

BÀI 4

PHẢN ỨNG PCR (Polymerase Chain Reaction)

Nhân bản một trình tự DNA đặc hiệu

NỘI DUNG

1. Nguyên lý – Mục tiêu
2. Cách thiết lập phản ứng
3. Hóa chất – dụng cụ - thiết bị
4. Cách thực hiện
- 4. Cách phân tích kết quả**

ĐÁNH GIÁ

1. Kiểm tra/bài tập
2. Tính toán được các thành phần phản ứng
3. Thao tác
4. Kết quả

YÊU CẦU

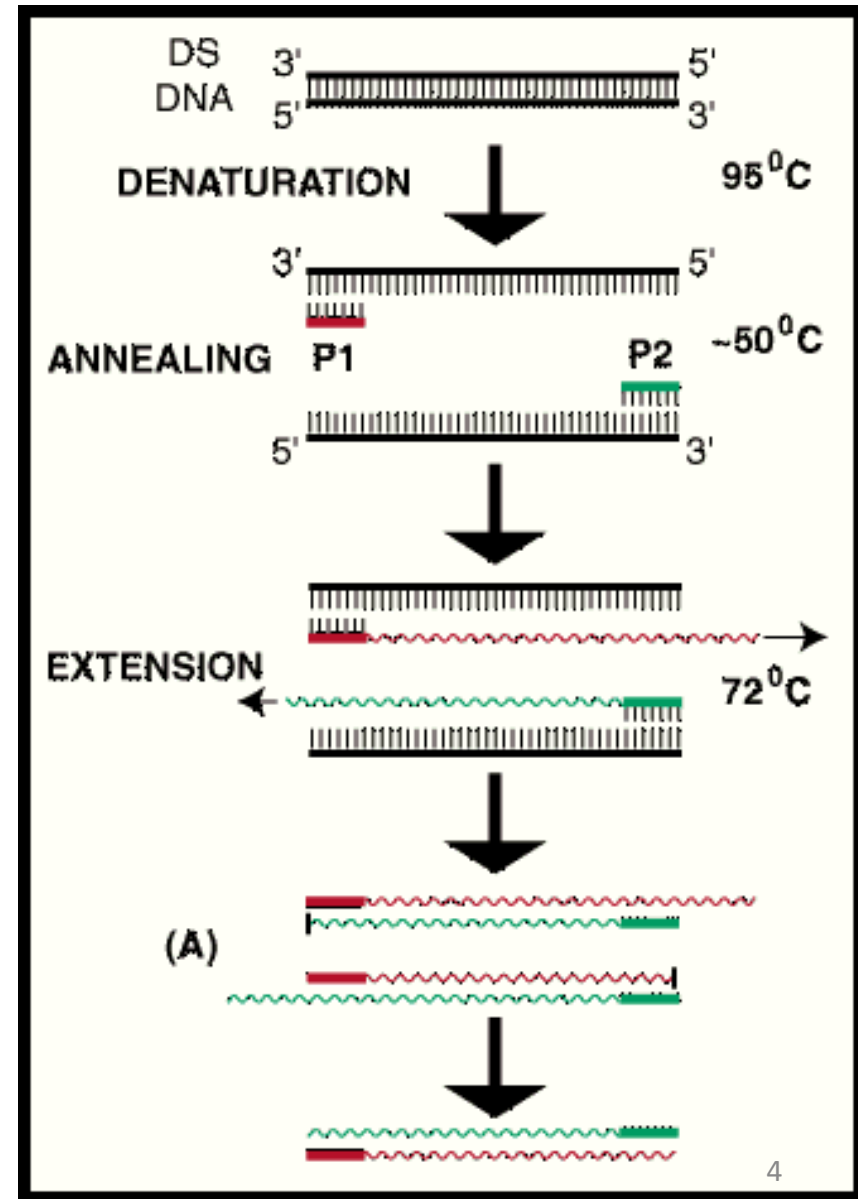
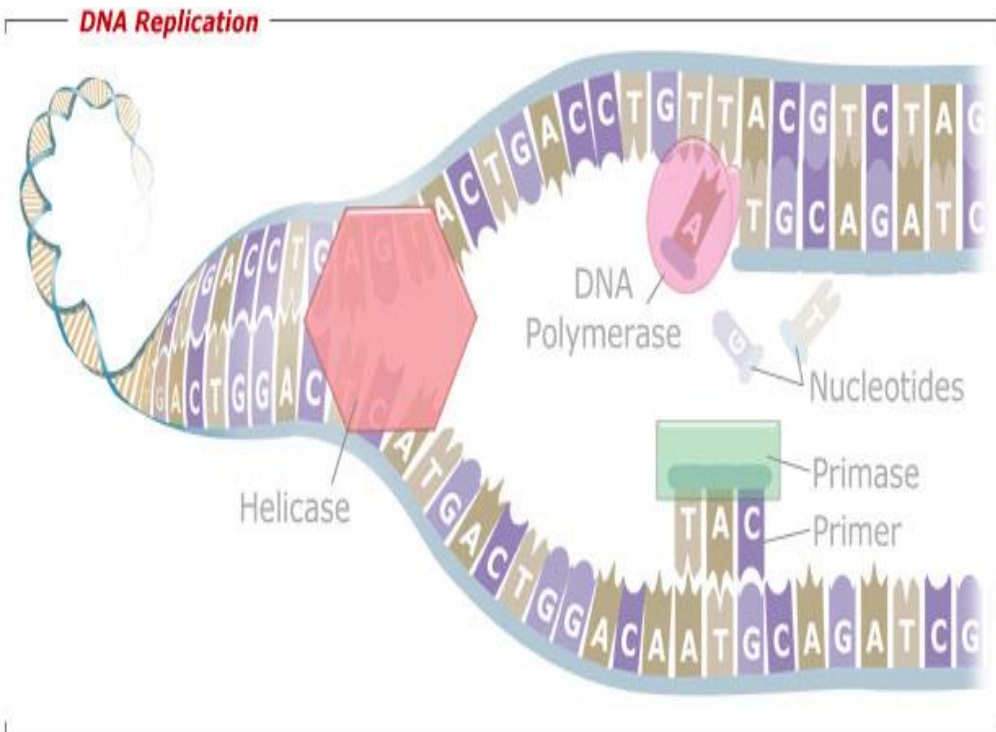
1. Hiểu được nguyên tắc, ý nghĩa của phương pháp
2. Biết cách thiết lập phản ứng
- 3. Biết cách phân tích kết quả**



Tế bào nhân bản DNA bằng cách nào?

Cần các yếu tố nào?

NGUYÊN LÝ PCR



CÁC BƯỚC CỦA PHẢN ỨNG PCR

Bước 1: 95°C trong 2 phút

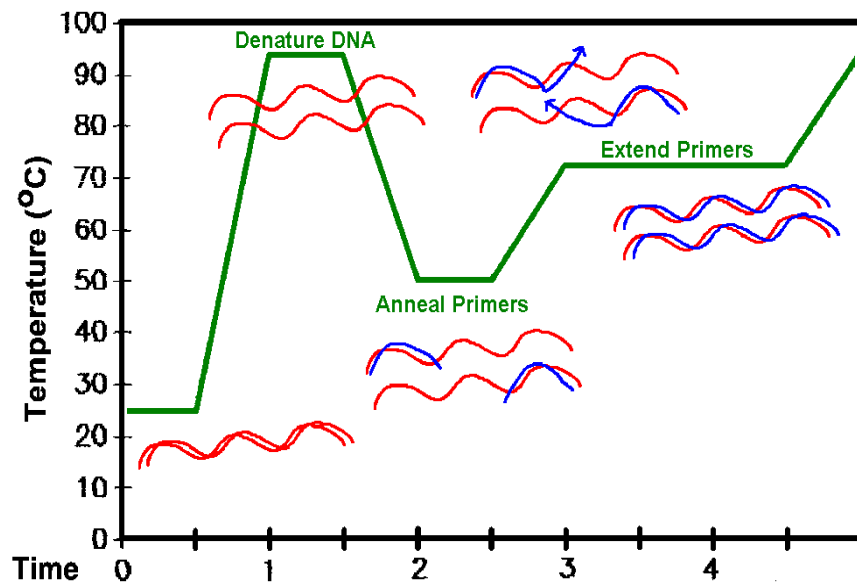
Bước 2: 94°C trong 30 giây

65°C trong 30 giây

72°C trong 1 phút

Bước 2 lặp lại 37 lần

Bước 3 72°C trong 10 phút

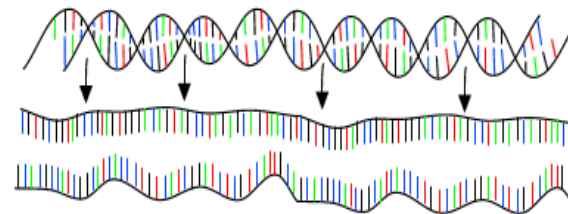


PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

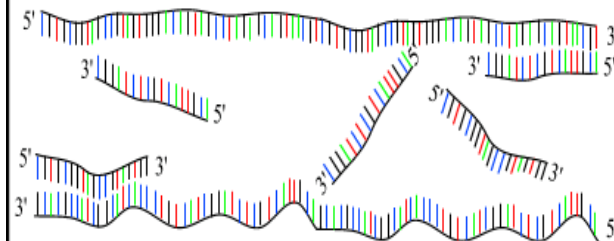
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

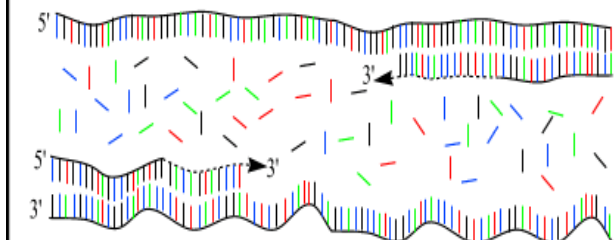
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

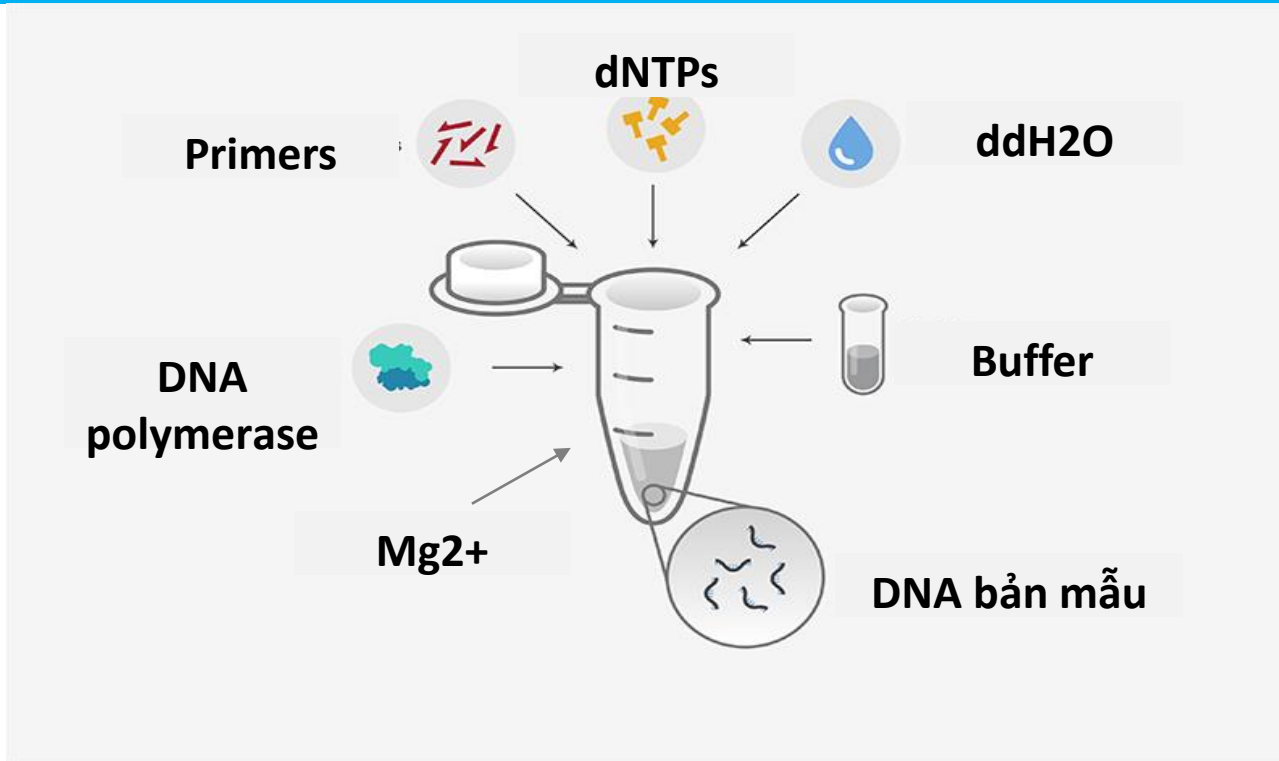
2 minutes 72 °C

only dNTP's



ĐẶT PHẢN ỨNG

Thành phần phản ứng



Chương trình nhiệt



Bước 1: 95°C trong 2 phút

Bước 2: 94°C trong 30 giây

65°C trong 30 giây

72°C trong 1 phút

Bước 2 lặp lại 37 lần

Bước 3 72°C trong 10 phút

Thành phần phản ứng

1. Enzyme DNA polymerase chịu nhiệt

Enzyme	Half life 95°C (h)	Elongation rate (nt/s)	Processivity (nt)	Fidelity	3'-5' exo
KOD HiFi	12	100-130	>300	+++++	N
Pfu	6-18	25	10-20	++++	Y
Tth	0.3	25-33	30-40	+	N
Pwo	?	40-50	40	+++	Y
Tgo	2	?	?	+++++	Y
Vent	6.7	67	10	++	Y
Deep Vent	23	23	<20	+++	Y
9°Nm	7.7	?	?	?	5%
Taq	1.6	60	150	+	N
Tfl	0.6	40	50-60	+	N

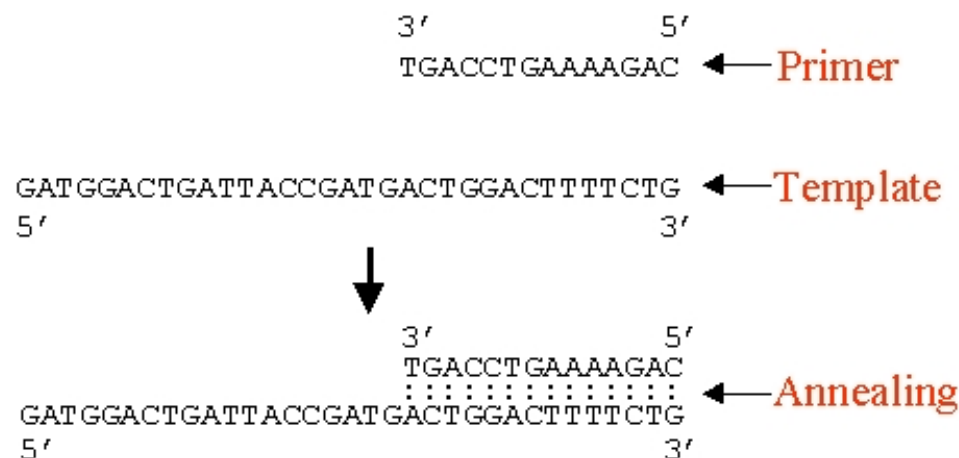
Thành phần phản ứng

2-3. Primer và DNA bản mẫu

DNA bản mẫu: chất lượng DNA, nồng độ DNA (1ng-1µg / phản ứng)

Mồi (primer):

- Mồi là những đoạn ngắn, sợi DNA nhân tạo thường 18-25 nucleotides
- Quyết định tính chuyên biệt của phản ứng PCR
- Nồng độ thường sử dụng: 0,1 – 0,5 µM mỗi loại
- Tm mồi



Thành phần phản ứng

4-5. dNTP và Mg^{2+}

dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP ($\sim 20\mu M$ mỗi loại)

Mg^{2+} (1-5 mM):

- Hoạt động của enzyme
- Nồng độ quá thấp --> ?
- Nồng độ quá cao \rightarrow sản phẩm không đặc hiệu

6-7. Buffer và H_2O

Dung dịch đệm (buffer)

H_2O

Chương trình nhiệt



Bước 1: 95°C trong 2 phút

Bước 2: 94°C trong 30 giây

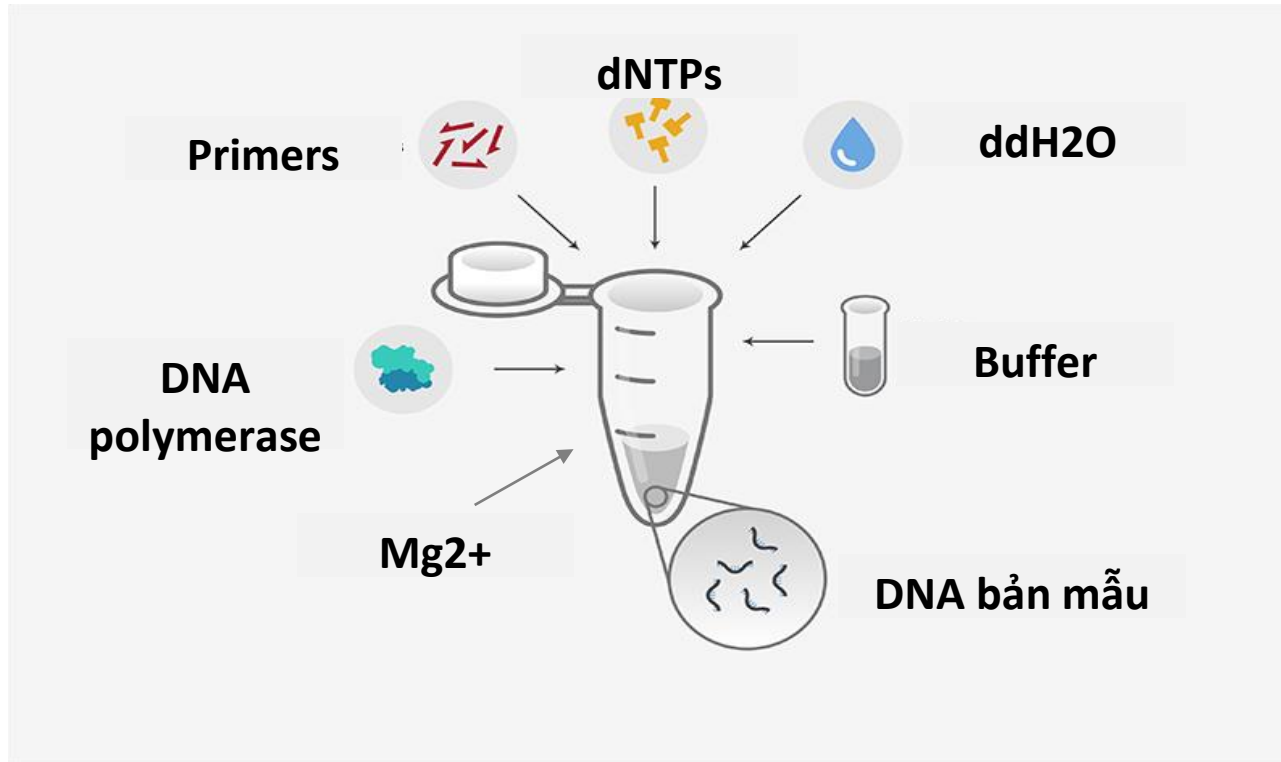
65°C trong 30 giây

72°C trong 1 phút

Bước 2 lặp lại 37 lần

Bước 3 72°C trong 10 phút

Đặt phản ứng



Thực hành (tt)

STT	Thành phần phản ứng	Ký hiệu	Nồng độ dung dịch cung cấp	Nồng độ sử dụng	Thể tích cần hút (μl)
1	Dung dịch đệm	Buf	10X	1X	
2	dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	dNTP	2,5 mM / mỗi loại	200 μM / mỗi loại	
3	MgCl ₂	MgCl ₂	7,5 mM	1,5 mM	
4	DNA tế bào má			≤100 ng	
5	Mồi (D1S80 R và F)	Pri	12,5 μM	0,5 μM	
6	Nước	H ₂ O			Đủ thể tích =
7	Taq polymerase	Taq	0,2 unit/μl	0,2 unit/phản ứng	

(Thiết lập phản ứng trên đá đang tan)

Thực hành (tt)

PCR



Bước 1: 95°C trong 2 phút

Bước 2: 94°C trong 30 giây

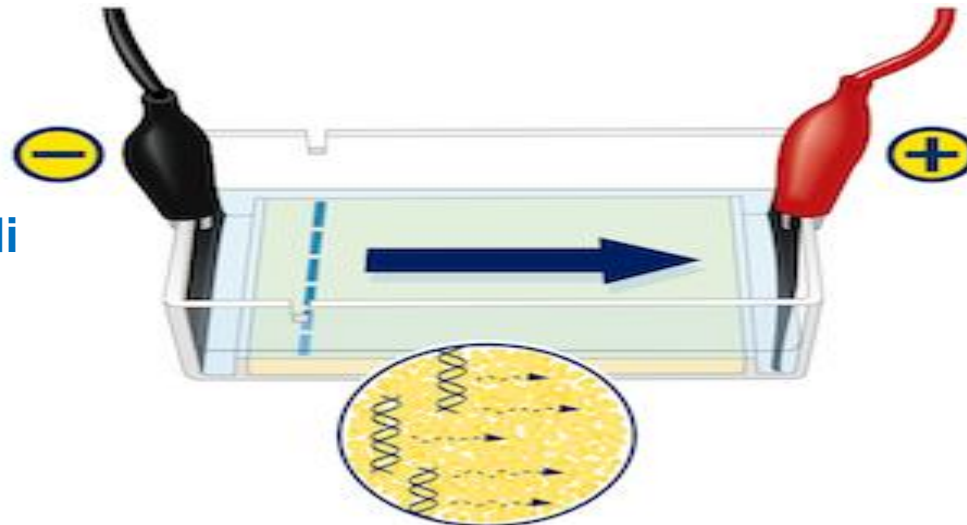
65°C trong 30 giây

72°C trong 1 phút

Bước 2 lặp lại 35 lần

Bước 3 72°C trong 10 phút

Điện di

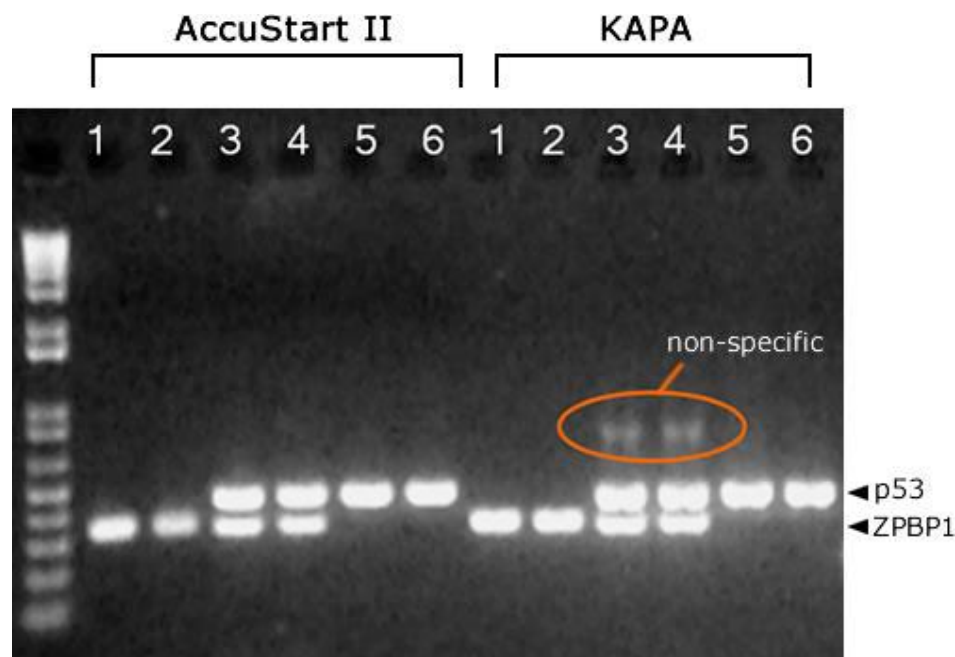


Phân tích kết quả

Phải xác định được đặc điểm trình tự mục tiêu: Kích thước, dự đoán sẽ có những sản phẩm gì sau khi PCR

Phân tích kết quả điện di sản phẩm PCR:

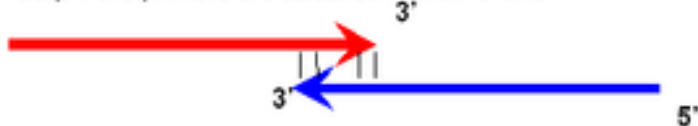
1. Thang
2. Chứng âm
3. Chứng dương
4. Mẫu
 - Có/không có vạch/đốm/vệt
 - Bao nhiêu vạch/đốm/vệt
 - Kích thước vạch/đốm/vệt
5. Kết quả có đúng với dự đoán: thu được sản phẩm mục tiêu không?
6. Có các sản phẩm không mong đợi khác: primer dimer, sản phẩm kí sinh không?



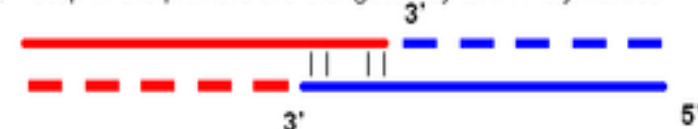
Primer dimer formation

- Primer, the arrow indicates the elongation side, i.e., the 3' end,
- DNA elongated from the 3' end of the primer
- Hydrogen bonds between two complementary bases

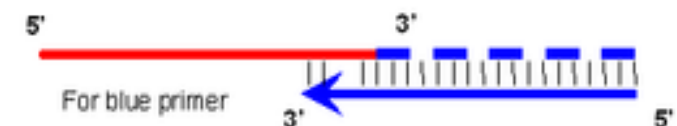
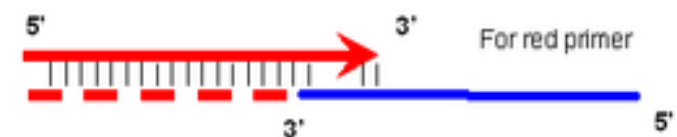
Step I: the primers are attached in their 3' end



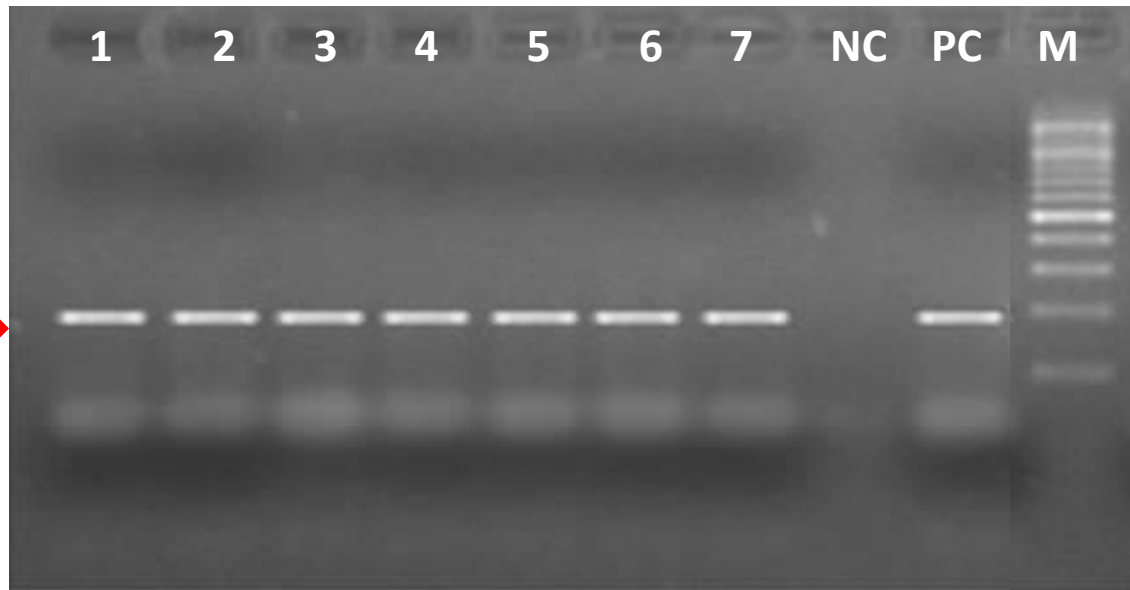
Step II: the primers are elongated by DNA Polymerase



Step III: in the following cycle the elongated primer binds its complementary primer with high affinity



Ví dụ: Bảy sinh viên cùng thực hiện nhân bản gene X (có kích thước 200 bp) bằng phương pháp PCR. Phân tích kết quả bên dưới.



Chú thích:

1-7: kết quả nhóm 1-7

NC: chứng âm

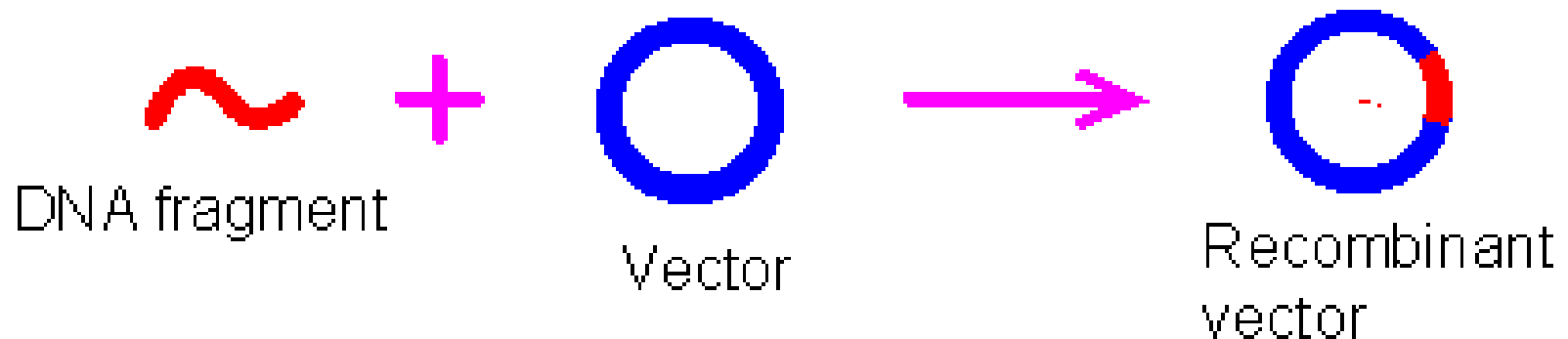
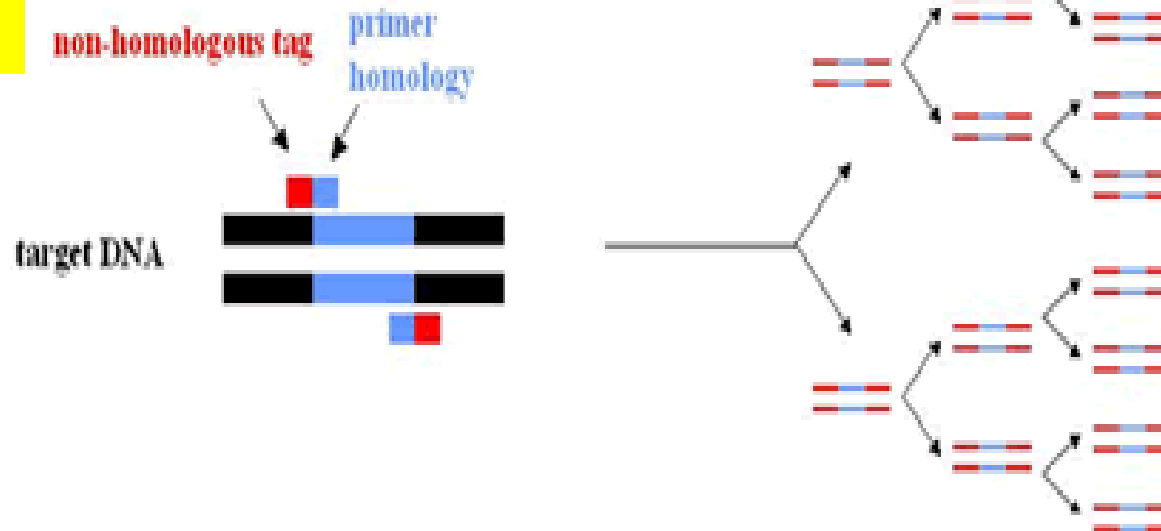
PC: chứng dương

M: thang 100 bp

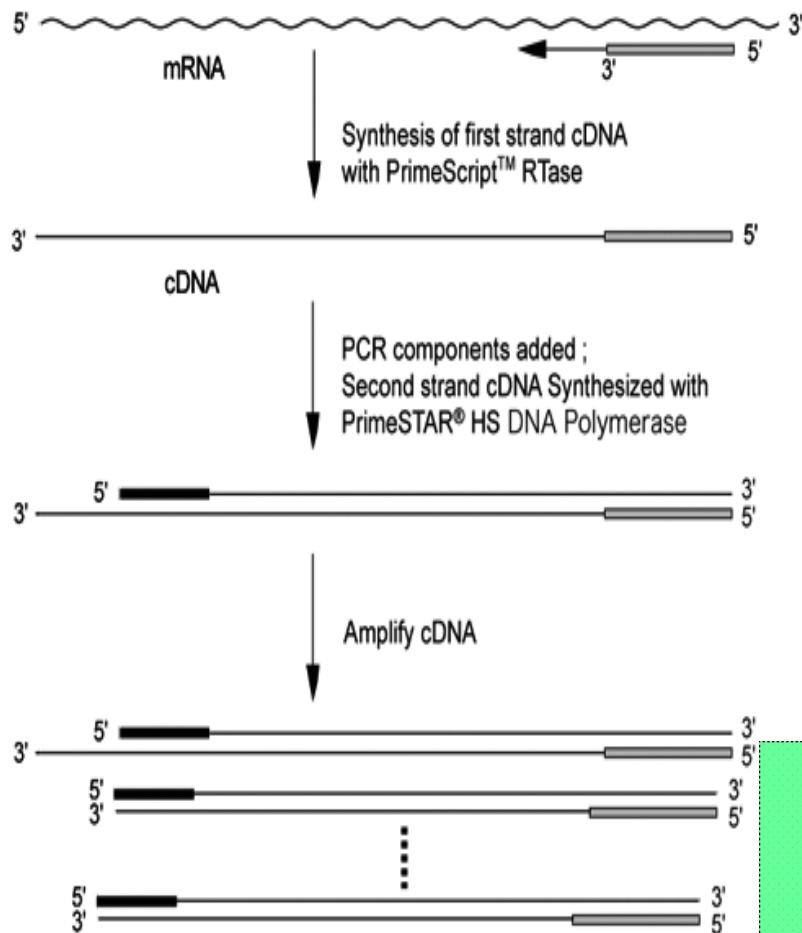
ỨNG DỤNG

Tạo dòng:

- In vitro
- In vivo

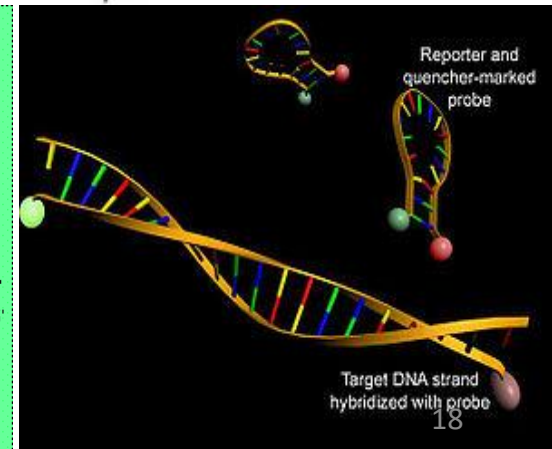
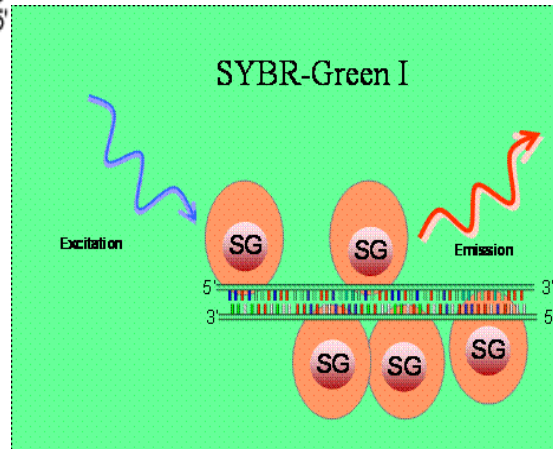
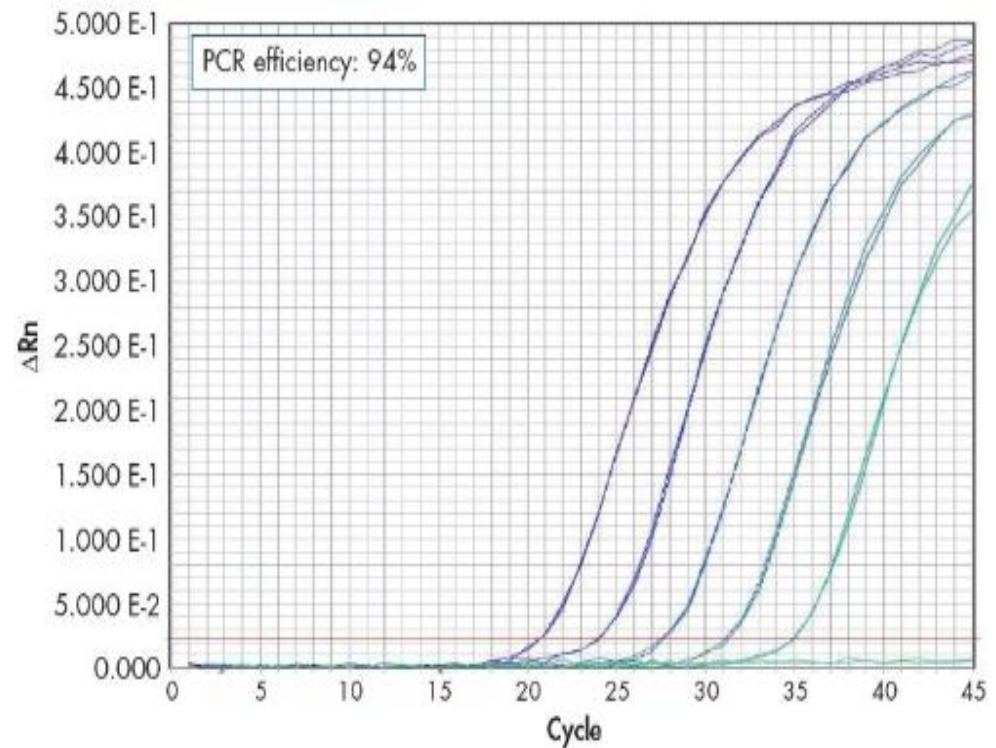


ỨNG DỤNG



Định lượng số DNA bản mẫu:

- Chẩn đoán
- Xác định sự biểu hiện gene



Nhân bản một trình tự đa hình thuộc locus D1S80 trong xác định huyết thống

Daddy's Girl

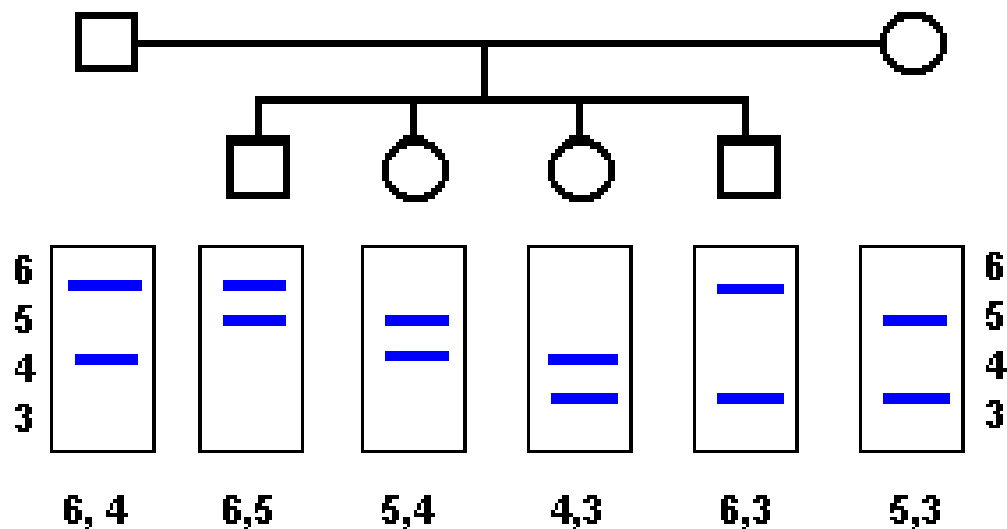
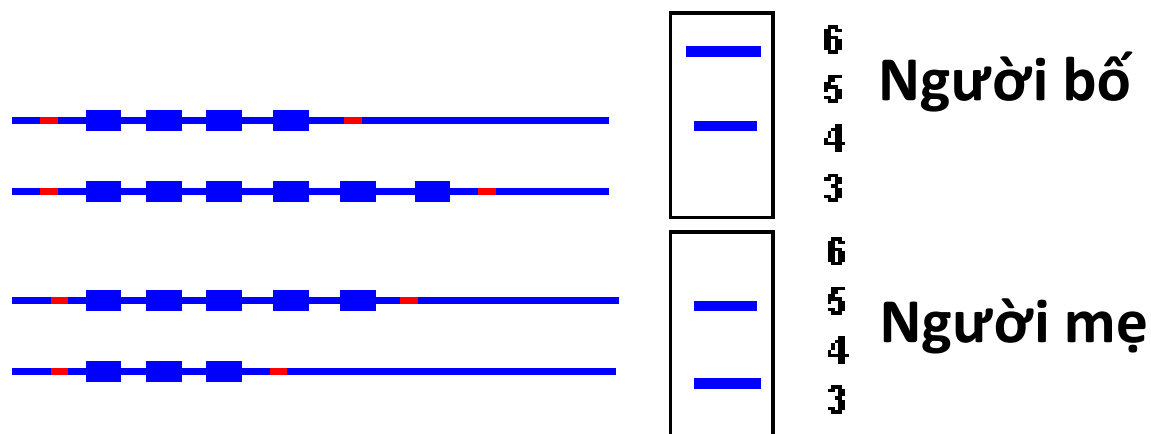


Thực hành

Cần nhân bản trình tự D1S80 trên DNA bộ gene → bạn sẽ làm gì?



Phát hiện đa hình VNTR



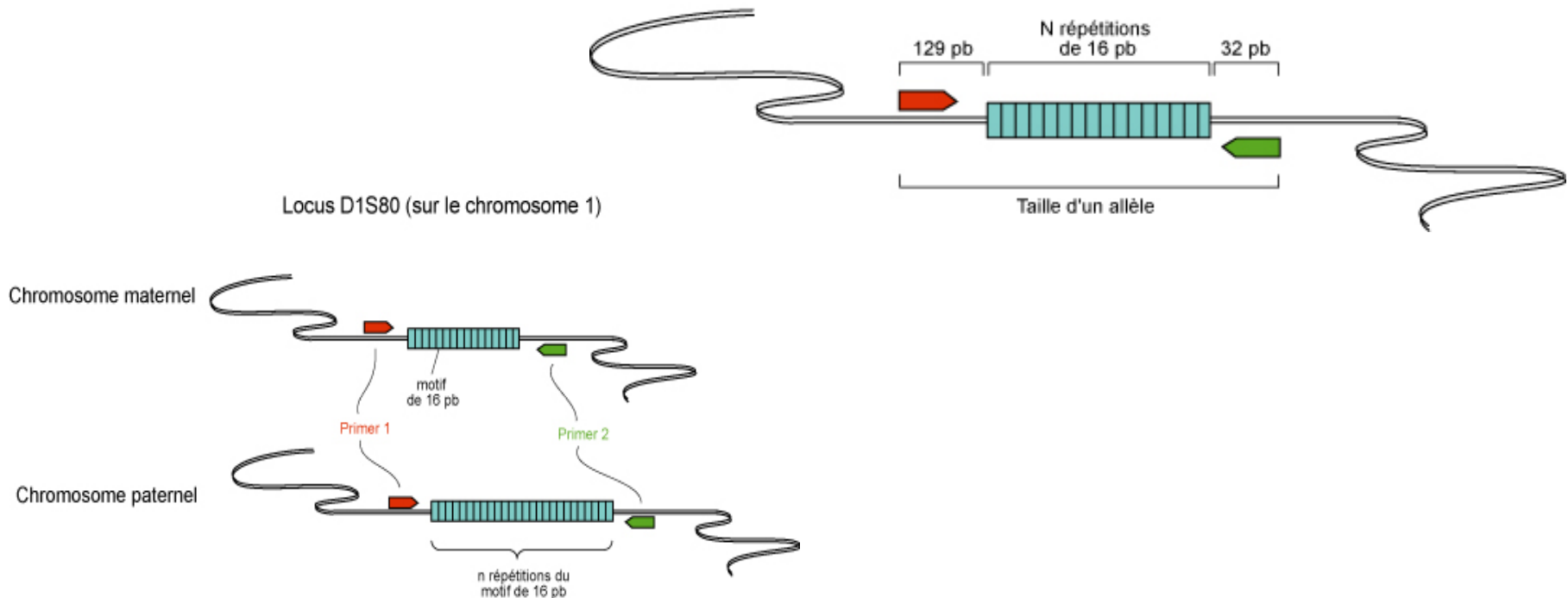
Thực hành (tt)

- Tìm hiểu thông tin về trình tự cần nhân bản: kích thước, trình tự...
- Thiết kế mỗi đặc hiệu
- Kiểm tra hoạt động của mỗi, tối ưu các thành phần phản ứng
(đọc các hướng dẫn)
- **Thiết lập các phản ứng cần để đảm bảo độ tin cậy của kết quả**
- **Tiến hành PCR, dự đoán và phân tích kết quả**

Variable number tandem repeat - VNTR

Locus:	D1S80 ^a
Chromosome location:	1p
Repeat length:	16 bp
Number of alleles:	>22 ^c
Allele length range ^b :	18–42 repeats (430–814 bp [5, 9])
Most common allele:	24 repeats
Heterozygosity:	79% ^d

Locus D1S80 (sur le chromosome 1)



Dự đoán kết quả

Cách đánh giá

1. Phần thực hành

1. Chuẩn bị nguyên vật liệu, dụng cụ

2. Tính toán thiết lập phản ứng

3. Thao tác (sử dụng pipet, máy PCR, điện di)

4. Ghi nhận kết quả

5. Trả lời câu hỏi

2. Phần báo cáo

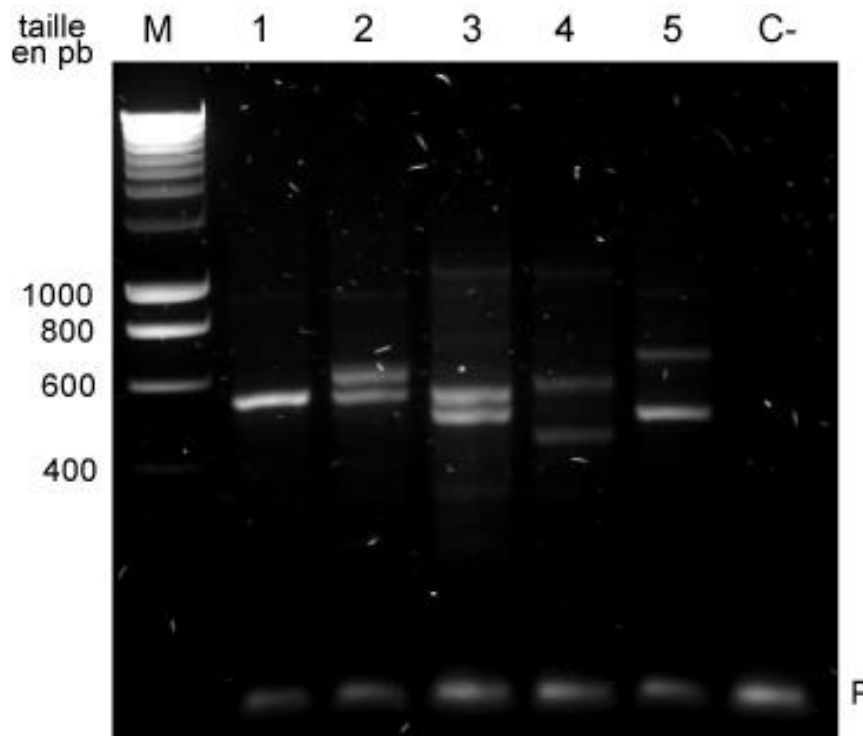
Trả lời ngắn gọn được các câu hỏi:

- Mục đích của thí nghiệm?
- Thiết kế thí nghiệm PCR?
- Kết quả của nhóm như thế nào?
- Kết quả cho biết điều gì?

Bài tập

Bài 1. Vẽ hình mô tả 4 chu kì đầu tiên của phản ứng PCR từ 1 phân tử DNA bản mẫu ban đầu

Bài 2. Phân tích kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản trình tự D1S80 theo kết quả điện di bên dưới.



Chú thích:

1-5: kết quả nhóm 1-5

C-: chứng âm

M: thang