

MỘT SỐ GIẢI PHÁP ĐỂ TỐI ƯU VÀ TĂNG TỐC PHẢN ỨNG PCR

Kỹ thuật PCR được tiến hành hàng ngày trong hầu hết các phòng thí nghiệm trên toàn thế giới. PCR hiện là phương pháp nhanh nhất và an toàn nhất để khuếch đại ADN, tuy nhiên phương pháp này chịu ảnh hưởng của một số yếu tố như ADN mẫu làm khuôn, chất lượng của enzyme ADN polymerase, chất lượng của môi, và đặc biệt là thiết bị và dụng cụ. Do đó, nhu cầu tăng tốc và tối ưu hóa các phản ứng PCR là rất lớn và nó có thể được tiếp cận theo nhiều cách khác nhau. Bài viết này giới thiệu một số giải pháp giúp tối ưu và tăng tốc phản ứng PCR.

Một vài nét về kỹ thuật PCR

Phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) là kỹ thuật cho phép khuếch đại một đoạn gen trong ống nghiệm dựa vào các chu kỳ nhiệt. Dựa vào các thành phần phản ứng cần thiết, đoạn gen mục tiêu sẽ được nhân bản ra hàng triệu bản sao giống nhau, từ đó phục vụ những mục đích nghiên cứu tiếp theo. Đây được xem là một quá trình cơ bản cho việc phát triển của hàng loạt công nghệ phân tích gen và hệ gen sau này.

Kỹ thuật PCR được nhà hóa sinh học người Hoa Kỳ Kary Mullis (1944-2019) phát triển vào năm 1985 dựa trên ý tưởng muốn xây dựng một quy trình giúp đoạn ADN có thể nhân lên nhiều lần một cách nhân tạo qua nhiều chu kỳ phản ứng thông qua xúc tác của enzyme ADN polymerase. Ý tưởng này được ấp ủ khi ông muốn khuếch đại (tạo ra nhiều bản sao) một đoạn ADN mà không cần sử dụng các sinh vật sống như vi khuẩn *E. coli* hay nấm men để tách sợi đôi ADN thành hai mạch đơn, sau đó sử dụng

các cặp môi bổ sung để bắt cặp với mạch đơn, tái bản nhờ enzyme ADN polymerase. Khó khăn lớn nhất trước đây trong việc phân tích gen là ở chỗ chúng là những mục tiêu đơn lẻ và rất nhỏ trong một hệ gen phức tạp, khổng lồ. Kỹ thuật PCR ra đời đã thay đổi tất cả, giúp chúng ta có thể tạo ra một số lượng lớn các bản sao của một đoạn ADN mong muốn. Kết quả này đã mang lại cho Kary Mullis Giải thưởng Nobel về hóa học năm 1993.

Thành công của Kary Mullis trong việc phát triển kỹ thuật PCR có sự đóng góp rất lớn của một loạt nghiên cứu từ những năm 50 của thế kỷ trước. Cụ thể, Arthur Komberg, một nhà hóa sinh người Hoa Kỳ đã bắt đầu nghiên cứu cơ chế sao chép ADN và phát hiện ra enzyme ADN polymerase vào khoảng những năm 50. Đến năm 1953, James D. Watson (Hoa Kỳ) và Francis Crick (Anh) đã tìm ra cấu trúc mạch đôi của phân tử ADN. Họ cho rằng với cấu trúc như vậy, thông tin di truyền có thể được sao chép và nhân lên. Đến những năm 60, một phương pháp tương tự cho phép nhân đôi mạch ADN

nhờ cặp môi và ADN polymerase đã được xây dựng bởi Kjell Kleppe (Na Uy) và Har Gobind Khorana (Hoa Kỳ). Tuy nhiên, Kary Mullis với kỹ thuật PCR đã tỏ ra ưu thế hơn hẳn nhờ sử dụng chu kỳ nhiệt, cho phép nhân bản sợi ADN một cách nhanh chóng với số lượng lớn.

Một điểm thú vị là enzyme ADN polymerase phân lập từ *E. coli* không bền nhiệt, cần được bổ sung sau giai đoạn nung nóng của mỗi chu kỳ nhiệt, vì vậy quy trình này rất chậm, tốn kém và mất nhiều công sức. Vấn đề này đã được giải quyết khi nhà vi sinh vật học Thomas Brock (Hoa Kỳ) tình cờ phát hiện ra vi khuẩn chịu nhiệt *Thermophilus aquaticus* (hay Taq) ở khu vực suối nước nóng (>70°C) tại Công viên quốc gia Yellowstone, Hoa Kỳ vào đầu những năm 60. Việc phát hiện ra enzyme Taq polymerase đã giúp PCR trở thành một cuộc cách mạng trong di truyền học phân tử, là một trong những kỹ thuật cơ bản được ứng dụng ở tất cả các phòng thí nghiệm trên thế giới hiện nay.

Ứng dụng của kỹ thuật PCR

Hiện nay, kỹ thuật PCR được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau, từ y học, cổ sinh vật học đến pháp y... Một trong những ứng dụng phổ biến nhất của PCR là trong lĩnh vực khoa học pháp y. Trước khi ra đời kỹ thuật PCR, một mẫu ADN nhỏ có thể không đủ để thực hiện xét nghiệm chính xác và đưa ra kết luận chắc chắn. Tuy nhiên, bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR, các nhà nghiên cứu có thể tạo đủ lượng ADN để xác định hài cốt từ các vụ tai nạn hay thảm họa trong quá khứ... Tương tự, các mẫu ADN nhỏ được phục hồi từ hiện trường vụ án có thể được sao chép bằng PCR và sau đó được kiểm tra để xác định hoặc giúp loại trừ các nghi phạm.

Trong y học hiện đại, PCR đã trở thành một công cụ quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu ung thư. PCR được sử dụng để phát hiện một số bệnh ung thư do virus gây ra như ung thư cổ tử cung (gây ra bởi virus u nhú ở người - HPV), ung thư da, ung thư miệng. Một ứng dụng y tế quan trọng khác của PCR là trong quy trình phân loại mô để xem xét khả năng tương hợp giữa mô người hiến tạng và những bệnh nhân cần trải qua cấy ghép nội tạng; lựa chọn phương pháp điều trị thích hợp cho bệnh nhân, xét nghiệm quan hệ di truyền; xác định sớm các bệnh truyền nhiễm cũng như theo dõi sự lây lan của các bệnh truyền nhiễm ở người hoặc động vật. Ngoài ra, PCR có thể xác định cả nhiễm nấm và ký sinh trùng (có thể phát hiện nhiễm HIV ngay cả trước khi bất kỳ kháng thể nào được tạo ra). Khuếch đại ADN cũng được sử dụng thường xuyên để sàng lọc máu được hiến nhằm

ngăn máu nhiễm bệnh xâm nhập vào ngân hàng máu.

Trong lĩnh vực cổ sinh vật học, PCR được sử dụng để khếch đại những mẫu vật ADN tồn tại trong các mô trên một trăm ngàn năm tuổi. Kỹ thuật này có thể được sử dụng trên các mẫu mô xác ướp, hệ thực vật và động vật cổ đại, hoặc các hóa thạch. Do đó, việc sử dụng PCR trong lĩnh vực này giúp chúng ta xác định và tìm hiểu về các sinh vật hiện đã tuyệt chủng cùng các quá trình hóa thạch và tiến hóa.

Kỹ thuật PCR còn tỏ ra hữu ích trong một số khía cạnh của vi sinh vật môi trường. Chúng được sử dụng để giúp phát hiện, xác định vi khuẩn và mầm bệnh có hại trong nguồn nước công cộng; phát hiện các vi sinh vật thoái hóa, nơi chất thải độc hại và sự cố ô nhiễm đã xảy ra.

Tại Việt Nam, PCR và các kỹ thuật dựa trên nền tảng PCR đang được ứng dụng phổ biến trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu khác

nhau như y học (phát hiện bệnh di truyền, nhận dạng vân tay ADN và xác định huyết thống), nông nghiệp (chọn dòng cá thể lai nhờ chỉ thị phân tử, xác định bệnh và kiểm định giống)...

Nguyên tắc và một số giải pháp nâng cao chất lượng của kỹ thuật PCR

Nguyên tắc của phương pháp PCR là tạo lượng lớn các đoạn ADN đặc thù từ ADN khuôn dựa trên cơ sở hoạt động của enzyme Taq polymerase để tổng hợp sợi mới bổ sung. Các yếu tố cơ bản để thực hiện phản ứng PCR (tổng thể tích dao động khoảng 20-50 µl) bao gồm: i) Sợi khuôn ADN (chỉ cần biết trình tự nucleotide của đoạn nhỏ nằm cạnh đoạn cần nhân để thiết kế hai mỗi oligonucleotide); ii) Hai đoạn mỗi ngắn để xác định các điểm bắt đầu tổng hợp ADN (mỗi dài khoảng 20 nucleotide và các nucleotide ở hai đầu của mỗi không tự kết hợp với nhau theo nguyên tắc bổ sung); iii) Có đầy đủ các loại nucleotide dATP, dTTP, dGTP, dCTP; iv) Môi



Máy PCR X50.

trường đệm cung cấp ion Mg và nước tinh khiết không có enzyme RNAse và ADNse; v) Enzyme chịu nhiệt Taq.

Trong phản ứng PCR, chúng ta thường dựa vào các bộ kit hoá chất thương mại có khả năng mang lại năng suất tối ưu cùng với quy trình nhanh hơn. Tuy nhiên, việc chuẩn bị mẫu, cũng như các thiết bị và vật tư tiêu hao trong quy trình làm PCR sẽ ảnh hưởng đến kết quả phản ứng theo những cách không được đánh giá thường xuyên. Vì vậy, một số giải pháp đã được đưa ra nhằm cải thiện và tăng tốc độ của phản ứng PCR.

Thứ nhất, cải thiện vật liệu block nhiệt phù hợp làm tăng tốc độ gia nhiệt và hạ nhiệt. Các vật liệu dẫn nhiệt được sử dụng làm hợp kim cho block nhiệt bên trong thiết bị PCR có tác dụng tăng và hạ nhiệt. Nhôm là vật liệu tiêu chuẩn thường được sử dụng, tuy nhiên block nhiệt cấu tạo từ hợp kim bạc sẽ đạt được tốc độ gia nhiệt nhanh gấp đôi. Tốc độ gia nhiệt và hạ nhiệt nhanh giúp phản ứng PCR diễn ra nhanh hơn. Điều quan trọng là nhiệt độ phải đạt được một cách đáng tin cậy, với độ lệch tối thiểu, độ vượt giá trị được kiểm soát và để đảm bảo điều này, chúng ta cần kiểm tra định kỳ, lý tưởng là sử dụng bộ thiết bị về kiểm tra nhiệt độ Temperature Verification System (TVS).

Thứ hai, công nghệ gradient nhiệt 2 chiều mới giúp tối ưu hoá phản ứng PCR. Công nghệ gradient nhiệt giúp tối ưu nhiệt độ gắn mỗi nhanh chóng. Tính năng này là một cuộc cách mạng trong quá trình tối ưu hoá phản ứng PCR. Tuy nhiên để xác định nhiệt độ biến tính tối ưu, chúng ta phải chạy thêm một hoặc nhiều phản

ứng PCR nữa. Một lần nữa, công nghệ 2D-gradient được phát triển. Theo cách này, nhiệt độ biến tính khác nhau có thể được chọn trong mỗi hàng, trong khi đồng thời nhiệt độ gắn mỗi khác nhau được chọn trong mỗi cột. Nhiệt độ tối ưu sẽ ngăn chặn sự biến tính và gắn mỗi không hoàn chỉnh. Tính năng này cho phép xác định nhiệt độ tối ưu và dẫn đến năng suất tối đa cũng như kết quả PCR lặp lại tối ưu.

Thứ ba, tối ưu hóa vật tư tiêu hao để tăng tốc phản ứng PCR. Một cách khác để tăng tốc độ chạy phản ứng PCR là việc sử dụng bộ kit hoá chất PCR được phát triển đặc biệt kết hợp với ống PCR nhanh. Ống PCR nhanh có thành ống mỏng, đồng thời duy trì sự ổn định của chúng - một tính năng cho phép gia nhiệt và hạ nhiệt mẫu nhanh hơn. Nhiệt độ bên trong mẫu đạt đồng đều hơn và với sự trợ giúp của bộ kit PCR nhanh, một lần chạy PCR được hoàn thành trong vòng 16 phút. Thêm vào đó, việc sử dụng ống PCR nhanh mang lại năng suất ADN tăng hơn nhiều lần.

Thứ tư, số lượng mẫu nhiều, kiểm soát tập trung sẽ làm giảm thời gian cho các quy trình chạy phản ứng PCR. Nếu có nhiều hơn một máy PCR để chạy chương trình trong phòng thí nghiệm, và được kiểm soát tập trung sẽ làm giảm thời gian thao tác với máy. Với máy PCR của Hãng Eppendorf (Đức), 50 máy PCR khác nhau sẽ được kết nối vào trong một mạng (network) và được điều khiển bằng phần mềm trung tâm, theo cách này có thể dùng 30 máy chạy chương trình thứ nhất và 20 máy chạy chương trình thứ hai. Đối với các phòng thí nghiệm số lượng mẫu thấp hơn, 9 máy PCR có thể kết nối mạng lan

với nhau và được điều khiển trên một bảng điều khiển của một máy chính. Điều này giúp tiết kiệm thời gian trong quá trình cài đặt chương trình.

Ngoài ra, có thể tối ưu hóa các kết quả PCR thông qua các điều chỉnh thiết kế mỗi, thành phần của hỗn hợp PCR master mix hoặc quy trình chuẩn bị mẫu. Thêm vào đó, sự kết nối của nhiệt độ biến tính và nhiệt độ gắn mỗi cũng như thời gian kéo dài chuỗi có thể rất quan trọng đối với lượng ADN cụ thể, độ tinh khiết và chất lượng của nó. Rất đáng để thử nghiệm tất cả các tùy chọn trước khi mua một bộ mới hoặc đặt hàng mỗi mới.

Thay lời kết

Kể từ khi phát triển vào đầu những năm 80, kỹ thuật PCR đã mở ra nhiều khả năng và giúp chúng ta hiểu rõ hơn về thế giới hiện tại và trong quá khứ. Tương lai, các kỹ thuật PCR trong cổ sinh vật học phân tử thậm chí có thể được sử dụng trong thám hiểm không gian để giúp xác định liệu sự sống đã từng tồn tại trên các hành tinh khác trong hệ mặt trời của chúng ta hay xa hơn nữa. Có nhiều cách để cải thiện và nâng cao chất lượng cũng như rút ngắn thời gian chạy phản ứng PCR - bắt đầu bằng việc lựa chọn thiết bị và dụng cụ, vật tư hoá chất tiêu hao phù hợp cho đến ứng dụng các công nghệ mới... Việc phát hiện ra sự kết hợp tối ưu có thể mất một ít thời gian, và nỗ lực ban đầu sẽ được đền đáp xứng đáng dưới dạng tiết kiệm chi phí và thời gian ✍

Trần Việt Dũng, Chu Đức Hà
(lược dịch từ Bionews)