

Nghiên cứu bào chế dung môi tách ARN từ nước tiểu, ứng dụng trong chẩn đoán một số tác nhân vi sinh vật gây bệnh

Development of an effective solvent for total RNA extraction from urine specimen for detecting microbiological pathogens

Đào Phương Giang, Ngô Tất Trung,
Trần Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Tĩnh, Phan Quốc Hoàn

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Bào chế thành công dung môi tách RNA tổng số từ bệnh phẩm nước tiểu. **Đối tượng và phương pháp:** Sử dụng các hoá chất hiện có dễ mua trong nước, pha chế thành dung môi tách chiết RNA tổng số từ các mẫu bệnh phẩm nước tiểu. Định lượng bằng kỹ thuật Real Time PCR theo nguyên lý Taqman Probe để đánh giá hiệu quả tách RNA bằng dung môi tự tạo. **Kết quả:** Pha chế thành công dung môi tách RNA tổng số từ nước tiểu có hiệu quả tách chiết tương đương với dung môi nhập ngoại. **Kết luận:** Dung môi tách ARN tổng số từ nước tiểu đã được tổng hợp thành công cho phép dùng trong các ứng dụng chẩn đoán một số tác nhân vi sinh vật gây bệnh.

Từ khóa: Tách chiết RNA, 108@Uzol, Taqman-probe.

Summary

Objective: To successfully prepare solvents to extraction total RNA from urine specimens. **Subject and method:** Using existing chemicals that are readily available, blended into solvents to extract total RNA from urine specimens. Quantitative by real time PCR technique according to Taqman Probe principle to evaluate the efficiency of RNA separation with self-created solvent. **Result:** Successfully prepared solvent to separate total RNA from urine with extraction efficiency equivalent to that of commercial counterparts. **Conclusion:** Solvents for extraction of total RNA from urine were successfully prepared with extraction efficiency for detecting microbiological pathogens.

Keywords: RNA extraction, 108@Uzol, Taqman-probe.

1. Đặt vấn đề

Các mẫu bệnh phẩm có thể dễ dàng thu nhận như nước bọt, máu hoặc nước tiểu từ lâu đã được kỳ vọng là cung cấp các dấu ấn sinh

học có tiềm năng cao trong chẩn đoán sớm bệnh tật như: Nhiễm khuẩn huyết, ung thư, phát hiện các tác nhân vi rút... Sử dụng nước tiểu để phát hiện các virus RNA, xác định các microRNA, là khả thi có nhiều ưu điểm vì nước tiểu được lấy mẫu dễ dàng, không xâm lấn, số lượng thu được nhiều... Các ứng dụng phát hiện ARN trong nước tiểu như các chỉ thị ung thư ở bệnh nhân ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tiền liệt, hay

Ngày nhận bài: 23/12/2020, ngày chấp nhận đăng: 25/12/2020

Người phản hồi: Phan Quốc Hoàn

Email: drhoan108@gmail.com - Bệnh viện TWQĐ 108

các virus có vật liệu di truyền là ARN có trong nước tiểu như *Ebola*, *Zika*, *Chinkugunia*,... Để đảm bảo chính xác của xét nghiệm, dung môi tách ARN cần phải được chuẩn hóa và trải qua các thử nghiệm trước khi sử dụng trên mẫu bệnh phẩm. Tách chiết ARN bằng Trizol là một phương pháp phổ biến để tách chiết ARN trên nghiên cứu của Chomczynsky P, Sacchi N năm 1987 và được xem xét một lần nữa vào năm 2006 [1], [2]. Trizol biến tính protein và sau đó bổ sung chloroform gây ra sự phân tách pha, protein được chiết suất sang pha hữu cơ, DNA ở bề mặt phân cách, và ARN ở trong pha nước. Do vậy, ARN, ADN và protein được tách chiết từ một mẫu duy nhất do vậy nó có tên là TRIzol. Tuy nhiên, TRIzol đắt tiền và việc làm chủ kỹ thuật để có 1 dung môi có thể tách được ARN tổng số từ nước tiểu là điều cần thiết. Để tự chủ được quy trình tách chiết ARN trong điều kiện khó khăn khan hiếm vật tư khi dịch bệnh bùng phát, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm xây dựng, bào chế dung môi tách chiết ARN có chất lượng đảm bảo và giá thành tốt.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Vật liệu

Các hóa chất Guanidine thiocyanate, Tris-HCl do Sigma - Mỹ cung cấp, amonium thiocyanate, Glycerol, amonium acetate, phenol tinh thể... Master-Mix QuanTitech probe realtime PCR - AB Applied Biosystems (Mỹ) máy phân tích real-time PCR- Cyclor 7500 Fast-Real-Time-PCR System, Applied Biosystems, CFX96-Biorad; dung dịch tách ARN tổng số - Trizol (invitrogene), enzyme phiên mã ngược reverse transcriptase -Fermentas- Mỹ.

2.2. Phương pháp

Tối ưu thành phần UTRIZol

Phenol được làm tan chảy bằng cách ủ tại 65°C trong 30 phút, sau đó được acid hóa bằng cách bổ sung dung dịch 1M Tris-HCl pH4.

Dung môi tách ARN được pha chế bằng cách bổ sung vào dung dịch theo trật tự sau: Glycerol, phenol, amonium acetate, guanidine thiocyanate và amonium thiocyanate.... Dung môi này được định danh là 108@Uzol.

Chất lượng 108@Uzol được đánh giá bằng cách so sánh nồng độ và chất lượng các mẫu ARN tách bằng dung môi 108@Uzol với nồng độ và chất lượng ARN cùng nguồn gốc nhưng được tách bằng dung môi Trizol chuẩn do hãng Invitrogen cung cấp.

Tách chiết ARN từ mẫu nước tiểu

Tách chiết ARN tổng số của 40 mẫu nước tiểu bằng dung môi 108@Uzol và TRIzol LS Sigma theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Invitrogen (Mỹ).

Tách chiết các mẫu plasmid của *Chinkungunya* và *Zika* pha loãng trong mẫu nước tiểu với các nồng độ 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 copy/ml.

Phương pháp realtime PCR đánh giá biểu hiện gene ABL, RNase P

ARN tổng số được chiết xuất từ 40 mẫu nước tiểu bằng dung dịch 108@Uzol. ARN được sao chép ngược thành cDNA bằng bộ kit Thermo Fisher (Mỹ). Định lượng cDNA được thực hiện phản ứng qRT-PCR có sử dụng gene ABL (Tyrosine-protein kinase ABL1) và RNase P làm gen tham chiếu. Các primers đặc hiệu được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1. Các primer được sử dụng trong nghiên cứu

Primer	Trình tự primer (5'-3')
ABL_F	AAAGGAGCAGGGAAGAAGGAATCA
ABL_R	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA
ABL_Probe	5'- FAM-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA-TAMRA- 3'

RNase_F	AGATTGGACCTGCGAGCG
RNase_R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT
RNase_Probe	5'- HEX-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG – BHQ-1-3'

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm R, Graphpath 6. Tất cả các so sánh có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Công thức pha chế dung môi 108@Uzol

Chúng tôi đã thử nghiệm và thành công trong pha chế dung môi được đặt tên 108@Uzol với công thức chi tiết dưới Bảng 2.

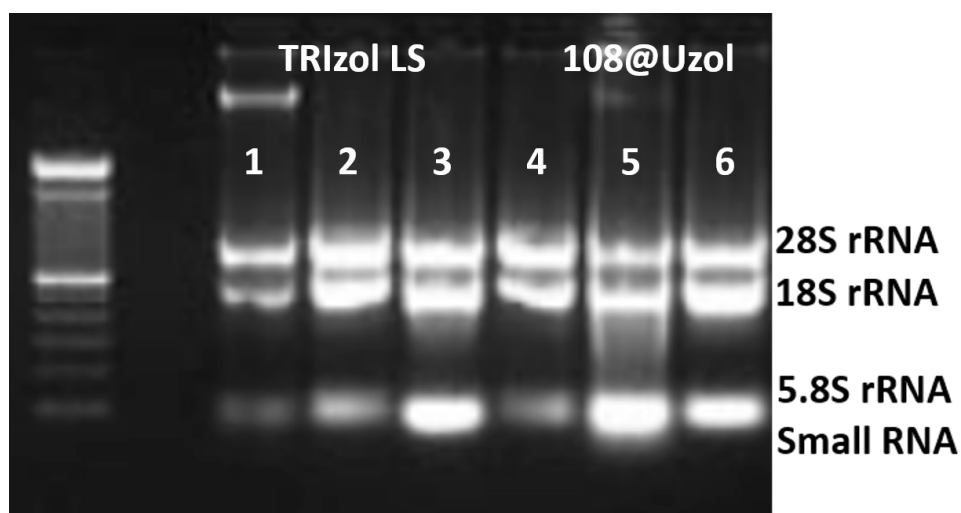
Bảng 2. Công thức dung môi pha 108@Uzol

Tên công thức	108@Uzol
Acid Phenol	38%
Guanidine thiocyanate	0,8M
Ammonium thiocyanate	0,4M
Sodium acetate, pH 5.0	0,1M
Glycerol	5%
SDS	0,50%
N-laurosylysarcosine (Sarkosyl)	0,40%
Triton-X100	0,10%
MgCl ₂	7,2mM
CaCl ₂	2,4mM
TCEP	5mM
Beta mecaptoethanol	0,2mM

3.2. Thử nghiệm tách ARN trên mẫu nước tiểu sử dụng dung môi 108@Uzol và dung môi thương mại Trizol LS - Invitrogen

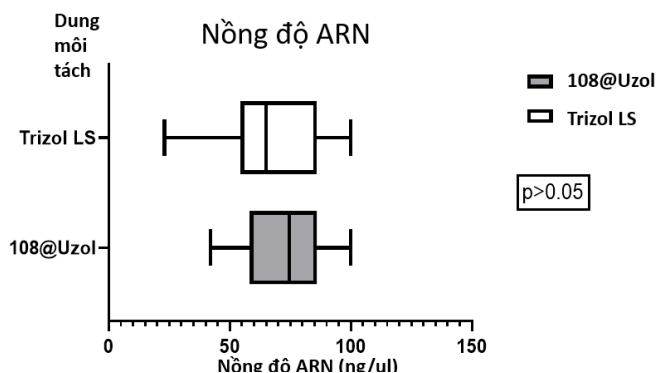
Để khẳng định công thức dung môi nói trên phù hợp với việc tách ARN tổng số từ mẫu nước tiểu. Chúng tôi tiến hành tách ARN trên 3 mẫu nước tiểu bằng hai dung môi Trizol LS –Invitrogen và dung môi 108@Uzol.

Kết quả Hình 1 cho thấy, bước đầu không có sự khác biệt đáng kể giữa các đoạn ARN đặc trưng cho tế bào người như 28S, 18S, 5S khi tách bằng dung môi Trizol LS-Invitrogen - giếng 3, 4, 5 và tách bằng dung môi 108@Uzol.

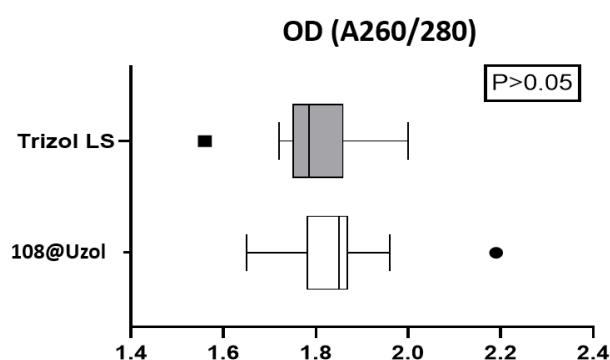


Hình 1. Hình ảnh điện di ARN tách bằng dung môi Trizol LS (giếng 1, 2, 3) - Invitrogen và dung môi 108@Uzol (giếng 4, 5, 6)

Dung môi tách chiết ARN ngoài việc duy trì tính nguyên vẹn của các phân tử ARN sau tách, cần đảm bảo không tồn tại các thành phần ức chế enzyme phiên mã ngược trong các sản phẩm ARN. Trong khi đó, các phân đoạn ribosomal ARN 28S, 18S, 5S có số lượng copy rất lớn trong các tế bào động vật có vú. Vì thế, ta dễ dàng tách và quan sát được trên bản điện di agarose.

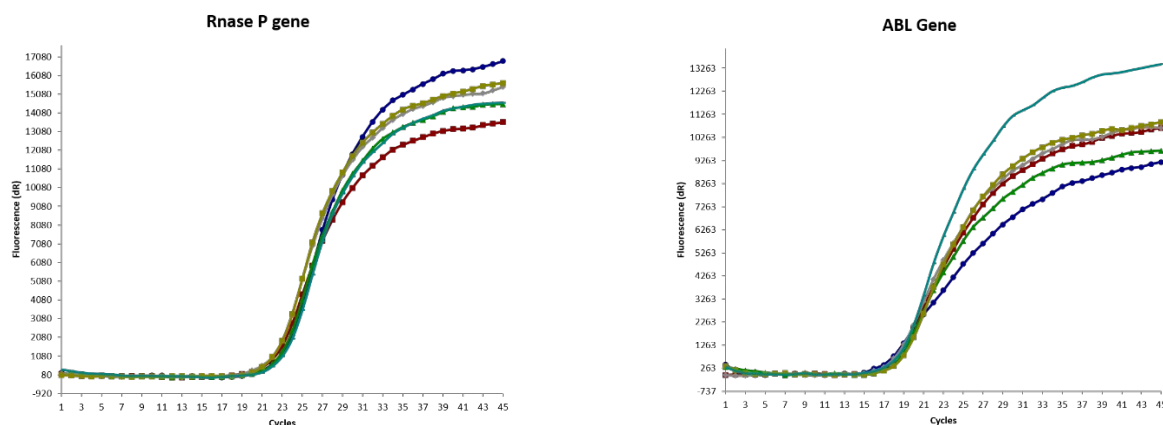


Hình 2. So sánh nồng độ ARN giữa 2 phương pháp tách bằng TRIZOL LS và 108@Uzol, $p=0,55$, không có sự khác biệt giữa nồng độ tách được từ 2 phương pháp



Hình 3. So sánh độ sạch OD (A260/280) giữa 2 phương pháp tách bằng TRIZOL LS và 108@Uzol, không có sự khác biệt về độ tinh sạch OD giữa 2 phương pháp tách với $p>0,05$

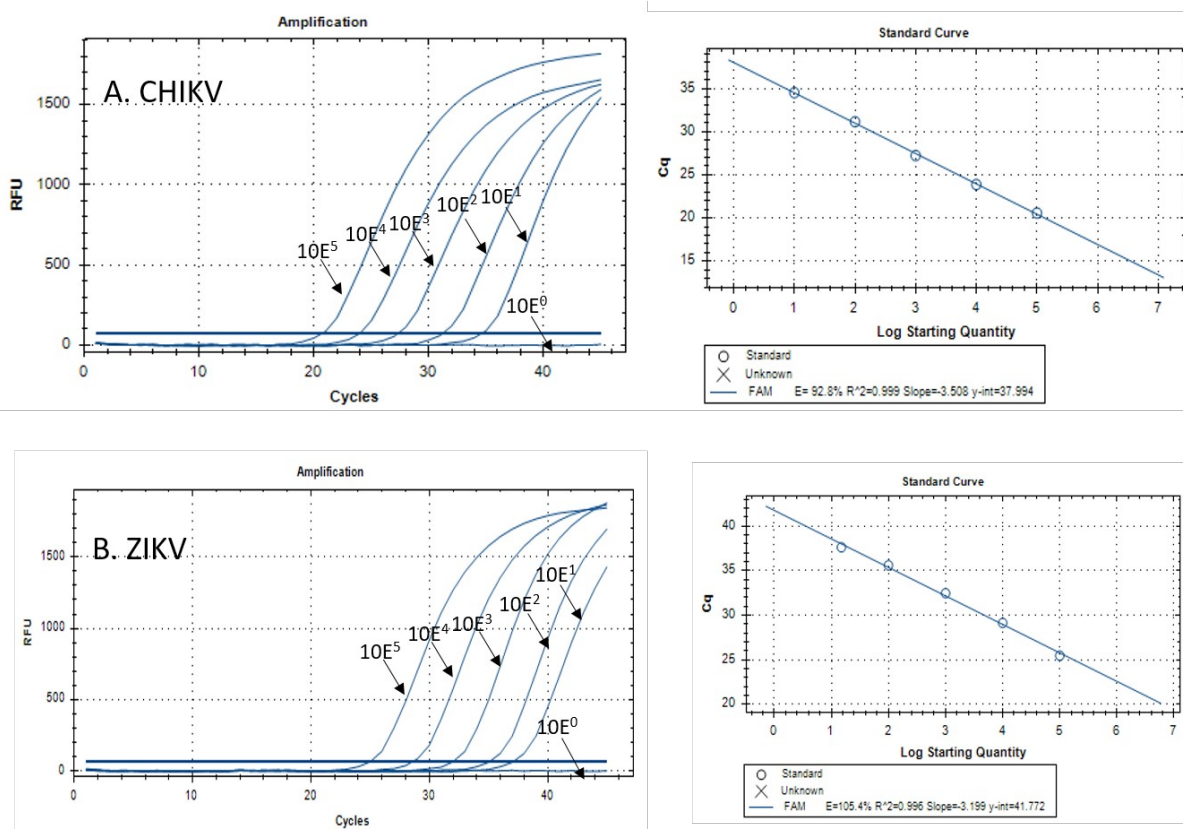
3.3. Đánh giá chất lượng ARN tách từ nước tiểu bằng phản ứng realtime PCR



Hình 4. Cho thấy tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu cho gene ABL, RNase P có Ct trên mẫu nước tiểu được tách bằng 108@Uzol không có khác biệt với tách bằng dung môi Trizol LS do hãng Invitrogen cung cấp

Tín hiệu realtime PCR trên gene nội chuẩn ABL và RNase P khi tách chiết bằng hai dung môi 108@Uzol và TRizol LS đảm bảo độ ổn định có Ct đạt (18 - 33).

Tuy nhiên, không thể đảm bảo chắc chắn chế phẩm ARN tạo ra không có chứa các thành phần ức chế enzyme phiên mã ngược - yếu tố quan trọng cho các ứng dụng chẩn đoán sau này. Chúng tôi đã pha loãng plasmid *Chikungunya* và *Zika* vào mẫu nước tiểu, tách chiết ARN, tổng hợp cDNA, và tiến hành phản ứng realtime PCR.



Hình 5. Tín hiệu realtime PCR và đường chuẩn pha loãng plasmid của Chikungunya,

Zika pha loãng trong nước tiểu với các nồng độ 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 copy/ml.

3.4. Thành công trong thiết lập được dung môi 108@Uzol

Chúng tôi đã xây dựng được dung môi 108@Uzol với chi phí khoảng 6 triệu VNĐ/l so với hãng TRIzol LS Invitrogen có chi phí 60 triệu VNĐ/l mang lại hiệu quả kinh tế và làm chủ được kỹ thuật trong việc thao tác tách chiết ARN đảm bảo chất lượng, là sản phẩm đầu vào hoạt động chẩn đoán và nghiên cứu mà không lệ thuộc bởi các nguồn cung cấp ngoại nhập.

4. Bàn luận

Đối với các vi rút có nhân ARN như Zika, Chikungunya, Ebola, Cúm, Dengue... Kiến thức về động học của các vi rút này sẽ liên quan đến xác định chiến lược tối ưu cho việc lựa chọn bệnh phẩm để phát hiện, chẩn đoán các vi rút đó ở các giai đoạn bệnh khác nhau. Virus sẽ xuất hiện trong máu và các dịch khác của cơ thể trong giai đoạn cấp tính. ZIKV có thể phát hiện trong huyết thanh cho tới 3 đến 5 ngày sau khi khởi bệnh về mặt lâm sàng. Tải lượng virus đạt đỉnh khi các dấu hiệu lâm sàng bắt đầu xuất hiện [3]. ZIKV có thể được phát hiện trong nước bọt song song nhưng không kéo dài hơn trong huyết thanh. Sự kết hợp xét nghiệm máu và nước bọt đã làm tăng tỷ lệ phát hiện ZIKV lên khoảng 19% [4]. Dựa trên các tài liệu thu được tại các vụ dịch và các báo cáo trong các phòng xét nghiệm tham chiếu, các nhà khoa học cho thấy rằng khi sử dụng các xét nghiệm sinh học phân tử để phát hiện ZIKV nên kết hợp tìm ZIKV cả trong máu và trong nước tiểu [4]. Ở nước tiểu tải lượng virus xuất hiện cao hơn trong máu và đạt đỉnh cao nhất vào ngày thứ 5-7, và kéo dài đến 20 ngày sau khi khởi phát bệnh [4]. Do vậy, nước tiểu là bệnh phẩm rất quan trọng để chẩn đoán bệnh. Các kit thương mại chưa chú trọng việc tách ARN trong nước tiểu. Mónica Martínez-Fernández và cộng sự đã thấy rằng khi sử dụng các kit tách thương mại thường có hiệu suất tách được ARN thấp hơn các kỹ thuật tách chiết ARN

in house. Các kit mà nhóm tác giả này sử dụng là Norgen Total RNA kit (catalog no. 29600), Norgen miRNA kit (catalog No. 29000; Norgen Biotek Corp), miRCURY kit (catalog No. 300113; Exiqon A/S, Vedbæk, Denmark), and Qiagen miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen GmbH, Venlo, the Netherlands).

Hiện nay có nhiều sản phẩm thương mại nhập ngoại dùng trong tách ARN, ví dụ đó là dung môi Trizol LS do hãng Invitrogen cung cấp với giá 12 triệu/chai 200ml và bộ kit tách ARN do hãng Qiagen cung cấp với giá 15 triệu/bộ 50 chiếc. Trong thực hành chẩn đoán hoặc trong các nghiên cứu triển khai xét nghiệm mới chúng tôi sử dụng 0,5 - 0,7ml dung môi cho một lần tách ARN (tương ứng với 80.000 đồng/bệnh nhân nếu sử dụng Trizol LS Invitrogen) hoặc ít nhất một kit tách ARN (tương ứng với 300.000 đồng/bệnh nhân nếu dùng kit tách Qiagen) còn nếu sử dụng dung môi 108@Uzol, mỗi bệnh nhân chỉ phải chi trả 5.000 đồng/lượt tách. Tuy nhiên trong nhiều trường hợp (ví dụ như tiến hành các nghiên cứu thử nghiệm triển khai các xét nghiệm mới) số lần tách ARN.

5. Kết luận

Chúng tôi đã pha chế thành công dung môi tách ARN tổng số từ nước tiểu với hiệu suất tách chiết tương đương so với sản phẩm nhập ngoại cùng loại.

Tài liệu tham khảo

1. Chomczynski P, Sacchi N (1987) *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem 162(1): 156-159.
2. Chomczynski P, Sacchi N (2006) *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on*. Nat Protoc 1(2): 581-585.

3. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, Cao-Lormeau VM, Choumet V, Briant L, Desprès P, Amara A, Yssel H, Missé D (2015) *Biology of Zika virus infection in human skin cells*. J Virol 89(17): 8880-8896.
4. Lyle R, Petersen DJJ, Ann M Powers, and Margaret A Honein (2016) *Zika virus*. N Engl J Med 374: 1552-1563.