

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA BA KIT CHIẾT TÁCH DNA VÀ RNA TỔNG SỐ TỪ MẪU THỰC ĐỊA

*Phạm Minh Hằng, Phạm Thị Thu Thúy,
Phan Thanh Hương, Nguyễn Việt Không
Viện Thú y*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá và so sánh năng suất, chất lượng, thời gian, giá thành và quy trình chiết tách đồng thời DNA và RNA từ mẫu phân, hạch và phổi lợn của ba bộ kit chiết tách. Kết quả nghiên cứu cho thấy QIAamp Cador pathogen mini kit cho năng suất chiết tách DNA và RNA cao nhất. Chất lượng tinh sạch DNA và RNA của E.Z.N.A.® Universal Pathogen kit là thấp nhất. Số bước thực hiện của QIAamp Cador pathogen mini kit là ít nhất. Nhưng thời gian cần thiết thực hiện và giá thành của Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit lại là ngắn nhất và thấp nhất. Bộ kit được coi là phù hợp nhất để phân tích mẫu thực địa là QIAamp Cador pathogen mini kit do kit này đã cho năng suất, chất lượng và quy trình tinh chế DNA, RNA đơn giản nhất.

Từ khóa: DNA, RNA, chiết tách, tinh sạch.

Evaluation on efficacy of three different kits for extracting DNA and RNA total from field samples

*Pham Minh Hang, Pham Thi Thu Thuy,
Phan Thanh Huong, Nguyen Viet Khong*

SUMMARY

In this study, we evaluated and compared the yield, quality, time, cost and process of extracting DNA and RNA from the pig fecal, lympho node and lung samples by three extraction methods. The studied result showed that QIAamp Cador pathogen mini kit had given the highest DNA and RNA extracted yield. The quality of the extracted DNA and RNA of E.Z.N.A.® Universal Pathogen kit was lowest. The minimum number of extracted steps for QIAamp Cador pathogen mini kit was determined. But the time and cost of the Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit was shortest and lowest, respectively. The most suitable kit for extracting the field samples was QIAamp Cador pathogen mini kit, because it had given the high DNA, RNA yield, quality, and the simple process to purify both RNA and DNA from the same sample.

Keywords: DNA, RNA, extraction, purify.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các phương pháp khuếch đại gen như PCR (Polymerase chain reaction), Realtime PCR hoặc LAMP (Loop mediated isothermal amplification) đang được sử dụng ngày càng nhiều cho các xét nghiệm chẩn đoán dịch bệnh do có độ đặc hiệu và độ nhạy cao. Đặc biệt, các phương pháp này được sử dụng để phát hiện virus trong mẫu phân, mẫu mô

đang dần thay thế cho phương pháp chẩn đoán dựa trên phân lập và phát hiện đặc tính virus trong nuôi cấy tế bào (Burd, 2010). Tuy nhiên, độ nhạy của các phương pháp khuếch đại bị ảnh hưởng do các tạp chất có trong mẫu lâm sàng có thể ức chế một phần hoặc hoàn toàn hóa chất sử dụng trong các phương pháp đó (Wilson, 1997). Chất ức chế bao gồm hemoglobin, immunoglobulin, bilirubin, triglyceride, phức chất polysaccharide, hợp

chất hữu cơ và phenolic, glycogen, chất béo và sản phẩm chuyển hóa, vi khuẩn, rau, quả và thuốc (Oikarinen *et al.*, 2009). Thêm vào đó còn có chất ức chế ngoại sinh từ các phương pháp chiết tách như chất tẩy rửa, hợp chất tạo phức hợp và guanidinium HCl (Monteiro *et al.*, 1997). Chúng có thể được loại bỏ hoàn toàn trong quá trình chiết DNA và RNA. Hiện tại có rất nhiều phương pháp có thể sử dụng để tinh chế DNA và RNA tổng số, nhưng có rất ít nghiên cứu so sánh các phương pháp chiết tách đối với mẫu phân hoặc mẫu bệnh phẩm như hạch, phổi. Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá hiệu quả của 3 bộ kit chiết tách đồng thời DNA và RNA tổng số từ các mẫu phân, hạch và phổi lợn, để tìm ra bộ kit có năng suất cao, chất lượng và quy trình đơn giản nhất.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Mẫu thực địa:

+ 10 mẫu phân lợn gộp (50 mẫu đơn) được thu thập ở Sóc Sơn (Hà Nội), Phú Thọ, Thái Nguyên, Quảng Ninh, Thái Bình trong năm 2018. Các mẫu phân tươi được để trong túi vô trùng, bảo quản trên đá và vận chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ.

+ 10 mẫu hạch, phổi của lợn thịt bán ngoài chợ tại Hà Nội được thu thập, bảo quản trong đá và vận chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 5 giờ.

- Kit chiết tách: QIAamp Cador pathogen mini kit (Qiagen, Inc, Valencia, Mỹ), Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit (iNtRON biotechnology, Hàn Quốc), E.Z.N.A.® Universal pathogen kit (Ambion, Inc., Carlsbad, Mỹ).

- PBS (Invitrogen Corporation), Ethanol 100% (Applichem GmbH, Đức), DNase I (Ambion, Inc., Carlsbad, Mỹ), Isopropanol (Sigma aldrich), runSAFE (Cleaver Scientific, Anh).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp xử lý mẫu phân theo Esona *et al.* (2013): Các mẫu phân được pha loãng tỷ lệ 10% với dung dịch PBS lạnh (pH = 7,2) và được đồng hóa bằng máy lắc (vortex). Sau đó mẫu được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 5000 RPM để loại bỏ chất rắn. Phần dịch nổi được chuyển sang ống eppendorff mới và được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

- Phương pháp xử lý mẫu phổi, lách theo TCVN 8400-21:2014: Dùng panh, kéo lấy 1g phổi hoặc hạch, cắt nhỏ rồi nghiền trong cối chày sứ vô trùng với 10 ml dung dịch PBS pH = 7,2 thành huyền dịch 10%. Chuyển toàn bộ huyền dịch vào ống ly tâm 50 ml rồi ly tâm bằng máy ly tâm ở tốc độ 4500 RPM trong 15 phút. Hút lấy dịch nước trong ở phía trên và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

- DNA và RNA trong các mẫu được đồng hóa bởi dung dịch PBS được chiết tách bởi ba bộ kit: QIAamp Cador pathogen mini kit (Qiagen, Inc, Valencia, CA, Mỹ) với lượng mẫu đưa vào là 200µl và lượng elution buffer để hòa tan là 150µl, Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit (iNtRON biotechnology, Hàn Quốc) với lượng mẫu đưa vào là 150 µl và lượng elution buffer để hòa tan là 60µl, E.Z.N.A.® Universal pathogen kit (Omega Bio-tek, Inc., Mỹ) với lượng mẫu đưa vào là 250µl và elution buffer để hòa tan là 100µl. Các bước tiến hành của ba kit được tóm tắt như sau:

+ Chiết tách bằng QIAamp Cador pathogen mini kit: Đưa 200µl dung dịch mẫu vào ống ly tâm 1,5ml có chứa proteinase K. Thêm 100µl Buffer VXL vào ống chứa mẫu. Đậy nắp vào, lắc đều bằng máy lắc trộn (vortex). Ủ ở nhiệt độ 20-25°C trong 15 phút. Thêm 350µl buffer ACB vào ống chứa mẫu. Đậy nắp và trộn đều bằng máy lắc trộn. Chuyển dung dịch ly giải vào cột QIAamp Mini được đựng trong ống 2ml. Đậy nắp và ly tâm ở vận tốc 8000rpm trong 1 phút. Loại bỏ nước lọc và đưa cột lọc vào ống 2ml mới. Thêm vào 600µl buffer AW1 vào cột lọc và ly tâm ở vận tốc 8000rpm trong 1 phút. Loại

bỏ nước lọc và thêm 600µl buffer AW2 vào cột lọc. Đậy nắp và ly tâm ở vận tốc 8.000rpm trong 1 phút. Đưa cột lọc vào ống eppendorff mới và loại bỏ ống chứa nước lọc. Mở nắp cột lọc, thêm 150 µl elution buffer (AVE buffer) vào trung tâm của màng lọc. Đậy nắp ống eppendorff và ủ ở nhiệt độ 15-25°C trong 1 phút. Ly tâm với tốc độ 14.000 rpm trong 1 phút.

+ Chiết tách bằng Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit: Cho 150 µl dung dịch mẫu vào ống ly tâm 1,5ml. Thêm 250 µl Lysis buffer. Trộn đều bằng vortex trong 15 giây. Ủ ở nhiệt độ phòng (15-25°C) trong 10 phút. Thêm 350µl Binding buffer, trộn đều bằng vortex. Đưa dung dịch ly giải vào cột lọc và ly tâm ở tốc độ 13.000rpm trong 1 phút. Loại phần nước lọc và thêm 500µl Washing buffer A vào cột lọc, sau đó ly tâm 13.000rpm trong 1 phút. Loại bỏ phần nước lọc và thêm 500µl Washing buffer B vào cột lọc, ly tâm 13.000rpm trong 1 phút. Loại phần nước lọc và đưa cột lọc vào ống ly tâm 1,5ml mới và thêm 60µl elution buffer vào chính giữa màng lọc. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút và ly tâm 13.000rpm trong 1 phút.

+ Chiết tách bằng E.Z.N.A.® Universal pathogen kit (Omega Bio-tek, Inc., Mỹ): Cho 250µl dung dịch mẫu vào ống đựng mẫu (cung cấp bởi nhà sản xuất). Thêm 475µl SLX-Mlus buffer, 72µl DS buffer và 20µl Proteinase K. Đậy nắp ống ly tâm và trộn đều bằng vortex trong 60 giây. Ủ ở nhiệt độ 70°C trong 15 phút. Ly tâm 10.000rpm trong 5 phút. Chuyển 300µl mẫu sang ống ly tâm 1,5ml. Thêm 600µl RBB buffer, trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Đưa 700µl mẫu vào cột lọc và ly tâm tốc độ tối đa trong 1 phút. Loại bỏ dịch lọc và thêm 500 µL HBC buffer vào cột lọc. Ly tâm ở tốc độ tối đa trong 30 giây. Loại bỏ dịch lọc và thêm 700 µL DNA Wash buffer vào cột lọc. Ly tâm ở tốc độ tối đa trong 30 giây. Loại bỏ dịch lọc và rửa cột lọc lần thứ hai bằng DNA Wash buffer. Ly tâm tốc độ tối đa trong 2 phút và đưa cột lọc vào ống ly tâm 1,5ml mới. Thêm 100µl elution buffer đã được làm ấm đến 70°C vào cột lọc. Ủ cột lọc ở nhiệt độ phòng trong 2 phút, sau đó ly tâm

tốc độ tối đa trong 1 phút.

- Phương pháp phân tích định lượng DNA và RNA (Desjardins và Conklin, 2010): 2µl mẫu đã được chiết tách được sử dụng để đo độ hấp thụ ở 260 (A260) và 280 (A280) theo thang nanomet (nm) trong máy đo quang phổ NanoDrop 1000 cho mỗi mẫu (Thermo Science, Wilmington, Delwar). Nồng độ DNA hoặc RNA ước tính thu được bằng cách nhân với 50 (đối với DNA) hoặc 40 (đối với RNA) giá trị của A260 (ng/µL). Độ tinh khiết (biểu thị chất lượng của DNA hoặc RNA) được đánh giá bằng tỷ lệ A260/A28, trong đó các giá trị tỷ lệ A260 / A280 ~1,8 đối với DNA và 260/280 ~2,0 đối với RNA cho thấy mẫu được chiết tách không bị tạp nhiễm.

- Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được phân tích theo phương pháp One-way ANOVA (Analysis of variance) (Brooks và Johanson, 2011).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã so sánh năng suất và chất lượng DNA và RNA tổng số đồng thời được chiết tách từ 10 mẫu phân lợn gộp (50 mẫu đơn), 10 mẫu hạch và phổi lợn sử dụng ba kit thương mại QIAamp Cadore pathogen mini kit (Qiagen, Inc, Valencia, CA, Mỹ), Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit (iNtRON biotechnology, Hàn Quốc) và E.Z.N.A.® Universal pathogen kit (Omega Bio-tek, Inc. Mỹ).

Năng suất và chất lượng DNA và RNA được đo bằng Nanodrop với $\lambda_{260/280} \sim 1,8$ và 2,0 được chấp nhận là DNA và RNA tinh sạch. Nếu tỷ lệ này thấp hơn đáng kể trong cả hai trường hợp nói trên cho thấy có sự hiện diện của protein, phenol hoặc các chất tạp nhiễm khác hấp thụ mạnh ở bước sóng gần 280nm (Desjardins và Conklin, 2010).

Kết quả phân tích hàm lượng và độ tinh sạch của DNA và RNA được trình bày ở bảng 1, 2, 3 và 4. Kết quả phân tích cho thấy nồng độ và độ tinh khiết DNA và RNA thay đổi đáng kể tùy thuộc vào kit sử dụng và loại mẫu.

Đối với mẫu phân, phương pháp cho năng suất DNA và RNA tốt nhất và khác biệt rõ rệt so với hai phương pháp còn lại ($p < 0,05$) là QIAamp Cador pathogen mini kit trong đó lượng DNA trung bình thu được là $11,2 \pm 3,3$ ng/ μ l (bảng 1).

Bảng 1. So sánh hàm lượng và độ tinh sạch DNA được chiết tách từ mẫu phân

Ký hiệu mẫu	QIAamp Cador pathogen mini kit		Viral Gene-spin™ Viral DNA/ RNA extraction kit		E.Z.N.A.® Universal pathogen kit	
	Hàm lượng mẫu ng/ μ l	Độ tinh sạch A260/A280	Hàm lượng mẫu ng/ μ l	Độ tinh sạch A260/A280	Hàm lượng mẫu ng/ μ l	Độ tinh sạch A260/A280
TBG1	13,5	1,9	6,2	2,3	3,6	1,9
TBG2	11,6	2,1	6,4	2,3	3,1	2,0
TNG1	9,8	2,4	3,5	1,8	4,3	0,9
TNG4	7,0	2,5	3,5	2,4	3,4	1,4
PTG1	10,3	2,3	2,5	2,4	2,4	2,0
PTG4	6,5	2,3	4,4	2,6	3,9	1,1
QNG1	17,1	2,0	9,7	2,0	3,0	2,2
QNG2	15,2	2,5	10,9	2,0	4,5	1,1
HNG1	10,4	2,4	3,4	2,5	6,5	0,8
HNG2	10,8	2,5	5,7	2,4	2,1	1,6
Trung bình	11,2 \pm 3,3		5,6 \pm 2,8		3,7 \pm 1,2	
p			< 0,05			

Và RNA trung bình thu được là $8,8 \pm 2,7$ ng/ μ l (bảng 2). Tiếp theo là Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit với lượng DNA trung bình thu được là $5,6 \pm 2,8$ ng/ μ l (bảng 1).

Bảng 2. So sánh hàm lượng và độ tinh sạch RNA được chiết tách từ mẫu phân

Ký hiệu mẫu	QIAamp Cador pathogen mini kit		Viral Gene-spin™ Viral DNA/ RNA extraction kit		E.Z.N.A.® Universal pathogen kit	
	Hàm lượng mẫu ng/ μ l	Độ tinh sạch A260/A280	Hàm lượng mẫu ng/ μ l	Độ tinh sạch A260/A280	Hàm lượng mẫu ng/ μ l	Độ tinh sạch A260/A280
TBG1	10,3	2,2	6,4	2,1	3,1	1,6
TBG2	9,9	2,4	5,3	2,1	3,1	1,6
TNG1	7,7	2,1	2,8	2,2	2,8	2,0
TNG4	5,5	2,4	2,6	2,7	3,8	1,0
PTG1	7,6	2,3	3,7	2,2	3,9	0,9
PTG4	5,1	2,4	2,2	2,3	3,0	1,3
QNG1	13,4	2,0	7,9	2,0	2,5	1,8
QNG2	12,3	2,2	9,0	2,0	3,8	1,1
HNG1	7,9	1,8	3,2	2,0	5,1	0,8
HNG2	8,7	2,4	5,6	2,0	2,3	1,9
Trung bình	8,8 \pm 2,7		4,9 \pm 2,4		3,3 \pm 0,8	
p			< 0,05			

và RNA trung bình thu được là $4,9 \pm 2,4$ ng/ μ l (bảng 2). Phương pháp cho năng suất DNA và RNA thấp nhất là E.Z.N.A.[®] Universal pathogen kit với lượng DNA trung bình thu được là $3,7 \pm 1,2$ ng/ μ l (bảng 1) và RNA trung bình thu được là $3,3 \pm 0,8$ ng/ μ l (bảng 2). Về độ tinh sạch DNA và RNA của QIAamp Cador pathogen mini kit và Viral Gene-spin[™] Viral DNA/RNA extraction kit tốt hơn khi tỷ lệ A260/280 của các mẫu cao hơn $> 1,8$ (bảng 1 và 2) trong khi đó E.Z.N.A.[®] Universal pathogen kit có những mẫu có tỷ lệ A260/280 thấp hơn 1,8. Điều này chứng tỏ DNA và RNA tách chiết từ các mẫu phân vẫn còn có lẫn tạp chất khi sử dụng kit E.Z.N.A.[®] Universal pathogen.

Đối với mẫu bệnh phẩm hạch và phổi, năng suất DNA và RNA thu được từ ba phương

pháp không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê do $p > 0,05$ (bảng 3 và 4). QIAamp Cador pathogen mini kit cho năng suất DNA trung bình thu được là $105,9 \pm 32,8$ ng/ μ l (bảng 3) và RNA trung bình thu được là $88,3 \pm 26,1$ ng/ μ l (bảng 4). Viral Gene-spin[™] Viral DNA/RNA extraction kit với lượng DNA trung bình thu được là $31,7 \pm 6,7$ ng/ μ l và RNA trung bình thu được là $17,1 \pm 5,4$ ng/ μ l (bảng 4). E.Z.N.A.[®] Universal pathogen kit với lượng DNA trung bình thu được là $72,3 \pm 17,9$ ng/ μ l (bảng 3) và RNA trung bình thu được là $51,5 \pm 16,3$ ng/ μ l (bảng 4). Tuy nhiên lượng elution buffer thu được của QIAamp Cador pathogen mini kit là cao nhất (150 μ l), tiếp theo E.Z.N.A.[®] Universal pathogen kit (100 μ l), thấp nhất Viral Gene-spin[™] Viral DNA/RNA extraction kit.

Bảng 3. So sánh hàm lượng và độ tinh sạch DNA được chiết tách từ mẫu hạch, phổi

Ký hiệu mẫu	QIAamp Cador pathogen mini kit		Viral Gene-spin [™] Viral DNA/RNA extraction kit		E.Z.N.A. [®] Universal pathogen kit	
	Hàm lượng mẫu ng/ μ l	Độ tinh sạch A260/A280	Hàm lượng mẫu ng/ μ l	Độ tinh sạch A260/A280	Hàm lượng mẫu ng/ μ l	Độ tinh sạch A260/A280
Ph 1	347,1	1,91	19,1	2,9	191,9	1,8
Ph 2	202,1	1,96	61,0	2,1	139,6	1,8
Ph 3	22,4	2,9	7,1	2,7	61,3	1,7
Ph 4	88,0	2,0	50,6	2,2	61,0	1,7
Ph 5	99,5	2,0	60,6	2,1	94,1	1,9
Ph 6	9,0	2,0	16,8	2,3	6,1	2,4
Ph 7	94,6	2,0	32,8	2,1	64,0	1,9
Ph 8	39,6	2,4	46,2	2,5	51,4	1,3
Ph 9	134,6	2,0	9,5	8,9	39,5	1,9
Hal	21,9	2,9	13,6	2,7	13,8	2,7
Trung bình	105,9 \pm 32,8		31,7 \pm 6,7		72,3 \pm 17,9	
p			> 0,05			

Khi so sánh về độ tinh sạch của DNA và RNA thu được thì QIAamp Cador pathogen mini kit và Viral Gene-spin[™] Viral DNA/RNA extraction kit có tỷ lệ A260/280 của các mẫu $> 1,8$. Còn E.Z.N.A.[®] Universal pathogen kit

có những mẫu có tỷ lệ A260/280 thấp (1,3-1,7). Điều này cũng chứng tỏ DNA và RNA từ mẫu hạch và phổi vẫn còn có lẫn tạp chất khi được chiết bằng kit E.Z.N.A.[®] Universal pathogen.

Bảng 4. So sánh hàm lượng và độ tinh sạch DNA được chiết tách từ mẫu hạch, phổi

Ký hiệu mẫu	QIAamp Cador pathogen mini kit		Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit		E.Z.N.A.® Universal pathogen kit	
	Hàm lượng mẫu ng/μl	Độ tinh sạch A260/A280	Hàm lượng mẫu ng/μl	Độ tinh sạch A260/A280	Hàm lượng mẫu ng/μl	Độ tinh sạch A260/A280
Ph1	279,6	1,9	17,4	2,3	185,9	1,8
Ph 2	165,2	1,9	51,7	2,0	107,8	1,8
Ph 3	24,9	2,2	8,5	2,3	27,7	1,8
Ph 4	82,5	2,0	43,1	2,1	52,5	1,7
Ph 5	82,0	2,0	51,4	2,0	85,3	1,8
Ph 6	10,0	2,4	16,3	2,0	12,3	1,7
Ph 7	68,1	2,0	29,3	2,0	68,9	1,8
Ph 8	35,4	2,2	40,7	2,4	47,7	1,3
Ph 9	115,0	1,9	10,7	2,3	51,0	1,7
Hal	20,3	2,4	13,5	2,2	18,5	1,6
Trung bình	88,3 ± 26,1		17,1 ± 5,4		51,5 ± 16,3	
p			> 0,05			

Việc lựa chọn một kỹ thuật chiết xuất đồng thời DNA, RNA và có thể sử dụng để kiểm tra một số lượng lớn các mẫu thực địa phải tính đến việc sử dụng đơn giản, nhanh chóng, năng suất, chi phí thấp và tăng cường độ nhạy của các phương pháp chẩn đoán phân tử. Các phương pháp dựa trên phân tích cột thường dựa trên nguyên lý các phân tử DNA và RNA được tích điện âm để thu giữ chúng bằng màng silica và sắc ký trao đổi ion. Những phương pháp này bao gồm ly giải trong một hoặc hai bước (trong màng silica - chaotropes và ly giải protein, và trong trao đổi anion - chất tẩy và enzyme). Sau đó đưa mẫu chất lỏng vào cột và ly tâm với mục đích liên kết axit nucleic trong môi trường muối cao; xử lý cột bằng dung dịch đệm ly giải và / hoặc trực tiếp bằng dung dịch đệm rửa (chứa cồn và muối cao). Ly tâm tốc độ cao để loại bỏ phần dung dịch đệm còn lại (như ethanol). Sau đó rửa lại cột bằng ultra-pure RNase/DNase-free H₂O (pH 8,0), dung dịch ion có độ bền ion thấp trong trường hợp sử dụng màng silica hoặc dung dịch đệm muối cao trong trường hợp trao đổi anion. Ủ nhiệt độ phòng trong 1-3 phút và ly tâm. Có thể lặp lại các bước rửa và rửa giải

để đạt được sự tinh chế hơn nữa (nếu cột được xử lý bằng DNase hoặc RNase sau lần rửa giải đầu tiên) hoặc rửa giải một lượng axit nucleic cao hơn. Có thể sử dụng thể tích mẫu ban đầu cao hơn khuyến nghị nhưng điều này có thể làm quá tải cột tinh chế, dẫn đến năng suất thấp hơn và / hoặc tỷ lệ tạp chất cao hơn. Ethanol còn lại trong sản phẩm cuối có thể dẫn đến thoát axit nucleic ra khỏi giếng trong quá trình điện di gel và có thể ngăn cản phản ứng PCR và các phản ứng enzyme khác như LAMP.

Quy trình chuẩn cho một mẫu chiết tách của cả ba kit thay đổi từ 12-35 bước. Trong đó QIAamp Cador pathogen mini kit có số bước thực hiện ít nhất là 12 bước, tiếp đến là Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit với 15 bước và E.Z.N.A.® Universal pathogen kit có số bước thực hiện nhiều nhất, 35 bước (bảng 5). Tuy nhiên thời gian trung bình cần thiết để thực hiện bao gồm cả thời gian xử lý DNase hoặc RNase của Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit thấp nhất (23 phút), tiếp đến QIAamp Cador pathogen mini kit (khoảng 30 phút) và cao nhất là E.Z.N.A.® Universal pathogen kit (52 phút).

Giá thành cho một mẫu chiết tách của QIAamp Cador pathogen mini kit là cao nhất (180.000đ/mẫu), giá thấp nhất là của Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit (100.000đ/mẫu) (bảng 5).

Bảng 5. So sánh về số bước, thời gian thực hiện và giá thành của các phương pháp chiết tách DNA và RNA

Tên kit	Số bước thực hiện	Thời gian lý thuyết	Thời gian thực	Giá thành (đồng/mẫu)
QIAamp Cador pathogen mini kit	12	22 phút	30 phút	180.000
Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit	15	15 phút	23 phút	100.000
E.Z.N.A.® Universal pathogen kit	35	38 phút	52 phút	140.000

Cả ba kit đều có ưu và nhược điểm riêng trong việc chiết tách RNA và DNA từ mẫu hạch, phổi và mẫu phân. Việc lựa chọn phương pháp thích hợp là một bước quan trọng để sử dụng thành công và có giá trị các xét nghiệm PCR hoặc LAMP. Do đó, chúng tôi khuyến cáo các kỹ thuật chiết DNA và RNA phải được lựa chọn cẩn thận, đặc biệt với các mẫu bệnh phẩm thu thập ngoài thực địa.

IV. KẾT LUẬN

- Năng suất, chất lượng, thời gian, giá thành quy trình chiết tách đồng thời DNA và RNA từ mẫu phân, hạch và phổi lợn bởi ba kit thương mại đã được so sánh.

- QIAamp Cador pathogen mini kit cho năng suất chiết tách DNA và RNA cao nhất.

- Chất lượng tinh sạch DNA và RNA của E.Z.N.A.® Universal pathogen kit thấp nhất.

- Số bước thực hiện của QIAamp Cador pathogen mini kit ít nhất.

- Thời gian cần thiết thực hiện và giá thành của Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA extraction kit ngắn nhất và thấp nhất.

- Bộ kit được coi là phù hợp nhất với mẫu thực địa là QIAamp Cador pathogen mini kit vì năng suất, chất lượng và quy trình tinh chế đơn giản nhất.

diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:550–576.

- Desjardins, P., Conklin, D., 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J Vis Exp.* (45). pii: 2565.
- Esona, M. D., McDonald, S., Kamili, S., Kerin, T., Gautam, R., Bowen, M. D., 2013. Comparative evaluation of commercially available manual and automated nucleic acid extraction methods for rotavirus RNA detection in stools. *J Virol Methods* 194: 242 - 249
- Monteiro. L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K. G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., Mégraud, F., 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model. *J Clin Microbiol* 35: 995 – 998.
- Oikarinen, S., Tauriainen, S., Viskari, H., Simell, O., Knip, M., Virtanen, S., Hyöty, H., 2009. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *J Clin Virol.* 44: 211 –214.
- Brooks GP, Johanson GA., 2011. Sample Size Considerations for Multiple Comparison Procedures in ANOVA. *Journal of Modern Applied Statistical Methods* 10 (1): 97-109
- Wilson, I. G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3741 – 3751

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Burd EM., 2010. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious

Ngày nhận 12-2-2020
 Ngày phản biện 1-3-2020
 Ngày đăng 1-5-2020