

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG AMICON® ULTRA-15 TRONG QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT ADN TỪ MẪU HÀI CỐT LÂU NĂM TRÊN HỆ THỐNG TÁCH CHIẾT TỰ ĐỘNG AUTOMATE EXPRESS DNA EXTRACTION TRONG NHẬN DẠNG PHÁP Y

Nguyễn Thị Ngọc Ánh^{1*}, Đỗ Thị Xao Mai¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu xây dựng quy trình tách chiết ADN từ mẫu hài cốt lâu năm trên hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction có sử dụng Amicon® ultra-15 centrifugal filter units trong nhận dạng pháp y.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu thực nghiệm 10 mẫu răng (xương) lâu năm, trưng cầu Viện Pháp y Quân đội giám định ADN; thời gian từ tháng 7/2023 đến tháng 12/2023.

Kết quả: Xây dựng thành công quy trình tách chiết ADN từ mẫu hài cốt lâu năm trên hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction có ứng dụng thiết bị lọc li tâm Amicon® ultra-15, với 5 bước thực hiện (xử lý mẫu; khử khoáng; ủ đệm; cô đặc dung dịch; thiết lập và chạy hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction). Quy trình có khả năng ứng dụng trong giám định ADN với các ưu điểm tiết kiệm thời gian tách chiết, tăng số lượng mẫu trong mỗi lần tách chiết, hạn chế khả năng nhiễm trong phòng thí nghiệm, tránh sự tiếp xúc với phenol-chloroform-isoamyl alcohol.

Từ khóa: Tách chiết ADN, hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction.

ABSTRACT

Objectives: Study to develop DNA extraction process from remains samples on AutoMate Express DNA Extraction using Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices.

Subjects and methods: Experimental study on 10 degraded teeth (bones) samples which are required Military Institute of forensic medicine for DNA analysis, from July 2023 to December 2023.

Results: We built DNA Extraction method for degraded bone and teeth Samples using Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices included five steps (cleaning, demineralization, sample lysate, concentration, run the AutoMate Express DNA Extraction). Advantages of this method include: saving time, the increase in number of extracted samples, the reduced risk for contamination, avoiding work with Phenol-chloroform-isoamyl alcohol for laboratory staffs.

Keywords: DNA extraction method, AutoMate Express DNA Extraction.

Chịu trách nhiệm nội dung: Nguyễn Thị Ngọc Ánh, Email: duck19399@gmail.com

Ngày nhận bài: 16/01/2024; mời phản biện khoa học: 01/2024; chấp nhận đăng: 16/02/2024.

¹Viện Pháp y Quân đội.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quy trình giám định ADN xác định danh tính hài cốt gồm các bước: lựa chọn mẫu, tách chiết ADN, khuếch đại, giải trình tự, phân tích kết quả. Tách chiết ADN là bước đầu tiên, có ý nghĩa quan trọng quyết định thành công của cả quy trình. Hiện có nhiều quy trình tách chiết ADN từ các mẫu xương (răng) hài cốt đã được nghiên cứu, công bố và áp dụng, trong đó có các quy trình tách chiết hữu cơ [1], tách chiết sử dụng bộ kit QIAamp® ADN Investigator (Đức) [2], tách chiết sử dụng bộ kit

PrepFiler Express BTA™ trên hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction [3]. Năm 2021, Jasmin Zoranjic và cộng sự đã công bố kết quả so sánh các phương pháp tách chiết, như phương pháp hữu cơ (sử dụng phenol-chloroform-isoamyl alcohol, tỉ lệ 25:24:1), phương pháp sử dụng bộ kit QIAamp® ADN Investigator và phương pháp sử dụng bộ kit PrepFiler Express BTA™ trên hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction để xác định phương pháp tách chiết hiệu quả nhất cho xương và răng [4]. Các nghiên cứu cho thấy, phương pháp PrepFiler Express BTA™

tạo ra kết quả tối ưu nhất để tách chiết ADN từ các mẫu răng và xương.

Viện Pháp y Quân đội đang áp dụng quy trình tách chiết hữu cơ (sử dụng 1.000-2.000 mg bột xương/răng) để tách chiết ADN từ các mẫu hài cốt lâu năm. Những năm qua, Viện được trang bị hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction. Tuy nhiên, việc ứng dụng tách chiết các mẫu hài cốt lâu năm theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất (chỉ sử dụng 50 mg bột xương/răng) chưa thành công.

Thiết bị lọc li tâm Amicon® ultra-15 centrifugal filter units có khả năng lọc siêu nhanh, dễ dàng cô đặc các dung dịch mẫu loãng và phức tạp. Thiết bị được sử dụng để cô đặc các mẫu sinh học có chứa kháng nguyên, kháng thể, enzyme, axit nucleic (mẫu ADN, ARN sợi đơn hoặc sợi đôi), vi sinh vật. Từ thực tiễn trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xây dựng và triển khai ứng dụng quy trình tách chiết ADN từ mẫu hài cốt lâu năm trên hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction có sử dụng Amicon® ultra-15 centrifugal filter units trong nhận dạng pháp y.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

10 mẫu răng (xương) lâu năm, trưng cầu Viện Pháp y Quân đội giám định ADN. Thời gian nghiên cứu từ tháng 7/2023-12/2023.

- Tiêu chuẩn lựa chọn: mẫu hài cốt đã được giám định hình thái, không nằm trong mộ tập thể, đủ điều kiện giám định ADN.

- Tiêu chuẩn loại trừ: các mẫu hài cốt chưa được giám định hình thái, mẫu hài cốt nằm trong mộ tập thể và mẫu hài cốt bị phân hủy nặng, không đủ điều kiện giám định ADN.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế: nghiên cứu thực nghiệm.

- Nội dung nghiên cứu:

+ Lựa chọn mẫu nghiên cứu.

+ Tách chiết ADN từ 10 mẫu đã lựa chọn.

+ Đánh giá ADN sau tách chiết: thực hiện phản ứng khuếch đại vùng HV1 hệ gen ty thể; kiểm tra sản phẩm khuếch đại; tinh sạch sản phẩm khuếch đại; giải trình tự vùng HV1 - ADN ty thể; đánh giá và phân tích kết quả.

- Nghiên cứu ứng dụng thiết bị lọc li tâm Amicon® ultra-15 centrifugal filter units (Merkmillipore) trong quy trình tách chiết ADN từ mẫu hài cốt lâu năm trên hệ thống AutoMate Express DNA Extraction.

Đây là sự kết hợp giữa ưu điểm của quy trình tách chiết hữu cơ, thiết bị lọc li tâm Amicon® ultra-15 centrifugal filter units và quy trình tách chiết bằng bộ kit PrepFiler Express BTA trên hệ thống AutoMate Express DNA Extraction (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ).

- Quy trình tách chiết hữu cơ:

+ Bước 1: xử lí mẫu (sử dụng 1.000-2.000 mg bột xương/răng).

+ Bước 2: khử khoáng.

+ Bước 3: ủ đệm ở nhiệt độ 56°C, gồm 2-2,5 ml lysis buffer (200 µl EDTA 0,5M, pH 8,0; 200 µl Tris HCl 1M, pH 7,5; 150 µl SDS 10%; 600 µl protein K 20 mg/mL; 10 µl DTT 1M; 0,36g NaCl, nước khử ion).

+ Bước 4: loại bỏ protein và tạp chất bằng Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) và chloroform-isoamyl alcohol (24:1). Tủa cồn, tinh sạch thu ADN.

- Quy trình tách chiết bằng bộ kit PrepFiler Express BTA™:

+ Bước 1: xử lí mẫu (sử dụng 50 mg bột xương/răng).

+ Bước 2: ủ đệm ở nhiệt độ 56°C, gồm 220µl PrepFiler BTA™ Lysis buffer, 3µl DTT 1M, 7µl Proteinase K.

+ Bước 3: thiết lập và chạy hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction thu ADN.

- Quy trình nghiên cứu:

+ Bước 1: xử lí mẫu (sử dụng 1.000-2.000 mg bột xương/răng).

+ Bước 2: khử khoáng.

+ Bước 3: ủ đệm ở nhiệt độ 56°C, gồm 2-2,5ml lysis buffer (200µl EDTA 0,5M, pH 8,0; 200 µl Tris HCl pH 1M, 7,5; 150 µl SDS 10%; 600 µl protein K 20mg/ml; 10 µl DTT 1M; 0,36g NaCl, nước khử ion).

+ Bước 4: cô đặc dung dịch bằng thiết bị lọc li tâm Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units; đến khi còn thể tích 300 µl.

+ Bước 5: thiết lập và chạy hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction thu ADN.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả lựa chọn mẫu nghiên cứu

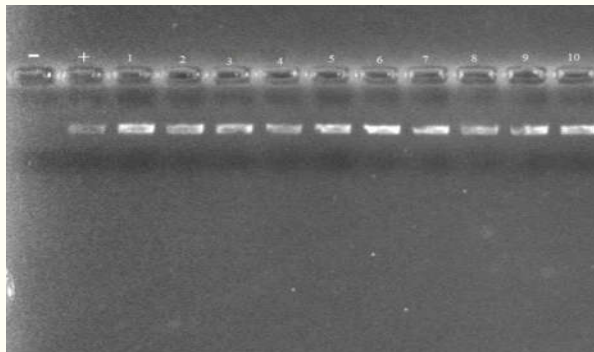
Nghiên cứu đã lựa chọn đủ 10 mẫu xương (răng) hài cốt để thực hiện nghiên cứu. Các mẫu sau khi tiếp nhận được giám định hình thái, là các mẫu xương (răng) người.



Hình 1. Kết quả lựa chọn mẫu nghiên cứu.

3.2. Kết quả khuếch đại vùng HV1 hệ gen ty thể

Khuếch đại thành công vùng HV1 hệ gen ty thể của 10 mẫu nghiên cứu.



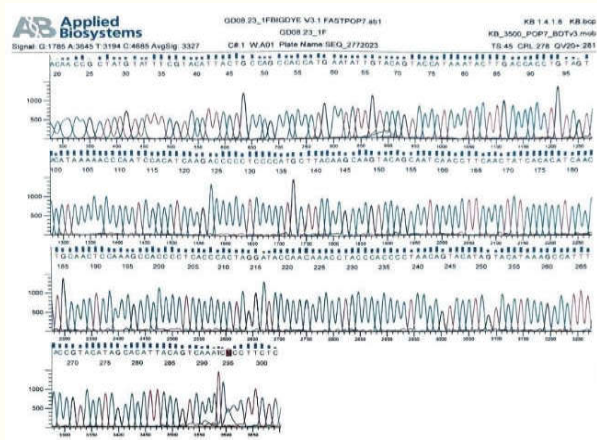
Hình 2. Kết quả khuếch đại vùng HV1 hệ gen ty thể.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm khuếch đại (PCR) trên gel agarose 1% (hình 2) cho thấy, mẫu đối chứng âm (kí hiệu -) không xuất hiện băng, 10 mẫu xương (răng) (kí hiệu từ 1 đến 10) các băng đều rõ nét, cùng kích thước với mẫu đối chứng dương (kí hiệu +).

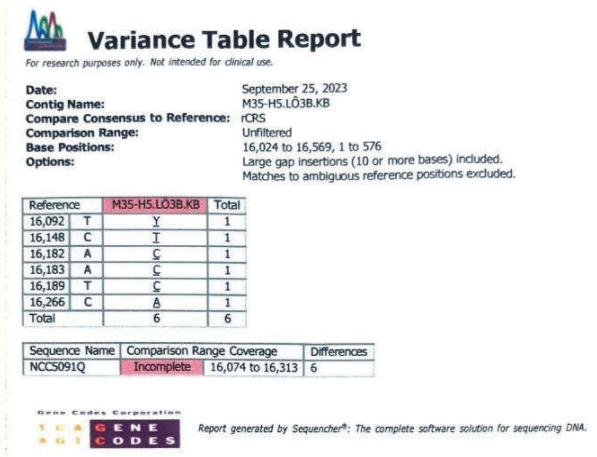
3.3. Kết quả giải trình tự

Giải trình tự thành công vùng HV1 hệ gen ty thể của 10 mẫu nghiên cứu. Trình tự các vùng siêu biến HV1 hệ gen ty thể được phân tích trên phần mềm Sequencing Analysis 6 Software và phần mềm Sequencher 5.4.5. Trình tự vùng HV1 chúng tôi đọc được của các mẫu nằm trong khoảng 16024-16365.

Tạp chí Y HỌC QUÂN SỰ, SỐ 371 (7-8/2024)



Hình 3. Phân tích trình tự bằng phần mềm Sequencing Analysis 6.



Hình 4. Phân tích kết quả giải trình tự bằng phần mềm Sequencher 5.4.5.

Trình tự vùng HV1 hệ gen ty thể của các mẫu nghiên cứu được xác định nhóm ADN ty thể đơn bội (haplotype) trên webstie: <https://haplogrep.i-med.ac.at/>.

Haplogrep2 - HSD File Report

Download HSD File:

SampleID	Range	Haplogroup	Polymorphisms
MAU_1	16024-16365	F1a1a	16108T, 16129A, 16162G, 16172C, 16304C
MAU_10	16024-16365	M29a	16145A, 16189C, 16223T, 16311C
MAU_2	16024-16365	F1e3	16183C, 16189C, 16249A, 16300G, 16304C
MAU_3	16024-16365	M701a	16123A, 16162G, 16223T, 16297C
MAU_4	16024-16365	A	16223T, 16290T, 16319A
MAU_5	16024-16365	B5a	16148T, 16182C, 16183C, 16189C, 16265A
MAU_6	16024-16365	N	16078A, 16223T
MAU_7	16024-16365	M11a2	16173T, 16182C, 16183C, 16189C, 16223T
MAU_9	16024-16365	N9b	16182C, 16183C, 16189C, 16223T

Hình 5. Haplotype của các mẫu nghiên cứu.

4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu trong đề tài này là các mẫu răng (xương) của liệt sĩ Việt Nam.

Các mẫu được lựa chọn nghiên cứu được lấy từ các hài cốt có lượng mẫu tương đối nhiều.

4.2. Đặc điểm biến đổi nucleotide vùng HV1-ADN ty thể

Hình ảnh điện di ADN sau khuếch đại (hình 2) và hình ảnh giải trình tự gen vùng HV1 (hình 3, hình 4) cho thấy, kĩ thuật phân tích trình tự gen bảo đảm chất lượng. Haplotype của các mẫu nghiên cứu (hình 5) thuộc các nhóm F, M, A, B, N; là các nhóm haplotype phân bố ở khu vực châu Á [5].

So với nghiên cứu của các tác giả Ivanova trên 50 người Việt Nam không có quan hệ họ hàng sinh sống tại Hà Nội [6] và khối dữ liệu trình tự vùng HV1 hệ gen ty thể từ hàng ngàn thân nhân liệt sĩ đang lưu trữ tại Viện Pháp y Quân đội thì trình tự vùng HV1 hệ gen ty thể của 10 mẫu nghiên cứu phù hợp trình tự của ADN ty thể có giá trị nhận dạng cho người Việt Nam.

Như vậy, có thể phân tích trình tự nucleotide vùng HV1 hệ gen ty thể sau khi tách chiết bằng phương pháp sử dụng thiết bị lọc li tâm Amicon® ultra-15 centrifugal filter units (Merkmillipore) trong quy trình tách chiết ADN từ mẫu hài cốt lâu năm trên hệ thống AutoMate Express DNA Extraction.

4.3. Ưu điểm của quy trình nghiên cứu

a) Tách chiết được trọng lượng mẫu như mong muốn, tiết kiệm thời gian tách chiết.

Theo thời gian, ADN từ các mẫu răng (xương) lâu năm ngày càng nghèo do bị phân hủy mạnh. Vì vậy, trọng lượng bột răng (xương) đưa vào tách chiết thu ADN cần phải có nhiều hơn. Trường hợp sử dụng 1.000-2.000 mg bột xương (răng) để tách chiết bằng hệ thống AutoMate Express DNA Extraction mà không qua bước cô đặc dung dịch sau ủ đệm li giải bằng thiết bị lọc li tâm Amicon® ultra-15 centrifugal filter units thì chúng ta phải sử dụng tối thiểu 08 cartridge cho 01 mẫu tách chiết, rất tốn kém. Thiết bị lọc li tâm Amicon® ultra-15 centrifugal filter units cô đặc dung dịch sau tách chiết còn 300 µl. Như vậy, khi tách chiết 01 mẫu xương (răng) hài cốt liệt sĩ chúng ta chỉ cần sử dụng 02 cartridge.

Sự khác biệt về thời gian tách chiết giữa quy trình tách chiết hữu cơ và quy trình nghiên cứu thể hiện từ bước sau ủ đệm li giải. Với quy trình tách chiết hữu cơ, nghiên cứu thực hiện các bước loại

bỏ protein và tạp chất, rửa cặn, tinh sạch thu ADN trong khoảng thời gian từ 2-5 giờ. Với quy trình tách chiết nghiên cứu, chúng tôi thực hiện bước cô đặc dung dịch, chạy hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction thu ADN trong khoảng thời gian từ 1 giờ đến 1 giờ 10 phút.

b) Hạn chế hiện tượng nhiễm trong phòng thí nghiệm.

Khi giám định ADN từ các mẫu răng (xương) hài cốt lâu năm, thường gặp hiện tượng nhiễm cao hơn so với giám định ADN từ các loại mẫu sinh phẩm khác (vì đây là các mẫu nghèo ADN). Quy trình tách chiết nghiên cứu đã giảm số bước thủ công, giảm khả năng nhiễm chéo giữa các mẫu trong một lần tách chiết và nhiễm ADN của giám định viên, kĩ thuật viên thực hiện tách chiết.

c) Tránh tiếp xúc với Phenol-chloroform-isoamyl alcohol cho giám định viên, kĩ thuật viên.

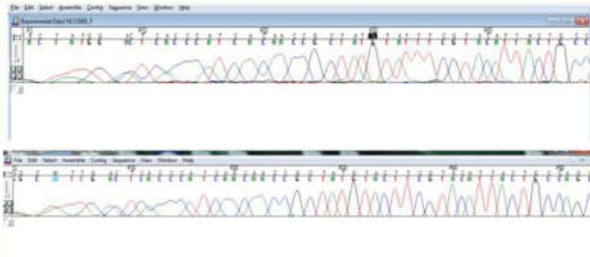
Quy trình tách chiết hữu cơ từ các mẫu xương (răng) hài cốt lâu năm cho đến nay là một quy trình tách chiết có hiệu suất cao và giá thành thấp. Tuy nhiên, nhược điểm của quy trình này là mức độ độc hại của Phenol-chloroform-isoamyl alcohol. Phiếu an toàn hóa chất theo quy định (EU) số 1907/2006 công bố: Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) có khả năng gây độc nếu nuốt phải hoặc hít phải; có hại khi tiếp xúc với da, mắt; nghi ngờ gây ra các khiếm khuyết về di truyền; nghi ngờ gây ung thư; nghi ngờ gây tổn hại cho thai nhi, gây tổn thương các cơ quan (thận, gan, hệ thần kinh trung ương, da) khi phơi nhiễm kéo dài hoặc lặp đi lặp lại. Vì vậy, khi thực hiện thao tác với Phenol-chloroform-isoamyl alcohol, cần phải bảo đảm dụng cụ bảo hộ an toàn cho giám định viên, kĩ thuật viên. Đồng thời, thao tác phải được thực hiện trong tủ kĩ thuật có chức năng hút khí độc. Với quy trình tách chiết này, chúng tôi không sử dụng Phenol-chloroform-isoamyl alcohol, an toàn cho sức khỏe của giám định viên và kĩ thuật viên thực hiện giám định.

4.4. Một số kết quả áp dụng thực tiễn

Chúng tôi đã sử dụng quy trình nghiên cứu để thực hiện nhận dạng một số mẫu hài cốt được trưng cầu giám định tại Viện Pháp y Quân đội. Điển hình là trường hợp giám định nhận dạng hài cốt mã số NCC5091. Mẫu gồm 02 chiếc răng hàm được bàn giao cho Viện Pháp y Quân đội. Mẫu đã được giám định hình thái là răng người. Chúng tôi thực hiện hai quy trình tách chiết: quy trình nghiên cứu và quy trình hữu cơ. Kết quả cả hai quy trình thu được ADN đều giải trình tự thành công vùng HV1 hệ gen ty thể.



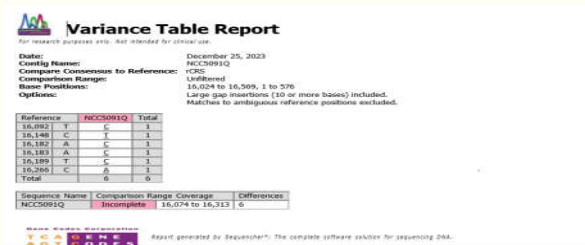
Hình 6. Hình ảnh mẫu NCC5091 (răng) giám định theo quy trình nghiên cứu.



Hình 7. Trình tự mẫu tách chiết bằng quy trình nghiên cứu.

Mẫu NCC5091Q được tách chiết ADN bằng quy trình nghiên cứu có chất lượng trình tự tốt hơn so với trình tự thu được khi tách chiết bằng quy trình hữu cơ (đỉnh và chân peak rõ ràng hơn).

Trình tự vùng HV1 hệ gen ty thể của mẫu NCC5091Q thuộc nhóm haplotype B5, phân bố ở khu vực châu Á [5].



Hình 8. Phân tích kết quả giải trình tự mẫu NCC5091Q bằng phần mềm Sequencher 5.4.5.

Mẫu NCC5091Q đã được so sánh có quan hệ huyết thống theo dòng mẹ với thân nhân có kí hiệu DH10 (anh ruột cùng cha mẹ với người cần nhận dạng).

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu thực nghiệm xây dựng thành công quy trình tách chiết ADN từ mẫu hài cốt lâu năm trên hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction có sử dụng thiết bị lọc li tâm Amicon® ultra-15.

Quy trình gồm 5 bước, thực hiện theo thứ tự: (1) xử lí mẫu, (2) khử khoáng, (3) ủ đệm, (4) cô đặc dung dịch, (5) thiết lập và chạy hệ thống tách chiết tự động AutoMate Express DNA Extraction.

Sử dụng quy trình nghiên cứu thực hiện nhận dạng một số mẫu hài cốt được trưng cầu giám định tại Viện Pháp y Quân đội, cho thấy quy trình đáp ứng đủ các điều kiện để triển khai ứng dụng trong giám định ADN nhận dạng pháp y. Đặc biệt, quy trình có các ưu điểm: tiết kiệm thời gian tách chiết; tăng số lượng mẫu trong mỗi lần tách chiết; hạn chế khả năng nhiễm trong phòng thí nghiệm; tránh tiếp xúc với Phenol-chloroform-isoamyl alcohol cho giám định viên, kĩ thuật viên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Mariyam Dairawan, Preetha J Shetty2 (2020), "The Evolution of ADN Extraction Methods", 8 (1). *AJBSR.MS.ID.001234*.
- Bộ Y tế (2022), Quy trình, biểu mẫu giám định pháp y, thời hạn, nhân lực thực hiện giám định pháp y, Thông tư số 13/2022/TT-BYT ngày 30/11/2022.
- Applied Biosystems (2012), "PrepFiler® Express ADN PrepFiler® Express BTA Forensic ADN Extraction Kits-User Guide", Publication, No: 4442699. Revised: March 2012. Available online: https://tools.thermo-fisher.com/content/sfs/manuals/cms_081933.pdf (accessed on 20 September 2021).
- Jasmin Zoranjic, Jasmine W Tay, Nicholas S Mounford, Marie S Rye (2021), "Optimisation of an Automated ADN Extraction method for bone ADN teeth samples ADN applicability to two forensic cases", 1 (3), 194-201; <https://doi.org/10.3390/forensicsci1030017>.
- Elizabeth M McCormick, Marie T Lott, Matthew C Dulik Lishuang Shen, Marcella Attimonelli, Ornella Vitale, Amel Karaa, Renkui Bai, Daniel E Pineda-Alvarez, Larry N Singh, Christine M Stanley, Stacey Wong, Anshu Bhardwaj, Daria Merkurjev, Rong Mao, Neal Sondheimer, Shiping Zhang, Vincent Procaccio, Douglas C Wallace, Xiaowu Gai, Mami J Falk (2020), Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation.
- Ivanova R, Astridinis A, Lepage V et al (1999), "Polimorphism of mitochondrial DNA in Vietnamese population", *European Journal of immunogenetics*, 26, 417-422. □