

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT ADN  
THÂN TÓC BẰNG HẠT TỪ TÍNH: ỨNG DỤNG TRONG  
DẠNG CÁ THỂ**

**TỪ  
NHẬN**

*Triệu Tiến Sang\**; *Nguyễn Duy Bắc\**  
*Trần Văn Khoa\**; *Phạm Văn Thìn\** và *CS*

**TÓM TẮT**

Thân tóc người có thể là một bằng chứng pháp y quan trọng cho nhận dạng, nhưng phân tích ADN thậm chí cả ADN ty thể cũng gặp nhiều khó khăn. Hiện nay, có rất nhiều phương pháp tách chiết ADN từ thân tóc như dùng phenol/chloroform, dùng muối và dùng hạt nhựa Chelex nhưng các phương pháp này đều gặp những khó khăn về nồng độ và độ sạch ADN sau tách chiết, đặc biệt là một số chất gây ức chế phản ứng PCR. Do vậy, chúng tôi áp dụng phương pháp tách chiết ADN mới sử dụng hạt từ tính. Trình tự của 2 vùng siêu biến (HVS1, HVS2) của ADN ty thể từ nhiều mẫu tóc của 18 gia đình người Việt được phân tích và so sánh với nhau để xác định các điểm đa hình. Kết quả cho thấy đã tách chiết được ADN ty thể từ thân tóc với nồng độ và độ sạch cao. Trình tự của 2 vùng này có tính bảo thủ cao trong mỗi phả hệ cũng như tính đặc trưng đa hình giữa các phả hệ. Điều này bổ sung cơ sở khoa học cho xét nghiệm xác định huyết thống và giám định pháp y dựa trên gen ty thể tách từ mẫu thân tóc.

\* Từ khoá: Tách chiết ADN; Hạt từ tính.

**RESEARCH ON IMPROVING DNA EXTRACTION METHOD FROM HAIR  
SHAFTS BY USING MAGNETIC PARTICLES: APPLICATION IN INDIVIDUAL  
IDENTIFICATION**

**SUMMARY**

*Human hair shafts can be important forensic evidence for identification, but DNA typing, even of mitochondrial DNA (mtDNA), presented certain difficulties. At present, DNA extraction methods from hair shafts, such as the phenol/chloroform method, NaI treatment method, and Chelex method have some difficulties about concentration of DNA after extraction, purification of extracted DNA, especially some materials inhibitor PCR. Therefore, we applied new extraction DNA method by magnetic particles. The sequences of the hypervariable region 1 and 2 (HVS1, HVS2) of the mitochondrial DNA control region from multiple hair shafts from 18 Vietnamese pedigrees were analysed and compared each others to determine polymorphisms. The results showed that we succeed in DNA extraction with high concentration and purification. Sequences of HVS1 and HVS2 are conservative in each pedigree and have specific polymorphism among pedigrees. These results complement scientific foundations for maternal and forensic testing and based on mt DNA.*

\* Key words: DNA extraction; Magnetic particles.

\* Học viện Quân y

*Phản biện khoa học: PGS. TS. Hoàng Văn Lương*

**ĐẶT VẤN ĐỀ**

Trong điều tra hình sự, tóc rụng không còn chân là một trong những loại mẫu vật sinh vật phổ biến nhất. Mẫu thân tóc không còn chứa ADN nhân nhưng có một số lượng rất lớn ADN ty thể (mtADN) cho phép có thể phân tích chỉ cần dùng một thân tóc. MtADN bộc lộ rất nhiều đặc điểm đa hình về trình tự nucleotide giữa các cá thể, tập trung chủ yếu vào vùng siêu biến không mã hóa nằm trong vùng D-loop, vùng HVS1 và HVS2. Tuy nhiên,

tách chiết ADN với nồng độ thấp ở mẫu thân tóc gặp rất nhiều khó khăn mà các phương pháp trước đây không thể loại bỏ một số chất có trong thân tóc gây ức chế phản ứng PCR [9]. Xuất phát từ yêu cầu thực tiễn đó, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm cải tiến quy trình tách chiết ADN ty thể từ thân tóc hạt từ tính, phân tích và phát hiện các đặc điểm đa hình có giá trị trong nhận dạng cá thể và xác định huyết thống.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu.

Lấy mẫu tóc từ các thành viên của 18 gia đình ở khu vực Hà Đông. Cắt bỏ chân các mẫu tóc, thu lấy phần thân tóc. Cắt thân tóc thành từng đoạn ngắn khoảng 0,5 - 1 cm.

### 2. Hóa chất và thiết bị sử dụng.

- Hoá chất sử dụng hạt từ tính mang điện tích, DTT, proteinase K, nước tinh khiết, dNTP, primer, POP4....

- Thiết bị: bể nước ổn nhiệt, microtip, eppendofp, block nhiệt, máy PCR, máy sequencing 3130XL, phần mềm phân tích trình tự BioEdit...

- Dung dịch tách chiết:

Dung dịch đệm: DTT: proteinase K (8:1:1) trộn đều và giữ trong đá.

Dung dịch rửa còn 96 - 100% và còn 70%.

### 3. Phương pháp nghiên cứu.

\* Phương pháp tách chiết bằng hạt từ tính:

*Nguyên tắc:* các hạt từ được bọc silica mang điện dương, mtADN mang điện âm được gắn vào hạt từ. Nhiệt độ sẽ làm cho hạt từ và mtADN tách ra và cuối cùng sẽ tách được mtADN.

\* Quy trình tách chiết:

Bước 1: cắt nhỏ mẫu, cho vào ống li tâm; bước 2: thêm lysis buffer, ủ 70<sup>0</sup>C trong 30 phút; bước 3: chuyển hỗn dịch vào cột lọc; bước 4: thêm resin, vortex, ủ nhiệt độ phòng; bước 5: vortex, đặt vào giá; bước 6: rửa bằng wash buffer; Bước 7: để khô trong không khí; bước 8: ủ 65<sup>0</sup>C, 5 phút; bước 9: vortex, đặt vào giá; bước 10: thu dung dịch ADN.

\* Phương pháp PCR:

Sau khi tách chiết ADN ty thể, định lượng bằng máy NanoDrop, tiến hành phản ứng PCR cùng với 3 mồi trên hai vùng siêu biến HVS1 và HVS2 của ADN ty thể.

Mồi 1: F 5'- CTCCACCATTAGCACCCAAAGC - 3'

R 5'- AGCGGTTGTTGATGGGTGAGTC - 3'

Mồi 2: F 5'- CACCCATCAACAACCGCTAT - 3'

R 5' - TGATGTGGATTGGGTTTTTATGTA - 3'

Mồi 3: F 5' -AGCCATTTACCGTACATAGCACA - 3'

R 5'- TGATTTACGGAGGATGGTG - 3'

\* Chu trình nhiệt:

1 chu kỳ	94 <sup>0</sup> C x 5 phút
30 chu kỳ	94 <sup>0</sup> C x 1 phút

	55°C x 1 phút
	72°C x 1 phút
1 chu kỳ	72°C x 10 phút
1 chu kỳ	4°C x ∞

Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose, phân tích và xác định độ đặc hiệu của phản ứng PCR.

\* Phương pháp đọc trình tự:

Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit tinh sạch của hãng Promega (Wizard® SV Genomic DNA Purification System, Promega), tiến hành phản ứng PCR sequencing bằng bộ kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (ABI, Mỹ). Cuối cùng phân tích trình tự mẫu đã chạy PCR sequencing trên máy đọc trình tự động ABI 3130XL. Phản ứng PCR sequencing với chu trình nhiệt và thành phần phản ứng:

Thành phần phản ứng PCR sequencing:

1 chu kỳ	96°C x 1 phút
25 chu kỳ	96°C x 10 giây
	50°C x 5 giây
	60°C x 4 phút
1 chu kỳ	4°C x ∞

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR sequencing:

Terminator Ready Reaction Mix	8,0 µl
Mẫu	2 µl
Môi	2,5 µl
Nước	7,5 µl
Tổng thể tích	20 µl

\* Phân tích số liệu: bằng phần mềm Sequencing Analysis, Cluxtal, BioEidt...

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

### 1. Kết quả tách chiết ADN ty thể bằng hạt từ tính.

Bảng 1: Kết quả tách chiết ADN ty thể.

Mẫu	ADN (ng/ul)	A260/A280	Mẫu	ADN (ng/ul)	ADN (ng/ul)
1	12,42	1,49	8	12,51	2,13
2	25,62	1,37	9	14,1	2,04
3	11,49	2,35	10	20,98	2,1
4	9,33	2,72	11	15,32	2,0

5	7,90	2,59	12	10,06	3,72
6	6,24	3,29	13	11,58	1,87
7	19,6	2,03	14	10,86	1,93

\*Nồng độ và độ tinh sạch đạt tiêu chuẩn cho nghiên cứu tiếp theo. So với một số phương pháp tách chiết trước đây, phương pháp này có ưu điểm: nhanh, đơn giản, hiệu quả tách chiết cao, tiết kiệm thời gian và chi phí thấp.

Từ hình ảnh kết quả điện di ta nhận thấy rằng băng vạch của sản phẩm PCR rất rõ nét và kích thước khoảng 239 bp, tương ứng với đoạn HVS1. Kết quả này khẳng định chúng tôi đã tách chiết ADN ty thể thành công từ thân tóc. Đồng thời băng sáng rõ nét cũng cho thấy nồng độ ADN tách chiết khá cao, chu trình nhiệt và thành phần phản ứng đã được tối ưu.

## 2. Kết quả phân tích trình tự vùng HVS1 và HVS2.

Với sản phẩm PCR thu được có độ đặc hiệu cao, tiến hành phân tích trình tự nucleotide của 2 vùng siêu biến trên gen ty thể. Kết quả cho thấy đã đọc được trình tự toàn bộ 2 đoạn siêu biến HVS1 và HVS2.

Kết quả đọc trình tự đỉnh tương ứng với các nucleotide cho thấy sản phẩm PCR thu được có độ đặc hiệu và tinh sạch cao. Toàn bộ các mẫu đều đọc được trình tự bằng các môi sử dụng như trong phản ứng PCR (hình 2).

Tiến hành phân tích trình tự của các cá thể thu được bằng phần mềm BioEdit và Cluxtal.

Kết quả phân tích cho thấy, các thành viên trong mỗi gia đình có trình tự vùng gen siêu biến HVS1 và HVS2 giống nhau, không tìm thấy điểm sai khác nào giữa các thành viên trong mỗi gia đình, khẳng định tính bảo thủ của vùng gen HVS1 và HVS2 qua các thế hệ, phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây [5, 6, 7, 8].

Trong nghiên cứu so sánh trình tự đoạn D-loop ở các anh chị em ruột, từ cha mẹ và con cái của họ, Parsons và CS (1997) đã phát hiện trình tự của đoạn D-loop có tỷ lệ đột biến rất cao. Khi nghiên cứu hai cá thể có genome giống nhau, sau 33 thế hệ sẽ xảy ra sự khác nhau về hai đột biến. Như vậy, dựa trên cơ sở khoa học này có thể đánh giá được mối quan hệ gần gũi về mặt di truyền trong nghiên cứu di truyền quần thể [1, 2, 3, 4, 5].

Khi so sánh trình tự gen của các gia đình với với nhau, chúng tôi nhận thấy có một số điểm sai khác đặc trưng. Mỗi gia đình sai khác ở một vài vị trí nucleotide, thể hiện đa hình đặc trưng di truyền theo dòng mẹ của gen ty thể.

**Bảng 2:** Bảng thống kê những điểm sai khác khi phân tích trình tự cá thể giữa các gia đình khác nhau của mỗi 406 bp.

VỊ TRÍ	GIA ĐÌNH (GD) 1	GIA ĐÌNH 2	GIA ĐÌNH 4	GIA ĐÌNH 5	GIA ĐÌNH 6	GIA ĐÌNH 7	GIA ĐÌNH 8
34	A	A	A	A	G	A	A
40	G	G	G	G	G	C	G
42	G	G	G	G	G	A	G
58	T	T	T	T	T	C	T
60	T	T	A	T	T	T	T

**TẠP CHÍ Y - DƯỢC HỌC QUÂN SỰ SỐ 1-2010**

73	T	T	C	T	C	T	T
81	G	G	A	G	A	A	A
88	A	A	A	A	A	A	G
94	G	G	A	G	A	A	A
95	A	A	G	A	A	A	A
96	G	G	G	G	G	T	G

*Bảng 3:* Bảng thống kê những điểm sai khác khi phân tích trình tự cá thể giữa các gia đình khác nhau của mỗi 239 bp.

VỊ TRÍ	GD1	GD2	GD3	GD4	GD5	GD6	TTS	TTA
24	T	T	T	T	T	A	T	T
41	T	T	A	T	A	T	T	T
71	T	T	C	T	T	C	C	C
79	G	G	A	G	G	A	G	A
92	G	G	A	G	G	A	G	A
119	A	A	G	A	A	A	A	A
121	T	T	C	T	T	T	T	T

**Bảng 4:** Bảng thống kê những điểm sai khác khi phân tích trình tự cá thể giữa các gia đình khác nhau của mỗi 278 bp.

VỊ TRÍ	GĐ1	TTA	GĐ2	GĐ3	THX
30	A	C	G	C	A
68	A	T	A	C	A
98	C	T	T	G	T

Từ bảng 2, 3, 4 cho thấy, tổng cộng có 21 vị trí sai khác giữa các gia đình. Tính toán khi so sánh 2 gia đình với nhau, độ chính xác của xét nghiệm huyết thống là  $[1 - 1: (4^{21})] \times 100$  (khoảng 99,9999%).

### KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu phương pháp tách chiết ADN ty thể từ mẫu thân tóc của 18 gia đình, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Đã tách chiết thành công ADN ty thể từ thân tóc bằng phương pháp sử dụng hạt từ tính. Quy trình tách chiết đơn giản, hiệu quả bảo đảm thu được ADN có đủ nồng độ và độ sạch cho các phân tích tiếp theo.

- Đã phân tích trình tự đoạn gen HVS1 và HVS2 ở 18 phả hệ nghiên cứu. Kết quả cho thấy trình tự của 2 vùng này có tính bảo thủ cao trong mỗi phả hệ cũng như tính đặc trưng đa hình giữa các phả hệ. Điều này bổ sung cơ sở khoa học cho xét nghiệm xác định huyết thống dựa trên gen ty thể tách từ mẫu thân tóc.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brakez Z, Bosch E, Izaabel H et al. Human mitochondrial DNA sequence variation in the Moroccan population of the Souss area. *Ann Hum Biol.* 2001, 28, pp.295-307.
2. Chen YS, Torroni A, Excoffier L, Santachiara-Benerecetti AS, Wallace DC. Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all continent-specific haplogroups. *Am J Hum Genet.* 1995, 57, pp.133-149.
3. Graven L, Passarino G, Semino O et al. Evolutionary correlation between control region sequence and restriction polymorphisms in the mitochondrial genome of a large Senegalese Mandenka sample. *Mol Biol Evol.* 1995, 12, pp. 334-345.
4. Larruga JM, Díez F, Pinto FM, Flores C, González AM. Mitochondrial DNA characterization of European isolates: the Maragatos from Spain. *Eur J Hum Genet.* 2001, 9, pp.708-716.
5. Parsons T.J., Muniec D.S., Sullivan K., Woodyatt N., Alliston-Greiner R., Wilson M.R., Berry D.L., HollDNA K.L., Weedn V.W., Gill P., HollDNA M.M. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature Genetics.* 1997, 15, pp.363-368.
6. H. Pfeiffer, J. Huhne, C. Ortmann, K. Waterkamp, B. Brinkmann. Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts - success rates and sequence comparisons. *Int. J. Leg. Med.* 1999, 112, pp.287-290.
7. Rando JC, Pinto F, González AM et al. Mitochondrial DNA analysis of Northwest African populations reveals genetic exchanges with European, near Eastern, and Sub-Saharan populations. *Ann Hum Genet.* 1998, 62, pp.531-550.
8. Salas A, Comas D, Lareu M, Bertranpetit J, Carracedo A. MtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *Eur J Hum Genet.* 1998, 6, pp.365-375.
9. Takayanagi K., Asamura H., Tsukada K., Ota M., Saito S., Fukushima H. Investigation of DNA extraction from hair shafts. *International Congress Series.* 2003, Vol 1239, January, 6, pp.759-764.

