

HOÀN CHỈNH KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN HVS-I, HVS-II TRÊN ADN TY THỂ

HỒ QUANG HUY, NGUYỄN VĂN TUẤT, PHẠM ĐĂNG KHOA
Trường Đại học Y Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là một quốc gia đa dân tộc, đa văn hóa, do vậy việc nghiên cứu đặc điểm mỗi tộc người cũng như mối liên quan giữa các tộc người là một việc làm cần thiết. Trong quá trình đổi mới, trước tác động của toàn cầu hoá, nhiều vấn đề được đặt ra có ý nghĩa chiến lược, đặc biệt là vấn đề con người trong chiến lược phát triển đất nước, nhưng cũng vì đó mà tính thuần nhất của các tộc người sẽ bị mất dần do sự lai tạp và xáo trộn dân số. Vì những lí do này, việc nghiên cứu con người hay nhân chủng học (anthropology) ở Việt Nam cần phải được tiến hành trên nhiều bình diện. Nhờ đó mà có được những số liệu về các tộc người Việt Nam hiện nay để sau này thấy được những thay đổi do các áp lực trên qua thời gian. Trong các khía cạnh của nhân chủng học, khía cạnh được nghiên cứu nhiều nhất có lẽ là nhân chủng học văn hoá-xã hội (các công trình của Đặng Nghiêm Vạn, Nguyễn An Lịch...), khảo cổ học (các công trình của Hà Văn Tấn...), ngôn ngữ học (các

công trình của Nguyễn Văn Lợi...) và nhân trắc học (các công trình của Nguyễn Quang Quyền, Trịnh Văn Minh, Nguyễn Đình Khoa...). Riêng khía cạnh nhân chủng phân tử (molecular anthropology) hay nhân chủng gen học (genetic anthropology) vẫn còn ở thời kì phôi thai nên những số liệu thu được còn hết sức khiêm tốn (một vài bài báo của Vũ Triệu An và CS trong mấy năm gần đây).

Trước tình hình như trên, chúng tôi đã tiến hành thu thập và lưu giữ ADN của một số tộc người Việt Nam (Kinh, Mường, Thái, Tày, Nùng, Khmer, Chăm, H'mong, Dao...). Số ADN bước đầu đã được khai thác để phân tích tính đa hình thái của hệ thống HLA (Human Leulocyte Antigen) và hệ STR (Short Tandem Repeat). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành hoàn chỉnh kĩ thuật giải trình tự gen HVS-I, HVS-II ADN ty thể, từ đó xác định tính đa hình thái của ADN ty thể góp phần vào nghiên cứu nhân chủng gen học của người Việt Nam.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng.

05 ADN người Kinh Việt Nam.

2. Phương pháp.

2.1. Phương pháp chiết tách ADN.

- ADN được chiết tách từ bạch cầu máu ngoại vi.
- Các mẫu được định lượng và đo độ tinh khiết bằng máy quang phổ kế ở bước sóng 260/280 nm.

Quy trình PCR.

- Chuẩn bị các mẫu ADN có nồng độ 50 ng/μl
- Khuếch đại đoạn gen bằng cặp mồi:
+ L13894: ACTTAAATAAAATCCCCACTATGCACAT
+ H2187: TGTTGAGCTTGAACGCTTCTTAATTGGTG
- Chu trình nhiệt
94°C: 1 phút

94°C: 30 giây
65.5°C: 6 phút } 30 chu kỳ

72°C: 10 phút
4°C

Quy trình tinh sạch sản phẩm PCR

Sử dụng kit để tinh sạch sản phẩm sau PCR theo quy trình:

Thêm vào mỗi mẫu 500μl PA
Cho vào qua màng
Ly tâm 900 vòng/15 giây đổ nước cạn đi
Thêm 400μl PA vào mỗi tube để 1 phút } 2 lần

Ly tâm 900 vòng/15 giây đổ cạn
Thêm vào mỗi tube 500μl W1 để 2 phút
Ly tâm 900 vòng/1 phút
Chuyển phần màng sang tube 1,5 ml
Thêm 24μl T1

Để 1 phút ở nhiệt độ phòng
Ủ 1 phút ở 57°C

Ly tâm 900 vòng/1 phút

Lấy cạn bỏ màng đi

Kiểm tra sản phẩm bằng chạy điện di trên gel agarose 1,5% với điện thế 100v/30 phút

Quy trình PCR-Sequencing

- Chuẩn bị plate để PCR
- Chạy PCR-Sequencing với kit sequencing ABI

- Các đoạn mồi sau:

L15996: CTCCACCATTAgCACCCAAAgC

L29: GgTCTATCACCTATTAACCAC

- Chu trình nhiệt:

96°C: 10 giây
50°C: 5 giây
60°C: 4 phút
Giữ ở 4°C } 25 chu kỳ

Quy trình tinh sạch sản phẩm PCR-Sequencing

- Thêm vào mỗi giếng 32μl Isopropyl alcohol (3lso: 1 H2O)

- Lắc 500 rpm/1 phút ở nhiệt độ phòng 30 phút
- Ly tâm 3600 rpm/30 phút/10°C
- Ly tâm ngược plate 96rpm/30 giây
- Thêm vào mỗi giếng 80μl Isopropyl alcohol 75%
- Để ở nhiệt độ phòng 3 phút

- Ly tâm 3600rpm/10 phút/ 10°C

- Ly tâm ngược plate

- Cho vào máy PCR 60°C/10 phút

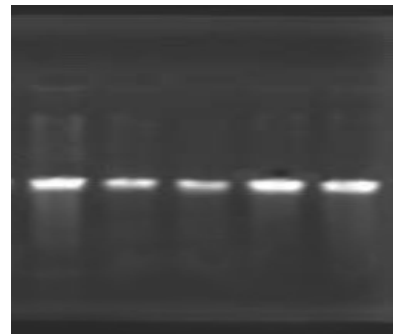
- Đặt plate vào tủ ấm 56°C/20 phút

- Thêm vào mỗi giếng 10μl nước cất khử ion

Giải trình tự gen và xác định tính đa hình thái của gen: Dùng phần mềm sequenmen để xác định tính đa hình thái gen HVS-I và HVS-II.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Để xác định tính đa hình thái của ADN ty thể (một yếu tố di truyền nằm trong tế bào chất của mẹ), chúng tôi tiến hành ứng dụng và hoàn chỉnh kĩ thuật xác định trình tự nucleotid ở hai gen HVS-I, HVS-II của 5 mẫu người Kinh Việt Nam. Với quy trình trên, chạy PCR, kiểm tra sản phẩm bằng kĩ thuật điện di gel agarose (hình 1). Khi chắc chắn có sản phẩm PCR, chúng tôi tiến hành tinh sạch sản phẩm và giải trình tự gen trên máy ABI 3100.



Hình1: ảnh điện di sản phẩm PCR bằng gel agarose

Kết quả cho thấy đã xác định được trình tự nucleotid của hai gen HVS-I (16024-16569) và HVS-II (01-576) trên ADN ty thể. Sau khi có trình tự các nucleotid của hai đoạn gen trên, chúng tôi tiến hành đối chiếu với trình tự của ngân hàng gen và tìm ra được tính đa hình thái hai gen HVS-I, HVS-II trên ADN ty thể của các mẫu và từ đó xác định được haplogroup của chúng (bảng 1).

Bảng 1: Tính đa hình thái của 05 mẫu người Kinh Việt Nam:

Mẫu	Haplogroup	Tính đa hình thái HVS-I (16024-16569)	Tính đa hình thái HVS-II (01-576)
01	M7a/M7	086, 129, 209, 223, 272, 519	73, 152, 249d, 263, 315+C, 316, 489, 522-523d
02	F	157, 256, 304, 335, 527	73, 249d, 263, 315+C
03	B5	140, 187, 189, 256, 266G, 519	73, 93, 210, 263, 315+C, 522-523d
04	M12	148, 223, 234, 261, 290, 519	73, 263, 309+C, 315+C, 318, 463, 489, 573+CCC
05	B4g	93, 181C, 182C, 183C, 189, 213, 217, 242, 261, 287, 292, 301, 355, 519	61A, 62, 73, 263, 309+C, 315+C, 522-523d

Trong nhân chủng gen học nhờ tính đa hình thái của ADN ty thể người ta đã xác định được mối liên quan về gen học của các tộc người khác nhau.

Trong khoa học hình sự và Y pháp ứng dụng tính đa hình thái này để xác định và nhận dạng cá thể. Vì vậy việc xác định tính đa hình thái của ADN ty thể đóng một vai trò quan trọng. Trong nghiên cứu này chúng tôi bước đầu hoàn thiện được kĩ thuật xác định trình tự nucleotid của hai gen HVS-I, HVS-II, từ đó xác định được tính đa hình của hai gen và các haplogroup. Kết quả này đã được kiểm chứng độc lập của labo sinh học phân tử Viện động vật học Kunming - Trung Quốc cho thấy kết quả hoàn toàn phù hợp.

Trong giai đoạn tới, chúng tôi dự kiến sẽ tập trung khai thác số ADN đã có và đang được bảo quản tốt ở -70°C để nghiên cứu nhân chủng gen học (một khía cạnh nhân chủng rất có ý nghĩa nhưng còn chưa được quan tâm ở Việt Nam) về các phương diện:

- HLA: một đặc điểm rất đặc trưng cho từng cá thể, có mối liên quan với bệnh và yếu tố hoà hợp mô;
- STR (trên nhiễm sắc thể thường): hệ thống này thường nằm ở vùng intron, ít bị đột biến và mang tính đặc trưng cho từng cá thể;

- STR (trên nhiễm sắc thể Y): một nét đặc trưng về gen học được di truyền từ bố và mang tính đa hình thái cao;

- ADN ti thể: được di truyền theo tế bào chất, một nét đặc trưng về gen học được di truyền từ mẹ và mang tính đa hình thái cao.

Tập hợp các kết quả trên đây sẽ giúp đánh giá được đặc điểm nhân chủng gen học con người Việt Nam hiện tại, kết hợp với những nghiên cứu về các khía cạnh khác của nhân chủng học sẽ làm cơ sở cho việc đánh giá tổng thể đặc điểm nhân chủng học của các tộc người Việt Nam. Những kết quả trên sẽ rất có ý nghĩa cho những nghiên cứu sau này khi tính thuần nhất của các tộc người bị mất dần do sự lai tạp và xáo trộn dân số.

KẾT LUẬN

Bước đầu đã ứng dụng và hoàn chỉnh được kĩ thuật giải trình tự gen xác định trình tự nucleotid hai gen HVS-I và HVS-II trên ADN ty thể.

Xác định được tính đa hình thái của các gen trên và các haplogroup của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anita Brandstätter, Harald Niederstätter et al, 2006 "Generating population data for the EMPOP database—An overview of the mtDNA sequencing and data evaluation processes considering 273 Austrian control region sequences as example" Forensic Science International.

2. R. Ivanova, A. Astrinidis, V. Lepage, S. Djoulah, E. Wijnen, An. Vu-Trieu, J. Hors & D. Charron 1999 "Mitochondrial DNA polymorphism in the Vietnamese population" European Journal of Immunogenetics 26, 417–422

3. Qing-Peng Kong, Hans-Jürgen Bandelt et al "Updating the East Asian mtDNA phylogeny a prerequisite for the identification of pathogenic mutations" Human Molecular Genetics, 2006, Vol. 15, No. 13

4. Qing-Peng Kong & Yong-Gang Yao 2003 "Mitochondrial DNA sequence polymorphisms of five ethnic populations from northern China" Am. J. Hum Genet 113 : 391–405

5. Yong-Gang Yao, Antonio Salas, 2007 "mtDNA Data Mining in GenBank Needs Surveying" AJHG, Volume 85

6. Yong-Gang Yao, Qing-Peng Kong 2002 "Phylogeographic Differentiation of Mitochondrial DNA in Han Chinese" Am. J. Hum. Genet. 70:635–651