

## NGHIÊN CỨU TẠO ARMORED RNA LÀM CHỨNG DƯƠNG CHO REAL-TIME RT-PCR PHÁT HIỆN VIRUS MARBURG

Đến tòa soạn 24-08-2022

Nguyễn Thị Thu Hoài<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Nga<sup>1</sup>, Bùi Liêm Chính<sup>1</sup>, Phạm Thị Thu Hương<sup>1</sup>,  
Phùng Huyền Nhung<sup>1</sup>, Vương Thanh Hương<sup>1</sup>, Trần Khánh Ngọc<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thùy Linh<sup>2</sup>,  
Nguyễn Minh Anh<sup>2</sup>, Lê Quang Hòa\*<sup>2</sup>

1. Viện Khoa học và Công nghệ, Bộ Công an

2. Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

Email: hoa.lequang@hust.edu.vn

### SUMMARY

#### PREPARATION OF ARMORED RNA AS A POSITIVE CONTROL FOR REAL-TIME RT-PCR DETECTING MARBURG VIRUS

Marburg virus is the causative agent of a severe viral hemorrhagic fever in human with high mortality rate. This study aims to prepare virus-modified particles, based on MS2 bacteriophage, to be used as a positive control for the diagnosis of Marburg virus by Real-time RT-PCR. To this aim, the target region of Real-time RT-PCR assay was cloned into the pMC037-HisMS2\_PLP\_pac plasmid, generating expression vector pMS2-MARV-NP. MS2-like particles were then produced in *E. coli* BL21(DE3) and were purified by Ni-NTA affinity chromatography. Analysis by SDS-PAGE and agarose gel electrophoresis, transmission electron microscopy, and real-time RT-PCR showed that the His-tagged Armored RNA particles carrying the target region were successfully assembled and purified at high concentration ( $3.9 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L by RT-qPCR quantification) while DNA plasmid contamination was negligible. Most importantly, these armored RNA particles were found to be resistant to RNase A. These findings reveal the potential of Armored RNA technology for rapid preparation of ribonuclease-resistant viral RNA controls.

**Keywords:** Armored RNA, Marburg virus, MS2 bacteriophage, Real-time RT-PCR.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo tổ chức Y tế Thế giới (WHO), virus Marburg (MARV) là tác nhân gây bệnh tối nguy hiểm cho loài người với tỷ lệ tử vong cao đến 90% (Feldmann *et al.*, 1996; Leffel and Reed, 2004). Bệnh nhân nhiễm MARV sau thời gian ủ bệnh từ 2 đến 21 ngày sẽ xuất hiện triệu chứng sốt xuất huyết nghiêm trọng, sốc, suy đa tạng và tử vong. Từ khi được phát hiện lần đầu tại Marburg (Cộng hòa Liên bang Đức) vào năm 1967, MARV đã gây ra nhiều vụ dịch rải rác, điển hình là ở Angola trong các năm 2004-2005 làm 227 người chết trong tổng số

252 ca mắc được ghi nhận (Towner *et al.*, 2006). Trong hai năm gần đây, một số ca tử vong do MARV tại Guinea và Ghana cũng đã được ghi nhận (Koundouno *et al.*, 2022; Hussain, 2022). Dù là bệnh tối nguy hiểm nhưng hiện vẫn chưa có thuốc điều trị và vắc xin phòng MARV nào được lưu hành (Gene *et al.*, 2009; Suschak and Schmaljohn, 2019). Do vậy, cần có các xét nghiệm chính xác để phát hiện MARV trong các mẫu bệnh phẩm, môi trường nhằm ngăn ngừa bệnh lan truyền trong cộng đồng.

Hệ gen của MARV là một sợi RNA âm kích thước khoảng 19 kb chứa bảy khung đọc mở, mã hóa cho nucleoprotein (NP), protein VP24, VP30, VP35, VP40, glycoprotein và RNA-dependent RNA polymerase (Leffel and Reed, 2004). Các phương pháp thường quy để phát hiện MARV trong các mẫu bệnh phẩm hiện thường dựa trên kỹ thuật TaqMan Real-time RT-PCR với vùng gen đích nằm trong gen mã hóa NP. Để đảm bảo tính chính xác của quy trình xét nghiệm, cần phải có mẫu kiểm chứng dương để kiểm soát chất lượng của từng giai đoạn phân tích từ bước tách chiết RNA đến bước khuếch đại RT-PCR. Kiểm chứng dương dạng RNA phiên mã *in vitro* đã được sử dụng trong ít nhất 10 sinh phẩm RT-PCR được cấp phép bởi Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ để phát hiện virus Ebola (EBOV) vốn cùng nhóm với MARV (Jacob *et al.*, 2020). Tuy nhiên, các mẫu chứng dương RNA này chỉ giúp kiểm tra được bước khuếch đại RT-PCR và rất dễ bị phân hủy, đòi hỏi điều kiện bảo quản lạnh khắt khe. Trong nỗ lực tiêu chuẩn hóa các xét nghiệm sinh học phân tử phát hiện EBOV, Ủy ban chuyên gia về Tiêu chuẩn hóa Sinh học của WHO đã lựa chọn hai mẫu kiểm chứng dương dưới dạng lentivirus tái tổ hợp không nhân bản được là Ebola NP-VP35-GP-LLV và Ebola VP40-L-LLV (WHO, 2018). Dù có độ ổn định cao và có thể được sử dụng làm kiểm chứng dương cho toàn bộ quy trình phân tích kể cả bước tách chiết RNA nhưng quy trình sản xuất kiểm chứng dương loại này cần nuôi cấy tế bào động vật với các yêu cầu về trang thiết bị và kinh phí tốn kém.

Một dạng chứng dương khác hiện cũng đang được sử dụng trong một số sinh phẩm phát hiện EBOV là Armored RNA® (Asuragen) (Cepheid, 2015). Nhờ công nghệ đóng gói RNA đích trong cấu trúc thực khuẩn thể MS2, Armored RNA có khả năng bảo vệ RNA khỏi các nuclease, có tính bền nhiệt tốt, an toàn và đặc biệt là quá trình sản xuất trong *Escherichia coli* đơn giản hơn nhiều so với vector lentivirus (Cheng *et al.*, 2006; Mikel *et al.*, 2015). Cho đến thời điểm tháng 12 năm 2022, chưa có nghiên cứu hay sản phẩm thương mại nào được công bố liên quan đến chứng dương Armored RNA cho MARV. Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm tạo chế phẩm Armored RNA dùng làm kiểm chứng dương cho quy trình Real-time RT-PCR phát hiện MARV mới được xây dựng bởi nhóm nghiên cứu chúng tôi.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Vật liệu

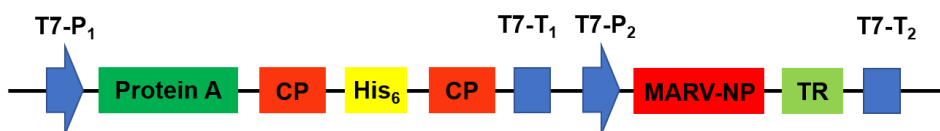
Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  và *E. coli* BL21(DE3) được sử dụng để tách dòng gen và tạo hạt Armored RNA. Vector pMC037-HisMS2\_PLP\_pac được chuyển giao từ Paul Freemont (Addgene plasmid #128233; <http://n2t.net/addgene:128233>; RRID: Addgene\_128233) (de Martín Garrido *et al.*, 2020). Đoạn trình tự vùng gen NP của MARV (MARV-NP) được lấy từ ngân hàng dữ liệu với mã số GenBank là MK271062.1 và được đặt tổng hợp từ công ty GenScript (Mỹ). Các oligonucleotide được sử dụng trong nghiên cứu này (Bảng 1) được cung cấp bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc).

Bảng 1. Trình tự các đoạn oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu.

STT	Tên oligo	Trình tự (5' - 3')	Mục đích sử dụng
1	Arm-1	CGACTCACTATAGGGAGACGGTGCTGAGTGA-TAGAGACTAGTGGA	Xây dựng cấu trúc
	Arm-2	CTCATGTTGAGACGTGACCTGAGCTAGCCA-AGACCATCATGC	
2	pMS2-F	AGGTCACGTCTCAACATGAGG	
4	pMS2-R	CGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAT	
5	pMS2-L-F	GTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGT	Sàng lọc và giải trình tự gen tổng hợp
6	BZF1	GAGCTAGCCAAGACCATCA	
7	MARV-N-F	ACATGAACAYCAGGAAATTCA	qRT-PCR và qPCR
8	MARV-N-R	GTTTTCAATTTCTGCAGCRA	
9	MARV-N-P	FAM-CCGYCTCAGCCAGAAACGAGA-TAMRA	

## 2.2. Xây dựng plasmid pMC037-HisMS2\_PLP\_pac mang trình tự đoạn gen đích MARV-NP

Cấu trúc vector biểu hiện hạt Armored RNA bao gồm: (i) operon mã hóa cho maturase (protein A) và dạng dimer của protein vỏ (CP) được nối với nhau bởi trình tự (His)<sub>6</sub> có chức năng giúp tinh sạch hạt thực khuẩn thể; (ii) trình tự vùng gen đích MARV-NP gắn với trình tự TR quy định quá trình đóng gói virus (Hình 1). Vector pMC037-HisMS2\_PLP\_pac được mở vòng bằng PCR với bộ môi pMS2-F và pMS2-R. Sau khi được khuếch đại bằng PCR sử dụng bộ môi Arm-1 và Arm-2, vùng



Hình 1. Cấu trúc vector biểu hiện pMS2-MARV-NP mang vùng gen đích NP của MARV.

Protein A: maturase; CP: protein vỏ; MARV-NP: vùng gen đích; TR: trình tự đóng gói; T7-P: T7 promoter, T7-T: T7 terminator.

## 2.3. Biểu hiện, tinh sạch và đặc tính hóa hạt Armored RNA mang gen MARV-NP

Dòng plasmid pMS2-MARV-NP có trình tự chính xác được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3). Sau quá trình sàng lọc, một khuẩn lạc được nuôi trong 100 mL môi trường LB có bổ sung 50 µg/mL kanamycin, ở 37 ± 1°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khi mật độ tế bào đạt đến giá trị OD<sub>600</sub> là 0,6-0,8, isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) được bổ sung vào canh trường tới nồng độ cuối là 0,5 mM. Canh trường tiếp tục được nuôi lắc ở 20 ± 1°C trong 14 giờ. Hạt virus tái tổ hợp được tinh sạch bằng HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với một số điều chỉnh như sau: Bezonase (Millipore) được bổ sung vào đệm phá tế bào để đạt tới nồng độ cuối 1000 U/mL, dịch phá tế bào được ủ ở nhiệt độ thường trong 3 giờ để Bezonase phân hủy axit nucleic của tế bào vật chủ *E. coli*, nồng độ NaCl trong dịch rửa cột được tăng lên 1 M để tăng hiệu quả loại bỏ dư lượng DNA. Kết quả tinh sạch được kiểm tra bằng cách điện di SDS-PAGE và điện di trên

gel đích MARV-NP được chèn vào vector đã được mở vòng ở trên tạo thành plasmid pMS2-MARV-NP bằng cách sử dụng NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5α và nuôi trên môi trường thạch LB có bổ sung kanamycin 50 µg/ml. Các khuẩn lạc riêng rẽ được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc sử dụng hai môi pMS2-L-F và BZF1. Các khuẩn lạc dương tính được nuôi lỏng, tách chiết plasmid và giải trình tự với môi pMS2-L-F để thu nhận dòng plasmid chính xác

gel agarose. Hình ảnh hạt virus trong dịch tinh sạch được chụp bằng kính hiển vi điện tử Hitachi FE-SEM S-4800 tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (Việt Nam).

## 2.4. Phương pháp tách chiết RNA từ hạt Armored

Mẫu dịch tinh sạch sau HisPur™ Ni-NTA Resin được pha loãng 10 lần trong nước nuclease-free và được ủ 95°C trong thời gian 5 phút để ly giải hạt virus (Cheng *et al.*, 2006). Đối với thử nghiệm xử lý với RNase A (xem mục 2.6), RNA từ hạt virus được tách chiết bằng RNeasy Mini Kit (QIAGEN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

## 2.5. Real-time RT-PCR đánh giá nồng độ RNA của MARV-NP

RNA của MARV-NP được định lượng bằng BioFact™ OneStep Multi-Star qRT-PCR Kit sử dụng tổ hợp môi mẫu dò MARV-N-F, MARV-N-R và MARV-N-P theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: 55°C-15 phút; 95°C-15 phút, 40 chu kỳ: (95°C-15 giây, 58°C-30 giây, 60°C-30 giây).

## 2.6. Real-time PCR đánh giá độ nhiễm tạp DNA của MARV-NP

DNA của MARV-NP trong dịch tinh sạch được định lượng bằng Real-time PCR sử dụng GoTaq™ G2 DNA Polymerase theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: 95°C-3 phút, 40 chu kỳ (95°C-15 giây, 58°C-30 giây, 60°C-30 giây).

## 2.7. Độ ổn định của các hạt Armored-MARV-NP đối với RNase A

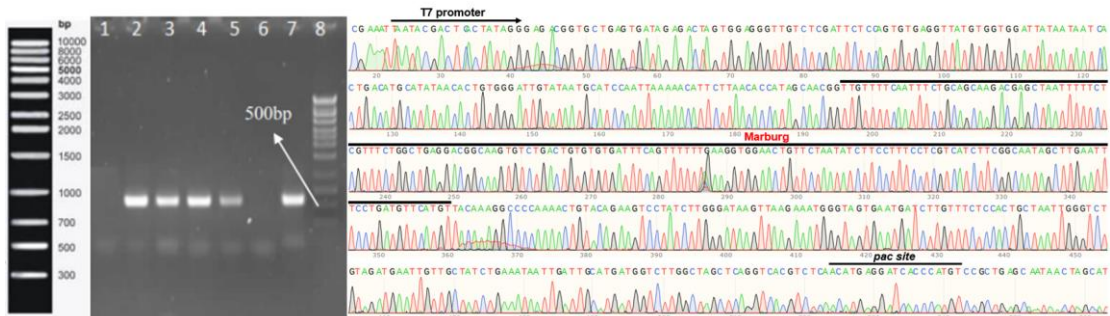
Độ ổn định của các hạt Armored-MARV-NP đối với RNase A được xác định bằng cách cho hạt Armored-MARV-NP và mẫu RNA tách chiết (không được bao gói) ủ với RNase A (QIAGEN) ở các liều lượng 0,5 U/μL, 0,05 U/μL và 0 U/μL (không bổ sung RNase A) ở 37°C trong 1 giờ. Các mẫu được tách chiết RNA bằng RNeasy Mini Kit (QIAGEN) theo

hướng dẫn của nhà sản xuất và được định lượng bằng Real-time RT-PCR như trên.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Xây dựng cấu trúc plasmid pMS2-MARV-NP

Trình tự tổng hợp nhân tạo của vùng gen đích MARV-NP được nối vào vector pMC037-HisMS2\_PLP\_pac nhờ kỹ thuật nối Gibson để tạo vector biểu hiện pMS2-MARV-NP. Sau khi biến nạp sản phẩm của phản ứng Gibson vào tế bào *E. coli* DH5α, các khuẩn lạc được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc. Kết quả sàng lọc cho thấy thấy 5/6 dòng khuẩn lạc dương tính với một băng sáng duy nhất có kích thước khoảng 500 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết (Hình 2A). Kết quả giải trình tự một dòng plasmid cho thấy đã thu nhận được vector biểu hiện pMS2-MARV-NP có trình tự chính xác so với thiết kế (Hình 2B).



Hình 2. Kết quả tạo cấu trúc pMS2-MARV-NP.

(A) Kết quả sàng lọc khuẩn lạc mang cấu trúc pMS2-MARV-NP bằng PCR. 1: mẫu âm tính, 2-7: dòng khuẩn lạc từ 1 đến 6, 8: HighRanger 1 kb DNA Ladder (Norgen).

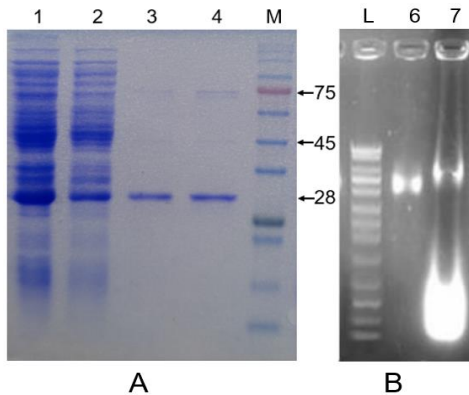
(B) Kết quả giải trình tự dòng plasmid pMS2-MARV-NP. Trình tự vùng gen đích được gạch trên.

### 3.2. Biểu hiện, tinh sạch và đặc tính hóa hạt Armored RNA mang gen MARV-NP

Để kiểm tra sự biểu hiện của các protein cấu thành nên hạt Armored RNA, các phân đoạn trong quá trình tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni-NTA được điện di biến tính trên gel SDS-PAGE. Kết quả điện di (Hình 3A) cho thấy trong các phân đoạn rửa giải (giếng 3 và giếng 4) chủ yếu thu được protein có kích thước khoảng 28 kDa, phù hợp với tính toán lý thuyết của protein vỏ CP ở dạng dimer gắn đuôi (His)<sub>6</sub>. Bên cạnh đó, phổ protein sau rửa giải còn xuất hiện vạch mờ ngay bên dưới vị trí 45

kDa, tương ứng với kích thước của maturase của thực khuẩn thể MS2. Ngoài ra, còn xuất hiện các vạch protein có kích thước xấp xỉ 75 kDa nhiều khả năng là các protein từ vật chủ *E. coli* chưa được loại bỏ hết. Các kết quả này cung cấp bằng chứng cho thấy hai protein cấu thành nên lớp vỏ của thực khuẩn thể MS2 là CP (180 phiên bản/virion) và maturase (1 phiên bản/virion) đều có mặt trong dịch rửa giải sau tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni-NTA với tỷ lệ hợp lý (de Martín Garrido *et al.*, 2020). Tiếp đó, kết quả điện di trên gel agarose (Hình 3B) cho thấy dịch rửa giải sau tinh sạch (giếng

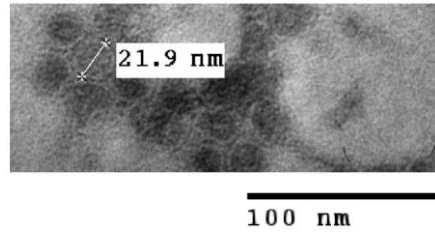
6) xuất hiện một băng sáng duy nhất, trong khi đó ở giếng sau xử lý với Benzonase và trước khi lên cột có xuất hiện một dải sáng (smear) ở bên dưới và một băng sáng có kích thước gần bằng băng sáng ở giếng sau tinh sạch. Các kết quả này cho thấy là dịch sau tinh sạch chỉ có một đoạn axit nucleic rất có thể chính là đoạn RNA được đóng gói trong hạt virus. Đồng thời, kết quả này cũng củng cố bằng chứng là đoạn RNA đã được đóng gói thành công nên không bị phân hủy bởi Benzonase trong khi enzym này lại phân giải rất hiệu quả DNA và RNA của vật chủ *E. coli* thể hiện qua việc dải smear có kích thước dưới 400 bp. Hình ảnh chụp dịch rửa giải bởi kính hiển vi điện tử cho thấy xuất hiện nhiều hạt virus hình cầu, đường kính  $21,8 \pm 0,7$  nm (Hình 4), phù hợp với hình dạng và kích thước của thực khuẩn thể MS2 (Cheng *et al.*, 2006). Toàn bộ các kết quả này cho thấy đã tạo và tinh sạch thành công hạt thực khuẩn thể MS2 tái tổ hợp từ *E. coli* BL21(DE3) mang cấu trúc pMS2-MARV-NP.



Hình 3. Kết quả biểu hiện cấu trúc Armored và tinh sạch sắc kí ái lực từ dịch tế bào chất *E. coli* BL21 (DE3).

(A) Kết quả điện di SDS-PAGE; giếng 1: dịch phá tế bào trước lên cột sắc ký, giếng 2: dịch không bám cột, giếng 3,4: dịch rửa giải tại phân đoạn 1, 2; giếng M: thang chuẩn protein GangNam-Stain™.

(B) Kết quả điện di trên gel agarose; L: 100 bp DNA Ladder (NEB); 6: Dịch rửa giải phân đoạn 1 và 2; 7: dịch phá tế bào trước khi lên cột sắc ký.



Hình 4. Ảnh chụp hạt thực khuẩn thể trong dịch sau tinh sạch bằng kính hiển vi điện tử truyền qua.

Để khẳng định hạt virus tạo ra có mang trình tự RNA đích của MARV-NP, nồng độ RNA trong dịch tinh sạch đã được đánh giá bằng phản ứng Real-time RT-PCR. Kết quả định lượng (Bảng 2) cho thấy, nồng độ RNA của MARV-NP trong dịch tách chiết là khoảng  $3,9 \times 10^7$  phiên bản/ $\mu$ L và nồng độ DNA nhiễm tạp (lượng DNA plasmid mang cấu trúc MARV-NP còn sót lại) là  $1,8 \times 10^1$  phiên bản/ $\mu$ L, không đáng kể so với nồng độ RNA thu nhận được. Kết quả này cho thấy đã tinh sạch thành công Armored RNA mang vùng gen đích MARV-NP với nồng độ là  $3,9 \times 10^8$  phiên bản/ $\mu$ L dịch rửa giải (do dịch được pha loãng 10 lần trước khi tách chiết và định lượng) với lượng DNA nhiễm tạp là rất nhỏ. Hiện nay, các chế phẩm thương mại Armored RNA thường được cung cấp ở khoảng nồng độ  $10^3$  phiên bản/ $\mu$ L (Mikel *et al.*, 2015). Do vậy, dịch tinh sạch này cũng đã được pha loãng về nồng độ  $10^3$  phiên bản/ $\mu$ L để thu nhận chế phẩm Armored RNA-MARV-NP. Nhận thấy với độ pha loãng  $3,9 \times 10^5$  lần, có thể coi lượng DNA nhiễm tạp đã bị pha loãng về nồng độ 0 phiên bản/ $\mu$ L chế phẩm.

Bảng 2. Kết quả đánh giá nồng độ hạt Armored mang vùng gen RNA đích và độ nhiễm tạp DNA bằng Real-time RT-PCR và Real-time PCR.

	C <sub>q</sub> trung bình ± Độ lệch chuẩn	Nồng độ ± Độ lệch chuẩn (phiên bản/ $\mu$ L)
<b>Kết quả định lượng Real-time RT-PCR</b>	9,83 ± 0,06	$3,9 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^6$
<b>Kết quả định lượng Real-time PCR</b>	32,25 ± 0,45	$1,8 \times 10^1 \pm 0,6 \times 10^1$

### 3.3. Độ ổn định của hạt Armored RNA-MARV-NP đối với RNase A

Như đã đề cập ở trên, hạt Armored RNA-MARV-NP có khả năng kháng với hoạt tính của chế phẩm Benzonase, vốn là một loại endonuclease có khả năng phân hủy toàn bộ các dạng DNA và RNA. Trong nội dung nghiên cứu này, độ ổn định của chế phẩm Armored RNA-MARV-NP tiếp tục được đánh giá với RNase A vốn là một endoribonuclease phân cắt các phân tử RNA mạch đơn ở các gốc C và U. Kết quả phân tích (Bảng 3) cho thấy các giá trị Cq trung bình thu được ở các mẫu chế phẩm Armored RNA-MARV-NP khi không xử lý với RNase A hoặc khi xử lý với RNase A là không có sự khác biệt đáng kể. Trong khi đó, ở các mẫu RNA đã được tách chiết khi ủ với RNase A thì nồng độ suy giảm rõ rệt, xuống dưới ngưỡng định lượng (Cq tăng từ 8 đến 10 đơn vị). Điều này chứng tỏ RNA MARV-NP trong chế phẩm Armored RNA được tạo ra trong nghiên cứu này là bền với RNase A.

Bảng 3. Kết quả Real-time RT-PCR đánh giá độ ổn định của hạt Armored RNA đối với RNase A.

Xử lý	C <sub>q</sub> trung bình ± Độ lệch chuẩn
Armored + 0 U/μL RNase A	25,67 ± 0,19
Armored + 0,05 U/μL RNase A	26,13 ± 0,55
Armored + 0,5 U/μL RNase A	25,88 ± 0,63
RNA + 0 U/μL RNase A	25,77 ± 0,55
RNA + 0,05 U/μL RNase A	33,95 ± 1,01
RNA + 0,5 U/μL RNase A	35,88 ± 0,18

Hạn chế của nghiên cứu này là chưa đánh giá được độ bền của chế phẩm Armored RNA-MARV-NP trong các điều kiện bảo quản thực tế (bảo quản ở -20°C trong thời gian dài, ở điều

kiện làm việc từ 2-8 °C trong vài ngày, nhiều chu kỳ đông và tháo đông hay khi bảo quản trong mẫu máu, mẫu môi trường). Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm đánh giá tính bền của Armored RNA khi được bảo quản trong các điều kiện khác nhau. Điển hình là nồng độ hạt Armored-HIV không bị ảnh hưởng khi được bảo quản trong huyết thanh người ở 4°C trong 60 ngày, -20°C trong 180 ngày hoặc sau 5 lần đông và tháo đông (Pasloske *et al.*, 1998).

### 4. KẾT LUẬN

- Đã xây dựng thành công vector biểu hiện pMS2-MARV-NP mang vùng gen đích MARV-NP có trình tự chính xác so với thiết kế.

- Đã tạo và tinh sạch thành công hạt Armored RNA mang vùng gen đích MARV-NP từ đó tạo chế phẩm Armored RNA-MARV-NP với nồng độ 10<sup>3</sup> phiên bản/μL, không bị nhiễm tạp DNA.

- Hạt Armored RNA thu được có khả năng kháng lại tác dụng của RNase A.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cepheid. Xpert® Ebola assay – Instructions for use: for use under an Emergency Use Authorization (EUA) only. <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/Safety/EmergencySituations/UCM439578.pdf>. 2015.
2. Cheng Y, Niu J, Zhang Y, Huang J, Li Q. Preparation of His-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(10): 3557-3561.
3. de Martín Garrido N, Crone MA, Ramlal K, Simpson PA, Freemont PS, Aylett CHS. Bacteriophage MS2 displays unreported capsid variability assembling T = 4 and mixed capsids. *Mol Microbiol.* 2020; 113(1): 143-152.

4. Feldmann H, Klenk HD. Marburg and Ebola viruses. *Adv Virus Res.* 1996; 47:1-52.
5. Gene OG, Julia BE, Vanessa MR, Victoria WJ, Thomas GW, Lisa HE. Drug targets in infections with Ebola and Marburg viruses. *Infect Disord Drug Targets.* 2009; 9(2): 191-200.
6. Hussain Z. Ghana declares its first outbreak of Marburg virus disease after two deaths. *BMJ.* 2022; 378:o1797.
7. Jacob ST, Crozier I, Fischer WA 2nd, et al. Ebola virus disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2020; 6(1):13.
8. Koundouno FR, Kafetzopoulou LE, Faye M, et al. Detection of Marburg Virus Disease in Guinea. *N Engl J Med.* 2022; 386(26): 2528-2530.
9. Leffel EK, Reed DS. Marburg and Ebola viruses as aerosol threats. *Biosecur Bioterror.* 2004; 2(3): 186-191.
10. Mikel P, Vasickova P, Kralik P. Methods for Preparation of MS2 Phage-Like Particles and Their Utilization as Process Control Viruses in RT-PCR and qRT-PCR Detection of RNA Viruses From Food Matrices and Clinical Specimens. *Food Environ Virol.* 2015; 7(2): 96-111.
11. Pasloske BL, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, DuBois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(12): 3590-3594.
12. Suschak JJ, Schmaljohn CS. Vaccines against Ebola virus and Marburg virus: recent advances and promising candidates. *Hum Vaccin Immunother.* 2019; 15(10): 2359-2377.
13. Towner JS, Khristova ML, Sealy TK, et al. Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J Virol.* 2006; 80(13): 6497-6516.
14. WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization. 2018. vol. 71, no. 14.