



3. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Kết hợp của RAPD và RFLP = PCR + R.E

Các bước:

1. Cắt giới hạn DNA (bằng enzyme cắt giới hạn R.E)
2. Gắn các đoạn adapters tương thích đầu cắt RE
3. PCR
4. Southern blot

11/4/2021

<https://www.youtube.com/watch?v=YJNZQm7b7-s>
TS. Nguyen Ngoc Phuong Thao

129




CHƯƠNG 5 PCR và CÁC ỨNG DỤNG TRONG KỸ THUẬT DI TRUYỀN


TS. Nguyễn Ngọc Phương Thảo


Email: Thao.nnp@vlu.edu.vn

130




QUESTION

 1. PCR viết tắt của từ gì?

 2. PCR đã được sử dụng trong các kỹ thuật di truyền nào đã được học ở các chương trước?

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 131

131



MỤC TIÊU

- SV có khả năng trình bày **nguyên tắc** của kỹ thuật PCR và các biến thể khác
- SV có thể giải thích **cách thực hiện** và phân tích **các ứng dụng** thực tế

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 132

132



NỘI DUNG

1. Nhắc lại nguyên tắc của kỹ thuật PCR truyền thống
2. Các biến thể của kỹ thuật PCR và ứng dụng
 - nested PCR
 - multiplex PCR
 - allele-specific PCR
 - **real-time quantitative PCR**
 - **reverse transcriptase PCR**
3. Thảo luận: Quy trình thiết kế bộ kit PCR chẩn đoán bệnh nhiễm

11/4/2021

Nguyễn Ngọc Phương Thảo

133

133

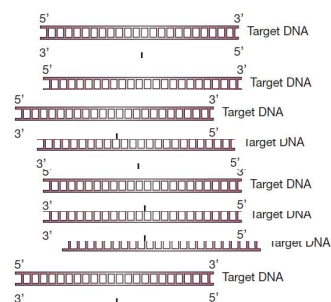
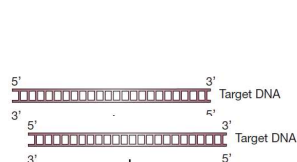


1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

PCR TRUYỀN THỐNG



Tổng lượng DNA khuếch đại = $m \times 2^n$

m: Là số bản sao của chuỗi mã hóa.

n: Là số chu kỳ.

11/4/2021

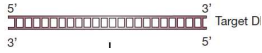
Nguyễn Ngọc Phương Thảo

134

134


1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

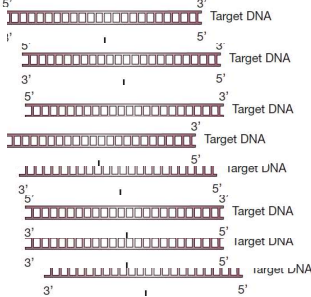
CÁC THÀNH PHẦN CỦA PHẢN ỨNG PCR



Target DNA

Máy luân nhiệt





Target DNA

target LNA

- DNA template
- Primers: forward, reverse
- dNTPs
- Buffer
- Enzyme DNA polymerase

11/4/2021

Nguyễn Ngọc Phương Thảo

135

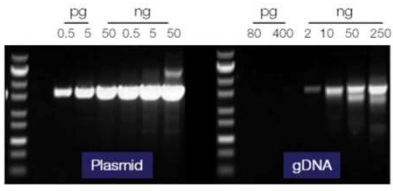
135

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

CÁC THÀNH PHẦN QUAN TRỌNG PCR

DNA khuôn (template):

- Hàm lượng vừa đủ (0.1-1ng plasmid, 5-50ng genomic DNA/50ul phản ứng)
- Tinh sạch, không chứa các chất ức chế phản ứng (SDS, ethanol, protein, RNA..)
- OD 260/280 nm=1.8-2.0
- Có thể tối ưu



Hình 1. So sánh kết quả PCR với plasmid so với mẫu gDNA của người. Cùng một loại DNA polymerase đã được sử dụng để khuếch đại mục tiêu 2 kb từ các lượng DNA đầu vào khác nhau trong các điều kiện được khuyến nghị.

<https://tapchisinhhoc.com/pcr-6-thanh-phan-quan-trong-can-hieu-cho-dung.html/>

11/4/2021

Nguyễn Ngọc Phương Thảo

136

136

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

CÁC THÀNH PHẦN QUAN TRỌNG PCR

Mồi (primers):

Nên	Tránh
<ul style="list-style-type: none"> 15-30 nucleotides Nhiệt độ nóng chảy T_m (melting temperature) = 55-70 °C, hai mồi không chênh nhau quá 5 °C 40-60% GC phân bố đồng đều Một C hoặc G ở đầu 3' Nồng độ 0.1-1uM 	<ul style="list-style-type: none"> Cấu trúc bậc 2 Các trình tự lặp ngược chiều Nhiều hơn 3G hoặc C ở đầu 3' <div style="margin-top: 10px;"> <p>• Hairpin loop</p> <pre style="font-family: monospace; font-size: 0.8em;"> 5' GGGAAA 3' TATCTAGGACCTTA </pre> </div> <div style="margin-top: 10px;"> <p>• Self-complementary</p> <pre style="font-family: monospace; font-size: 0.8em;"> 5' GGGAAAATTCAGGATCTAT 3' 3' TATCTAGGACCTTAAAAGGG 5' </pre> </div> <div style="margin-top: 10px;"> <p>• Primer-dimer</p> <pre style="font-family: monospace; font-size: 0.8em;"> Primer-primer dimers: 5'-TACTTATGCTAGATGGATATCAAGATCG-3' : : : : : : : : : : 3'-TAAATCAGATGTAGCTATATCTAGCATATC-5' GC = -6.63 kcal mol⁻¹ </pre> </div>

11/4/2021 Nguồn: <https://www.slideshare.net/MetheeSri/pcr-primer-design-english-version137>

137

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

QUESTION

Nếu các mồi được thiết kế ngắn và không có G/C ở đầu 3' thì kết quả phản ứng PCR sẽ như thế nào?

- A. PCR không xảy ra
- B. PCR ngưng sau 1 chu kỳ nhiệt
- C. Sản phẩm PCR sẽ bị ngắn hơn mong đợi
- D. Sản phẩm PCR sẽ có nhiều đoạn không đặc hiệu

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 138

138

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

CÁC THÀNH PHẦN QUAN TRỌNG PCR

Mồi (primers) T_m

$T_m = 2 \times (\text{no. of [A+T]}) + 4 \times (\text{no. of [G+C]})$

Annealing temp. = T_m of primer - 5

Sequence	T _m (°C)	Annealing Temp. (°C)
5' GAT TAC TTG GGC AAG GCC GA 3'	62	57
5' ATG GGC AAT AAT TTG GGA 3'	50	45
5' ATT GGC AAG TTG AAG GCG GGG 3'	64	59
5' TTG TTG AAG AGC CCC GGA C 3'	60	55

Melting Temperature (T_m) Calculation

Primer (6-50 bases):
 GTATGTGTGTATATATATGT Compute T_m

LENGTH: 20
 C+G%: 25
 Molecular weight: 6272.715

Basic T_m
 Degenerated nucleotides are allowed

Base-Stacking T_m
 Degenerated nucleotides are NOT allowed

Primer concentration: 200 nM
 Salt concentration: 50 mM
 Mg²⁺ concentration: 0 mM

T_m: **41.3 °C**
 Enthalpy: -145.6
 Entropy: -430.95

11/4/2021

<http://nailico.edu.es/tm.php?primer=GTATGTGTGTATATATATGT&NearestNeighbor=1&cp=200&cs=50&cmg=0>
 Nguyễn Ngọc Phương Thảo

139

139

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

CÁC THÀNH PHẦN QUAN TRỌNG PCR

Mồi (primers) T_m

Nhiệt độ nóng chảy của DNA = nhiệt độ làm tách 50% mạch đôi phân tử DNA

T_m: temperature that makes dsDNA → ssDNA 50%

$T_m = 2 \times (\text{no. of [A+T]}) + 4 \times (\text{no. of [G+C]})$

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
140

140

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

CÁC THÀNH PHẦN QUAN TRỌNG PCR

Mồi (primers):

Primer concentration (μM , each)

	0.04	0.1	0.25	0.5	1
--	------	-----	------	-----	---

Hình 3. PCR gDNA của người với nồng độ mồi thay đổi. Một đoạn 0.7 kb với hàm lượng GC cao được khuếch đại trong các thí nghiệm này. Chú ý đến sự tích tụ của các sản phẩm không đặc hiệu và primer-dimer ở nồng độ mồi cao.

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
<https://tapchisinhhoc.com/pcr-6-thanh-phan-quan-trong-can-hieu-cho-dung.html/>
141

141

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

CÁC THÀNH PHẦN QUAN TRỌNG PCR

Deoxynucleoside triphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

- $[A] = [T] = [C] = [G]$ (từ 20-200 μM , thường 50 μM each)
- Nồng độ cao có thể ức chế phản ứng
- Đối với sản phẩm PCR dài hơn, cần tăng nồng độ dNTPs

DNA polymerase enzyme

- Taq polymerase:
 - ổn định nhiệt cao (chu kỳ bán hủy 40ph, 95 $^{\circ}\text{C}$),
 - tốc độ tổng hợp: 60 base/s ở 70 $^{\circ}\text{C}$,
 - độ dài sản phẩm đến 5kb
- 1-2U/50ul phản ứng. Nồng độ cao có thể xuất hiện sản phẩm không đặc hiệu.
- Các thế hệ enzyme mới cải thiện hiệu suất PCR

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
142

142

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

CÁC THÀNH PHẦN QUAN TRỌNG PCR

Ion Mg²⁺

- Là cofactor của enzyme DNA polymerase
- Tạo điều kiện cho mỗi bám lên khuôn
- Thường được phân phối ở dạng MgCl₂, MgSO₄
- Nồng độ tối ưu: 1-4mM

Hình 7. PCR với các nồng độ Mg²⁺ khác nhau. Bản trên cùng là băng mong muốn với kích thước 2.8 kb từ gDNA người.

11/4/2021

Nguyễn Ngọc Phương Thảo

<https://tapchisinhhoc.com/pcr-6-thanh-phan-quan-trong-can-hieu-cho-dung.html/>

143

143

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

CÁC THÀNH PHẦN QUAN TRỌNG PCR

Đệm (buffer)

- Tạo pH 8-9.5 (dùng Tris HCl)
- K⁺ thúc đẩy quá trình gắn mồi
- NH₄⁺ tăng tính đặc hiệu

Hình 9. Kết quả PCR từ nhiều nồng độ Mg²⁺ trong hai loại đệm khác nhau, nói lên tầm quan trọng của việc chọn lựa đệm để đạt được tính đặc hiệu PCR. Một đoạn 0.95 kb được khuếch đại từ gDNA người với Taq DNA polymerase trong các phản ứng này.

11/4/2021


Nguyễn Ngọc Phương Thảo

<https://tapchisinhhoc.com/pcr-6-thanh-phan-quan-trong-can-hieu-cho-dung.html/>

144

144

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



CÁC THÀNH PHẦN QUAN TRỌNG PCR

Một số chất phụ gia khác

- Giúp cải thiện độ đặc hiệu: giảm sự gắn nhầm sai
- Tăng hiệu quả khuếch đại: loại bỏ cấu trúc thứ cấp
- Dùng trong một số ứng dụng nhất định (ví dụ khi khuếch đại khuôn giàu GC)

Bảng 2. Các chất phụ gia phổ biến được dùng để cải thiện PCR, và nồng độ khuyến nghị của chúng


Hóa chất	Nồng độ cuối cùng
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	1–10%
Glycerol	5–20%
Formamide	1.25–10%
Bovine serum albumin (BSA)	10–100 µg/mL
Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	15–30 mM
Polyethylene glycol (PEG)	5–15%
Gelatin	0.01%
Nonionic detergents (e.g., Tween 20, Triton X-100)	0.05–0.1%
N,N,N-trimethylglycine (betaine)	1–3 M

<https://tapchisinhhoc.com/pcr-6-thanh-phan-quan-trong-can-hieu-cho-dung.html/>

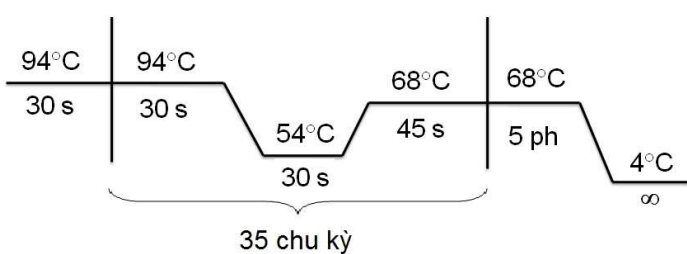
11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
145

145

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



CHU TRÌNH NHIỆT TRÊN MÁY PCR



Biến tính


Bắt cặp mới
5°C dưới T_m

Kéo dài

Bảo quản

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
146

146



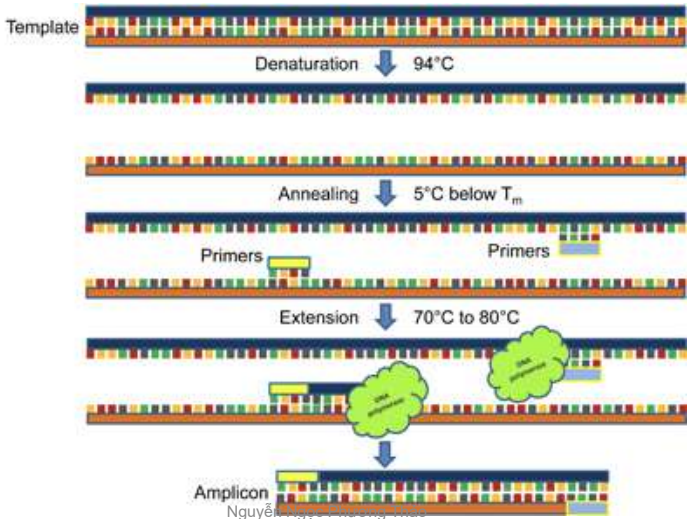
VANLANG
UNIVERSITY

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận


CHU TRÌNH NHIỆT TRÊN MÁY PCR



11/4/2021 147

Nguyễn Ngọc Phương Thảo

147



VANLANG
UNIVERSITY

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

QUESTION


Nếu nhiệt độ bắt cặp mỗi được cài đặt tăng thì phản ứng PCR sẽ

- Tăng độ đặc hiệu
- Giảm độ đặc hiệu
- Tăng hiệu suất
- Giảm hiệu suất

11/4/2021 148

Nguyễn Ngọc Phương Thảo

148



VANLANG
UNIVERSITY

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận


QUESTION

Nếu tăng thời gian của giai đoạn kéo dài thì phản ứng PCR sẽ

- A. Tăng độ đặc hiệu
- B. Giảm độ đặc hiệu
- C. Tăng hiệu suất
- D. Giảm hiệu suất

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
149

149



VANLANG
UNIVERSITY

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

QUESTION

Kết quả của phản ứng PCR ra sao nếu bất kỳ tình huống nào sau đây xảy ra: (1) không có primers trong phản ứng, (2) không có dNTPs trong phản ứng, (3) không có Taq polymerase trong phản ứng

- A. PCR diễn ra bình thường
- B. Sản phẩm PCR không đặc hiệu của một khuôn ngẫu nhiên sẽ hình thành
- C. Phản ứng sẽ giảm và ngưng sau vài chu trình nhiệt
- D. Phản ứng PCR không xảy ra

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
150

150



BÀI TẬP

- Cho trình tự gene 16S-rRNA (AJ422059). Ứng dụng công cụ Primer - BLAST thiết kế môi chạy PCR khuếch đại gene 16S-rRNA. Cho biết vùng để chọn Forward primer từ nucleotide 1 đến 50, Reverse primer từ 450 đến 519.
- Sản phẩm khuếch đại có kích thước:

Môi	Trình tự (5'-3')	Kích thước (nu)	Từ nu	Đến nu	Tm (°C)
Môi xuôi					
Môi ngược					

11/4/2021

Nguyễn Ngọc Phương Thảo

151

151



1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

NỘI DUNG

1. Nhắc lại nguyên tắc của kỹ thuật PCR truyền thống

2. Các biến thể của kỹ thuật PCR và ứng dụng

- nested PCR
- multiplex PCR
- allele-specific PCR
- overlapped extension PCR
- reverse transcriptase PCR
- **real-time/quantitative PCR**

3. Thảo luận: Thiết kế bộ kit PCR chẩn đoán bệnh nhiễm

11/4/2021

Nguyễn Ngọc Phương Thảo

152

152

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

2.1 MULTIPLEX PCR

Là một dạng của PCR thông thường, ở đó, 2 hoặc nhiều hơn 2 locus được khuếch đại cùng một lúc, sử dụng tương ứng từ 2 cặp mồi.

Sử dụng để phát hiện virus, vi khuẩn, các đột biến, đa hình....

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo

153

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

2.1 MULTIPLEX PCR

Nhược điểm: độ nhạy, độ đặc hiệu kém.

Khắc phục:

- Thiết kế primers: 18-22b, Tm 55-60°C, có tính đặc hiệu, độ nhạy cao.
- Tối ưu điều kiện phản ứng
- PCR set up

Ưu điểm:

- Kết hợp sẵn sàng đối chứng dương để phát hiện dương tính giả.
- Tiết kiệm thời gian, chi phí

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
154

154

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

2.1 MULTIPLEX PCR

Ứng dụng mPCR chẩn đoán chủng *E. coli* gây tiêu chảy ở người

Phát hiện đồng thời các gene độc lực

- Eae* (attaching and effacing) mã hoá protein intimin vai trò trong định vị vi khuẩn ở ruột, có ở chủng EPEC
- Sxt* (shiga toxin) độc tố ruột có ở chủng EHEC, EPEC
- ipaH*: gene độc lực có ở chủng EIEC

Gen	Chủng			
	EPEC	EHEC	EIEC	EC
<i>eae</i> (376 bp)	+	+	-	-
<i>stx</i> (298 bp)	-	+	-	-
<i>ipaH</i> (620 bp)	-	-	+	-

Hình 4: Kết quả khuếch đại gen độc lực bằng phản ứng multiplex-PCR.
(1: EHEC; 2: EIEC; 3: EPEC; M: Marker Φ X 174 cắt bằng *Hae* III)

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
http://220.231.117.26/TapChi_YDHQS/Data/TapTinBaiVietPDF/TCYDHQS%20SO%202%202018%20phan%20I.doc_04.pdf
155

155

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

2.2 NESTED PCR

Nested PCR là gì?


2 cặp mồi được sử dụng để khuếch đại số lượng đoạn DNA mục tiêu. Lần đầu PCR với cặp mồi outer. Sản phẩm của lần 1 là mẫu cho lần PCR 2 với cặp mồi inner.

By: tutorialscan.com

The set up of inner as well as an outer set of primers in nested PCR.

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
156

156



VANLANG
UNIVERSITY

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

2.2 NESTED PCR

Ưu điểm:


- Tăng tính đặc hiệu
- Tăng độ nhạy
- Được áp dụng trong trường hợp có rất ít mẫu gốc

Nhược điểm:
Khả năng tạp nhiễm tăng trong quá trình chuyển mẫu giữa 2 lần PCR

Khắc phục:?

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
157

157



VANLANG
UNIVERSITY

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

2.2 NESTED PCR

Ứng dụng nPCR phát hiện 18S ribosomal DNA của vi nấm *Penicillium marneffe* trong mẫu huyết thanh

Đặc điểm: Vi nấm phát triển rất chậm; lượng DNA trong mẫu huyết thanh rất thấp (4ng/ul)

Outer primers: 630bp ; Inner primers 400 bps


Độ nhạy đối với đối chứng dương (gDNA *P. marneffe*): 4 pg/ul với 15 chu kỳ nhiệt và 0,4 fg/ul ở 30 chu kỳ nhiệt (4-6 tế bào vi nấm)

Đặc hiệu đối với đối chứng dương: 100% (không khuếch đại bất kỳ DNA lạ nào khi dùng cặp inner primers)

<https://academic.oup.com/mmy/article/47/5/549/1050859>

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
158

158



VANLANG UNIVERSITY

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

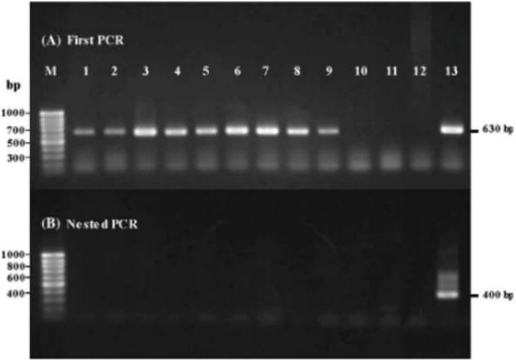
3. Thảo luận

2.2 NESTED PCR

Ứng dụng nPCR phát hiện 18S ribosomal DNA của vi nấm *Penicillium marneffei* trong mẫu huyết thanh


Fig. 1 Specificity of the nested PCR. Spiked DNA in lane 1, *Aspergillus flavus*; 2. *Histoplasma capsulatum*; 3. *Candida albicans*; 4. *Candida krusei*; 5. *Cryptococcus neoformans*; 6. *Fusarium* spp.; 7. *Rhodotorula* sp.; 8. *Rhizopus* sp.; 9. *Cladosporium* spp.; 10. *Pythium insidiosum*; 11. a bacterium *Streptococcus pyogenes*; 12. human DNA; and 13. *Penicillium marneffei*. (A) First PCR (pan-fungal PCR). A product of 630-bp was amplified from sera spiked with fungal DNA. (B) Nested PCR specific from *Penicillium marneffei*. A 400-bp product was amplified specifically for the serum spiked with DNA of *Penicillium marneffei* (lane 13). M indicates a 100-bp DNA marker (Fermentas).

<https://academic.oup.com/mmy/article/47/5/549/1050859>



11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
159

159



VANLANG UNIVERSITY

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

2.3 ALLELE SPECIFIC PCR

As PCR là gì?

- PCR trực tiếp phát hiện bất kỳ đột biến điểm nào trên DNA
- Sử dụng oligonucleotide primer đầu 3' mismatch với khuôn DNA

Ưu điểm: đơn giản, hiệu quả

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
160

160

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.3 ALLELE SPECIFIC PCR

Wild Type Match Primer **Variant Match Primer**

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo / Thrombosis Research 130 (2012) 104–109 161

161

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.3 ALLELE SPECIFIC PCR

Ứng dụng As PCR:

Phát hiện các đột biến điểm trên các gene BIN1 rs744373, CLU rs11136000, ABCA7 rs3764650, CR1 rs3818361, PICALM rs3851179 liên quan đến nguy cơ phát triển Alzheimer

11/4/2021 <https://bmcmegenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-14-27> 162

162

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

2.3 Reverse transcriptase PCR

Reverse transcriptase PCR là gì?

- Tổng hợp cDNA từ RNA và khuếch đại số lượng cDNA
- Nhờ vào enzyme reverse transcriptase: enzyme phiên mã ngược.
- Và DNA polymerase

mRNA/RNA → cDNA → DNA

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
163

163

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

2.3 Reverse transcriptase PCR


Nguyên tắc

The diagram illustrates the process of Reverse Transcriptase PCR. It starts with an RNA molecule (red bar) and a primer (yellow bar). The process involves Reverse Transcription, where the RNA is converted into cDNA (green bar). This is followed by PCR, which results in Amplified DNA (multiple green bars). The final step is Amplification, showing the exponential increase in the number of DNA molecules.

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
164

164

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



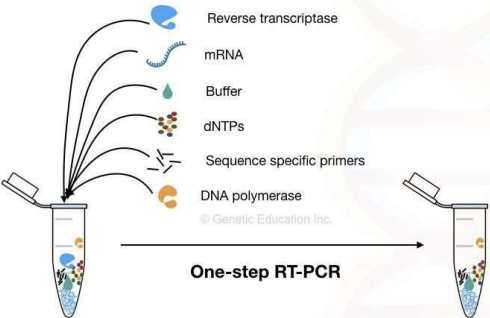
2.3 Reverse transcriptase PCR

Thực hiện:

Rtase: 42-45 °C

Trở ngại:

- Bắt cặp primer ở nhiệt độ thấp
- Cấu trúc RNA bậc 2




Giải pháp: enzyme chịu nhiệt, thực hiện cùng lúc 2 chức năng reverse transcriptase và DNA polymerase *Thermus thermophilus*

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
165

165

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



2.3 Reverse transcriptase PCR

Ứng dụng:

- Chẩn đoán bệnh do virus RNA
- Định lượng mức độ phiên mã của gene (số lượng mRNA)
- Tạo thư viện cDNA từ hỗn hợp mRNA


11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
166

166

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận



2.3 Reverse transcriptase PCR

Ứng dụng chẩn đoán bệnh lở mồm long móng ở gia súc

- Bệnh virus, cấp tính, lây lan rất nhanh
- RT-PCR chẩn đoán nhanh, chính xác, và phát hiện được cả trong giai đoạn chưa có triệu chứng
- Sử dụng các cặp mồi:
 - Cặp mồi 1F/1R xác định các tuýp O, A, C, asia-1
 - Cặp mồi P33/38 type O, P33/P87 type A, P33/40 type C, P33/74 type asia-1
- Các bước thực hiện:
 - Tách chiết RNA từ bệnh phẩm
 - Tạo cDNA
 - Khuếch đại PCR
 - Kiểm tra sản phẩm


11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
PCR và các ứng dụng, TS Nguyễn Ngọc Hải

167

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận



2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR là gì?

- **Real-time PCR = PCR + đọc kết quả lượng DNA hình thành trong suốt quá trình phản ứng**
- Thiết bị = máy luân nhiệt + quang phổ đo cường độ huỳnh quang (spectrofluorometry)+ phần mềm máy tính xử lý kết quả

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
168

168

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.4 REAL-TIME PCR

Spectrofluorometry

Syber Green: absorbs 497nm, emits 520 nm

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
169

169

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.4 REAL-TIME PCR

Thành phần của phản ứng RT PCR

- DNA template
- Primers: forward, reverse
- dNTPs
- Buffer
- Enzyme DNA polymerase

+ detector

Detector :

- Chất nhuộm huỳnh quang **Syber green**
- Detective probe: **Taqman**

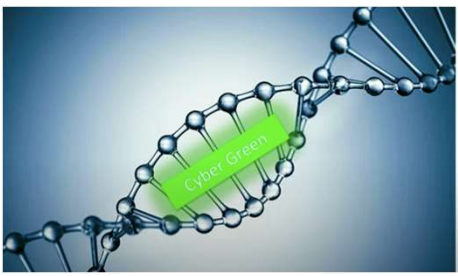
11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
170

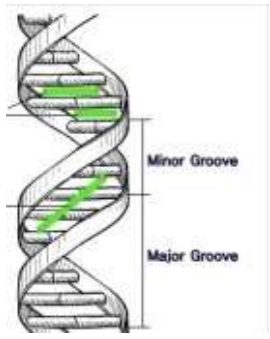
170

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR/Syber green





- **Syber Green** bám lên DNA (minor groove, giàu AT) tạo phức hợp DNA-dye complex
- **Syber Green**: hấp thụ blue light 497nm, phát huỳnh quang green light 520 nm
- **Phát hiện tất cả** các phân tử dsDNA trong phản ứng

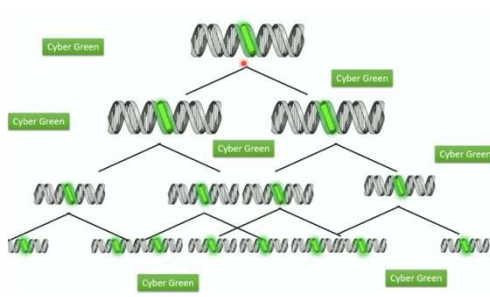
11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
171

171

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR/Syber green



Ưu điểm:

1. Rẻ, dễ dùng, nhạy, hiệu quả
- 2.

Nhược điểm:


4. Không đặc hiệu với sản phẩm PCR mục tiêu
- 8.

Giải pháp??

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
172


172

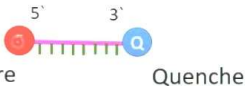
1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR/Specific Detection: **Detective probe (TaqMan)**






Fluorophore Quencher

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
173

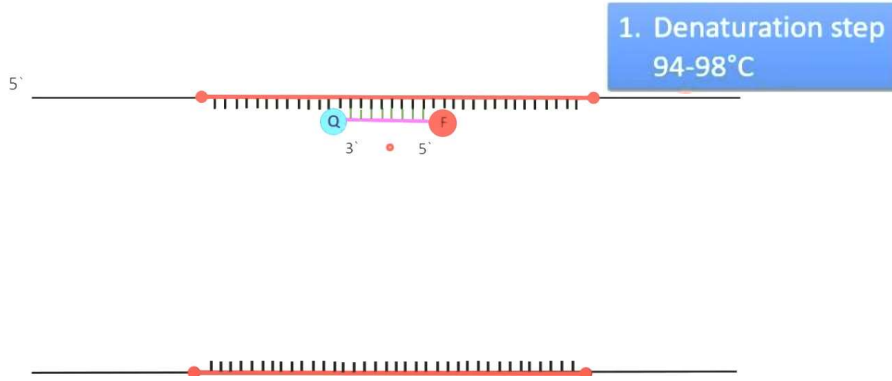
173

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



2.4 REAL-TIME PCR


RT PCR/Specific Detection: **Detective probe (TaqMan)**



11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
174

174

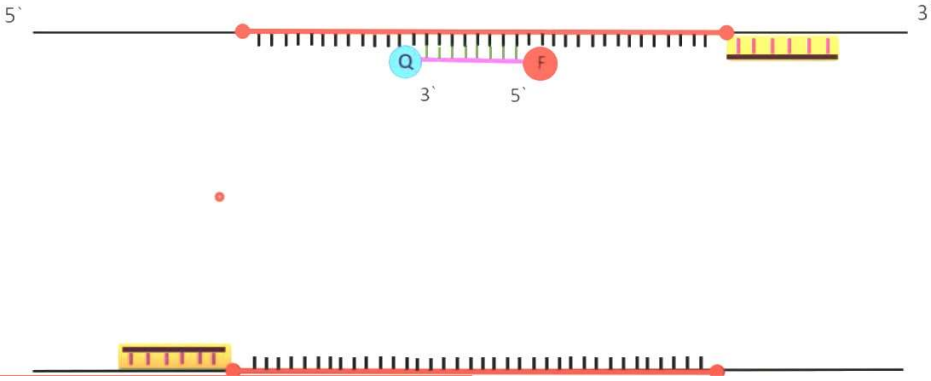
1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR/Specific Detection: **Detective probe (TaqMan)**


2. Annealing step
50-65°C



11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
175

175

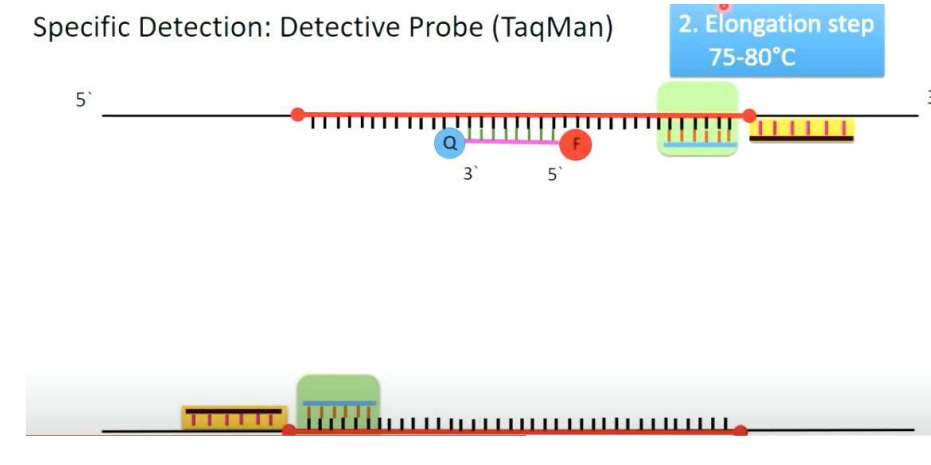
1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



2.4 REAL-TIME PCR

Specific Detection: Detective Probe (TaqMan)

2. Elongation step
75-80°C



11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
176

176

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.4 REAL-TIME PCR

Specific Detection: Detective Probe (TaqMan)

2. Elongation step 75-80°C

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 177

177

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.4 REAL-TIME PCR

Specific Detection: Detective Probe (TaqMan)

2. Elongation step 75-80°C

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 178

178

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.4 REAL-TIME PCR

Specific Detection: Detective Probe (TaqMan)

2. Elongation step 75-80°C

5' 3'

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 179

179

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.4 REAL-TIME PCR

Specific Detection: Detective Probe (TaqMan)


2. Elongation step 75-80°C

5' 3'

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 180

180

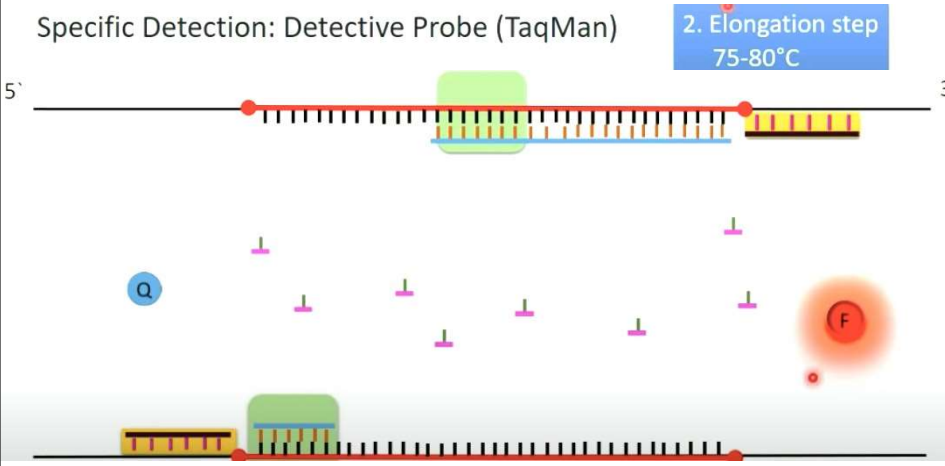
1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



2.4 REAL-TIME PCR

Specific Detection: Detective Probe (TaqMan)


2. Elongation step
75-80°C



11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
181

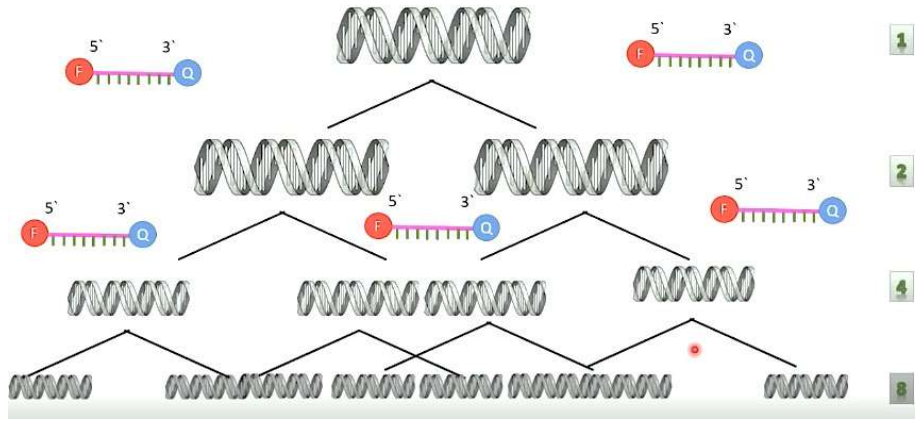
181

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận



2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR/Specific Detection: Detective probe (TaqMan)



11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
182

182

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR/Specific Detection: **Detective probe (TaqMan)**

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 183

183

1. PCR truyền thống 2. Các loại PCR và ứng dụng 3. Thảo luận

VANLANG UNIVERSITY

2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR/Specific Detection: **Detective probe (TaqMan)**

Ưu điểm:

- Đặc hiệu trên sản phẩm PCR mục tiêu
- Multiplex RT-PCR: PCR và detect nhiều gene trong cùng 1 tuýp phản ứng
- Nhanh

Nhược điểm: Đắt tiền, false result (rare)

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 184

184

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận

2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR-**Amplification curves**

C_q (quantification cycles): số chu kỳ mà tín hiệu huỳnh quang bắt đầu được phát hiện (ngưỡng phát hiện)

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 185

185

1. PCR truyền thống
2. Các loại PCR và ứng dụng
3. Thảo luận


2.4 REAL-TIME PCR

RT PCR-**Amplification curves**

C_q (quantification cycles) vs. nồng độ DNA khuôn

11/4/2021 Nguyễn Ngọc Phương Thảo 186

186



VANLANG
UNIVERSITY

1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng


3. Thảo luận

2.4 REAL-TIME PCR

Ví dụ ứng dụng RT PCR chẩn đoán sớm trẻ sơ sinh bị nhiễm HIV => Thảo luận

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
187

187



VANLANG
UNIVERSITY

CÁC LOẠI PCR KHÁC

- **Hot Start PCR** – in which heat is used to denature antibodies that are used to inactivate Taq polymerase
- **Long-range PCR** – longer ranges of DNA are formed by using a mixture of polymerases
- **Assembly PCR** – longer DNA fragments are amplified by using overlapping primers
- **Asymmetric PCR** – only one strand of the target DNA is amplified
- **In situ PCR** – PCR that takes place in cells, or in fixed tissue on a slide
- **SOE PCR, GC rich PCR, inverse PCR, touch down PCR, LATE PCR.....**

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
188

188



1. PCR truyền thống

2. Các loại PCR và ứng dụng

3. Thảo luận

Thảo luận


Chủ đề 1: ứng dụng RT PCR chẩn đoán sớm trẻ sơ sinh bị nhiễm HIV

- Đọc hiểu nội dung cung cấp
- Thực hiện hỏi đáp giữa các nhóm

Chủ đề 2: yêu cầu thiết kế bộ kit chẩn đoán bệnh nhân COVID19, hãy vạch ra kế hoạch thực hiện và phương án thực hiện

11/4/2021
Nguyễn Ngọc Phương Thảo
189

189



CHƯƠNG 6

KỸ THUẬT DI TRUYỀN VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

GV: Nguyễn Ngọc Phương Thảo

190