

ESTABLISHMENT AND EVALUATION OF THE SUITABILITY OF THE IDENTIFICATION PROCEDURE FOR ROTAVIRUS USING QIAGEN ONESTEP RT-PCR KIT

Dang Thi Ngan Ha, Nguyen Dang Hien, Tran Thi Bich Hanh, Nguyen Thuy Huong*

Center for Research and Production of Vaccines and biologicals - 135 Lo Duc, Hai Ba Trung Ward, Hanoi City, Vietnam

Received: 01/08/2025

Revised: 17/08/2025; Accepted: 28/11/2025

ABSTRACT

Currently, Center for Research and Production of Vaccines and biologicals (POLYVAC) is using the RT-PCR method to perform genotyping test to identify Rota bulk vaccine and finished product, G1P strain. With this method, the extracted products have to undergo two rounds of PCR, approximately 8 hours to use for identify genotype G1 and another 8 hours for genotype P. The entire testing time takes about 3 days.

By using the QIAGEN OneStep RT-PCR kit, we are able to reduce the total testing time to only 1.5 days, as the product only needs one round of PCR in which both reverse transcription and amplification of the target gene G1 and P in a single reaction. The total time for PCR cycle is reduced to approximately 3 hours to use for identification of both G1 and P types. The research results show that the newly established genotyping procedure using the QIAGEN OneStep RT-PCR kit (100) is suitable for POLYVAC's testing requirements and give the comparable results to those from the current genotyping method using at POLYVAC.

Keywords: POLYVAC, Rotavin, Rotavirus vaccine identification test.

*Corresponding author

Email: huong72us@yahoo.com **Phone:** (+84) 912514309 **Doi:** 10.52163/yhc.v66iCD23.3926



THIẾT LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH PHÙ HỢP QUY TRÌNH NHẬN DẠNG VIRUS ROTA SỬ DỤNG BỘ SINH PHẨM QIAGEN ONE-STEP RT-PCR

Đặng Thị Ngân Hà, Nguyễn Đăng Hiền, Trần Thị Bích Hạnh, Nguyễn Thúy Hường*

Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc-xin và Sinh phẩm y tế - 135 Lò Đúc, P. Hai Bà Trưng, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận: 01/08/2025

Ngày sửa: 17/2025; Ngày đăng: 28/11/2025

TÓM TẮT

Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc-xin và Sinh phẩm y tế (POLYVAC) hiện nay đang sử dụng phương pháp RT-PCR để thực hiện thử nghiệm nhận dạng vắc-xin Rota bán thành phẩm và thành phẩm chủng G1P[8]. Với phương pháp này, sản phẩm sau khi tách chiết sẽ được chạy PCR 2 lần, chu trình RT-PCR cần khoảng 8 giờ để nhận dạng typ G1 và tương tự cần 8 giờ để nhận dạng typ P[8]. Tổng thời gian thực hiện thử nghiệm từ khi tách chiết đến chạy điện di đọc kết quả mất khoảng 3 ngày.

Bằng việc sử dụng bộ kit QIAGEN OneStep RT-PCR, chúng tôi đã rút ngắn được tổng thời gian thử nghiệm xuống còn 1,5 ngày do chỉ cần chạy PCR 1 lần duy nhất vừa phiên mã ngược, vừa nhân bản sản phẩm phiên mã trong cùng 1 chu trình phản ứng, tổng thời gian mất khoảng 3 giờ cho chu trình PCR để nhận dạng typ G1 và typ P[8]. Kết quả nghiên cứu đã thiết lập được quy trình thử nghiệm nhận dạng virus Rota sử dụng bộ kit QIAGEN OneStep RT-PCR (100) phù hợp với yêu cầu của thử nghiệm và có kết quả tương đồng với thử nghiệm nhận dạng hiện đang áp dụng tại POLYVAC.

Từ khóa: POLYVAC, Rotavin, thử nghiệm nhận dạng vắc-xin Rota.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay trên thế giới có 5 nước sản xuất được vắc-xin Rota, đó là Rotarix của GSK (Bỉ), Rotateq của Merck (Mỹ), Rotavac của Bharat (Ấn Độ), Rota LLR (Trung Quốc) và vắc-xin Rotavin của POLYVAC (Việt Nam) [8].

Vắc-xin Rotavirus là vắc-xin được sử dụng để bảo vệ chống lại nhiễm virus Rota, là nguyên nhân hàng đầu gây tiêu chảy nặng ở trẻ nhỏ. Vắc-xin phòng ngừa 15-34% tiêu chảy nặng ở các nước đang phát triển và 37-96% tiêu chảy nặng ở các nước phát triển. Vắc-xin làm giảm nguy cơ tử vong ở trẻ nhỏ do tiêu chảy [8].

Tại Việt Nam, vắc-xin Rotavin sử dụng chủng virus G1P8 sống, giảm độc lực là vắc-xin nội địa duy nhất được POLYVAC sản xuất dùng để phòng bệnh tiêu chảy do virus Rota [3].

Trước khi được cơ quan Kiểm định quốc gia cho phép xuất xưởng lô vắc-xin ra thị trường, nhà sản xuất cần phải đánh giá đầy đủ các tiêu chuẩn chất lượng của lô vắc-xin theo tiêu chuẩn đã được đăng ký. Một trong những thử nghiệm không thể thiếu đó là thử nghiệm nhận dạng vắc-xin, phương pháp

RT-PCR đã được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) khuyến cáo làm phương pháp chuẩn để nhận dạng vắc-xin Rota cho kết quả nhanh, chính xác, hiệu quả và tiết kiệm thời gian. POLYVAC đã thiết lập phương pháp này để làm thử nghiệm nhận dạng vắc-xin Rotavin.

Virus rota có hệ gen phân đoạn gồm 11 đoạn ARN kép, có độ lớn khoảng 18 nghìn cặp bazơ, trọng lượng phân tử từ 11.106 đến 14.106 Dalton. Mỗi gen có trọng lượng phân tử từ 2.105 đến 2.2.106 Dalton và mã hóa cho một protein cấu trúc hoặc không cấu trúc [4].

Hạt virus chứa ít nhất 6 protein cấu trúc: các gen 1, 2, 3 và 6 mã hóa cho các protein VP1, VP2, VP3 và VP6. Đoạn gen 4, 9 mã hóa cho các protein capsit lớp ngoài VP4 và VP7 quy định kiểu hình của virus Rota. Các gen còn lại (4, 7, 8, 10 và 11) mã hóa cho các protein không cấu trúc (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5) [4].

Thử nghiệm nhận dạng vắc-xin Rotavin bằng phương pháp RT-PCR chính là xác định kiểu gen mã hóa cho hai protein capsit lớp ngoài của virus là VP4 và VP7 có chính xác là typ G1 và P[8] là chủng sử dụng để

*Tác giả liên hệ

Email: huong72us@yahoo.com Điện thoại: (+84) 912514309 Doi: 10.52163/yhc.v66iCD23.3926

sản xuất vắc-xin.

Vắc-xin Rotavin đã được đưa vào Chương trình Tiêm chủng mở rộng từ năm 2023, hàng năm POLYVAC phải sản xuất hàng trăm lô vắc-xin, để tiết kiệm thời gian thực hiện thử nghiệm, chúng tôi đã tiến hành tìm hiểu bộ kit mới của hãng QIAGEN OneStep RT-PCR [5] để nhận dạng vắc-xin. Với việc sử dụng bộ kit này, có thể giảm được gần 1/2 thời gian thực hiện thử nghiệm, đồng thời cũng đơn giản hóa các bước tiến hành giúp sớm có kết quả đánh giá chất lượng của lô vắc-xin, kịp thời cung cấp cho nhu cầu của tiêm chủng mở rộng. Xuất phát từ nhu cầu thực tế đó, chúng tôi thực hiện đề tài nghiên cứu thiết lập quy trình và đánh giá tính phù hợp của bộ kit QIAGEN OneStep RT-PCR kit (100) cho thử nghiệm nhận dạng virus Rota tại POLYVAC nhằm thay thế/bổ sung cho quy trình đang sử dụng tại POLYVAC.

Đề tài đã thiết lập được quy trình nhận dạng virus Rota trong vắc-xin Rota. Vắc-xin phải đạt được tiêu chuẩn chất lượng yêu cầu trong chuyên luận vắc-xin dùng cho người theo Dược điển Việt Nam, cơ sở hướng dẫn nhận dạng virus Rota WHO/IVB/08.17 của WHO [9].

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu của 3 lô vắc-xin Rota bán thành phẩm RSH # 0124; RSH # 0324; RSH # 0424 và 3 lô vắc-xin Rota thành phẩm R # 1324; R # 1424; R # 1524 chủng G1P[8].

Bộ kit QIAGEN OneStep RT-PCR (100) (Qiagen).

Chứng âm: H₂O không có RNase (Qiagen).

Chứng dương: GP Master seed lot 1. 13.17.3 chủng G1P[8] (POLYVAC). Thể tích: 200 uL/mẫu sử dụng để tách chiết RNA, lặp lại mỗi thử nghiệm 3 lần.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại POLYVAC, Bộ Y tế, cơ sở 135 Lò Đúc.

Thời gian thực hiện nghiên cứu: từ tháng 1/2024 đến tháng 10/2024.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Sử dụng phương pháp tách chiết ARN virus Rota sử dụng bộ kit tách chiết ARN của hãng Invitrogen để tách chiết ARN virus Rota trong mẫu vắc-xin Rota bán thành phẩm và thành phẩm.

- Phương pháp pha các primer (của hãng IDT, Mỹ) và thành phần hỗn dịch chạy PCR1 và PCR2.

Bảng 1. Primer xác định gen G1

STT	Tên primer	Trình tự 5'-3'	Vị trí trên đoạn gen
1	VP7R (chung cho tất cả các chủng G)	AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC	914-932
2	aBT1 (G1)	CAA GTA CTC AAA TCA ATG G	314-335

Bảng 2. Primer xác định gen P [8]

STT	Tên primer	Trình tự 5'-3'	Vị trí trên đoạn gen
1	Conc3 (chung cho các chủng P)	TGG CTT CGC TCA TTTATA GAC A	11-32
2	1T-1 (P8)	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	339-356

- Chu trình chạy PCR1 và PCR2 tạo sản phẩm xác định typ G và typ P.

- Chu trình chạy PCR tạo sản phẩm xác định typ G và typ P sử dụng bộ kit QIAGEN Onestep RT-PCR Kit (100).

- Phương pháp điện di sản phẩm PCR và đọc kết quả

Tiêu chuẩn chấp thuận

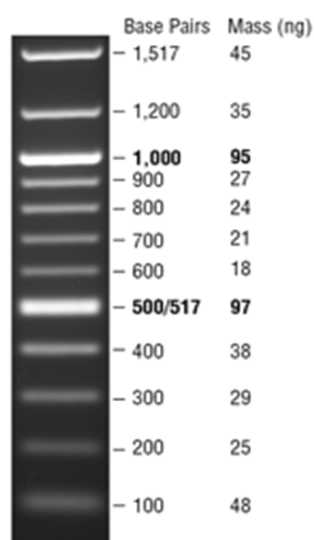
+ Mẫu chứng âm và trắng: điện di không có băng sản phẩm. Thang chuẩn sáng rõ.

+ Mẫu chứng dương:

Sản phẩm khuếch đại đúng kích thước: sản phẩm PCR gen G1 kích thước ~618 bp, sản phẩm gen P8 kích thước ~224 bp.

Vạch băng điện di rõ nét: vạch băng sáng, nét.

+ Thang chuẩn 1 kb =1000 nucleotit (marker): vạch chia kích thước các vạch băng 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 nucleotit chạy rõ nét và sáng.



Hình 1. Thang chuẩn (100 bp)

Thử nghiệm được coi là hợp lệ khi: các mẫu thử xuất hiện duy nhất một dải băng điện di sáng rõ và tương đương với mẫu chứng dương được coi là dương tính và nhận dạng là typ G1 khi dải băng tương đương với dải băng của mẫu chứng dương G1, và P[8] khi giải băng tương đương với mẫu chứng dương P[8], các mẫu không xuất hiện băng điện di và tương đương với mẫu chứng âm được coi là âm tính.

Yêu cầu: kết quả của 3 lần lặp lại thử nghiệm phải giống nhau và các băng điện di có độ nét và sáng tối thiểu tương đương với băng điện di sử dụng phương pháp hiện có, không có băng phụ.

2.4. Thiết kế nghiên cứu

Để xây dựng phương pháp nhận dạng sử dụng bộ kit QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (100), chúng tôi thực hiện thiết lập các chu trình PCR khác nhau để lựa chọn được chu trình phù hợp nhất, đáp ứng được yêu cầu của thử nghiệm.

2.4.1. Nghiên cứu 1: Thiết lập chu trình nhiệt định typ G và P riêng rẽ.

STT	Thành phần	Thể tích/phản ứng	Chu trình nhiệt của định typ G:
1	H ₂ O không chứa Rnase	8 µl	42°C - 30 phút → 1 chu kỳ 95°C - 15 phút → 1 chu kỳ 94°C - 30 giây 50°C - 1 phút 68°C - 1 phút 68°C - 5 phút → 1 chu kỳ Giữ mẫu ở 4°C
2	QIAGEN OneStep RT-PCR 5X Buffer	10 µl	
3	Hỗn hợp dNTP (10 mM)	2 µl	
4	VP7R (100 ng/µl)	4 µl	
5	G1 (100 ng/µl)	4 µl	
6	Enzyme QIAGEN OneStep RT-PCR	2 µl	
7	Q-Solution 5*	6 µl	
8	Mẫu RNA	14 µl	
Tổng thể tích phản ứng		50 µl	
STT	Thành phần	Thể tích/phản ứng	Chu trình nhiệt của định typ P:
1	H ₂ O không chứa RNase	8 µl	42°C - 30 phút → 1 chu kỳ 95°C - 15 phút → 1 chu kỳ 94°C - 1 phút 51°C - 1 phút 72°C - 1 phút 72°C - 5 phút → 1 chu kỳ Giữ mẫu ở 4°C
2	QIAGEN OneStep RT-PCR 5X Buffer	10 µl	
3	Hỗn hợp dNTP (10mM)	2 µl	
4	VP4F (100ng/µl)	4 µl	
5	P8 (100ng/µl)	4 µl	
6	Enzyme QIAGEN OneStep RT-PCR	2 µl	
7	Q-Solution 5*	6 µl	
8	Mẫu RNA	14 µl	
Tổng thể tích phản ứng		50 µl	

2.4.2. Nghiên cứu 2: Thiết lập duy nhất một chu trình nhiệt cho cả định typ G và P.

42°C - 30 phút → 1 chu kỳ

95°C - 15 phút → 1 chu kỳ

94°C - 1 phút	} 40 chu kỳ
51°C - 1 phút	
72°C - 1 phút	

72°C - 7 phút → 1 chu kỳ

Giữ mẫu ở 4°C

Định typ G			Định typ P		
STT	Thành phần	Thể tích/ phản ứng	STT	Thành phần	Thể tích/ phản ứng
1	H ₂ O không chứa RNase	8 µl	1	H ₂ O không chứa RNase	8 µl
2	QIAGEN OneStep RT-PCR 5X Buffer	10 µl	2	QIAGEN OneStep RT-PCR 5X Buffer	10 µl
3	Hỗn hợp dNTP (10 mM)	2 µl	3	Hỗn hợp dNTP (10 mM)	2 µl
4	VP7R (100 ng/µl)	4 µl	4	VP4F (100 ng/µl)	4 µl
5	G1 (100 ng/µl)	4 µl	5	P8 (100 ng/µl)	4 µl
6	Enzyme QIAGEN OneStep RT-PCR	2 µl	6	Enzyme QIAGEN OneStep RT-PCR	2 µl
7	Q-Solution 5*	6 µl	7	Q-Solution 5*	6 µl
8	Mẫu RNA	14 µl	8	Mẫu RNA	14 µl
Tổng thể tích phản ứng		50 µl	Tổng thể tích phản ứng		50 µl

2.4.3. Quy trình đang được sử dụng để thực hiện thử nghiệm nhận dạng virus Rota

Định typ G: PCR vòng 1			Định typ G: PCR vòng 2		
STT	Thành phần	Thể tích (µl)	STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	dH ₂ O	32,5 µl	1	dH ₂ O	33,25 µl
2	10X buffer	5 µl	2	10X buffer	5 µl
3	DMSO	3,5 µl	3	DMSO	3.5 µl
4	5 mM dNTPs	2 µl	4	5mM dNTPs	2 µl
5	100 ng/µl VP7F	1 µl	5	100 ng/µl VP7R	1 µl
6	100 ng/µl VP7R	1 µl	6	100 ng/µl G1	4 µlv
Tổng		45 µl	7	Taq ADN polymerase	0,25 µl
Trộn đều, bổ sung 5 µl dsARN ↓ Ủ 97°C, 3 phút ↓ Ủ trên đá 2 phút ↓ Bổ sung 0,5 µl (5,5 U) Reverse transcriptase (RT) ↓ 0,25 µl (2,5 U) Taq ADN polymerase			Tổng		49 µl
			Trộn đều, bổ sung 1 µl cADN		

Chu trình nhiệt: 42°C - 60 phút → 1 chu kỳ 94°C - 1 phút 42°C - 2 phút } 30 chu kỳ 68°C - 1 phút 68°C - 7 phút → 1 chu kỳ Giữ ở 4°C			Chu trình nhiệt: 94°C - 2 phút → 1 chu kỳ 94°C - 1 phút 42°C - 2 phút } 30 chu kỳ 68°C - 1 phút 68°C - 7 phút → 1 chu kỳ Giữ ở 4°C		
Định typ P: PCR vòng 1			Định typ P: PCR vòng 2		
STT	Thành phần	Thể tích (μl)	STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	dH ₂ O	32,5 μl	1	dH ₂ O	30,75 μl
2	10X buffer	5 μl	2	10X buffer	5 μl
3	DMSO	3,5 μl	3	5 mM dNTPs	2 μl
4	5 mM dNTPs	2 μl	4	100 ng/μl VP4R	1 μl
5	100 ng/μl VP4F	1 μl	5	100 ng/μl P8	6 μl
6	100 ng/μl VP4R	1 μl	6	Taq ADN polymerase	0,25 μl
Tổng		45 μl	Tổng		45 μl
Trộn đều, bổ sung 5 μl dsARN ↓ Ủ 97°C, 3 phút ↓ Ủ trên đá 2 phút ↓ Bổ sung 0,5 μl (5,5 U) Reverse transcriptase (RT) ↓ 0,25 μl (2,5 U) Taq ADN polymerase			Trộn đều, bổ sung 5 μl cADN		
Chu trình nhiệt: 42°C - 60 phút → 1 chu kỳ 94°C - 1 phút 50°C - 2 phút } 35 chu kỳ 72°C - 1 phút 72°C - 7 phút → 1 chu kỳ Giữ ở 4°C			Chu trình nhiệt: 94°C - 3 phút → 1 chu kỳ 94°C - 1 phút 50°C - 2 phút } 42 chu kỳ 72°C - 1 phút 72°C - 7 phút → 1 chu kỳ Giữ ở 4°C		

Thời gian thực hiện cho mỗi quy trình:

Sản phẩm PCR	Chu trình PCR hiện tại	Chu trình PCR nghiên cứu 1	Chu trình PCR nghiên cứu 2
G	G1: 187'; G2: 129'	125'	172'
P	P1: 127'; P2: 178'	172'	

2.5. Biến số nghiên cứu

Nghiên cứu được thiết lập theo 3 quy trình, mỗi quy trình lặp lại 3 lần. Kết quả phải thu được các sản phẩm PCR đạt được sản lượng và tính hợp lệ của quy trình thử nghiệm nhận dạng.

2.6. Đánh giá kết quả

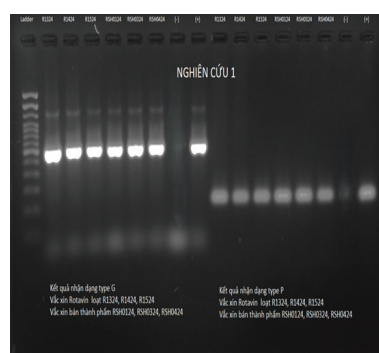
Kết quả của 3 lần lặp lại thử nghiệm phải giống nhau và các băng điện di có độ nét và sáng tối thiểu tương đương với băng điện di sử dụng phương pháp hiện có, không có băng phụ.

Kết quả nghiên cứu sẽ lựa chọn quy trình nào phù hợp nhất để đề xuất thực hiện thẩm định phương pháp trước khi đưa vào áp dụng thay thế phương pháp hiện có.

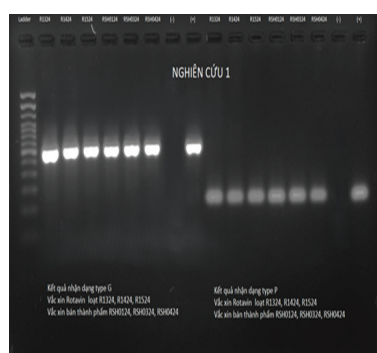
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhận dạng typ G1 và typ P[8] trong các mẫu vắc-xin

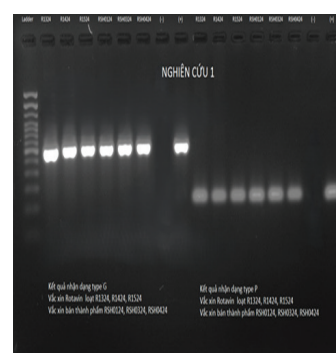
Tên mẫu	Kết quả điện di typ G1 và typ P[8]								
	Nghiên cứu 1			Nghiên cứu 2			Quy trình đang áp dụng		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3
RSH # 0124	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
RSH # 0324	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
RSH # 0424	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
R # 1324	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
R # 1424	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
R # 1524	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Chứng âm (H ₂ O không có Rnase)	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Chứng dương (GP Master seed lot 1. 13.17.3)	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt



TN lần 1

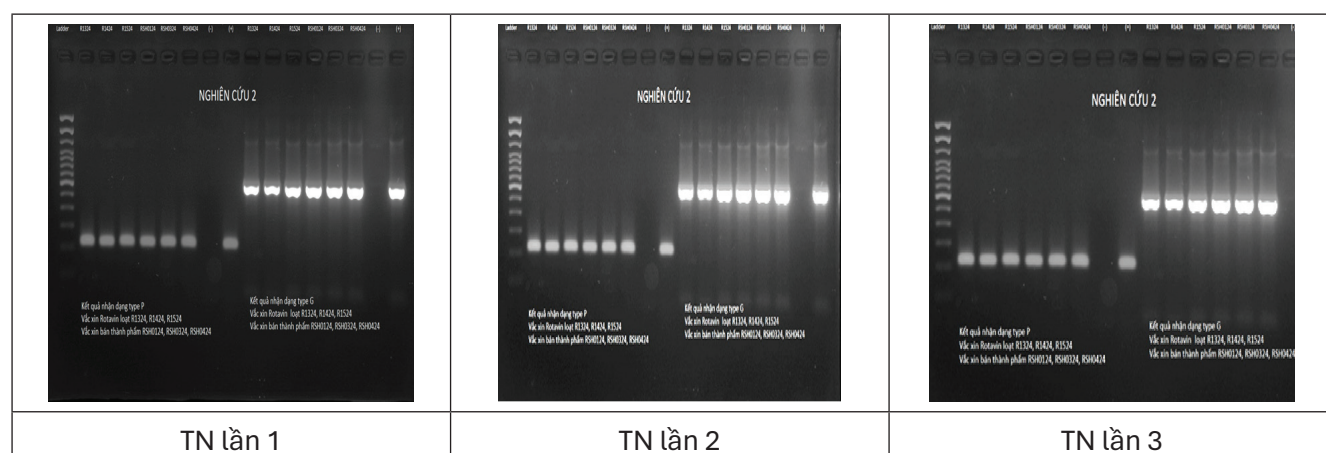


TN lần 2

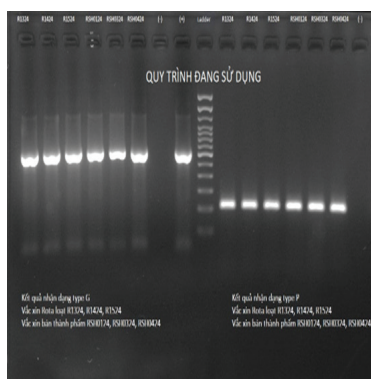


TN lần 3

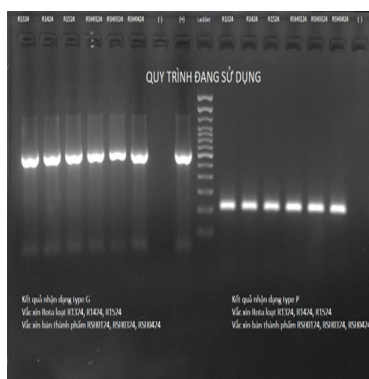
Hình 2. Hình ảnh điện di typ G1 và typ P[8] của nghiên cứu 1



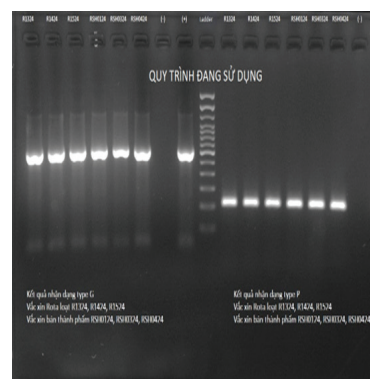
Hình 3. Hình ảnh điện di typ P[8] và typ G1 của nghiên cứu 2



TN lần 1



TN lần 2

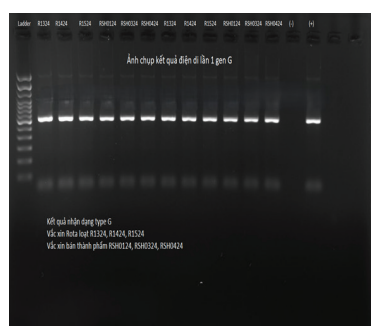


TN lần 3

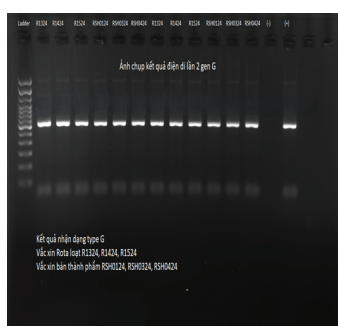
Hình 4. Hình ảnh điện di typ G1 và typ P[8] của quy trình đang áp dụng

Kết quả ở hình trên cho thấy cả hai nghiên cứu 1 và 2 sau 3 lần thử nghiệm các băng tương ứng với typ G và P đều xuất hiện băng sáng, rõ nét và tương đồng với các băng G và P của thử nghiệm theo quy trình đang áp dụng tại POLYVAC.

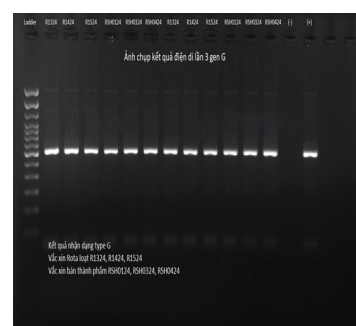
Với kết quả trên, chúng tôi lựa chọn quy trình của nghiên cứu 2 để đề xuất thực hiện thay đổi áp dụng cho thử nghiệm nhận dạng thay thế quy trình hiện đang áp dụng tại POLYVAC. Chúng tôi tiếp tục thực hiện tiếp 3 lần với quy trình lựa chọn này và có kết quả điện di typ G và P như hình 5 và 6.



TN lần 1

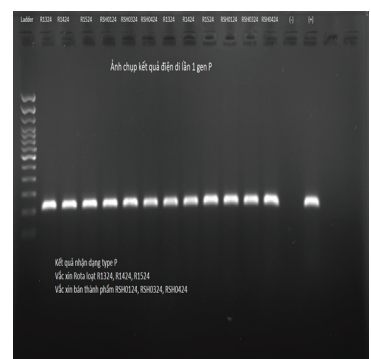


TN lần 2

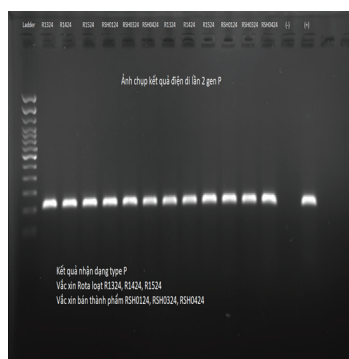


TN lần 3

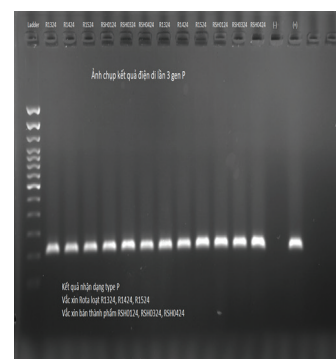
Hình 5. Hình ảnh chụp kết quả điện di 3 lần định typ G theo quy trình của nghiên cứu 2



TN lần 1



TN lần 2



TN lần 3

Hình 6. Hình ảnh chụp kết quả điện di 3 lần định typ P theo quy trình của nghiên cứu 2

Kết quả định typ G và P ở hình 5 và 6 theo quy trình của nghiên cứu 2 cho thấy các băng đều sáng, sắc nét và xuất hiện ở vị trí tương ứng với mẫu chứng dương G1 và P[8].

4. BÀN LUẬN

Kỹ thuật RT-PCR có giá trị chẩn đoán cao, cho phép xác định trực tiếp virus Rota trong mẫu nhờ khả năng khuếch đại sao chép ngược số lượng các đoạn ARN đặc hiệu trên hệ gen của virus. Phương pháp này đồng thời có thể định typ virus Rota lưu hành nhờ sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu [4]. Kỹ thuật RT-PCR thông thường gồm 2 bước, trong đó bước 1 sử dụng hỗn hợp enzyme phiên mã ngược để phiên mã các đoạn khuôn ARN của virus Rota sau khi được tách chiết sang ADN, sau đó sử dụng enzyme Taq polymerase để nhân bản các đoạn ADN này lên.

Bộ kit QIAGEN OneStep RT-PCR (100) được thiết kế cho chu trình RT-PCR một bước có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, thiết lập 1 ống nhanh chóng và dễ dàng, có hiệu quả với bất kỳ khuôn mẫu RNA nào. Bộ kit bao gồm các thành phần được tối ưu hóa cho phép cả phiên mã ngược và khuếch đại PCR diễn ra trong cùng một hỗn hợp phản ứng trong phản ứng “một bước”. Hỗn hợp enzyme được pha chế đặc biệt cho cả phiên mã ngược và PCR. Sự kết hợp độc đáo của Omniscript và Sensiscript Reverse Transcriptase, với ái lực cao đối với khuôn mẫu RNA, đảm bảo phiên mã hiệu quả và nhạy cảm cao với lượng ARN chỉ từ 1 pg. Sau phiên mã ngược, các phản ứng được đun nóng đến 95°C trong 15 phút để kích hoạt ADN polymerase và đồng thời bất hoạt các phiên mã ngược. Bước khởi động nóng này loại bỏ các sản phẩm khuếch đại không đặc hiệu như primer-dimer và giảm thiểu hiện tượng bọt nền, đảm bảo RT-PCR có độ nhạy cao [5].

Kết quả nghiên cứu cho thấy sản phẩm PCR sử dụng bộ kit QIAGEN OneStep RT-PCR (100) phù hợp cho thử nghiệm nhận dạng vắc-xin Rota và có kết quả tương đồng so với phương pháp nhận dạng đang áp dụng. Tuy nhiên với việc sử dụng kit QIAGEN OneStep RT-PCR 100 sẽ tiết kiệm được thời gian và giảm thiểu các thao tác so với phương pháp đang áp dụng.

5. KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình nhận dạng vắc-xin Rota sử dụng bộ kit QIAGEN OneStep RT-PCR 100 bao gồm: tách chiết mẫu - chạy chu trình RT-PCR sử dụng bộ kit QIAGEN OneStep RT-PCR 100 - điện di sản phẩm PCR - đọc và đánh giá kết quả. Quy trình nhận dạng này rất khả thi và phù hợp để áp dụng thay thế cho quy trình RT-PCR được áp dụng trước đây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đặng Đức Anh. Virus Rota: dịch tễ, miễn dịch và vắc-xin. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2010.
- [2] Nguyễn Văn Mẫn, Lê Thị Luân, Nguyễn Thúy Hương, Nguyễn Thị Quỳ. Giám sát dịch tễ học căn bệnh tiêu chảy do virus Rota tại Việt Nam từ 8/1998 đến tháng 12/2002. Tạp chí Y học thực hành, 2003, (469): 33-35.
- [3] Nguyễn Thúy Hương, Nguyễn Phương Thảo, Trần Thị Bích Hạnh, Nguyễn Đăng Hiền. Nghiên cứu tính ổn định của vắc-xin Rotavin công thức cải tiến sản xuất tại Việt Nam. Tạp chí Y học dự phòng, 2020, 30 (7): 18-25.
- [4] Phạm Thị Phương Thảo. Nghiên cứu, đánh giá các chủng virus Rota lưu hành tại Việt Nam từ năm 1998 đến nay. Luận văn thạc sĩ y học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 2010.
- [5] Quick-Start Protocol QIAGEN OneStep RT-PCR Kit.
- [6] World Health Organization. Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral). WHO Technical Report Series, 2007, No. 941, annex3, 2007.
- [7] World Health Organization. Thermostability of Vaccines. Global programme for vaccines and immunization. GPV/98.07, 1998.
- [8] World Health Organization. Rotavirus vaccines, 2013, 88 (5): 49-64.
- [9] World Health Organization. Manual of Rotavirus detection and characterization, methods, 2009, 47-99.