

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

-----

**Lê Xuân Toàn**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG BỘ KIT PREPFILER® TRONG TÁCH  
CHIẾT ADN NHÂN TẾ BÀO TỪ HÀI CỐT PHỤC VỤ CÔNG TÁC  
GIÁM ĐỊNH ADN TẠI VIỆT NAM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

**Hà Nội - 2015**

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

-----  
**Lê Xuân Toàn**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG BỘ KIT PREPFILER® TRONG TÁCH  
CHIẾT ADN NHÂN TẾ BÀO TỪ HÀI CỐT PHỤC VỤ CÔNG TÁC  
GIÁM ĐỊNH ADN TẠI VIỆT NAM**

**Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 60420114**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS.TS. NGUYỄN VĂN HÀ**

**PGS.TS. BÙI PHƯƠNG THUẬN**

**Hà Nội - 2015**

### **Lời cảm ơn**

Để hoàn thành bản luận văn này tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới Đại tá, PGS.TS. Nguyễn Văn Hà (Phó giám đốc Trung tâm giám định Sinh học Pháp lý - Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an) và PGS.TS. Bùi Phương Thuận (Trường Đại học Khoa học tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội) đã rất tận tình hướng dẫn tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành bản luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Lãnh đạo Viện Khoa học hình sự, Lãnh đạo Trung Tâm và các đồng nghiệp trong Trung tâm giám định Sinh học Pháp lý - Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an đã động viên, giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình làm luận văn.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo thuộc khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên đã tận tình truyền đạt kiến thức và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình và bạn bè, đã động viên, góp ý và tạo điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2015*

**Học viên**

**Lê Xuân Toàn**

**Lời cam đoan**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất cứ công trình nào khác.

Tác giả

**Lê Xuân Toàn**

## MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	44
1. Sự cần thiết của việc nghiên cứu đề tài.....	44
2. Mục đích nghiên cứu .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Chương 1. TỔNG QUAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1. Giám định ADN từ nhân tế bào trong Khoa học hình sự.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1.1. Lịch sử giám định ADN trong khoa học hình sự.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1.2. Giám định ADN .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2. Các kỹ thuật tách chiết ADN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2.1. Phương pháp tách chiết hữu cơ (phương pháp tách chiết bằng phenol/ chloroform/ Isoamyl Alcohol).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2.2. Phương pháp tách chiết bằng chelex .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2.3. Phương pháp tách chiết bằng cột silica .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2.4. Phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler®.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3. Cấu tạo xương, răng người và cơ sở để phân tích ADN xương, răng .	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3.1. Cấu tạo bộ xương người.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3.2. Phân tích ADN từ xương người.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3.3. Cơ sở để sử dụng bộ kit PrepFiler® trong việc tách chiết ADN từ hài cốt để phục vụ giám định ADN trong khoa học hình sự.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4. Các bộ kit khác có thể sử dụng để tách chiết ADN từ mẫu răng , xương .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4.1. QIAamp Investigator DNA Kit .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4.2. PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## **Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

- 2.1. Đối tượng nghiên cứu** .....**Error! Bookmark not defined.**
- 2.2. Dụng cụ và hoá chất thí nghiệm**.....**Error! Bookmark not defined.**
- 2.2.1. *Dụng cụ thí nghiệm* .....**Error! Bookmark not defined.**
- 2.2.2. *Hóa chất thí nghiệm* .....**Error! Bookmark not defined.**
- 2.3. Phương pháp nghiên cứu**.....**Error! Bookmark not defined.**
- 2.3.1. *Phương pháp làm sạch mẫu* .....**Error! Bookmark not defined.**
- 2.3.2. *Phương pháp nghiên cứu mẫu*.....**Error! Bookmark not defined.**
- 2.3.3. *Phương pháp tách chiết ADN bằng bộ kit PrepFiler®***Error! Bookmark not defined.**
- 2.3.4. *Định lượng sản phẩm ADN sau tách chiết*..**Error! Bookmark not defined.**
- 2.3.5. *Nhân bội sản phẩm ADN sau tách chiết bằng phản ứng PCR*..... **Error! Bookmark not defined.**
- 2.3.6. *Điện di và phân tích kết quả*.....**Error! Bookmark not defined.**

## **Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

- 3.1. Kết quả định lượng sản phẩm ADN sau tách chiết****Error! Bookmark not defined.**
- 3.2. Kết quả điện di đối với các mẫu răng và xương có thời gian dưới 2 năm** .....**Error! Bookmark not defined.**
- 3.2.1. *Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 1*....**Error! Bookmark not defined.**
- 3.2.2. *Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 2*....**Error! Bookmark not defined.**
- 3.2.3. *Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 3*....**Error! Bookmark not defined.**
- 3.2.4. *Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 4*....**Error! Bookmark not defined.**
- 3.2.5. *Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 5*....**Error! Bookmark not defined.**
- 3.2.6. *Đánh giá kết quả tách chiết ADN đối với các mẫu răng và xương có thời gian dưới 02 năm*.....**Error! Bookmark not defined.**
- 3.3. Kết quả tách chiết đối với các mẫu răng và xương có thời gian từ 02 - 10 năm:** .....**Error! Bookmark not defined.**

3.3.1. Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 6....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.2. Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 7....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.3. Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 8....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.4. Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 9....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.5. Phân tích kết quả điện di từ thí nghiệm 10..	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.6. Đánh giá kết quả tách chiết ADN đối với các mẫu răng và xương có thời gian từ 02 đến 10 năm .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3.4. So sánh kết quả phân tích ADN ở các mẫu hài cốt</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3.5. Quy trình tách chiết ADN nhân tế bào từ hài cốt bằng bộ kit PrepFiler®</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>45</b>

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. So sánh kiểu gen của 03 người nghi có quan hệ cha con
Bảng 2.1. Bố trí thí nghiệm đối với nhóm hài cốt có thời gian dưới 02 năm
Bảng 2.2. Bố trí thí nghiệm đối với nhóm hài cốt có thời gian từ 02 – 10 năm
Bảng 2.3. Nồng độ mẫu chứng khi Realtime PCR
Bảng 2.4. Thành phần của phản ứng PCR sử dụng bộ kit Identifiler
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt được sử dụng cho phản ứng PCR
Bảng 2.6. Thành phần của phản ứng PCR sử dụng bộ kit Identifiler
Bảng 2.7. Chu trình nhiệt được sử dụng cho phản ứng PCR
Bảng 2.8. Thành phần của hỗn hợp điện di trên máy ABI 3130
Bảng 3.1. Kết quả định lượng ADN tổng số từ thí nghiệm 1 đến thí nghiệm 5 đối với các mẫu hài cốt có thời gian dưới 02 năm

Bảng 3.2. Kết quả định lượng ADN tổng số từ thí nghiệm 6 đến thí nghiệm 10 đối với các mẫu hài cốt có thời gian từ 02 – 10 năm

Bảng 3.3. So sánh kiểu gen của mẫu R1, X1, R2, X2 với mẫu so sánh tương ứng

Bảng 3.4. So sánh kiểu gen của mẫu R3, X3, R4, X4 với mẫu so sánh tương ứng

Bảng 3.5. So sánh kiểu gen của mẫu R5, X5, R6, X6 với mẫu so sánh tương ứng

## DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Hình ảnh phân tích kết quả điện di bằng phần mềm GeneMapper ID v.3.2

Hình 1.2. Bộ kit PrepFiler®

Hình 1.3. Tỷ lệ thành công khi phân tích ADN ti thể tại các vị trí xương khác nhau trên cơ thể người

Hình 1.4. Cấu tạo xương dài

Hình 1.5. Cấu tạo răng hàm

Hình 2.1. Mẫu răng, xương có thời gian dưới 02 năm

Hình 2.2. Mẫu răng, xương có thời gian từ 02 - 10 năm

Hình 2.3. Ảnh kết quả Realtime PCR trên máy Eco™ Real-Time PCR System (hãng Illumina – Mỹ)

Hình 3.1. So sánh kết quả định lượng ADN tổng số từ thí nghiệm 1 đến thí nghiệm 4 đối với mẫu hài cốt có thời gian dưới 02 năm (răng số 1 và xương số 1)

Hình 3.2. So sánh kết quả định lượng ADN tổng số giữa thí nghiệm 3,6,7,8 và 9

Hình 3.3. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 1 - răng số 1

Hình 3.4. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 2 - răng số 1

Hình 3.5. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 3 - xương số 1

Hình 3.6. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 4 - răng số 1



Hình 3.7. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 5 - răng số 2

Hình 3.8. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 5 - răng số 3

Hình 3.9. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 6 - răng số 4

Hình 3.10. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 7 - răng số 4

Hình 3.11. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 7 - xương số 4

Hình 3.12. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 8 - răng số 4

Hình 3.12. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 9 - răng số 4

Hình 3.12. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 10 - răng số 5

Hình 3.12. Ảnh kết quả điện di của thí nghiệm 10 - răng số 6

### Danh mục chữ viết tắt

Chữ viết tắt	Cụm từ đầy đủ	Nghĩa tiếng việt
ADN, DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit đêoxiribonucleic
bp	Base pair	Cặp bazơ
DDT	Dithiothreitol	Dithiothreitol
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng khuếch đại gen
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn
rfu	Relative fluorescent units	Đơn vị huỳnh quang
rpm	Revolutions per minute	Số vòng quay mỗi phút

STR	Short Tandem Repeat	Các trình tự lặp lại ngắn
-----	---------------------	---------------------------

## MỞ ĐẦU

### 1. Sự cần thiết của việc nghiên cứu đề tài

Cùng với sự phát triển của xã hội, tình hình tội phạm càng ngày càng phức tạp, phương thức thủ đoạn phạm tội ngày càng tinh vi nên chỉ sử dụng những phương pháp giám định dấu vết truyền thống thông qua dấu vân tay, vải sợi... là không đủ cơ sở làm bằng chứng trong các vụ án. Ngày nay, nhờ có sự phát triển của công nghệ sinh học, với việc tìm ra cách tách chiết và phân tích ADN nhân tế bào ở nhân tế bào người, khi ứng dụng vào công tác điều tra, các điều tra viên có thể truy nguyên cá thể một cách chính xác thông qua những dấu vết tương chừng như rất nhỏ mà thủ phạm để lại như dấu vết máu, tế bào trên đầu lọc thuốc lá, bã kẹo cao su...

Hàng năm, Viện Khoa học hình sự nhận được rất nhiều trung cầu giám định ADN, trong đó dấu vết để lại trong các vụ án hình sự không chỉ là máu, lông tóc hay tinh dịch mà còn là tử thi chưa rõ tung tích hoặc chỉ là các bộ phận trên cơ thể. Khi đó việc giám định ADN từ các mẫu mô là rất khó khăn do tử thi đã bị thối rữa nhiều tháng, thậm chí đã phân hủy hoàn toàn qua nhiều năm, chỉ có thể giám định ADN

thông qua răng và xương còn sót lại của nạn nhân. Điển hình như các vụ án “xác chết không đầu”, “thảm mỹ viện Cát Tường”... là các vụ án rất được dư luận quan tâm.

Tuy nhiên, với các mẫu hài cốt, việc phân tích ADN nhân tế bào gặp rất nhiều khó khăn, nhưng bù lại nếu phân tích được, dù chỉ một vài locus cũng rất có giá trị, thậm chí giá trị truy nguyên còn cao hơn cả việc phân tích được toàn bộ gen ty thể của hài cốt đó. Đặc biệt đối với việc xác định danh tính hài cốt liệt sĩ, nếu chỉ giám định bằng hệ gen ty thể thì không thể phân biệt từng cá thể do đặc điểm di truyền theo dòng mẹ. Nhưng nếu thu được vài locus gen nhân tế bào, đã có thể truy nguyên chính xác danh tính của liệt sĩ, thông qua những người thân của họ. Mặt khác, đối với các hài cốt liệt sĩ thì lượng răng và xương thu được là hạn chế, nên cần phải tiến hành phân tích trên lượng mẫu tối thiểu do đó việc lựa chọn một quy trình tách chiết hiệu quả là bước

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Nguyễn Văn Hà (2011), *Nghiên cứu tối ưu hóa phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN ti thể từ răng, xương người phục vụ giám định ADN ti thể trong điều kiện Việt Nam*, Báo cáo đề tài nghiên cứu khoa học cấp bộ, Viện Khoa học hình sự, Tổng cục cảnh sát phòng chống tội phạm, Bộ Công an.
2. Hoàng Tử Hùng (2010), *Giải phẫu răng*, NXB Y học.
3. Hoàng Tử Hùng (2010), *Mô phôi răng miệng*, NXB Y học.
4. Hà Quốc Khanh, Nguyễn Văn Hà (2007), *Giám định ADN*, Viện khoa học hình sự,
5. Chu Văn Mẫn, Đào Hữu Hồ (2001), *Thống kê Sinh học*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
6. Ngô Tiên Quý (2008), *Bảo vệ và khám nghiệm hiện trường*, NXB Công an Nhân dân.
7. Ngô Tiên Quý (2013), *Phát hiện, thu, bảo quản, nghiên cứu và giám định dấu vết sinh vật*, NXB Công an Nhân dân.
8. Ngô Tiên Quý, Hà Quốc Khanh, Nguyễn Văn Hà và cộng sự (2005), *Giám định sinh học pháp lý*, Viện khoa học hình sự.
9. Lê Thị Thu Thủy (2012), *Khảo sát và xây dựng cơ sở dữ liệu tần suất các alen của 15 gen hệ Identifiler trong quần thể người Việt (Kinh) ứng dụng trong giám định gen (ADN) của lực lượng Kỹ thuật hình sự*, Báo cáo đề tài nghiên cứu khoa học cấp bộ, Viện Khoa học hình sự, Tổng cục cảnh sát phòng chống tội phạm, Bộ Công an.
10. Phạm Xuân Thủy, Hà Quốc Khanh (2010), *Dấu vết sinh vật và pháp y hình sự*, Giáo trình Học viện Cảnh sát Nhân dân.
11. Lê Đình Ván (2013), *Giải phẫu học*, NXB Y học.

### Tiếng Anh

12. Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, Della Manna A, Gross AM, Guerrieri RA, Luttmann JC, McClure DL (2009), "Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework", *Journal of Forensic Sciences*, 54, pp, 810-821.
13. Caragine T, Mikulasovich R, Tamariz J, Bajda E, Sebestyen J, Baum H, Prinz M (2009), "Validation of testing and interpretation protocols for

- low template DNA samples using AmpFISTR Identifiler”, *Croatian Medical Journal*, 50, pp, 250-267.
14. Gaines ML, Wojtkiewicz PW, Valentine JA, Brown CL (2002), “Reduced volume PCR amplification reactions using the AmpFISTR Profiler Plus kit”, *Journal of Forensic Sciences*, 47, pp, 1224-1237.
  15. Gilbert N (2010), “*Science in court: DNA’s identity crisis*”, *Nature*, 464, pp, 347-348.
  16. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J (2000), “*An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA*”, *Forensic Science International*, 112, pp, 17-40.
  17. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML, Turek SA (1998), “QIAamp Spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework”, *Journal of Forensic Sciences*, 43, pp, 1024-1030.
  18. John M, Butler (2005), *Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers*, Elsevier, USA.
  19. Kloosterman AD, Kersbergen P (2003), “Efficacy and limits of genotyping low copy number (LCN) DNA samples by multiplex PCR of STR loci”, *Soc Biol*, 197, pp, 351-359.
  20. Locard E (1930), “The analysis of dust traces—Part I”, *American Journal of Political Science*, 1, pp, 276–298.
  21. Mulero JJ, Chang CW, Lagacé RE, Wang DY, Bas JL, McMahon TP, Hennessy LK (2008), “Development and validation of the AmpFISTR MiniFiler PCR amplification kit: a miniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA”, *Journal of Forensic Sciences*, 53, pp, 838-852.
  22. Oorschot RA, Szepietowska I, Scott DL, Weston RK, Jones MK (1999), *Retrieval of genetic profiles from touched objects*, Proceedings of the First International Conference in Forensic Human Identification, London.
  23. Oorschot RAH, Phelan DG, Furlong S, Scarfo GM, Holding NL, Cummins MJ (2003), “Are you collecting all the available DNA from touched objects?”, *International Congress of the SER*, 1239, pp, 803-807.
  24. Park SJ, Kim JY, Yang YG, Lee SH (2008), “Direct STR amplification from whole blood and blood- or saliva-spotted FTA without DNA purification”, *Journal of Forensic Sciences*, 53, pp, 335-341.

25. Prinz M, Schiffner L, Sebestyén JA, Bajda E, Tamariz J, Shaler RC, Baum H, Caragine T (2006), “Maximization of STR DNA typing success for touched objects”, *International Congress of the SER*, 1288, pp, 651-653.
26. Raymond JJ, Walsh SJ, van Oorschot RAH, Gunn PR, Evans L, Roux C (2008), “Assessing trace DNA evidence from a residential burglary: abundance, transfer and persistence”, *Forensic Science International Genet Suppl Ser*, 1, pp, 442-443.
27. Schiffner L, Bajda E, Prinz M, Sebestyén J, Shaler R, Caragine T (2005), “Optimization of a simple, automatable extraction method to recover sufficient DNA from low copy number DNA samples for generation of short tandem repeat profiles”, *Croatian Medical Journal*, 46, pp, 578-586.
28. Smith PJ, Ballantyne J (2007), “Simplified low-copy-number DNA analysis by post-PCR purification”, *Journal of Forensic Sciences*, 52, pp, 820-829.
29. Timothy P McMahon (2015), “Post Mortem Affects on DNA, DNA Extraction and Challenged DNA Processing”, *American Registry of Pathology Contractor*, 3, pp 10 – 50.
30. Weston AA, Nagel JHA, Benschop CCG, Weiler NEC, de Jong BJ, Sijen T (2009), “Higher capillary electrophoresis injection settings as an efficient approach to increase the sensitivity of STR typing”, *Journal of Forensic Sciences*, 54, pp, 591-598.
31. Wickenheiser RA (2002): “Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact”, *Journal of Forensic Sciences*, 47, pp, 442-450.
32. Wickenheiser RA, Jobin RM (1999), “Case of comparison of DNA recovered from a contact lens using PCR DNA typing”, *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 32, pp, 67-73.