



PCR là chữ viết tắt của cụm từ **Polymerase Chain Reaction**, được dịch ra một vài sách là **Phản ứng chuỗi i 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 [tế bào](#) phân chia. Nó làm việc bằng cách nối và nối 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, enzyme 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 mua enzyme DNA polymerase, và phải liên tục lưu ý suốt 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 nhiệt độ cao) và khi dùng trong PCR nó không bị phá vỡ khi đun nóng để tách sợi DNA. Thế 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 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 exonuclease 3'-5' trong quá trình sao chép DNA, dẫn đến đột biến (sai) trong chuỗi DNA, vì nó thiếu 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 lỗi) và có thể làm giảm một cách đáng kể số đột biến xảy ra trong chuỗi DNA được sao chép. Ngày nay, số lượng hợp gia Taq và Pfu có thể cung cấp độ tin cậy cao hơn sự nhân bản chính xác của DNA.

Thực nghiệm PCR



Đoạn mã

Đoạn DNA của khu vực đích được xác định bằng máy chọn lọc. Mã 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 DNA được đo bằng base hay nucleotides) phù hợp một cách chính xác để đi vào một đầu và kết thúc của DNA của khu vực đích. Nó gắn chặt với DNA mẫu những đầu mút và kết thúc, nơi mà DNA-polymerase mới và bắt đầu quá trình tổng hợp của sợi DNA mới.

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

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

Giới thiệu về PCR

Viết bởi Administrator

Thứ sáu, 08 Tháng 6 2012 14:43 -

trình công nghệ phân tích khuếch đại PCR. Vấn đề có thể được giải quyết bằng phương pháp touchdown PCR.

Vấn đề thiết kế mồi chính xác đã được đề cập trên công nghệ thu thập vào sản xuất sản phẩm: - hàm lượng GC nên trong khoảng 40-60% - Tính toán nhiệt độ tính cho công nghệ đo nhiệt độ trong phân tích không khác quá 50 °C và nhiệt độ tính công nghệ phân tích khuếch đại không khác mồi quá 10 °C - Nhiệt độ bám vào thành thông thường hơn nhiệt nóng chảy 50 °C. Tuy nhiên, nên chọn lựa theo kinh nghiệm cho trình trình công nghệ. - Tránh ... - Kết thúc đầu 3' rớt nhụy công nghệ - nó có thể không bổ sung cho bất kỳ vùng nào của đo nhiệt độ trong phân tích và phải cung cấp base chính xác phù hợp với mồi. Có các công nghệ trình trình công nghệ (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 trình công nghệ 1, DNA thông thường được biến tính để trình trình công nghệ chuỗi để đo lường mức độ DNA và mồi được phân tách hoàn toàn và chỉ còn dòng sợi đơn. Thời gian: 1-2 phút

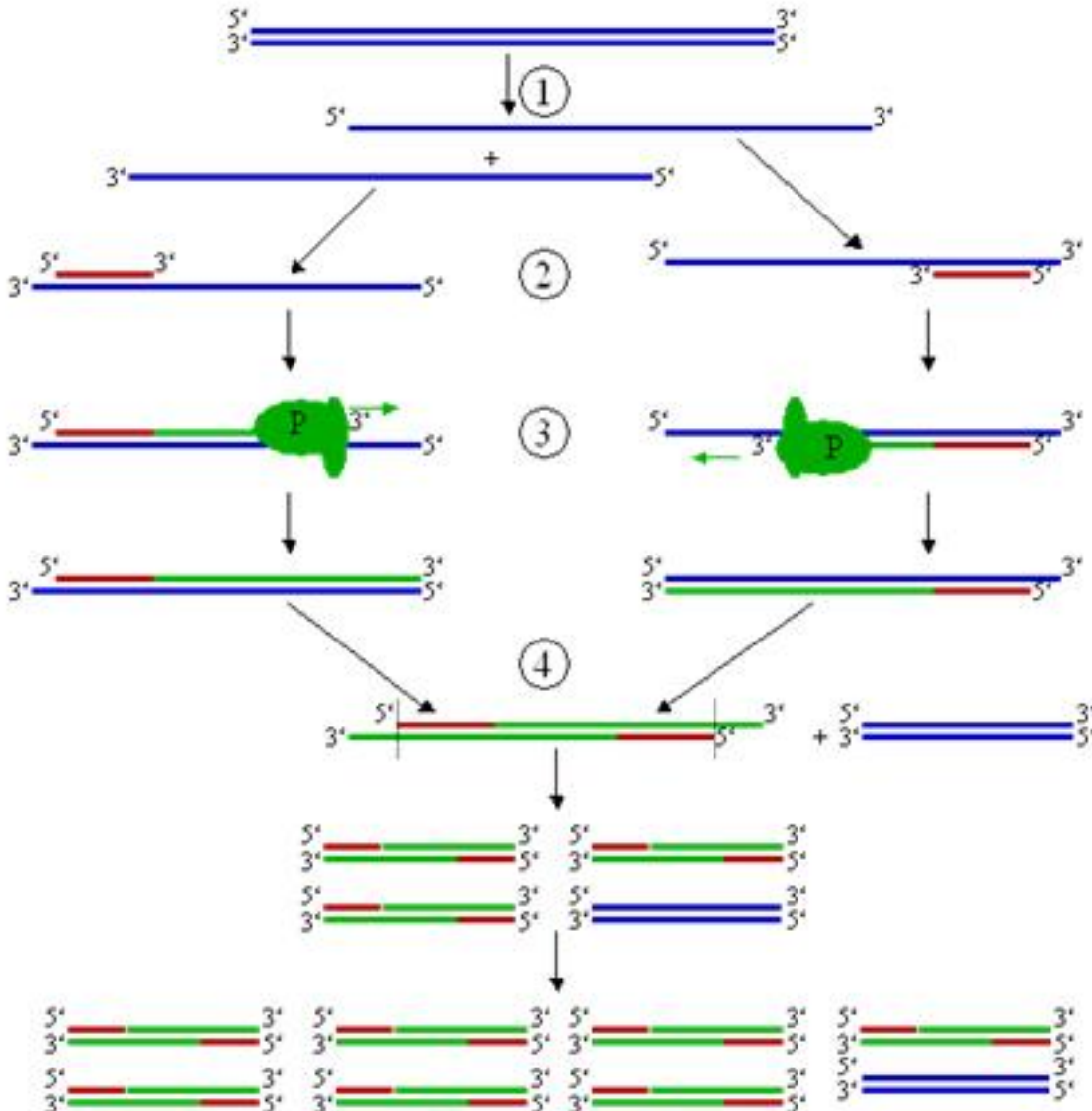
(2) Sau khi 2 sợi DNA tách ra, nhiệt độ được hạ xuống để mồi có thể gắn vào sợi DNA đơn. Bước này gọi là gắn mồi. Nhiệt độ giai đoạn này phụ thuộc vào đo nhiệt độ và thông thường hơn nhiệt độ biến tính 50 °C (45-60 °C). Sự dòng sai nhiệt độ trong giai đoạn này dẫn đến việc đo nhiệt độ không gắn hoàn 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 công nghệ DNA-polymerase và chiều dài mẫu như DNA công nghệ khuếch đại. Nhiệt độ quy trình ..., 1000bp/ 1 phút.

Giới thiệu về PCR

Vị trí Administrator

Thứ sáu, 08 Tháng 6 2012 14:43 -



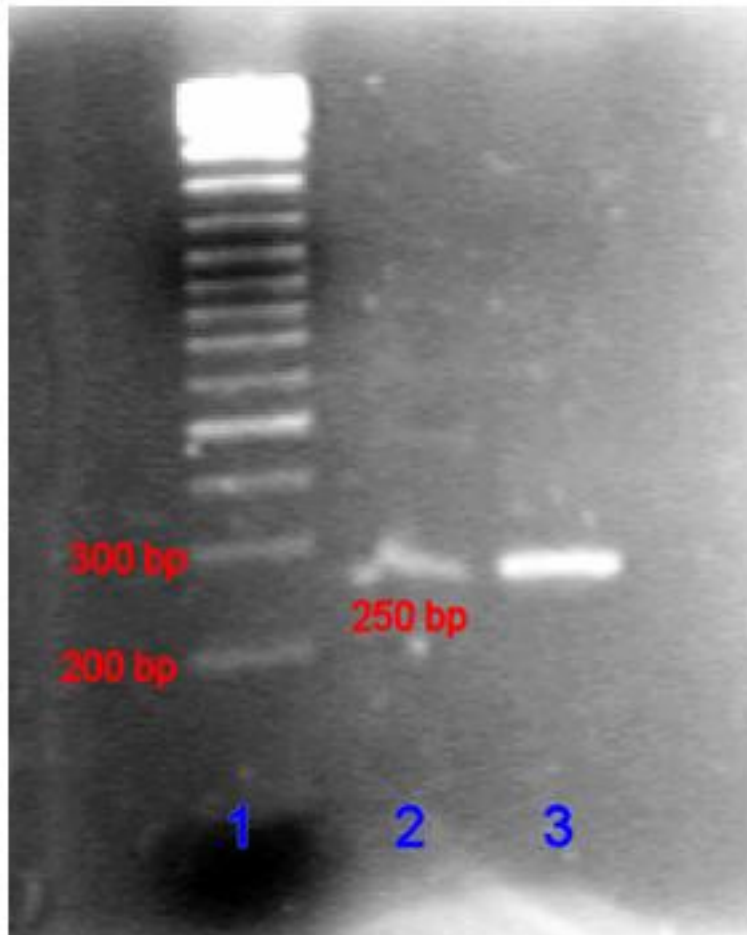
Hình 20.10 Các bước của PCR (1) Nhiệt độ nóng chảy để tách DNA ban đầu (2) DNA đơn chuỗi (3) DNA dài
Tổ chức hóa PCR

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 phòng riêng biệt với đèn UV. Phải sử dụng găng tay sạch cho mọi bước PCR cũng như thay thế các pipet. Thuộc thể 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 sản phẩm

Giới thiệu về PCR

Vị trí Administrator

Thứ sáu, 08 Tháng 6 2012 14:43 -



Đã gửi file về địa chỉ email của bạn. Vui lòng kiểm tra địa chỉ email của bạn để tải file về. Nếu không nhận được file, vui lòng liên hệ bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi.