

<https://doi.org/10.59459/1859-1655/JMM.47>

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT ENZYME Br512 TÁI TỔ HỢP VÀ ỨNG DỤNG SÀNG LỌC SARS-CoV-2 BẰNG KỸ THUẬT KHUẾCH ĐẠI ĐẲNG NHIỆT

Nguyễn Phú Thành¹, Đinh Thị Thảo¹,
Nguyễn Cẩm Thạch^{1*}, Bạch Thùy Dương¹,
Ngô Tất Trung¹, Lê Hữu Song¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Sản xuất enzyme Br512 tái tổ hợp cho ứng dụng khuếch đại gene đích bằng công nghệ khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP) phát hiện SARS-CoV-2.

Vật liệu và phương pháp: Plasmid pKAR2-Br512 mã hóa enzyme Br512 được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3). Enzyme Br512 từ đó được biểu hiện bằng chất cảm ứng đặc hiệu (IPTG) sau đó được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực. Đánh giá đặc tính của enzyme Br512 tự sản xuất, so sánh với enzyme Bst 3.0 (Biolab NewEngland), sử dụng phương pháp reverse transcription LAMP (RT-LAMP) phát hiện gen N của SARS-CoV-2. Thử nghiệm được tiến hành trên mẫu bệnh phẩm.

Kết quả: Br512 thu được có độ tinh sạch cao, không tạp nhiễm các protein của vi khuẩn. Phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme Bst 3.0 hoặc Br512 phát hiện gen N của SARS-CoV-2 với ngưỡng phát hiện lần lượt là 10^2 bản sao/ μ L và 10^1 bản sao/ μ L.

Kết luận: Biểu hiện và tinh sạch thành công enzyme Br512 và sử dụng trong xét nghiệm RT-LAMP để sàng lọc SARS-CoV-2 với ngưỡng phát hiện là 10^2 bản sao/ μ L.

Từ khóa: SARS-CoV-2, khuếch đại đẳng nhiệt, Bst polymerase.

ABSTRACT

Objectives: To produce recombinant Br512 enzyme and investigate its application in RT-LAMP to detect SARS-CoV-2.

Material and methods: *E. coli* BL21(DE3) cells was transformed with pKAR2-Br512 encoding plasmid then induced with specific inducer (IPTG); the expressed Br512 enzyme was purified by affinity chromatography; its activity was evaluated and compared with commercial Bst 3.0 polymerase (Biolab NewEngland) in the RT-LAMP reaction for identifying the SARS-CoV-2's N-gene. Clinical trials were conducted on patient samples as well.

Results: The inhouse Br512 enzyme was highly pure enough and retains its LAMP activity in compareable with that of Bst 3.0 from New England Biolab; both product can sense SARS-CoV-2 RNA at the threshold of 10^1 copies/ μ L and 10^2 copies/ μ L, respectively.

Conclusion: Successful expression and purification of the recombinant Br512 enzyme and its application of the RT-LAMP assay for the SARS-CoV-2 screening with a detection threshold of 10^2 copies/ μ L.

Keywords: SARS-CoV-2, Isothermal amplification, Bst polymerase.

Chịu trách nhiệm nội dung: Nguyễn Cẩm Thạch, Email: nguyencamthach1973@yahoo.com

Ngày nhận bài: 05/2/2023; mời phản biện khoa học: 3/2023; chấp nhận đăng: 15/4/2023.

¹ Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

SARS-CoV-2 là vi-rút thuộc họ *Coronaviridae*, gây ra hội chứng viêm đường hô hấp cấp và nhiều biến chứng nghiêm trọng trên hệ tiêu hóa, thần kinh, tim mạch. Đây cũng là nguyên nhân dẫn đến hơn 5 triệu ca tử vong trên toàn

thế giới tính đến ngày 12/12/2021 [1]. Chẩn đoán sớm đóng vai trò quan trọng trong việc phát hiện nhanh và cách li kịp thời các cá thể nhiễm mầm bệnh để kiểm soát sự lây lan của vi-rút SARS-CoV-2; đồng thời, cho phép can thiệp điều trị sớm, giảm nguy cơ phát triển các biến chứng nghiêm trọng hơn [2]. Có nhiều phương pháp

xét nghiệm được phát triển để phát hiện vi-rút SARS-CoV-2, như RT-PCR, giải trình tự gen, PCR kĩ thuật số, ELISA, RT-LAMP, CRISPR-CAS [3]. Trong đó, RT-qPCR là phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) công nhận và được sử dụng rộng rãi nhất. Song, phương pháp này đòi hỏi kĩ thuật viên phải có tay nghề cao, cơ sở xét nghiệm phải có các dụng cụ xét nghiệm đắt tiền nên khó áp dụng bên ngoài các cơ sở được trang bị chuyên dụng. Hơn nữa, thời gian quay vòng xét nghiệm có thể đến vài giờ, cùng với kĩ thuật phức tạp, làm hạn chế khả năng xét nghiệm cho các tình huống cần sàng lọc nhanh. Do đó, việc triển khai rộng rãi xét nghiệm RT-qPCR khó khả thi, đặc biệt là ở vùng sâu, vùng xa, các khu vực hạn chế về nguồn lực [3].

Khắc phục những điểm nêu trên, các kĩ thuật khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt (như LAMP) lại có tiềm năng phát triển to lớn, vì chúng cho phép chẩn đoán mầm bệnh nhanh chóng với yêu cầu thiết bị đơn giản, rẻ tiền [4]. RT-LAMP (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA) là kĩ thuật khuếch đại axit nucleic ở nhiệt độ không đổi, sử dụng hai hoặc ba bộ mỗi, enzyme *Bst* polymerase có hoạt tính tách mạch và tổng hợp sợi axit nucleic với hiệu suất cao [3], [4]. Các enzym *Bst* polymerase có nhiều loại khác nhau (bao gồm wild-type *Bst* polymerase, *Bst* large fragment, *Bsm*, *Bst* 2.0, *Bst* 3.0...) đã được sản xuất thương mại. Nhưng trong đó, chỉ có enzym *Bst* 3.0 có hoạt tính phiên mã ngược [4], [5], [6]. Mặt khác, giá thành cao và nguồn cung bị gián đoạn do đại dịch COVID-19 là những khó khăn trong việc triển khai thường quy xét nghiệm RT-LAMP.

Nhằm chủ động nguồn vật liệu phục vụ xét nghiệm, chúng tôi nghiên cứu sản xuất enzyme Br512 - một dạng enzyme *Bst* DNA polymerase tái tổ hợp được nghiên cứu và phát triển bởi Andrew D Ellington và cộng sự năm 2020 - để ứng dụng vào kĩ thuật RT-LAMP phát hiện SARS-CoV-2.

2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chuẩn dương RNA SARS-CoV-2 khai thác từ Công ty Sao Thái Dương; Plasmid pKAR2-Br512 chứa cấu trúc biểu hiện enzyme Br512 khai thác từ Addgene (Hoa Kỳ); tế bào *E. coli* BL21(DE3)

khai thác từ Labo Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt - Đức, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108; mẫu dịch hầu họng của bệnh nhân được tách RNA bằng kit QIAamp Viral RNA (Quigen).

Các hóa chất phục vụ xét nghiệm khai thác từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Hoa Kỳ); các enzym thương mại và dung dịch đệm liên quan được khai thác từ New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, Hoa Kỳ); bộ mỗi trong phản ứng RT-LAMP khai thác từ Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, Hoa Kỳ).

2.2. Sản xuất enzyme Br512 tái tổ hợp

Plasmid pKAR2-Br512 (Addgene, Hoa Kỳ) mang trình tự gen mã hóa protein Br512 được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3). Khuẩn lạc được nuôi trong 10 mL môi trường LB (1% peptone; 1% NaCl; 0,5% cao nấm men) có bổ sung ampicillin qua đêm ở 37°C lắc 140 vòng/phút. Sau đó, 1 mL dịch nuôi được thêm vào thành 100 mL môi trường LB có bổ sung ampicillin, nuôi ở 37°C, lắc 140 vòng/phút cho đến khi OD600 đạt 0,6-0,8. Tế bào được cảm ứng biểu hiện enzyme Br512 bằng 0,5-1-2 mM IPTG ở 16°C hoặc 37°C trong 16-18 giờ (qua đêm) lắc 140 vòng/phút. Sinh khối được thu bằng cách li tâm 6.000 x g trong 5 phút ở 4°C. Tiếp đó, sinh khối được hòa tan trong đệm li giải lạnh (50 mM Phosphate Buffer; pH 7,5; 300 mM NaCl; 20 mM imidazole; 0,1% Igepal CO-630; 5 mM MgSO₄; 1 mg/mL DTT) bổ sung PMSF 1 mM. Sinh khối được siêu âm theo chương trình 1ON-4OFF, Amplitude 40% trong 4 phút ở trên đá. Dịch li giải được li tâm 10.000 x g trong 20 phút tại 4°C. Dịch nổi được chuyển vào ống eppendorf sạch.

Protein thu được trong dịch li giải được tinh sạch theo phương pháp ái lực ion bằng Ni-NTA Resin (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Nhựa Ni-NTA được chuyển vào ống eppendorf, sau đó li tâm 700 x g trong 2 phút, loại bỏ dịch nổi. Nhựa Ni-NTA được cân bằng bởi đệm cân bằng (50 mM Phosphate Buffer; pH 7,5; 300 mM NaCl; 10 mM imidazole), li tâm 700 x g trong 2 phút, loại bỏ đệm. Mẫu được chuẩn bị bằng cách thêm 1:1 v/v đệm cân bằng. Sau đó, hỗn hợp được thêm vào ống chứa nhựa Ni-NTA, ủ lắc trên đá trong 30 phút. Hạt nhựa sau đó được rửa với tỉ lệ 2:1 v/v đệm rửa (50 mM Phosphate Buffer; pH 7,5; 300 mM NaCl; 50 mM imidazole), li tâm 700 x g trong 2 phút. Rửa giải protein với 150 µL đệm

rửa giải (50 mM Phosphate Buffer; pH 7,5; 300 mM NaCl; 250 mM imidazole) bằng cách li tâm 700 x g trong 2 phút.

Protein thu sau rửa giải được kiểm tra bằng đo OD ở bước sóng 280 nm và điện di SDS-PAGE; thử hoạt tính trên phản ứng RT-LAMP.

2.3. Phản ứng RT-LAMP phát hiện SARS-CoV-2

Phản ứng RT-LAMP phát hiện SARS-CoV-2 sử dụng bộ mồi phát hiện vùng gen N của vi-rút. Khi sử dụng enzyme *Bst* 3.0 (NEB), thành phần phản ứng bao gồm đệm Isothermal Amplification Buffer II 10X (NEB; 20 mM Tris-HCl; 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 150 mM KCl; 2 mM MgSO_4 ; 0,1% Tween 20; pH 8,8 tại 25°C), 0,4 M Betaine, 4 mM MgSO_4 , 0,25 mM dNTPs, 1,6 μM FIP primer, 1,6 μM BIP primer, 0,4 μM F3 primer, 0,4 μM B3 primer, 0,8 μM LF primer, 0,8 μM LB primer, 0,108 U/ μL enzyme *Bst* 3.0.

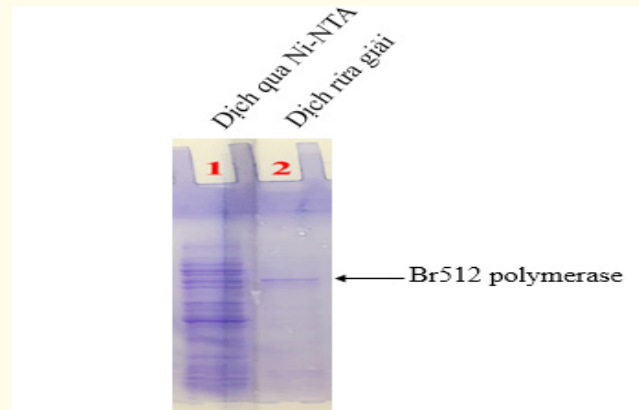
Khi sử dụng enzyme Br512, thành phần phản ứng bao gồm đệm Isothermal Amplification Buffer 10X (NEB; 20 mM Tris-HCl; 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 150 mM KCl; 2 mM MgSO_4 ; 0,1% Tween 20; pH 8,8 tại 25°C), 0,4 M Betaine, 4 mM MgSO_4 , 0,25 mM dNTPs, 1,6 μM FIP primer, 1,6 μM BIP primer, 0,4 μM F3 primer, 0,4 μM B3 primer, 0,8 μM LF primer, 0,8 μM LB primer. Nồng độ MgSO_4 được thử nghiệm tại 2-4-6-8 mM. Phản ứng được khảo sát ở khoảng nhiệt độ 59-65°C, trong thời gian từ 30-70 phút. Sản phẩm của phản ứng RT-LAMP được điện di trên gel agarose 1,2% hoặc được quan sát đổi màu bằng cách bổ sung SYBR™ Green I Nucleic Acid (Thermo). Các mẫu có RNA của SARS-CoV-2 được phát hiện có màu xanh lá; ngược lại, các mẫu âm tính giữ nguyên màu cam.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Biểu hiện và tinh sạch enzyme Br512 tái tổ hợp

Chúng tôi khảo sát quá trình biểu hiện enzym Br512 trên 3 yếu tố là nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng và thời gian cảm ứng. Br512 được khảo sát biểu hiện ở hai nhiệt độ 16°C và 37°C, chất cảm ứng IPTG được khảo sát ở ba nồng độ 0,5-1-2 mM và khoảng thời gian biểu hiện được đánh giá từ 12-18-24 giờ. Trong các điều kiện đã được thử nghiệm, điều kiện tốt nhất cho sinh tổng hợp protein tái tổ hợp là ở 16°C, cảm ứng với 1 mM IPTG và thời gian tối ưu là 18 giờ.

Enzym Br512 tự sản xuất được điện di SDS-PAGE kiểm tra kích thước, độ tinh sạch. Kết quả phân tích SDS-PAGE (hình 1) cho thấy chỉ có 1 vạch protein duy nhất ở giếng trong dịch rửa giải. Điều này chứng tỏ enzyme Br512 thu nhận được có độ tinh sạch cao, không tạp nhiễm các protein của vi khuẩn.



Hình 1. Điện di SDS-PAGE Br512 polymerase

3.2. Phản ứng RT-LAMP phát hiện SARS-CoV-2

3.2.1. Phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme *Bst* 3.0

Phản ứng RT-LAMP sử dụng *Bst* 3.0 (NEB) với thành phần phản ứng đã nêu ở trên, được khảo sát điều kiện nhiệt độ từ 59-65°C, nồng độ MgSO_4 trong hệ đệm từ 2-4-6-8 mM, lượng enzym sử dụng trong phản ứng từ 0,054-0,108-0,162-0,216 U/ μL . Kết quả điện di sản phẩm phản ứng RT-LAMP cho thấy nhiệt độ tối ưu của phản ứng là 62°C (hình 2), nồng độ MgSO_4 tối ưu là 4 mM (hình 3) và lượng enzym *Bst* 3.0 tối thiểu (hình 4) cho quá trình khuếch đại là 0,108 U/ μL .

3.2.2. Phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme Br512 tái tổ hợp

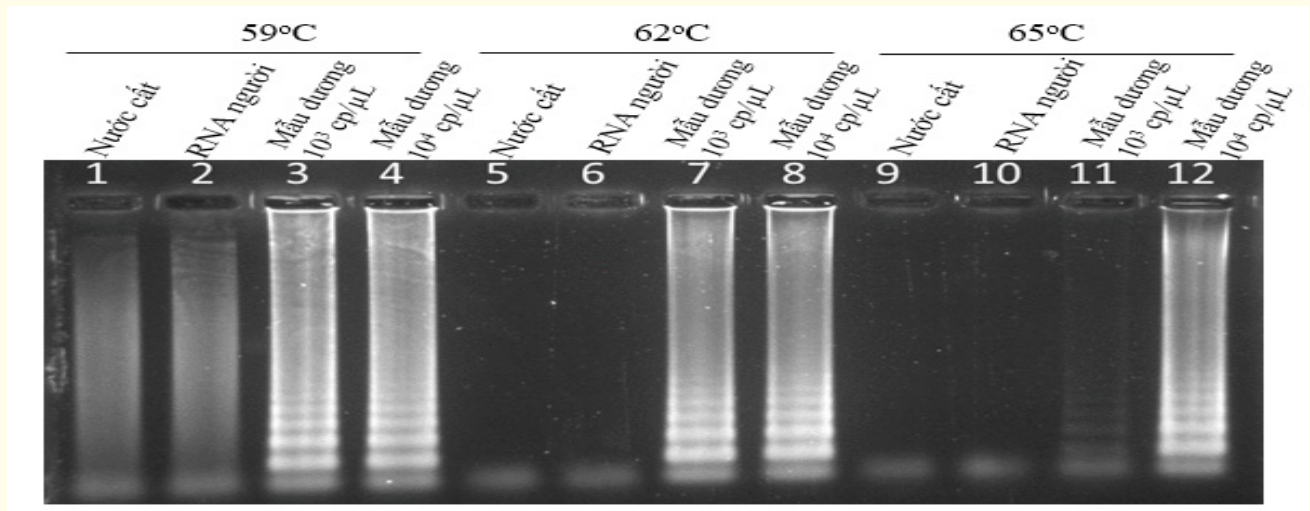
Phản ứng RT-LAMP sử dụng enzym Br512 với thành phần phản ứng đã nêu ở trên, được khảo sát điều kiện nhiệt độ từ 59-65°C, nồng độ MgSO_4 trong hệ đệm từ 2-4-6-8 mM, lượng enzym sử dụng trong phản ứng từ 0,054-0,108-0,162-0,216 U/ μL . Kết quả điện di sản phẩm RT-LAMP tối ưu phản ứng (hình 5 và hình 6) cho thấy, nồng độ MgSO_4 là 4 mM và tại nhiệt độ 62°C cho kết quả tốt nhất.

3.2.3. Độ nhạy của các phản ứng RT-LAMP

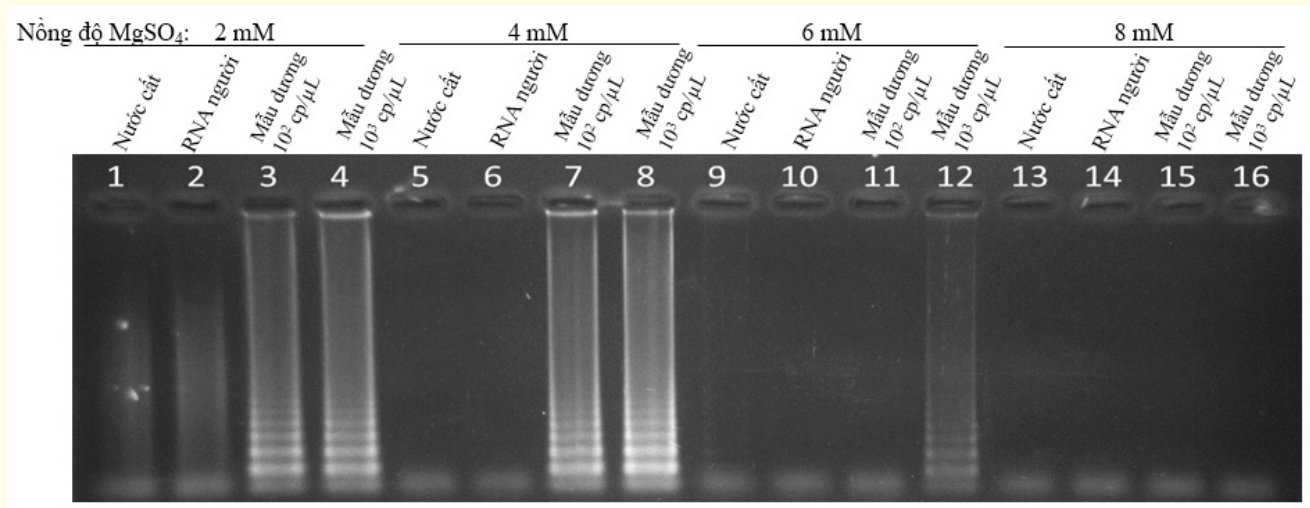
Phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme *Bst* 3.0 hoặc hỗn hợp enzyme RTx và Br512 được thử nghiệm với dải chứng dương RNA COVID-19 được pha loãng 10 lần thành các nồng độ từ

10^0 - 10^1 - 10^2 - 10^3 copies/ μ L. Kết quả (hình 7) cho thấy, độ nhạy của phản ứng dùng Bst 3.0 đạt đến 10^1 copies/ μ L (1/3 mẫu lên tín hiệu). Bên

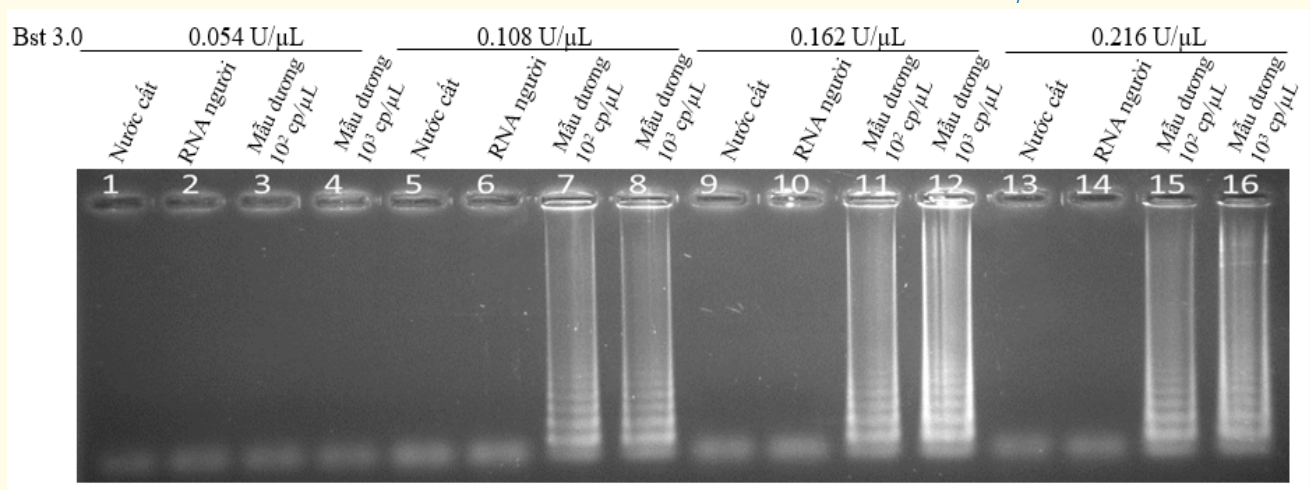
cạnh đó, độ nhạy của phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme Br512 (hình 8) đạt ngưỡng 10^2 copies/ μ L.



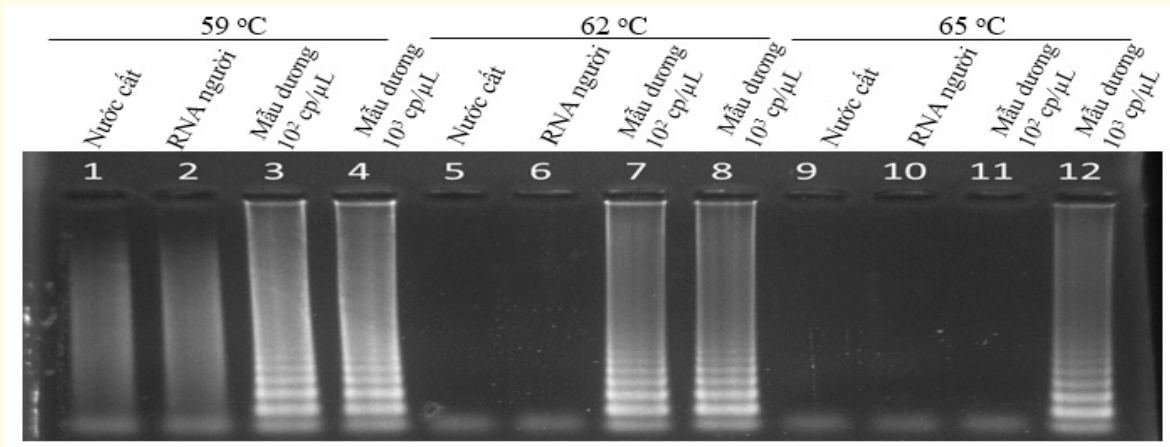
Hình 2. Điện di sản phẩm RT-LAMP tối ưu nhiệt độ phản ứng



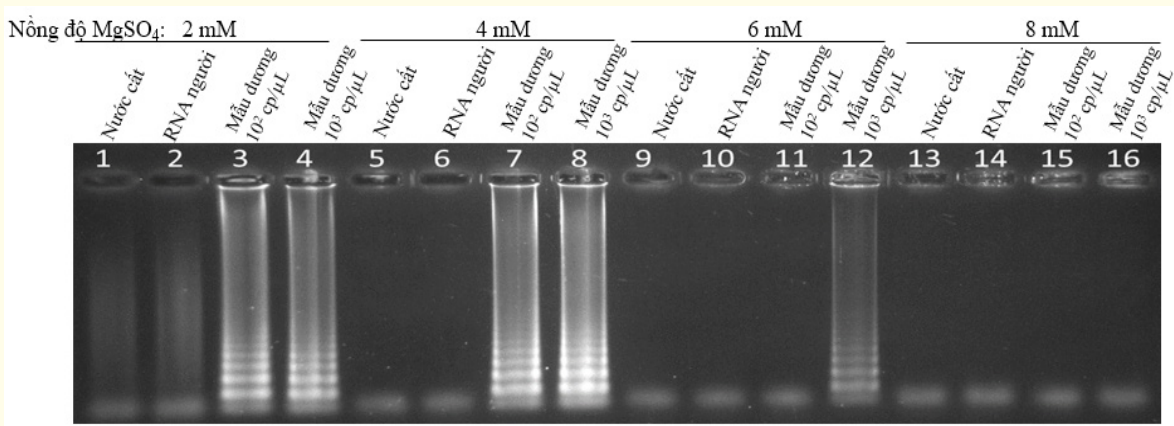
Hình 3. Điện di sản phẩm RT-LAMP tối ưu nồng độ $MgSO_4$



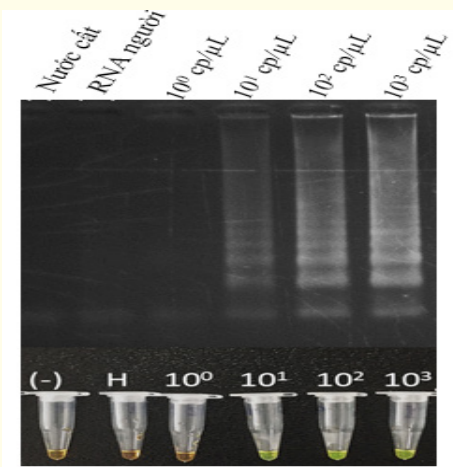
Hình 4. Điện di sản phẩm RT-LAMP tối ưu lượng enzyme Bst 3.0



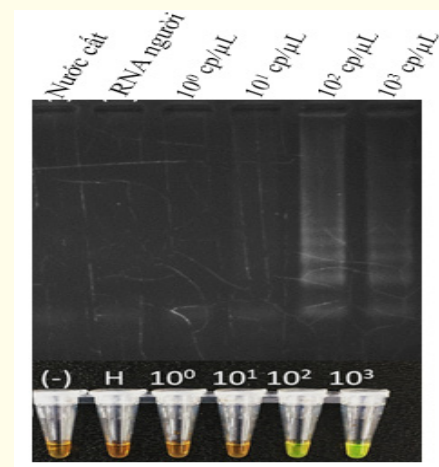
Hình 5. Điện di sản phẩm RT-LAMP tối ưu nhiệt độ phản ứng



Hình 6. Điện di sản phẩm RT-LAMP tối ưu nồng độ MgSO₄



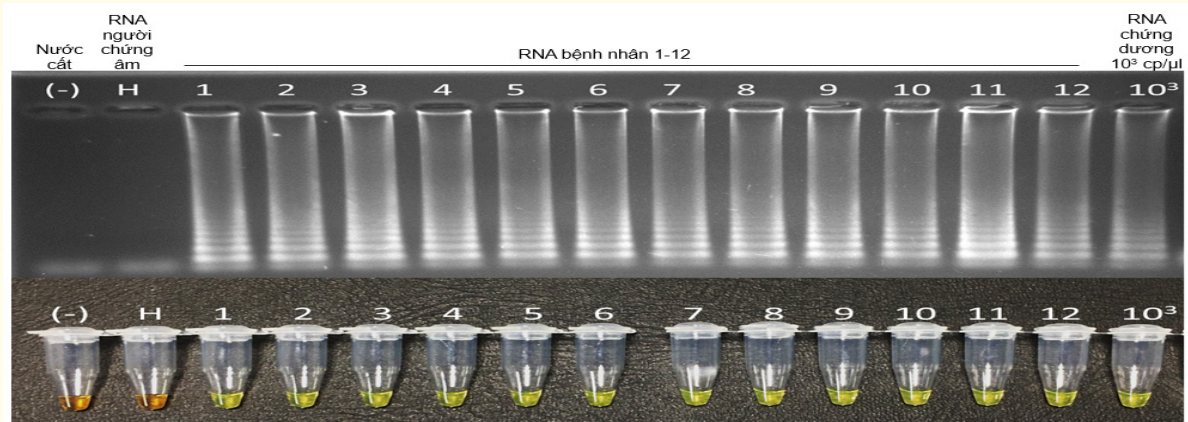
Hình 7. Kết quả khảo sát độ nhạy phản ứng RT-LAMP sử dụng Bst 3.0



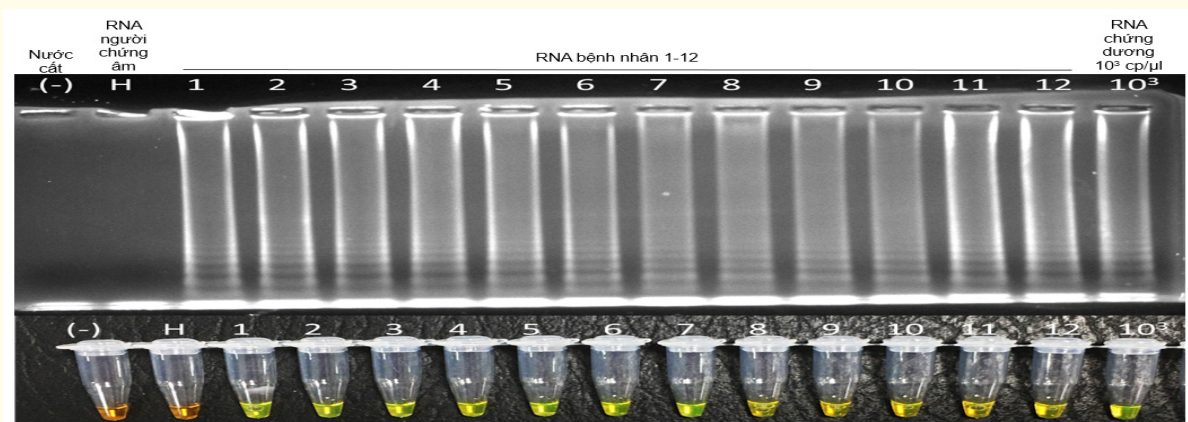
Hình 8. Kết quả thí nghiệm độ nhạy phản ứng RT-LAMP sử dụng Br512

3.2.4. Thử nghiệm trên mẫu bệnh phẩm lâm sàng

Phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme Bst 3.0 hoặc Br512 được thử nghiệm trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng là mẫu RNA tách từ dịch hầu họng của bệnh nhân. Kết quả thử nghiệm lâm sàng RT-LAMP phát hiện 12/12 mẫu bệnh phẩm lâm sàng (hình 9), trước đó đã được xác nhận bằng phản ứng realtime-PCR. Đặc biệt, các mẫu có Ct cao (< 19), pha loãng 100 và 1.000 lần, phản ứng RT-LAMP có thể phát hiện được chỉ sau 45 phút.



Hình 9. Kết quả phản ứng RT-LAMP SARS-CoV-2 N-gene sử dụng enzyme *Bst* 3.0, điện di sản phẩm LAMP và quan sát đổi màu SYBR Green



Hình 10. Kết quả phản ứng RT-LAMP SARS-CoV-2 N-gene sử dụng enzyme *Br512*, điện di sản phẩm LAMP và quan sát đổi màu SYBR Green

4. BÀN LUẬN

Trong quá trình biểu hiện, nhóm nghiên cứu không nhận thấy sự khác biệt giữa các nồng độ IPTG cảm ứng được khảo sát. IPTG không phải là một chất cảm ứng vô hại; thay vào đó, nó có thể gây ức chế và gây giảm hiệu suất tổng hợp protein đáng kể của tế bào *E. coli* BL21 (DE3) vốn đã mang gánh nặng chuyển hóa do plasmid mang gen của đối tượng biểu hiện. Nồng độ IPTG có thể được điều chỉnh một cách hiệu quả, từ 40-400 μ M để giảm thiểu tác động tiêu cực này [8].

Nhiệt độ nuôi *E. coli* BL21 (DE3) biểu hiện enzyme được khảo sát ở 16°C và 37°C trong các khoảng thời gian 16-18 giờ. Kết quả thu được lượng enzym tối đa ở điều kiện nuôi là 16°C, trong 18 giờ.

Nồng độ imidazole trong dung dịch đệm cân bằng và dung dịch rửa hạt Ni-NTA ảnh hưởng đến độ tinh sạch của protein. Ngoài ra, nồng độ imidazole trong elution buffer cũng ảnh hưởng đến lượng protein thu được. Với đa số protein tinh sạch bằng hạt Ni-NTA thì nồng độ imidazole phù hợp trong đệm cân bằng và rửa hạt từ 10-20 mM; nồng độ imidazole sử dụng trong giai đoạn tách rửa cuối

cùng là 250 mM [9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy nồng độ imidazole 50 mM thu được enzym với độ tinh sạch tốt nhất. Độ tinh sạch của enzyme được đánh giá qua hình ảnh điện di SDS-PAGE là một dải protein gọn, không có các vạch phụ với các kích thước khác nhau (hình 1). Hơn nữa, với lô enzyme không đạt độ tinh sạch, các thử nghiệm đánh giá hoạt tính trong phản ứng LAMP cho các tín hiệu dương tính giả.

Enzyme *Bst* 3.0 là một enzyme *Bst* polymerase được nghiên cứu cải tiến hoạt tính tách mạch, tốc độ trùng hợp mạnh mẽ, ổn định nhiệt tốt và chịu được điều kiện nồng độ muối cao. Đây là sản phẩm enzyme thương mại duy nhất đang được sử dụng cho các xét nghiệm LAMP có hoạt tính phiên mã ngược từ RNA thành DNA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu phản ứng RT-LAMP một bước, phát hiện SARS-CoV-2 N-gene ở nồng độ 10^1 copies/ μ L sau 60 phút (hình 7).

Enzyme *Br512* được Andrew D Ellington và cộng sự phát triển năm 2020, bằng cách thêm 12 amino acid và nhóm HP35 để tạo ra nhóm HP47 của *Bst* large fragment (*Bst* LF) polymerase, giúp

cải thiện độ hòa tan và hiệu suất tinh sạch enzyme tốt hơn. Đồng thời, tăng tính chịu nhiệt và có thêm hoạt tính phiên mã ngược mà *Bst* LF không có [7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã biểu hiện và tinh sạch thành công enzyme Br512, sử dụng tối ưu phản ứng RT-LAMP hai bước, phát hiện SARS-CoV-2 N-gene ở nồng độ 10^2 copies/ μ L sau 70 phút (hình 8). Phản ứng RT-LAMP ở cả 2 giai đoạn diễn ra ở 62°C , nồng độ MgSO_4 4 mM (hình 5, hình 6). Tuy nhiên, pH dung dịch đệm ở giai đoạn phiên mã ngược là 8,0 và ở giai đoạn sau là 8,8 thì tối ưu cho phản ứng xảy ra. Sự khác biệt về pH có thể ảnh hưởng đến hoạt tính phiên mã ngược của Br512. Do đó, đây là một khó khăn trong quá trình tối ưu phản ứng RT-LAMP một bước với enzyme Br512.

Để khắc phục vấn đề này, chúng tôi đã sử dụng kết hợp enzyme Br512 và một enzyme phiên mã ngược RT xexo cho phản ứng RT-LAMP một bước. Phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme Br512 một bước được chúng tôi tối ưu đã phát hiện SARS-CoV-2 N-gene ở nồng độ 10^2 copies/ μ L sau 70 phút.

Trong công bố của Andrew D Ellington và cộng sự, các tác giả chỉ đánh giá hoạt tính và so sánh hiệu suất enzyme với enzyme *Bst* 2.0 và chứng minh ưu điểm vượt trội của Br512 tốt hơn *Bst* 2.0 kết hợp RT trong phản ứng RT-LAMP ứng dụng phát hiện COVID-19. Tuy nhiên, tác giả này không so sánh với enzyme *Bst* 3.0 [7].

Chúng tôi tiếp tục đánh giá phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme *Bst* 3.0 và Br512 tự sản xuất trên mẫu RNA tách từ dịch tỵ hầu của một số bệnh nhân trước đó được chẩn đoán xác định dương tính với SARS-CoV-2 bằng realtime-PCR. Kết quả thể hiện trên hình 9 và hình 10, cho thấy phản ứng RT-LAMP đã phát hiện chính xác, phù hợp với kết quả chẩn đoán bằng realtime-PCR; không trường hợp nào âm tính giả và không xuất hiện dương tính giả ở mẫu chứng âm. Bên cạnh đó, chúng tôi còn tối ưu thành công phản ứng đổi màu sử dụng thuốc nhuộm SYBR-Green I để đọc kết quả phản ứng RT-LAMP, giúp rút ngắn thời gian xét nghiệm.

Như vậy, chúng tôi đã sản xuất thành công enzyme Br512 ứng dụng phát hiện chính xác SARS-CoV-2 N-gene dựa trên công nghệ khuếch đại acid nucleic đẳng nhiệt RT-LAMP. Đây là một phương pháp đơn giản, nhanh chóng, chính xác.

Mặc dù vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi vẫn còn một số điểm hạn chế. Đó là cần tiếp tục tối ưu phản ứng RT-LAMP một bước với enzyme Br512 và đánh giá phản ứng RT-LAMP trên nhiều mẫu bệnh phẩm lâm sàng hơn để có thể áp dụng trong sàng lọc thường quy.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu sản xuất enzyme Br512 tái tổ hợp cho ứng dụng khuếch đại gene đích bằng công nghệ khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP) phát hiện SARS-CoV-2 tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Kết quả: biểu hiện và tinh sạch thành công enzyme Br512 và sử dụng trong xét nghiệm RT-LAMP để sàng lọc SARS-CoV-2. Cụ thể, enzyme Br512 thu được có độ tinh sạch cao, không tạp nhiễm các protein của vi khuẩn; phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme *Bst* 3.0 hoặc Br512 phát hiện gen N của SARS-CoV-2 với ngưỡng phát hiện lần lượt là 10^1 copies/ μ L và 10^2 copies/ μ L.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO (2021), *WHO-COVID-19-global-data.csv.pdf*. 2021: <https://covid19.who.int/>
2. Baj J, et al. (2020), *COVID-19: Specific and Non-Specific Clinical Manifestations and Symptoms: The Current State of Knowledge*. Journal of clinical medicine, 2020, 9(6): p. 1753.
3. Rai P, et al. (2021), *Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection*. Applied microbiology and biotechnology, 2021. 105(2): p. 441-455.
4. Srividya A, et al. (2019), *Loop Mediated Isothermal Amplification: A Promising Tool for Screening Genetic Mutations*. Mol Diagn Ther, 2019. 23(6): p. 723-733.
5. Ma Y, et al. (2016), *Enhancement of Polymerase Activity of the Large Fragment in DNA Polymerase I from Geobacillus stearothermophilus by Site-Directed Mutagenesis at the Active Site*. Biomed Res Int, 2016: p. 2906484.
6. Ocorbin I.P, Boyarskikh U.A, Filipenko M.L (2015), *Large Fragment of DNA Polymerase I from Geobacillus sp. 777: Cloning and Comparison with DNA Polymerases I in Practical Applications*. Mol Biotechnol, 2015. 57(10): p. 947-59.
7. Maranhao A, et al. (2020), *An improved and readily available version of Bst DNA Polymerase for LAMP, and applications to COVID-19 diagnostics*. medRxiv, 2020.
8. Dvorak P, et al. (2015), *Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in Escherichia coli BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway*. Microbial Cell Factories, 2015. 14(1): p. 201.
9. Nurjayadi M, et al. (2019), *Variations of binding, washing, and concentration of imidazole on purification of recombinant Fim-C Protein Salmonella typhi with Ni-NTA Resin*. Journal of Physics: Conference Series, 2019. 1402(5). □