	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	Mã số: Trang: Ban hành: Ngày ban hành:
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN VIBRIO CHOLERAЕ	Cơ quan ban hành KHOA VI KHUẨN

Mã số:

Lần ban hành:

Ngày ban hành:


Bản số:

Người giữ:

	Biên soạn	Xem xét	Phê duyệt
Họ và tên	Ths. Lê Thanh Hương	TS. Nguyễn Đồng Tú	PGS. TS. Hoàng Thị Thu Hà
Ký tên			

THEO DÕI VÀ SỬA CHỮA TÀI LIỆU

TT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	<i>Mã số:</i> <i>Trang:</i> <i>Ban hành:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN <i>VIBRIO CHOLERA</i>	<i>Cơ quan ban hành</i> KHOA VI KHUẨN

1. Mục đích

Phát hiện các gen đặc hiệu và gen độc tố tả (cholera toxin A) của *V. cholerae* O1, O139 và NAG.

2. Phạm vi áp dụng

Phát hiện *V. cholerae* và độc tố tả từ các chủng vi khuẩn hoặc trực tiếp từ phân, thực phẩm, nước.

3. Nguyên lý

Sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu để khuếch đại các đoạn gen mã hóa *V. cholerae* O1, O139, NAG và độc tố tả (cholera toxin A) bằng phản ứng chuỗi men. Quá trình này được lặp lại nhiều lần để tổng hợp hàng triệu bản sao của đoạn gen từ một vài phân tử ADN ban đầu qua đó có thể phát hiện được các đoạn gen dưới đèn UV sau khi điện di.

4. Trách nhiệm

4.1. Trưởng phòng thí nghiệm

- Duyệt lại các kết quả xét nghiệm
- Cập nhật các thay đổi của qui trình

4.2. Quản lý chất lượng của phòng thí nghiệm

4.3. Nhân viên

- Thực hiện thao tác xét nghiệm
- Đảm bảo các mẫu bệnh phẩm được dán nhãn đúng và ghi vào sổ nhận mẫu
- Hoàn tất báo cáo trả lời kết quả xét nghiệm
- Đảm bảo kiểm soát chất lượng nội bộ phù hợp với tiêu chuẩn


5. Định nghĩa và các từ viết tắt

5.1. Định nghĩa

5.2. Các từ viết tắt

6. An toàn

- Mặc áo choàng, mang găng tay và khẩu trang khi tiếp xúc với các mẫu bệnh phẩm
- Mang găng tay suốt quá trình thao tác kỹ thuật PCR

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	<i>Mã số:</i> <i>Trang:</i> <i>Ban hành:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN <i>VIBRIO CHOLERA</i>	<i>Cơ quan ban hành</i> KHOA VI KHUẨN

4. THÔNG TIN MẪU BAN ĐẦU

STT	Tên mẫu	Dụng cụ chứa	Chất thêm vào	Số lượng cần có	Yêu cầu về vận chuyển và lưu giữ
1	Chủng vi khuẩn	Thạch mềm hoặc thạch dinh dưỡng	Không		Nhiệt độ phòng (2-4 tuần)
2	Phân	Lọ vô trùng	Không	3 g	Nhiệt độ phòng (giữ trong ngày) 2-8 ⁰ C (<2 ngày)
3	Nước	Chai sạch	Pepton kiểm 10X	450ml	Giữ ở nhiệt độ phòng <3 ngày


5. TRANG THIẾT BỊ-HÓA CHẤT-SINH PHẨM

5.3. Thiết bị:

- Máy luân nhiệt :Mastercycler eppendorf
- Máy chụp gen
- Máy điện di
- Máy ly tâm eppendorf 10.000
- Máy lắc có điều chỉnh nhiệt độ
- Máy khuấy từ
- Máy trộn vortex
- Máy đo pH
- Cân điện
- Tủ lạnh 4⁰C, -20⁰C và -80⁰C
- Tủ ẩm

5.4. Dụng cụ:

- Que cấy vi khuẩn
- Micropipette:: 2,5; 10-50; 100-200 và 1000 μ l
- Đầu tít các cỡ
- Tube eppendorf các cỡ: 0,2; 0,5; 1,5ml
- Hộp để đầu tít

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	Mã số: Trang: Ban hành: Ngày ban hành:
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN <i>VIBRIO CHOLERA</i>	Cơ quan ban hành KHOA VI KHUẨN


- Giá đỡ đầu tube
- Ống nghiệm 12
- Hộp lồng, bình cầu, ống đong
- Chai 0,5lít, 1 lít
- Găng tay các cỡ

5.5. Sinh phẩm hóa chất

Bảng 1: các đoạn mồi dùng trong kỹ thuật PCR phát hiện gen đặc hiệu của *V. cholerae*

Tên mồi	Trình tự mồi	Gen chỉ điểm	Kích thước gen (bp)
VCO1 F2-1 VCO1R2-2	5' GTT TCA CTG AAC AGA TGG G 3' 5' GGT CAT CTG TAA GAT CAA C 3'	<i>O1</i>	192
VCO139F2 VCO139 R2	5' AGC CTC TTT ATT ACG GGT GG 3' 5' GTC AAA CCC GAT CGT AAA GG 3'	<i>O139</i>	449
AX2 AX3	5' CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G 3' 5' CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC 3'	<i>ctxA</i>	564
101F 837R	5' CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C 3' 5' AGG GTT AGC AAC GAT GCG TAA G 3'	<i>ToxA</i>	779

- Canh thang LB (promega)
- Thạch dinh dưỡng
- NaCl 0,09%
- Kít tách chiết ADN (QIAGEN)
- Dung dịch đệm TAE 10X
- Nước cất
- Thạch điện di (electrophoresis agar)
- Thang chuẩn ADN 100bp
- Ethidiumbromide
- Chứng dương:
 - *V. cholerae* O1: VN01/07
 - *V. cholerae* O139: AI4450
- Chứng âm: *E. coli*

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	<i>Mã số:</i> <i>Trang:</i> <i>Ban hành:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN <i>VIBRIO CHOLERA</i>	<i>Cơ quan ban hành</i> KHOA VI KHUẨN

6. TIẾN HÀNH KỸ THUẬT PCR

6.3. Tách chiết ADN khuôn mẫu:

6.3.1. Tách chiết từ chủng vi khuẩn

- Lấy 4-5 khuẩn lạc trộn đều với 200µl nước cất
- Đun cách thủy ở 95⁰C trong 5 phút
- Ly tâm 10.000 vòng/2 phút lấy nước nổi làm khuôn mẫu ADN


6.3.2. Tách chiết trực tiếp từ phân: Sử dụng kit QIAGEN

- Nhỏ 300µl dịch phân tiêu chảy vào tít eppendorf 1,5ml có chứa 600µl NaCL 0.09%
- Ly tâm 2500 vòng x 2 phút để loại bỏ cặn
- Hút dịch nổi sang một tít eppendorf mới
- Ly tâm 13.000 vòng x 10 phút để loại bỏ nước nổi, thu cặn vi khuẩn
- Trộn đều cặn vi khuẩn trong 180µl dung dịch ALT
- Nhỏ 20µl protein K trộn đều bằng máy trộn voltex
- Ủ 56⁰C trong máy ủ nhiệt cho đến khi vi khuẩn ly giải hoàn toàn (thỉnh thoảng nhẹ bằng máy trộn voltex).
- Trộn đều bằng máy trộn voltex trong 15 giây, nhỏ 200µl dung dịch AL, trộn đều sau đó nhỏ 200µl cồn tuyệt đối và trộn đều
- Hút toàn bộ hỗn hợp nhỏ vào cột DNeasy Mini spin column, ly tâm 8000 vòng x 1 phút
- Nhỏ 500µl dung dịch AW1, ly tâm 8000 vòng x 1 phút
- Rửa cột bằng cách nhỏ 500µl dung dịch AW2, ly tâm 14000 vòng x 3 phút
- Chuyển cột sang tít PCR sạch và nhỏ 75µl dung dịch AE vào trung tâm cột, để ở nhiệt độ phòng 1 phút, ly tâm 8000 vòng x 1 phút thu ADN tách chiết để làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR.

6.4. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR

6.4.1. Cách pha môi (primers) cho phản ứng PCR:

Bảng 2: cách pha môi


	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	Mã số: Trang: Ban hành: Ngày ban hành:
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN VIBRIO CHOLERAЕ	Cơ quan ban hành KHOA VI KHUẨN

Primers (mỗi)	Primer đặc (100µM/µl)	Nước cất siêu sạch	Nồng độ pha loãng	Primer cần dùng cho 30µl phản ứng
VCO1 F2-1	10 µl	30µl	25µM/ul	0.6µl
VCO1R2-2	10 µl	30µl	25µM/ul	0.6µl
VCO139F2	10 µl	30µl	25µM/ul	0.3µl
VCO139 R2	10 µl	30µl	25µM/ul	0.3µl
AX2	10 µl	30µl	25µM/ul	0.2µl
AX3	10 µl	30µl	25µM/ul	0.2µl
101F	10 µl	30µl	25µM/ul	0.2µl
837R	10 µl	30µl	25µM/ul	0.2µl

6.4.2. Hỗn hợp phản ứng cho PCR đa môi bằng Master-Mix (promega)

Thành phần phản ứng		1 mẫu (µl)	10 mẫu (µl)
2X Master-Mix:		15	150
Primers (mỗi)	VCO1 F2/R2	0.6µl/mỗi (0.5µM)	12
	VCO139F2/R2	0.3µl/mỗi (0.25µl)	6
	AX2/3	0.2µl /mỗi (0.167µM)	4
	101F/837R	0.2µl /mỗi (0.167µM)	4
Nước siêu sạch		9.4	94
Tổng số:		27	270

- Trộn đều chia mỗi tube 27µl
- Cho 3µl ADN khuôn mẫu vào các tube chứa hỗn dịch PCR

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	Mã số: Trang: Ban hành: Ngày ban hành:
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN VIBRIO CHOLERAЕ	Cơ quan ban hành KHOA VI KHUẨN

6.4.3. Hỗn hợp phản ứng cho PCR đơn mỗi bằng Master-Mix (promega)

Thành phần phản ứng		1 mẫu (μl)	10 Mẫu (μl)
2X Master-Mix		15	150
Cặp primers	VCO1F2	0.6	6
	VCO1R2	0.6	6
Nước siêu sạch		10.8	108
Tổng số:		27	270


- Trộn đều chia mỗi tube 27μl
- Cho 3μl ADN khuôn mẫu vào các tube chứa hỗn dịch PCR

6.5. Thực hiện phản ứng PCR trên máy luân nhiệt

Các bước	Nhiệt độ	Thời gian
Biến tính	94 ⁰ C	5 phút
Biến tính	94 ⁰ C	60 giây
Gắn mồi	55 ⁰ C	60 giây
Tổng hợp	72 ⁰ C	60 giây
Kết thúc	72 ⁰ C	7 phút
Giữ ở nhiệt độ 4 ⁰ C		

6.6. Điện di sản phẩm PCR

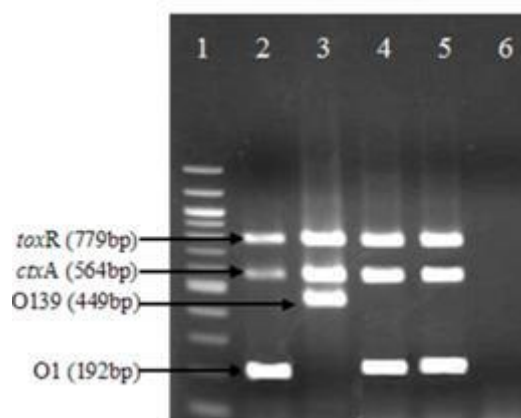
- Chuẩn bị gel agarose 2%:
 - Cân 1g thạch cho vào dung dịch TAE 1X, lắc đều và đun hòa tan thạch bằng lò vi sóng
 - Để thạch nguội khoảng 70⁰C đổ khuôn tạo gel
- Nhỏ mẫu:

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	Mã số: Trang: Ban hành: Ngày ban hành:
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN <i>VIBRIO CHOLERA</i>	Cơ quan ban hành KHOA VI KHUẨN

- Đặt bản gel vào buồng điện di có dung dịch đệm TAE 1X
- Rỏ 5µl thang ADN chuẩn 100bp, các chứng âm, chứng dương và sản phẩm PCR vào các giếng thạch
- Chạy điện di: Chạy điện di ở hiệu điện thế 100V trong vòng 30 phút
- Nhuộm và chụp ảnh gel:
 - Nhuộm gel trong dung dịch ethidium bromide (10mg/ml) trong 10 phút rồi rửa bằng nước cất trong 15 phút
 - Soi và chụp ảnh gel bằng máy chụp gel BioDoc-it™ System


7. PHÂN TÍCH KẾT QUẢ

- Chứng dương phải rõ ràng
- Có vạch trên gel và đúng kích thước khi so sánh với thang ADN chuẩn Vạch có hình ảnh rõ nét, đẹp như hình 1.



Hình 1: Kết quả PCR các chủng chứng dương và chứng âm của *V. cholerae* O1, O139


- Nếu vạch mờ, không rõ:
 - Tăng thể tích điện di
 - Thực hiện lại phản ứng PCR
- Mẫu chứng âm không được có vạch nào, nếu thấy vạch là mẫu đã bị nhiễm và phải làm lại xét nghiệm

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	<i>Mã số:</i> <i>Trang:</i> <i>Ban hành:</i> <i>Ngày ban hành:</i>
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN <i>VIBRIO CHOLERA</i>	<i>Cơ quan ban hành</i> KHOA VI KHUẨN

- Các mẫu xét nghiệm được xác định dương tính khi xuất hiện các vạch có kích thước tương ứng với các mẫu chứng và thang chuẩn ADN, ghi: (+)
- Các mẫu không có vạch hoặc có vạch không đúng kích thước được coi là âm tính, ghi (-)

8. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Độ nhạy: 100vk/ml
- Độ đặc hiệu: 100%
- Mẫu chứng:
- Chứng âm: E. coli (không có vạch)
- Chứng dương:
 - o *V. cholerae* O1: VN107-07(kích thước band 192bp)
 - o *V. cholerae* O139: AI4450 (kích thước band 490bp)
 - o CtxA: AI4450 (kích thước band 564bp)

	VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT- KHOA VI KHUẨN	Mã số: Trang: Ban hành: Ngày ban hành:
	QUI TRÌNH KỸ THUẬT PCR PHÁT HIỆN VIBRIO CHOLERAЕ	Cơ quan ban hành KHOA VI KHUẨN

PHIẾU TRẢ LỜI KẾT QUẢ PCR

Người làm xét nghiệm:.....

Ngày làm xét nghiệm:.....

- Loại mẫu:.....
- Tách chiết ADN khuôn mẫu:.....

Pha hỗn hợp phản ứng PCR:

Hóa chất	Thể tích cho 1 phản ứng	Thể tích cho N phản ứng	Nồng độ cuối cùng
Nước cất	9,4	9,4 x N	
Master mix 2X	15	15 x N	1X
Mồi O1, O139, ctxA, toxA	2,6	2,6 x N	
Tổng số	27		

- PCR: Máy.....Chu trình.....
- Điện di: Máy..... Thạch.....%. Dung dịch đệm..... Công suất..... Thời gian.....
- Chụp ảnh gel và phân tích kết quả:

STT	Tên mẫu	Kết quả
1	Chứng dương	
2	Chứng âm	
3	
4	
5	

Cán bộ xét nghiệm

Trưởng khoa vi khuẩn