

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

NGUYỄN NHƯ GIANG

**KHẢO SÁT TẦN SUẤT CÁC ALEN TRONG CÁC
LOCUS GEN (ADN) HỆ IDENTIFILER CỦA
DÂN TỘC H'MÔNG PHỤC VỤ CÔNG TÁC
GIÁM ĐỊNH GEN Ở VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Đề tài:

**KHẢO SÁT TẦN SUẤT CÁC ALEN TRONG CÁC
LOCUS GEN (ADN) HỆ IDENTIFILER CỦA
DÂN TỘC H'MÔNG PHỤC VỤ CÔNG TÁC
GIÁM ĐỊNH GEN Ở VIỆT NAM**

Học viên : Nguyễn Như Giang
Chuyên ngành : Hóa Sinh
Mã số : 60 42 01 14
Người hướng dẫn : PGS. TS Nguyễn Văn Hà

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin được gửi lời cảm ơn tới các Thầy, cô đã giảng dạy tại Viện sinh thái và tài nguyên sinh vật - Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam đã truyền đạt cho tôi những kiến thức cơ bản và chuyên sâu về lĩnh vực Công nghệ sinh học, làm tiền đề cho tôi hoàn thành Luận văn tốt nghiệp.

Tôi cũng xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS Nguyễn Văn Hà - Phó giám đốc Trung tâm giám định sinh học pháp lý - Viện Khoa học hình sự đã tận tình hướng dẫn trong thời gian tôi thực hiện luận văn này.

Tôi xin cảm ơn Lãnh đạo Viện khoa học hình sự, Lãnh đạo Trung tâm giám định sinh học pháp lý, toàn bộ tập thể cán bộ Trung tâm đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình đã luôn tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình học cũng như hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Hà Nội, ngày 10 tháng 12 năm 2014

Học viên

Nguyễn Như Giang

CÁC KÍ HIỆU VIẾT TẮT

ADN	Axit Deoxyribonucleic
STR	Short Tandem Repeats
PCR	Polymerase chain Reaction
D8	D8S1179
D21	D21S11
D7	D7S820
CSF	CSF1PO
D3	D3 S1358
THO1	HUMTHO1
D13	D13S317
D16	D16S539
D2	D2 S1338
D19	D19S433
D18	D18S51
D5	D5 S818
χ^2	Khi bình phương thành phần thí nghiệm
χ_α	Khi bình phương tiêu chuẩn

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	5
1. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về khảo sát tần suất các alen của các locus gen sử dụng trong giám định ADN.....	5
1.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	5
1.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt nam	5
2. Giám định gen (ADN)	6
2.1. Cơ sở khoa học của giám định gen	6
2.1.1. Cấu trúc, chức năng của phân tử ADN	6
2.1.2. Cơ chế phân ly độc lập và tổ hợp tự do trong sinh sản hữu tính	7
2.2. Lịch sử phát triển giám định ADN	8
2.3. Khái niệm giám định gen (ADN).....	10
2.4. Khái niệm về locus và alen	12
2.5. Các tiêu chuẩn cho locus STR dùng trong giám định ADN.....	13
2.6. Ý nghĩa của cơ sở dữ liệu tần suất alen của các locus STR.....	14
CHƯƠNG 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
1. Nội dung nghiên cứu:.....	16
2. Phương pháp nghiên cứu:	16
2.1. Thu mẫu:	16
2.2. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ:	17
2.2.1. Hóa chất và thiết bị cho tách chiết ADN	17
2.2.2. Hóa chất và thiết bị cho định lượng ADN	18
2.2.3. Hóa chất và thiết bị cho nhân bội và điện di.....	18
2.3. Phân tích mẫu	18
2.3.1. Tách chiết mẫu bằng chelex.....	18
2.3.2. Định lượng ADN bằng Realtime PCR.....	19
2.3.3. Nhân bội ADN (PCR).....	20
2.3.4. Điện di trên máy điện di mao dẫn (Capillary Electrophoresis- CE)	22

2.4. Xử lý thống kê số liệu và tính tần suất các locus gen	25
2.4.1. Cơ sở lý thuyết	25
2.4.2. Phương pháp xử lý thống kê	25
2.4.3. Các bước tính toán thống kê và kiểm định tiến hành trên phần mềm Excel:.....	26
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN.....	27
1. Kết quả.....	27
1.1. Thu mẫu	27
1.2. Phân tích mẫu thu được kiểu gen theo yêu cầu và lập được bảng kiểu gen của 120 cá thể. (Xem bảng 3 - phụ lục).....	27
1.3. Xử lý số liệu thống kê (Xem bảng 3.1 đến 3.15); tính được bảng tần suất của các mẫu nghiên cứu (Xem bảng 3.16 đến 3.30); và so sánh với một số quần thể người Việt và người nước ngoài (Xem bảng 3.31 đến 3.45).....	27
1.3.1. Xử lý số liệu thống kê	27
1.3.2. Bảng tần suất của các mẫu nghiên cứu	49
Bảng kết quả và thảo luận cơ sở dữ liệu tần suất phân bố các alen của 15 locus gen (gồm bảng 3.16 đến bảng 3.30)	49
1.3.3. Kết quả so sánh tần suất alen của người H'Mông với một số người tộc người (xem Bảng từ 3.31 đến 3.45) và biện luận :	56
2. Bàn luận	68
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	69
1. Kết luận	69
2. Kiến nghị.....	70
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	
ỨNG DỤNG ĐỀ TÀI	

DANH MỤC CÁC HÌNH, BẢNG BIỂU

- Hình 1.** Cấu trúc ADN trong nhân tế bào (trang 7)
- Hình 2.** Các locus gen hệ Identifiler (trang 24)
- Bảng 2.1.** Thành phần phản ứng Realtime PCR (trang 20)
- Bảng 2.2.** Chu trình nhiệt của phản ứng PCR trên máy realtime 7500 (trang 20)
- Bảng 2.3.** Thành phần của phản ứng PCR (trang 22)
- Bảng 2.4.** Chu trình nhiệt trên máy PCR 9700 (trang 22)
- Bảng 2.5.** Thành phần của hỗn hợp điện di (trang 24)
- Bảng 3.1 đến 3.15.** Xử lý số liệu thống kê (trang 27 đến trang 46)
- Bảng 3.16 đến 3.30** Bảng tần suất alen của 120 mẫu nghiên cứu (trang 49 đến trang 55)
- Bảng 3.31 đến 3.45.** So sánh tần suất alen với một số quần thể (trang 56 đến trang 67)
- Bảng 1:** Danh sách người H' Mông được thu mẫu (Phần phụ lục)
- Bảng 2:** Kết quả định lượng 120 mẫu ADN của 120 cá thể người H'Mông (Phần phụ lục)
- Bảng 3:** Kết quả kiểu gen 120 cá thể người H' Mông (kí hiệu HM1 đến HM120) (Phần phụ lục)

MỞ ĐẦU

Cơ sở khoa học, thực tiễn và tính cấp thiết của việc nghiên cứu đề tài:

Người đầu tiên đặt nền móng cho ngành di truyền học là Mendel. Ông là người đầu tiên phát hiện ra các quy luật di truyền. Mendel đã gọi những đặc điểm được truyền từ thế hệ này qua thế hệ khác là “nhân tố di truyền”, mà sau này được gọi là gen.

Trong nhân tế bào, các nhiễm sắc thể sắp xếp thành 23 cặp, trong đó 22 cặp nhiễm sắc thể thường và 1 cặp nhiễm sắc thể giới tính. Các cặp nhiễm sắc thể này quy định các tính trạng khác nhau của cơ thể, được bảo tồn duy trì trong thế hệ và được di truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác. Con cái được thừa hưởng các đặc tính di truyền thông qua 23 nhiễm sắc thể từ tinh trùng của bố và 23 nhiễm sắc thể từ tế bào trứng của mẹ. Xét nghiệm truy nguyên cá thể người cũng như xác định huyết thống trực hệ cha - con, mẹ - con chủ yếu được thực hiện bằng cách sử dụng các marker ADN nằm trên các NST trong nhân tế bào. Ngoài ra phân tích các marker trên nhiễm sắc thể Y còn có thể xác định quan hệ huyết thống theo dòng cha.

ADN thường được coi là vật liệu di truyền ở cấp độ phân tử tham gia quyết định các tính trạng. Trong quá trình sinh sản, phân tử ADN được nhân đôi và truyền cho thế hệ sau. Năm 1953, Watson và Crick đã xây dựng mô hình cấu trúc không gian của phân tử ADN. Theo hai ông, ADN có cấu trúc từ hai sợi xoắn kép có phân tử lượng rất lớn, mỗi sợi ADN là một chuỗi xoắn nucleotid gồm 4 loại bazơ nitơ: Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) và Thymin (T) sắp xếp kế tiếp nhau, xoắn đều quanh một trục theo chiều từ trái sang phải như một thang dây xoắn, mà 2 tay thang là các phân tử đường ($C_5H_{10}O_4$) và axit photphoric sắp xếp xen kẽ nhau, còn mỗi bậc thang là một cặp bazơ nitric đứng đối diện và liên kết với nhau bằng các liên kết hiđrô theo nguyên tắc bổ sung, nghĩa là một bazơ lớn (A hoặc G) được bù bằng một

bazo bé (T hoặc C) hay ngược lại. Do đặc điểm cấu trúc, Adenin chỉ liên kết với Thymin bằng 2 liên kết hiđrô và Guanin chỉ liên kết với Cytosin bằng 3 liên kết hiđrô. Do các cặp nuclêôtit liên kết với nhau theo nguyên tắc bổ sung, chiều rộng của chuỗi xoắn kép bằng 20Å , khoảng cách giữa các bậc thang trên chuỗi xoắn bằng $3,4\text{Å}$, phân tử ADN xoắn theo chu kỳ xoắn, mỗi chu kỳ xoắn có 10 cặp nucleotit có chiều cao 34Å .

Nghiên cứu và ứng dụng công nghệ ADN vào công tác đấu tranh phòng chống tội phạm là một mũi nhọn đã được thực hiện ở nhiều quốc gia từ những năm 80 của thế kỷ XX. Cùng với sự tiến bộ của khoa học công nghệ, giám định ADN ngày càng phát triển, hoàn thiện cả về công nghệ, phương pháp và khả năng đáp ứng nhu cầu chung của pháp luật và của cả xã hội. Kết luận của giám định ADN mang tính quyết định đối với các vụ việc mang tính hình sự, dân sự như truy nguyên cá thể, xác định quan hệ huyết thống, xác định tung tích nạn nhân trong các vụ thảm họa, chiến tranh... là rất cần thiết và cấp bách. Tuy nhiên, để bảo đảm tính khoa học và tính pháp lý thì các phòng thí nghiệm giám định ADN cần phải có tần suất các alen của các locus gen để sử dụng khi dùng phân tích, kết luận giám định ADN cho mỗi một quần thể người (dân tộc). Việc nghiên cứu, khảo sát tần suất alen của các locus gen dùng trong giám định ADN của các dân tộc trên thế giới đã được tiến hành ở mức cơ bản. Tuy nhiên tùy thuộc vào số dân tộc ở mỗi quốc gia cũng như phụ thuộc vào năng lực giám định ADN của mỗi nước, các công bố về tần suất alen của các locus gen dùng trong giám định ADN ở mỗi nước khác nhau đối với mỗi dân tộc khác nhau là khác nhau.

Trong các điều kiện cần phải có khi kết luận giám định ADN thì có một điều kiện bắt buộc đó là phải có cơ sở dữ liệu tần suất alen của các locus gen dùng cho giám định gen đối mỗi quần thể người (dân tộc) cụ thể. Hiện nay, trên thế giới, các đơn vị giám định ADN đang sử dụng phổ biến các bộ Kit với 16 locus gen như bộ kit Identifiler, Identifiler Plus và Identifiler Direct

(hãng AB, Mỹ) hoặc bộ kit Powerplex (hãng Promega, Mỹ)... để tính toán tần suất xuất hiện của các alen. Trên cơ sở đó tính toán xác suất trùng nhau giữa các mẫu khi phải truy nguyên đồng nhất hoặc xác suất quan hệ huyết thống giữa các mẫu khi phải xác định quan hệ huyết thống trong giám định ADN.

Ở Việt Nam hiện nay, Viện Khoa học hình sự và đa số các cơ quan, tổ chức giám định đang sử dụng các bộ kit Identifiler, Identifiler Plus, và Identifiler Direct cho giám định ADN. Năm 2011, bảng tần suất các alen của các locus gen của hệ Identifiler trong quần thể người Việt (Kinh) được công bố trên tạp chí ForensicAsia. Cho đến nay, chưa có một nghiên cứu nào được công bố về khảo sát sự phân bố tần suất các alen của các locus gen hệ Identifiler (gồm 15 gen) trong quần thể người H'Mông. Với dân số khoảng 80.000 người (đứng thứ 8 trong tổng số 54 các dân tộc Việt Nam), dân tộc H'Mông phân bố khắp trên các tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam: Quảng Ninh, Lạng Sơn, Bắc Cạn, Cao Bằng, Hà Giang, Tuyên Quang, Yên Bái, Lào Cai, Lai Châu, Điện Biên, Sơn La, Hoà Bình, Thanh Hoá, Nghệ An và số ít ở Phú Thọ, cũng như các tỉnh Tây Nguyên, đây là những điểm nóng về tình hình an ninh và trật tự xã hội, số vụ án trong cộng đồng người H'Mông có diễn biến phức tạp với xu hướng ngày càng gia tăng. Vì vậy, việc tiến hành triển khai đề tài nghiên cứu: ***“Khảo sát tần suất các alen trong các locus gen (ADN) hệ Identifiler của dân tộc H'Mông phục vụ cho công tác giám định gen ở Việt Nam”*** là một yêu cầu cấp thiết.

Mục đích của đề tài :

1. Khảo sát tần suất các alen trong các locus gen (ADN) hệ Identifiler của dân tộc H'Mông phục vụ công tác giám định gen ở Việt Nam.
2. Trên cơ sở đó, tính tần suất xuất hiện của mỗi alen trong từng locus của dân tộc H'Mông, làm cơ sở khoa học để phân tích, đánh giá và đưa ra kết luận giám định truy nguyên huyết thống hoặc truy nguyên cá thể.