

## GIẢI TRÌNH TỰ VÙNG HVI, HVII CỦA DNA TY THỂ NGƯỜI

## HVI, HVII SEQUENCING OF HUMAN MITOCHONDRIAL DNA

TRƯƠNG THẾ QUANG<sup>(\*)</sup>

**TÓM TẮT:** Nghiên cứu xây dựng quy trình giải trình tự vùng HVI, HVII của DNA ty thể người. Phân loại và đánh giá mẫu theo hai tiêu chí khối lượng và chất lượng. Xây dựng đường chuẩn Singleplex Real - Time PCR để nhân bản và định lượng DNA đích, xác định được giá trị Ct cũng như Tm cho các vùng HVI, HVII đảm bảo cho quá trình giải trình tự thành công. Tiêu chuẩn để quá trình giải trình tự vùng HVI thành công là Ct = 33, Tm = 80 ÷ 83 °C; Tiêu chuẩn để quá trình giải trình tự vùng HVII thành công là Ct = 30, Tm = 83 ÷ 85 °C. Giải trình tự các vùng HVI và HVII hoàn chỉnh cho 10/14 mẫu chiếm tỷ lệ 52,63%. Đặc biệt, cũng giải trình tự thành công cho 5 mẫu xương bị thoái hóa nặng ở nhóm 3, là nhóm không đạt cả hai tiêu chí khối lượng và chất lượng. Ở trình tự HVI, có sự xuất hiện chuỗi homopoly C (≥ 8C) ít hơn trình tự HVII khoảng 5 lần, do đó nhất thiết phải giải trình tự hai chiều.

**Từ khóa:** giải trình tự, HVI, HVII, DNA ty thể.

**ABSTRACT:** Research about HVI, HVII sequencing process of human mitochondrial DNA. Classify and evaluate samples according to both mass and quality criteria. Construct Singleplex Real-Time PCR calibration curve to both duplicate and quantify the target DNA and determine Ct as well as Tm values for HVI and HVII regions to ensure successful sequencing. The standard for successful HVI sequencing is Ct = 33, Tm = 80 ÷ 83 °C; The standard for successful HVII sequencing is Ct = 30, Tm = 83 ÷ 85 °C. HVI and HVII regions were sequenced in 10 out of 14 samples, accounting for 52.63 %. In particular, the successful sequencing of 5 severely deformed bone samples in Group 3 was not achieved in both mass and quality criteria. In the HVI sequence there appears a homopoly string C (≥ 8C) less than the HVII sequence of about 5, so it is necessary to two-dimensional sequence.

**Key words:** sequencing, HVI, HVII, mitochondrial DNA.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vùng điều khiển D - Loop (Displacement Loop) của bộ gen ty thể hay DNA ty thể viết tắt là mtDNA (mitochondrial Deoxyribo Nucleic Acid) người với các ưu điểm như di truyền độc

lập với DNA nhân, tần số đột biến cao, di truyền theo dòng mẹ, không tái tổ hợp và số lượng bản sao lớn đã giúp cho DNA ty thể trở thành công cụ hữu hiệu trong sinh học phân tử và di truyền, đặc biệt là vùng siêu biến HVI (Hypervariable region I, nt 16024

<sup>(\*)</sup> TS. Trường Đại học Văn Lang, Email:truongthequang@vanlanguni.edu.vn

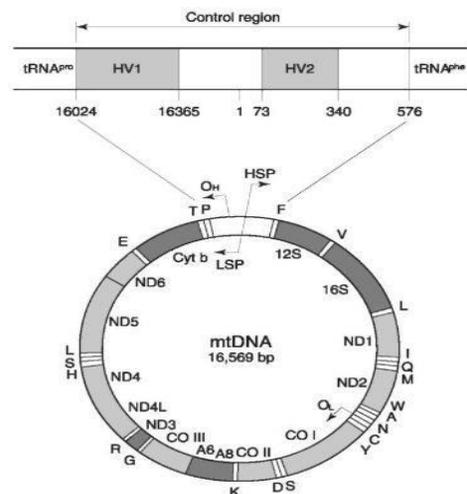
- 16365) và vùng siêu biến HVII (Hypervariable region II, nt 57 - 372).

Các nghiên cứu trong nước về cấu trúc DNA ty thể người và trình tự vùng D - Loop đã được công bố trong các năm gần đây: Nghiên cứu ứng dụng phân tích trình tự đoạn HVI vào việc giám định quan hệ huyết thống [3]; Nghiên cứu phân tích phần lớn trình tự vùng D - Loop với kích thước 670 bp bao gồm hầu như toàn bộ đoạn HV1, toàn bộ đoạn bảo thủ xen giữa HVII và HVII của năm cá thể người Việt Nam thuộc ba dân tộc Kinh, Tày và H' Mông, đây cũng là cơ sở dữ liệu đầu tiên mở đầu cho các nghiên cứu tiếp theo về giải mã DNA ty thể người Việt Nam [2]. Năm 2014, một công trình nghiên cứu được báo cáo với mục tiêu xác định đa dạng di truyền của đoạn HVI và HVII trên DNA ty thể của người Mường ở Việt Nam [5]. Đến năm 2015, đề tài “*Đa hình gen ty thể HVI và HVII trên một nhóm người dân tộc Kinh ở Việt Nam*” của Trường Đại Học Y, Hà Nội công bố với mục tiêu nghiên cứu xác định đa hình trên hai gen HVI và HVII, từ đó phân loại sơ bộ DNA ty thể theo các nhóm đơn bội và dưới đơn bội của 50 mẫu nghiên cứu người Kinh ở Việt Nam [7].

Ở nước ngoài, nghiên cứu đầu tiên về trình tự hoàn chỉnh của DNA ty thể người được Anderson và các cộng sự công bố vào năm 1981 [1], đánh dấu sự khởi đầu cho các đề tài nghiên cứu sau này về DNA ty thể người ra đời và phát triển mạnh mẽ. Các nghiên cứu về hai vùng siêu biến HVI và HVII không chỉ dừng lại ở mức cá thể điển hình giám định quan hệ huyết thống mà còn phát triển hơn trong quần thể, nhằm tìm hiểu mối quan hệ di truyền của các cá thể ở

những vùng địa lý khác nhau, nguồn gốc của các dân tộc trên thế giới [4]. Cho đến nay, đã có trên 300 trình tự hoàn chỉnh của bộ gen ty thể người thuộc các chủng tộc người và dân tộc khác nhau được nghiên cứu và đăng ký tại Ngân hàng Gen quốc tế (GenBank). Các công bố này cho thấy, trình tự DNA ty thể của các chủng tộc và dân tộc khác nhau có những khác biệt. Với tần số đột biến cao, nhiều điểm đa hình nên vùng điều khiển D - Loop, đặc biệt là vùng gen HVI, HVII được tập trung nghiên cứu nhiều hơn cả, trong đó có các nghiên cứu về các dân tộc người Trung Quốc, Thái Lan, Nhật Bản, Hàn Quốc là những chủng tộc người có mối quan hệ địa lý, chủng tộc rất gần gũi với các dân tộc người Việt Nam.

Hiện nay, việc tìm kiếm thông tin của người dựa vào hồ sơ DNA nhân rất hạn chế và hầu như không có khả năng lập được đối với những mẫu ở trạng thái thoái hóa nặng. Trong khi đó, việc lập hồ sơ DNA ty thể thành công hơn DNA nhân, cung cấp một phần thông tin theo dòng mẹ, góp phần phân nhóm mẫu cho việc phân tích mối quan hệ huyết thống.



**Hình 1.** Cấu trúc gen ty thể người (Nguồn: Parsons, et al., 1997 [6])

## 2. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

### 2.1. Mục tiêu nghiên cứu

Giải trình tự vùng HVI, HVII của DNA ty thể người bằng phương pháp Real - Time PCR, là phương pháp mới giúp quá trình giải trình tự được nhanh chóng, đạt chất lượng và hiệu quả cao trong việc lập hồ sơ DNA người. Nghiên cứu được thực hiện vào năm 2015 tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử thuộc Viện Pháp y Thành phố Hồ Chí Minh.

### 2.2. Nội dung nghiên cứu

Ứng dụng phản ứng Real - Time PCR kết hợp phân tích đỉnh chảy của các sản phẩm nhân bản nhằm định lượng sản phẩm đặc hiệu đảm bảo quá trình giải trình tự vùng HVI, HVII thành công. Trong đó, việc tiến hành xây dựng đường chuẩn là quan trọng vì giúp nhanh chóng loại các mẫu không đạt yêu cầu. Các kết quả giải trình tự sẽ được so sánh với trình tự chuẩn Cambridge đã chỉnh sửa rCRS (revised Cambridge Reference Sequence) để khảo sát các điểm đa hình đơn.

## 3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 3.1. Đánh giá chất lượng và phân loại mẫu

Đánh giá chất lượng và phân loại mẫu theo hai tiêu chí khối lượng và chất lượng. Tiêu chí khối lượng sử dụng bộ kit ly trích DNA IQ™ (hãng Promega), cho thấy việc sử dụng 2g khối lượng bột xương sẽ thu được DNA tốt nhất. Tiêu chí chất lượng cảm quan mẫu càng cứng chắc thì xác suất DNA nguyên vẹn càng cao.

### 3.2. Tiền trích ly

Làm sạch mẫu và loại bỏ khoáng vô cơ trong mẫu bằng dung dịch Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA). EDTA

có cấu trúc dạng vòng được sử dụng để cô lập ion kim loại có hóa trị II và III bằng cách kết hợp với kim loại bởi 4 nhóm carboxylate và 2 nhóm amin.

### 3.3. Trích ly DNA bằng hạt từ

Dùng tính năng hấp phụ DNA của hạt từ được phủ silica để hấp phụ nucleic acid khỏi hỗn hợp ly giải. Quá trình hấp phụ này dựa trên sự tương tác tĩnh điện giữa nhóm diethyl aminoethyl (DEAE) và nhóm phosphate của phân tử DNA.

Trích ly DNA từ mẫu bột xương bằng bộ kit DNA IQ™ theo quy trình hãng hướng dẫn. Mẫu sau khi loại bỏ các khoáng vô cơ sẽ được ly giải và giải phóng DNA ra khỏi tế bào xương nhờ proteinase K. Lúc này hạt từ DNA IQ Resin được bổ sung vào để hấp phụ các DNA, sau đó tube được đặt vào giá từ để cố định phức hợp DNA - hạt từ và các thành phần khác trong dịch ly giải tế bào sẽ bị loại bỏ. Các hạt từ có gắn DNA sẽ được làm sạch với dung dịch rửa và cuối cùng DNA được thu nhận ở bước dung dịch với dung dịch TE.

### 3.4. Khuếch đại trình tự vùng HVI và HVII bằng phương pháp Real - Time PCR

Sử dụng phần mềm Primer premier 6.0 để thiết kế hai cặp mồi (primer) cho trình tự HVI và HVII của bộ gen ty thể dựa trên trình tự rCRS của Andrews đã được công bố vào năm 1999. Xác định hàm lượng của trình tự HVI, HVII bằng phân tử gắn huỳnh quang EvaGreen vào dsDNA. Dùng bộ kit Kapa 2G Robust Hotstart Readymix (2X) xây dựng phản ứng định lượng với 5 đường chuẩn và thực hiện phản ứng Real - Time PCR trên máy LightCycler® Nano Real - Time PCR System của hãng Roche. Chu trình luân kỳ nhiệt theo Bảng 1.

**Bảng 1.** Chu trình luân kỳ nhiệt của phản ứng Real – Time PCR

Công đoạn	Nhiệt độ (°C)	Tốc độ gia nhiệt (giây)	Thời gian (giây)
<i>Chương trình PCR (35 ÷ 40 chu kỳ)</i>			
Tiền biến tính	95	5,0	180
Biến tính	90	2,5	5
Bắt cặp	55	2,5	15
Kéo dài mạch	72	2,5	10
Kéo dài sau cùng	95	5,0	120
<i>Phân tích đỉnh chảy</i>			
Giai đoạn đầu	60	4,0	15
Giai đoạn cuối	90	0,5	15

### 3.5. Tinh sạch sản phẩm PCR

Sản phẩm sau khi chạy PCR còn những tạp chất, những tạp chất này cần được loại bỏ vì chúng có khả năng ảnh hưởng đến phản ứng giải trình tự Sanger. Sử dụng kit Wizard® SV Gel and PCR Clean - Up System (hãng Promega) để DNA bám lên màng silica, phần còn lại là các sản phẩm không đặc hiệu sẽ nằm lại trong pha lỏng. Dưới tác dụng của lực ly tâm, các sản phẩm không đặc hiệu sẽ bị loại bỏ. Cuối cùng, dùng nước đã khử nucleases để dung giải DNA ra khỏi màng silica.

### 3.6. Điện di

Kiểm định chất lượng sản phẩm PCR, tiến hành điện di mẫu sản phẩm PCR trên gel agarose 2% với dung dịch đệm TBE ở hiệu điện thế 150V, thời gian điện di 30 ÷ 45 phút. Nhuộm gel với màu nhuộm GelRed (hãng Biotium) 1,5 µl/100 ml dung dịch TBE, thời gian nhuộm 30 phút. Quan

sát và chụp ảnh gel dưới hệ thống đọc gel KETA (hãng WEALTEC).

### 3.7. Giải trình tự HVI và HVII

Điện di mao quản trên hệ thống 3130 Genetic Analyzer (hãng Life Technologies) để giải trình tự vùng HVI và HVII của các mẫu với BigDye Terminator v 3.1/v 1.1 Cycle Sequencing Kit. Phương pháp điện di mao quản hoạt động dựa trên nguyên tắc giải trình tự tự động dùng ddNTP của Sanger, đây là phản ứng Cycle Sequencing thực hiện cùng lúc 4 phản ứng của phương pháp Sanger trong 1 tube. Đối với giải trình tự vùng HVI và HVII của mtDNA, hệ thống ghi nhận sự sai khác 1 nucleotide.

### 3.8. Phân tích điểm đa hình

Đa hình đơn SNP (Single Nucleotide Polymorphism) là những khác nhau một nucleotide trong trình tự bộ gen của các cá thể trong quần thể. Các vị trí thể hiện SNP trong hệ gen là nơi mà ở đó chuỗi DNA được phân biệt bởi một base duy nhất khi hai hoặc nhiều cá thể được so sánh. SNP là

dạng thay đổi trình tự gen phổ biến nhất cho tới nay, ở người 90% thay đổi trình tự là thay đổi nucleotide đơn, cứ 1000 bp có 1 SNP [8].

Phân tích điểm đa hình đơn SNP của hai vùng HVI và HVII của mtDNA mẫu, chúng tôi sử dụng trình tự rCRS được Andrews và cộng sự công bố làm chuẩn để đối chiếu. Trình tự này có thể tải xuống từ NCBI (National Center for Biotechnology Information) với số mã hóa của bộ gen ty thể là NC\_012920.1. Trong đó vị trí vùng HVI: 16024..16365; HVII: 73..340. Ứng dụng phần mềm phân tích gene Sequencing Analysis version 5.4 để phân tích trình tự DNA. Sau đó, dùng phần mềm Seqscape version 3.0 để khảo sát tính đa hình của trình tự mẫu vật khi đem đối chiếu với trình tự chuẩn rCRS.

#### 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### 4.1. Đánh giá chất lượng và phân loại mẫu

Căn cứ tiêu chuẩn khối lượng và chất lượng để đánh giá và phân loại 14 mẫu xương người cần giám định huyết thống được chia thành ba nhóm. Nhóm 1 gồm hai mẫu, ký hiệu R1, R2. Nhóm 2 gồm sáu

mẫu, ký hiệu R3, R4, R5, R6, R7, R8. Nhóm 3 gồm sáu mẫu, ký hiệu R9, R10, R11, R12, R13, R14. Đánh giá và phân loại mẫu theo khối lượng và chất lượng được nêu trong Bảng 2.

**Bảng 2.** Đánh giá và phân loại mẫu xương người

Nhóm	Mẫu	Chất lượng	Khối lượng
1	R1	Tốt	Đủ
	R2	Tốt	Đủ
2	R3	Tốt	Không đủ
	R4	Tốt	Không đủ
	R5	Tốt	Không đủ
	R6	Tốt	Không đủ
	R7	Xấu	Đủ
	R8	Xấu	Đủ
3	R9	Xấu	Không đủ
	R10	Xấu	Không đủ
	R11	Xấu	Không đủ
	R12	Xấu	Không đủ
	R13	Xấu	Không đủ
	R14	Xấu	Không đủ

##### 4.2. Kết quả Real - Time PCR

Kết quả thiết kế hai cặp môi khuếch đại các vùng trình tự HVI, HVII của bộ gen ty thể người bằng phương pháp Real - Time PCR, xem Bảng 3.

**Bảng 3.** Các cặp môi khuếch đại vùng trình tự HVI, HVII bằng phương pháp Real – Time PCR

Tên vùng	Đoạn môi	Trình tự 5'– 3'	Tm (°C)
HVI	mtF15973	AACTCCACCATTAGCACCCAAAG	52
	mtR16418	ATTTACGGAGGATGGTGGTCA	
HVII	mtF16	ACCCTATTAACCACTCAC	52
	mtR632	GTGAGCCCGTCTAACATT	

Đối với nhóm 1, trình tự vùng HVI cả hai mẫu R1 và R2 đều không xuất hiện sản phẩm phụ cũng như đạt cả hai chỉ tiêu chu kỳ ngưỡng Ct và nhiệt độ nóng chảy Tm, có nghĩa là cả hai mẫu trên đạt đủ lượng DNA mục tiêu. Nhưng, ở trình tự vùng

HVII, mẫu R2 xuất hiện peak sản phẩm phụ nên mẫu này sẽ bị loại bỏ. Kết quả, Ct mẫu R1 là 26 và Tm là 84<sup>0</sup>C, đây là hai giá trị tương ứng DNA mục tiêu. Trong khi đó, mẫu R2 cho Ct là 36 và Tm có 2 đỉnh tại nhiệt độ 78<sup>0</sup>C và 83<sup>0</sup>C, điều này cho thấy lượng DNA mục tiêu thấp và xuất hiện sản

phẩm phụ có thể là primer - primer (Bảng 4). Vậy ở nhóm 1, chỉ có 1 mẫu R1 đạt yêu cầu Ct và Tm khi khuếch đại cả hai trình tự vùng HVI và HVII.

**Bảng 4.** Kết quả Real – Time PCR nhóm 1

Nhóm	Mẫu	HVII	
		Ct	Tm (°C)
1	R1	26	84
	R2	36	78/83

Đối với nhóm 2, trình tự vùng HVI cả 6 mẫu đều đạt yêu cầu về Ct và Tm, nhưng đối với vùng HVII, chỉ có 4 mẫu đạt yêu cầu về Ct và Tm, hai mẫu R3 và R8 xuất hiện peak sản phẩm phụ có thể là dimer - primer kế peak sản phẩm chính khi phân tích Tm của chúng nên hai mẫu R3 và R8 bị loại. Còn lại, các mẫu R4 đến R7 không xuất hiện sản phẩm phụ và Ct đạt yêu cầu nên sẽ được giải trình tự về sau. Vậy ở nhóm 2, có 4 mẫu R4, R5, R6, R7 đạt yêu cầu Ct và Tm khi khuếch đại cả hai trình tự vùng HVI và HVII (Bảng 5).

**Bảng 5.** Kết quả Real - Time PCR nhóm 2

\	Mẫu	HVII	
		Ct	Tm (°C)
2	R3	36	78/83
	R4	36	77
	R5	38	78
	R6	30	85
	R7	30	85
	R8	36	82/85

Đối với nhóm 3, kết quả khuếch đại vùng trình tự HVI và HVII ghi nhận có 5 mẫu hoàn chỉnh cả hai vùng và 1 mẫu

(R13) chỉ có trình tự vùng HVI. Theo kết quả Real - Time PCR của mẫu R13 xuất hiện peak sản phẩm phụ nên mẫu này bị loại (Bảng 6).

**Bảng 6.** Kết quả Real – Time PCR nhóm 3

Nhóm	Mẫu	HVII	
		Ct	Tm (°C)
3	R13	38	82/85

Sau khi thực hiện phản ứng Real - Time PCR cho 14 mẫu của 3 nhóm phân loại trên, chúng tôi có 10 mẫu đạt Ct và Tm, đạt đủ DNA mục tiêu để giải trình tự cả hai vùng HVI và HVII.

Nhóm 1: Mẫu R1;

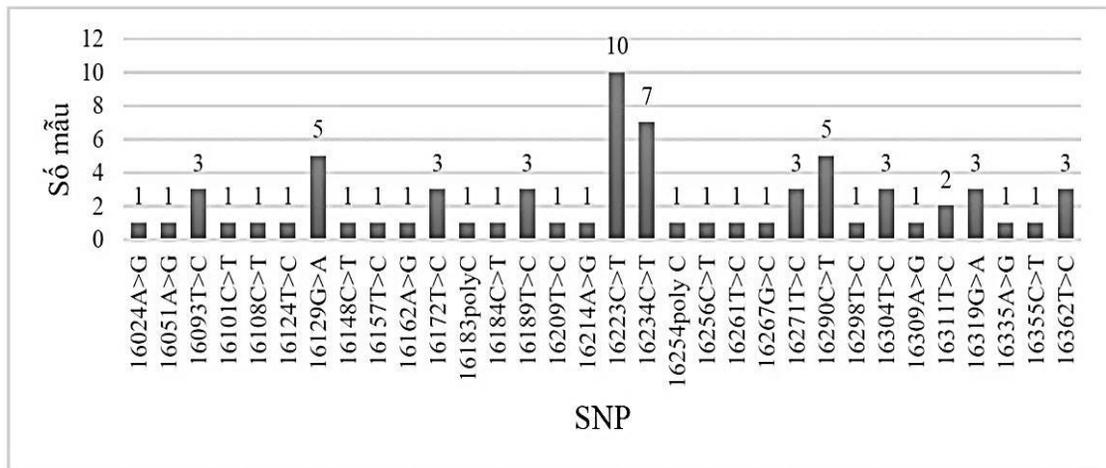
Nhóm 2: Mẫu R4, R5, R6, R7;

Nhóm 3: Mẫu R9, R10, R11, R12, R14.

Để kiểm tra lại quy trình, tiến hành phản ứng Real - Time PCR cho 13 mẫu máu đối chứng. Kết quả cho thấy cả 13 mẫu máu này đều đạt Ct và Tm, không có peak sản phẩm phụ nên cả 13 mẫu máu và 10 mẫu xương trên sẽ được dùng để giải trình tự vùng HVI và HVII.

Như vậy, việc xác định giá trị ngưỡng Ct có vai trò nhất định trong việc định lượng tương đối hàm lượng gen mục tiêu HVI, HVII cho quá trình giải trình tự. Kỹ thuật Real - Time PCR được sử dụng trong quy trình này có ý nghĩa trong việc đánh giá chất lượng, nồng độ gen mục tiêu ban đầu hiện diện trong mẫu xương và phản ánh khả năng thành công của việc giải trình tự sau này.

### 4.3. Kết quả giải trình tự và phân tích trình tự vùng HVI và HVII

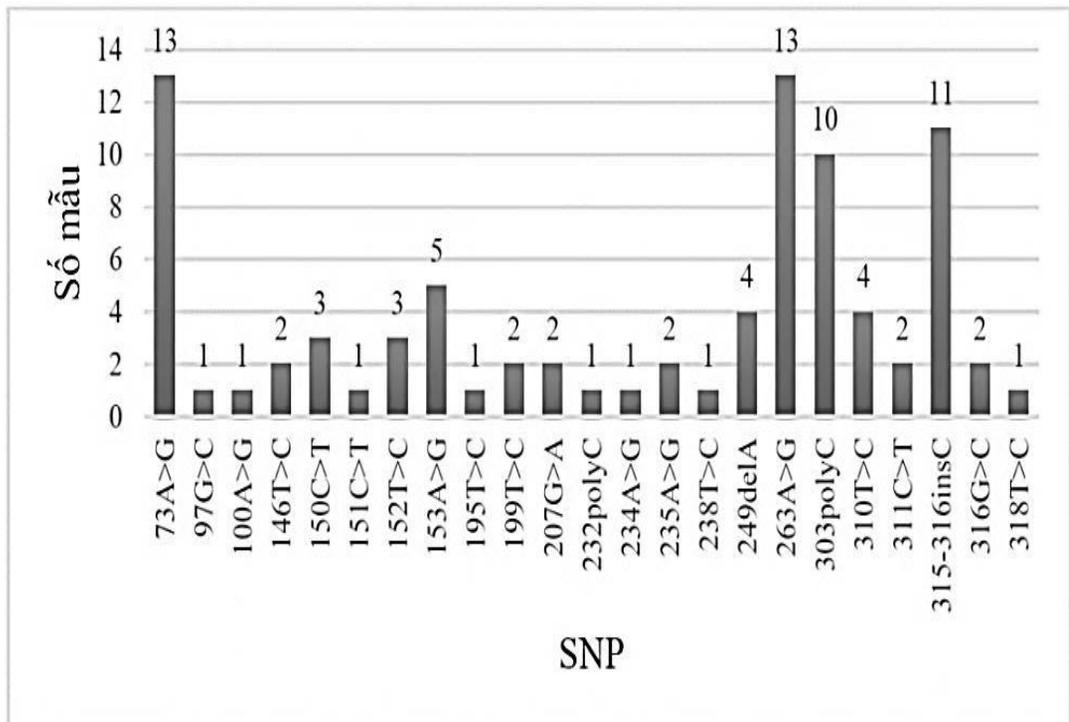


**Hình 2.** Sự phân bố các SNP ở trình tự vùng HVI

Dựa vào đặc điểm của hai vùng trình tự HVI, HVII của mtDNA người là vùng chứa các SNP đặc trưng cho mỗi chủng tộc, tiến hành khảo sát mức độ biến thiên và với mong muốn xác định được các SNP đặc trưng cho người Việt Nam ở hai trình tự này để có thể làm tiền đề cho các nghiên cứu về sau. Tiến hành giải trình tự 23 mẫu trên, gồm 13 mẫu máu và 10 mẫu xương và so sánh với trình tự chuẩn rCRS để khảo sát SNP. Với sự phân bố các SNP trên trình tự HVI (Hình 2), cho thấy trong 342 nucleotide vùng HVI tổng cộng có 32 SNP, chiếm tỷ lệ 9,4 % tổng số nucleotide. Trong đó, base cytosine ở vị trí 16223 biến thành thymine chiếm tỷ lệ nhiều nhất là 43,5 % so với tổng số 23 người (10 người có cùng SNP này), base cytosine ở vị trí 16234 biến thành thymine hiện diện ở 7 người, base guanine ở vị trí 16129 biến thành adenine hiện diện ở 5 người, base cytosine ở vị trí 16290 biến thành thymine hiện diện ở 5 người. Chuỗi homopoly C (từ 8C liên tiếp trở lên) xuất hiện ở 2 người chiếm tỷ lệ 8,7%.

Sự phân bố các SNP ở trình tự HVII cho thấy, trong 268 nucleotide đã có 23 SNP, chiếm tỷ lệ 8,6 %. Trong đó 13 người có cùng 2 SNP, đó là base adenine biến thành guanine tại vị trí số 73 và vị trí 263, kể đến là ở 11 người có cùng SNP tại vị trí 315 – 316 với base cytosine được thêm vào (Hình 3). Bên cạnh đó, chuỗi homopoly C (từ 8C liên tiếp trở lên) xuất hiện tại vị trí 303 ở 10 người chiếm tỷ lệ 43,5 %.

Với sự phân bố trên, hai trình tự HVI và HVII, chúng tôi nhận thấy rằng, mức độ biến động (hay số SNP xuất hiện) khi so sánh giữa hai trình tự không có ý nghĩa thống kê ( $p > 5 \%$ , chi bình phương). Tuy nhiên, tỷ lệ xuất hiện của chuỗi homopoly C (từ 8C liên tiếp trở lên) ở trình tự HVII nhiều hơn HVI 6,5 lần, vì thế quá trình giải trình tự HVII sẽ không thành công như ở trình tự HVI. Điều này còn có thể giải thích cho kết quả giải trình tự của 6 mẫu không lập được đầy đủ hồ sơ mtDNA gồm 2 trình tự HVI và HVII, trong 6 mẫu trên, có 5 mẫu lập được trình tự HVI và chỉ có 1 mẫu lập được trình tự HVII.



**Hình 3.** Sự phân bố các SNP ở trình tự vùng HVII

## 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Từ những kết quả trên, chúng tôi xây dựng quy trình giải trình tự vùng HVI, HVII của DNA ty thể người như sau:

Phân loại và đánh giá mẫu theo hai tiêu chí khối lượng và chất lượng.

Khuếch đại trình tự vùng HVI, HVII:

Xây dựng đường chuẩn Singleplex Real - Time PCR để vừa nhân bản vừa định lượng DNA đích và xác định được giá trị Ct cũng như Tm cho các vùng HVI, HVII đảm bảo cho quá trình giải trình tự thành công. Tiêu chuẩn để quá trình giải trình tự vùng HVI thành công là Ct = 33, Tm = 80 ÷ 83 °C; Tiêu chuẩn để quá trình giải trình tự vùng HVII thành công là Ct = 30, Tm = 83 ÷ 85 °C.

Giải trình tự và phân tích trình tự các vùng HVI và HVII:

Đã giải trình tự các vùng HVI và HVII hoàn chỉnh cho 10 mẫu trong tổng số 14 mẫu (chiếm tỷ lệ 52,63%). Đặc biệt, cũng giải trình tự thành công cho 5 mẫu xương bị thoái hóa nặng ở nhóm 3 (nhóm không đạt cả 2 tiêu chí khối lượng và chất lượng). Ở trình tự HVI, có sự xuất hiện chuỗi homopoly C ( $\geq 8C$ ) ít hơn trình tự HVII khoảng 5 lần. Do đó, nhất thiết phải giải trình tự hai chiều.

Kiến nghị tiếp tục nghiên cứu với phạm vi rộng hơn:

Thử nghiệm quy trình với số lượng mẫu lớn hơn để nâng độ tin cậy của các giá trị khảo sát;

Kết hợp phân tích trình tự vùng HVI, HVII trên DNA ty thể với phân tích trình tự STR trên DNA nhân để có kết quả chính xác hơn trong việc lập hồ sơ DNA.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Anderson S. BA., Barrell B. G., et al. (1981), *Sequence and organization of the human mitochondrial genomes*, Nature, 290.
2. Huỳnh Thị Thu Huệ, Hoàng Thị Thu Yến, Nguyễn Đăng Tôn, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Đình Cường, Phan Văn Chí, Nông Văn Hải (2005), *Phân tích trình tự vùng điều khiển (D – Loop) trên genome ty thể của năm cá thể người Việt Nam*, Tạp chí Công nghệ sinh học, 3(1).
3. Lê Quang Huân, Trần Mỹ Linh, Vũ Thị Thu, Phan Minh Tuấn, Lê Trần Bình (2003), *Nghiên cứu giám định phả hệ bằng kỹ thuật DNA*, Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc lần thứ 2, Nghiên cứu cơ bản trong sinh học, nông nghiệp, y học, Huế, Nxb. Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
4. Monson Kea. (2002), *The mtDNA population database: an integrated software and database resource for forensic comparison*, Forensic Science Communications 4/2.
5. Nguyễn Thu Thúy, Trần Thúy Hằng, Tạ Thành Văn, Nguyễn Đức Hình, Trần Văn Khánh (2014), *Đa dạng di truyền đoạn siêu biến I và II trên DNA ty thể của dân tộc Mường ở Việt Nam*, Tạp chí Y học phụ trợ, 91(5).
6. Parsons T. J., Sullivan K., Allison Greiner R., Wilson M. R., Berry D. L., Holland K. A., Weedn V. W., Gill P., Holland M. M. (1997), *A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region*, Nature Genetics, 15.
7. Trần Thúy Hằng, Trần Huy Thịnh, Bùi Thị Minh Phượng, Trần Văn Khánh (2015), *Đa hình gen ty thể HVI và HVII trên một nhóm người dân tộc Kinh ở Việt Nam*, Tạp chí Nghiên cứu y học, 96(4).
8. Trương Thế Quang, Lê Ngọc Huyền (2015), *Nghiên cứu quy trình phân tích trình tự vùng HVI và HVII của DNA ty thể người sử dụng phương pháp Real – Time PCR*, Trường Đại học Văn Lang.

Ngày nhận bài: 26/09/2017. Ngày biên tập xong: 02/11/2017. Duyệt đăng: 02/01/2018