

TÁCH CHIẾT ADN TY THỂ TỪ THÂN TÓC BẰNG HẠT TỪ TÍNH

Triệu Tiến Sang; Trần Văn Khoa**

TÓM TẮT

ADN được tách chiết (có sử dụng hạt từ tính) từ mẫu thân tóc thuộc 14 gia đình. Sử dụng 3 cặp mồi nhân đoạn gen từ mẫu ADN thu được. Đã thành công nhân gen bằng phản ứng PCR với 40 mẫu ADN tách chiết được từ thân tóc. Kết quả này cho thấy việc tách chiết ADN thân tóc bằng phương pháp có sử dụng hạt từ tính cho phép đạt được mục tiêu.

* Từ khóa: ADN ty thể; Thân tóc; Hạt từ tính.

MITOCHONDRIAL DNA EXTRACTION FROM HAIR SHAFTS USING MAGNETIC PARTICLES

SUMMARY

DNA was extracted from hair shafts of 14 families by using magnetic particles. Three mitochondrial specific primer sets were used to obtain sequence information from the extracted DNA. The PCR amplification was successful from each of the 40 hair shaft samples investigated. The results demonstrated that extraction of DNA from hair shafts by using the method enables to get achievement.

* *Key words: mtDNA; Hair shafts; Magnetic particles.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành khoa học nhận dạng là một trong các ngành rất phát triển hiện nay. Để phục vụ việc nhận dạng cá thể, từ trước tới nay hầu hết thường sử dụng ADN nhân cho độ chính xác gần như tuyệt đối. Nhưng đối với các mẫu ADN bị phân huỷ nặng, việc phân tích ADN nhân khó hoặc không thể thực

hiện được. Trong những trường hợp đó, phân tích ADN ty thể là giải pháp được lựa chọn thay thế do ADN ty thể bền vững hơn ADN nhân [2, 4]. Tuy nhiên, khó khăn lớn nhất chính là ở khâu tách chiết ADN từ những mẫu có hàm lượng ADN thấp. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm *tách chiết ADN ty thể từ thân tóc phục vụ cho công tác nhận dạng cá thể và xác định huyết thống.*

* Học viện Quân y

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

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Mẫu thân tóc lấy từ các thành viên thuộc 14 gia đình khác nhau.

2. Hóa chất và thiết bị.

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

Thiết bị: bể nước ổn nhiệt, microtip, Eppendorf, block nhiệt, máy PCR...

Chuẩn bị dung dịch tách chiết: dung dịch đệm: DTT: proteinase K (8:1:1) trộn đều và giữ trong đá. Dung dịch rửa: cồn 96 - 100% và cồn 70%.

3. Phương pháp nghiên cứu.

** Phương pháp tách chiết ADN:*

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

- Quy trình tách chiết:

Bước 1: cắt phần thân tóc thành đoạn nhỏ, không có chân tóc, cho vào ống ly tâm.

Bước 2: thêm lysis buffer, ủ 70°C trong 30 phút.

Bước 3: chuyển hỗn dịch vào cột lọc.

Bước 4: thêm resin, quay ly tâm, ủ nhiệt độ phòng.

Bước 5: quay ly tâm, đặt vào giá từ.

Bước 6: rửa bằng wash buffer.

Bước 7: để khô trong không khí.

Bước 8: ủ 65°C trong 5 phút.

Bước 9: quay ly tâm, đặt vào giá từ.

Bước 10: thu dung dịch chứa ADN.

** Phương pháp PCR:*

Sau khi tách chiết ADN ty thể, định lượng bằng máy NanoDrop, sau đó tiến hành phản ứng PCR cùng với 3 cặp mồi trên 2 vùng siêu biến HVI và HVII của ADN ty thể [6].

Mồi 1: 5'CTCCACCATTAGCACCCAAAGC3'

R5'AGCGGTTGTTGATGGGTGAGTC3'

Mồi 2: 5'CACCCATCAACAACCGCTAT3'

R5'TGATGTGGATTGGGTTTTTATGTA3'

Mồi 3: 5'AGCCATTTACCGTACATAGCAC3'

R5'TGATTTACGGAGGATGGTG3'

Chu trình nhiệt:

1 chu kỳ: 94°C x 5 phút;

30 chu kỳ: 94°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. Tinh sạch sản phẩm PCR và dùng để chạy PCR sequencing, tiếp tục đem sản phẩm PCR sequencing đọc trình tự trên máy ABI 3130XL.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả tách chiết ADN ty thể.

Xác định hàm lượng và độ tinh sạch các mẫu ADN sau khi tách chiết bằng máy đo quang phổ Nano Drop.

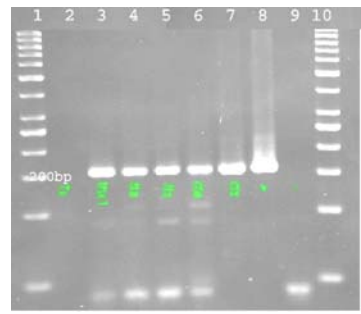
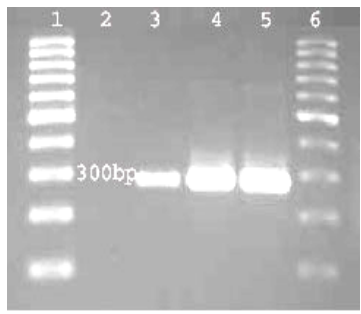
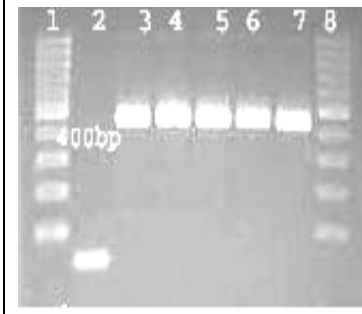
Bảng 1: Kết quả tách chiết ADN ty thể.

MẪU	ADN (ng/ul)	A260/A280	MẪU	ADN (ng/ul)	A260/A280
1	12,42	1,49	8	12,51	2,13
2	25,62	1,37	9	14,10	2,04
3	11,49	2,35	10	20,98	2,10
4	9,33	2,72	11	15,32	2,00
5	7,90	2,59	12	10,06	3,72
6	6,24	3,29	13	11,58	1,87
7	19,60	2,03	14	10,86	1,93

Hàm lượng và độ tinh sạch ADN tương đương với kết quả khi sử dụng các phương pháp khác và đạt tiêu chuẩn để phân tích tiếp [1, 3, 5, 6].

2. Kết quả nhân gen và điện di sản phẩm PCR.

Với 3 cặp mồi được sử dụng nhân gen thuộc 2 vùng HVI và HVII, đều thu được kết quả tốt

		
<p><i>Hình 1:</i> Hình ảnh điện di sản phẩm 239 bp/HVII. 1, 10: marker. 2, 9: chứng âm nước cất. 3 - 8: băng sản phẩm ADN kích thước 239 bp.</p>	<p><i>Hình 2:</i> Hình ảnh điện di sản phẩm 278 bp/HVI. 1, 6: marker. 2: chứng âm nước cất. 3 - 5: băng sản phẩm ADN kích thước 239 bp.</p>	<p><i>Hình 3:</i> Hình ảnh điện di sản phẩm 406 bp/HVII. 1, 8: marker. 2: chứng âm nước cất. 3 - 7: băng sản phẩm ADN kích thước 406 bp.</p>

Kết quả nhân gen và điện di cho thấy: băng vạch đặc hiệu của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước sản phẩm của các cặp mồi đã chọn.

KẾT LUẬN

Bằng việc sử dụng hạt từ tính cho tách chiết và tinh sạch ADN ty thể từ thân tóc áp dụng cho 40 mẫu, kiểm tra kết quả tách chiết và tinh sạch cũng như kết quả nhân gen và điện di với 3 cặp mồi khác nhau thuộc vùng siêu biến, chúng tôi đi đến một số kết luận sau:

1. Đã tách chiết thành công ADN ty thể từ thân tóc bằng phương pháp tách chiết có sử dụng hạt từ tính.
2. Nhân được gen thuộc vùng HVI và HVII phục vụ cho việc phân tích nhận dạng cá thể và xác định huyết thống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Höss M., Pääbo S.* DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, pp.3913-3914.
2. *Richards M, Macaulay V, Hickey E. et al.* Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtADN pool. *Am J Hum Genet.* 2000, 67, pp.1251-1276.
3. *Tibor Kalmár, Csanád Z. Bachrati, Antónia Marcsik1, István Raskó.* A simple and efficient method for PCR amplifiable ADN extraction from ancient bones *Nucleic Acids Research.* 2000, Vol 28 (12), E67-e67.
4. *Thomas M.G, Weale M.E, Jones A.L. et al.* Founding mothers of Jewish communities: geographically separated Jewish groups were independently founded by very few female ancestors. *Am J Hum Genet.* 2002, 70, pp.1411-1420.
5. *Wilson M.R, Polanskey D, Butler J, DiZinno J.A, Roplogle J, Budowle B.* Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial ADN from human hair shafts. *Biotechniques.* 1995, 18, pp.662-669.
6. *Walsh P.S, Metzger D.A, Higuchi R.* Chelex 100 as a medium for simple extraction of ADN for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991, 10, pp.506-513.