

ĐẶC ĐIỂM ĐA HÌNH DI TRUYỀN ADN TY THỂ: ỨNG DỤNG TRONG NHẬN DẠNG CÁ THỂ VÀ XÁC ĐỊNH HUYẾT THỐNG THEO DÒNG MẸ

Trần Văn Khoa*; Triệu Tiến Sang*

TÓM TẮT

Tách chiết ADN từ các mẫu thân tóc thuộc 14 gia đình và một số mẫu hài cốt người. Nhân đoạn các đoạn gen ADN ty thể thuộc vùng siêu biến HVI và HVII, sử dụng ba cặp mồi khác nhau. Bằng việc giải trình tự và phân tích đoạn gen ADN ty thể một số đặc điểm đa hình nucleotid đơn (SNPs) đã phát hiện có giá trị cho nhận dạng cá thể và xác định huyết thống theo dòng mẹ.

* Từ khóa: ADN ty thể; Tính đa hình.

MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISM: APPLICATION IN INDIVIDUAL IDENTIFICATION AND MATRILINEAL TEST

SUMMARY

DNA was extracted from hair shafts of 14 families and human skeletal remains. Mitochondrial DNA in regions HVI and HVII were amplified using three different primer sets. By sequencing and analysis of the mt-DNA regions, some polymorphic characteristics in SNPs were determined that are useful for individual identification and matrilineal test.

* Key words: Mitochondrial DNA; Polymorphism.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành khoa học nhận dạng là một trong các ngành rất phát triển hiện nay. Để phục vụ cho 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 thay thế do ADN ty thể bền vững hơn ADN nhân.

Việc phân tích ADN ty thể cũng được nhiều tác giả trên thế giới áp dụng trong lĩnh vực hình sự, pháp y [8], mất tích trong chiến tranh [5], khảo cổ học với các mẫu cách đây nhiều thế kỷ [6, 7]. Trong đó, hai vùng siêu biến được phân tích dựa vào đa hình nucleotid đơn [1, 2, 3, 4]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm Tách chiết ADN ty thể từ thân tóc và xương, phân tích và phát hiện các đặc điểm đa hình có giá trị trong 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 14 gia đình (GD) khác nhau không có quan hệ huyết thống, thuộc khu vực Hà Đông và xương hài cốt ở Bộ môn Giải phẫu, Học viện Quân y. Tổng số 40 mẫu.

2. Hóa chất và thiết bị.

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

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

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

3. Phương pháp nghiên cứu.

* Phương pháp tách chiết ADN:

Tách chiết ADN bằng hạt từ tính theo quy trình sau:

Bước 1: cắt/nghiền nhỏ mẫu, 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, vortex, ủ nhiệt độ phòng.

Bước 5: vortex, đặt vào giá từ.

Bước 6: rửa bằng wash buffer.

Bước 7: để khô trong không khí.

Bước 8: ủ 65°C, 5 phút.

Bước 9: vortex, 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 hai vùng siêu biến HV I và HV II của ADN ty thể.

Mồi 1: F 5' FCTCCACCATTAGCACCCAAAGC 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°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. Sau đó, tinh sạch sản phẩm PCR và chạy PCR sequencing, tiếp tục đem sản phẩm PCR sequencing đọc trình tự trên máy ABI 3130XL.

* Phản ứng PCR sequencing với chu trình nhiệt và thành phần phản ứng:

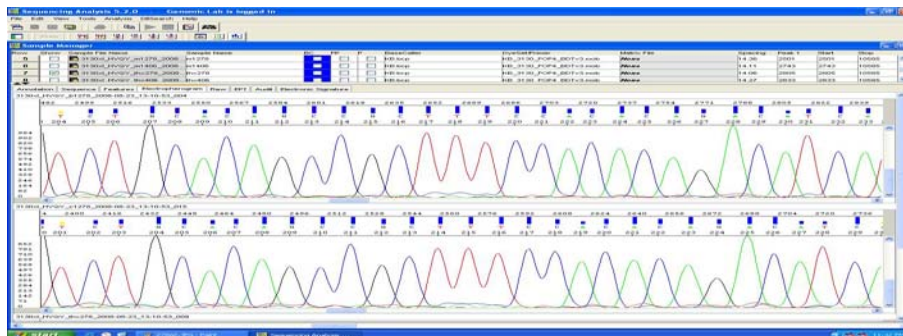
1 chu kỳ: 96°C x 1 phút; 25 chu kỳ: 96°C x 10 giây; 50°C x 5 giây, 60°C x 4 phút; 1 chu kỳ: 4°C x ∞.

- Terminator Ready Reaction Mix: 8,0 µl; mẫu: 2,0 µl; mồi: 2,5 µl; nước cất: 7,5 µl; tổng thể tích: 20 µl.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

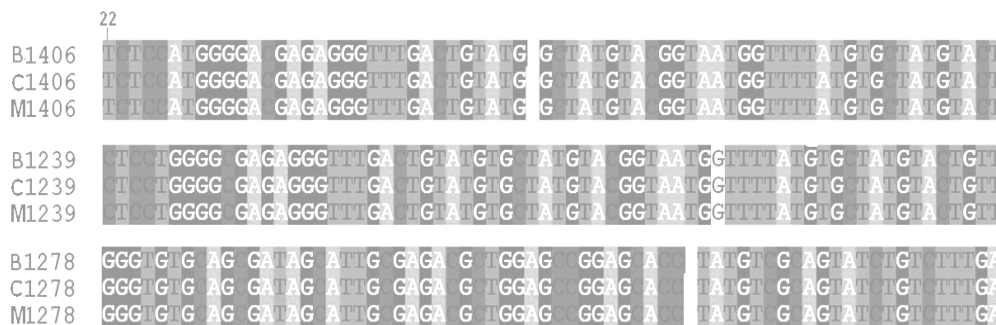
1. Kết quả nhân gen, giải trình tự ADN ty thể.

Sau khi tách chiết và tinh sạch, sử dụng các cặp mồi, nhân gen, tinh sạch sản phẩm PCR sequencing và giải trình tự trực tiếp.

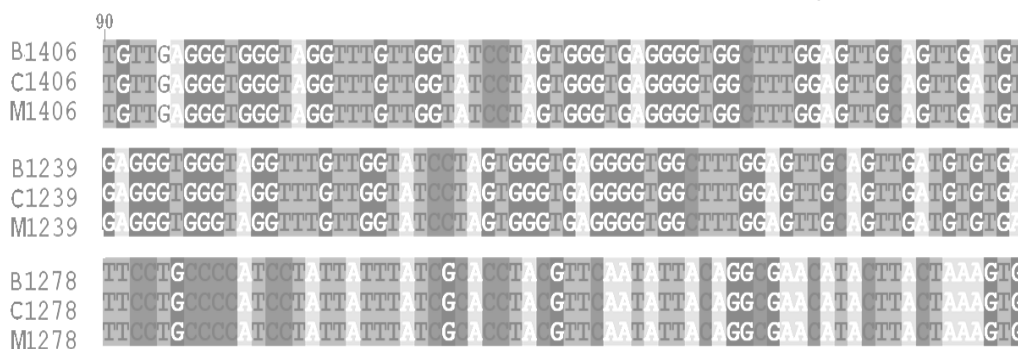


Hình 1: Kết quả giải trình tự ADN ty thể của 2 cá thể trong cùng một gia đình.

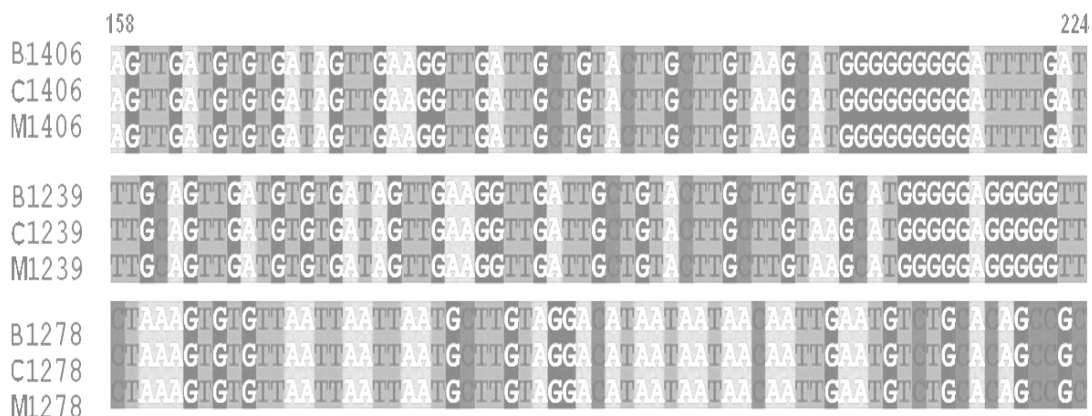
Hình ảnh trên cho thấy sản phẩm PCR không bị nhiễm, các đỉnh rõ nét đảm bảo cho việc phân tích một cách chính xác.



Hình 2: Kết quả phân tích trình tự ADN ty thể của các gia đình gồm bà (B), con (C) và mẹ (M), nucleotid 22 - 89 của 3 đoạn gen.



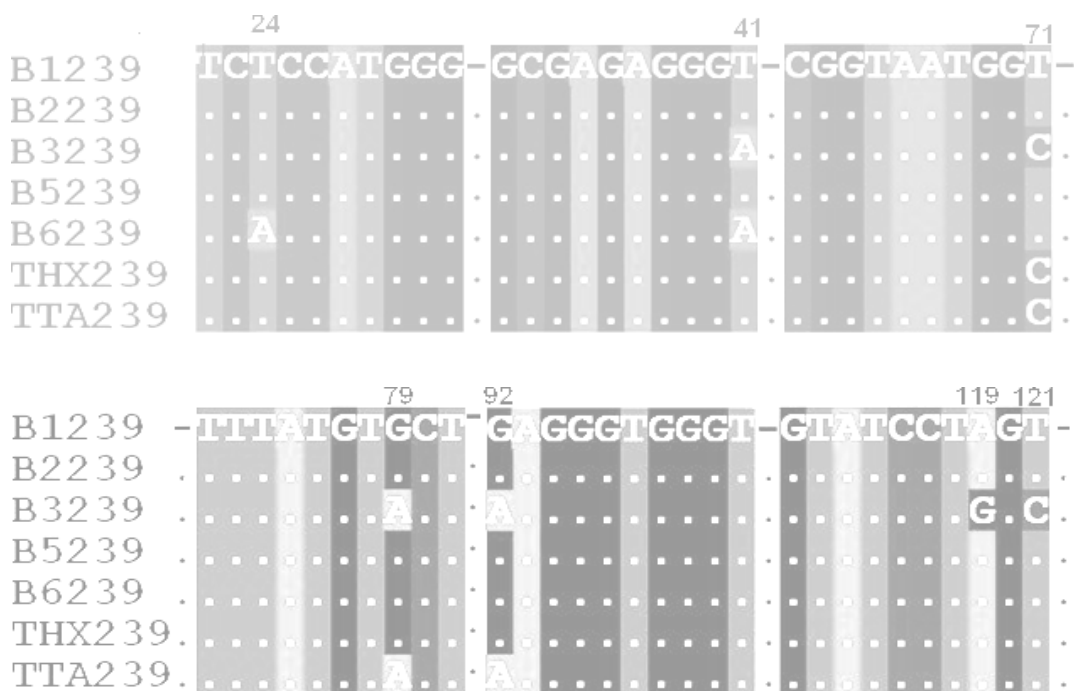
Hình 3: Kết quả phân tích trình tự ADN ty thể của các gia đình gồm bà (B), con (C) và mẹ (M), nucleotid 90 - 157 của 3 đoạn gen.



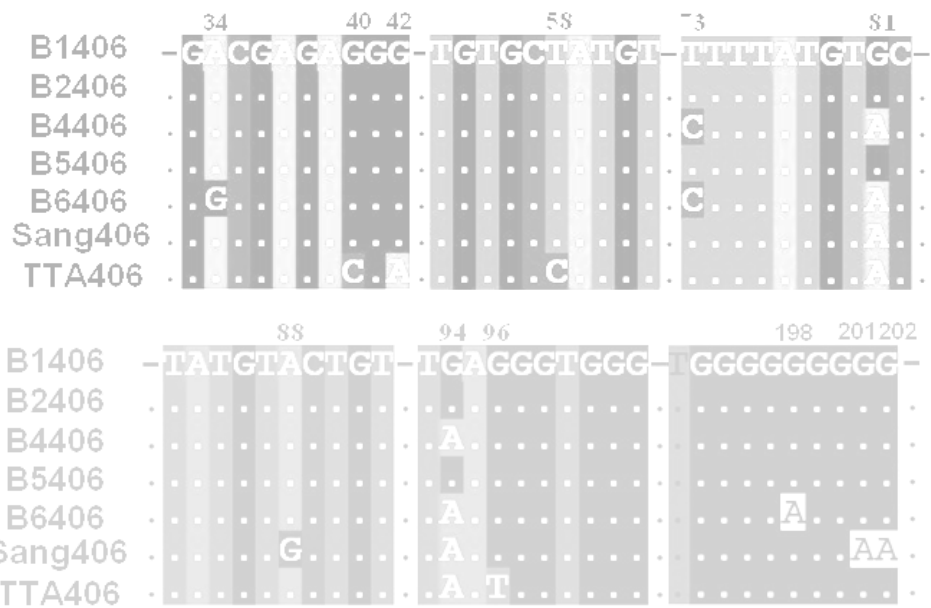
Hình 4: Kết quả phân tích trình tự ADN ty thể của các gia đình gồm bà (B), con (C) và mẹ (M), nucleotid 158 - 224 của 3 đoạn gen.

1. Kết quả phân tích phát hiện đặc điểm đa hình nucleotid đơn.

Bằng việc sử dụng phần mềm Bioedit phân tích và so sánh trình tự nucleotid của 3 đoạn gen được nhân lên thuộc các cá thể từ những gia đình khác nhau, chúng tôi thu được kết quả như sau:



Hình 5: Một số đa hình nucleotid đơn giữa các gia đình thuộc đoạn gen 239bp.



Hình 6: Một số đa hình nucleotid đơn giữa các gia đình thuộc đoạn gen 406bp.



Hình 7: Một số đa hình nucleotid đơn giữa các gia đình thuộc đoạn gen 406bp.

Bảng 1: Các điểm sai khác khi phân tích trình tự của cá thể giữa những gia đình khác nhau của đoạn 406bp/HVII.

STT	VỊ TRÍ	MẪU							
		GD1	GD2	GD4	GD5	GD6	GD7	GD8	
1	34	A	A	A	A	G	A	A	
2	40	G	G	G	G	G	C	G	
3	42	G	G	G	G	G	A	G	
4	58	T	T	T	T	T	C	T	
5	60	T	T	A	T	T	T	T	
6	73	T	T	C	T	C	T	T	
7	81	G	G	A	G	A	A	A	
8	88	A	A	A	A	A	A	G	
9	94	G	G	A	G	A	A	A	
10	95	A	A	G	A	A	A	A	
11	96	G	G	G	G	G	T	G	

Bảng 2: Các điểm sai khác khi phân tích trình tự cá thể giữa những gia đình khác nhau của đoạn 239bp/HVII.

STT	VỊ TRÍ	MẪU							
		GD1	GD2	GD3	GD4	GD5	GD6	Thân tóc 1	Thân tóc 2
1	24	T	T	T	T	T	A	T	T
2	41	T	T	A	T	A	T	T	T
3	71	T	T	C	T	T	C	C	C
4	79	G	G	A	G	G	A	G	A
5	92	G	G	A	G	G	A	G	A
6	119	A	A	G	A	A	A	A	A
7	121	T	T	C	T	T	T	T	T

Bảng 3: Các điểm sai khác khi phân tích trình tự cá thể giữa những gia đình khác nhau của đoạn 278bp/HVI.

STT	VỊ TRÍ	MẪU				
		GD1	Thân tóc 2	GD2	GD3	Thân xương 1
1	30	A	C	G	C	A
2	68	A	T	A	C	A
3	98	C	T	T	G	T

Phát hiện thấy có tổng cộng 21 vị trí sai khác nucleotid giữa những gia đình. Tính toán khả năng phân biệt khi so sánh giữa 2 gia đình dựa vào phân tích tính đa hình của các nucleotid đơn (SNPs) thì độ chính xác của phép phân tích: $[1 - 1: (4^{21})] \times 100$, bằng khoảng 99,9999999909%.

KẾT LUẬN

Qua tách chiết ADN từ các mẫu thân tóc, xương bằng hạt từ tính, nhân gen với 3 cặp mồi thuộc vùng HVI, HVII của ADN ty thể, giải trình tự đoạn gen được nhân lên, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đã phát hiện được 21 đặc điểm đa hình của các nucleotid đơn trong ADN ty thể thuộc hai vùng HVI và HVII tương ứng với đoạn gen được nghiên cứu.

2. Đặc điểm đa hình nói trên có thể áp dụng vào việc nhận dạng cá thể và xác định huyết thống theo dòng mẹ với độ chính xác là 99,9999999909%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Côrte-Real HBSM, Macaulay VA, Richards MB et al.* Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann Hum Genet.* 1996, 60, pp.331-350.
2. *Crespillo M, Luque JA, Paredes M.* Mitochondrial DNA sequences for 118 individuals from northeastern Spain. *Int J Legal Med.* 2000, 114, pp.130-132.
3. *Ginther C, Issel-Tarver L, King M-C.* Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat Genet* 2. 1992, pp.135-138.
4. *Greenberg B D, Newbold J E, Sugino A.* Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial. *Gene* 1983, 21, pp.33-49.
5. *Holland M M, Fisher D L, Mitchell L G, Rodriguez W C, Canik J J, Merrill C R, Weedn V W.* Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of re-mains from the Vietnam war. *J Forensic Sci.* 1993, 38, pp.542-553.
6. *Ivanov P L, Wadhams M J, Roby R K, Holland M M, Weedn V W, Parsons T J.* Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet.* 1996, 12, pp.417-420.
7. *Tibor Kalmár, Csanád Z. Bachrati, Antónia Marcsik1 and István Raskó.* A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones *Nucleic Acids Research.* 2000, Vol 28, No 12, E67-e67.
8. *Wilson M R, DiZinno J A, Polanskey D, Replogle J, Budowle B.* Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med.* 1995, 108. pp.68-74.