



Real-time PCR từ góc độ lý thuyết căn bản đến khả năng áp dụng thực tiễn trong y học lâm sàng Việt Nam

Bùi Xuân Trường*, Vũ Tường Vân**, Nguyễn Xuân Quang**

Tóm tắt

Sự phát triển của sinh học phân tử, trong đó có kỹ thuật real-time PCR, đã giúp ích rất nhiều mặt cho nghiên cứu y học. Hiện nay trong y học, real-time PCR đã trở thành kỹ thuật thường quy trong quá trình chẩn đoán và đánh giá hiệu quả điều trị nhiều bệnh do virus gây ra như viêm gan B, viêm gan C, HIV-AIDS... Real-time PCR là kỹ thuật có khả năng đánh giá - nghiên cứu DNA, RNA với một số ưu điểm mà các kỹ thuật khác không có. Chúng ta đang ở giai đoạn đầu của sự phát triển kỹ thuật real-time PCR. Tiềm năng áp dụng real-time PCR vào y học lâm sàng rất rộng lớn và đang được quan tâm nghiên cứu từ bệnh lý truyền nhiễm, di truyền, ung thư đến các bệnh lý chuyển hoá có liên quan đến biến đổi gen và yếu tố gen trong sinh bệnh học.

I. LỜI MỞ ĐẦU

Năm 1944, ấn phẩm “Sự sống là gì - What is Life” của Erwin Schrodinger và Max Delbruck phát hành, được đánh giá là minh chứng chính thức đầu tiên về một lĩnh vực khoa học - nghiên cứu mới: sinh học phân tử. Jim Watson và Francis Crick với mô hình cấu trúc xoắn kép phân tử DNA công bố vào năm 1953 đã mở ra một kỷ nguyên mới, nghiên cứu khám phá thế giới vật chất lưu trữ thông tin di truyền sự sống. Cho đến nay, sau hơn năm thập kỷ phát triển, nhân loại đã đạt được những thành tựu to lớn trong lĩnh vực sinh học phân tử và di truyền học, đem những hiểu biết đó áp dụng vào thực tiễn cuộc sống trong nhiều lĩnh vực, trong đó có y học. Các ngành khoa học, dù là bất

kỳ ngành nào, muốn phát triển lên các bậc thang mới thì cần phải có các phương pháp và phương tiện nghiên cứu phù hợp làm công cụ hữu ích cho các nhà nghiên cứu, các nhà chuyên môn. Nghiên cứu y học nói chung và sinh học phân tử nói riêng cũng không phải là một ngoại lệ. Khi khoa học ngày càng phát triển, điều này luôn đồng nghĩa với việc nhà nghiên cứu và nhà chuyên môn ngày càng phải tiếp cận và hấp thụ một khối lượng tri thức nhiều hơn. Trong tiến trình phát triển nghiên cứu, việc tìm ra các phương pháp có độ tin cậy cao, không quá phức tạp, không quá đắt tiền và có khả năng triển khai trong thực tiễn luôn được các nhà khoa học quan tâm. Trong lĩnh vực sinh học phân tử, việc khám phá ra phân tử DNA polymerase của Arthur Kornberg vào năm 1957 và mô phỏng

* Khoa Tiêu hóa - Bệnh viện Bạch Mai

** Khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai



thành công cấu trúc không gian của phân tử DNA polymerase I của E. Coli năm 1970 đã tạo nên những tiền đề căn bản trong lĩnh vực nghiên cứu tổng hợp phân tử DNA bằng con đường hoá học. Trong thập kỷ 1970 một số nhà khoa học đã nêu ra những giả thuyết và mô phỏng khả năng sử dụng các cặp mồi (primers) để tổng hợp phân tử DNA và sự thành công của kỹ thuật nhân dòng, giải trình tự gen vào thập kỷ những năm 1980 đã tạo những bước đột phá cho sự ra đời của kỹ thuật tổng hợp chuỗi gen (PCR: polymerase chain reaction), như một tác động tương hỗ hữu cơ, kỹ thuật PCR lại tạo tiền đề cho kỹ thuật nhân dòng và giải trình tự gen phát triển ngày một mạnh mẽ. Năm 1983, Kary Mullis một nhà nghiên cứu thuộc công ty sinh học Centus Corporation tại California, Hoa Kỳ đã nghiên cứu thành công kỹ thuật PCR với chu trình vòng nhiệt để khuếch đại các đoạn phân tử DNA. Tuy nhiên, lúc đầu nghiên cứu của Kary Mullis không nhận được sự quan tâm và ghi nhận của các nhà khoa học, khi bài báo khoa học đầu tiên sử dụng kỹ thuật PCR phân tích đột biến gen công bố trên tạp chí Science vào năm 1985 thì kỹ thuật này mới được thừa nhận rộng rãi. Năm 1993, Kary Mullis đã được nhận giải thưởng Nobel.

Với sự ra đời của kỹ thuật PCR, nghiên cứu acid nucleic (DNA, RNA) đã có những bước tiến ngoài sự dự đoán của nhiều nhà khoa học. Trong y học, một trong những lĩnh vực được áp dụng sớm nhất và nhiều nhất đó là nghiên cứu, chẩn đoán các bệnh do virus và vi khuẩn. Lúc đầu kỹ thuật PCR chỉ dừng lại ở mức định tính, dương hay âm tính. Tuy nhiên, xuất phát đòi hỏi từ thực tiễn của bệnh do virus gây ra, áp dụng kỹ thuật PCR để định lượng nồng độ virus ngay từ đầu đã luôn được các nhà nghiên cứu y học tìm tòi khám phá. Các nhà khoa học đã không tự hài lòng và không dừng lại ở kỹ thuật PCR bán định lượng, đặc biệt là sự xuất hiện của đại

dịch AIDS đã hồi thúc cộng đồng khoa học đoàn kết lại để tìm ra một phương thức kỹ thuật PCR định lượng mới. Năm 1991, với sự thành công tìm ra cơ chế hoạt động theo chu trình từ đầu 5 đến đầu 3 của phân tử DNA polymerase; Gelfand D, Holland P và cộng sự đã đặt nền tảng cho sự phát triển kỹ thuật PCR mới (real-time PCR) và khái niệm “TaqMan” ra đời. Những phát kiến của Gelfand D, Holland P và kế tiếp sau đó của Higuchi R và cộng sự vào năm 1992 đã nhận được sự quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu và của nhiều công ty sinh học trên thế giới. Cuối cùng, với sự phát triển và hợp tác của nhiều công ty sinh học nổi tiếng như Genetech, Roche và ABI (Applied Biosystems), kỹ thuật real-time PCR đã được hoàn thiện và chính thức áp dụng vào khoảng năm 1995. Ngày nay, áp dụng kỹ thuật real-time PCR định lượng nồng độ virus đã trở nên phổ biến rộng khắp và khá thường quy tại nhiều khu vực trên thế giới, đã giúp ích rất nhiều y học lâm sàng trong chẩn đoán và đánh giá hiệu quả điều trị một số bệnh do virus gây ra.

Trong các kỹ thuật sinh học phân tử, real-time PCR là một kỹ thuật không quá khó, dễ triển khai, dễ áp dụng rộng rãi trên thực tiễn và khả năng chẩn đoán chính xác cao. Bài viết này đề cập phân tích bao gồm khái niệm về PCR thường quy và real-time PCR từ khía cạnh lý thuyết cơ bản đến những khả năng áp dụng real-time PCR trong thực tiễn y học lâm sàng Việt Nam.

II. PHẢN ỨNG TỔNG HỢP CHUỖI GEN – PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Ngày nay, trong thực hành chẩn đoán và nghiên cứu các bệnh truyền nhiễm, PCR là kỹ thuật được sử dụng nhiều nhất để khuếch đại acid nucleic, bao gồm cả DNA và RNA. Để thực hiện được PCR, bước đầu tiên cần làm là phải tách



phân tử DNA và RNA của đối tượng nghiên cứu, chẩn đoán. Riêng đối với RNA trước khi làm PCR cần phải tiến hành thêm bước chuyển đảo ngược (RT: reverse transcription) RNA sang DNA, do vậy phản ứng khuếch đại RNA thường được viết hay ký hiệu là RT-PCR. Sự khác biệt cơ bản trong bước chuẩn bị tiến hành làm PCR giữa DNA và RNA được minh họa ở hình 1. Tuy nhiên, trong khuôn khổ bài viết này, chúng tôi không đề cập đến kỹ thuật tách DNA, tách RNA và kỹ thuật phiên mã ngược từ RNA sang DNA.

Để tiến hành PCR cần phải có các vật liệu vật chất bao gồm:

1. Phân tử DNA cần khuếch đại, đã được tách chiết và làm sạch ở một mức độ nhất định.
2. Các nucleotide triphosphates nguyên liệu (dNTPs) để tạo nên 4 loại nucleotide là Adenine, Guanine, Thymine và Cytosine.
3. Cặp mồi oligonucleotide (primer) bao gồm một mồi xuôi (forward hay sense) và một mồi ngược (reverse hay anti-sense), chiều dài thông thường của một primer vào khoảng từ 18-

22 nucleotides.

4. Phân tử polymerase (DNA polymerase) bền vững với nhiệt độ.

5. Dung dịch đệm (buffer) có chứa ion magnesium.

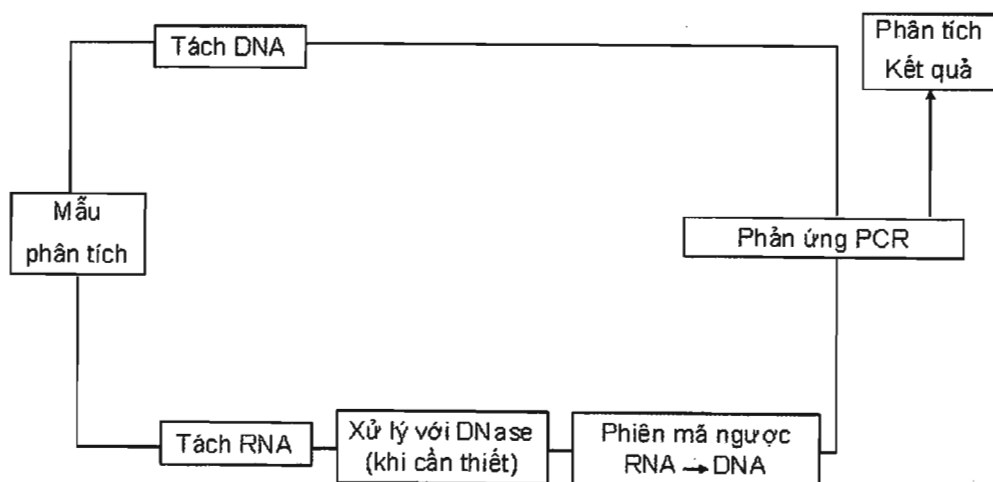
6. Nước tinh khiết (H₂O) để pha dung dịch phản ứng PCR (bao gồm cả phân tử DNA, dNTPs, primer, DNA polymerase, dung dịch đệm) theo tỷ lệ nồng độ mong muốn.

7. Máy PCR (thiết bị tạo vòng nhiệt độ trong chu trình phản ứng PCR).

Chu trình vòng nhiệt căn bản trong PCR và ý nghĩa của từng mức nhiệt độ (hình 2):

1. Denaturation (duỗi tách): Mức nhiệt độ thông thường 92°C - 95°C với thời gian từ vài chục giây đến vài phút. Đây là giai đoạn làm duỗi tách phân tử DNA cần khuếch đại.

2. Annealing (kết gắn): Mức nhiệt độ thông thường 50°C - 60°C với thời gian từ vài chục giây đến vài phút. Đây là giai đoạn kết gắn mồi (primer) vào đầu 5 và 3 của phân tử DNA cần khuếch đại.



Sơ đồ 1. Mô hình mô phỏng một số đặc điểm giống nhau cũng như sự khác biệt căn bản trong các bước chuẩn bị tiến hành làm PCR đối với DNA và RNA.



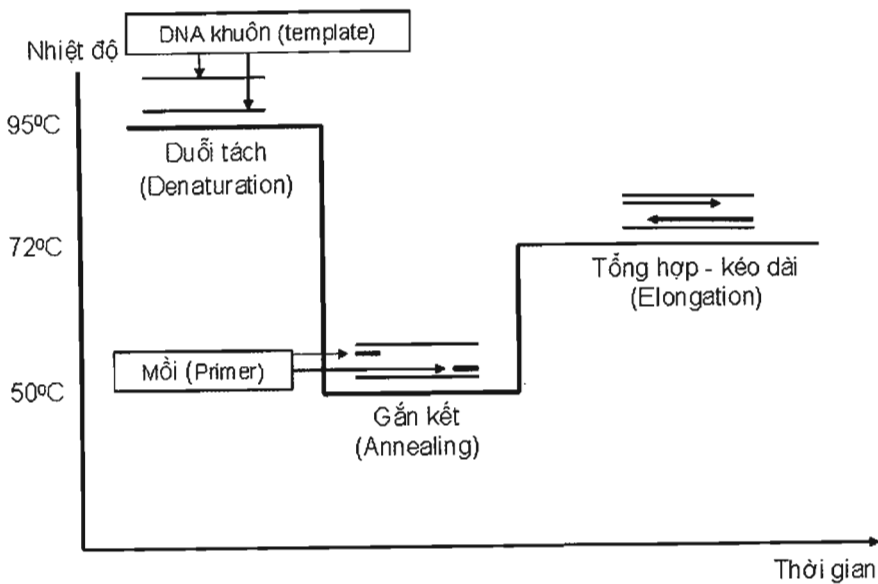
3. Elongation (nhân bản): Mức nhiệt độ thông thường 70°C - 78°C với thời gian từ một phút đến một vài phút. Đây là giai đoạn phân tử DNA polymerase phát huy tác dụng với sự có mặt của các nucleotide triphosphates nguyên liệu để tổng hợp đoạn DNA cần khuếch đại.

Để tạo được hàm lượng DNA (PCR product) theo mong muốn, chu trình vòng nhiệt PCR cần phải lặp đi lặp lại nhiều lần (vòng PCR- cycle of PCR reaction), thông thường một phản ứng PCR có khoảng từ 20 đến 35 vòng. Sau mỗi một vòng PCR, lượng DNA khuếch đại tăng theo hệ số mũ (2^n , trong đó n: là số vòng PCR). Tuy nhiên, trên thực tế không hiếm các trường hợp, trên một số mẫu không phải phản ứng PCR nào cũng đạt được hàm lượng DNA khuếch đại theo mong muốn, chính vì vậy kết quả PCR vẫn âm tính. Trong các trường hợp như vậy, đòi hỏi người làm thực nghiệm phải hiểu biết tường tận và có kinh nghiệm thực tiễn để chỉnh lại tỷ lệ nồng độ dung dịch phản ứng PCR, điều chỉnh lại chu trình vòng PCR bao gồm cả thời gian, mức nhiệt độ của từng giai đoạn trong chu trình vòng nhiệt PCR và cả số lượng vòng PCR cần thiết, đôi khi còn phải thay đổi thiết kế trình tự cặp mồi. Chính vì vậy, không có gì ngạc nhiên khi với cùng một chẩn đoán, mà phòng thí nghiệm này có thể cho kết quả âm tính và phòng thí nghiệm khác cho kết quả dương tính hoặc ngược lại. Nhiều trường hợp, để đạt được kết quả theo mong muốn, chẩn đoán đúng, phản ứng PCR cần phải làm đi làm lại nhiều lần. Ngược lại, trong một số trường hợp do phạm lỗi kỹ thuật, gây nên hiện tượng lây nhiễm ngang (contamination) giữa các mẫu, phản ứng PCR cho kết quả dương tính đối với các trường hợp mà đúng ra kết quả là âm tính. Một hạn chế cơ bản hiện nay trong kỹ thuật PCR là các cặp mồi được thiết kế phải dựa trên cơ sở các bản giải trình tự gen đã biết, trong khi chúng ta chỉ biết hữu hạn một số lượng các bản giải trình tự gen nhất định. Hơn nữa, các gen của

sinh vật nói chung, đều có những vùng khá hằng định và vùng dễ biến đổi, chính vì vậy để xác định vùng hằng định bao giờ cũng dễ dàng hơn vùng biến đổi.

III. REAL-TIME PCR

Trước khi kỹ thuật real-time PCR ra đời, một số kỹ thuật PCR định lượng khác đã được phát triển, tuy nhiên nhược điểm căn bản của các kỹ thuật đó là rất khó triển khai rộng rãi trên thực tiễn. Ngay cả trong lĩnh vực nghiên cứu, nếu sử dụng kỹ thuật PCR định lượng không phải real-time PCR, để tiến hành định lượng DNA hay RNA của một mẫu nghiên cứu cũng mất khá nhiều thời gian. Hoặc một số kỹ thuật PCR định lượng khác chỉ cho biết mức nồng độ của mẫu phân tích trong một ma trận phân tầng nồng độ, chứ không đưa ra được một đơn vị đo lường cụ thể. Chính vì vậy, kỹ thuật real-time PCR ra đời đã đáp ứng và giải quyết được những vấn đề cả trong thực nghiệm nghiên cứu và thực tiễn. Hiện nay, trong y học lâm sàng, kỹ thuật real-time PCR được áp dụng rộng rãi nhất trong định lượng nồng độ virus như viêm gan B, viêm gan C, virus HIV... Tuy nhiên, nhiều tính năng khác của real-time PCR đang được nghiên cứu và ngày càng được khẳng định với những ưu điểm mà một số kỹ thuật khác không có. Mặt khác, chúng ta nên biết rằng, real-time PCR là một thuật ngữ khoa học bao trùm một nhóm kỹ thuật ghi tín hiệu trực tiếp bằng PCR trong phân tích DNA, chính vì vậy kỹ thuật real-time có nhiều cách tiến hành khác nhau với những đặc điểm chung cơ bản nhất định và một số đặc điểm riêng của từng kỹ thuật. Trong phạm vi bài này, chúng tôi đề cập đến những khía cạnh cơ bản nhất của real-time PCR với phương pháp sử dụng oligonucleotides TaqMan probes (5'Nuclease oligoprobes).



Sơ đồ 2. Mô tả ba giai đoạn cơ bản trong một chu trình vòng nhiệt của phản ứng PCR, Denaturation: giai đoạn duỗi tách DNA, Annealing: giai đoạn kết gắn mồi-primer vào đầu 5' và 3' của đoạn DNA cần khuếch đại và Elongation: giai đoạn nhân bản đoạn DNA cần khuếch đại

Những đặc điểm giống nhau và khác nhau giữa real-time PCR và kỹ thuật PCR thường quy

Real-time PCR chính là kỹ thuật PCR có ghi tín hiệu trực tiếp và tức thì trong quá trình phản ứng PCR diễn ra. Chính vì vậy các vật liệu vật chất của real-time PCR về mặt cơ bản cũng không khác nhiều so với PCR thường quy, có nghĩa là cũng bao gồm nước tinh khiết (H₂O), dung dịch đệm, DNA polymerase, cặp mồi (primers) bao gồm cả mồi xuôi và mồi ngược, các nucleotide triphosphate nguyên liệu (dNTPs). Thông thường hiện nay trong real-time PCR hay sử dụng dung dịch phản ứng MasterMix, trong thành phần dung dịch này đã có sẵn dung dịch đệm, DNA polymerase, các nucleotides triphosphate nguyên liệu pha sẵn theo một tỷ lệ thích hợp rất thuận tiện cho việc sử dụng. Tuy nhiên trong real-time PCR cần phải có thêm TaqMan probe, một đoạn oligonucleotide với chiều dài được thiết kế thông thường khoảng 25 nucleotide. Một đầu là reporter có gắn chất chỉ thị huỳnh quang - fluorescence và một đầu là quencher (đầu ngắt), chính với chất chỉ thị huỳnh quang và vai trò phối hợp của đầu quencher đã giúp cho việc ghi tín hiệu trực tiếp trong quá trình phản ứng PCR

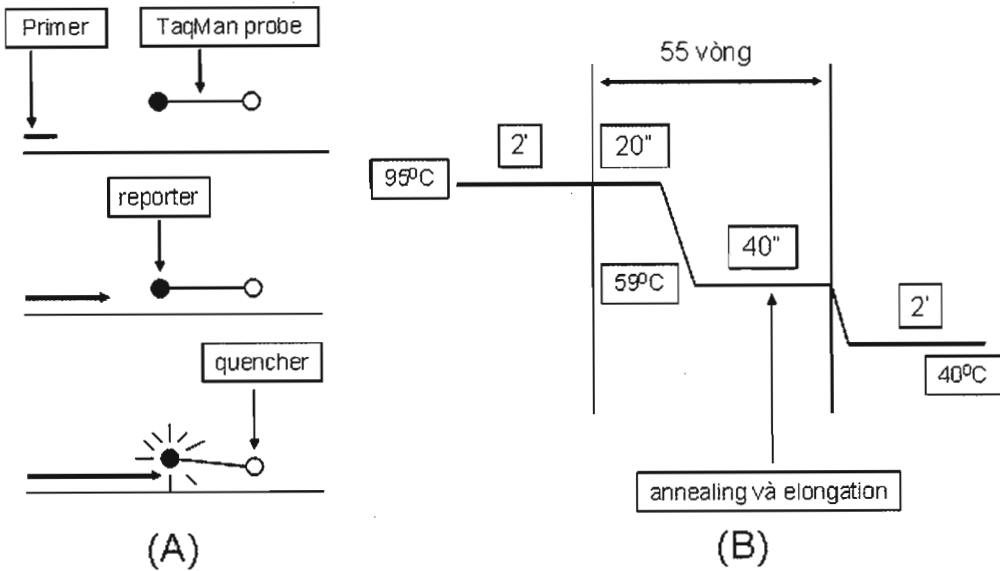
diễn ra (hình 3). Chất gắn ở đầu reporter và đầu quencher không giống nhau, ví dụ đầu reporter có thể là FAM (6-carboxyfluorescein) và đầu quencher có thể là TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine). Trong real-time PCR, TaqMan probe sẽ kết gắn với đoạn phân tử DNA cần phân tích ở vị trí nằm giữa mồi xuôi và mồi ngược.

Về chu trình vòng nhiệt độ trong real-time PCR cũng bao gồm ba giai đoạn cơ bản, denaturation (duỗi tách), annealing (kết gắn) và elongation (nhân bản), tuy nhiên hai giai đoạn annealing và elongation được gộp vào làm một (hình 3). Nhiệt độ thông thường ở giai đoạn denaturation (duỗi tách) là 95°C với thời gian khoảng một vài chục giây. Nhiệt độ thông thường của giai đoạn annealing (kết gắn) và elongation (nhân bản) là 59°C-60°C, thời gian thường không quá một phút. Về số vòng chu trình nhiệt độ trong real-time PCR thường nhiều hơn so với PCR thường quy, hay sử dụng từ 50-60 vòng (hình 3). Một điểm khác biệt nữa, vị trí đoạn gen được chọn phân tích trong real-time PCR thường là vùng hằng định của gen, đặc biệt đối với định lượng nồng độ mới đảm bảo tính chính xác và độ dài đoạn gen nằm giữa mồi



xuôi (forward) và mỗi ngược (reverse) cũng không nên quá dài. Vì real-time PCR là một kỹ thuật ghi tín hiệu trực tiếp trong quá trình phản ứng và dựa vào phân tích tín hiệu này sẽ cho ra kết quả cần biết, vì vậy mỗi một loại máy real-time PCR đều có sự kết nối với máy tính và có một phần mềm

trương ứng để phân tích số liệu. Ngoài ra, để có được kết quả chính xác, trong real-time PCR cần phải có các mẫu chuẩn (đặc biệt là trong định lượng nồng độ) để xây dựng nên phương trình xử lý kết quả, sẽ được phân tích kỹ hơn tiếp sau đây.



Sơ đồ 3. (A) Mô phỏng cơ chế kỹ thuật real-time PCR, việc có thêm TaqMan probe với đầu reporter có gắn chất chỉ thị huỳnh quang-fluorescence và đầu quencher là đặc điểm cơ bản khác biệt với kỹ thuật PCR thường quy. (B) Mô tả một chu trình vòng nhiệt cơ bản trong kỹ thuật real-time PCR, bước annealing và elongation được gộp làm một

Nguyên lý căn bản cách tính nồng độ DNA trong real-time PCR (hình 4)

Trong real-time PCR, đồ thị tín hiệu thu được của các mẫu phân tích được biểu diễn dưới dạng lô-ga-rít, bao gồm hai pha cơ bản là pha tăng và pha bão hoà (cao nguyên). Số vòng real-time PCR cần thiết đối với một mẫu để đạt được mức cơ sở (threshold line) được ký hiệu là CT. Tùy theo từng loại máy real-time PCR và phần mềm phân tích đi cùng mà cách tính mức cơ sở (threshold line) có một số điểm khác biệt nhất định. Tuy nhiên, cho dù hoàn thiện đến đâu chẳng nữa chúng ta cũng không thể hoàn thiện thiết bị 100%.

Ví dụ, hiệu suất của thiết bị là 100%, tỷ lệ nồng độ của mẫu A và mẫu B trong real-time PCR sẽ là:

$$[N_0]B/[N_0]A = 2^{(CT_A - CT_B)}$$

Trong đó: CT_A và CT_B là CT của mẫu A và mẫu B, [N₀]A và [N₀]B là nồng độ đạt được của mẫu A và

mẫu B. Nếu như CT_B đạt được chậm hơn so với CT_A 5 vòng phản ứng real-time PCR, vậy nồng độ của mẫu B sẽ thấp hơn mẫu A là $25 = 2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2 = 32$ lần.

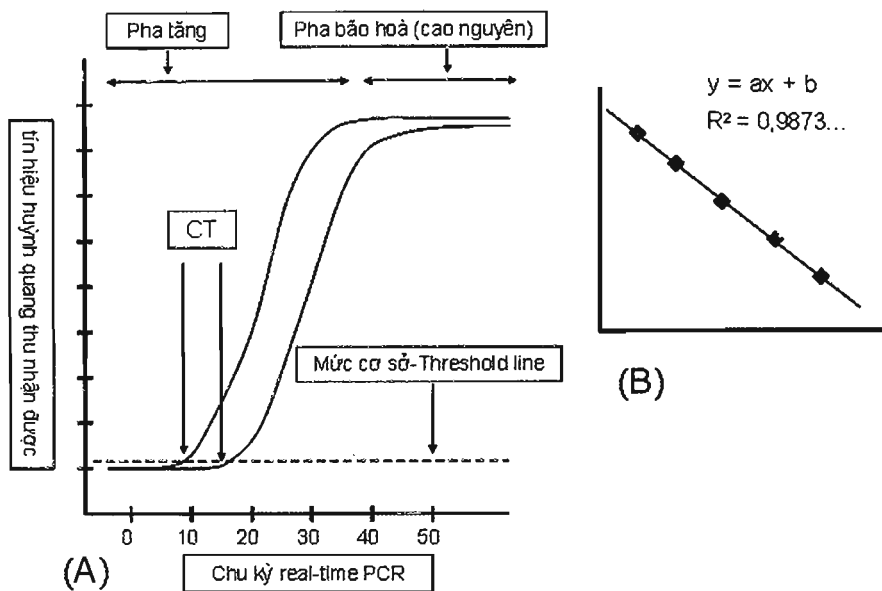
Nếu hiệu suất của thiết bị chỉ là 90%, trong trường hợp này, tỷ lệ nồng độ của mẫu A và mẫu B trong real-time PCR sẽ là:

$$[N_0]B/[N_0]A = (1+E)^{(CT_A - CT_B)}$$

với E = 0,9

vậy nồng độ của mẫu B sẽ thấp hơn mẫu A là $(1+0,9)^5 = 24,76$ lần.

Qua hai ví dụ trên đây chúng ta nhận thấy khoảng cách 32 lần và 24,76 lần là hoàn toàn khác nhau với trị số chênh lệch rất lớn. Để thuận lợi trong tính toán giá trị của nồng độ các mẫu phân tích và không phải kiểm tra hiệu suất thiết bị mỗi khi sử dụng, trong real-time PCR luôn luôn sử dụng các mẫu với nồng độ chuẩn, thường là năm mẫu với năm nồng độ chênh nhau liên tiếp 10 lần.



Sơ đồ 4. (A) Mô phỏng đường cong lô-ga-rít tín hiệu thu nhận được trong quá trình phản ứng real-time PCR. (B) Phương trình tổng quan tuyến tính xác lập dựa trên các mẫu chuẩn.

Chính nồng độ các mẫu chuẩn trong phản ứng real-time PCR sẽ giúp xây dựng được phương trình tương quan tuyến tính $y = ax + b$ với độ tương quan rất chặt chẽ giúp cho việc xác định được hiệu suất thiết bị một cách tự động, đồng thời làm cơ sở để tính được nồng độ của các mẫu phân tích. Tuy nhiên, một đặc điểm căn bản cần phải hiểu rõ, đường cong tín hiệu của các mẫu chuẩn không hoàn toàn tuân theo đồ thị hàm lô-ga-rít giống như mẫu phân tích, do vậy phương pháp real-time PCR chỉ có khả năng định lượng được trong một khoảng giới hạn nhất định, ngoài khoảng đó sẽ không đạt được tính chính xác. Hơn nữa, mặc dù đã có mẫu chuẩn nồng độ để xây dựng lên hàm số toán học, nhưng nếu mẫu phân tích khi tách DNA không đạt được mức độ tinh khiết tốt cũng sẽ làm sai lệch kết quả. Với sự phát triển của khoa học ngày nay, các thế hệ máy real-time PCR và phần mềm phân tích ngày càng hoàn thiện đã giúp cho phương pháp real-time PCR có khả năng định lượng nồng độ với khoảng giá trị ngày càng mở rộng với tính chính xác cao.

IV. REAL-TIME PCR VÀ NHỮNG TRIỂN VỌNG ỨNG DỤNG TRONG Y HỌC LÂM SÀNG VIỆT NAM

Real-time PCR là một kỹ thuật phân tích đơn vị vật chất lưu trữ thông tin di truyền tế bào và một số cơ quan trong tế bào. Chúng ta đang ở giai đoạn đầu

trong sự phát triển của kỹ thuật real-time PCR, rất nhiều tính năng và khả năng áp dụng các tính năng của real-time PCR vào thực tiễn nghiên cứu khoa học và phục vụ cuộc sống con người nói chung và y học nói riêng đang được nhiều nhà khoa học quan tâm tìm hiểu. Điều đáng mừng là y học Việt Nam đã từng bước tiếp cận với real-time PCR trong một vài năm trở lại đây và đưa kỹ thuật real-time PCR không chỉ phục vụ cho các nghiên cứu y học mà còn phục vụ cho thực tiễn công tác khám chữa bệnh ở một số trung tâm y tế - bệnh viện lớn tại Hà Nội và thành phố Hồ Chí Minh. Việt Nam nằm trong khu vực đại dịch nhiễm virus viêm gan B của thế giới, bên cạnh đó tỷ lệ nhiễm virus viêm gan C ngày một có chiều hướng gia tăng. Chúng ta đã triển khai nhiều chương trình hiệu quả trong phòng chống HIV - AIDS, tuy nhiên HIV-AIDS vẫn luôn thường trực là một vấn đề được xã hội hết sức quan tâm. Gần đây, các bệnh dịch do virus khác, đặc biệt virus cúm A-H₂N₁ và H₁N₁ đã dự báo những diễn biến phức tạp của bệnh truyền nhiễm trên thế giới trong tương lai. Bên cạnh đó, cùng chia sẻ với nhiều khía cạnh khác của y học-y tế thế giới, Việt Nam cũng đang phải xây dựng chiến lược giải quyết nhiều vấn đề liên quan đến phòng ngừa, chẩn đoán và điều trị các bệnh lý ung thư. Với sự phát triển và hội nhập của đất nước trong



cộng đồng quốc tế, mô hình xã hội, cơ cấu kinh tế và thói quen sống cũng có nhiều đặc điểm khác với trước đây, chính vì vậy những bệnh lý chuyển hoá liên quan đến môi trường và thói quen lối sống cũng có xu hướng gia tăng tại Việt Nam. Hiện nay, có nhiều bệnh lý không thể cắt nghĩa một cách cơ học tách biệt các yếu tố như kiểu gen, yếu tố môi trường (bao gồm cả môi trường sống và môi trường chuyển hoá bên trong cơ thể) và yếu tố gây bệnh là vi khuẩn, virus, ký sinh trùng hay côn trùng. Chính vì vậy, trong nghiên cứu y học hiện nay nhiều ranh giới chuyên khoa bị xóa nhòa, nhiều nền y học mạnh của thế giới, tùy theo năng lực cụ thể đều xây dựng mô hình liên thông trực tiếp xuyên suốt từ nghiên cứu cơ bản cho đến thử nghiệm trên động vật và thực tiễn trên cơ thể người bệnh trong một khoa hoặc một cụm nghiên cứu trung tâm.

Trong y học, sinh học phân tử nói chung và PCR, real-time PCR nói riêng là một lĩnh vực khoa học cũng không thể đứng tách riêng, biệt lập. Sự phát triển của real-time PCR sẽ cung cấp thêm cho các nhà nghiên cứu một công cụ mới với độ tin cậy cao trong phân tích yếu tố vật chất lưu trữ thông tin tế bào là DNA và RNA. Cho đến nay, trong y học lâm sàng, real-time PCR được áp dụng nhiều nhất trong chẩn đoán “đương tính hay âm tính” và định lượng nồng độ virus trong các bệnh do virus gây ra. Nếu chỉ dừng lại ở mức này, thì phạm vi áp dụng của real-time PCR còn quá khiêm tốn và không xứng tầm với một kỹ thuật phân tích gen có nhiều điểm ưu việt. Do vậy, phạm vi áp dụng của real-time PCR đang được mở rộng để phân tích kiểu gen, phân tích đột biến gen đối với yếu tố gây bệnh: vi khuẩn, virus... cho đến tế bào vật chủ. Với sự phát triển mạnh mẽ của y - dược học song song cùng nhiều ngành khoa học khác, nhiều khái niệm mới xuất hiện như dịch tễ học phân tử, dược lý gen học và dược lý di truyền (pharmacogenomics and pharmacogenetics), cũng như chẩn đoán và đánh giá hiệu quả điều trị các bệnh ung thư ở mức độ phân tử. Đây là những lĩnh vực mà real-time PCR có rất nhiều tiềm năng áp dụng với một số ưu điểm mà một số phương pháp khác như hoá mô miễn dịch, Southern blot, Northern blot hay đếm dòng tế bào không có được. Nhiều tác giả đang cố gắng hoàn thiện và đưa ra phương pháp multiplex real-time PCR hoặc phối hợp giữa real-time PCR với phương pháp khác như ELISA. Điều này cho thấy một tương lai với

phạm vi áp dụng rộng lớn của real-time PCR trong các bệnh lý có phân tích đến yếu tố gen từ bệnh truyền nhiễm, di truyền, ung thư cho đến các bệnh chuyển hoá. Sự hội nhập của y học Việt Nam trong nền y học thế giới hiện nay và trong tương lai là hết sức rộng mở, đây chính là cơ hội tốt để cho các nhà nghiên cứu và chuyên môn y học Việt Nam nắm bắt, học hỏi và từng bước theo kịp sự phát triển kỹ thuật real-time PCR.

V. KẾT LUẬN

Mặc dù bài viết đề cập đến một khía cạnh chuyên môn khá đặc thù và trên một khía cạnh nào đó còn khá mới mẻ đối với nhiều nhà y học lâm sàng, tuy nhiên chúng tôi không đi quá sâu phân tích vào những đặc điểm của từng kỹ thuật PCR nói chung và kỹ thuật real-time PCR nói riêng. Bài viết cố gắng đề cập đến những khái niệm cơ bản nhất của PCR thường quy và kỹ thuật real-time PCR được áp dụng phổ biến nhất hiện nay, cũng như bước đầu đề cập đến những tiềm năng to lớn áp dụng real-time PCR vào y học lâm sàng Việt Nam ❖

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cockeril FR. (2003). Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 127:1112-1120.
 2. Durischi JD, Stevenson J, Hymas W and Voelkerding KV. (2006). Evaluation of quantification methods for real-time PCR minor groove binding hybridization probe assays. *Anal Biochem* 361: 55-64.
 3. Hnatyszyn HJ, Podack ER, Young AK et al. (2001). The use of real-time PCR and fluorogenic probes for rapid and accurate genotyping of newborn mice. *Mol Cell Pro* 15:169-175.
 4. Lind K, Stahlberg A, Zoric N et al. (2006). Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *BioTech* 40:315-318.
 5. Makinen J, Mertsola J, Viljamen MK et al. (2002). Rapid typing of *Bordetella pertussis* pertussis toxin gene variants by lightcycler real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer hybridization probe melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 40: 2213-2216.
 6. Monis PT, Giglio S and Saint CP. (2005). Comparison of SYTO9 and SYBR green 1 for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem* 340: 24-34.
 7. Williams PM. (2009). The beginning of real-time PCR. *Clin Chem* 55:1-2.
- Real-time PCR from basic principles to applied aspects of clinical medicine in Vietnam.*