

ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ SINH PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT ADN VI KHUẨN MYCOBACTERIA TRÊN MẪU BỆNH PHẨM THU THẬP TỪ BỆNH NHÂN NHIỄM LAO

PHẠM THỊ HÀ GIANG ^(1,2), VŨ THỊ THƯƠNG ⁽²⁾, BÙI THỊ THANH NGÀ ⁽²⁾,
PHẠM VIỆT HÙNG ⁽²⁾, PHẠM XUÂN THẾ ANH ⁽³⁾, LÊ THỊ LAN ANH ⁽²⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lao là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm gây ra bởi vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis* - MTB) [1]. Trên toàn thế giới có khoảng 10 triệu người (dao động từ 9-11,1 triệu) được chẩn đoán mắc bệnh lao và 1,4 triệu ca tử vong do lao vào năm 2018 [1]. Việc phát hiện và chẩn đoán bệnh chủ yếu dựa vào các yếu tố lâm sàng và cận lâm sàng như nhuộm soi đờm, hay nuôi cấy tìm vi khuẩn lao [2]. Vi khuẩn lao và vi khuẩn lao không điển hình thuộc nhóm Mycobacteria, có thể gây bệnh cho người, vật nuôi và động vật hoang dã [3, 4].

Các kỹ thuật vi sinh truyền thống như nuôi cấy trên môi trường Lowenstein - Jensen, Middlebrook 7H10/7H11 được coi là tiêu chuẩn vàng để phát hiện Mycobacteria [2,8], tuy nhiên thời gian nuôi có thể kéo dài tới 8 tuần [2,9]. Trong khi đó, việc chẩn đoán sớm vi khuẩn lao trên bệnh phẩm lâm sàng, chủ yếu là đờm, là vô cùng quan trọng để đưa ra phác đồ điều trị phù hợp [2,4,8]. Chính vì vậy các kỹ thuật sinh học phân tử như khuếch đại axit nucleic như Real-time PCR ngày càng được áp dụng rộng rãi, để phục vụ chẩn đoán sớm và chính xác vi khuẩn lao. Tuy nhiên, độ nhạy và độ đặc hiệu của Realtime PCR phụ thuộc vào chất lượng ADN sau quá trình tách chiết [3, 10]. Không giống như các vi khuẩn khác, thành tế bào Mycobacteria có cấu trúc phức tạp, giàu axit mycolic và các mycolates, ảnh hưởng lớn đến quá trình ly giải thành tế bào vi khuẩn để giải phóng ADN. Ngoài ra, các mẫu bệnh phẩm đường hô hấp chứa nhiều chất ức chế phản ứng khuếch đại ADN vi khuẩn, cần xử lý khử tạp loại nhiễm [3]. Các tạp chất và lượng tế bào lớn trong bệnh phẩm hô hấp ảnh hưởng lớn đến độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp PCR nói chung. Theo nghiên cứu của Ramya Barani và cs, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp PCR có thể dao động rất lớn từ 11 đến 81% [10]. Để tăng cường hiệu quả xử lý bệnh phẩm cho tách chiết ADN, các phòng xét nghiệm cũng bổ sung một số phương pháp khử tạp, khử nhày bệnh phẩm, nhất là bệnh phẩm đờm [11]. Mặt khác, bệnh lao thường hoành hành ở các nước đang phát triển, có hạn chế về nguồn lực, do đó cũng cần thiết nghiên cứu các phương pháp tách chiết ADN đơn giản, chi phí thấp phục vụ cho xét nghiệm trên diện rộng. Gần đây, Dilhari A công bố phương pháp salting-out dựa trên các hóa chất cơ bản như Tris, SDS, NaCl, proteinase K có khả năng tách ADN vi khuẩn từ mẫu lâm sàng với hiệu quả nhất định, phù hợp với điều kiện các nước đang phát triển [12]. Ngoài ra, vi khuẩn lao là đối tượng gây bệnh nguy hiểm, lây lan qua đường hô hấp, việc xử lý mẫu cũng cần chú ý giảm thiểu nguy cơ cho người thực hiện kỹ thuật chuyên môn. Một số tác giả đã đề xuất phương pháp xử lý nhiệt đơn giản nhằm bất hoạt vi khuẩn lao, mà vẫn đảm bảo hiệu quả tách chiết ADN/ARN cho các kỹ thuật sinh học phân tử chuyên sâu [13, 14].

Hiện nay, trong điều kiện Việt Nam, các bộ sinh phẩm thương mại thường được dùng để tách chiết ADN cho PCR, Real-time PCR phát hiện vi khuẩn lao. Việc khảo sát hiệu quả của các bộ sinh phẩm sẵn có tại Việt Nam còn ít được đề cập, mặc dù trên thế giới đã có nghiên cứu tương tự [10, 15].

Từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mô tả hiệu quả của phương pháp Salting - out kết hợp xử lý nhiệt mẫu bệnh phẩm lâm sàng trong tách chiết ADN từ vi khuẩn lao. Đồng thời mô tả hiệu quả của một số kit thương mại như G-Spin (Intron-Hàn Quốc), RIBO- sorb (Amplisens-Liên Bang Nga), ADN/RNA Prep (Sacace-Ý).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này thuộc đề tài nghiên cứu khoa học cấp trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga “Nghiên cứu, chế tạo bộ kit Multiplex Realtime PCR định danh vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*) và vi khuẩn lao không điển hình (*Nontuberculous mycobacteria*)” được phê duyệt bởi Hội đồng đạo đức trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, số chứng nhận 2199/CN-HĐĐĐ.

2.2. Mẫu nghiên cứu

Vắc xin BCG, ống đông khô, hàm lượng 0,5mg và 15 mẫu bệnh phẩm đờm của bệnh nhân mắc lao phổi.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Tách chiết ADN

Trước khi tiến hành tách chiết ADN, 15 mẫu đờm được xử lý bằng cách ủ 80°C/20 phút trong bể ổn nhiệt để bất hoạt vi khuẩn lao, theo quy trình tham khảo của Doig C, Sabiti W [13, 14]. Vắc xin BCG được bổ sung 1ml nước muối sinh lý, sau đó pha loãng theo chuỗi tỷ lệ 1 : 10, để đạt được một dải nồng độ : 5×10^{-2} mg/ml ; 5×10^{-3} mg/ml ; 5×10^{-4} mg/ml, 5×10^{-5} mg/ml.

- Tóm tắt quy trình tách chiết ADN bằng kit thương mại DNA/RNA Prep (Sacace - Ý) ly giải 100 µl bệnh phẩm, kèm theo 10µl IC và hóa chất trong bộ kit ở nhiệt độ 65°C trong 5 phút. Sau đó tiến hành các bước xử lý, kết tủa và rửa theo quy trình của bộ kit, cuối cùng thu hồi bằng 50 µl dung dịch đệm. Bảo quản ADN tách chiết ở nhiệt độ -20°C.

- Tóm tắt quy trình tách chiết DNA bằng bộ kit DNA sorb-B (Amplisens - Nga): ly giải 100 µl bệnh phẩm với hóa chất trong bộ kit ở nhiệt độ 65°C trong 5 phút. Sau đó tiến hành các bước xử lý, kết tủa và rửa theo quy trình của bộ kit, cuối cùng thu hồi bằng 50 µl dung dịch đệm. Bảo quản ADN tách chiết ở nhiệt độ -20°C.

- Tóm tắt quy trình tách chiết ADN bằng kit G-Spin (Intron - Hàn Quốc) ly giải 200 µl bệnh phẩm với hóa chất trong bộ kit ở nhiệt độ 65°C trong 10 phút. Sau đó tiến hành các bước xử lý, chuyển lên cột hấp phụ và rửa theo quy trình của bộ kit, cuối cùng thu hồi bằng 50 µl dung dịch đệm. Bảo quản ADN tách chiết ở nhiệt độ -20°C.

- Quy trình tách chiết ADN bằng phương pháp Salting-out: trộn 200 µl mẫu bệnh phẩm với 600 µl đệm TNES (10 mM Tris-HCl pH = 7,5, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% SDS), 15 µl Protein K. Đảo ngược ống 10 lần, ủ 55°C trong 20 phút, ly tâm nhanh 7-10 giây. Bổ sung 230 µl NaCl 5M, vortex 20 giây, ly tâm 13000 vòng/ 5 phút. Hút 500 µl dung dịch nổi ra ống Eppendorf mới, thêm vào 1ml cồn tuyệt đối lạnh, lắc đều, để trong nước đá 15 phút. Ly tâm 12000 vòng/ 10 phút, đổ bỏ dịch nổi, giữ lại cặn. Rửa bằng 1ml cồn 70°C, ly tâm 12000 vòng/ 3 phút. Lặp lại bước rửa 2 lần. Đổ bỏ dịch nổi, để 5 phút trong block nhiệt 50°C. Hòa tan bằng 50 µl TE, bảo quản ở -20°C.

2.3.2. Phương pháp xét nghiệm vi khuẩn lao từ các mẫu đã tách chiết bằng kit MTB-Real TM (Sacace - Ý).

Thể tích phản ứng Realtime PCR là 25 µl gồm 10 µl PCR-mix; 1,5 µl PCR-buffer Flu; 0,5 µl TaqF DNA polymerase; 0,5 µl UDG enzyme và 5 µl ADN đã tách chiết. Chu trình nhiệt của phản ứng Realtime PCR được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Chu trình nhiệt phản ứng Realtime PCR

TT	Tên	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ	Kênh đọc tín hiệu huỳnh quang
1	Biến tính	95	15 phút	1	
2	Vòng 1	95	15 giây	5	
		65	30 giây		
		72	15 giây		
3	Vòng 2	95	15 giây	40	FAM & JOE
		65	30 giây		
		72	15 giây		

Đọc kết quả: vi khuẩn lao đọc trên kênh FAM, nội chứng đọc trên kênh JOE. Phản ứng đạt tiêu chuẩn khi chứng âm có giá trị Ct trên kênh FAM âm tính và trên kênh JOE < 36, chứng dương có giá trị Ct trên kênh FAM < 36 và trên kênh JOE < 34. Một mẫu xét nghiệm âm tính khi Ct trên kênh FAM âm tính và trên kênh JOE ≤ 38, một mẫu xét nghiệm dương tính khi Ct trên kênh FAM ≤ 38 và trên kênh JOE ≤ 38.

2.3.3. Phương pháp PCR nhân gene 16S của vi khuẩn lao

Thể tích phản ứng PCR là 10 µl gồm 5 µl 2X PCR Mastermix Solution (i-Taq) - LiliF, 0,5 µl Primer 16sRNA-R1, 0,5 µl Primer 16sRNA-F1, 3 µl distilled water và 1 µl ADN đã tách chiết.

Chu trình nhiệt: 94°C - 3 phút, (94°C - 20 giây, 67°C - 30 giây, 72°C - 90 giây) x 30 chu kỳ, 72°C - 7 phút, 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0.8% trong 30 phút, thể tích 10 µl sử dụng marker 1kb Thermo Scientific. Bộ mồi được tham khảo bởi Huard RC và cs [16] có cải tiến bổ sung, kích thước đoạn gen theo thiết kế là 1258 bp, chi tiết trình tự mồi như sau: Mồi xuôi 16sRNA_F1 (5' - ACTCGAGTGGCGAACGGGTG - 3'), mồi ngược 16sRNA_R1 (5' - TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA - 3').

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả đo dsADN trên máy Nano drop của bốn phương pháp

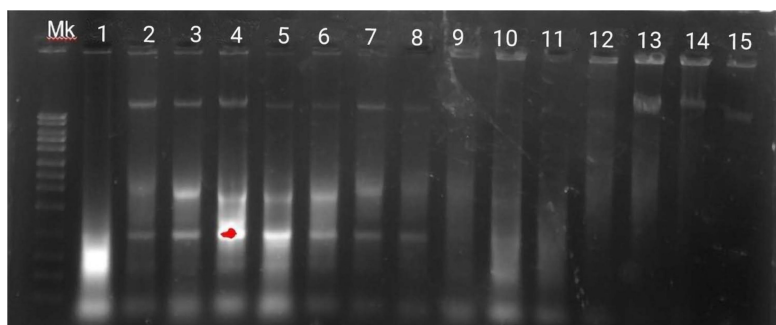
Dựa trên nồng độ đo được cho thấy lượng ADN thu hồi cao nhất ở DNA/RNA Prep, tiếp theo là Salting-out, G-Spin, thấp nhất là RIBO-prep. So sánh chỉ số A260/A280 thấy thứ tự về độ tinh sạch là RIBO-prep, G-Spin, Salting-out, cuối cùng là DNA/RNA Prep. Như vậy quy trình Salting-out có chất lượng ở mức khá về lượng ADN thu hồi, cũng như độ tinh sạch của sản phẩm, so với các kit thương mại được nghiên cứu. Kết quả chi tiết về nồng độ ADN và chỉ số A260/A280 như mô tả trong bảng 2.

Bảng 2. Giá trị trung bình đo dsADN tách từ 15 mẫu bệnh phẩm trên máy Nano drop

Phương pháp	Salting-out	G-spin	DNA/RNA Prep	RIBO-sorb
Nồng độ (ng/ μ l)	366,0	182,2	545,8	84,8
A260/A280	1,82	1,84	1,76	1,95
A260/A230	0,44	0,35	0,29	0,10

Kết quả trên được tính trung bình từ 15 mẫu bệnh phẩm, tuy không có thí nghiệm lặp lại trên từng mẫu để kiểm định sai số kỹ thuật, nhưng cũng thể hiện sự tái lập của phương pháp trên cùng một mô hình bệnh phẩm.

Các mẫu ADN tách chiết bằng phương pháp Salting-out được kiểm tra ADN tổng số bằng cách điện di trên gel agarose 0.8% trong 45 phút, thể tích mẫu ADN là 5 μ l. Kết quả điện di được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Kết quả điện di ADN tổng số sau tách chiết với phương pháp Salting-out

3.2. Kết quả Realtime PCR

Về Realtime PCR phát hiện *Mycobacterium tuberculosis* trên mẫu BCG cho thấy ở nồng độ 5×10^{-4} mg/ml thì tất cả các phương pháp đều phát hiện được (bảng 3). DNA/RNA Prep và RIBO-sorb phát hiện sâu hơn ở mức 5×10^{-5} mg/ml, còn Salting-out và G-Spin không phát hiện được. Về mức phát hiện thì DNA/RNA Prep có ưu thế hơn khi phát hiện được ở 5×10^{-5} mg/ml với Ct = 29 còn RIBO-sorb với Ct=32. Như vậy DNA/RNA Prep hiệu quả nhất với tách chiết ADN từ BCG, còn Salting-out tương đương với G-Spin.

Bảng 3. Kết quả Real-time PCR phát hiện *Mycobacterium tuberculosis* trên mẫu BCG

TT	Nồng độ BCG	Giá trị Ct của mỗi phương pháp			
		Salting-out	DNA/RNA Prep	RIBO-sorb	G-Spin
1	5×10^{-2} mg/ml	22	15	16	15
2	5×10^{-3} mg/ml	25	21	23	20
3	5×10^{-4} mg/ml	27	24	26	24
4	5×10^{-5} mg/ml	∞	29	32	∞

Kết quả cụ thể trên từng mẫu và giá trị Ct theo mỗi phương pháp tách chiết được trình bày ở bảng 4. Realtime PCR *Mycobacterium tuberculosis* (Sacace-Ý) phát hiện được 14/15 mẫu từ G-Spin, DNA/RNA Prep, và RIBO- sorb, còn Salting-out phát hiện được 13/15 mẫu. Về giá trị Ct trung bình của các phương pháp, thì Sacace ở mức thấp nhất (Ct=14), các phương pháp còn lại đều tương tự nhau (Ct=18). Trên phần kết quả định tính RIBO- sorb thất bại với mẫu UN14, trong khi ba phương pháp còn lại đều phát hiện dao động ở mức Ct = 20-24. Tuy phương pháp Salting-out không phát hiện được mẫu TT01, TT04 nhưng G-Spin và DNA/RNA Prep cũng chỉ phát hiện được ½ số mẫu này. Như vậy DNA/RNA Prep có hiệu quả nhất trên các mẫu lâm sàng được thử nghiệm, còn Salting - out có hạn chế hơn nhưng giá trị Ct cũng tương tự các sinh phẩm thương mại.

Bảng 4. Giá trị Ct của Real-time PCR phát hiện *Mycobacterium tuberculosis*

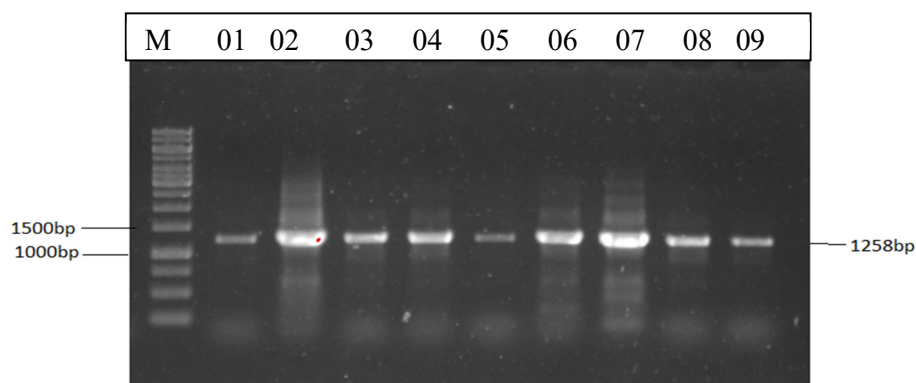
STT	Tên mẫu	Salting - out	G-Spin	DNA/RNA Prep	RIBO- sorb
1	UN06	13	15	11	11
2	UN10	16	12	9	13
3	UN14	24	20	20	0
4	UN15	16	13	11	13
5	UN24	20	17	18	19
6	UN25	16	21	12	22
7	TB01	15	15	12	12
8	TB02	16	15	13	15
9	TB03	16	21	12	14
10	TB05	26	22	19	19
11	TB06	20	19	13	17
12	TB10	24	18	15	18
13	HG09	23	19	19	25
14	TT01	0	0	20	31
15	TT04	0	35	0	32
Giá trị Ct trung bình		18	18	14	18

3.3. Kết quả PCR nhân gen 16S

Kết quả cho thấy 15/15 mẫu tách G-Spin và DNA/RNA Prep, 14/15 từ RIBO-sorb, 13/15 từ Salting-out được nhân gen 16S thành công, với sản phẩm PCR có kích thước 1258bp (hình 2). Như vậy, G-Spin và DNA/RNA Prep có hiệu quả trong tách chiết ADN mạch dài cho PCR. Với RIBO-sorb và Salting-out cho thấy kết quả này tương tự giữa PCR và Real-time PCR, và hai phương pháp đều không nhân được gene 16S từ mẫu UN10. Tuy nhiên, cũng không thể loại trừ trong mẫu có tồn tại các Mycobacteria khác ngoài *M. tuberculosis*, do đó có sự sai khác về kết quả giữa PCR-16S với Real-time PCR ở sinh phẩm G-Spin và DNA/RNA Prep. Chi tiết quá nhân gen 16S trên mẫu lâm sàng được mô tả ở bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Kết quả nhân gen 16S của Mycobacteria

TT	Tên mẫu	Salting-out	G-spin	DNA/RNA Prep	RIBO-sorb
1	UN06	+	+	+	+
2	UN10	-	+	+	-
3	UN14	+	+	+	+
4	UN15	+	+	+	+
5	UN24	+	+	+	+
6	UN25	+	+	+	+
7	TB01	+	+	+	+
8	TB02	+	+	+	+
9	TB03	+	+	+	+
10	TB05	+	+	+	+
11	TB06	+	+	+	+
12	TB10	+	+	+	+
13	HG09	+	+	+	+
14	TT01	-	+	+	+
15	TT04	+	+	+	+



Hình 2. Đại diện một số mẫu nhân gen 16S thành công

Chú thích: M: DNA marker, 01-09 là mẫu tách chiết bằng Salting-out.

4. KẾT LUẬN

Cả bốn phương pháp đều có thể tách chiết ADN thành công cho PCR và Realtime PCR phát hiện vi khuẩn lao. Trên các chỉ số về phát hiện BCG, PCR, và Realtime PCR thì DNA/RNA Prep có hiệu quả nhất. G-Spin và DNA/RNA Prep có hiệu quả tương đương trong việc nhân gene 16S. RIBO- sorb có ưu thế trội về độ tinh sạch, nhưng lượng ADN thu hồi cũng thấp nhất. Salting-out có hiệu quả thu hồi và độ tinh sạch đứng thứ hai, chỉ sau DNA/RNA Prep, mặc dù có hạn chế hơn về nhân gene vi khuẩn Mycobacteria, tuy nhiên có giá trị Ct tương tự như các phương pháp còn lại. Nghiên cứu cho thấy Salting-out có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong tương lai, nhưng cần có cải tiến để nâng cao hiệu suất phát hiện vi khuẩn lao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization, *Global Tuberculosis Report*, 2019.
2. Bộ Y tế Việt Nam, *Quyết định 4263/QĐ-BYT về việc ban hành Hướng dẫn chẩn đoán điều trị và dự phòng bệnh lao*, 2015.
3. Böddinghaus B., Wichelhaus T. A., Brade V., Bittner T., *Removal of PCR inhibitors by silica membranes: evaluating the Amplicor Mycobacterium tuberculosis kit*, J. Clin. Microbiol., 2001, **39**(10):3750-3752.
4. Larsson, L. O., Polverino, E., Hoefsloot, W., Codecasa, L. R., Diel, R., Jenkins, S. G., & Loebinger, M. R., *Pulmonary disease by non-tuberculous mycobacteria-clinical management, unmet needs and future perspectives*, Expert Rev. Respir. Med., 2017, **11**(12):977-989.
5. H. J. Huh, W. J. Koh, D. J. Song, C. S. Ki, and N. Y. Lee, *Evaluation of the cobas TaqMan MTB test for the detection of mycobacterium tuberculosis complex according to acid-fast-bacillus smear grades in respiratory specimens*, J. Clin. Microbiol., 2015, **53**(2):696-698.
6. R. Gopalaswamy, S. Shanmugam, R. Mondal, and S. Subbian, *Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - A comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment*, J. Biomed. Sci., 2020, **27**(1):1-17.
7. S. E. Strollo, J. Adjemian, M. K. Adjemian, and D. R. Prevots, *The burden of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in the United States*, Ann. Am. Thorac. Soc., 2015, **12**(10):1458.
8. Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademaro, M. F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., Von Reyn, C. F., Wallace, R. J., Jr, Winthrop, K., ATS, *An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*, 2007, Am. J. Respir. Crit. Care Med., **175**(4):367-416.
9. Bộ Y tế Việt Nam, *Quy trình thực hành chuẩn xét nghiệm vi khuẩn lao*, 2018.

10. I. N. De Almeida, W. Da Silva Carvalho, M. L. Rossetti, E. R. D. Costa, and S. S. De Miranda, *Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of Mycobacterium tuberculosis by means of PCR-IS6110: Preliminary study*, 2013, BMC Res. Notes, **6**(1):2-7.
11. Dippenaar A., Ismail N., Grobbelaar M., *Optimizing liquefaction and decontamination of sputum for DNA extraction from Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis (Edinb), 2022, **132**:102159.
12. Dilhari A., et al., *Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method*, AMB Express. 2017, **7**(1):179.
13. Doig C., Seagar A. L., Watt B., Forbes K. J., *The efficacy of the heat killing of Mycobacterium tuberculosis*, J. Clin. Pathol., 2002, **55**(10):778-779.
14. Sabiiti W., Azam K., Esmeraldo E., Bhatt N., Rachow A., Gillespie S. H., *Heat inactivation renders sputum safe and preserves Mycobacterium tuberculosis RNA for downstream molecular tests*, J. Clin. Microbiol., 2019, **57**(4):e01778-18.
15. Gülnur T., İsmail C., *Evaluation of three DNA extraction methods of Mycobacterium tuberculosis DNA from processed sputum for testing by three real systems*. Adv Biotech. & Micro., 2017, **2**(2):555581.
16. Huard R. C., Lazzarini L. C., Butler W. R., Van Soolingen D., Ho J. L., *PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions*, J. Clin. Microbiol., 2003, **41**(4):1637-1650.

SUMMARY

EVALUATION SOME DNA EXTRACTION KITS AND METHODS FOR MYCOBACTERIA FROM SPUTUMS OF TUBERCULOSIS INFECTED CASES

Tuberculosis is still burden in developing countries, including Viet Nam. Molecular techniques such as PCR, Real-time PCR play an important role in tuberculosis diagnostics. Specimens for tuberculosis testing are complex such as sputums, gastric fluids. DNA extraction are commonly performed by commercial kits, with little study about efficacy for tuberculosis testing assays. This study describes efficacy of three kits G-Spin (Intron-Korea), RIBO- sorb (Amplisens-Russia), DNA/RNA Prep (Sacace-Italy), and Salting-out method using basic reagents. Samples were 15 sputums collected from tuberculosis infected cases. As the result, recovered ADN was highest in DNA/RNA Prep, folowed by Salting-out, G-Spin, and last by RIBO - sorb. Oder of purification value was RIBO - sorb, G-Spin, Salting-out, and DNA/RNA Prep. About PCR for 16S gene, 15/15 samples

were succeed in G-Spin and DNA/RNA Prep, 14/15 from RIBO-prep, 13/15 from Salting-out. Real-time PCR *Mycobacterium tuberculosis* (Sacace-Italy) detected 14/15 samples from G-Spin, DNA/RNA Prep, and RIBO-sorb, but Salting-out detected 13/15 samples. Therefore, G-Spin and DNA/RNA Prep show higher efficacy in amplication of 16S gene and Real-time PCR assays for tuberculosis. RIBO- sorb has equal efficacy in Realtime PCR, but more priority in purification. Salting-out perform equally in recovery and purification with commercial kits, but limited in efficacy of Mycobacteria genome amplification.

Keywords: *DNA extraction, Mycobacteria, Salting-out, 16S, Realtime PCR, tách chiết ADN.*

Nhận bài ngày 12 tháng 8 năm 2022

Phản biện xong ngày 12 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 18 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ *Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

⁽²⁾ *Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga*

⁽³⁾ *Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

Liên hệ: Lê Thị Lan Anh

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Số 63, Nguyễn Văn Huyền - Nghĩa Đô - Cầu Giấy - Hà Nội

Điện thoại: 0963122607; Email: leanhbio@gmail.com