

Chương 13. Kỹ thuật di truyền và phương pháp phân tử

Mục lục

Chương 13. Kỹ thuật di truyền và phương pháp phân tử.....	1
13.1. Giới thiệu.....	2
13.2. DNA	2
13.3. Kỹ thuật di truyền.....	2
13.3.1. Chuẩn bị đoạn DNA bằng enzyme cắt giới hạn	3
13.3.2. Phân tách vật lý các đoạn DNA có kích thước khác nhau.....	3
13.3.3. Enzyme dùng để cắt, nối và phiên mã ngược nucleic acid.....	4
13.3.4. Phương pháp xác định kích thước, tổng hợp và giải trình tự DNA.....	5
13.4. Các kiểu lai phân tử.....	6
13.4.1. Northern blot.....	6
13.4.3. Western blot.....	6
13.5. Giải trình tự DNA	7
13.5. Mồi dò nucleic acid	8
13.6. PCR - phản ứng chuỗi polymerase.....	9
13.6.1. Giới thiệu PCR.....	9
13.6.3. Ứng dụng của PCR	11
13.7. Công nghệ DNA tái tổ hợp	12
13.7.1. Vector tạo dòng và tế bào chủ	13
13.7.2. Các sản phẩm sinh học của công nghệ tái tổ hợp	14
13.8. Sinh vật biến đổi gen.....	14
13.9. Liệu pháp gen.....	14

13.1. Giới thiệu

Sự biến đổi căn trọng thông tin di truyền của vi sinh vật bằng cách thay đổi trực tiếp bộ gen của chúng được gọi là kỹ thuật di truyền và sự biến đổi này cũng dẫn đến làm xuất hiện công nghệ DNA tái tổ hợp.

13.2. DNA

Cấu trúc của deoxyribonucleic acid (DNA) cung cấp mã di truyền phức tạp để mã hóa cho sự tổng hợp protein. DNA là phân tử biểu hiện nhiều đặc tính tuyệt vời. Một đặc điểm của DNA đó là sự gắn kết (anneal), nghĩa là phân tử DNA tự nó thay đổi các đặc điểm liên kết trong phản ứng với sự gia nhiệt và làm lạnh.

Khi phơi nhiễm DNA trong khoảng nhiệt độ 90 - 95°C sẽ làm cho phân tử này bị biến tính tạm thời. Khi đó các liên kết hydrogen vốn giữ cho mạch đôi xoắn lại với nhau bị phá vỡ, nên phân tử DNA sẽ được tách ra thành hai mạch theo chiều dọc. Mỗi mạch biểu hiện mã di truyền nucleotide. Vì vậy DNA ở dạng mạch đơn được sử dụng cho các thử nghiệm hoặc sao chép. Khi nhiệt cao được làm lạnh từ từ, hai mạch đơn DNA tái nối lại với nhau nhờ các liên kết hydrogen tại các vị trí bổ sung. Sự gắn kết (annealing) này là đặc điểm cần thiết cho phản ứng chuỗi polymerase (PCR) và các mẫu dò nucleic acid.

13.3. Kỹ thuật di truyền

Kỹ thuật di truyền là sự áp dụng khoa học cho những vấn đề cần thiết của xã hội. Trong những năm gần đây, kỹ thuật dựa trên di truyền vi khuẩn đã làm chuyển biến sinh học. Các đoạn DNA mục tiêu có thể được phân lập và khuếch đại và các gen của chúng được biểu hiện ở hàm lượng cao. Đặc tính chuyên biệt nucleotide đòi hỏi phải có sự phân cắt bằng enzyme cắt giới hạn, cho phép các đoạn này chứa các gen hoặc nhiều phần các gen sau đó được chèn vào tế bào chủ vi khuẩn.

Khuẩn lạc vi khuẩn hay dòng (clone) mang các gen đặc hiệu được xác định bằng lai phân tử (hybridization) DNA hay RNA với hóa chất hoặc sử dụng mẫu dò phóng xạ. Ngoài ra, các sản phẩm protein do các gen mã hóa được nhận biết hoặc bằng hoạt tính enzyme hoặc bằng kỹ thuật miễn dịch. Vì vậy kỹ thuật di truyền được sử dụng để phân lập bất kỳ gen nào có đặc tính sinh học được nhận biết.

13.3.1. Chuẩn bị đoạn DNA bằng enzyme cắt giới hạn

Sự đa dạng về di truyền của vi khuẩn biểu hiện trình tự đặc biệt được enzyme cắt giới hạn nhận biết và phân cắt. Các trình tự DNA được enzyme cắt giới hạn nhận biết chủ yếu là palindrome - trình tự lặp lại đảo ngược. GAATTC là một trình tự palindrome điển hình, được nhận biết bằng cách sử dụng enzyme cắt giới hạn *EcoRI*. Trình tự lặp lại đảo ngược này vốn dĩ là các cặp base bổ sung G - C và A - T, dẫn đến trình tự 5'- TTC có trình tự bổ sung là 3' - AAG.

Hầu hết các enzyme cắt giới hạn nhận biết các trình tự gồm 4, 6 hay 8 base. Tuy nhiên cũng có các enzyme cắt giới hạn khác nhận biết trình tự gồm 10, 11, 12 hay 15 base. Enzyme cắt giới hạn nhận biết 8 base sẽ tạo ra đoạn có kích thước 64.000 bp, được sử dụng để phân tích các vùng di truyền lớn. Enzyme cắt giới hạn nhận biết 10 base được sử dụng để xây dựng bản đồ và dùng để phân kiểu (typing) phân tử bằng điện di trường xung trên gel (PFGE).

13.3.2. Phân tách vật lý các đoạn DNA có kích thước khác nhau

Sự đơn giản hóa khi tiến hành kỹ thuật di truyền nằm ở chỗ điện di trên gel cho phép các đoạn DNA phân tách ra dựa trên kích thước của chúng. Các đoạn càng nhỏ càng di chuyển nhanh hơn. Tốc độ di chuyển và khoảng tối thích về kích thước để phân tách được quyết định nhờ đặc tính tự nhiên của chất hóa học của gel và mức độ liên kết chéo của chúng.

Gel có đặc tính liên kết chéo cao sẽ tối thích để phân tách các đoạn DNA có kích thước nhỏ. Chất nhuộm dạng ethidium bromide, hay các hoá chất nhuộm dạng khác có tên thương mại như: runSafe (Bromophenol Blue, Xylene Cyanol FF, and Orange G), safeview, diamond... sẽ gắn kết với DNA và phát màu huỳnh quang dưới tia cực tím UV và có thể ghi lại hình ảnh trên gel nhờ thiết bị chụp ảnh chuyên biệt (ví dụ geldoc). Các đoạn DNA chuyên biệt có thể được nhận biết bằng các mẫu dò có các trình tự bổ sung.

Điện di trường xung trên gel (PFGE) cho phép phân tách các đoạn DNA trên 100 kbp. Các đoạn DNA lớn này cho phép xây dựng bản đồ nhiễm sắc thể cho một số loài vi khuẩn.

Ứng dụng của mẫu dò DNA: mẫu dò DNA dùng để: (1). Phát hiện trực tiếp vi sinh vật có trong mẫu thử nghiệm. (2). Chẩn đoán vi sinh vật không qua nuôi cấy. (3). Xác định các chủng phân lập. (4). Xác định chủng cho phân kiểu miễn dịch học. (5). Xác định gen gây bệnh của vi sinh vật. (6). Xác định gen tạo độc tố.

13.3.3. Enzyme dùng để cắt, nối và phiên mã ngược nucleic acid

Endonuclease cắt giới hạn: mạch polynucleotide của DNA cũng bị cắt chữ thập (crosswise) tại vị trí chọn lọc bằng enzyme cắt giới hạn endonuclease. Các enzyme này nhận biết DNA ngoại lai và có khả năng phân cắt và thủy giải các cầu nối DNA. Sự hiện diện của enzyme trong tế bào vi khuẩn bảo vệ vi khuẩn chống lại các DNA không thích hợp của bacteriophage hay của plasmid.

Tại phòng thí nghiệm, enzyme cắt giới hạn endonuclease có thể được sử dụng để phân cắt DNA tại vị trí mong muốn và được áp dụng trong công nghệ DNA tái tổ hợp. Cho đến nay hàng trăm endonuclease cắt giới hạn đã được khám phá trong vi khuẩn. Mỗi một kiểu được biết có trình tự mục tiêu từ 4 - 10 bp. Các vị trí cắt như vậy có thể được kiểm soát. Endonuclease được đặt tên bằng cách kết hợp ký tự đầu của giống vi khuẩn, hai ký tự đầu của loài vi khuẩn và số thứ tự của endonuclease. Ví dụ, *EcoRI* là endonuclease cắt giới hạn đầu tiên được phát hiện ở *Escherichia coli* và *HindIII* là enzyme endonuclease thứ ba được khám phá ở *Haemophilus influenzae*.

Sự đa hình về chiều dài đoạn DNA cắt giới hạn: mảnh DNA được enzyme cắt giới hạn endonuclease tạo ra được gọi là đoạn giới hạn. Do các bộ gen của nhiều loài tương tự nhau có thể thay đổi về kiểu cắt bởi các endonuclease chuyên biệt, nên có thể phát hiện được sự khác nhau về di truyền bằng kỹ thuật đa hình về chiều dài của đoạn DNA cắt giới hạn (RFLPs).

Hàng trăm vị trí phân cắt tạo ra các đoạn đa hình RFLP được phân bố khắp bộ gen. Bởi vì RFLP hoạt động như là kiểu chỉ dấu về di truyền (genetic marker), nên chúng có thể giúp định vị các vị trí đặc biệt dọc theo mạch DNA. Vì vậy các đoạn RFLP này hữu ích cho sự chuẩn bị lập bản đồ gen và xây dựng hồ sơ DNA và cũng được sử dụng trong phân tích về mối quan hệ di truyền.

Ligase: là một enzyme cần thiết để hàn gắn các đầu cuối lại với nhau bằng cách

tái nối các cầu nối phosphate - đường đã bị cắt bởi endonuclease. Ứng dụng chính của enzyme này là trong việc nối ghép cuối cùng các gen vào trong plasmid và nhiễm sắc thể.

Enzyme phiên mã ngược transcriptase: đây là enzyme mà vai trò của nó được biết nhiều nhất trong sao chép của virus có bộ gen RNA như virus gây bệnh AIDS và ở các retrovirus khác. Enzyme này được các nhà di truyền học sử dụng như là một công cụ có giá trị để chuyển đổi RNA thành DNA.

DNA bổ sung: các bản sao được gọi là DNA bổ sung hay cDNA, có thể được làm ra từ RNA thông tin, RNA vận chuyển, RNA ribosome và các dạng khác của RNA. Kỹ thuật này cung cấp các phương tiện có giá trị cho sự tổng hợp các gen của eukaryote từ mRNA. Điểm thuận lợi đó là gen được tổng hợp sẽ không có các trình tự xen vào gọi là *intron*, có thể làm phức tạp cho sự quản lý các gen của eukaryote trong kỹ thuật di truyền. DNA bổ sung cũng có thể được sử dụng để phân tích trình tự nucleotide của RNA như RNA được tìm thấy trong ribosome và trong RNA vận chuyển.

13.3.4. Phương pháp xác định kích thước, tổng hợp và giải trình tự DNA

Kích thước tương đối của nucleic acid thường được biết qua số lượng cặp base hay nucleotide mà chúng có. Ví dụ, các trình tự palindrome được nhận biết bằng endonuclease thường dài từ 4 - 10 bp. Một gen trung bình ở *E. coli* khoảng 1.300 bp hay 1,3 kilobase (kb), bộ gen *E. coli* có khoảng 4,7 triệu bp (Mb). Virus Epstein - Barr, gây bệnh mononucleosis có một gen kích thước 172 kb. Con người chúng ta có khoảng 3,5 tỷ bp (Bbp) phân bố dọc trong 46 nhiễm sắc thể.

Oligonucleotide là đoạn DNA hoặc RNA rất ngắn. Chúng có chiều dài dao động trong khoảng từ 2 đến 200 bp, mặc dù hầu hết thường phổ biến trong khoảng 20 - 30 bp. Oligonucleotide có thể được phân lập từ các tế bào hoặc dạng DNA tổng hợp có chiều dài giới hạn trong khoảng 200 nucleotide.

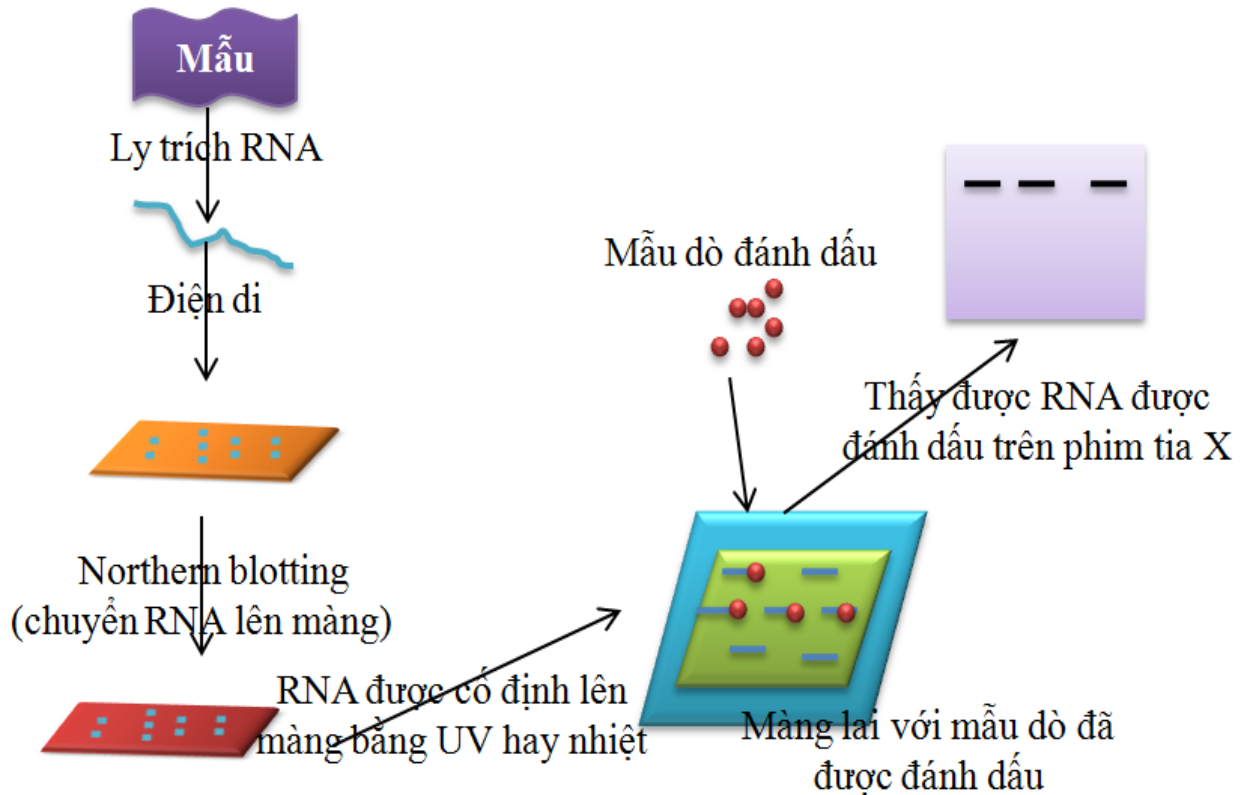
Mẫu dò lai thường được sử dụng trong tạo dòng DNA. Trình tự amino acid của protein được sử dụng để suy ra trình tự DNA từ mẫu dò có thể được sử dụng để xây dựng và áp dụng phát hiện khuẩn lạc vi khuẩn có gen đã được tạo dòng. cDNA do mRNA mã hóa được sử dụng để phát hiện gen mã hóa cho mRNA.

13.4. Các kiểu lai phân tử

Lai phân tử có các kiểu sau: (a). Northern blot, (b). Southern blot và (c). Western blot

13.4.1. Northern blot

Lai DNA với RNA được gọi là Northern blot, kỹ thuật lai này nhằm cung cấp thông tin định lượng về sự tổng hợp RNA.



Hình 13.1. Sơ đồ minh họa kỹ thuật lai DNA với RNA còn gọi là Northern blot.

13.4.2. Southern blot

Lai DNA với DNA được gọi là Southern blot. Phương pháp này được sử dụng cho các đoạn DNA chuyên biệt trong các đoạn giới hạn được tách trên gel. Các blot này có thể được sử dụng để phát hiện các đoạn giới hạn bị chồng lấn.

13.4.3. Western blot

Là kỹ thuật được sử dụng để phát hiện gen mà theo đó kháng thể được sử dụng để phát hiện các gen đã được tạo dòng nhờ tạo cầu nối với các sản phẩm của protein này. Việc tạo dòng các đoạn này tạo ra khả năng phân lập các vùng bên hông (flanking) của

DNA bằng kỹ thuật gọi là đi dọc theo nhiễm sắc thể (chromosomal walking).

13.5. Giải trình tự DNA

Giải trình tự DNA là kỹ thuật giúp biết được trình tự của cấu trúc gen, là công cụ giúp các nhà nghiên cứu tìm ra cấu trúc của sản phẩm gen.

Giải trình tự DNA có nhiều ứng dụng sau:

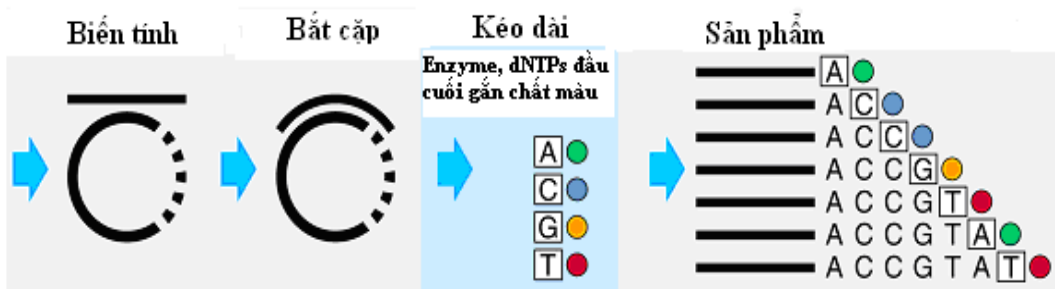
(1). Thông tin thu nhận được nhờ giải trình tự DNA sẽ giúp hiểu được các gen đã giải trình tự hay thay đổi chức năng của gen.

(2). Phân tích trình tự DNA nhằm chứng minh các vùng điều hoà kiểm soát sự biểu hiện của gen và các vị trí gen nhạy cảm để đột biến.

(3). So sánh các trình tự DNA để chứng minh về mối quan hệ tiến hoá nhằm cung cấp thông tin cho phân loại vi sinh vật.

(4). So sánh các trình tự DNA để tạo thuận lợi xác định vùng bảo tồn. Vùng bảo tồn rất hữu ích cho việc phát triển môi phân tích PCR, mẫu dò lai đặc hiệu để phát hiện vi sinh vật có trong mẫu thử.

Kỹ thuật Maxam - Gilbert và phương pháp Sanger (sử dụng đầu cuối dideoxy) là hai phương pháp được sử dụng thường xuyên trong giải trình tự. Kỹ thuật Maxam - Gilbert phụ thuộc vào độ tin cậy của hoá chất liên quan do sự khác nhau về các cầu nối nucleotide, ngược lại phương pháp Sanger cắt ngang sự kéo dài các trình tự DNA bằng cách gắn các dideoxynucleotide vào trong các trình tự.



Hình 13.2. Sơ đồ minh họa chu trình giải trình tự tự động có trình tự cuối gắn chất phát huỳnh quang.

Chu trình giải trình tự tự động dựa trên sự phát huỳnh quang cần có một mạch khuôn DNA, mỗi giải trình tự, DNA polymerase bền nhiệt, nucleotide, dNTP và đệm.

Nhưng khác với phương pháp của Sanger thay vì sử dụng chất phóng xạ, thì phương pháp giải trình tự tự động sử dụng chất phát huỳnh quang để gắn vào sản phẩm kéo dài và các thành phần được kết hợp với nhau trong một phản ứng bao gồm các bước bắt cặp, kéo dài và biến tính trong máy luân nhiệt. Phản ứng giải trình tự trong chu kỳ nhiệt cao, khuếch đại sản phẩm kéo dài và dừng lại khi lắp ráp một trong bốn ddNTP. Tỷ lệ giữa dNTP với ddNTP được tối ưu để tạo ra số lượng cân bằng các sản phẩm kéo dài có độ dài và ngắn khác nhau (Hình 13.2).

Chu trình giải trình tự tự động có gắn chất phát huỳnh quang bằng cách sử dụng dideoxynucleotide triphosphate có gắn chất phát huỳnh quang hoặc mỗi gắn chất phát huỳnh quang. Cả hai dùng bốn chất màu khác nhau. Vì vậy khi nhận được ánh sáng kích thích mỗi chất màu chỉ phát ra một bước sóng duy nhất, chất phát huỳnh quang trên sản phẩm khuếch đại giúp xác định ddNTP ở đầu cuối 3' là A, C, G hay T (Hình 13.2).

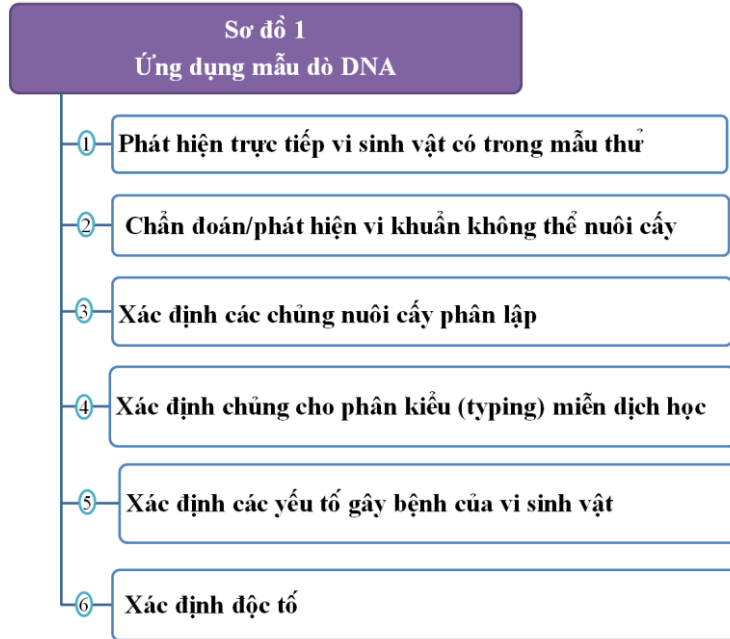
Shotgunning: nghiên cứu sinh học đã tiến hoá nhiều do sự phát triển của công nghệ cho phép giải trình tự và phân tích bộ gen sinh vật của virus đến bộ gen vi khuẩn và cả bộ gen của con người. Việc giải trình tự đã được dễ dàng hơn nhờ sử dụng quy trình shotgunning. Trong quy trình này, DNA bị phá vỡ thành các mảnh nhỏ ngẫu nhiên để tạo ra thư viện mảnh ngẫu nhiên.

13.5. Mẫu dò nucleic acid

Mẫu dò nucleic acid là những phân đoạn DNA và RNA có gắn đồng vị phóng xạ hay enzyme có thể lai với nucleic acid có tính đặc hiệu cao. Mẫu dò lai có giá trị thực nghiệm bởi vì chúng có thể phát hiện các trình tự nucleotide chuyên biệt trong các mẫu không biết. Các mẫu dò này mang các phân tử tín hiệu nhờ gắn đồng vị phát ra phóng xạ, hoặc gắn các chất phát quang hoá học có thể phát ra ánh sáng thấy được. Các phản ứng có thể lộ ra bằng cách đặt phản ứng thử nghiệm tiếp xúc với phim chụp. Mẫu dò phát huỳnh quang có chất màu có thể thấy được bằng ánh sáng tử ngoại. Các mẫu dò có thể được sử dụng trong nhiều quy trình phân tích. Hai nucleic acid khác nhau có thể lai với nhau bằng cách kết hợp tại các vị trí bổ sung của chúng. Tất cả hình thức kết hợp có thể là: DNA mạch đơn có thể kết hợp với DNA mạch đơn hoặc RNA khác và RNA có thể lai với RNA khác. Đây là đặc điểm cơ bản để hình thành nên chất đánh dấu chuyên biệt

dạng oligonucleotide công thức được gọi là mẫu dò gen.

Ứng dụng của mẫu dò DNA: mẫu dò DNA không phải là phương pháp khuếch đại. chúng chỉ phát hiện DNA có trong mẫu thử nhưng không có bất kỳ khuếch đại DNA



nào trong mẫu. Mẫu dò DNA có nhiều ứng dụng sau:

(1). Nhiều mẫu dò DNA đã được phát triển để xác định các chủng phân lập và được áp dụng để phát hiện vi sinh vật gây bệnh (a) phát hiện trực tiếp vi sinh vật có trong mẫu thử (b) xác định vi sinh vật sau khi phân lập (Sơ đồ 1).

(2). Một số vùng DNA ở người biểu hiện sự biến động đáng kể về sự phân bố các vị trí giới hạn. Sự biến động này được gọi là sự đa hình về chiều dài của đoạn DNA giới hạn (RFLP). Mẫu dò oligonucleotide lai với các đoạn RFLP này có thể được sử dụng để truy tìm DNA từ mẫu vật nhỏ còn sót lại trên cơ thể người nhận. Vì vậy kỹ thuật này có giá trị đối với lĩnh vực khoa học pháp y.

(3). Những ứng dụng của RFLP đối với y học gồm xác định vùng di truyền có quan hệ gần với các gen của người bị rối loạn chức năng, cùng với đó là bệnh di truyền. Thông tin này sẽ có giá trị trong việc hỗ trợ tư vấn về di truyền.

13.6. PCR - phản ứng chuỗi polymerase

13.6.1. Giới thiệu PCR

Năm 1983, Kary Mullis đã phát triển một kỹ thuật mới nhờ đó có thể tổng hợp một số lượng lớn DNA từ một đoạn DNA mà không cần qua tạo dòng đoạn này. Kỹ thuật này được gọi là phản ứng chuỗi polymerase hay được viết tắt là PCR và đã có tầm quan trọng đáng kể trong thực nghiệm cũng như tác động mạnh mẽ đến công nghệ sinh học. Nhờ kỹ thuật này, có thể chuẩn bị một lượng lớn DNA của một đoạn DNA cụ thể.

Trong PCR, các trình tự oligonucleotide giống với trình tự dọc theo trình tự mục tiêu được tổng hợp đầu tiên. Những oligonucleotide tổng hợp này thường có chiều dài khoảng 20 nucleotide và đóng vai trò làm mồi (primer) cho sự tổng hợp DNA. Các đoạn có kích thước nằm trong khoảng nhỏ hơn 100 bp đến vài 1000 bp có thể được khuếch đại và chỉ đòi hỏi từ 10 - 100 pmol mồi. Nồng độ của DNA mục tiêu có thể thấp từ 10 - 15 μ L. Hỗn hợp phản ứng cho PCR có (a) DNA mục tiêu (b) mồi, (c) DNA polymerase bền nhiệt và (d) bốn deoxyribonucleoside triphosphate. Chỉ có DNA polymerase có khả năng chịu được nhiệt độ cao có thể được sử dụng cho kỹ thuật PCR. *Taq polymerase* được ly trích từ vi khuẩn chịu nhiệt *Thermus aquaticus* và *Vent polymerase* từ *Thermococcus litoralis* là hai enzyme phổ biến được sử dụng trong PCR.

13.6.2. Chu kỳ PCR

Tiến hành trong ba bước như sau:

(1). Bước thứ nhất: DNA có trình tự cần khuếch đại được gia nhiệt biến tính để tách các mạch bổ sung của chúng ra. Thông thường DNA mục tiêu có chiều dài trong khoảng giữa 100 và 5000 bp.

(2). Bước thứ hai: nhiệt độ được hạ thấp xuống để mồi có thể gắn kết với DNA trên cả hai đầu của trình tự mục tiêu. Do mồi có một lượng dư thừa nên các mạch DNA mục tiêu thường gắn kết với mồi hơn là gắn kết với nhau.

(3). Bước thứ ba: DNA polymerase kéo dài mồi và tổng hợp các bản sao của trình tự DNA mục tiêu, sử dụng deoxyribonucleoside triphosphate. Tại thời điểm kết thúc của một chu kỳ phản ứng, các trình tự mục tiêu trên cả hai mạch được sao ra. Khi chu trình ba bước được lặp lại, sẽ có bốn mạch từ chu kỳ đầu tiên được sao ra để tạo ra tám đoạn. Chu kỳ thứ ba tạo ra 16 sản phẩm. Về lý thuyết, 20 chu kỳ sẽ tạo ra một triệu bản sao trình tự DNA mục tiêu và 30 chu kỳ sẽ tạo ra khoảng một tỷ bản sao.

Kỹ thuật PCR hiện đã được tự động hoá và được tiến hành nhờ thiết bị có thiết kế đặc biệt được gọi là máy luân nhiệt (thermocycler). Hiện nay máy luân nhiệt hay thiết bị PCR có thể tiến hành 25 chu kỳ và khuếch đại DNA gấp 10^5 lần chỉ trong vòng 57 phút. Trong một chu kỳ điển hình, DNA được biến tính ở 94°C trong 15 giây; sau đó mồi được gắn vào và mở rộng ở 68°C trong 60 giây.

Kỹ thuật PCR đang cải tiến liên tục và trải qua nhiều thay đổi như sau:

1. Ngày nay, RNA có thể được sử dụng một cách hiệu quả trong các quy trình PCR. *Tth* DNA polymerase, một *Thermus thermophilus* DNA polymerase tái tổ hợp sẽ phiên mã RNA thành DNA và sau đó khuếch đại DNA. RNA tế bào và RNA virus có thể được nghiên cứu ngay cả khi RNA hiện diện một lượng rất nhỏ chỉ khoảng 100 bản sao cũng có thể được phiên mã và khuếch đại.

2. Cũng có thể sử dụng PCR để định lượng các sản phẩm DNA mà không cần sử dụng đồng vị. Điều này cho phép nó tìm kiếm một lượng DNA mục tiêu ban đầu trong thời gian ít hơn một giờ nhờ sử dụng thiết bị tự động. PCR định lượng rất có giá trị trong nghiên cứu về virus và biểu hiện gen.

3. Như đã đề cập ở trên, DNA mục tiêu thông thường được khuếch đại có kích thước nhỏ hơn 5000 bp. Kỹ thuật PCR khuếch đại kích thước dài (long PCR) đã được phát triển, khuếch đại các trình tự có kích thước trên 42 kilobase. Nó phụ thuộc vào việc sử dụng polymerase khắc phục lỗi bởi vì *Taq* polymerase dễ bị lỗi.

4. Multiplex PCR là một biến thể của PCR theo đó có hai hoặc nhiều hơn các trình tự mục tiêu có thể được khuếch đại đồng thời có trong mẫu thử nghiệm tại cùng thời điểm. Phương pháp này sử dụng hai hoặc nhiều hơn hai cặp mồi được thiết kế để khuếch đại các mục tiêu khác nhau. Multiplex PCR được sử dụng để chứng minh có hai hoặc nhiều hơn hai vi sinh vật gây bệnh có trong mẫu thử.

5. Real-time PCR là kỹ thuật được phát triển mới nhất. Kỹ thuật này được đặt tên như vậy vì các sản phẩm PCR (amplicon) có thể được phát hiện theo thời gian thực (realtime). Nhưng trong thực tế thời gian thực là chỉ sự phát hiện các sản phẩm PCR (amplicon) ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt phản ứng. Một số thiết bị thương mại kết hợp khuếch đại DNA mục tiêu với việc phát hiện các amplicon trong cùng một ống nghiệm kín. Các hình thức phát hiện bằng mẫu dò phát huỳnh quang sẽ thu được kết quả bán định lượng và thời gian phân tích có thể ngắn hơn khi tiến hành bằng phương pháp PCR truyền thống.

13.6.3. Ứng dụng của PCR

PCR và các kỹ thuật sinh học phân tử khác thật sự đem lại giá trị ngoài sự mong

đội trong nhiều lĩnh vực của sinh học phân tử, y học và công nghệ sinh học. Những phương pháp này hữu dụng để:

(1). Khuếch đại một lượng nhỏ DNA đặc trưng và cung cấp vật liệu để giải trình tự trực tiếp đoạn DNA, hoặc qua tạo dòng bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn.

(2). Phát hiện vi sinh vật chưa được nhận biết trước đó hoặc vi sinh vật không thể nuôi cấy.

(3). Phát hiện các gen kháng kháng sinh. Kỹ thuật này cũng hỗ trợ cho thử nghiệm nhạy cảm kháng kháng sinh theo phương pháp truyền thống phát hiện gen kháng methicillin ở *Staphylococcus*, gen kháng rifampicin ở *M. tuberculosis*, hay đa kháng do nhiều gen kháng ở vi khuẩn gây bệnh,

(4). Dự đoán và giám sát phản ứng của các cá thể bị nhiễm mạn tính virus viêm gan B (HBV), virus viêm gan C (HCV), hay HIV để đưa ra liệu pháp kháng virus hiệu quả.

(5). Cung cấp thông tin hữu ích để có thể dự đoán tiên triển của bệnh. Ví dụ xác định hàm lượng virus HIV-1 để dự đoán tiên triển bệnh AIDS.

(6). Chẩn đoán các bệnh như AIDS, Lyme, bệnh do nấm chlamydia, bệnh lao, sởi gan do virus, virus papilloma ở người và các yếu tố xâm nhiễm khác.

(7). Phát hiện bệnh di truyền như bệnh thiếu máu do hồng cầu hình lưỡi liềm, bệnh phenylketone niệu và bệnh loạn dưỡng cơ.

(8). Phát hiện virus trong thực phẩm như virus siêu vi gan A (HAV) hay norovirus; vi khuẩn gây bệnh có trong thực phẩm như: *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, ...

(9). Chẩn đoán/phát hiện virus vật gây bệnh cho vật nuôi trên cạn cũng như dưới nước như: WSSV, YHV, TSV, IHNV,

13.7. Công nghệ DNA tái tổ hợp

Trong công nghệ DNA tái tổ hợp, điều trước tiên là phải xác định và phân lập được trình tự DNA mã hóa cho kiểu hình cụ thể nào đó cần sử dụng. Sau khi tinh sạch, gen được dung hợp với các đoạn DNA khác để hình thành phân tử DNA tái tổ hợp. Các phân tử tái tổ hợp này được nhân lên bằng cách chèn vào một sinh vật để tạo dòng.

13.7.1. Vector tạo dòng và tế bào chủ

Một vật chuyển tải tổ hợp tốt phải có hai đặc tính rất cần thiết: nó phải có khả năng mang một đoạn đáng kể DNA cho và vector này phải dễ dàng được vật chủ tạo dòng chấp nhận.

Vector tạo dòng: các vector được sử dụng trong tạo dòng gồm: (a) plasmid, (b) thực khuẩn thể và (c) vector lai (hybrid vector).

(a). Plasmid là những vector tuyệt vời bởi vì chúng có kích thước nhỏ, có đặc tính tốt, dễ thao tác và chúng có thể được chuyển vào trong tế bào chủ thông qua sự biến nạp. Plasmid *E. coli* mang các gen đánh dấu (genetic marker) mã hóa cho tính kháng kháng sinh, mặc dù plasmid này tương đối bị giới hạn và chỉ một lượng nhỏ DNA ngoại lai được chấp nhận.

(b). Thực khuẩn thể cũng là vector tốt bởi vì nó có khả năng tiêm DNA vào tế bào chủ là vi khuẩn DNA thông qua sự tải nạp. Phage *Charon2* được biến đổi từ vector phage thiếu đi một phần lớn bộ gen của chúng; vì vậy nó có thể mang một đoạn tương đối lớn DNA ngoại lai.

(c). Vector lai được phát triển bằng cách nối ghép hai vector khác nhau lại với nhau. *Cosmid* là một ví dụ về vector lai này, nhờ sự kết hợp giữa một plasmid và một phage và có khả năng mang các trình tự bộ gen lớn hơn. Vector lai giữa *E. coli* và nấm men có thể chèn cả phần lớn bộ gen vi khuẩn và nấm men tạo dòng vào trong tế bào chủ tạo dòng.

Vật chủ tạo dòng: *E. coli* là vật chủ tạo dòng truyền thống vẫn còn được sử dụng trong phần lớn các thực nghiệm. Bởi vì vi khuẩn này là vật chủ tái tổ hợp đầu tiên và những hướng dẫn sử dụng được thiết lập tốt, tương đối dễ hiểu và tin cậy. Theo đó hàng trăm các vector tạo dòng đã được phát triển. Những điểm bất lợi chính đối với *E. coli* đó là khuẩn này thiếu đi tính linh hoạt để biểu hiện chính xác các gen eukaryote.

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là một tế bào chủ khác được lựa chọn. Tế bào chủ này được sử dụng cho một số quá trình công nghiệp và nghiên cứu. Vật chủ này là tế bào eukaryote luôn có những cơ chế để chế biến và biến đổi các sản phẩm gen của eukaryote. Một số kỹ thuật này cũng được sử dụng cho các vi khuẩn khác ví dụ như

Bacillus subtilis, nuôi cấy tế bào động vật và thậm chí cho động vật và thực vật sống dùng làm vật chủ tạo dòng.

13.7.2. Các sản phẩm sinh học của công nghệ tái tổ hợp

Công nghệ tái tổ hợp DNA được sử dụng trong lĩnh vực dược học để sản xuất dược phẩm mà không cần bất cứ phương tiện nào khác. Các bệnh như tiểu đường và bệnh lùn do thiếu một hormone thiết yếu, nay được điều trị bằng cách thay thế gen khiếm khuyết hormone.

Insulin bò và heo chỉ là một dạng sản phẩm tái tổ hợp dùng để điều trị bệnh tiểu đường type 1, mặc dù những sản phẩm này gây phản ứng dị ứng ở một số cá thể nhạy cảm. Ngược lại trạng thái lùn có thể không được điều trị bằng hormone tăng trưởng lấy từ động vật mà chỉ được điều trị bằng hormone tăng trưởng ở người (HGH) bằng cách thu nhận từ tuyến yên của tử thi. Chính vì vậy nên nhiều lúc không đủ HGH để điều trị cho hàng ngàn trẻ có nhu cầu. Tuy nhiên hiện nay tình trạng này đã được cải thiện nhờ HGH tái tổ hợp. Công nghệ tái tổ hợp đã làm thay đổi bằng cách sản xuất ra một lượng lớn hormone và enzyme có nguồn gốc từ người đã góp phần giải quyết được một số vấn đề nan giải trong điều trị.

13.8. Sinh vật biến đổi gen

Quá trình nhân tạo đưa các gen ngoại lai vào sinh vật được gọi là sự chuyển nạp (transfection) và sinh vật tái tổ hợp tạo ra trong trường hợp này được gọi là sinh vật chuyển gen (transgenic) hay sinh vật biến đổi gen (GMO).

Các gen ngoại lai được chèn vào nhiều vi sinh vật, thực vật và động vật nhờ kỹ thuật DNA tái tổ hợp như nấm men, thực vật như gạo, cà chua, khoai tây. Sinh vật chuyển gen là các hình thức đời sống độc đáo, được ứng dụng trong công nghệ sinh học.

13.9. Liệu pháp gen

Liệu pháp gen là một kỹ thuật thay thế gen bị khiếm khuyết bằng một gen bình thường. Lợi ích thừa hưởng của liệu pháp này rõ ràng là phương thức điều trị làm thay đổi hoạt động sinh lý do sửa chữa khiếm khuyết di truyền.

Có hai chiến lược cho liệu pháp này đó là: (a) liệu pháp ngoài cơ thể sống (*ex vivo*) và (b) liệu pháp trong cơ thể sống (*in vivo*). Trong liệu pháp ngoài cơ thể sống, gen

bình thường được tạo dòng trong vector, như retrovirus (ví dụ virus gây ung thư bạch cầu ở chuột MLV) hay adenovirus là những virus xâm nhiễm nhưng tương đối vô hại. Các mô lấy từ bệnh nhân được ủ với virus biến đổi gen này để chuyển nạp với gen bình thường. Tế bào qua gây nhiễm sau đó được đưa vào cơ thể bệnh nhân qua đường truyền vào. Ngược lại đối với liệu pháp trong cơ thể sống không có bước trung gian ủ mô được xén từ bệnh nhân. Thay vào đó là DNA trần hay vector virus được đưa trực tiếp vào mô bệnh nhân.