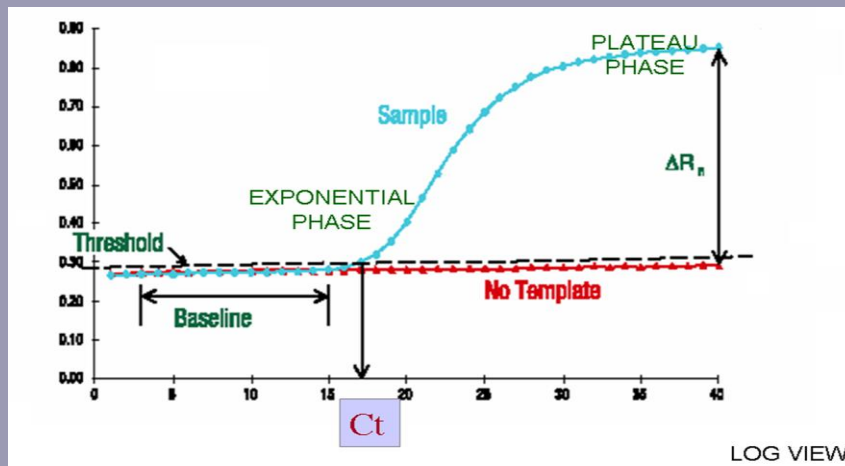


## Cách xác định sản phẩm PCR trong real-time PCR (2)

- Thời điểm phát hiện tín hiệu:
  - ✓ **Threshold:** điểm bắt đầu quan sát được tín hiệu huỳnh quang phát ra, tại thời điểm này tín hiệu do sản phẩm PCR > tín hiệu nền (background).
  - ✓ **Ct (Cycle of Threshold):** số chu kỳ mà tại đó tín hiệu huỳnh quang của sản phẩm PCR được phát hiện.



## Cách xác định sản phẩm PCR trong real-time PCR (3)



## REAL-TIME PCR ĐỊNH TÍNH

- Xác định sự hiện diện (có/không có) của 1 đoạn DNA trình tự đặc hiệu
- Sử dụng hỗn hợp các đoạn mồi và probe cho nhiều đoạn DNA đích khác nhau. Mỗi probe đặc hiệu phát một tín hiệu huỳnh quang khác nhau.
- Ứng dụng: định type VSV, xác định đột biến đặc hiệu (trong nhiều loại đột biến)...

19

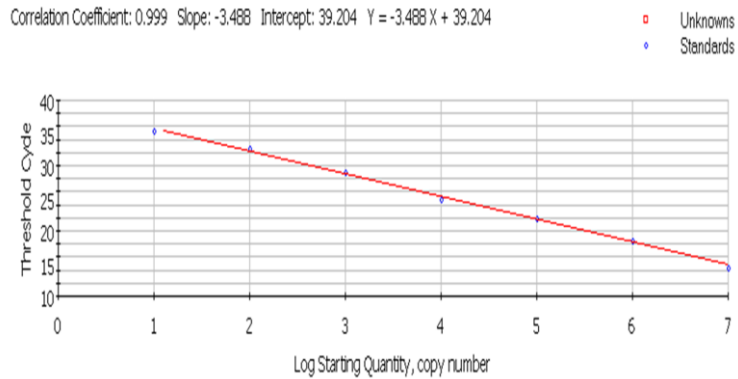
## REAL-TIME PCR ĐỊNH LƯỢNG

- Xác định nồng độ (số copy) sản phẩm của đoạn DNA trình tự đặc hiệu ban đầu (*định lượng tuyệt đối*)
- Xác định mức độ biểu hiện 1 gen đặc hiệu trong một tình trạng của cơ thể (*định lượng tương đối*)

20

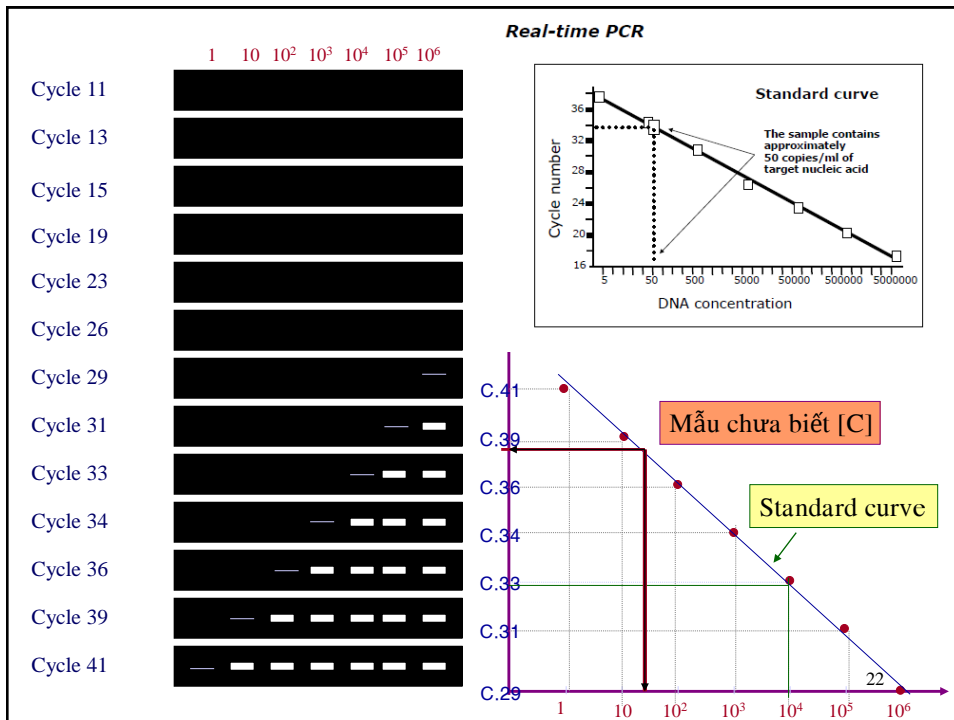
## Định lượng tuyệt đối (1)

- Phải xây dựng 1 phương trình đường chuẩn (standard curve) từ những mẫu có số copy DNA đặc hiệu biết trước, cho biết tương quan giữa số copy và Ct đo được.



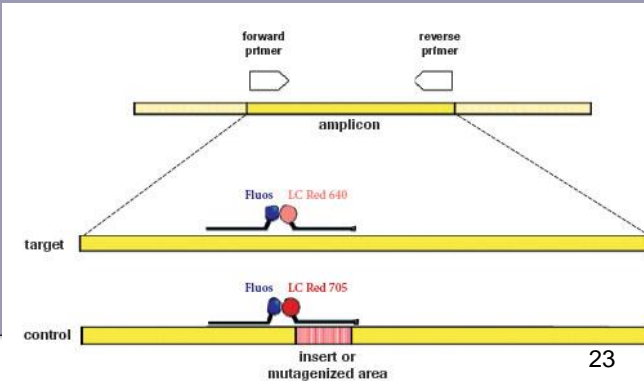
PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 12331eff.opd

21

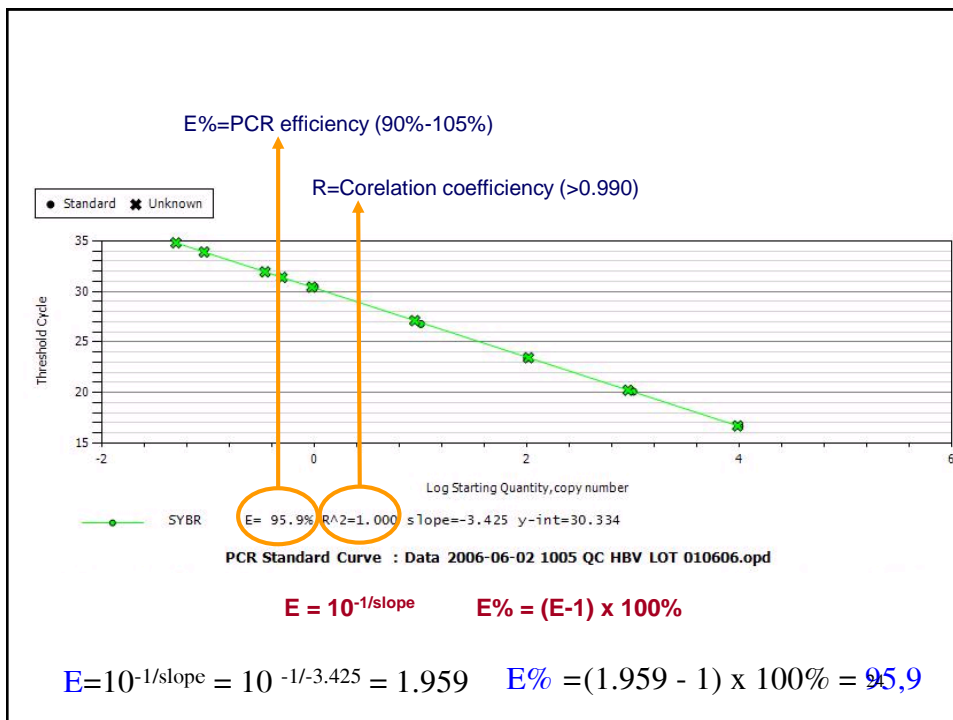


## Định lượng tuyệt đối (2)

- Ngoài ra, phải xây dựng gen nội kiểm tra (internal control):
  - Là đoạn DNA đích được gây đột biến (cùng primer với DNA đích nhưng khác biệt về trình tự khuếch đại để phát hiện)
  - Nhằm phát hiện yếu tố gây ức chế PCR hiện diện trong dung dịch chạy PCR
- Được pha vào mỗi mẫu thử 1 lượng như nhau

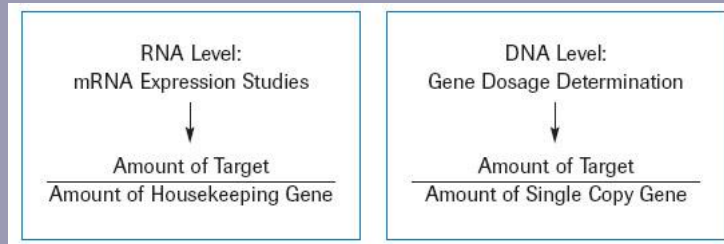


23



## Định lượng tương đối (1)

- Có sự xuất hiện của gen tham chiếu (reference gene)
- Có 2 cách:
  - Sử dụng đường chuẩn
  - Sử dụng mẫu chuẩn (calibrator)

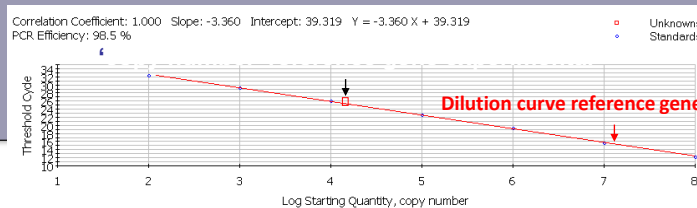
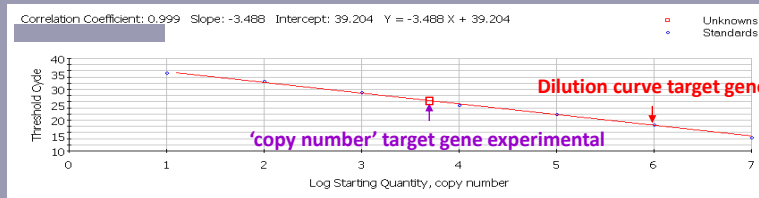


25

## Định lượng tương đối (2)

- Có sử dụng đường chuẩn: KQ là 1 tỷ lệ giữa target gene và reference gene trong mỗi mẫu thử

$$\frac{\text{Copies of target gene}}{\text{Copies of reference gene}}$$

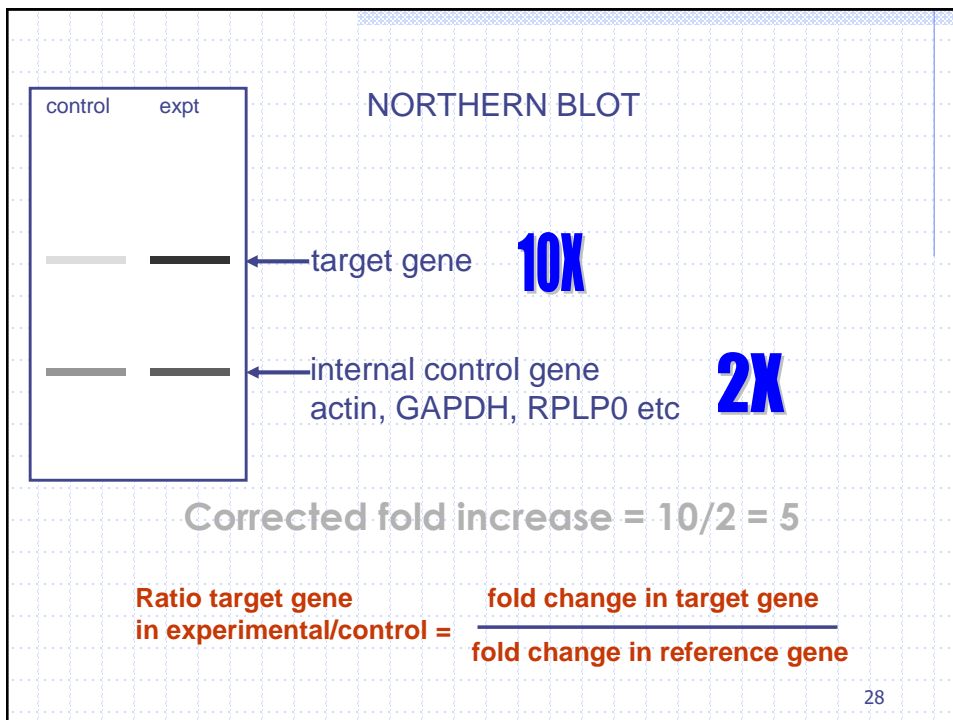


26

### **Định lượng tương đối (3)**

- Sử dụng mẫu chuẩn:
  - Calibrator là một mẫu (dòng tế bào) có tỷ lệ target gene trên reference gene ổn định
  - Áp dụng thuật toán
  - KQ là tỷ lệ của target gene trong mẫu thử so với trong calibrator sau khi đã đồng nhất với reference gene.

27



## Khác biệt giữa PCR và real-time PCR

Đặc điểm	PCR	Realtime PCR
Thành phần PU		
Ứng dụng		
Hiển thị, đọc kết quả		
...		