



PCR là chữ viết tắt của cụm từ **Polymerase Chain Reaction**, được dịch ra một vài sách là **Phản ứng chuỗi trùng hợp**

cũng có sách gọi là "phản ứng khuếch đại gen". PCR là một kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm khuếch đại (tạo ra nhiều bản sao) một đoạn DNA mà không cần sử dụng các sinh vật sống như

[E. coli](#)

hay

[nấm men](#)

. PCR được sử dụng trong các nghiên cứu sinh học và y học phục vụ nhiều mục đích khác nhau, như phát hiện các

[bệnh di truyền](#)

, nhiễm trùng, chẩn đoán bệnh

[bệnh nhiễm trùng](#)

,

[tách dòng gene](#)

, và xác định huyết thống.

Lịch sử

Phương pháp căn bản của PCR được [Kary Mullis](#) phát minh, ông đã đoạt [giải Nobel về Hóa học](#) vào [tháng 10](#)

năm

[1993](#)

cho thành tựu này, chỉ sau 7 năm khi ông đưa ra ý tưởng. Ý kiến của Mullis là phát triển một quy trình mà DNA có thể nhân lên nhiều lần một cách nhân tạo qua nhiều chu kỳ sao chép bởi

[enzyme](#)

[DNA polymerase](#)

DNA polymerase có [tự nhiên](#) trong sinh vật sống, nhờ đó mà nó thực hiện chức năng nhân DNA khi [tự bào](#) phân chia. Nó làm việc bằng cách nối và nối lại DNA và tạo sợi bổ sung. Theo quy trình PCR gốc của Mullis, [enzyme](#)

phản ứng nhân bản DNA được thực hiện trong phòng thí nghiệm (in vitro). Sợi DNA đôi bị tách thành 2 sợi đơn khi đun nóng ở 96 °C. Tuy nhiên, nhiệt độ này DNA polymerase bị phá hủy vì vậy cần bổ sung enzyme sau mỗi giai đoạn đun nóng của mỗi chu kỳ. Quy trình PCR gốc của Mullis không có hiệu quả cao vì nó mất nhiều thời gian, cần mất nhiều DNA polymerase, và phải liên tục lấy ý suất trong quá trình PCR.

Sau đó, quy trình gốc này được phát triển bằng cách dùng DNA-Polymerase lấy từ vi khuẩn thermophilic (ưa nhiệt) sống trong môi trường phun nhiệt độ trên 110 °C. DNA polymerase từ sinh vật này là thermostable (bền vững nhiệt độ cao) và khi dùng trong PCR nó không bị phá vỡ khi đun nóng để tách sợi DNA. Từ đó, không cần phải thêm DNA-polymerase vào mỗi chu kỳ, quá trình sao chép DNA có thể diễn ra liên tục và tự động hơn.

Một trong những DNA-polymerase chủ yếu nhiệt độ ưu tiên được phân lập được từ *Thermus aquaticus* và được gọi là Taq. Taq polymerase được dùng rộng rãi trong thực nghiệm PCR (5/2004). Nhược điểm của Taq là thiếu khả năng nó không có tính sửa sai exonuclease 3'-5'. Các polymerase như Pwo hay Pfu, được phân lập từ Archaea có khả năng sửa sai (có khả năng kiểm tra lại sai) và có thể làm giảm mức độ sai sót khi nhân bản DNA được sao chép. Ngày nay, sự kết hợp giữa Taq và Pfu có thể cung cấp độ chính xác cao hơn sự nhân bản chính xác của DNA.

Thực nghiệm PCR



Đoạn mồi

Đoạn DNA cần khuếch đại để được xác định bằng máy chiếu tia cực tím. Mồi là những đoạn ngắn, sợi DNA nhân tạo – không quá 50 (thường 18-25) nucleotides (vì DNA thường là sợi đôi, chiều dài của nó được xác định bằng số lượng cặp base (bp); chiều dài của sợi đơn DNA được đo bằng base hay nucleotides) phù hợp một cách chính xác để đi vào bắt đầu và kết thúc của DNA cần khuếch đại. Nó gắn chặt với DNA mẫu và nhờ đi vào khuôn và kết thúc, nhờ mà DNA-polymerase mới và bắt đầu quá trình tổng hợp của sợi DNA mới.

Số lượng của chiều dài của những đoạn mồi và nhiệt độ biến tính của nó (T_m -melting) phụ thuộc vào số ... Nhiệt độ biến tính của mồi – được chọn lựa với nhiệt độ biến tính của DNA trong chu kỳ đầu tiên của quá trình PCR—được chọn nghĩa là nhiệt độ để mồi bám vào DNA mẫu và nhiệt độ trên lúc mồi tách ra khỏi DNA mẫu. Nhiệt độ biến tính tối ưu phụ thuộc vào chiều dài của mồi. Mồi quá ngắn sẽ bám nhiều vào trí trên DNA mẫu dài và sẽ cho kết quả không rõ ràng. Một khác chiều dài DNA bắt đầu từ nhiệt độ của biến tính. Nhiệt độ biến tính quá cao, ví dụ như trên 80°C sẽ gây ra nhiệt độ vì DNA-polymerase hoạt động kém nhiệt độ đó. Chiều dài tối thiểu của đoạn mồi là từ 20-40 nucleotide với nhiệt độ biến tính khoảng từ $60 - 75^\circ\text{C}$.

Thành thông thường những đoạn mồi đã thoái hóa cũng được sử dụng. Những đoạn mồi này là hỗn hợp tổng hợp từ những không giống hoàn toàn. Nó có thể thu được từ những có cùng gen cần khuếch đại từ những sinh vật khác nhau, hoặc gen của nó có thể là tổng hợp từ những không giống nhau. Nhưng ta còn dùng những đoạn mồi đã thoái hóa khi mồi được thiết kế dựa trên chuỗi protein. Nếu nhiệt độ codon có thể mã hóa cho nhiệt độ acid amin, thông qua rất khó để suy ra codon nào dùng cho trình tự hợp để biết. Vì vậy đoạn mồi tổng hợp bằng axit amin isoleucine có thể là “ATH”, A có nghĩa là adenine, T là thymine, và H là adenine, thymine, hay cytosine. (Xem mã di truyền để hiểu thêm về codons) Sử dụng đoạn mồi đã thoái hóa có thể làm giảm được

trình của phần ứng khuếch đại PCR. Việc có thể được gọi là quy trình biến tính phương pháp touchdown PCR.

Việc thiết kế mẫu chính xác đã được đề cập trên phần thu vào sản xuất sản phẩm: - hàm lượng GC nên trong khoảng 40-60% - Tính toán nhiệt độ tính cho các bước đun mẫu trong phần ứng không khác quá 50 °C và nhiệt độ tính của sản phẩm khuếch đại không khác mẫu quá 10 °C - Nhiệt độ bám vào thành ống thép hơn nhiệt nóng chảy 50 °C. Tuy nhiên, nên chọn lựa theo kinh nghiệm cho từng trình trình hợp cụ thể. - Tránh ... - Kết thúc đầu 3' rớt nhụy cụ thể – nó có thể không bổ sung cho bất kỳ vùng nào của đoạn mẫu trong phần ứng và phải cung cấp base chính xác phù hợp với mẫu. Có các chương trình hỗ trợ việc thiết kế mẫu (xem Liên kết ngoài)

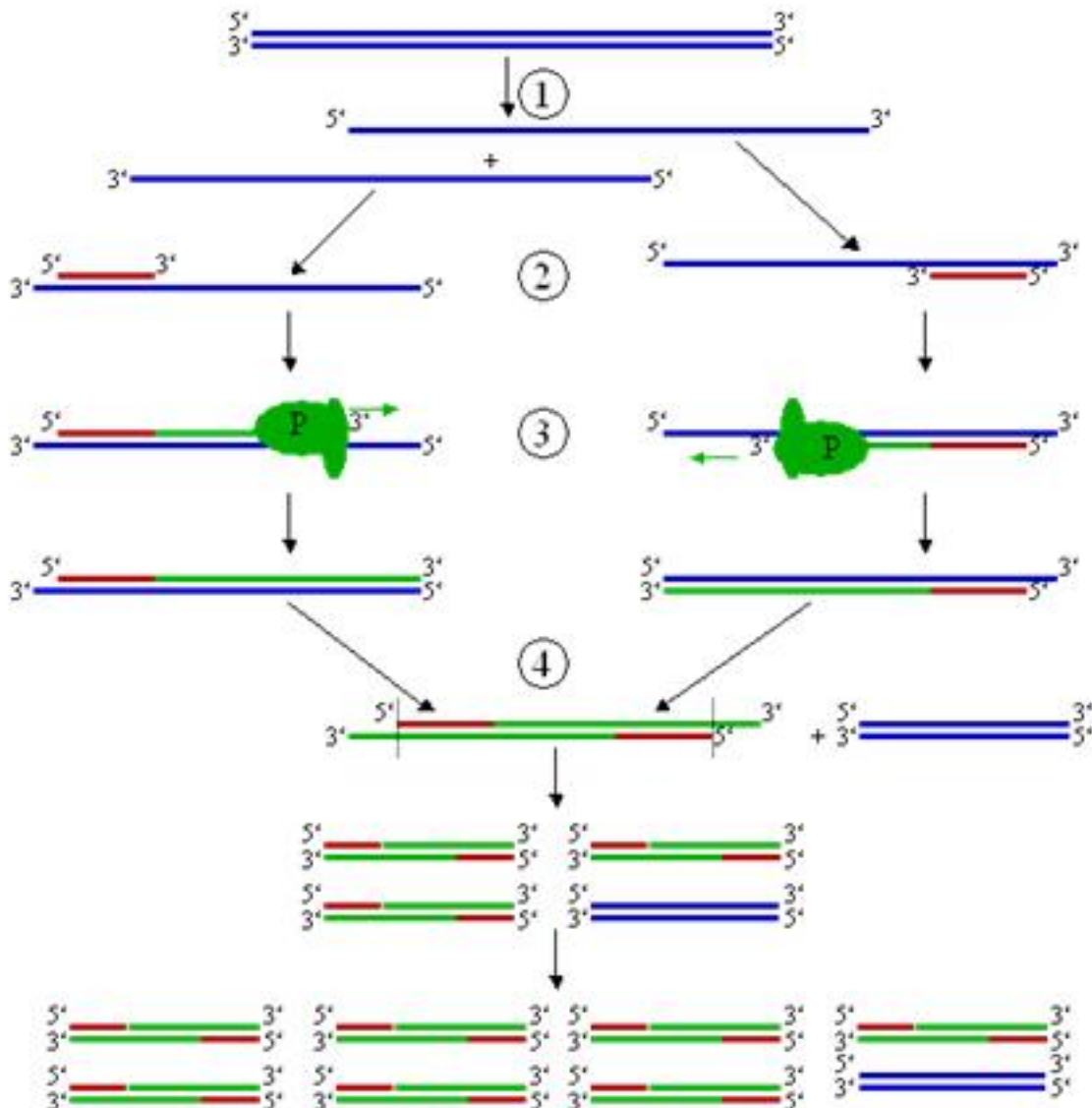
Quy trình

Quy trình PCR gồm 20 đến 30 chu kỳ. Mỗi chu kỳ gồm 3 bước (Hình 2)

(1) Nhiệt độ tăng lên 94-96 °C để tách hai sợi DNA ra. Bước này gọi là biến tính, nó phá vỡ cấu trúc hydrogen của 2 sợi DNA. Trình tự chu kỳ 1, DNA thành được biến tính đến thời gian mẫu chuỗi để đảm bảo mẫu DNA và mẫu được phân tách hoàn toàn và chỉ còn dòng sợi đơn. Thời gian: 1-2 phút

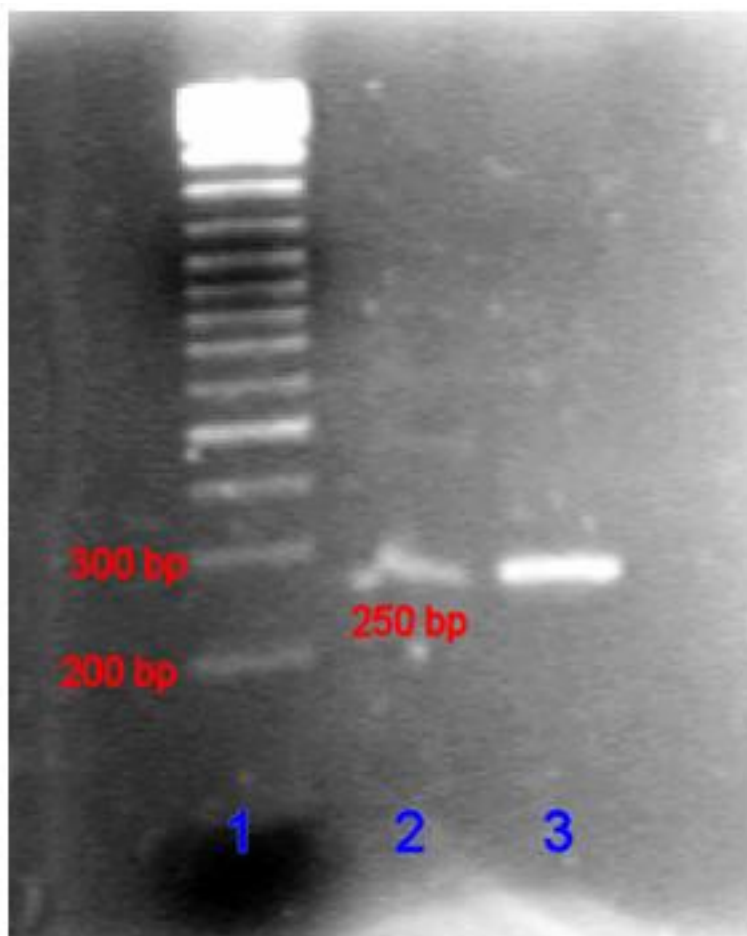
(2) Sau khi 2 sợi DNA tách ra, nhiệt độ được hạ thấp xuống để mẫu có thể gắn vào sợi DNA đơn. Bước này gọi là gắn mẫu. Nhiệt độ giai đoạn này phụ thuộc vào đoạn mẫu và thành phần hơn nhiệt độ biến tính 50 °C (45-60 °C). Số dòng sai nhiệt độ trong giai đoạn này dẫn đến việc đoạn mẫu không gắn hoàn toàn vào DNA mẫu, hay gắn một cách tùy tiện. Thời gian: 1-2 phút.

(3) Cuối cùng, DNA polymerase gắn tiếp vào sợi trình. Nó bắt đầu bám vào và hoạt động dọc theo sợi DNA. Bước này gọi là kéo dài. Nhiệt độ kéo dài phụ thuộc DNA-polymerase. Thời gian của bước này phụ thuộc vào các DNA-polymerase và chiều dài mẫu như DNA của khuếch đại. Nhịp quy tắc ..., 1000bp/ 1 phút.



Hình 2.0: Các bước của PCR (1) Nhiệt độ nóng chảy để tách DNA thành 2 chuỗi đơn (2) Nhiệt độ gắn kết để gắn các mồi (3) Nhiệt độ kéo dài để kéo dài chuỗi DNA (4) Hoàn thành quá trình PCR

Do PCR rất nhạy, nên phải tránh ô nhiễm các DNA khác có trong phòng thí nghiệm (vi khuẩn, virus, DNA, ...). Vì vậy các mẫu DNA, hỗn hợp phản ứng và quy trình DNA, ngoài ra còn có phần riêng phân tích sản phẩm, nên được thực hiện trong một khu vực riêng biệt. Ở giai đoạn chuẩn bị hỗn hợp phản ứng, phải chú ý bố trí phòng riêng biệt với đèn UV. Phải sử dụng gang tay sạch cho mọi bước PCR cũng như thay thế các pipet. Thuộc thủ dùng trong PCR phải được chuẩn bị riêng biệt và chỉ được dùng cho mục đích này. Các mẫu phải được giữ riêng biệt với các mẫu DNA khác. Phần riêng có kiểm soát (kiểm soát bên trong), ngoài trừ DNA khuôn mẫu, phải luôn được thực hiện, để kiểm tra sự nhiễm bẩn



Đã được đăng tải trên trang web của Bộ Y tế Việt Nam, Cổng thông tin y học (http://www.vietnam.gov.vn) và các trang web khác.
Ths. Nguyễn Văn Hùng là tác giả