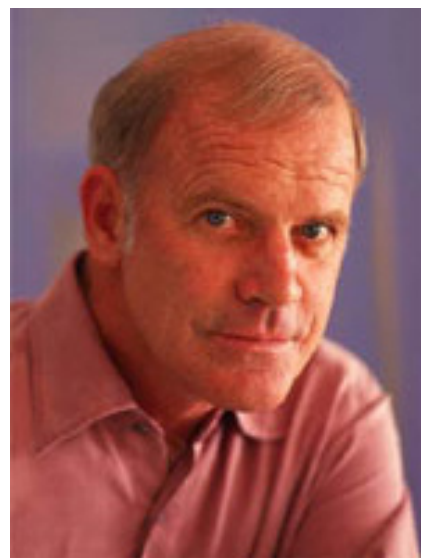


PHÁT HIỆN NHANH MẮM BỆNH BẰNG PCR

QUỲNH NGỌC

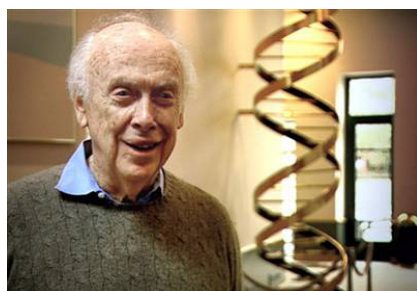
Làm thế nào xác định mầm bệnh cũng như nguồn gốc bệnh lý một cách nhanh chóng để chọn hướng điều trị phù hợp và kịp thời khi xảy ra dịch bệnh? Đã có phương pháp kỹ thuật hiện đại: nhân bản gene - Polymerase Chain Reaction (PCR)



Kary Mullis - người đầu tiên tìm ra phương pháp nhân gene trong ống nghiệm và thành công với giải Nobel hóa học năm 1993

Tìm hiểu một chút về gene...

Trong mỗi sinh vật, phần vật liệu trong nhân tế bào sẽ truyền từ đời này sang đời khác là các nhiễm sắc thể (NST). Bản chất NST là những đại phân tử Acid deoxyribonucleic (viết tắt ADN hay DNA) rất dài có dạng sợi đôi do 4 loại Nucleotide (Nu) tạo thành. Trên phân tử DNA có những đoạn trình tự gồm một số Nu nhất định quyết định biểu hiện một đặc tính nào đó của cá thể ví dụ như màu mắt, màu tóc..., chỉ mỗi đoạn như vậy đã gọi là một gene (còn gọi là đoạn DNA hay DNA). Khi một cô gái xinh đẹp như mẹ mình,



James D. Watson - nhà khoa học tìm ra cấu trúc sợi đôi DNA

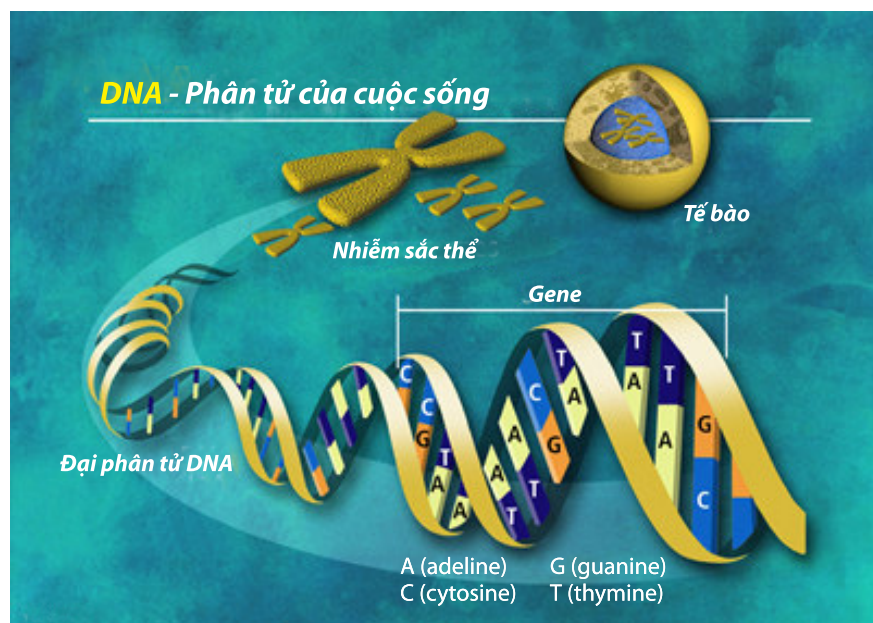
bà mẹ sẽ tự hào rằng “nhờ có gene di truyền của mẹ đó!”. Đến nay, khoa học đã tìm thấy ở bộ gene người có đến 20.000 – 25.000 gene. Hầu hết

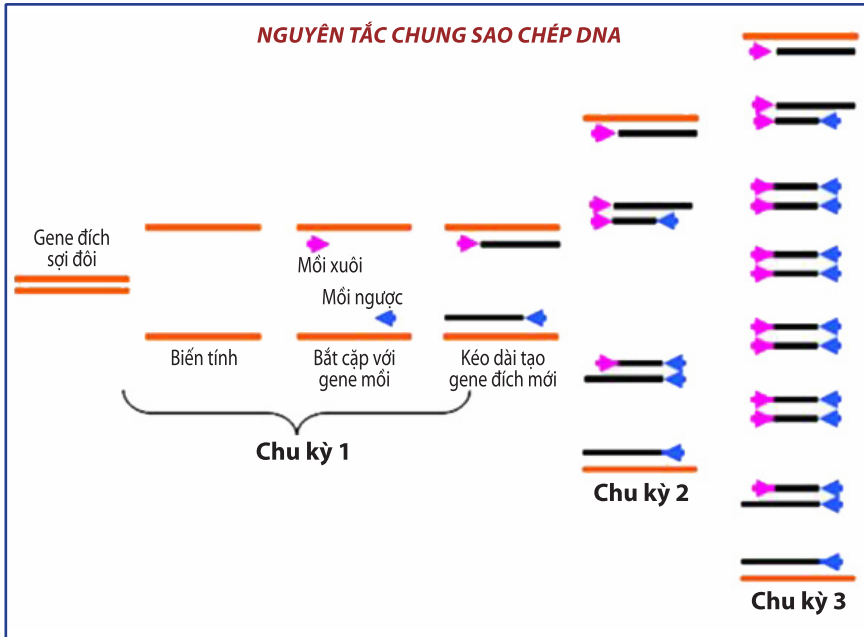
bộ gene của sinh vật là DNA, một số bộ gene của virus chỉ là DNA dạng sợi đơn – gọi là RNA (RiboNucleicAcid).

Kỹ thuật PCR là gì?

Hiểu một cách đơn giản, PCR là kỹ thuật nhân bản (hay sao chép) gene. Sau một phản ứng (còn gọi quy trình) PCR thì từ một mẫu vật chứa rất ít các đoạn gene cần tìm người ta sẽ có được một số lượng gene lớn gấp nhiều lần số lượng đoạn gene ban đầu và giống hệt nhau.

Các nhà khoa học đã nghiên cứu thành công quá trình sao chép gene tương tự như trong cơ thể tự nhiên nhưng được thực hiện bên ngoài cơ thể (invitro) và quá trình này ngày càng được hoàn thiện, chính xác. Người đầu tiên tìm ra phương pháp nhân gene trong ống nghiệm là Kary Mullis, một nhà hóa sinh học người Mỹ, ông đã bắt đầu nghiên cứu năm





thành sợi đơn; giai đoạn này còn gọi là giai đoạn biến tính (denaturation) hay tách đôi phân tử DNA.

Giai đoạn 2, bắt đầu sau khi các sợi đôi tách nhau ra, các đoạn gen mỗi chuyên biệt có sẵn trong ống phản ứng sẽ gắn đặc hiệu chỉ với trình tự gene đích trên sợi DNA mẫu vật, giai đoạn này máy PCR chuyển nhiệt độ tức thì xuống khoảng 45-60°C cho phù hợp với nhiệt độ bắt cặp giữa mỗi và gene cần tìm và cũng kéo dài từ vài chục giây đến vài phút; giai đoạn này còn gọi là giai đoạn bắt cặp (annealing) và là giai đoạn quan trọng quyết định việc “chọn đúng” trình tự gene đích.

Giai đoạn 3, khi mỗi bắt cặp với các đoạn gen đích sẽ mở màn cho việc sao chép các gen đích mới, lúc đó dưới tác động xúc tác của enzyme - các Nu tự do trong ống nghiệm gắn dần với trình tự Nu trên đoạn gene mẫu cho đến khi hoàn tất cả trình tự gen đích, nhiệt độ của máy PCR trong giai đoạn này lại chuyển ngay lên khoảng từ 68-72°C, thời gian của giai đoạn này dài hơn giai đoạn 2 và tùy vào kích thước trình tự gene đích.

Kết thúc giai đoạn 3, máy PCR lặp lại chu kỳ kế tiếp với thứ tự các giai đoạn như trên, liên tục liên tục ... cho đến khi hoàn tất hết số chu kỳ cài đặt ban

1985 và thành công với giải Nobel hóa học năm 1993.

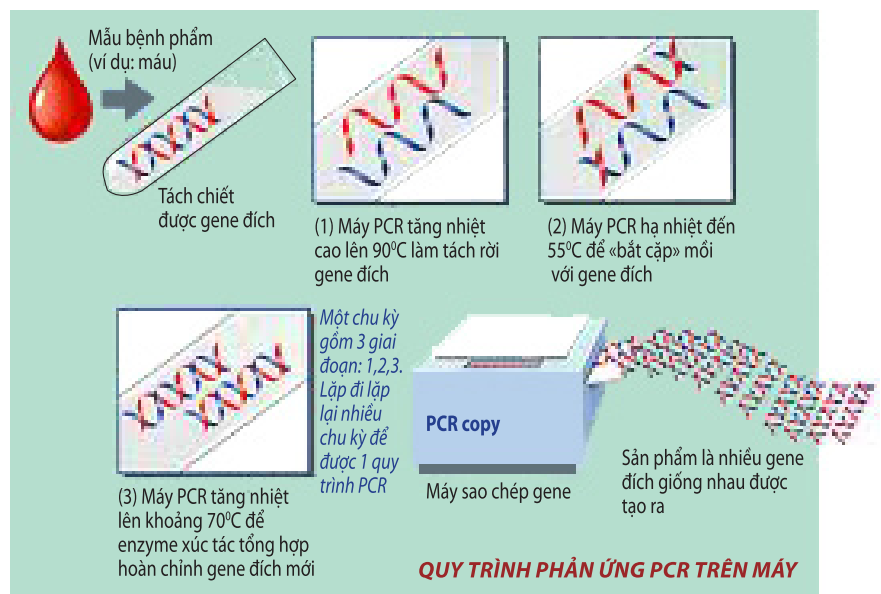
Bước quan trọng cơ bản trước khi thực hiện qui trình PCR là tách chiết được các gene mang đoạn gene cần nhân bản (DNA hay RNA, gọi là gene mẫu hay gene đích) từ mẫu vật là mô cơ quan nào đó.

Các vật liệu cần thiết cho một quy trình PCR nhân bản gene thường gồm: gen mẫu; hỗn hợp hóa chất cần thiết để kéo dài gene (4 loại Nu tự do, các hóa chất dung dịch đệm, enzyme xúc tác, nước); cặp đoạn gen mỗi – là một đoạn gene ngắn đặc hiệu với gene cần tìm làm mỗi để tạo ra gen đích. Tất cả vật liệu trên được cho vào ống phản ứng và đặt vào thiết bị PCR để thực hiện việc nhân bản. Sản phẩm sau PCR thường được thể hiện kiểm chứng trên ảnh chụp điện di gel agarose.

Quy trình PCR sao chép một gene hay một đoạn gene trong ống nghiệm thực hiện trong máy PCR cũng giống với quá trình tự nhiên sao chép gen trong tế bào, đều là quá trình lặp lại nhiều chu kỳ sao chép giống nhau. Mỗi một chu kỳ sao chép thường gồm 3 giai đoạn khác nhau, số lượng gene sau một chu kỳ sao chép sẽ gấp đôi số lượng gene của chu kỳ trước đó. Số gene vừa sao chép được sẽ làm “DNA

mẫu” cho chu kỳ tiếp sau, số chu kỳ như vậy được cài đặt cho máy lặp đi lặp lại từ 20 - 40 lần tùy theo mục đích nghiên cứu. Sản phẩm cuối cùng là lượng các bản sao gene được tính theo hàm số mũ 2^n với n là số chu kỳ sao chép. Máy PCR thực hiện một chu kỳ sao chép gồm các giai đoạn như sau:

Giai đoạn 1, máy PCR sẽ tăng nhiệt độ lên cao (khoảng 90-96°C) trong khoảng thời gian ngắn từ vài chục giây đến vài phút làm đứt các liên kết gắn nhau giữa 2 sợi gene để cấu trúc sợi đôi của gene mẫu sẽ dẫn tách đôi



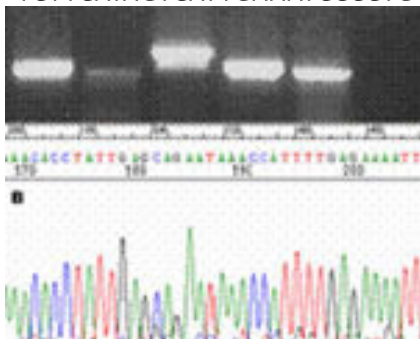
► Suối Nguồn Tri Thức

đầu.

Ví dụ xác định virus gây dịch bệnh cúm H5N1 bằng PCR

Tên gọi H5N1 có từ mối liên quan đến hai loại gen đặc trưng trong cấu trúc phân tử (RNA) của virus tạo ra protein gây bệnh: protein hemagglutinin nhóm 5 (H5) và neuraminidase nhóm 1 (N1). Virus H5N1 được nghiên cứu và biết được trình tự của các Nu trong bộ gen, cũng như những đoạn của gen H5 và N1.

Sử dụng PCR để phát hiện nhanh H5N1 người ta dùng những cặp đoạn gen ngắn (1 xuôi và 1 ngược) tương ứng với gen H5 hay N1 hay cả 2 làm những đoạn mồi (primer) cho quy trình nhân gen. Để có các cặp gen mồi trước tiên cần chọn được một đoạn gen có trình tự thật đặc biệt dựa trên trình tự gen đích H5 hay N1 (gọi là thiết kế mồi), sau đó sẽ tạo ra nhiều đoạn gen đúng trình tự thiết kế đó theo một kỹ thuật chuyên biệt và độ chính xác rất cao. Hiện nay, ở Việt Nam thường phải mua các gen mồi làm sẵn hay đặt theo thiết kế của mình từ các công ty uy tín trên thế giới. Ví dụ một cặp gen mồi đặc hiệu của gen H5, theo nghiên cứu của Enders K.O. Ng, Peter K.C. Cheng, Antia Y.Y. Ng, T.L. Hoang, Wilina W.L. Lim) có trình tự mồi là "TGCCGGAATGGTCTTACATAGTG" (xuôi, 5'-3') và: "TCTTCATAGTCATTGAAATCCCCTG"



Một đoạn gene của virus H5N1 được Viện Công nghệ sinh học giải mã

Virus H5N1 trong các mẫu có tỉ lệ rất nhỏ do đó rất khó phát hiện, thời gian xác định virus H5N1 trong mẫu bằng PCR cần khoảng 4-7 tiếng.

Quy trình xác định virus H5N1 nhanh



bằng PCR sẽ thực hiện như sau:

1. Lấy mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân (dịch nhầy từ mũi hay họng)
2. Tách gen mẫu từ bệnh phẩm (RNA)
3. Chuẩn bị phản ứng: pha hóa chất cần thiết (gen mồi, dung dịch đệm, nước, enzyme) và lấy lượng gen mẫu tương ứng.
4. Thực hiện phản ứng bằng máy PCR
5. Chụp ảnh bằng điện di sau phản ứng PCR và đọc kết quả trên ảnh, nếu âm tính là không nhiễm bệnh, còn dương tính thì đã nhiễm H5N1.

Phát triển kỹ thuật PCR

Ngày nay, kỹ thuật PCR rất phát triển trên thế giới và cả ở Việt Nam. Khi mới ra đời, thiết bị cho kỹ thuật này rất rườm rà, các giai đoạn của chu kỳ được thực hiện riêng trong từng buồng nhiệt hay bể nhiệt để đạt được việc thay đổi nhanh nhiệt độ phản ứng mong muốn. Càng về sau, công nghệ



Thực hiện các thao tác xét nghiệm chẩn đoán bằng PCR tại labo Viện Sốt rét KST-CT Quy Nhơn

PCR ngày càng hiện đại, các hãng đã cho ra đời các thế hệ máy chuyên dùng thực hiện các phản ứng PCR, càng về sau càng gọn nhẹ, tự động cao, thực hiện phản ứng chỉ trong một

buồng ủ có thể thay đổi nhiệt độ tức thời (nên còn gọi là máy luân nhiệt - thermalcycles) với giới hạn phân tích lớn và độ chính xác ngày càng cao, ví dụ như Hãng MJ-Research đã cho ra đời thế hệ máy có thể dùng đến 8 buồng phản ứng với quy trình độc lập và giới hạn phân tích máy lên đến 1.536 mẫu trong cùng thời điểm.

Các kỹ thuật trong quy trình phản ứng PCR cũng phát triển theo các hướng nghiên cứu sâu và rộng hơn, ngoài PCR hiện nay cũng đã phổ biến các quy trình cải tiến, như "RT-PCR" dùng sao chép các gene chỉ là sợi đơn RNA dùng trong các xét nghiệm



bệnh virus, quy trình Multiplex PCR cho phép phát hiện nhiều đoạn gene kích thước khác nhau trong cùng một ống phản ứng, hay quy trình PCR định lượng - còn gọi là Realtime-PCR, nó cho phép biết được số lượng chính xác số lượng gene trong mẫu ban đầu và ứng dụng tốt trong chuẩn đoán mức độ bệnh lý hay tác dụng điều trị.

PCR- Kỹ thuật quan trọng trong phát hiện mầm bệnh

Thiết bị PCR là công cụ cần thiết và thông dụng hiện nay trong các phòng thí nghiệm phân tích cấp độ phân tử, như các phòng xét nghiệm bệnh, các bệnh viện, trung tâm y khoa hay trung tâm nghiên cứu. Tuy nhiên mức độ kết quả đạt được tại mỗi nơi là rất khác nhau tùy thuộc vào điều kiện đầu tư nghiên cứu và chuyên môn của kỹ thuật viên.

Điều khác biệt vượt trội của kỹ thuật PCR so với các phương pháp phân

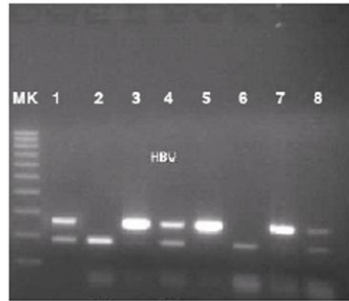


TS. Bác sĩ Phạm Hùng Vân đang sử dụng máy PCR

tích khác là tiết kiệm được rất nhiều thời gian, phát hiện được bệnh trong giai đoạn rất sớm khi mức độ nhiễm còn nhẹ.

Mẫu vật trong xét nghiệm PCR có thể là bệnh phẩm người hay động vật, các mô cơ quan bình thường hay vật liệu mang dấu vết sinh học như các sinh vật hóa thạch hay máu của tội phạm... Dựa vào kỹ thuật PCR để hiểu rõ về "mẫu vật" chính là ứng dụng quan trọng của kỹ thuật này.

Theo TS. Phạm Hùng Vân (giảng viên ĐH Y Dược TP. HCM), việc ứng dụng kỹ thuật PCR của Việt Nam không hề thua kém các nước trong khu vực và đang được sử dụng rất hiệu quả. PCR được đưa vào Việt Nam từ năm 1988, đến nay có rất nhiều phòng thí nghiệm đã được trang bị máy PCR như Trường ĐH Y Dược TP.HCM, ĐH Khoa học Tự nhiên TP.HCM, Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Thủy sản, Bệnh viện ĐH Y-Dược, Bệnh viện Nhiệt đới, Trung tâm Y khoa Medic,... và cả các công ty sản xuất cung cấp nguyên vật liệu và dịch vụ sinh học như Công ty Nam Khoa, ... Kỹ thuật PCR đã được ứng dụng tại VN để xét nghiệm nhanh và chính xác một số bệnh như lao phổi, viêm gan B, viêm gan C, cúm H5N1, HIV, sốt xuất huyết, u



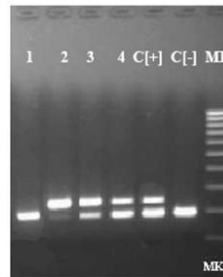
MK	Thang DNA
1	Chứng [-]
2	Chứng [-]
3, 4, 5, 7, 8	HBV-DNA [+]
6	HBV-DNA [-]

Kết quả xét nghiệm PCR phát hiện HBV-DNA được thực hiện với NK[®]HBV-PCR kit

← 259bp (HBV+)

← #190bp (IC+)

Kết quả xét nghiệm RT-PCR phát hiện HCV-RNA được thực hiện với NK[®]HCV-RTPCR kit



MK	Thang DNA markers, steps 100bps
1	HCV [+] mạnh
2, 3, 4	HCV [+], Internal control [+]
5	HCV [+] yếu, Internal control [+]
6	Ức chế

← HCV[+]: #240bp

← IC[+]: #190bp

nhũ (virus Human Pailloma), mụn giộp (virus Herpes), viêm màng mủ não, một số bệnh ung thư. Phòng Di truyền Phân tử thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học (ĐHQG Hà Nội) đã ứng dụng PCR để tìm bệnh ung thư cho người và cả ngay từ trong bào thai, dự báo bệnh ung thư cho người và các thể hệ con cái của họ.

Việc chẩn đoán viêm màng mủ não lúc trước chỉ thực hiện bằng phương pháp soi, nuôi cấy và định danh, các bác sĩ dựa vào các triệu chứng lâm sàng, sinh hóa và phải mất từ 12 đến 24 giờ để chẩn đoán bệnh, nay chỉ cần chạy PCR với một lượng nhỏ mẫu dịch não, trong vòng 6 giờ là đã có kết quả. Đây là thành công do nhóm nghiên cứu của ThS. Nguyễn Hoàng Chương – ĐH Khoa học Tự nhiên đã thực hiện được cách đây vài năm. Với bệnh viêm gan siêu vi B và C thay vì trước đây phải gửi mẫu ra nước ngoài xét nghiệm mất

khoảng một tháng mới có kết quả thì nay ứng dụng kỹ thuật này tại TP.HCM chỉ mất 4 giờ vẫn cho kết quả chính xác tương tự, đó là nghiên cứu không mệt mỏi của TS. Phạm Hùng Vân và nhóm nghiên cứu trường ĐH Y TP.HCM. TS. Vân cũng nghiên cứu thành công và ứng dụng lâm sàng kịp thời phát hiện virus H5N1 trong bệnh cúm gia cầm cũng như virus Dengue trong bệnh sốt xuất huyết chỉ trong vòng 4 giờ ngay trong thời điểm xảy ra dịch bệnh.

Hiện tại giá thành xét nghiệm bằng phương pháp PCR cao hơn các phương pháp khác vì những hạn chế chưa giải quyết được về thiết bị cũng như hóa chất để thực hiện. Các nhà khoa học tâm huyết Việt Nam vẫn đang nghiên cứu để rút ngắn thời gian hơn nữa cũng như giảm các chi phí xét nghiệm để có thể ứng dụng phổ biến PCR giúp xác định nhanh trong việc khám và chữa bệnh. □



Máy PCR "đời đầu" với 3 bể nhiệt riêng chưa có buồng phản ứng tự động



Máy PCR có 1 buồng phản ứng tự động thay đổi nhiệt độ



MJ Research Tetrad PTC-225 Thermo Cycler. Máy có 4 (có thể lắp 8) buồng ủ tự động thay đổi nhiệt độ