

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

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

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Ngô Thị Thu Trang**

**NGHIÊN CỨU, ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP  
TÁCH CHIẾT DẤU VẾT TINH TRÙNG PHỤC VỤ CÔNG TÁC  
GIÁM ĐỊNH SINH HỌC KỸ THUẬT HÌNH SỰ**

**LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

**Hà Nội - 2022**

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

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

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Ngô Thị Thu Trang**

**NGHIÊN CỨU, ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP  
TÁCH CHIẾT DẦU VẾT TINH TRÙNG PHỤC VỤ CÔNG TÁC  
GIÁM ĐỊNH SINH HỌC KỸ THUẬT HÌNH SỰ**

**Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8420114**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH  
CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**

1. Hướng dẫn 1: TS. Bùi Anh Tuấn
2. Hướng dẫn 2: PGS.TS Võ Thị Bích Thủy

**Hà Nội - 2022**

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm.*

*Hà Nội, ngày tháng năm 2022*

Tác giả luận văn

Ngô Thị Thu Trang

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ nhiệt tình và quý báu từ các thầy cô, các anh chị đồng nghiệp, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới:

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Bùi Anh Tuấn - vừa là thầy hướng dẫn khoa học, vừa là một người anh đồng nghiệp của tôi, người đã định hướng, trực tiếp dẫn dắt và cố vấn cho tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học, luôn cho tôi những lời khuyên vô cùng quý giá về kiến thức chuyên môn; PGS. TS. Võ Thị Bích Thủy - cô hướng dẫn khoa học của tôi, người đã cho tôi những góp ý, bình luận rất có giá trị để tôi có được nền tảng kiến thức, hỗ trợ rất lớn cho tôi trong quá trình thực hiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng, các thầy cô giáo đang công tác tại Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện giúp đỡ, truyền đạt những kiến thức chuyên sâu về chuyên ngành trong suốt thời gian học tập và hết sức giúp đỡ để tôi có thể hoàn thành luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới TS. Lê Thị Thu Thủy - giám đốc, cùng Ban giám đốc Trung tâm giám định Sinh học - Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an, ThS. Dương Thị Thu Thủy, và các cô, chú, anh chị đồng nghiệp tại Trung tâm, những người đã dạy dỗ, chỉ bảo, tạo điều kiện và luôn khuyến khích động viên tôi trong cả quá trình công tác và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới bạn bè, gia đình, những người luôn sát cánh, động viên tôi vượt qua khó khăn trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày      tháng      năm 2022

Ngô Thị Thu Trang

## MỤC LỤC

<b>LỜI CAM ĐOAN</b> .....	<b>i</b>
<b>LỜI CẢM ƠN</b> .....	<b>ii</b>
<b>Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt</b> .....	<b>iii</b>
<b>Danh mục các bảng</b> .....	<b>iv</b>
<b>Danh mục các hình vẽ, đồ thị</b> .....	<b>v</b>
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	<b>4</b>
1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ DẤU VẾT TINH TRÙNG, TINH DỊCH .....	4
1.1.1. Khái niệm tinh trùng, tinh dịch và dấu vết tinh trùng, tinh dịch .....	4
1.1.2. DNA trong tinh trùng.....	5
1.2. GIÁM ĐỊNH GEN (DNA) TỪ DẤU VẾT TINH TRÙNG, TINH DỊCH .....	6
1.2.1. Sự ra đời của giám định gen (DNA).....	6
1.2.2. Phương pháp phát hiện, thu thập, bảo quản và giám định dấu vết tinh trùng, tinh dịch .....	7
1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT DNA TỪ DẤU VẾT TINH TRÙNG, TINH DỊCH .....	11
1.3.1. Phương pháp tách chiết phân biệt bằng phương pháp hóa học (phương pháp ly giải phân biệt).....	12
1.3.2. Một số phương pháp tách chiết phân biệt khác .....	14
1.3.3. Một số bộ kit tách chiết DNA từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch.....	17
1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI .....	19
1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới .....	19
1.4.2. Tình hình nghiên cứu trong nước .....	21
<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>22</b>
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	22
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	22
2.2.1. Phương pháp thu thập, lựa chọn mẫu.....	23
2.2.2. Phương pháp đánh giá chất lượng dấu vết tinh dịch, tinh trùng bằng cảm quan... ..	23
2.2.3. Làm tiêu bản, xác định chính xác tinh trùng người bằng phương pháp nhuộm Christmas Tree .....	24
2.2.4. Phương pháp tách chiết DNA từ tinh dịch, tinh trùng bằng Chelex® .....	24

2.2.5. Phương pháp tách chiết DNA từ tinh dịch, tinh trùng bằng bộ kit QIAamp DNA Micro (hãng QIAamp DNA Micro, Đức).....	26
2.2.6. Phương pháp tách chiết DNA từ tinh dịch, tinh trùng bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (hãng Thermo Fisher, Mỹ).....	27
2.2.7. Phương pháp định lượng DNA sau tách chiết bằng bộ kit DNA Quantifiler™ Trio DNA Quantification.....	30
2.2.8. Khuếch đại sản phẩm DNA sau tách chiết bằng phản ứng PCR.....	31
2.2.9. Điện di mao quản.....	35
2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS .....	35
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>36</b>
3.1. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG DẤU VẾT TINH DỊCH, TINH TRÙNG VÀ XÁC ĐỊNH CHÍNH XÁC TINH TRÙNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN .....	36
3.1.1. Kết quả đánh giá chất lượng dấu vết tinh dịch, tinh trùng bằng bộ kit Phosphatesmo KM .....	36
3.1.2. Xác định chính xác tinh trùng người bằng phương pháp nhuộm Christmas Tree... ..	37
3.3. KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG SẢN PHẨM DNA SAU TÁCH CHIẾT SỬ DỤNG BỘ KIT ĐỊNH LƯỢNG DNA QUANTIFILER™ TRIO DNA QUANTIFICATION .....	39
3.4. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CỦA DNA THÔNG QUA BIỂU ĐỒ ĐIỆN DI MAO QUẢN.....	47
3.5. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH PHƯƠNG SAI MỘT YẾU TỐ (KIỂM ĐỊNH ANOVA) SỬ DỤNG PHẦN MỀM SPSS ĐỐI VỚI HÀM LƯỢNG DNA TỔNG SỐ THU ĐƯỢC.....	61
3.6. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH PHƯƠNG SAI MỘT YẾU TỐ (KIỂM ĐỊNH ANOVA) SỬ DỤNG PHẦN MỀM SPSS ĐỐI VỚI TỶ LỆ DNA BỊ BIẾN TÍNH.....	62
3.7. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH PHƯƠNG SAI MỘT YẾU TỐ (KIỂM ĐỊNH ANOVA) SỬ DỤNG PHẦN MỀM SPSS ĐỐI VỚI HÀM LƯỢNG DNA CỦA NGƯỜI NAM GIỚI THU HỒI ĐƯỢC .....	66
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>71</b>
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....</b>	<b>72</b>
<b>DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>73</b>

## Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt

<i>Từ viết tắt</i>	<i>Nghĩa Tiếng Anh</i>	<i>Nghĩa Tiếng Việt</i>
ADE	Acoustic differential extraction	Phương pháp tách chiết phân biệt truyền thống
DEP	Development of a Procedure for Dielectrophoretic	Sự cải tiến quá trình điện di
DNA	Deoxyribonucleic acid	Một loại axit nucleic
DTT	Dithiothreitol	Một loại hoá chất
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RF	Restriction Fragment	Đoạn cắt giới hạn
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Một loại hoá chất
SPRED	Separation Potential Ratio	Tỷ lệ phân tách tiềm năng
STR	Short Tandem Repeats	Các đoạn lặp ngắn liên tiếp
VNTR	Variable Number Tandem Repeat	Đoạn lặp lại liên tiếp với số lượng khác nhau

## Danh mục các bảng

<i>Bảng</i>	<i>Tên bảng</i>	<i>Trang</i>
Bảng 2.1	Nồng độ và thể tích pha loãng Standards	31
Bảng 2.2	Thành phần của một phản ứng định lượng	31
Bảng 2.3	Chu trình nhiệt phản ứng realtime PCR	32
Bảng 2.4	Tên, vị trí 16 locus trong được sử dụng trong bộ kit AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR với trình tự 16 cặp mồi tương ứng	32 - 34
Bảng 2.5	Thành phần của một phản ứng PCR sử dụng bộ kit AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR	34
Bảng 2.6	Chu trình nhiệt được sử dụng cho phản ứng nhân gen sử dụng bộ kit AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR	35
Bảng 2.7	Thành phần của một phản ứng điện di mao quản	35
Bảng 3.1	Kết quả định lượng sản phẩm DNA sau tách chiết sử dụng bộ kit định lượng DNA Quantifiler™ Trio DNA Quantification (của hãng Thermo Fisher, Mỹ)	39 - 42
Bảng 3.2	Kết quả đánh giá chất lượng của DNA thông qua kết quả điện di mao quản phân tích trên phần mềm GeneMapper ID (của hãng Applied Biosystems, Mỹ)	48 - 51



## Danh mục các hình vẽ, đồ thị

<i>Hình</i>	<i>Tên hình vẽ, đồ thị</i>	<i>Trang</i>
Hình 1.1	Phản ứng giữa muối natri của phenolphthalein diphotphat với enzyme photphatase axit	9
Hình 1.2	Một số hình ảnh tinh trùng quan sát dưới kính hiển vi nhuộm bằng thuốc nhuộm Nuclear fast red - Indigo carmine	11
Hình 2.1	Sơ đồ các bước nghiên cứu	22
Hình 2.2	Các locus hệ Identifiler	33
Hình 3.1	Mẫu số 3 thử định hướng bằng bộ kit Phosphatesmo KM	36
Hình 3.2	Mẫu số 8 thử định hướng bằng bộ kit Phosphatesmo KM	37
Hình 3.3	Mẫu số 12 thử định hướng bằng bộ kit Phosphatesmo KM	37
Hình 3.4	Tiêu bản mẫu số 8 (hình trái) và tiêu bản mẫu số 13 (hình phải)	38
Hình 3.5	Tiêu bản mẫu số 14 (hình trái) và tiêu bản mẫu số 16 (hình phải)	39
Hình 3.6	Đồ thị so sánh kết quả hàm lượng DNA tổng số thu hồi được cao nhất từ ba phương pháp tách chiết	43
Hình 3.7	Đồ thị so sánh kết quả tỷ lệ DNA bị biến tính thấp nhất từ ba phương pháp tách chiết	43
Hình 3.8	Đồ thị so sánh kết quả hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được cao nhất ở mẫu nam, thấp nhất ở mẫu nữ từ ba phương pháp tách chiết	44

Hình 3.9	Đồ thị so sánh tỷ lệ hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được cao nhất ở mẫu nam, thấp nhất ở mẫu nữ/hàm lượng DNA tổng số thu hồi được từ ba phương pháp tách chiết	44
Hình 3.10	Kết quả điện di mẫu nam 17 (pha loãng 10 lần)	52 - 54
Hình 3.11	Kết quả điện di mẫu nam 2, mẫu nam 3 và mẫu nam 7 tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction có hiện tượng pull up	55 - 57
Hình 3.12	Kết quả điện di mẫu nam 9 tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction và bộ kit QIAamp DNA Micro có hiện tượng mất peak	59 - 60
Hình 3.13	Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của hàm lượng DNA tổng số thu được ở mẫu nam	61
Hình 3.14	Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của hàm lượng DNA tổng số thu được ở mẫu nữ	62
Hình 3.15	Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nam	63
Hình 3.16	So sánh sự khác biệt của tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nam	64
Hình 3.17	Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nữ	65
Hình 3.18	So sánh sự khác biệt của tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nữ	66
Hình 3.19	Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của hàm lượng DNA của người nam giới thu được ở mẫu nam	67
Hình 3.20	So sánh sự khác biệt của hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được ở mẫu nam	68

- Hình 3.21 Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của hàm lượng DNA của người nam giới thu được ở mẫu nữ 69
- Hình 3.22 So sánh sự khác biệt của hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được ở mẫu nữ 70

## MỞ ĐẦU

Dấu vết sinh vật có nguồn gốc từ người là một sản phẩm cụ thể của quá trình sống, có liên quan hoặc được hình thành trong các vụ việc mang tính hình sự cần được ghi nhận, thu lượm và giám định. Dấu vết sinh vật là đối tượng chính trong lĩnh vực giám định sinh học kỹ thuật hình sự, có giá trị truy nguyên cao. Trong đó, dấu vết tinh trùng, tinh dịch là loại dấu vết sinh vật đặc trưng trong các vụ án có hoạt động xâm hại tình dục. Qua các hành vi xâm hại tình dục, sự tiếp xúc giữa thủ phạm và nạn nhân, luôn để lại dấu vết. Các dấu vết hình thành và tồn tại do có sự tác động qua lại giữa cơ thể nạn nhân và thủ phạm hoặc dấu vết để lại tại hiện trường [1, 2]. Các dấu vết tinh dịch và tinh trùng cũng là loại dấu vết có giá trị chứng minh tội phạm cao nhất, giúp cho cơ quan điều tra tìm ra chân tướng sự việc, thông qua: định hướng điều tra, cung cấp thông tin nhận dạng thủ phạm, chứng minh sự vô tội cho nghi phạm hoặc bị cáo, khẳng định hoặc bác bỏ lời khai của nạn nhân, nhân chứng, hoặc nghi phạm, cung cấp thông tin về hiện trường vụ án, và cung cấp bằng chứng chứng thực sự xuất hiện của người hoặc sự việc bị cáo buộc.

Trong các vụ việc hình sự, dấu vết tinh trùng, tinh dịch thường xuất hiện và tồn tại trên các bộ phận của cơ thể, bao cao su, quần áo, giường, chiếu, vật dụng cá nhân, tư trang... của nạn nhân hoặc đối tượng gây án. Thông qua quá trình giám định, giám định viên xác định và so sánh hồ sơ kiểu gen của đối tượng nghi vấn với kiểu gen thu được từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch đó, sẽ là bằng chứng xác thực cho hành vi phạm tội của đối tượng.

Tuy nhiên, trong giám định sinh học hình sự, do đặc trưng của dấu vết tinh trùng là được hình thành bởi sự tác động qua lại giữa cơ thể hoặc dịch tiết cơ thể của nạn nhân và đối tượng, nên dễ có sự lẫn, nhiễm giữa tế bào của đối tượng và nạn nhân (tế bào tinh trùng, tế bào biểu mô của đối tượng với tế bào biểu mô, tế bào máu kinh nguyệt của nạn nhân...). Một lượng lớn tế bào biểu mô của nữ giới tồn tại trong các dấu vết tinh trùng, tinh dịch có thể ngăn cản việc phát hiện nguồn DNA của người nam giới. Bên cạnh đó, trong một số vụ việc, đối tượng phạm tội có hành vi không xuất tinh, xuất tinh ngoài âm đạo, hoặc đối tượng đã thất óng dẫn tinh cũng là những thách thức không nhỏ. Do đó, quá trình giám định từ phát hiện, thử định hướng, tách chiết, định lượng DNA, phân tích kết quả đều gặp những trở ngại, trong đó bước tách chiết

DNA có ý nghĩa quyết định. Quy trình tách chiết DNA từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch so với nhiều loại dấu vết khác là phức tạp và đòi hỏi phải sử dụng nhiều loại hóa chất hơn để phân tách các nguồn DNA trong hỗn hợp. Đối mặt với loại dấu vết này, các giám định viên thường gặp khó khăn trong việc lựa chọn phương pháp tách chiết tối ưu để thu được các hồ sơ kiểu gen rõ ràng và hoàn chỉnh, giảm thiểu sự nhiễm, lẫn các nguồn DNA. Xuất phát từ tính cấp thiết và những yêu cầu thực tế kể trên, tác giả tiến hành Đề tài nghiên cứu: "*Nghiên cứu, đánh giá hiệu quả một số phương pháp tách chiết dấu vết tinh trùng phục vụ công tác giám định sinh học kỹ thuật hình sự*" với các mục tiêu và nội dung như sau:

### ***Mục tiêu nghiên cứu***

Phân tích, đánh giá được tính hiệu quả của ba phương pháp tách chiết DNA từ dấu vết tinh trùng.

Trên cơ sở kết quả nghiên cứu, chọn lựa ra phương pháp tách chiết phù hợp, tối ưu với một số dạng dấu vết tinh trùng, tinh dịch thường gặp.

### ***Nội dung nghiên cứu***

Thu thập, chọn lựa 30 mẫu dấu vết tinh trùng từ các vụ việc xâm hại tình dục thực tế xảy ra trong năm 2021 - 2022.

Giám định định hướng, làm tiêu bản quan sát và khẳng định sự có mặt của tinh trùng trong 30 mẫu nghiên cứu. Đánh giá sơ bộ chất, lượng của dấu vết.

Tách chiết DNA đối với 30 mẫu nghiên cứu theo ba phương pháp: Phương pháp sử dụng Chelex<sup>®</sup>, phương pháp hấp phụ ái lực trên bề mặt hạt từ sử dụng bộ kit PrepFiler<sup>™</sup> Forensic DNA Extraction và phương pháp hấp phụ màng lọc silica trong bộ kit QIAamp DNA Micro.

Xác định hàm lượng, chất lượng DNA sau tách chiết của từng phương pháp bằng phản ứng realtime PCR.

Tiến hành PCR sản phẩm sau tách chiết sử dụng phức hợp 16 cặp môi STR, phát hiện và phân tích kết quả bằng phương pháp điện di mao quản. Đánh giá chất, lượng DNA thông qua phân tích biểu đồ điện di.

Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS. Biện luận kết quả.

### ***Những đóng góp của luận văn***

Kết quả của nghiên cứu giúp giám định viên định hướng, lựa chọn được phương pháp tách chiết thích hợp với loại dấu vết tinh trùng trong các vụ án cụ thể, giúp cho việc khai thác hiệu quả tối đa thông tin từ dấu vết tinh trùng phục vụ công tác điều tra, xử lý tội phạm.

Kết quả nghiên cứu đóng góp cụ thể, thiết thực khi đưa ra định hướng công nghệ có thể được triển khai trong chủ trương mở rộng, phân cấp công tác giám định DNA cho các Phòng PC09 - Công an tỉnh, thành phố thuộc hệ lực lượng Kỹ thuật hình sự Công an nhân dân.

Các kết quả nghiên cứu là tư liệu mới, có giá trị tham khảo trong đào tạo và nghiên cứu khoa học, đặc biệt trong lĩnh vực khoa học hình sự.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ DẤU VẾT TINH TRÙNG, TINH DỊCH

#### 1.1.1. Khái niệm tinh trùng, tinh dịch và dấu vết tinh trùng, tinh dịch

##### 1.1.1.1. Tinh trùng

Tinh trùng là giao tử đực, là sản phẩm của quá trình sinh tinh ở người nam giới.

Tinh trùng sau khi ra khỏi cơ thể người nam giới, tùy thuộc vào môi trường tiếp xúc sẽ quyết định thời gian tồn tại của các tế bào tinh trùng. Trong môi trường nước nóng hoặc tiếp xúc với hóa chất, các tế bào tinh trùng chỉ có thể tồn tại không quá vài giây. Trong môi trường nước ấm, các tế bào tinh trùng có thể tồn tại khoảng vài phút. Trên da hoặc trên các bề mặt khác, các tế bào tinh trùng có thể tồn tại từ khoảng 15 phút đến 30 phút. Trong điều kiện đông lạnh với nhiệt độ ổn định, tinh trùng có thể tồn tại vô thời hạn. Ở nhiệt độ thấp khoảng  $-196^{\circ}\text{C}$ , các tế bào tinh trùng ở trong một loại hoạt động lơ lửng, có nghĩa là tất cả các chức năng thiết yếu của chúng đã hoàn toàn ngừng hoạt động. Trong âm đạo, thời gian phân hủy của tinh trùng phụ thuộc vào tuổi của nạn nhân (trước hoặc sau khi dậy thì) và nếu tinh trùng ở trong cổ tử cung, thời gian phân hủy có thể trên 72 giờ [3]. Trong trường hợp nạn nhân ở giai đoạn hậu sinh sản, tinh trùng có thể vẫn di chuyển trong dịch tiết âm đạo từ 6 đến 12 giờ và trong cổ tử cung đến 5 ngày [4]; tinh trùng không di động có thể được tìm thấy trong các vết bẩn của dịch tiết âm đạo từ 12 đến 48 giờ sau khi xuất tinh [3]. Thời gian phân hủy của tinh trùng ở các bé gái trước tuổi dậy thì tương đối ngắn hơn do không có chất nhầy cổ tử cung [3]. Trường hợp dấu vết tinh trùng khô bám trên quần áo, vẫn có thể được phát hiện trong thời gian trên 1 năm [5].

##### 1.1.1.2. Tinh dịch

Tinh dịch là hỗn hợp dịch đi ra khỏi ống sinh tinh khi phóng tinh. Tinh dịch bao gồm: Tinh trùng và dịch từ tinh hoàn (chiếm 10% tổng số), dịch túi tinh (chiếm 60%), dịch tuyến tiền liệt (chiếm 30%). Tinh trùng chỉ chiếm tỉ lệ nhỏ hơn 5% tổng thể tích tinh dịch. Tinh dịch sau khi ra khỏi cơ quan sinh dục nam, ban đầu là một dịch đặc quánh. Nhờ enzyme phân hủy protein ở tuyến tiền liệt, tinh dịch hóa lỏng ở nhiệt độ bình thường sau 10 - 30 phút [6].

Thành phần tinh dịch có tới 45 - 80% là dịch tuyến tiền liệt. Đây là chất lỏng màu trắng như sữa, có tính axit (pH khoảng 6,5), có chứa nhiều protein, axit amin, các enzyme,... đặc biệt là enzyme photphatase axit. Enzyme photphatase axit có hàm lượng cao gấp 200 - 400 lần so với các dịch cơ thể khác, vì vậy nó được coi là chất chỉ thị để xác định dấu vết tinh dịch trong các vụ án đặc trưng bởi hành vi xâm hại tình dục. Protein đặc trưng của tuyến tiền liệt là glycoprotein P30 (prostatic specific antigen), việc xác định kháng nguyên P30 này cho phép xác định chính xác tinh dịch người. Ngoài glycoprotein P30, trong số các loại protein trong dịch tuyến tiền liệt, có spermin và cholin là hai protein thành phần có hàm lượng cao trong dịch tuyến tiền liệt. Spermin bị oxy hóa bởi diaminoxidase có trong thành phần tinh dịch, làm cho tinh dịch có mùi đặc trưng. Spermin kết hợp với axit picric để tạo thành tinh thể picrat spermin hình kim màu vàng, cholin tạo tinh thể đặc trưng trong dung dịch iot, đây là hai phản ứng được dùng để nhận biết sự có mặt của tinh dịch [7, 8].

Dịch túi tinh chiếm 12 - 32% thể tích của tinh dịch, là chất dịch trong suốt, nhớt, hơi vàng do hàm lượng sắc tố flavin cao. Sắc tố này có tính phát quang khi chiếu tia tử ngoại vào nên nó cũng được áp dụng trong phát hiện dấu vết tinh dịch [9].

### **1.1.2. DNA trong tinh trùng**

DNA của tinh trùng động vật có vú là DNA của sinh vật nhân chuẩn nhỏ gọn được biết đến nhiều nhất, được cuộn chặt hơn sáu lần so với các nhiễm sắc thể nguyên phân của tế bào soma [10, 11]. Ở động vật có vú, DNA của tinh trùng được cố định vào một cấu trúc duy nhất được gọi là vòng hạt nhân [11-13]. Các nghiên cứu trước đây được thực hiện về sự ngưng tụ chất nhiễm sắc trong quá trình hình thành tinh trùng chỉ ra rằng quá trình này bắt đầu từ đầu trước của đầu tinh trùng và tiến dần về phía đuôi [11, 13, 14]. Trong quá trình ngưng tụ chất nhiễm sắc, sau khi các protein histone được cấu trúc lại bởi các protein chuyển tiếp, chúng được tái cấu trúc một lần nữa để hoàn thiện hình dạng của chúng bằng các protamine là protein liên kết DNA của tinh trùng [15]. Hầu hết DNA trong tinh trùng người trưởng thành liên kết với protamine, vì các histone soma được thay thế trong quá trình hình thành tinh trùng. Tuy nhiên, các phân tích sinh hóa về protein trong tinh trùng



của con người cho thấy sự lưu giữ một số histone dẫn đến thành phần protein hạt nhân có khoảng 90% là protamine và 10% là histone. DNA liên kết với protamine được cuộn lại thành các toroid (dạng hình xuyên) nén chặt có chứa khoảng 50 kb DNA [16, 17]. DNA của tinh trùng được bảo vệ tốt đến nỗi, không giống như chất nhiễm sắc của tế bào soma, nó có khả năng chống lại nuclease [18].

## 1.2. GIÁM ĐỊNH GEN (DNA) TỪ DẤU VẾT TINH TRÙNG, TINH DỊCH

### 1.2.1. Sự ra đời của giám định gen (DNA)

Năm 1984, Alec Jeffreys đã phát triển thành công kỹ thuật giám định DNA trong phòng thí nghiệm của mình tại Đại học Leicester. Alec bắt đầu bằng việc kiểm tra trình tự DNA được tìm thấy trong gen myoglobin của hải cẩu. Trong trình tự DNA của gen myoglobin hải cẩu, Alec xác định được có các đoạn trình tự lặp. Ông đã nhận ra rằng, những trình tự lặp này là của một cá nhân duy nhất và nó có thể dùng như đặc điểm để phân biệt từng con với nhau. Có lẽ trình tự tương tự ở người có thể được sử dụng để phân biệt người này với người khác. Tên khoa học của trình tự lặp là minisatellite, đây là những trình tự ngắn, lặp đi lặp lại của DNA (thường là dài từ 10 đến 60 cặp base). Alec đã phân lập được hai đoạn và nhân bội chúng, sử dụng chúng làm mẫu dò được đánh dấu phóng xạ có thể nhận ra gen myoglobin [19]. Mẫu dò là một đoạn DNA ngắn có thể được sử dụng để giúp tìm ra trình tự cụ thể của các base trong phân tử DNA. Hay nói cách khác, mẫu dò chỉ liên kết với chuỗi DNA đích và làm nổi bật nó dưới dạng một dải hoặc đốm màu đen. Đây được coi là bước ngoặt lớn trong lịch sử phát triển của Khoa học hình sự. Các trình tự minisatellite được phát hiện thấy trong mọi tế bào và ở những vị trí khác nhau trong hệ gen người. Điều đáng chú ý là số lần lặp lại các đoạn lặp này ở các cá thể khác nhau là khác nhau, đây là đặc điểm rất quan trọng trong truy nguyên cá thể. Nhờ nghiên cứu của Alec, hàng ngàn tên tội phạm nguy hiểm đã bị bắt và bỏ tù và hàng ngàn cá nhân bị từ chối nhập tịch Vương quốc Anh một cách bất công đã được phép định cư tại đất nước này. Tháng 7 năm 1986, giám định gen (DNA) phát huy tác dụng trong vụ án đầu tiên, Pitchfork là kẻ sát nhân đầu tiên bị bắt nhờ giám định DNA. Một vụ cưỡng hiếp và giết hại hai nữ sinh đã xảy ra ở làng Narborough ngoại ô Leicester. Một người đàn

ông địa phương đã bị nghi ngờ và sau đó thú nhận giết một trong hai nữ sinh, tuy nhiên kết quả giám định DNA lại cho thấy trên người của hai nữ sinh có tinh dịch của cùng một người nam giới, nhưng không phải là của người đàn ông địa phương nói trên. Cảnh sát sau đó đã buộc phải chấp nhận rằng người đàn ông địa phương nói trên vô tội, cuộc điều tra tưởng như đi vào bế tắc. Đến năm 1987, cảnh sát đã yêu cầu xét nghiệm DNA từ máu của tất cả đàn ông địa phương từ 17 đến 34 tuổi nhằm loại họ khỏi danh sách tình nghi, tuy nhiên vẫn không có một kết quả nào trùng khớp với DNA của người nam giới để lại tinh dịch trên người của hai nữ sinh. Cho đến khi một người đàn ông tình cờ thú nhận về việc đã nộp mẫu xét nghiệm thay cho bạn mình, người bạn kia lập tức bị cảnh sát điều tra và giám định DNA. Kết quả cho thấy DNA của người đàn ông này trùng khớp hoàn toàn với DNA của Pitchfork - người nam giới để lại tinh dịch trên cơ thể hai nữ sinh [19].

### **1.2.2. Phương pháp phát hiện, thu thập, bảo quản và giám định dấu vết tinh trùng, tinh dịch**

#### **1.2.2.1. Phát hiện dấu vết tinh trùng, tinh dịch**

Trong các vụ án hình sự, dấu vết tinh trùng, tinh dịch thường xuất hiện và tồn tại trên các bộ phận của cơ thể của nạn nhân, đối tượng gây án hoặc trên bao cao su, quần áo, giường, chiếu,... Tại hiện trường các vụ án, việc quan sát và đánh giá sơ bộ, phát hiện sự có mặt của dấu vết là cực kỳ quan trọng. Tinh dịch ở trạng thái lỏng dạng quánh đặc khi còn ướt, có màu trắng đục, quan sát bằng mắt thường, khi dấu vết khô đi sẽ có màu sẫm. Nếu dấu vết bám trên vật mang là vải thì nó sẽ làm cho mảnh vải ở vị trí có dấu vết có màu sẫm hơn, khi sờ sẽ thấy ở vị trí đó vải cứng hơn so với ở các vị trí xung quanh. Việc phát hiện dấu vết tinh trùng, tinh dịch còn có thể được thực hiện bằng chiếu đèn huỳnh quang. Tia UV giúp phát hiện dấu vết tinh trùng, tinh dịch bám trên những đồ vật, vật mang mà khó quan sát được bằng mắt thường và những vật mang có kích thước lớn như ga trải giường, chăn, chiếu, khăn tắm,... Dấu vết tinh trùng, tinh dịch khô dưới tác động của tia UV, ở bước sóng 450nm, phát ra ánh sáng màu xanh tím [20].

#### **1.2.2.2. Thu thập và bảo quản dấu vết tinh trùng, tinh dịch**

Nguyên tắc chung khi thu thập dấu vết tinh trùng, tinh dịch là dấu vết

phải được làm khô tự nhiên, không sử dụng bất cứ phương pháp làm khô chủ động nào trước khi đóng gói. Dấu vết tinh trùng, tinh dịch phải được bọc trong gói giấy để tránh tình trạng hấp hơi khi dấu vết chưa khô hoàn toàn. Phải thu mẫu so sánh của nạn nhân và đối tượng (nếu có) để làm căn cứ so sánh, đối chiếu với kết quả giám định sau này.

Đối với các dấu vết tinh trùng, tinh dịch ở hiện trường, trong trường hợp dấu vết ở dạng lỏng, lấy một que tăm bông vô trùng sạch hoặc một mảnh gạc, mảnh vải, thấm dấu vết sau đó để khô tự nhiên trong khoảng 15 - 20 phút trước khi đóng gói niêm phong. Mẫu phải được ghi rõ thông tin, đảm bảo không lẫn, trùng lặp với mẫu nào khác. Trong trường hợp dấu vết đã tồn tại sẵn trên các vật mang, nếu là vật mang nhỏ, đóng gói và niêm phong đầy đủ thủ tục, nhanh chóng gửi mẫu vật cho cơ quan giám định để tiến hành giám định. Nếu là vật mang lớn, quan sát sơ bộ để phát hiện dấu vết bằng mắt thường, khoanh vùng và chuyển vị trí nghi có dấu vết tinh trùng, tinh dịch, chuyển cho cơ quan giám định để tiến hành giám định [21].

Đối với các vật mang cồng kềnh, không thể rách riêng vùng có dấu vết nghi tinh trùng, tiến hành làm ẩm que tăm bông và nhẹ nhàng lau dấu vết, hoặc cạo lấy dấu vết. Lưu ý là phải tiến hành chụp lại ảnh vị trí nghi có dấu vết trước khi lau hoặc cạo [21].

Đối với dấu vết tinh trùng, tinh dịch ở trên người nạn nhân hoặc đối tượng, trong trường hợp nạn nhân còn sống, dùng que tăm bông chuyên dùng thu lấy mẫu dịch âm đạo ở sâu trong âm đạo nạn nhân, việc thu mẫu phải được tiến hành bởi cán bộ y tế hoặc cán bộ pháp y ở trung tâm y tế hoặc ở các cơ quan có đầy đủ dụng cụ và trang thiết bị cần thiết. Trong trường hợp nạn nhân đã chết, dịch âm đạo được thu trong quá trình giải phẫu tử thi. Tùy vào tính chất, tình tiết của vụ việc, tiến hành thu mẫu ở quanh các bộ phận sinh dục hoặc trên cơ thể nạn nhân hoặc đối tượng bằng tăm bông sạch đã làm ẩm [21].

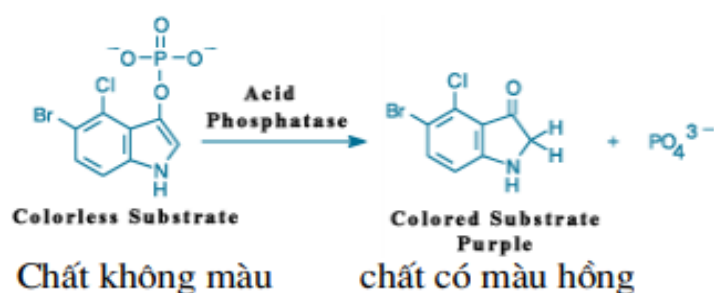
Toàn bộ mẫu vật sau khi tiến hành thu thập phải được đóng gói riêng, niêm phong, ghi chú cụ thể, bảo quản ở điều kiện lạnh từ 4°C đến - 20°C và nhanh chóng gửi đến cơ quan giám định [21].

#### 1.2.2.3. Giám định dấu vết tinh trùng, tinh dịch

Dấu vết tinh trùng, tinh dịch trước khi tiến hành tách chiết DNA sẽ

được giám định định hướng và xác định chính xác sự có mặt của tinh trùng, tinh dịch. Dựa vào những thành phần đặc trưng có trong tinh trùng và tinh dịch, có những phương pháp khác nhau để định hướng và xác định chính xác sự có mặt của tinh trùng, tinh dịch trong mẫu vật gửi giám định.

Enzyme photphatase axit trong tinh dịch có nồng độ cao gấp từ 20 - 400 lần so với các dịch cơ thể khác, đồng thời, photphatase axit là một enzyme tương đối bền vững trước sự tác động của môi trường và vi sinh vật, do đó, việc xác định sự có mặt của enzyme này được coi như một sự khẳng định cho sự có mặt của tinh dịch. Nguyên lý của phản ứng là thông qua việc sử dụng một số thuốc thử thông dụng cho enzyme photphatase axit như muối natri của phenolphtalein diphosphat hay brentamine fast black K,... sẽ có sự thay đổi màu sắc của chất chỉ thị màu [22].



Muối natri của phenolphtalein-diphosphat  
(không màu)

Môi trường kiềm      ↓      Photphataza axit

Phenolphtalein + diphosphat  
(màu đỏ hồng)

*Hình 1.1. Phản ứng giữa muối natri của phenolphtalein diphosphat với enzyme photphatase axit [21]*

Năm 2017, một sản phẩm thương mại có tên STK Sperm Tracker™ được phát triển với sự hợp tác giữa AXO Science và Viện Cảnh sát Khoa học Quốc gia Pháp (INPS) cũng dựa trên sự có mặt của photphatase axit trong tinh dịch để xác định sự có mặt của dấu vết tinh dịch, tinh trùng trong các vụ án. STK Sperm Tracker™ được sản xuất ở cả dạng giấy thử và dạng xịt, khi

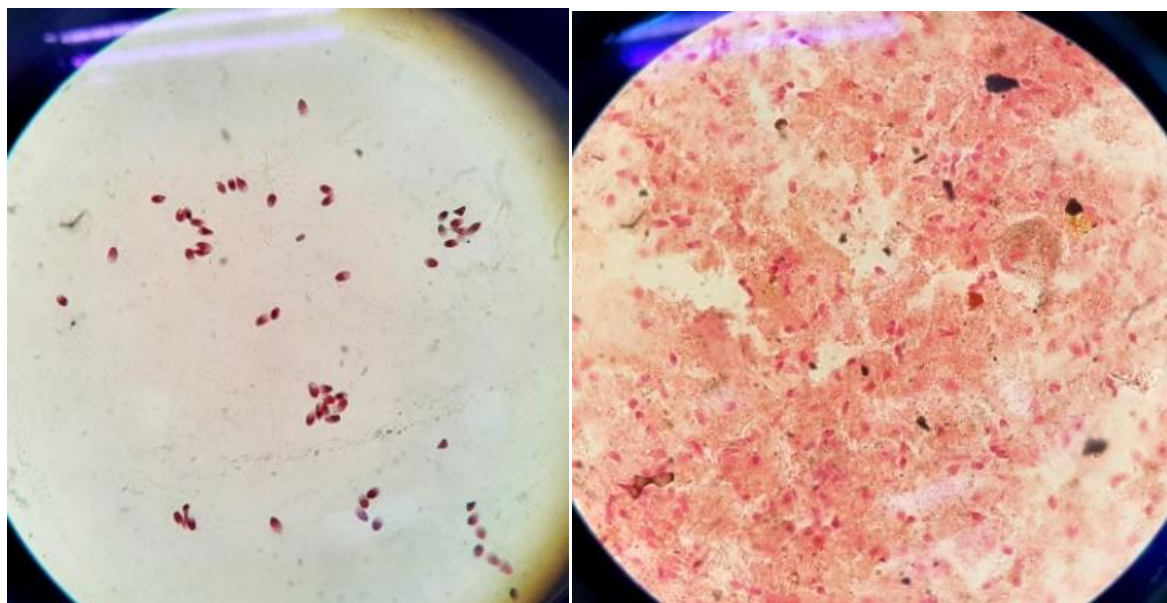
quan sát bằng đèn UV-A ở bước sóng 365 – 366 nm, phản ứng hóa học giữa sản phẩm với photphatase axit trong tinh dịch sẽ phát xạ huỳnh quang [23]. Các nghiên cứu năm 2018 của Cavedon, năm 2021 của Sijen và cộng sự cũng đã khẳng định hiệu quả của STK Sperm Tracker™ là tương đương với các phương pháp truyền thống [24, 25].

Protein đặc trưng của tuyến tiền liệt là glycoprotein P30 (prostatic specific antigen), việc xác định kháng nguyên P30 này cho phép xác định chính xác tinh dịch người. Hàm lượng của P30 trong tinh dịch rất cao, lên tới khoảng 200000 đến 5,5 triệu ng/ml. Kháng nguyên P30 trong tinh dịch có thể được phát hiện bằng cách sử dụng Anti - P30 với phương pháp khuếch tán miễn dịch kép (theo Ouchterlony). Việc phát hiện sự có mặt của kháng nguyên P30 có thể được tiến hành dễ dàng với cả những dấu vết đã có sự tẩy rửa, hoặc lượng dấu vết ít [26].

Giám định định hướng sự có mặt của dấu vết tinh trùng, tinh dịch còn được tiến hành thông qua một số các phản ứng tạo tinh thể đặc trưng với các protein đặc hiệu có trong tinh dịch. Spermin và cholin là hai protein thành phần có hàm lượng cao trong dịch tuyến tiền liệt. Spermin bị oxy hóa bởi diaminoxidase có trong thành phần tinh dịch, làm cho tinh dịch có mùi đặc trưng. Spermin kết hợp với axit picric để tạo thành tinh thể picrat spermin hình kim màu vàng, cholin tạo tinh thể đặc trưng trong dung dịch iot, đây là hai phản ứng được dùng để nhận biết sự có mặt của tinh dịch [27].

Mục đích của giám định gen (DNA) từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch là việc tách chiết được DNA nhân tế bào có trong phần đầu tinh trùng nhằm chứng minh sự có mặt, hành vi phạm tội của đối tượng. Thông qua việc làm tiêu bản và nhuộm, quan sát dưới kính hiển vi, giám định viên sẽ có thể đưa ra kết luận về sự có mặt của tinh trùng trong dấu vết tinh trùng, tinh dịch. Có hai phương pháp giám định chính xác sự có mặt của tinh trùng bao gồm làm tiêu bản soi tươi hoặc sử dụng thuốc nhuộm. Phương pháp soi tươi rất khó để quan sát tinh trùng, đặc biệt do đặc trưng của dấu vết tinh trùng, tinh dịch được hình thành trong quá trình phát sinh những hành vi xâm hại tình dục, thường có sự chống trả của nạn nhân nên dấu vết thường lẫn các tạp chất, đặc biệt là tế bào biểu mô âm đạo của nữ giới. Vì vậy, phương pháp soi tươi chỉ phù hợp với những dấu vết tinh trùng, tinh dịch còn rất mới. So với phương pháp soi

tươi, phương pháp nhuộm tinh trùng có những ưu điểm nhất định. Bộ nhuộm tinh trùng thường được thiết kế sao cho phần đầu tinh trùng và phần đuôi tinh trùng bắt màu khác nhau, tạo sự tương phản khi quan sát dưới kính hiển vi, từ đó giúp ta dễ dàng quan sát và phát hiện sự có mặt của tinh trùng trong dấu vết. Một số loại thuốc nhuộm phổ biến trong nhuộm tinh trùng: Thuốc nhuộm Giemsa, thuốc nhuộm Xanh toludin, thuốc nhuộm Azua-Eosin, thuốc nhuộm Nuclear fast red - Indigo carmine, ...[28-30].



*Hình 1.2. Hình ảnh tinh trùng quan sát dưới kính hiển vi nhuộm bằng thuốc nhuộm Nuclear fast red - Indigo carmine*

### 1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT DNA TỪ DẤU VẾT TINH TRÙNG, TINH DỊCH

Các dấu vết tinh dịch, tinh trùng thu được từ các vụ án có yếu tố xâm hại tình dục thường có đặc điểm là hỗn hợp không cân bằng giữa tế bào biểu mô và tinh trùng, tức là lượng tế bào biểu mô âm đạo của nữ giới cao so với tế bào người nam giới, dẫn đến khó khăn trong phân tách, thu hồi DNA của người nam và nữ giới. Tách chiết phân biệt là một kỹ thuật tách chiết cho phép ly giải và phân lập có chọn lọc DNA từ hỗn hợp tinh trùng của nam giới và tế bào biểu mô của nữ giới.

Phương pháp ly giải phân biệt, sử dụng các hóa chất khác nhau để tách tế bào biểu mô và tế bào tinh trùng [19, 31], là phương pháp đầu tiên và truyền thống nhất, đã được Grill và cộng sự ứng dụng từ những năm 1985

[19]. Liên sau đó là một loạt những nghiên cứu và công bố về các phương pháp khác để tách chiết phân biệt tế bào tinh trùng của người nam giới và tế bào biểu mô của người nữ giới trong hỗn hợp: Sử dụng tia laser vi phân để tách riêng tế bào biểu mô và thu thập tế bào tinh trùng [32-34]; sử dụng màng lọc và các thiết bị vi mô khai thác sự khác biệt giữa kích thước và hình dạng của tế bào [35, 36]; phương pháp đo tế bào dòng chảy dựa trên sự khác biệt trong tế bào, tận dụng các protein màng cụ thể để đánh dấu và phân loại tế bào [37];...

### **1.3.1. Phương pháp tách chiết phân biệt bằng phương pháp hóa học (phương pháp ly giải phân biệt)**

Năm 1985, Grill và cộng sự lần đầu tiên đã mô tả phương pháp tách chiết phân biệt sử dụng hóa chất ly giải để ứng dụng trong tách chiết dấu vết tinh trùng, tinh dịch từ các vụ án có yếu tố xâm hại tình dục. Mẫu được ủ qua đêm trong hỗn hợp sodium dodecyl sulfate (SDS), proteinase K, dithiothreitol (DTT) để loại bỏ các tạp chất, tế bào biểu mô của nữ giới sau đó được phân giải bằng hỗn hợp SDS và proteinase K. Tế bào tinh trùng chứa DNA vẫn được bảo toàn qua hai bước ly giải trên và sau đó được phân giải bằng cách ủ với hỗn hợp SDS, proteinase K và DTT. Ưu điểm của phương pháp ly giải phân biệt so với các phương pháp tách chiết phân biệt khác là nhanh chóng và chi phí thấp. Đến năm 1995, một nhóm các nhà khoa học Nhật Bản đã nghiên cứu cải tiến phương pháp ly giải phân biệt bằng cách sử dụng một phương pháp đặt tên là phương pháp tách chiết 2 bước [31]. Trong hầu hết các vụ án có yếu tố xâm hại tình dục, các mẫu thu từ dịch âm đạo của nạn nhân thường chứa một lượng tế bào biểu mô âm đạo của nữ giới nhiều hơn tế bào tinh trùng của nam giới. Trong những trường hợp như vậy, một số lượng đáng kể tế bào biểu mô âm đạo của nữ giới không bị phân giải hoàn toàn trong quá trình ly giải, dẫn đến hồ sơ DNA phân tích từ tế bào tinh trùng của người nam giới có thể bị lẫn tạp hoặc bị DNA từ tế bào biểu mô âm đạo của người nữ giới lấn át, gây khó khăn trong việc xác định nguồn DNA từ thủ phạm. Ở bước ly giải đầu tiên, thay vì ủ ở nhiệt độ 37°C như nghiên cứu của Grill và cộng sự, nhóm nghiên cứu của Yoshida và các cộng sự đã tăng nhiệt độ lên 70°C và ủ mẫu trong dung dịch đệm ly giải gồm đệm TNE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM etylendiamin tetraacetat (EDTA), 100 mM NaCl) với 1%

SDS và Proteinase K trong 3 giờ. Kết quả phân giải tế bào biểu mô âm đạo sau đó được kiểm tra trên kính hiển vi, mẫu sẽ tiếp tục được ủ trong dung dịch đệm ly giải trên trong 1 giờ nếu vẫn còn tồn tại các tế bào biểu mô âm đạo. Kết quả được định lượng ở bước sóng 260 nm bằng máy quang phổ UV cho thấy tế bào biểu mô âm đạo của người nữ giới đã bị phân giải hoàn toàn. Tế bào tinh trùng sau đó được ủ trong dung dịch gồm đệm TNE, SDS, Proteinase K và DTT trong hơn 8 giờ ở 56°C [31]. Phương pháp tách chiết 2 bước có ưu điểm là tế bào biểu mô âm đạo của nữ giới được loại bỏ hoàn toàn, tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là thời gian tách chiết tương đối dài, khả năng gặp rủi ro bị nhiễm cao hơn do phải sử dụng nhiều công đoạn hơn, đây là một hạn chế trong trường hợp có những vụ án cần có kết quả nhanh để phục vụ công tác điều tra của cơ quan trung cầu. Đồng thời, một lượng nhất định tế bào tinh trùng khó tránh khỏi việc bị phân giải trong giai đoạn đầu tiên của quá trình ly giải dẫn đến làm hao hụt nguồn DNA từ người nam giới, tác động tới giá trị truy nguyên của dấu vết.

Năm 2019, Zlatko Jakovski và cộng sự đã công bố một nghiên cứu nhằm khẳng định sự ưu việt của phương pháp tách chiết phân biệt trong 2 vụ việc thực tế. Vụ việc thứ nhất: Một người cha bị cáo buộc tấn công tình dục con gái của mình. Tại hiện trường vụ án thu giữ được mẫu dịch âm đạo của người con gái và một chiếc quần lót. Định hướng ban đầu cho thấy mẫu dịch âm đạo âm tính với tinh dịch, tinh trùng, trong khi dấu vết nghi tinh trùng trên chiếc quần lót cho kết quả dương tính. Dấu vết nghi tinh trùng trên chiếc quần lót thu giữ tại hiện trường được tách chiết sử dụng bộ kit QIAamp DNA mini (hãng QIAamp DNA Micro, Đức) và bộ kit PrepFiler<sup>®</sup> BTA Forensic DNA Extraction (hãng Thermo Fisher, Mỹ), kết quả cho thấy trên chiếc quần lót có DNA của hai người trong đó có DNA của một người nam giới. Tuy nhiên, khi tiến hành so sánh đối chiếu, DNA của người nữ giới trên chiếc quần lót lại là của mẹ nạn nhân, vì vậy dấu vết này không giúp ích cho quá trình điều tra. Trường hợp này cho thấy rằng mặc dù kiểu gen của người nam giới có STRs nhiễm sắc thể Y từ mẫu dịch âm đạo và nó trùng khớp với hồ sơ Y STR của người cha nghi phạm, nhưng vẫn chưa đủ để kết luận người cha có liên quan đến vụ tấn công tình dục, mẫu dịch âm đạo thu của người con gái lúc này là bằng chứng duy nhất. Vụ việc thứ hai: Tại một thị trấn nhỏ, một phụ nữ đã



báo cáo bị cưỡng hiếp tại nhà của cô ấy bởi một kẻ không rõ danh tính. Trong số các dấu vết mà cảnh sát thu thập được, có bộ đồ lót của nạn nhân trên có bám dính máu. Do lượng máu quá nhiều nên các giám định viên đã không phát hiện thấy chất dịch cơ thể nào khác. Kết quả tách chiết DNA bằng cách sử dụng bộ kit QIAamp DNA Micro EZ1 Biorobot và EZ1 Investigator, sau đó được khuếch đại và điện di trên máy phân tích gen ABI 3130, giám định viên đã thu được một mẫu DNA lẫn, trong đó có DNA của một người nam giới. Trong quá trình phân tích kết quả, có hai alen tại một locus D18S51 không trùng khớp với kiểu gen của nghi phạm, vì vậy không thể đưa ra được kết luận chắc chắn. Dấu vết nghi có tinh trùng, tinh dịch trong cả hai vụ việc sau đó được tách chiết lại sử dụng phương pháp tách chiết phân biệt, đã thu được kiểu gen đầy đủ riêng biệt của người nam giới và người nữ giới. Kết quả của hai trường hợp trên cho thấy rằng phương pháp chiết tách phân biệt có thể coi là phương pháp tối ưu nhất trong tách chiết mẫu hỗn hợp có chứa tế bào tinh trùng [38].

### **1.3.2. Một số phương pháp tách chiết phân biệt khác**

So với tế bào biểu mô, tế bào tinh trùng có kích thước nhỏ hơn khá nhiều. Căn cứ vào sự khác biệt trong hình dạng và kích thước của hai loại tế bào, phương pháp tách chiết phân biệt bằng màng lọc đã ra đời. Năm 1998, bộ lọc lưới ni lông có kích thước lỗ thích hợp được sử dụng để tách các tế bào tinh trùng hình bầu dục nhỏ với các tế bào biểu mô phẳng và lớn hơn đã được Chen và cộng sự nghiên cứu [35]. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, khoảng 70% tế bào tinh trùng và chỉ khoảng 1 - 2% tế bào biểu mô trong mẫu tế bào hỗn hợp sẽ lọt qua được màng lọc kích thước lỗ 10 $\mu$ m. Cũng trong năm 1998, Greenspoon và cộng sự cũng đã tiến hành một nghiên cứu tương tự trên cột lọc gọi là QIAamp nhằm thay thế phương pháp tách chiết ly giải phân biệt [37]. So sánh với phương pháp tách chiết ly giải phân biệt, phương pháp tách chiết phân biệt sử dụng màng lọc là phương pháp tách chiết vật lý, tiêu tốn ít hóa chất. Thời gian tách chiết cũng được rút ngắn đáng kể, từ khoảng 8 - 12 giờ xuống khoảng 5 - 6 giờ. Nhược điểm của phương pháp này là phải có trang thiết bị đặc thù, tốn kém chi phí hơn so với phương pháp tách chiết ly giải phân biệt.

Năm 2005, Katie và cộng sự đã thay thế quy trình tách chiết phân biệt thông thường bằng việc sử dụng một thiết bị kênh dẫn vi lưu (microfluidic device), tận dụng các đặc tính vật lý khác nhau của các tế bào dẫn đến sự lắng đọng của các tế bào biểu mô xuống đáy của bể chứa đầu vào và tiếp theo là sự bám dính vào chất nền thủy tinh. Do đó, tốc độ dòng chảy thấp có thể được sử dụng để tách tế bào tinh trùng khỏi hỗn hợp mẫu lẫn chứa tế bào biểu mô. Sau quá trình phân tách tế bào trên thiết bị vi lỏng, DNA được tách chiết, khuếch đại bằng các phương pháp trong phòng thí nghiệm thông thường. Kết quả cho thấy, việc tách chiết phân biệt bằng thiết bị kênh dẫn vi lưu giúp rút ngắn thời gian đáng kể so với phương pháp tách chiết phân biệt truyền thống [39].

Phương pháp soi tia laser để phát hiện tế bào tinh trùng trong hỗn hợp tế bào biểu mô và tế bào tinh trùng lần lượt được Sanders cùng cộng sự công bố năm 2006 và Murray cùng cộng sự công bố năm 2007 [33, 34]. Phương pháp này cũng có khả năng tách chiết chọn lọc các tế bào tinh trùng; tuy nhiên, tốn nhiều thời gian, công sức (để xác định các tế bào tinh trùng trong mẫu) và không có khả năng đáp ứng được với lượng mẫu nhiều. Nguyên lý của phương pháp dựa trên sự bắt màu huỳnh quang các tế bào, mẫu sẽ được nhuộm bằng hóa chất đặc biệt có khả năng bắt màu riêng biệt với tế bào biểu mô và tế bào tinh trùng. Hóa chất sử dụng ở bước nhuộm này phải đảm bảo sao cho ít gây ảnh hưởng nhất tới quá trình tách chiết tế bào ở các bước sau. Nhóm nghiên cứu đã sử dụng phương pháp soi tia laser để phát hiện và tách riêng tế bào tinh trùng, phục vụ cho bước tách chiết tiếp theo.

Trong những năm tiếp theo, các phương pháp tách chiết với mục đích tách chiết riêng tế bào biểu mô và tế bào tinh trùng liên tục được nghiên cứu nhằm đưa ra những phương pháp "tối ưu" hơn phương pháp ly giải phân biệt. Schoell đã công bố thêm một phương pháp tách chiết phân biệt dựa trên sự khác biệt về kích thước, hình dạng và đặc trưng của tế bào, được gọi là phương pháp đo tế bào dòng chảy [37]. Nguyên lý của phương pháp này dựa trên sự khác biệt ở các kháng nguyên trên bề mặt của tế bào biểu mô và tế bào tinh trùng. Một phần lớn tế bào biểu mô âm đạo của người nữ giới được tạo thành từ bạch cầu. Tế bào bạch cầu ở người mang kháng nguyên CD45 trên bề mặt, trong khi tế bào tinh trùng âm tính với kháng nguyên này. Tế bào biểu mô âm đạo cũng đặc trưng bởi hàm lượng cytokeratin. Nhóm nghiên cứu đã

tiến hành nhuộm hỗn hợp tế bào biểu mô âm đạo của người nữ giới và tế bào tinh trùng của người nam giới với fluoroisothiocyanate, một chất nhuộm huỳnh quang màu xanh lục, có thể phát hiện các kháng nguyên CD45 và cytokeratin bằng cách liên kết với kháng thể đơn dòng của chúng. Tinh trùng không có màu xanh lá cây, trong khi tất cả các tế bào biểu mô âm đạo phát huỳnh quang màu xanh lá cây [37]. So sánh với phương pháp ly giải phân biệt, phương pháp đo dòng chảy tế bào được đánh giá là có độ nhạy cao hơn, có tiềm năng trong việc phát hiện các tế bào tinh trùng từ dấu vết thu thập trong các vụ án có tính chất phức tạp. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi phải thay đổi việc thu mẫu bệnh phẩm từ dịch âm đạo bằng que tăm bông sang dịch rửa âm đạo.

Năm 2009, Martin và cộng sự đã nghiên cứu sử dụng phương pháp điện di trong tách chiết phân biệt tế bào tinh trùng và tế bào biểu mô, gọi là phương pháp DEP. DEP là sự chuyển động của các tế bào trong môi trường điện trường không đồng nhất. Do sự khác biệt về kích thước tế bào, cũng như sự khác biệt về thành phần hóa học và cấu trúc màng, tế bào tinh trùng và tế bào biểu mô sẽ phản ứng khác nhau trong điện trường không đồng nhất, dẫn đến sự khác biệt về sự di chuyển của DEP, từ đó có thể cho phép tách riêng 2 loại tế bào. Vì vậy, nhiều phương pháp tách chiết phân biệt dựa trên DEP đã được nghiên cứu làm công cụ nghiên cứu cho các ứng dụng chẩn đoán y tế và sinh học tế bào. Để ứng dụng với các mẫu dấu vết tinh trùng, tinh dịch, DEP có một số lợi thế tiềm năng so với quy trình tách chiết phân biệt tiêu chuẩn, bao gồm: (i) tách chiết được các mẫu có lượng ít, ở trạng thái lỏng; (ii) có khả năng ứng dụng với lượng mẫu lớn mà tách chiết bằng tay không làm được và (iii) tăng nồng độ và độ tinh khiết của tế bào tinh trùng sau tách chiết [40]. Nghiên cứu đã sử dụng hệ thống DEP thương mại có sẵn, hệ thống Silicon Biosystems SlideRunnerDEPSlide<sup>TM</sup>, để tách riêng tế bào tinh trùng và tế bào biểu mô ở định dạng vi lỏng, dựa trên chip. Dựa trên việc kiểm tra bằng kính hiển vi, kết quả cho thấy rằng DEP có thể được sử dụng để tách riêng tinh trùng và tế bào biểu mô thành các phân đoạn tinh khiết. Tuy nhiên, ở phạm vi của nghiên cứu, quy trình chiết tách phân biệt bằng hóa học tiêu chuẩn nhanh hơn và mang lại độ tinh khiết và sản lượng tốt hơn so với quy trình DEP [40].

Martinez và cộng sự đã đăng tải một nghiên cứu về việc sử dụng hai enzyme EA1 (được cung cấp bởi Zygem Corporation với tên gọi là ForensicGEM Saliva™) và Trypsin để tách riêng các tế bào tinh trùng và tế bào biểu mô nữ giới vào năm 2015. Do Zygem không có khả năng phân cắt các liên kết disulfide có trong các protein bao quanh DNA của tinh trùng, nên việc xử lý các mẫu hỗn hợp với enzyme Zygem sẽ giúp phân giải các tế bào biểu mô và giữ cho tế bào tinh trùng nguyên vẹn. Thời gian ủ của Zygem nhanh hơn nhiều so với phương pháp tách chiết phân biệt của Gill và toàn bộ quy trình tách chiết có thể được thực hiện trong một ống eppendorf, giảm thiểu nguy cơ thất thoát DNA và nhiễm bẩn trong quá trình tách chiết. Enzyme Zygem sau đó kết hợp với Trypsin để phân giải các tế bào tinh trùng. Việc kết hợp các phương pháp này thành một quy trình chiết tách khác biệt có thể giúp tối ưu thời gian tách chiết DNA từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch, đồng thời tăng hiệu quả tách chiết. Tuy nhiên, trong phạm vi của nghiên cứu, phương pháp tách chiết phân biệt sử dụng hai enzyme Zygem-Trypsin cho thấy sự phân tách không hoàn toàn của hai phần do Zygem phân giải không hoàn toàn các tế bào biểu mô. Mặc dù cần nghiên cứu và hoàn thiện thêm quy trình, nhưng nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng của một quy trình tách chiết phân biệt nhanh chóng, dễ dàng và có thể thực hiện trong bất kỳ phòng thí nghiệm nào [41].

### **1.3.3. Một số bộ kit tách chiết DNA từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch**

Song song với sự ra đời của các nghiên cứu về các phương pháp tách chiết phân biệt là sự ra đời của các bộ kit thương mại phục vụ việc tối ưu hóa quá trình tách chiết DNA từ các dấu vết nói chung và dấu vết tinh dịch, tinh trùng nói riêng. Differex™ System (hãng Promega, Mỹ) là một bộ kit thương mại phổ biến được dùng trong tách chiết DNA từ dấu vết tinh dịch, tinh trùng. Nguyên lý của nó cũng dựa trên phương pháp ly giải phân biệt, các tế bào biểu mô được phân giải bằng Proteinase K và DTT, hỗn hợp sau đó được ly tâm và tách riêng tế bào tinh trùng. Tế bào biểu mô và tế bào tinh trùng sau khi tách riêng, sẽ được tách chiết theo phương pháp hóa học sử dụng phenol và chloroform hoặc bằng các dung dịch ly giải đặc trưng. Hiệu quả tách chiết của phương pháp này được đánh giá tương đương hiệu quả tách chiết bằng phương pháp vô cơ sử dụng Chelex® [42]. Hiện nay, ở Việt Nam, quy trình

tách chiết DNA từ tinh dịch, tinh trùng được Bộ Y tế ban hành đang sử dụng bộ kit tách chiết Differex™ System (hãng Promega, Mỹ).

Tương tự như bộ kit Differex™ System (hãng Promega, Mỹ), bộ kit tách chiết DNA QIAamp DNA Micro (hãng QIAamp DNA Micro, Đức) cũng là một bộ kit thương mại phổ biến được sử dụng ở các phòng thí nghiệm kỹ thuật hình sự trên thế giới. Bộ kit QIAamp DNA Micro (hãng QIAamp DNA Micro, Đức) tách chiết DNA từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch dựa trên cơ chế màng lọc silica. Các mẫu có chứa tinh trùng, tinh dịch sẽ được ủ với đệm ly giải, bổ sung proteinase K và DTT để tách riêng tế bào biểu mô của người nữ giới và tế bào tinh trùng của người nam giới trước khi tiến hành tách chiết DNA. Nguyên lý của phương pháp này là sử dụng màng silica để phân tách DNA. Các phân tử DNA liên kết với bề mặt silica khi có mặt một số muối và trong điều kiện pH nhất định. DNA liên kết với silica dựa trên hoạt động của guanidinium HCl (GuHCl), hoạt động như một loại muối. Loại muối này làm biến tính các phân tử sinh học bằng cách phá vỡ lớp vỏ hydrat hóa xung quanh chúng. Axit nucleic sau đó được hấp thụ vào màng silica gel, polysaccharid và protein không liên kết và bị loại bỏ. Axit nucleic đã liên kết được rửa bằng cồn có chất đệm để khử muối. DNA tinh khiết sau đó được rửa giải trong dung dịch đệm ít muối hoặc nước [43].

Phương pháp tách chiết sử dụng hạt từ bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (hãng Thermo Fisher, Mỹ) cũng được đánh giá là một phương pháp hiệu quả trong tách chiết DNA, đặc biệt là với các mẫu khó, lượng dấu vết ít hoặc chất lượng dấu vết kém. Phương pháp tách chiết DNA bằng hạt từ này bản chất là các hạt bao gồm một lõi oxit sắt phủ silan. DNA mang điện tích âm, các hạt từ liên kết với các phân tử chứa axit cacboxylic tự do, lần lượt liên kết với DNA hoặc RNA. Một nam châm được đặt bên ngoài ống để tạo lực hút từ trường. Các hạt từ tính liên kết với axit nucleic bị hút vào từ trường và được hút tập trung vào cạnh của ống nghiệm. Từ trường được duy trì trong suốt quá trình tách chiết, bộ kit có các dung dịch để rửa và loại bỏ các protein gây nhiễm lẫn. Sau các bước rửa, DNA hoặc RNA được giải phóng khỏi các hạt từ tính bằng dung dịch đệm rửa giải, tạo ra một mẫu tinh khiết sẵn sàng để định lượng và phân tích [44].

## 1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI

### 1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Năm 2011, một nghiên cứu đánh giá hiệu quả phương pháp tách chiết phân biệt DNA từ dấu vết tinh dịch, tinh trùng dựa trên một số quy trình đối với 4 mẫu khảo nghiệm đã được tiến hành tại 9 phòng thí nghiệm khác nhau ở Thụy Sĩ [45]. Quy trình cơ bản được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm các bước: Ly giải lần 1, rửa, ly giải lần 2, tinh sạch. Mỗi phòng thí nghiệm sử dụng các loại hóa chất khác nhau cho từng bước trong quy trình, quy trình tách chiết được tiến hành giống như quy trình tách chiết mẫu thực. Mẫu sau tách chiết được đánh giá hiệu suất thu hồi của DNA tổng số từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch có trong mẫu bằng hai bộ kit realtime PCR là Quantifiler Human DNA và Human Male Y DNA Quantification và phân tích kết quả điện di mao quản trên máy giải trình tự gen ABI-3100. Kết quả đánh giá cho thấy sau khi tách chiết phân biệt, các phòng thí nghiệm đã thành công trong việc phát hiện DNA của người nam giới trong hỗn hợp có tỷ lệ DNA nam/nữ nằm trong khoảng từ 1:3 đến 9:1, trong khi mức độ không thể phát hiện thấy DNA của một cá thể trong hỗn hợp DNA khi tỷ lệ vượt quá 1:10 đến 1:20 [46], tức là kết quả tách chiết nằm trong khoảng có thể phát hiện.

Klein và cộng sự cũng đã tiến hành một nghiên cứu đánh giá hiệu quả của các phương pháp tách chiết khác nhau trong việc loại bỏ tế bào biểu mô nữ giới và thu hồi tế bào tinh trùng của nam giới từ các dấu vết tinh trùng, tinh dịch vào năm 2017 [47]. Nghiên cứu tiến hành nhằm mục đích làm nổi bật tác động mà nguồn DNA từ tinh trùng và nguồn DNA từ tế bào biểu mô đối với hồ sơ kiểu gen STR. Nghiên cứu được tiến hành với ba phương pháp tách chiết khác nhau bao gồm: Phương pháp tách chiết phân biệt truyền thống; phương pháp tách chiết phân biệt với hai lần ly giải và phương pháp tách chiết phân biệt sử dụng bộ kit Erase Sperm Isolation Kit (Paternity Testing Corporation©). Các mẫu sau tách chiết đều được tinh sạch bằng bộ kit PrepFiler® Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems, Mỹ). Kết quả tách chiết được định lượng và đánh giá thông qua tỷ lệ của % DNA từ tế bào tinh trùng thu hồi được % DNA từ tế bào biểu mô loại bỏ (gọi là tỷ lệ

SPRED). Tỷ lệ SPRED càng cao thì khả năng thu được DNA người nam giới trong phần tinh trùng càng cao.

Năm 2018, Gerry Alderson và cộng sự cũng đã tiến hành một nghiên cứu nhằm so sánh phần trăm hàm lượng DNA của nam giới tồn tại trong các mẫu khác nhau sau quá trình tách chiết phân biệt, kết quả cho thấy đối với các mẫu có chứa tinh trùng từ các vụ án có dấu hiệu tấn công tình dục, phần trăm DNA của nam giới tồn tại trong tinh trùng là 52,6% [48]. Cho thấy tầm quan trọng của phương pháp tách chiết phân biệt trong việc phát hiện DNA của người nam giới trong các vụ án có dấu hiệu tấn công tình dục.

Năm 2018, nhóm tác giả Mochammad Isro Alfajri và các cộng sự đã tiến hành một nghiên cứu đánh giá hiệu quả của ba phương pháp tách chiết DNA bao gồm: Phương pháp tách chiết sử dụng Chelex<sup>®</sup>, phương pháp tách chiết sử dụng hạt từ bằng bộ kit PrepFiler<sup>®</sup> BTA Forensic DNA Extraction (hãng Thermo Fisher, Mỹ) và phương pháp tách chiết sử dụng cột lọc bằng bộ kit QIAamp DNA Micro (hãng QIAamp DNA Micro, Đức) tương tự như nghiên cứu này. Tuy nhiên, nghiên cứu của Mochammad Isro Alfajri và cộng sự tập trung vào tách chiết DNA từ các dấu vết có nguồn gốc từ nước bọt, máu, tóc, xương và vi vết, nghiên cứu không đề cập đến nguồn từ dấu vết tinh trùng [49].

Năm 2018, Anslinger và cộng sự đã bước đầu nghiên cứu công nghệ DEPArray, hay còn gọi là công nghệ tách tế bào đơn, ứng dụng kỹ thuật số trong việc phân tách vật lý các tế bào, từ đó phân tách riêng từng tế bào đơn lẻ trong hỗn hợp. Bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang miễn dịch đặc hiệu tế bào, các tế bào đơn lẻ sẽ được phân biệt thông qua hình ảnh quang học. Hỗn hợp tế bào được đưa vào một dòng chảy, căn cứ vào kích thước khác nhau, các tế bào trong hỗn hợp được chia vào các ngăn có sẵn được tạo ra bởi các điện cực. Kết quả ảnh chụp cho thấy, các nhóm tế bào cùng loại có thể được tách riêng từ cùng một hỗn hợp và có thể thu hồi theo từng phần riêng biệt [50]. Cũng trong năm 2018, Victoria và cộng sự đã ứng dụng công nghệ tách tế bào đơn, cụ thể là sử dụng hệ thống DEPArray<sup>™</sup> của Menarini Silicon Biosystems, chứng minh rằng công nghệ này cho phép tách riêng tinh trùng và các phân đoạn tế bào biểu mô mà không cần tách chiết phân biệt, cải thiện

tỷ lệ khuếch đại thành công của mẫu và cải thiện việc phân tích các mẫu DNA kém hoặc bị biến tính [51]. Nghiên cứu được tiến hành với 32 mẫu, trong đó có 27 có chứa tế bào tinh trùng, kết quả phân tách bằng hệ thống DEPArray cho thấy có 26 trên 27 mẫu, chiếm 96,2% cho kết quả là kiểu gen duy nhất từ tế bào tinh trùng. Trong khi chỉ có 9 trên 28 mẫu sử dụng phương pháp tách chiết phân biệt, chiếm 32,1% cho kết quả tương ứng [51]. Việc sử dụng DEPArray™ cũng giúp lược bỏ bước phát hiện sự hiện diện của tinh trùng người và cho phép xác định trực tiếp loại và số lượng tế bào đang được phân tích, mà không cần định lượng DNA bằng qPCR. Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy tiềm năng của việc ứng dụng công nghệ DEPArray vào việc tách chiết các dấu vết lẫn, hoặc có chất lượng kém, đặc biệt là đối với các dấu vết tinh trùng, tinh dịch trong các vụ án xâm hại tình dục.

#### **1.4.2. Tình hình nghiên cứu trong nước**

Ở phạm vi trong nước, do tính đặc trưng của dấu vết tinh trùng, tinh dịch là thường chỉ xuất hiện trong các vụ án hình sự nên việc nghiên cứu, tách chiết DNA từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch còn trong phạm vi hẹp, chỉ một số cơ quan chuyên môn được phân công thực hiện. Những đề tài nghiên cứu liên quan đến dấu vết tinh trùng, tinh dịch phục vụ giám định hình sự là rất ít. Năm 2004, tác giả Bùi Bá Hợp đã tiến hành nghiên cứu đề tài: "Nghiên cứu khả năng tồn tại của dấu vết tinh dịch, tinh trùng người và một số phương pháp xác định dấu vết tinh trùng, tinh dịch người để sử dụng trong giám định Sinh học pháp lý" [52]. Tuy nhiên, đề tài mới chỉ dừng ở bước nghiên cứu định hướng và xác định chính xác sự có mặt của tinh trùng. Đề tài chưa tiến hành tách chiết DNA nên chưa đánh giá được chất lượng, hàm lượng của tế bào tinh trùng trong mẫu, dấu vết.

Qua nghiên cứu các công trình ở trong và ngoài nước có liên quan tới đề tài, chúng tôi nhận thấy chưa có công trình nghiên cứu nào đánh giá hiệu quả tách chiết DNA giữa các phương pháp khác nhau ứng dụng trong tách chiết DNA từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch trên các mẫu án thực tế. Hướng nghiên cứu của đề tài là mới, phục vụ trực tiếp công tác giám định sinh học kỹ thuật hình sự, đặc biệt là giám định gen hiện nay.



## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

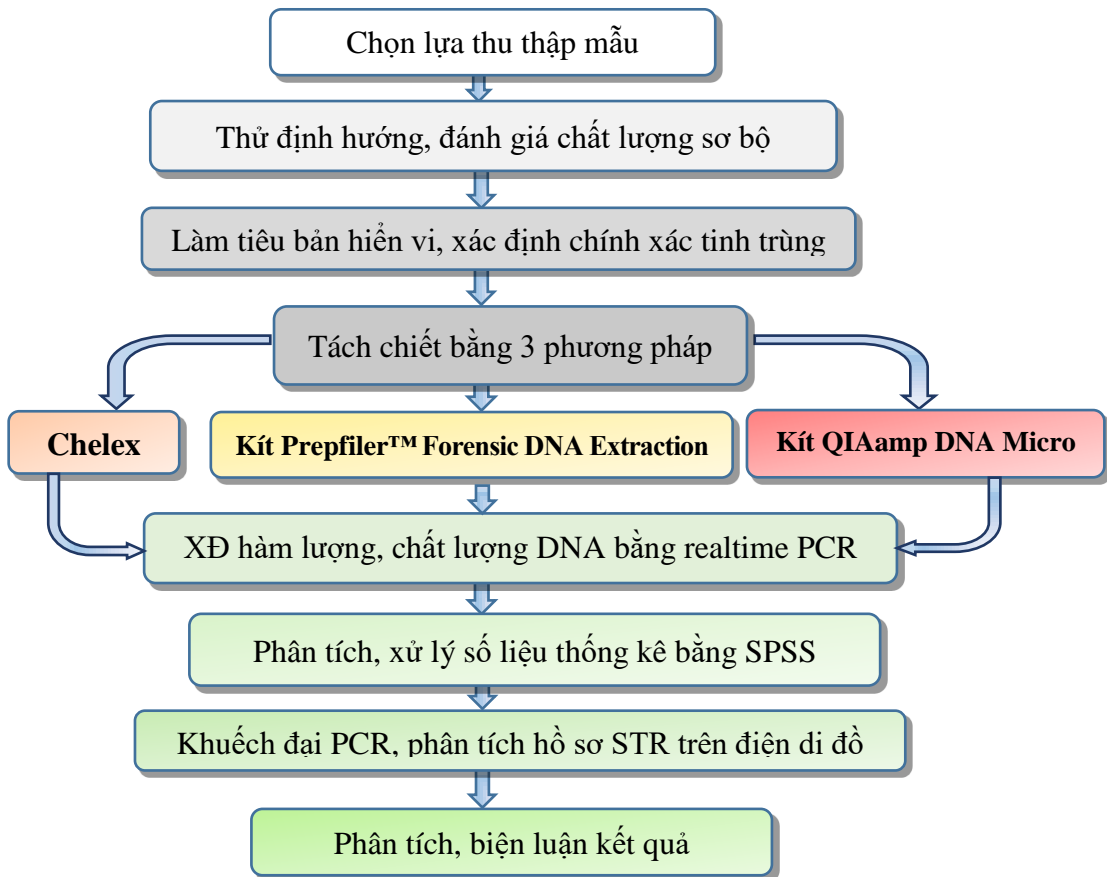
### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đề tài được tiến hành với 30 mẫu dấu vết tinh trùng thu thập từ các vụ việc mang tính hình sự có hoạt động xâm hại tình dục thực tế xảy ra trong hai năm 2021 – 2022. Các thông tin cá nhân liên quan đến mẫu dấu vết trong các vụ việc đều được tách riêng thành các mẫu mù trong quá trình nghiên cứu. Các mẫu được đánh mã số từ 1 - 30, được chọn lựa làm thí nghiệm theo trình tự ngẫu nhiên.

03 phương pháp tách chiết DNA vô cơ bằng tay (không sử dụng robot) được nghiên cứu đánh giá bao gồm: Phương pháp sử dụng Chelex<sup>®</sup>, phương pháp dựa trên nguyên lý hấp phụ từ tính sử dụng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (hãng Thermo Fisher, Mỹ) và phương pháp dựa trên nguyên lý cột lọc sử dụng bộ kit QIAamp DNA Micro (hãng QIAamp DNA Micro, Đức).

### 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tiến trình các bước nghiên cứu được minh họa bởi sơ đồ sau:



Hình 2.1. Sơ đồ các bước nghiên cứu

### **2.2.1. Phương pháp thu thập, lựa chọn mẫu**

Các mẫu dấu vết được chọn lựa sao cho có chất lượng và số lượng tương đương nhau giữa khi áp dụng 3 phương pháp tách chiết: có tuổi dấu vết, chất lượng về mặt cảm quan là như nhau và có mặt trên cùng loại vật mang vết (trên loại vải có tính chất tương tự nhau: vải cotton, lanh, thun, không thu dấu vết tồn tại trên các loại vải có chất nhuộm đặc biệt có thể ảnh hưởng đến chất lượng dấu vết như vải jeans, denim,...). Các mẫu được cắt từ cùng một dấu vết, tại cùng một vị trí trên mẫu vật, lượng mẫu cắt vào mỗi ống tách chiết có kích thước tương đương nhau (khoảng 3,0x3,0mm). Các dấu vết tinh trùng được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu của đề tài đều là các mẫu được thu thập và để khô tự nhiên, chưa qua xử lý bằng hóa chất. Ngoài ra, các mẫu dấu vết được chọn lựa sao cho có sự tương đồng cao nhất, bằng cách dựa vào độ đậm nhạt của màu sắc hiển thị của kit thử định hướng và mật độ tinh trùng trên vi trường qua việc quan sát hiển vi tiêu bản soi tươi.

Chọn lựa nguồn dấu vết đảm bảo có chất lượng tương đối đồng đều cũng bằng cách khai thác hồ sơ, tình tiết vụ việc và thu thập thông tin từ cơ quan điều tra (về chất lượng, số lượng và tuổi và điều kiện tồn tại của dấu vết như độ ẩm, ánh sáng,...).

### **2.2.2. Phương pháp đánh giá chất lượng dấu vết tinh dịch, tinh trùng bằng cảm quan**

#### **2.2.2.1. Quan sát bằng mắt thường và bằng nguồn sáng khả biến**

Quan sát bằng mắt thường dấu vết tinh dịch, tinh trùng trên bề mặt vật mang có màu sắc tương phản với màu sắc dấu vết: Quan sát màu sắc, đo đặc kích thước bề mặt dấu vết.

Quan sát dưới nguồn sáng khả biến ở bước sóng 450 nm, tiến hành đánh dấu và đo đặc kích thước dấu vết dưới nguồn sáng khả biến.

#### **2.2.2.2. Quan sát màu sắc chỉ thị của phương pháp test định hướng dấu vết tinh dịch, tinh trùng**

Sử dụng kit Phosphatesmo KM (của hãng Machery Nagel, Đức)

Photphatase axit là một loại enzyme có trong tinh dịch, nồng độ của enzyme photphatase axit trong tinh dịch cao gấp từ 20 - 400 lần so với dịch cơ thể khác. Enzyme này tương đối bền vững trước sự tác động của môi trường và vi sinh vật, do đó người ta sử dụng việc xác định sự có mặt của enzyme

này để định hướng sự có mặt của tinh dịch.

Trong một số trường hợp, dịch âm đạo hay dịch chiết của một số loại hoa quả cũng cho kết quả dương tính nhưng rất yếu.

Dấu vết nghi tinh dịch sẽ được làm ẩm bằng nước cất, sau đó thấm lên mặt có hóa chất của test.

Nếu dấu vết đó là tinh dịch, phản ứng dương tính sẽ cho màu tím đặc trưng, độ đậm nhạt của màu tím và thời gian lên màu tùy thuộc vào chất lượng và lượng của dấu vết.

### **2.2.3. Làm tiêu bản, xác định chính xác tinh trùng người bằng phương pháp nhuộm Christmas Tree**

Phần vật mang nghi có dấu vết tinh trùng được cắt thành mảnh có kích thước khoảng 0,5 x 0,5 cm và cho vào ống nghiệm. Thêm khoảng 2ml nước cất, dùng que sạch trộn đều, ủ ở nhiệt độ phòng từ 20 - 30 phút, thi thoảng lắc nhẹ. Loại bỏ vật mang rồi ly tâm mẫu 10 phút, tốc độ 3.000 vòng/phút, loại bỏ dịch nổi, để lại khoảng 30µl dịch cùng cặn tế bào ở đáy ống nghiệm, nhỏ lên lam kính, để khô tự nhiên rồi đem nhuộm.

Nhỏ 1 giọt dung dịch Nuclear Fast red lên lam kính sao cho bao phủ hoàn toàn phần dấu vết, ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút. Rửa nhanh lam kính bằng nước cất, sau đó nhỏ 1 giọt dung dịch Picroindigocarmin, để khoảng 15 giây, rửa sạch bằng cồn tuyệt đối. Để tiêu bản khô tự nhiên rồi đem quan sát dưới kính hiển vi.

### **2.2.4. Phương pháp tách chiết DNA từ tinh dịch, tinh trùng bằng Chelex®**

DNA được tách chiết theo quy trình chuẩn bằng phương pháp vô cơ sử dụng hạt Chelex®. Các tế bào biểu mô đầu tiên được phân giải bằng cách bổ sung SDS và proteinase K. Các tế bào tinh trùng nói chung có khả năng chống lại sự phân giải bởi các hóa chất này. Khi các tế bào biểu mô đã bị phân giải, tế bào tinh trùng sẽ được giữ lại bằng cách ly tâm thu cặn tế bào. Sau đó, DNA từ các tế bào biểu mô nằm ở phần dịch nổi sẽ được tách chiết ở một ống riêng, DNA từ các tế bào tinh trùng nằm ở phần cặn sẽ được tách chiết ở một ống khác, theo các bước khác nhau. Các tế bào tinh trùng sau khi tách riêng được phân giải bằng cách bổ sung SDS, proteinase K và DTT. DTT làm gãy

các liên kết disulfide có trong màng tế bào tinh trùng, giải phóng DNA của tế bào tinh trùng [53]. DNA từ tế bào tinh trùng và tế bào biểu mô sau đó được tách chiết theo phương pháp tách chiết vô cơ sử dụng hạt Chelex<sup>®</sup>.

#### *Quy trình tách chiết*

Cắt một phần vật mang dấu vết kích thước khoảng 3 mm x 3 mm vào ống eppendorf 1,5ml vô trùng.

Thêm 500µl dung dịch đệm tách chiết và 50µl Proteinase K (nồng độ 10mg/ml) vào ống, ủ hỗn hợp ở 56°C trong 30 phút.

Loại bỏ vật mang bằng cách chuyển toàn bộ dịch lỏng sang ống eppendorf 1,5ml vô trùng mới hoặc loại bỏ vật mang ra khỏi ống eppendorf 1,5ml vô trùng.

Đem toàn bộ dịch lỏng sau khi đã loại bỏ vật mang ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 3 phút.

Hút 150µl dịch nổi bên trên sang một ống eppendorf 1,5ml vô trùng mới để tách DNA từ tế bào biểu mô của nữ giới, loại bỏ toàn bộ phần dịch nổi còn lại trong ống, giữ lại cạn.

#### *Tách chiết DNA từ tế bào tinh trùng*

Hòa tan cạn tế bào trong 500µl dung dịch đệm tách chiết chứa 1,75% SDS + 50µl Proteinase K và ủ ở 56°C trong 30 phút (toàn bộ phần cạn tế bào phải được hòa tan hoàn toàn trước khi ủ).

Ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 3 phút, loại bỏ phần dịch nổi, giữ lại cạn.

Rửa cạn tế bào trong 500µl dung dịch đệm tách chiết và ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 5 phút.

Loại bỏ phần dịch nổi, giữ lại cạn. Lặp lại bước rửa 2 lần. Giữ lại khoảng 30µl dịch nổi, hòa tan cùng cạn tế bào và lấy khoảng 1 - 3µl làm tiêu bản.

Thêm 300µl dung dịch đệm tách chiết + 30µl Proteinase K + 30µl DTT và ủ ở 56°C trong 2 tiếng. Thêm 1ml cồn (đã được làm lạnh ở -20°C) và ủ ở -20°C trong 30 phút.

Ly tâm ở 13000 vòng/phút trong ít nhất 15 phút và loại bỏ dịch nổi. Cạn tế bào sau đó được hòa tan trong 150µl nước tinh khiết.

Thêm 50µl Chelex 20%, vortex nhẹ để trộn đều hỗn hợp và ủ ở 56°C trong 30 phút. Ủ mẫu ở 100°C trong 8 phút.

Ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 3 phút, hạt Chelex sẽ lắng ở dưới, hút phần dịch nổi để thực hiện phản ứng PCR.

Mẫu sau khi tách chiết được bảo quản ở 4°C hoặc tủ đông.

*Tách chiết DNA từ tế bào biểu mô của nữ giới*

Thêm 50µl Chelex 20% vào ống chứa 150µl dịch nổi và ủ ở 56°C trong 30 phút.

Ủ mẫu ở 100°C trong 8 phút. Ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 3 phút, hạt Chelex sẽ lắng ở dưới, hút phần dịch nổi để thực hiện phản ứng PCR.

Mẫu sau khi tách chiết được bảo quản ở 4°C hoặc tủ đông.

### **2.2.5. Phương pháp tách chiết DNA từ tinh dịch, tinh trùng bằng bộ kit QIAamp DNA Micro (hãng QIAamp DNA Micro, Đức)**

Dấu vết tinh dịch, tinh trùng được tách chiết DNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất trong bộ kit QIAamp DNA Micro (hãng QIAamp DNA Micro, Đức).

*Quy trình tách chiết*

Phần vật mang dấu vết tinh trùng, tinh dịch được cắt thành mảnh có kích thước khoảng 3,0x3,0mm và cho vào ống eppendorf mới.

Thêm vào ống eppendorf 20µl proteinase K và 500µl dung dịch đệm ATL, vortex nhẹ khoảng 10 giây để trộn đều hỗn hợp.

Đặt hỗn hợp mẫu vào máy lắc ổn nhiệt, ủ hỗn hợp mẫu ở nhiệt độ 56°C, lắc 900 vòng/phút trong tối thiểu 1 tiếng.

Loại bỏ vật mang, ly tâm ống eppendorf ở tốc độ cao nhất trong 5 phút.

Chuyển 300µl dịch nổi sang ống eppendorf mới để tách chiết tế bào biểu mô nữ giới, loại bỏ hoàn toàn phần dịch nổi còn lại, để lại khoảng 30µl dịch nổi cùng phần cặn tế bào.

*Tách chiết DNA từ tế bào tinh trùng*

Hòa tan cặn tế bào trong 500µl dung dịch đệm ATL. Vortex khoảng 10 giây để trộn đều hỗn hợp.

Ly tâm ở tốc độ cao nhất trong 5 phút, sau đó loại bỏ hoàn toàn phần dịch nổi còn lại, để lại khoảng 30µl dịch nổi cùng phần cặn tế bào.

Lặp lại bước rửa ít nhất 3 lần. Thêm vào ống eppendorf 300µl dung dịch đệm ATL + 10µl proteinase K + 10µl DTT (nồng độ 1M), vortex khoảng 10 giây để trộn đều hỗn hợp.

Đặt hỗn hợp mẫu vào máy lắc ổn nhiệt, ủ hỗn hợp mẫu ở nhiệt độ 56°C, lắc 900 vòng/phút trong tối thiểu 1 tiếng.

*Từ bước này tách chiết DNA từ tế bào tinh trùng và tách chiết DNA từ tế bào biểu mô nữ giới làm giống nhau*

*Rửa và loại bỏ các protein gây nhiễm lẫn trên cột*

Bổ sung thêm 300µl dung dịch đệm AL vào ống, vortex khoảng 10 giây để trộn đều hỗn hợp.

Tiếp tục đặt hỗn hợp mẫu vào máy lắc ổn nhiệt, ủ hỗn hợp mẫu ở nhiệt độ 70°C, lắc 900 vòng/phút trong 10 phút.

Ly tâm ở tốc độ cao nhất trong một phút, sau đó cẩn thận chuyển toàn bộ phần dịch nổi sang cột QIAamp MinElute.

Ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 1 phút, sau đó chuyển cột QIAamp MinElute sang ống 2ml mới, loại bỏ phần dịch sau ly tâm.

Thêm 500µl dung dịch đệm AW1 vào cột, ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 1 phút, sau đó chuyển cột QIAamp MinElute sang ống 2ml mới, loại bỏ phần dịch sau ly tâm.

Thêm 500µl dung dịch đệm AW2 vào cột, ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 1 phút, sau đó chuyển cột QIAamp MinElute sang ống 2ml mới, loại bỏ phần dịch sau ly tâm.

Ly tâm cột rỗng ở tốc độ cao nhất trong 3 phút để làm khô màng hoàn toàn.

*Thu hồi DNA*

Chuyển cột sang ống eppendorf 1,5ml sạch, thêm 20 - 50µl dung dịch đệm AE vào chính giữa màng.

Ủ cột ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, ly tâm ở tốc độ cao nhất trong 1 phút, thu được mẫu sau tách chiết để chuẩn bị cho quá trình định lượng và PCR.

Mẫu sau khi tách chiết được bảo quản ở 4°C hoặc tủ đông.

### **2.2.6. Phương pháp tách chiết DNA từ tinh dịch, tinh trùng bằng**

## **bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (hãng Thermo Fisher, Mỹ)**

DNA từ tinh dịch, tinh trùng được tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất trong bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (hãng Thermo Fisher, Mỹ).

### *Quy trình tách chiết*

Trước khi tiến hành tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction (hãng Thermo Fisher, Mỹ), đầu vết tinh dịch, tinh trùng được ủ trong hỗn hợp dung dịch đệm tách chiết bổ sung thêm proteinase K và DTT để tách riêng tế bào tinh trùng và tế bào biểu mô nữ giới [19].

### *Tách chiết DNA từ tế bào tinh trùng*

#### *Liên kết DNA với các hạt từ*

Bổ sung vào ống eppendorf một lượng dung dịch đệm ly giải PrepFiler™ Lysis Buffer sao cho tổng thể tích hỗn hợp trong ống đạt 500µl.

Vortex ống hạt từ trong khoảng 5 giây, thêm 15µl hạt từ vào hỗn hợp, thêm tiếp 300µl dung dịch isopropanol vào hỗn hợp, vortex trong khoảng 5 giây.

Đặt ống eppendorf vào máy lắc, lắc 1000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.

### *Tách chiết DNA từ tế bào biểu mô nữ giới*

#### *Liên kết DNA với các hạt từ*

Bổ sung vào ống eppendorf một lượng dung dịch đệm ly giải PrepFiler™ Lysis Buffer sao cho tổng thể tích hỗn hợp trong ống đạt 300µl.

Vortex ống hạt từ trong khoảng 5 giây, thêm 15µl hạt từ vào hỗn hợp, thêm tiếp 180µl dung dịch isopropanol vào hỗn hợp, vortex trong khoảng 5 giây.

Đặt ống eppendorf vào máy lắc, lắc 1000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.

*Từ bước này tách chiết DNA từ tế bào tinh trùng và tách chiết DNA từ tế bào biểu mô nữ giới làm giống nhau*

### *Rửa và loại bỏ các protein gây nhiễm lẫn*

Đặt ống eppendorf vào khay nam châm, đợi khoảng 1 - 2 phút sao cho các hạt từ bị hút hết về phía thành ống sát với nam châm, loại bỏ hoàn toàn

phần dịch một cách cẩn thận để không làm xáo trộn hạt từ.

Thêm vào ống eppendorf 600 $\mu$ l dung dịch đệm rửa A PrepFiler™ Wash Buffer A, vortex khoảng 10 giây, sau đó ly tâm nhanh để thu hồi toàn bộ phần dịch lỏng bị bắn lên nắp và quanh thành ống.

Đặt ống eppendorf vào khay nam châm, đợi khoảng 1 - 2 phút sao cho các hạt từ bị hút hết về phía thành ống sát với nam châm, loại bỏ hoàn toàn phần dịch lỏng một cách cẩn thận để không làm xáo trộn hạt từ.

Thêm vào ống eppendorf 300 $\mu$ l dung dịch đệm rửa A PrepFiler™ Wash Buffer A, vortex khoảng 10 giây, sau đó ly tâm nhanh để thu hồi toàn bộ phần dịch lỏng bị bắn lên nắp và quanh thành ống.

Đặt ống eppendorf vào khay nam châm, đợi khoảng 1 - 2 phút sao cho các hạt từ bị hút hết về phía thành ống sát với nam châm, loại bỏ hoàn toàn phần dịch lỏng một cách cẩn thận để không làm xáo trộn hạt từ.

Thêm vào ống eppendorf 300 $\mu$ l dung dịch đệm rửa B PrepFiler™ Wash Buffer B, vortex khoảng 10 giây, sau đó ly tâm nhanh để thu hồi toàn bộ phần dịch lỏng bị bắn lên nắp và quanh thành ống.

Đặt ống eppendorf vào khay nam châm, đợi khoảng 1 - 2 phút sao cho các hạt từ bị hút hết về phía thành ống sát với nam châm, loại bỏ hoàn toàn phần dịch lỏng một cách cẩn thận để không làm xáo trộn hạt từ. Ly tâm nhanh một lần nữa để đảm bảo thu hồi và loại bỏ được hoàn toàn phần dịch lỏng.

Mở nắp ống eppendorf và để khô hạt từ trong khoảng từ 7 - 10 phút.

#### *Thu hồi DNA*

Thêm vào ống eppendorf từ 20 - 50 $\mu$ l dung dịch đệm tách chiết PrepFiler™ Elution Buffer, vortex khoảng 10 giây sau đó đặt ống eppendorf vào máy lắc, lắc 900 vòng/phút trong 5 phút ở 70°C.

Đặt ống eppendorf vào khay nam châm, đợi khoảng 1 - 2 phút sao cho các hạt từ bị hút hết về phía thành ống sát với nam châm, hút chuyển toàn bộ phần dịch lỏng chứa DNA sang ống eppendorf mới, thu được mẫu sau tách chiết để chuẩn bị cho quá trình định lượng và PCR.

Mẫu sau khi tách chiết được bảo quản ở 4°C hoặc tủ đông.



### 2.2.7. Phương pháp định lượng DNA sau tách chiết bằng bộ kit DNA Quantifiler™ Trio DNA Quantification

Hàm lượng của DNA sau tách chiết được đánh giá thông qua kết quả định lượng bằng phương pháp Realtime PCR bằng bộ kit định lượng DNA Quantifiler™ Trio DNA Quantification, sử dụng máy Realtime PCR 7500.

Bộ kit định lượng DNA Quantifiler™ Trio DNA Quantification được thiết kế để định lượng đồng thời DNA tổng số và DNA của người nam giới trong một mẫu. Kết quả thu được khi sử dụng bộ dụng cụ có thể giúp xác định: Lượng DNA đầu vào để tiến hành phân tích STR; tỷ lệ tương đối lượng DNA của người nam giới và người nữ giới trong cùng một mẫu từ đó giúp cho việc chọn lựa phản ứng và tiến hành phân tích STR thuận lợi hơn; chất lượng DNA, bao gồm cả mức độ biến tính và mức độ ức chế của DNA; phát hiện chất ức chế phản ứng PCR, nếu chất ức chế phản ứng PCR có trong mẫu, có thể tinh chế lại mẫu trước khi tiến hành phân tích STR.

So sánh với các bộ kit định lượng khác, bộ kit Quantifiler™ Trio DNA Quantification (hãng Thermo Fisher, Mỹ) cho phép phát hiện lượng DNA đầu vào ít hơn 10pg so với các bộ kit khác, cho phép các phòng thí nghiệm kỹ thuật hình sự đồng thời có được đánh giá định lượng và định tính về DNA tổng số người và của riêng người nam giới trong cùng một phản ứng PCR với độ nhạy cao [54].

#### *Quy trình định lượng*

Chuẩn bị 05 ống Standards để xây dựng đồ thị chuẩn có nồng độ và thể tích pha loãng như bảng sau:

*Bảng 2.1. Nồng độ và thể tích pha loãng Standards*

<b>Standard</b>	<b>Nồng độ (ng/μl)</b>	<b>Thể tích</b>	<b>Hệ số pha loãng</b>
Std.1	50,000	10μl (lấy từ ống gốc nồng độ 100 ng/μl) + 10μl dung dịch đệm pha loãng Quantifiler™ THP DNA	2X

Std.2	5,000	10 $\mu$ l (lấy từ ống Std.1) + 90 $\mu$ l dung dịch đệm pha loãng Quantifiler™ THP DNA	10X
Std.3	0,500	10 $\mu$ l (lấy từ ống Std.2) + 90 $\mu$ l dung dịch đệm pha loãng Quantifiler™ THP DNA	10X
Std.4	0,050	10 $\mu$ l (lấy từ ống Std.3) + 90 $\mu$ l dung dịch đệm pha loãng Quantifiler™ THP DNA	10X
Std.5	0,005	10 $\mu$ l (lấy từ ống Std.4) + 90 $\mu$ l dung dịch đệm pha loãng Quantifiler™ THP DNA	10X

Hỗn hợp phản ứng của mỗi mẫu được chuẩn bị như bảng 2.2.

*Bảng 2.2. Thành phần của một phản ứng định lượng*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích (<math>\mu</math>l)</b>
Quantifiler™ Trio Primer Mix	8
Quantifiler™ THP Reaction Mix	10
Mẫu	2
Tổng	20

Cài đặt phản ứng trên máy và chạy phản ứng

*Bảng 2.3. Chu trình nhiệt phản ứng realtime PCR*

<b>Nhiệt độ</b>	<b>Thời gian</b>
95°C	2 phút
95°C	9 giây
60°C	30 giây
Số chu kỳ: 40 chu kỳ	

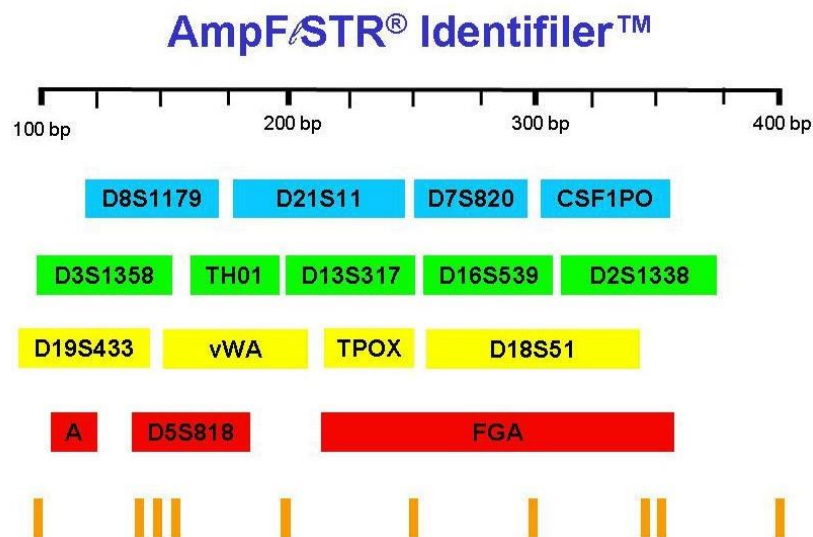
### **2.2.8. Khuếch đại sản phẩm DNA sau tách chiết bằng phản ứng PCR**

Phản ứng PCR được tiến hành sử dụng bộ kit AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification của hãng ABI (Mỹ) với phức hệ môi gắn huỳnh quang STR (gồm 15 locus gen trên nhiễm sắc thể thường: CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA và 01 locus gen trên nhiễm sắc thể giới tính: Amelogenin).

*Bảng 2.4. Tên, vị trí 16 locus trong được sử dụng trong bộ kit AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification với trình tự 16 cặp môi tương ứng [55-62]*

<b>Tên locus</b>	<b>Vị trí trên NST</b>	<b>Môi xuôi</b>	<b>Môi ngược</b>
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	CTGATGGTTGGC CTCAAGCCTGTG	TAAAGAGATTCA TTAACTTGACTG
CSF1PO	5q33.3-34	AACCTGAGTCTG CCAAGGACTAGC	TTCCACACACCAC TGGCCATCTTC
D2S1338	2q35-37.1	CCAGTGGATTTG GAAACAGA	ACCTAGCATGGT ACCTGCAG
D3S1358	3p	ACTGCAGTCCAA TCTGGGT	ATGAAATCAACA GAGGCTTG
D5S818	5q21-31	GGGTGATTTTCC TCTTTGGT	TGATTCCAATCAT AGCCACA
D8S1179	8	TTTTTGTATTTCA TGTGTACATTCG	CGTAGCTATAATT AGTTCATTTTCA
D7S820	7q11.21-22	TGTCATAGTTTA GAACGAACTAAC G	CTGAGGTATCAA AAACTCAGAGG
D13S317	13q22-31	ACAGAAGTCTGG GATGTGGA	GCCCAAAAAGAC AGACAGAA

D16S539	16q24-qter	GATCCCAAGCTC TTCCTCTT	ACGTTTGTGTGTG CATCTGT
D18S51	18q21.3	GAGCCATGTTCA TCCACTG	CAAACCCGACTA CCAGCAAC
D19S433	19q12-13.1	CCTGGGCAACAG AATAAGAT	TAGGTTTTTAAGG AACAGGTGG
D21S11	21q11.2-q21	GTGAGTCAATTC CCCAAG	GTTGTATTAGTCA ATGTTCTCC
FGA	4q28	GCCCCATAGGTT TTGAACTCA	TGATTTGTCTGTA ATTGCCAGC
TH01	11p15.5	GTGGGCTGAAAA GCTCCCGATTAT	GTGATTCCCATTG GCCTGTTCTC
TPOX	2p23-2per	ACTGGCACAGAA CAGGCACTTAGG	GGAGGAACTGGG AACCACACAGGT
vWA	12p12-pter	CCCTAGTGGATG ATAAGAATAATC	GGACAGATGATA AATACATAGGAT GGATGG



Hình 2.2. Các locus hệ Identifiler

Thành phần của một phản ứng PCR sử dụng bộ kit AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification như sau:

*Bảng 2.5. Thành phần của một phản ứng PCR*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích</b>
AmpF/STR PCR Reaction Mix	5,0µl
AmpF/STR AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification Primer Set	2,5µl
Mẫu	5µl
Nước	
Tổng	12,5µl

Hỗn hợp phản ứng được chạy trên máy PCR với chu trình nhiệt như sau:

*Bảng 2.6. Chu trình nhiệt được sử dụng cho phản ứng nhân gen sử dụng bộ kit Identifiler*

<b>Nhiệt độ</b>	<b>Thời gian</b>	<b>Số chu kỳ</b>
95°C	11 phút	1 chu kỳ
94°C	1 phút	28 chu kỳ
59°C	1 phút	
72°C	1 phút	
60°C	60 phút	1 chu kỳ
4°C	∞	1 chu kỳ

Lượng mẫu đầu vào của ba phương pháp tách chiết cho phản ứng nhân gen của mỗi mẫu là giống nhau.

### 2.2.9. Điện di mao quản

Sau khi thu được sản phẩm PCR, tiến hành xác định hồ sơ kiểu gen của các mẫu nghiên cứu bằng phương pháp điện di mao quản trên máy giải trình tự gen 3500 của hãng Thermo Fisher. Kết quả biểu đồ điện di sẽ được thể hiện bởi các peak đặc trưng cho các alen ở mỗi locus gen. Chất lượng, số lượng của DNA khuôn sẽ được gián tiếp đánh giá qua hình thái các peak trên biểu đồ điện di: Số lượng peak bị mất, , tỷ lệ peak bị lỗi (hiện tượng sè peak (split, shoulder), các peak giả, các hiện tượng thêm peak, mất peak (drop in, drop out), hiện tượng kéo peak (pull up),...

*Bảng 2.7. Thành phần của một phản ứng điện di mao quản*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích</b>
Hi-Di™ Formamide	10 µl
GeneScan™ 600 LIZ®	0,3 µl
Mẫu/ Thang alen chuẩn	1µl
Tổng	11,3 µl

Hỗn hợp phản ứng được biến tính trên máy PCR Applied Biosystems ProFlex (hãng Thermo Fisher, Mỹ) ở 95°C trong vòng 4 – 5 phút, sau đó lấy ra và ủ ngay vào đá lạnh trong 3 phút. Quá trình biến tính và làm lạnh đột ngột này đảm bảo hầu hết DNA từ dạng mạch đôi sẽ chuyển hoàn toàn sang dạng mạch đơn.

### 2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS

Kết quả định lượng DNA sau tách chiết bằng 3 phương pháp được phân tích bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (kiểm định ANOVA 1 yếu tố) sử dụng phần mềm SPSS (hãng IBM, Mỹ).

Tất cả các kết quả trả ra đều dựa trên giả định rằng khả năng xảy ra sai sót chỉ là 5%.

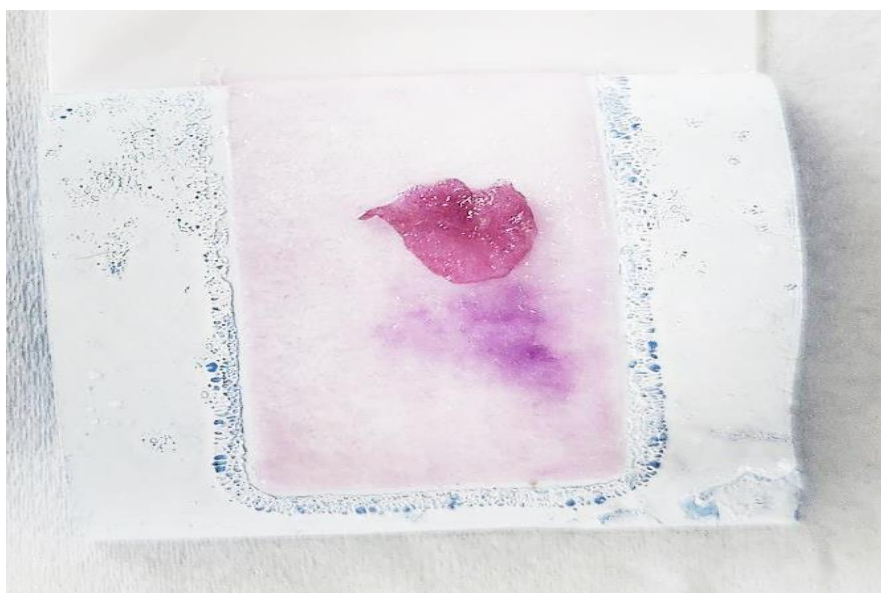
### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG DẦU VẾT TINH DỊCH, TINH TRÙNG VÀ XÁC ĐỊNH CHÍNH XÁC TINH TRÙNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN

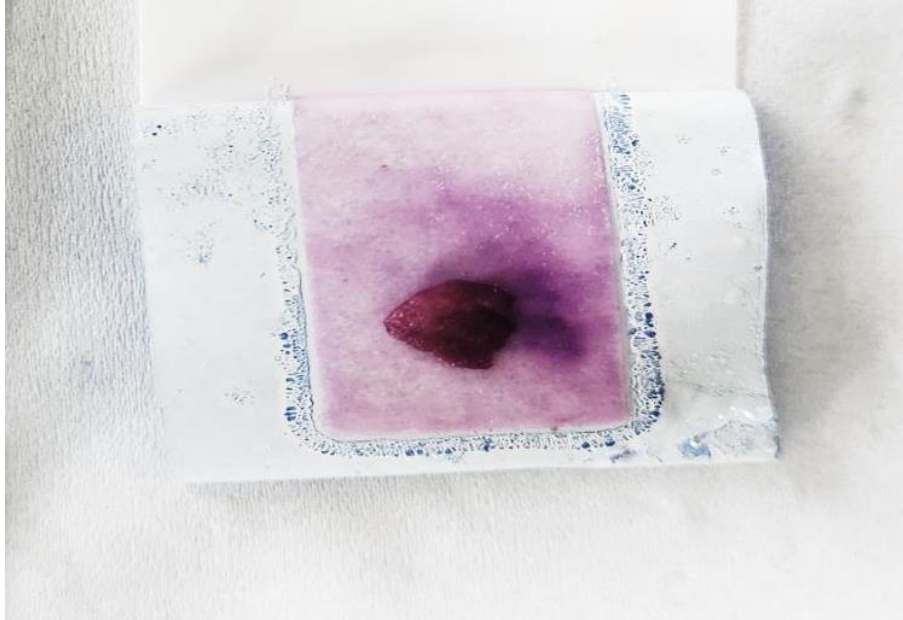
##### 3.1.1. Kết quả đánh giá chất lượng dầu vết tinh dịch, tinh trùng bằng bộ kit Phosphatesmo KM

Tất cả 30 mẫu đều cho kết quả dương tính khi thử bằng bộ kit Phosphatesmo KM, phản ứng cho màu tím đặc trưng. Thông qua kết quả định hướng, có thể đánh giá sơ bộ chất lượng của từng mẫu bằng cách quan sát độ đậm, nhạt của màu tím trên giấy thử.

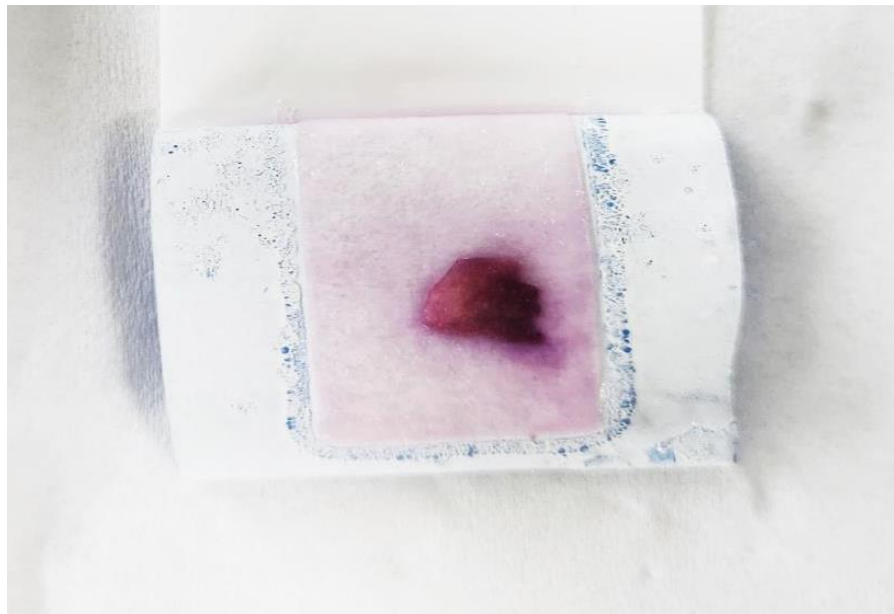
Kết quả thử định hướng được minh họa ở các hình 3.1, 3.2 và 3.3 tương ứng với kết quả ở 3 mẫu: mẫu số 3, mẫu số 8 và mẫu số 12. Quan sát độ đậm nhạt của màu chỉ thị (màu tím) trên kit thử cho thấy: Mẫu số 3, mẫu số 8 và mẫu số 12, có thể nhận định mẫu số 8 có chất lượng tốt nhất, mẫu số 3 có chất lượng kém hơn so với mẫu số 8 và mẫu số 12.



Hình 3.1. Mẫu số 3 thử định hướng bằng bộ kit Phosphatesmo KM



*Hình 3.2. Mẫu số 8 thử định hướng bằng bộ kit Phosphatesmo KM*



*Hình 3.3. Mẫu số 12 thử định hướng bằng bộ kit Phosphatesmo KM*

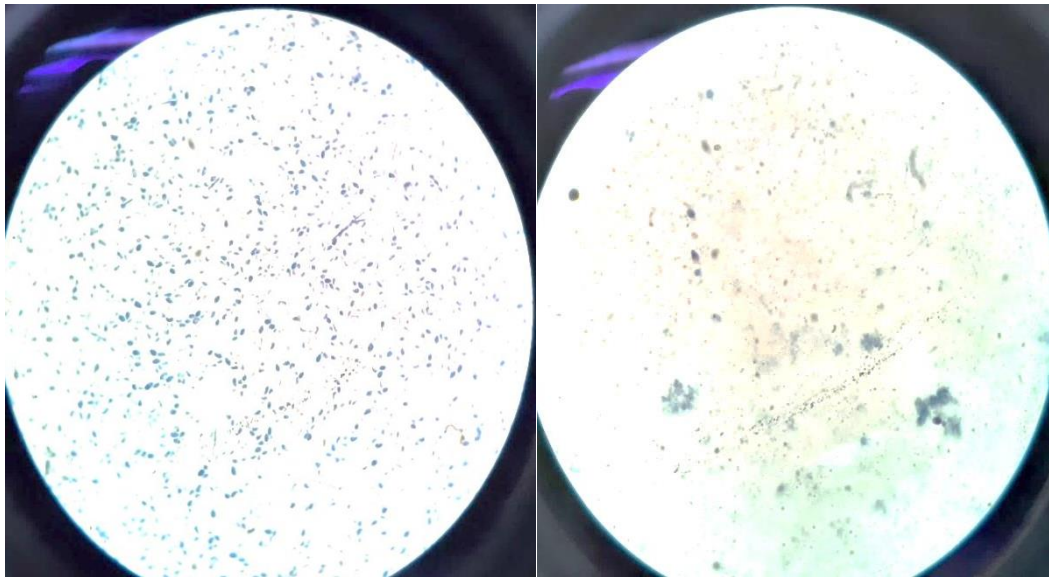
### **3.1.2. Xác định chính xác dấu vết tinh trùng người bằng phương pháp nhuộm Christmas Tree**

Tiến hành làm tiêu bản để xác định chính xác sự có mặt của tinh trùng người trên cả 30 mẫu nghiên cứu, quan sát ở vật kính dầu với độ phóng đại 100X, kết quả cho thấy 100% các mẫu đều có tinh trùng người.

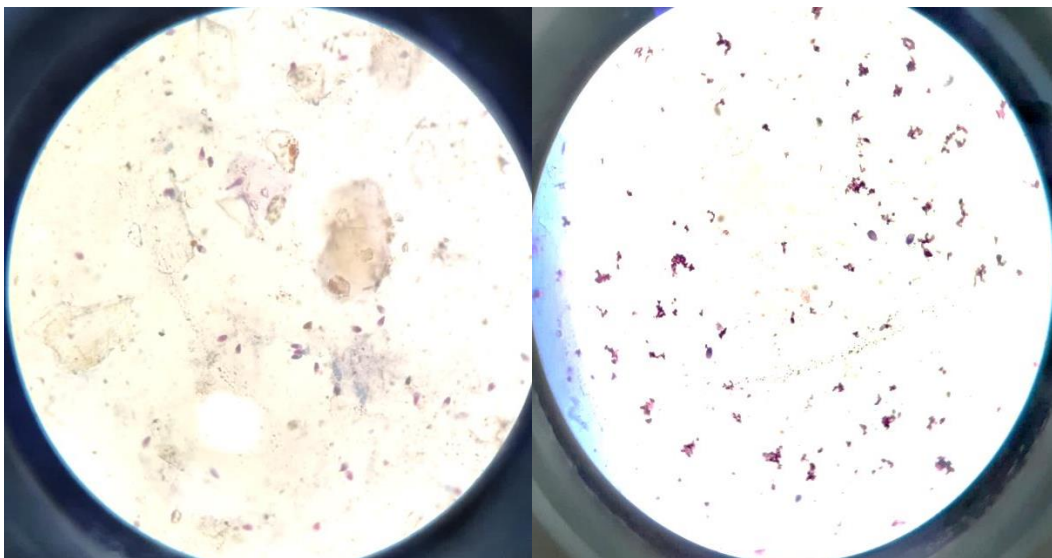
Số lượng tinh trùng đếm được trên một vi trường phản ánh một phần chất lượng của dấu vết. Mẫu có chất lượng càng tốt, số lượng tinh trùng đếm



được trên một vi trường càng nhiều. Dưới kính hiển vi, tinh trùng có hình thù đặc thù: dạng oval, một đầu hơi tròn, một đầu hơi nhọn. Khi quan sát tiêu bản tinh trùng nhuộm bằng phương pháp Christmas Tree, phần đầu tinh trùng bắt màu đỏ tím, thể đỉnh bắt màu nhạt hơn. Hầu hết ở các tiêu bản của 30 mẫu, tinh trùng đều ở dạng không có đuôi. Quan sát tiêu bản tinh trùng được minh họa ở 4 mẫu: Mẫu số 8, mẫu số 13, mẫu số 14 và mẫu số 16, có thể sơ bộ nhận định chất lượng mẫu của mẫu số 8 là tốt nhất, mật độ tinh trùng dày đặc. Mẫu số 13 và mẫu số 16 có số lượng tinh trùng đếm được trên một vi trường tương đương nhau (khoảng 3 - 4 con), sơ bộ đánh giá chất lượng mẫu là tương đương nhau. Hình ảnh tiêu bản được minh họa ở hình 3.4 và 3.5.



*Hình 3.4. Tiêu bản mẫu số 8 (hình trái) và tiêu bản mẫu số 13 (hình phải)*



*Hình 3.5. Tiêu bản mẫu số 14 (hình trái) và tiêu bản mẫu số 16 (hình phải)*

### 3.2. KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG SẢN PHẨM DNA SAU TÁCH CHIẾT SỬ DỤNG BỘ KIT ĐỊNH LƯỢNG DNA QUANTIFILER™ TRIO DNA QUANTIFICATION

Hàm lượng, chất lượng của DNA sau tách chiết được đánh giá thông qua kết quả định lượng bằng phương pháp Realtime PCR sử dụng bộ kit định lượng DNA Quantifiler™ Trio DNA Quantification. Các chỉ tiêu đánh giá tương ứng các vùng DNA đích được khuếch đại trong bộ kit bao gồm:

- Hàm lượng DNA tổng số được thể hiện qua chỉ số Small Autosomal (SA) target: SA là các đoạn DNA có kích thước nhỏ hơn. Kích thước amplicon của bộ kit chỉ khoảng 80bp (amplicon tiêu chuẩn từ 75 - 150 bp), phù hợp với kích thước của các locus STR “mini” điển hình và từ đó có thể phát hiện được cả các mẫu DNA bị biến tính, có kích thước phân tử nhỏ.

- Tỷ lệ DNA bị biến tính được thể hiện qua chỉ số Degradation Index (DI): Thể hiện mức độ biến tính của DNA bằng cách so sánh tỷ lệ giữa kết quả định lượng của SA với kết quả định lượng của LA (Large Autosomal – vùng DNA đích kính thước lớn).

- Hàm lượng DNA của người nam giới trong mẫu được thể hiện qua chỉ số Y chromosome target (T,Y): Khuếch đại thành phần DNA của nam giới, đặc biệt hữu ích trong việc đánh giá các mẫu lẫn chứa hỗn hợp DNA của nam giới và nữ giới.

- Tỷ lệ Hàm lượng DNA của người nam giới trong mẫu/ Hàm lượng DNA tổng số (T,Y/SA): Thể hiện khả năng thu hồi DNA của người nam giới trong hỗn hợp mẫu lẫn so với khả năng thu hồi DNA tổng số.

Phản ứng định lượng được tiến hành theo phương pháp ở mục 2.2.8.

*Bảng 3.1. Kết quả định lượng sản phẩm DNA sau tách chiết sử dụng bộ kit định lượng DNA Quantifiler™ Trio DNA Quantification (của hãng Thermo Fisher, Mỹ)*

TT	Tên mẫu	Tách chiết bằng kit QIAamp DNA Micro			Tách chiết bằng kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction			Tách chiết bằng Chelex®		
		SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)	SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)	SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)
1.	Mẫu_nam 1	11,886	0,826	10,915	11,039	1,654	10,018	13,557	0,513	19,439

TT	Tên mẫu	Tách chiết bằng kit QIAamp DNA Micro			Tách chiết bằng kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction			Tách chiết bằng Chelex®		
		SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)	SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)	SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)
2.	Mẫu_nam 2	15,421	0,51	12,023	17,672	0,63	14,577	12,463	0,659	10,067
3.	Mẫu_nam 3	34,623	2,237	27,658	27,571	0,994	26,517	20,435	0,955	19,22
4.	Mẫu_nam 4	21,611	0,744	22,86	20,169	0,662	20,263	20,192	0,606	20,172
5.	Mẫu_nam 5	12,584	0,87	12,304	10,922	0,553	10	8,912	0,895	7,899
6.	Mẫu_nam 6	50,084	0,766	40,094	52,736	1,53	41,765	44,276	1,607	42,666
7.	Mẫu_nam 7	36,287	0,4	33,801	37,949	1,027	34,09	30,371	0,47	25,418
8.	Mẫu_nam 8	40,201	0,844	40,081	88,094	0,597	56,522	55,034	0,899	45,391
9.	Mẫu_nam 9	0,027	1	0,018	0,105	0,682	0,108	0,256	1,31	0,188
10.	Mẫu_nam 10	0,003	0,642	0,001	0,011	0,873	0,008	0,052	0,85	0,066
11.	Mẫu_nam 11	1,138	1,425	0,524	0,107	1,04	0,098	0,7	0,779	0,773
12.	Mẫu_nam 12	25,509	0,627	10,79	14,278	0,924	11,117	10,814	1,062	8,328
13.	Mẫu_nam 13	2,182	0,817	1,76	4,862	1,038	3,702	2,061	1,426	2,38
14.	Mẫu_nam 14	23,146	0,857	22,557	37,154	0,984	29,875	20,161	1,056	20,1
15.	Mẫu_nam 15	0,099	0,865	0,044	1,826	0,831	1,015	0,199	0,887	0,05
16.	Mẫu_nam 16	1,991	0,642	1,278	1,448	0,792	1,349	2,635	0,899	1,918
17.	Mẫu_nam 17	22,38	0,825	20,477	22,587	0,946	21,409	31,096	1,15	20,515
18.	Mẫu_nam 18	4,656	1,171	3,28	7,017	1,609	4,664	6,941	1,644	3,96
19.	Mẫu_nam 19	0,085	0,729	0,018	1,452	1,043	0,126	0,056	1,315	0,04
20.	Mẫu_nam 20	0,012	0,842	0,006	1,035	1,042	0,988	0,218	0,81	0,112
21.	Mẫu_nam 21	0,399	0,722	0,264	1,084	0,825	0,841	0,510	0,968	0,468
22.	Mẫu_nam 22	0,571	0,754	0,463	0,297	0,980	0,278	0,496	1,017	0,125
23.	Mẫu_nam 23	1,656	1,101	1,180	2,017	1,961	2,064	0,941	1,644	1,960

TT	Tên mẫu	Tách chiết bằng kit QIAamp DNA Micro			Tách chiết bằng kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction			Tách chiết bằng Chelex®		
		SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)	SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)	SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)
24.	Mẫu_nam 24	0,845	0,529	0,180	1,052	0,843	0,326	0,557	1,115	0,140
25.	Mẫu_nam 25	1,115	0,342	0,164	3,035	1,014	1,988	2,218	0,910	0,412
26.	Mẫu_nam 26	3,399	0,522	2,026	4,084	0,625	3,841	2,510	0,768	1,047
27.	Mẫu_nam 27	4,571	0,554	3,463	4,730	0,780	3,028	4,496	0,817	2,125
28.	Mẫu_nam 28	1,012	0,842	1,006	1,035	1,042	1,988	0,218	0,810	0,212
29.	Mẫu_nam 29	0,990	0,722	0,640	1,084	0,825	0,841	0,510	0,968	0,468
30.	Mẫu_nam 30	1,571	0,754	1,463	1,297	0,980	1,278	1,496	1,017	1,125
31.	Mẫu_nữ 1	10,742	1,090	10,057	11,799	1,526	11,437	10,707	0,725	10,652
32.	Mẫu_nữ 2	15,855	0,616	10,603	15,867	1,019	11,626	10,822	0,707	10,725
33.	Mẫu_nữ 3	31,025	0,892	21,025	33,646	1,276	31,828	28,317	0,975	21,159
34.	Mẫu_nữ 4	22,365	1,714	21,162	21,251	1,392	19,915	20,935	1,278	20,917
35.	Mẫu_nữ 5	10,323	0,833	9,050	8,695	1,248	6,864	7,833	1,530	6,881
36.	Mẫu_nữ 6	30,159	1,106	20,252	32,977	0,491	20,955	36,827	1,149	30,173
37.	Mẫu_nữ 7	21,351	0,963	20,155	35,915	1,910	30,052	20,905	1,162	20,200
38.	Mẫu_nữ 8	30,139	1,246	27,837	27,582	0,636	20,671	27,542	1,034	20,140
39.	Mẫu_nữ 9	0,151	1,149	0,078	0,031	0,721	0,020	0,044	0,954	0,010
40.	Mẫu_nữ 10	0,023	0,572	0,008	0,054	0,828	0,034	0,047	0,949	0,007
41.	Mẫu_nữ 11	2,231	1,079	0,950	0,113	1,048	0,021	0,354	1,092	0,040
42.	Mẫu_nữ 12	22,179	0,970	22,018	12,817	0,604	10,029	10,061	0,498	10,300
43.	Mẫu_nữ 13	5,367	1,310	1,037	5,537	1,326	1,449	3,568	1,680	2,332
44.	Mẫu_nữ 14	26,511	0,735	20,380	33,158	1,061	29,180	22,339	0,835	22,212
45.	Mẫu_nữ 15	0,797	0,532	0,038	1,328	1,171	0,484	1,239	0,536	0,424

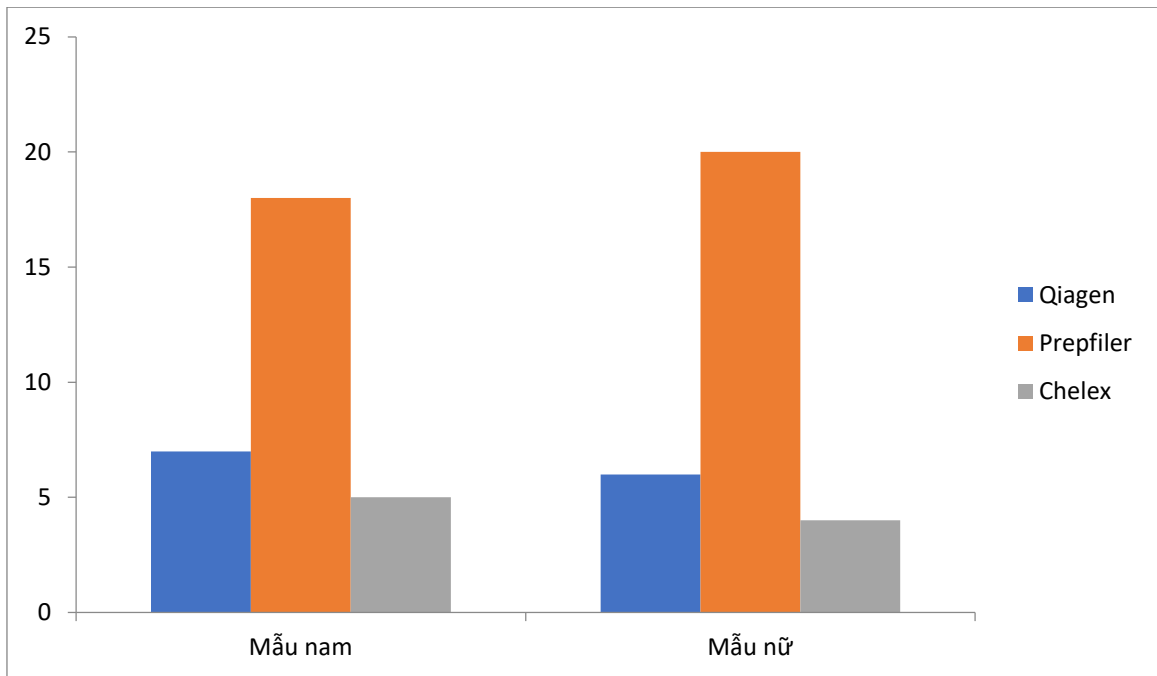
TT	Tên mẫu	Tách chiết bằng kit QIAamp DNA Micro			Tách chiết bằng kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction			Tách chiết bằng Chelex®		
		SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)	SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)	SA (ng/μl)	DI	T,Y (ng/μl)
46.	Mẫu_nữ 16	0,640	0,839	0,378	1,229	1,697	0,559	2,310	0,866	1,607
47.	Mẫu_nữ 17	20,056	1,503	20,022	28,424	0,937	20,422	30,890	1,017	24,443
48.	Mẫu_nữ 18	4,039	0,996	3,017	5,086	1,010	4,074	3,521	1,087	3,001
49.	Mẫu_nữ 19	1,464	0,657	1,102	2,012	1,066	1,200	1,092	0,934	1,020
50.	Mẫu_nữ 20	1,849	1,200	0,940	2,302	1,216	1,129	1,140	2,060	0,186
51.	Mẫu_nữ 21	0,918	0,628	0,850	1,010	0,840	0,664	0,150	0,632	0,055
52.	Mẫu_nữ 22	0,406	0,612	0,056	0,775	0,993	0,419	0,461	1,664	0,348
53.	Mẫu_nữ 23	1,039	0,896	0,917	2,086	1,340	2,004	0,521	1,087	0,120
54.	Mẫu_nữ 24	0,464	0,457	0,302	1,012	0,866	0,920	0,902	0,734	0,200
55.	Mẫu_nữ 25	1,849	1,002	1,094	2,302	1,160	1,129	2,140	1,060	1,186
56.	Mẫu_nữ 26	5,918	0,628	4,850	6,010	0,864	5,664	2,150	0,632	1,055
57.	Mẫu_nữ 27	3,406	0,412	3,056	4,775	0,793	3,419	3,961	1,464	3,348
58.	Mẫu_nữ 28	0,849	0,122	0,094	2,302	1,216	0,129	0,140	1,060	0,019
59.	Mẫu_nữ 29	0,918	0,528	0,850	1,010	0,840	0,664	0,501	0,632	0,470
60.	Mẫu_nữ 30	1,406	0,612	0,564	1,775	0,993	0,619	1,961	1,664	0,834

*Ghi chú:*

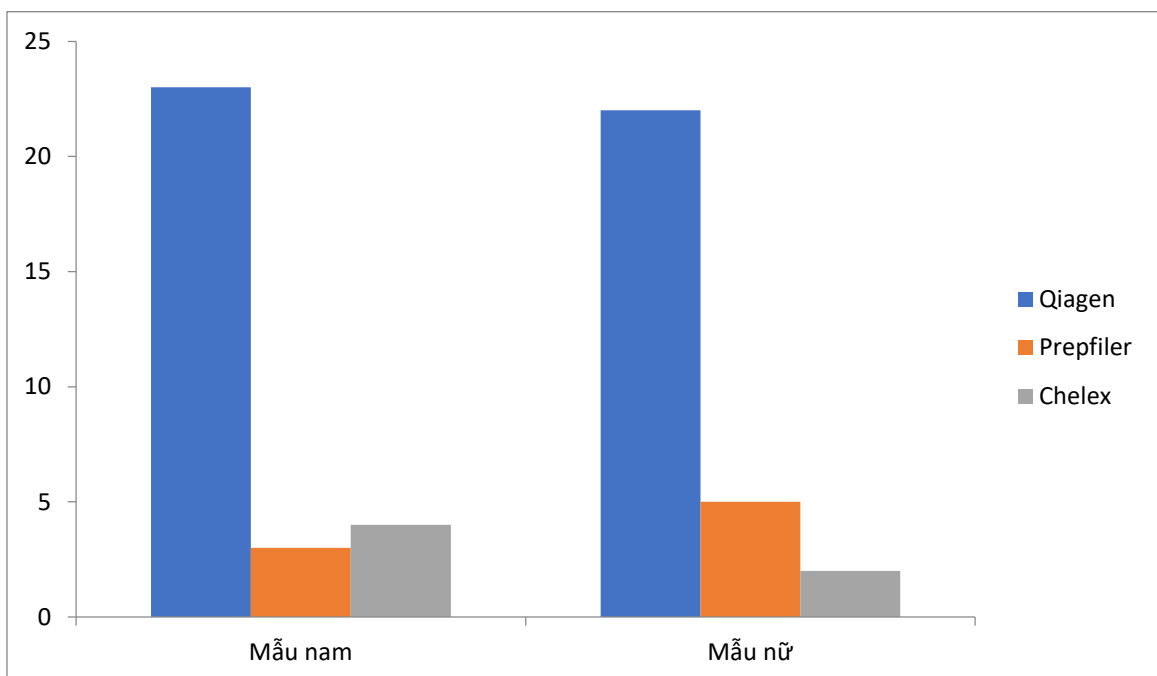
- **Ô có giá trị hàm lượng cao nhất, chất lượng DNA tốt nhất trong 3 phương pháp được bôi màu vàng**

- SA: (Small Autosomal) - vùng đích DNA nhỏ trên nhiễm sắc thể thường
- DI: Degradation Index - chỉ số đứt gãy (biến tính) DNA
- T.Y: Y chromosome target - Vùng đích DNA nằm trên NST giới tính Y.

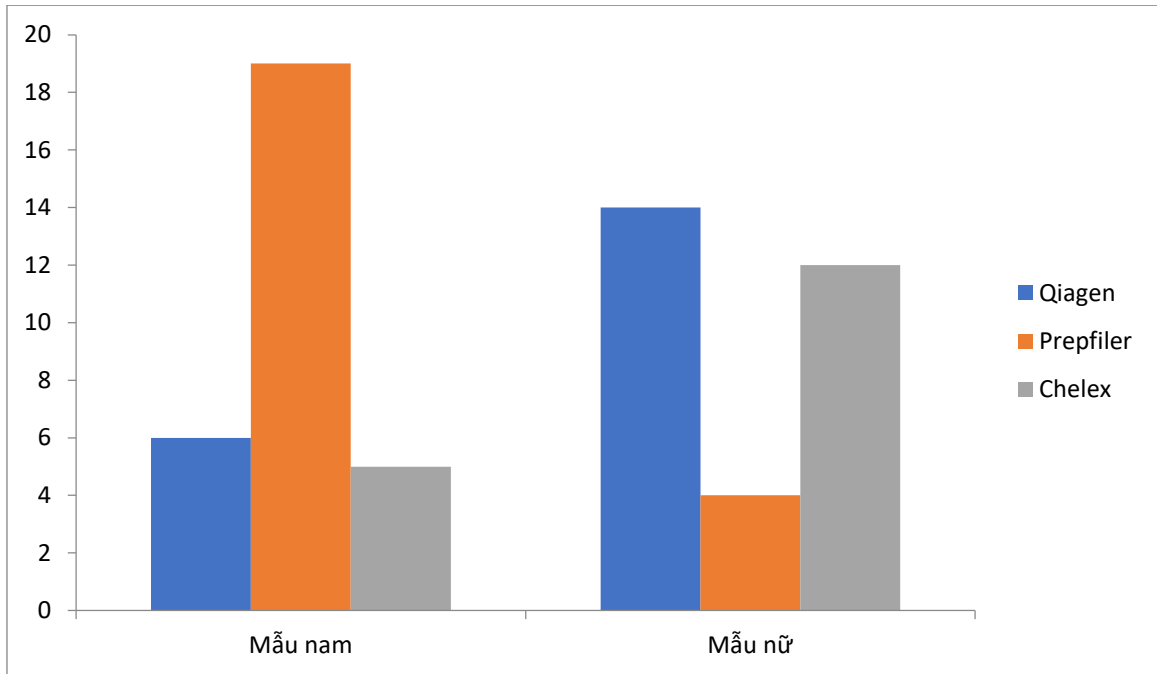
Từ bảng kết quả định lượng, ta có thể so sánh kết quả định lượng của ba phương pháp tách chiết, thể hiện qua các đồ thị sau:



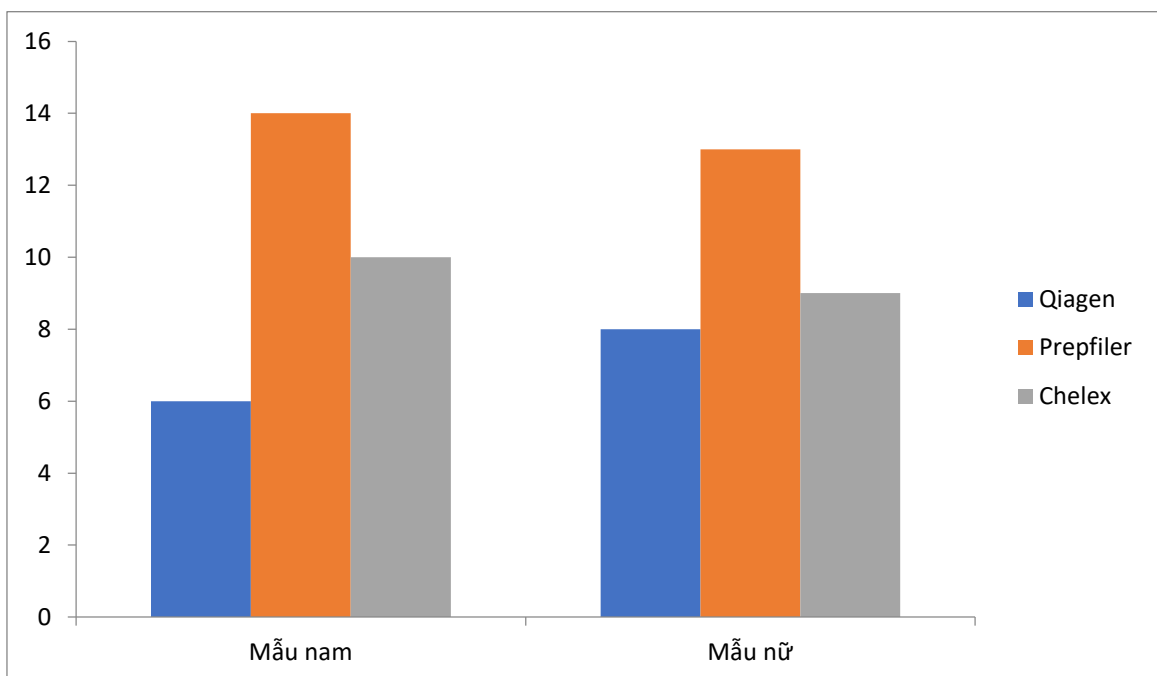
*Hình 3.6. Đồ thị so sánh kết quả hàm lượng DNA tổng số thu hồi được cao nhất từ ba phương pháp tách chiết*



*Hình 3.7. Đồ thị so sánh kết quả tỷ lệ DNA bị biến tính thấp nhất từ ba phương pháp tách chiết*



Hình 3.8. Đồ thị so sánh kết quả hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được cao nhất ở mẫu nam, thấp nhất ở mẫu nữ từ ba phương pháp tách chiết



Hình 3.9. Đồ thị so sánh tỷ lệ hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được cao nhất ở mẫu nam, thấp nhất ở mẫu nữ/hàm lượng DNA tổng số thu hồi được từ ba phương pháp tách chiết

Từ kết quả định lượng, ta thấy:

Hàm lượng DNA tổng số thu hồi được cao nhất trong 3 phương pháp: Có 18/30 (chiếm 60%) mẫu nam và 20/30 (chiếm 66,67%) mẫu nữ tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction cho kết quả hàm lượng DNA tổng số thu hồi được là cao nhất.

Tỷ lệ DNA bị biến tính thấp nhất trong 3 phương pháp: Có 23/30 (chiếm 76,7%) mẫu nam và 22/30 (chiếm 73,3%) mẫu nữ tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro cho kết quả tỷ lệ DNA bị biến tính thấp nhất.

Hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được: Có 19/30 (chiếm 63%) mẫu nam tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction cho kết quả hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được là cao nhất trong 3 phương pháp. Có 14/30 (chiếm 46%) mẫu nữ tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro cho kết quả hàm lượng DNA của người nam giới là thấp nhất trong 3 phương pháp.

Tỷ lệ hàm lượng DNA của người nam giới/ hàm lượng DNA tổng số: Có 14/30 (chiếm 46,7%) mẫu nam tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction cho tỷ lệ hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được so với hàm lượng DNA tổng số là cao nhất trong 3 phương pháp. Có 13/30 (chiếm 43,3%) mẫu nữ tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction cho tỷ lệ hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được so với hàm lượng DNA tổng số là thấp nhất trong 3 phương pháp.

Kết quả nghiên cứu của đề tài có sự tương đồng với các nghiên cứu năm 2011 của một nhóm các phòng thí nghiệm ở Thụy Sĩ và nghiên cứu năm 2019 của Hasap và cộng sự. Nghiên cứu hợp tác giữa 9 phòng thí nghiệm ở Thụy Sĩ đã chỉ ra rằng: Hàm lượng DNA tổng số và hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được bằng phương pháp tách chiết sử dụng bộ kit QIAamp DNA Micro cao hơn phương pháp tách chiết phân biệt sử dụng Chelex® [45]. Tuy nhiên, trong số 9 phòng thí nghiệm đó, không có phòng thí nghiệm nào sử dụng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction trong việc tách chiết và tinh sạch dấu vết tinh trùng, vì vậy, hiệu quả tách chiết từ bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction chưa được đề cập. Năm 2019, nghiên cứu của Hasap và cộng sự nhằm so sánh hiệu quả tách chiết giữa hai bộ kit



PrepFiler™ Forensic DNA Extraction và QIAamp DNA Micro cũng đi đến kết luận rằng khả năng thu hồi DNA tổng số của bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction tốt hơn [63]. Năm 2018, một nghiên cứu nhằm đánh giá hiệu quả tách chiết của ba phương pháp trên với các loại dấu vết khác nhau của Alfajri và cộng sự đã khẳng định hiệu quả tách chiết của bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction đối với dấu vết tinh trùng [49].

Kết quả nghiên cứu của đề tài là sử dụng bộ kit QIAamp DNA Micro cho sản phẩm DNA có tỷ lệ đứt gãy ít nhất được giải thích bởi cơ chế của màng lọc silica trong bộ kit QIAamp DNA Micro là hấp phụ có chọn lọc vào màng silica gel trong các điều kiện ion được kiểm soát, không trải qua bước kết tủa cồn, vì vậy không gây ảnh hưởng đến phản ứng PCR. Trong phương pháp này, liên kết axit nucleic với màng lọc được tối ưu hóa với các dung dịch đệm cụ thể ở nồng độ pH cực kỳ chính xác, do vậy, DNA thu hồi được ở lượng lớn. Dịch ly giải mẫu được lọc qua màng silica gel và được loại bỏ bằng cách ly tâm, màng silicagel được rửa lại để loại bỏ protein, muối và các tạp chất, chỉ còn lại DNA bám ở trên màng silicagel, DNA được thu hồi ở dạng đã được tinh sạch. Quá trình ly tâm và rửa giải màng, những mảnh DNA nhỏ bị biến tính và đứt gãy không liên kết được với màng silica gel cũng được loại bỏ, vì vậy tỷ lệ DNA bị đứt gãy và biến tính thu hồi sau quá trình tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro cũng thấp hơn so với 2 phương pháp còn lại [43].

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất thu hồi DNA tổng số là cao nhất khi sử dụng bộ kit bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction. Điều này được lý giải theo cơ chế sau: Mẫu được phân giải trong đệm với chất ức chế DNase và sau đó được ủ với các hạt từ tính, cho phép các hạt liên kết với các phân tử DNA. Ưu điểm của phương pháp này là các hạt từ tính được hòa lẫn trong dung dịch mẫu, diện tích tiếp xúc lớn, dễ dàng liên kết với các phân tử axit nucleic lơ lửng trong dung dịch. Thành phần bộ kit có dung dịch rửa giải PrepFiler Wash Buffer A loại bỏ các protein gây nhiễm lẫn, PrepFiler Wash Buffer B giúp giảm thiểu khả năng tồn tại chất ức chế phản ứng PCR từ PrepFiler Wash Buffer A, từ đó, không làm hao hụt lượng DNA tối đa thu hồi được sử dụng cho quá trình khuếch đại PCR tiếp theo, giúp rút gọn bước tinh sạch DNA. Thao tác của quy trình tách chiết chỉ gói gọn trong một ống

ependorf, không có sự hút qua hút lại giữa các ống hay ly tâm gây hao hụt DNA, vì vậy, lượng DNA thu hồi được từ phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction cho kết quả là tốt nhất [44].

Hiệu suất thu hồi DNA tổng số ở phương pháp tách chiết sử dụng hạt Chelex® thấp hơn 2 phương pháp kia xuất phát từ cơ chế của quá trình chiết tách: trước tiên, mẫu sẽ được tiến hành tách chiết phân biệt, tách riêng tế bào biểu mô và tế bào tinh trùng. Chelex® là một loại nhựa tạo phức có ái lực cao đối với các ion kim loại đa hoá trị. Vai trò của Chelex® 100 Resin là loại bỏ các chất ức chế kim loại mà không làm thay đổi nồng độ các ion không kim loại của dung dịch tinh sạch. Resin được tạo thành bởi hai polymer styrene và divinylbenzene chứa các liên kết imino, vì vậy có khả năng bám các kim loại cao. Ở 100°C, Chelex® liên kết với các ion kim loại đa hoá trị như  $Mg^{2+}$ , giúp loại bỏ  $Mg^{2+}$  ra khỏi phản ứng, làm bất hoạt các enzyme phân hủy DNA, ngăn cản sự biến tính của DNA và bảo vệ các phân tử DNA [53]. Mặc dù phương pháp tách chiết bằng Chelex® vẫn đảm bảo lượng DNA thu hồi để thực hiện phản ứng STR, tuy nhiên quy trình tách chiết bằng phương pháp Chelex này đòi hỏi một số bước hút chuyển, rửa tinh trùng. Các bước này có thể gây hao hụt lượng DNA thu hồi do lỗi thao tác, đồng thời cũng tăng cơ hội đưa các chất gây lẫn nhiễm vào mẫu, do đó, chất lượng DNA sau tách chiết kém tinh sạch hơn. DNA được thu hồi bằng cách tạo kết tủa với cồn, nếu như cồn không được loại bỏ hoàn toàn sau bước kết tủa có thể gây ức chế phản ứng PCR, làm giảm chất lượng của phản ứng STR.

So với phương pháp tách chiết bằng Chelex®, hai phương pháp tách chiết bằng bộ kit thương mại đều cho kết quả là DNA thu hồi ở dạng đã tinh sạch, nhìn chung đạt hiệu quả tách chiết DNA cao hơn.

### 3.3. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CỦA DNA THÔNG QUA BIỂU ĐỒ ĐIỆN DI MAO QUẢN

Kết quả biểu đồ điện di sẽ được thể hiện bởi các peak đặc trưng cho các alen ở mỗi locus gen.

Chất lượng, số lượng của DNA khôn sẽ được gián tiếp đánh giá một cách tương đối qua hình thái các peak trên biểu đồ điện di.

*Bảng 3.2. Kết quả đánh giá chất lượng của DNA thông qua kết quả điện di mao quản phân tích trên phần mềm GeneMapper IDx (của hãng Applied Biosystems, Mỹ)*

TT	Tên mẫu	Tách chiết bằng kit QIAamp DNA Micro		Tách chiết bằng kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction		Tách chiết bằng Chelex®	
		Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)	Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)	Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)
1.	Mẫu_nam 1	0	0	0	11	0	0
2.	Mẫu_nam 2	0	13	2	37	0	0
3.	Mẫu_nam 3	-	100	1	14,8	0	0
4.	Mẫu_nam 4	0	10	0	0	0	6,8
5.	Mẫu_nam 5	0	24	0	0	0	0
6.	Mẫu_nam 6	-	100	-	100	-	100
7.	Mẫu_nam 7	-	100	3	26	3	21
8.	Mẫu_nam 8	-	100	-	100	-	100
9.	Mẫu_nam 9	15	80	13	76	3	33
10.	Mẫu_nam 10	24	82,7	18	64	13	70
11.	Mẫu_nam 11	19	65	22	78	15	52
12.	Mẫu_nam 12	0	27,5	0	10,3	0	0
13.	Mẫu_nam 13	0	0	0	0	0	0
14.	Mẫu_nam 14	0	17,8	-	100	0	0
15.	Mẫu_nam 15	17	61	0	0	3	10,7
16.	Mẫu_nam 16	0	0	0	0	0	0
17.	Mẫu_nam 17	0	13	0	17	0	27
18.	Mẫu_nam 18	0	0	0	0	0	0

TT	Tên mẫu	Tách chiết bằng kit QIAamp DNA Micro		Tách chiết bằng kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction		Tách chiết bằng Chelex®	
		Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)	Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)	Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)
19.	Mẫu_nam 19	0	0	0	0	23	80
20.	Mẫu_nam 20	0	0	0	0	0	0
21.	Mẫu_nam 21	0	0	0	0	0	0
22.	Mẫu_nam 22	0	0	0	0	0	0
23.	Mẫu_nam 23	0	0	0	7,1	0	0
24.	Mẫu_nam 24	0	0	0	0	0	0
25.	Mẫu_nam 25	0	0	0	0	0	0
26.	Mẫu_nam 26	0	0	0	0	0	0
27.	Mẫu_nam 27	0	0	0	0	0	0
28.	Mẫu_nam 28	0	0	0	0	0	0
29.	Mẫu_nam 29	0	0	0	0	0	0
30.	Mẫu_nam 30	0	0	0	0	0	0
31.	Mẫu_nữ 1	0	0	0	19,3	0	0
32.	Mẫu_nữ 2	0	0	0	0	0	0
33.	Mẫu_nữ 3	1	4,7	-	100	0	0
34.	Mẫu_nữ 4	0	0	0	0	0	0
35.	Mẫu_nữ 5	0	0	0	22,7	0	31,8
36.	Mẫu_nữ 6	0	0	-	100	-	100
37.	Mẫu_nữ 7	0	0	-	100	0	0

TT	Tên mẫu	Tách chiết bằng kit QIAamp DNA Micro		Tách chiết bằng kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction		Tách chiết bằng Chelex®	
		Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)	Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)	Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)
38.	Mẫu_nữ 8	3	22,2	5	47,3	0	0
39.	Mẫu_nữ 9	0	0	0	0	0	0
40.	Mẫu_nữ 10	15	71,4	12	57	10	47,6
41.	Mẫu_nữ 11	0	0	0	0	0	0
42.	Mẫu_nữ 12	0	0	0	0	0	0
43.	Mẫu_nữ 13	0	0	0	0	0	0
44.	Mẫu_nữ 14	0	0	-	100	0	0
45.	Mẫu_nữ 15	0	0	0	0	0	0
46.	Mẫu_nữ 16	0	0	0	10,7	0	0
47.	Mẫu_nữ 17	0	0	0	0	0	0
48.	Mẫu_nữ 18	0	0	0	0	0	0
49.	Mẫu_nữ 19	0	0	0	0	0	0
50.	Mẫu_nữ 20	0	0	0	0	0	17,8
51.	Mẫu_nữ 21	0	0	0	0	0	0
52.	Mẫu_nữ 22	0	0	0	0	0	0
53.	Mẫu_nữ 23	0	0	0	0	0	0
54.	Mẫu_nữ 24	0	0	0	0	0	0
55.	Mẫu_nữ 25	0	0	0	0	0	0
56.	Mẫu_nữ 26	0	0	0	0	0	0

TT	Tên mẫu	Tách chiết bằng kit QIAamp DNA Micro		Tách chiết bằng kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction		Tách chiết bằng Chelex®	
		Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)	Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)	Số lượng peak bị mất	Tỷ lệ peak bị lỗi (%)
57.	Mẫu_nữ 27	0	0	0	0	0	0
58.	Mẫu_nữ 28	0	0	0	0	0	0
59.	Mẫu_nữ 29	0	0	0	0	0	0
60.	Mẫu_nữ 30	0	0	0	0	0	0

*Trong đó:*

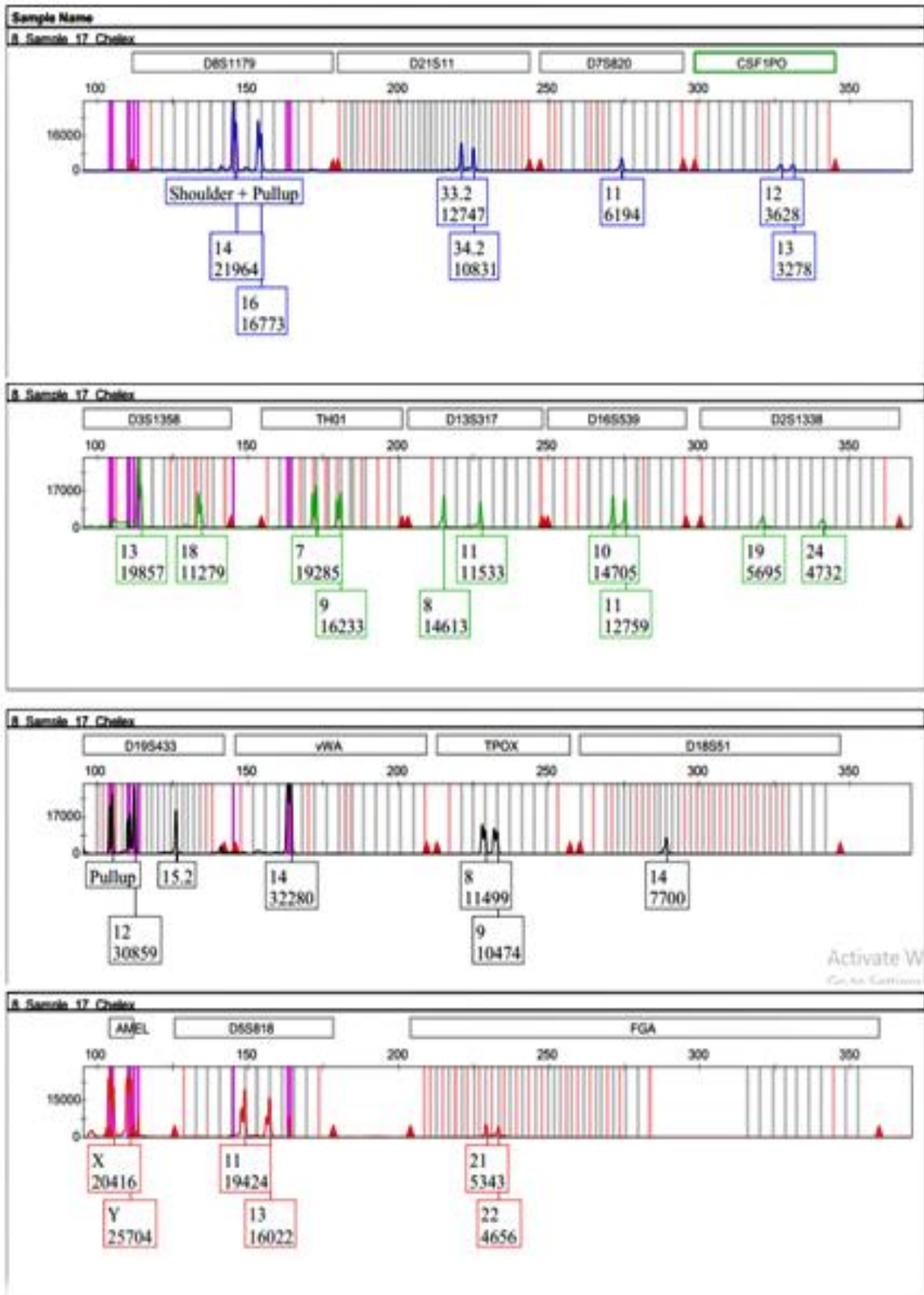
*Số lượng peak bị mất: tổng số lượng các peak (alen) bị mất (allele drop out) ở các locus trong tổng số 16 locus của hệ gen Identifiler.*

*Tỷ lệ peak bị lỗi: Những hiện tượng peak bị sẻ (split peak), mất alen (allele dropout), mất cân bằng (imbalance), các peak giả (artifacts), các hiện tượng thêm peak (dropin), (phản ánh chất lượng, tình trạng đứt gãy của DNA khuôn, là sản phẩm DNA sau tách chiết từ các dấu vết tinh dịch, tinh trùng).*

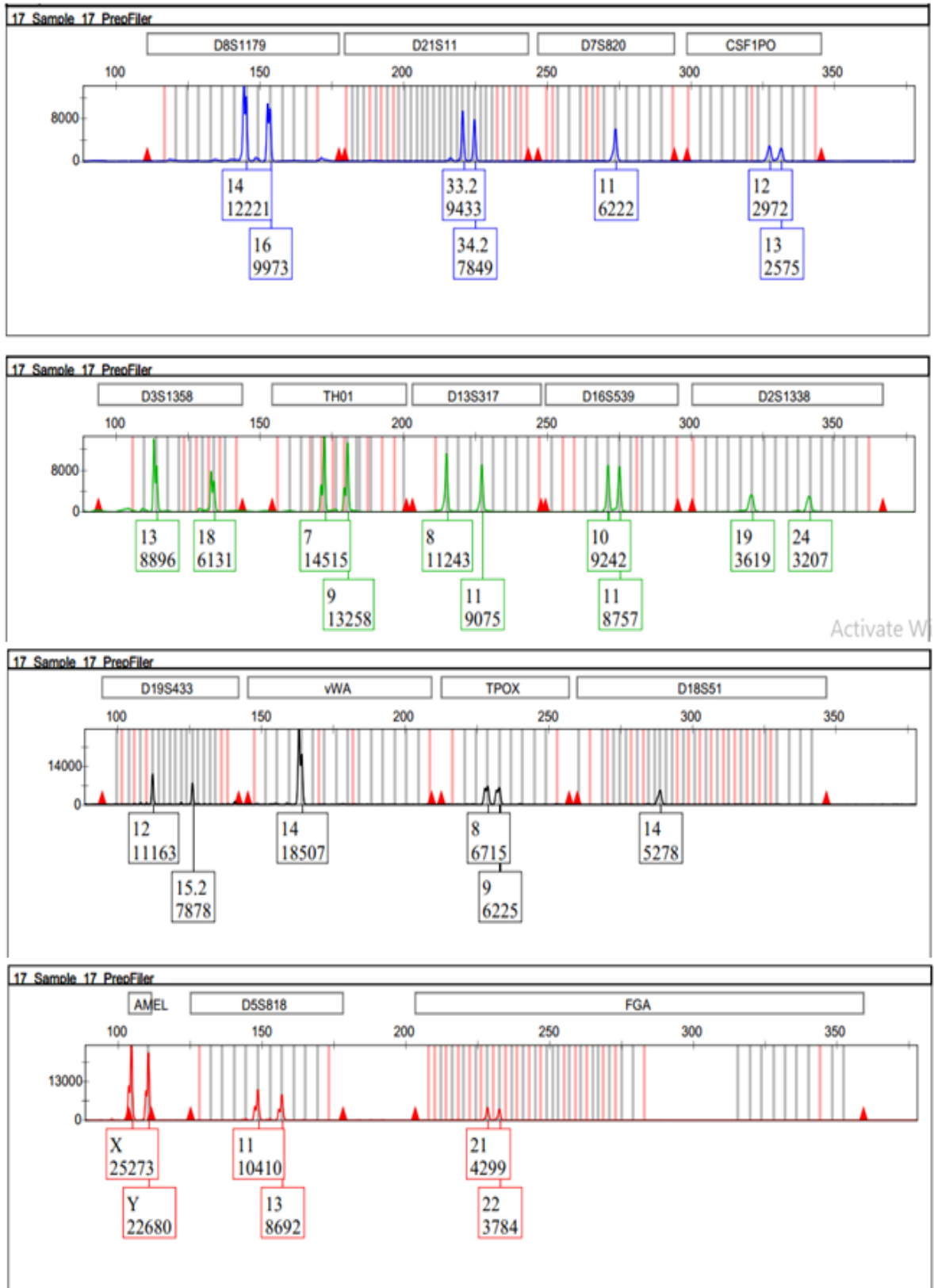
*Ký hiệu (-): Các mẫu có hiện tượng pull up, không phân tích được kiểu gen.*

Phân tích điện di đồ cho thấy, 100% tất cả các mẫu cho kết quả hàm lượng DNA tổng số cao, tỷ lệ biến tính thấp đều lên đủ peak, không có hiện tượng mất peak. Có 12/60 mẫu có ít nhất một phương pháp có hàm lượng DNA tổng số thu hồi được quá cao, có hiện tượng pull up (các vạch đỏ tím trên điện di đồ), tiến hành pha loãng và điện di lại sản phẩm PCR của cả ba phương pháp tách chiết của mẫu đó, thu được kết quả điện di có sự tương đồng với kết quả định lượng.

Ví dụ Mẫu nam 17:

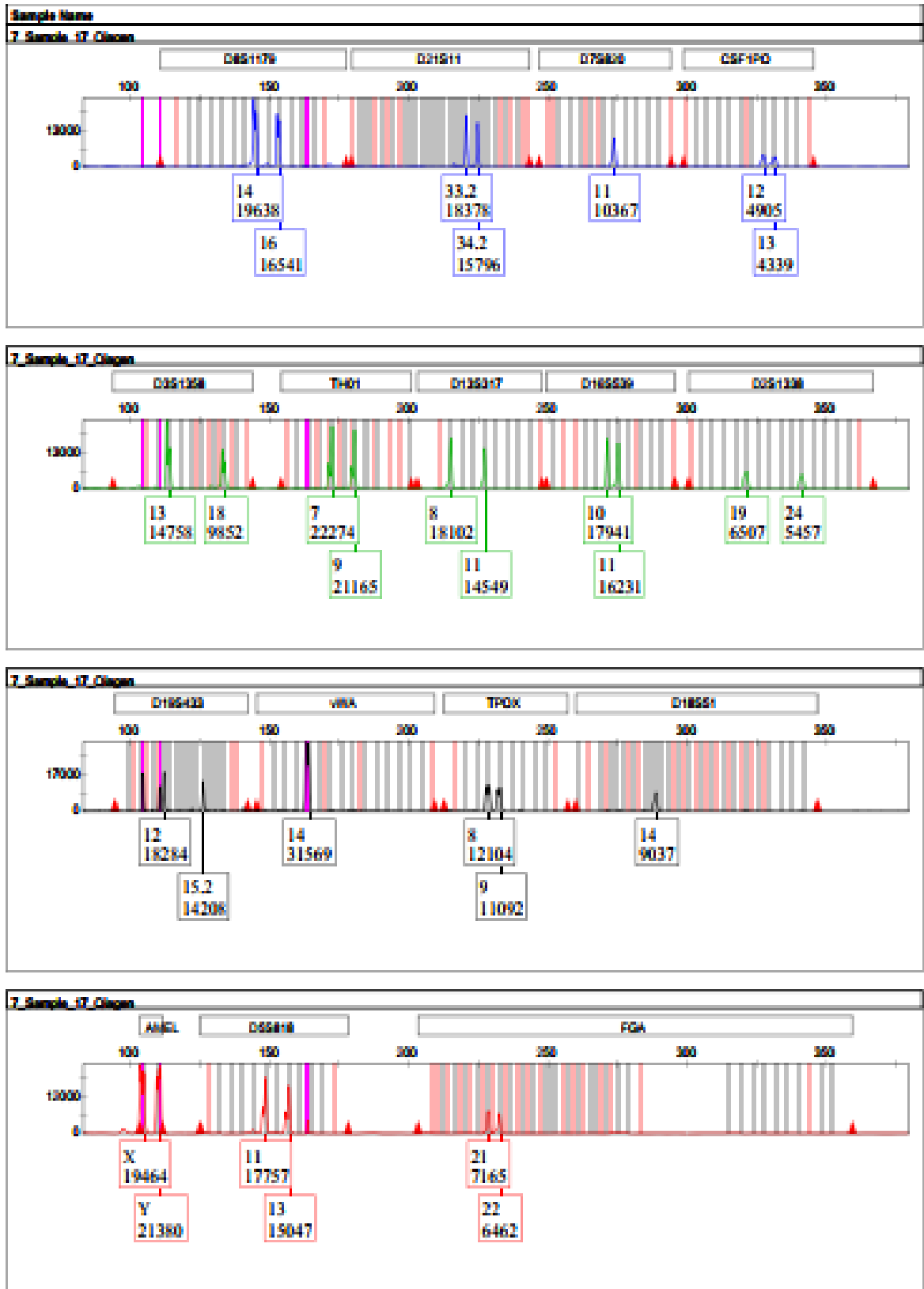


A: Mẫu tách chiết bằng Chelex®;



*B: Mẫu tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction;*





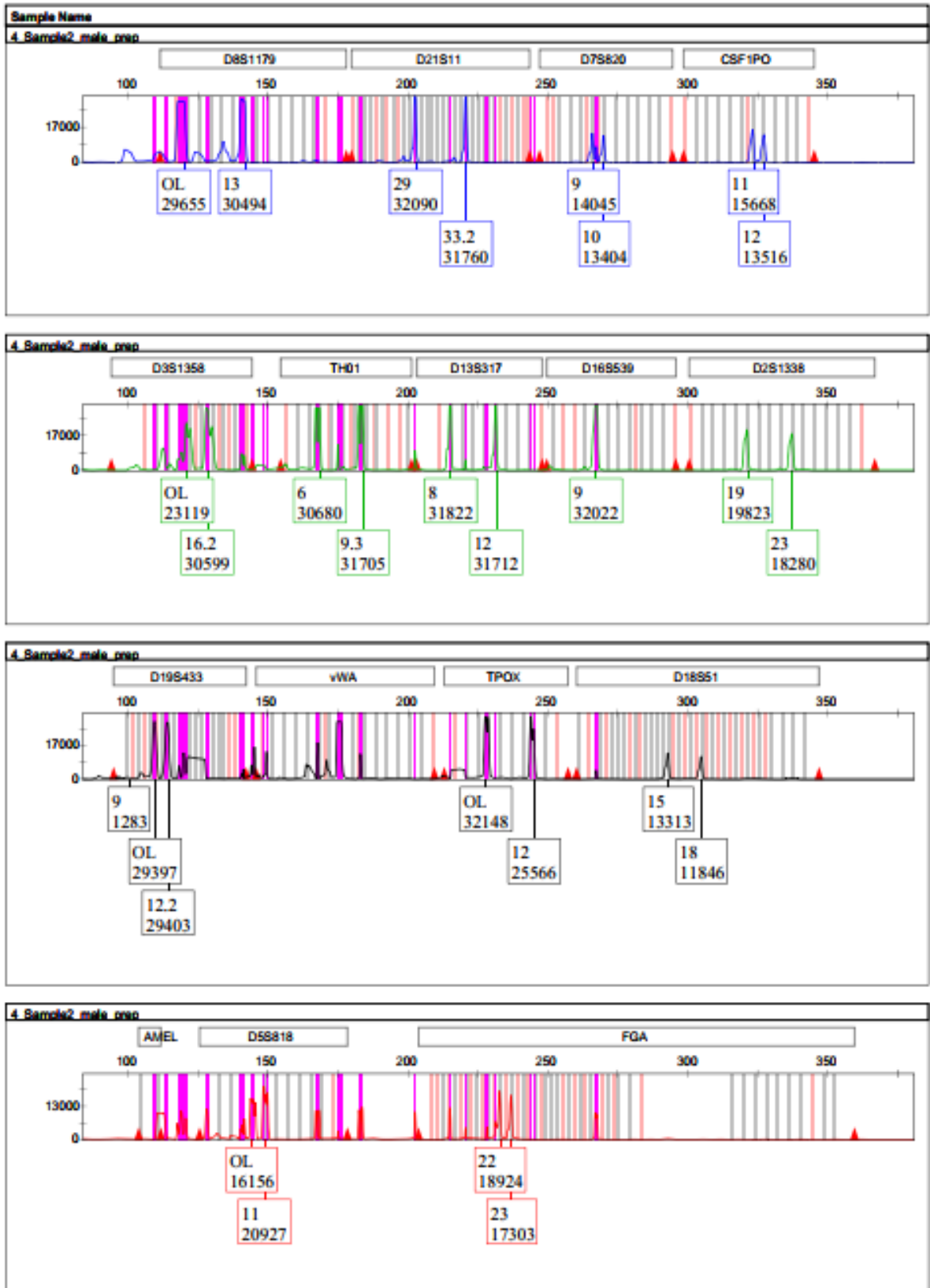
C: Mẫu tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro

Hình 3.10. Kết quả điện di Mẫu nam 17 (pha loãng 10 lần)

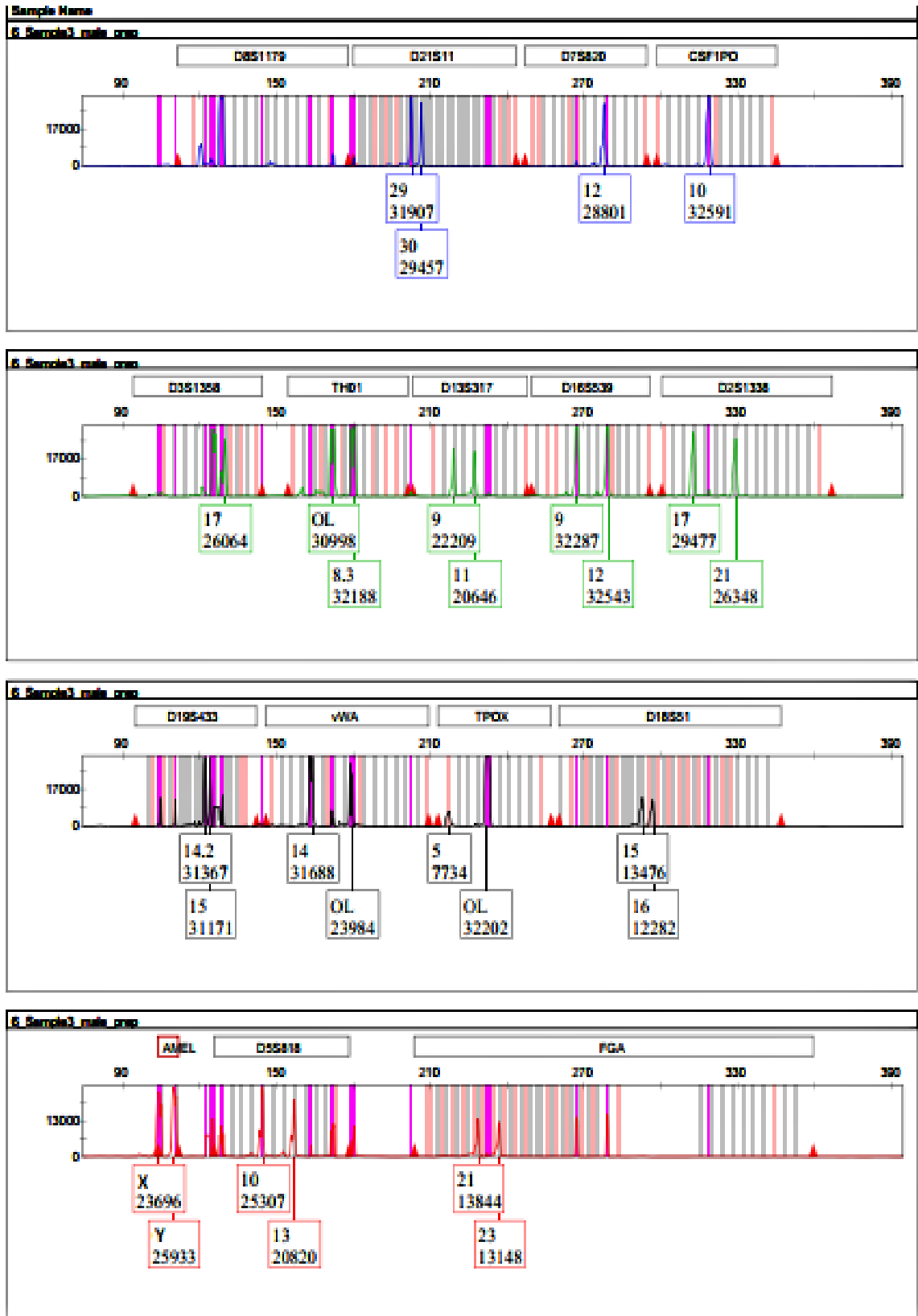
Kết quả định lượng của Mẫu nam 17 (hình 3.10) cho thấy, hàm lượng DNA tổng số thu được bằng phương pháp tách chiết sử dụng Chelex<sup>®</sup> là cao nhất, kết quả điện di Mẫu nam 17 cũng phù hợp khi xét chiều cao peak trung bình của mẫu tách bằng phương pháp Chelex<sup>®</sup> là 14227, cao hơn so với chiều cao peak trung bình của mẫu tách bằng bộ kit PrepFiler<sup>™</sup> Forensic DNA Extraction và bằng bộ kit QIAamp DNA Micro lần lượt là 14195 và 9313. Ở mẫu tách bằng phương pháp Chelex<sup>®</sup> có hiện tượng kéo peak (pull up) và hiện tượng sẻ peak (shoulder) do lượng DNA nhiều, trong khi đó ở mẫu tách bằng bộ kit PrepFiler<sup>™</sup> Forensic DNA Extraction và bằng bộ kit QIAamp DNA Micro không có hiện tượng này.

Có sự chênh lệch tương đối về hàm lượng DNA thu hồi được của cùng một phương pháp tách chiết giữa các mẫu khác nhau nguyên nhân là do các mẫu được thu từ các vụ án thực tế, nên chất, lượng dấu vết của từng vụ án là không đồng đều. Các mẫu: 3, 4, 5, 6, 7, 8 (nam, nữ) là các mẫu tinh dịch ở dạng lỏng, tồn tại trong bao cao su, được nhóm nghiên cứu thu hồi bằng cách dùng tăm bông thấm trực tiếp, vì vậy, cho hàm lượng DNA thu hồi được cao hơn hẳn các mẫu khác, dẫn đến hiện tượng pull up (thể hiện ở các vạch màu đỏ, tím trên điện di đồ), tỷ lệ peak bị mất và bị lỗi cao.

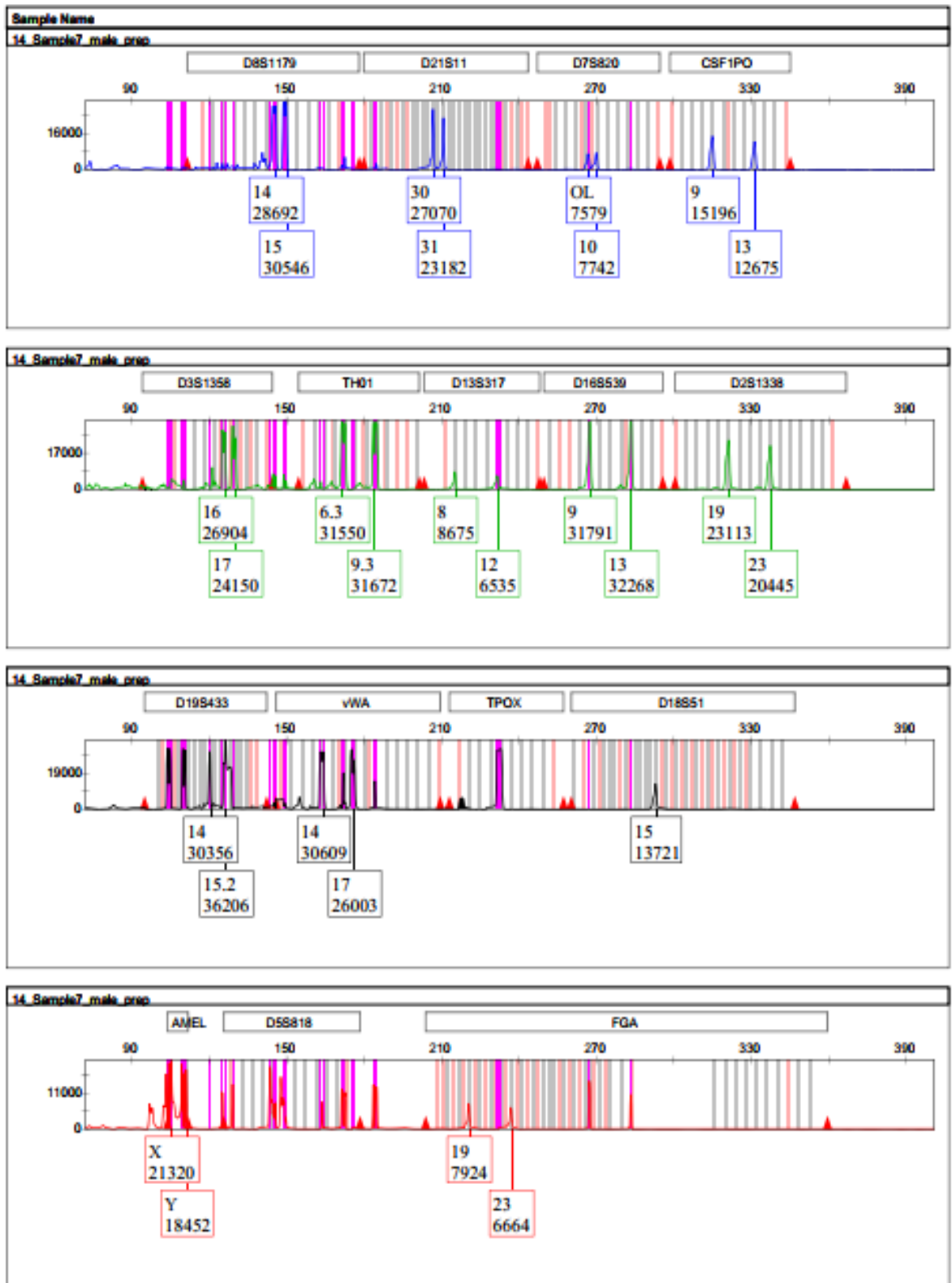
Ví dụ ở các Mẫu nam 2, Mẫu nam 3 và Mẫu nam 7 (hình 3.11):



A: Mẫu nam 2;



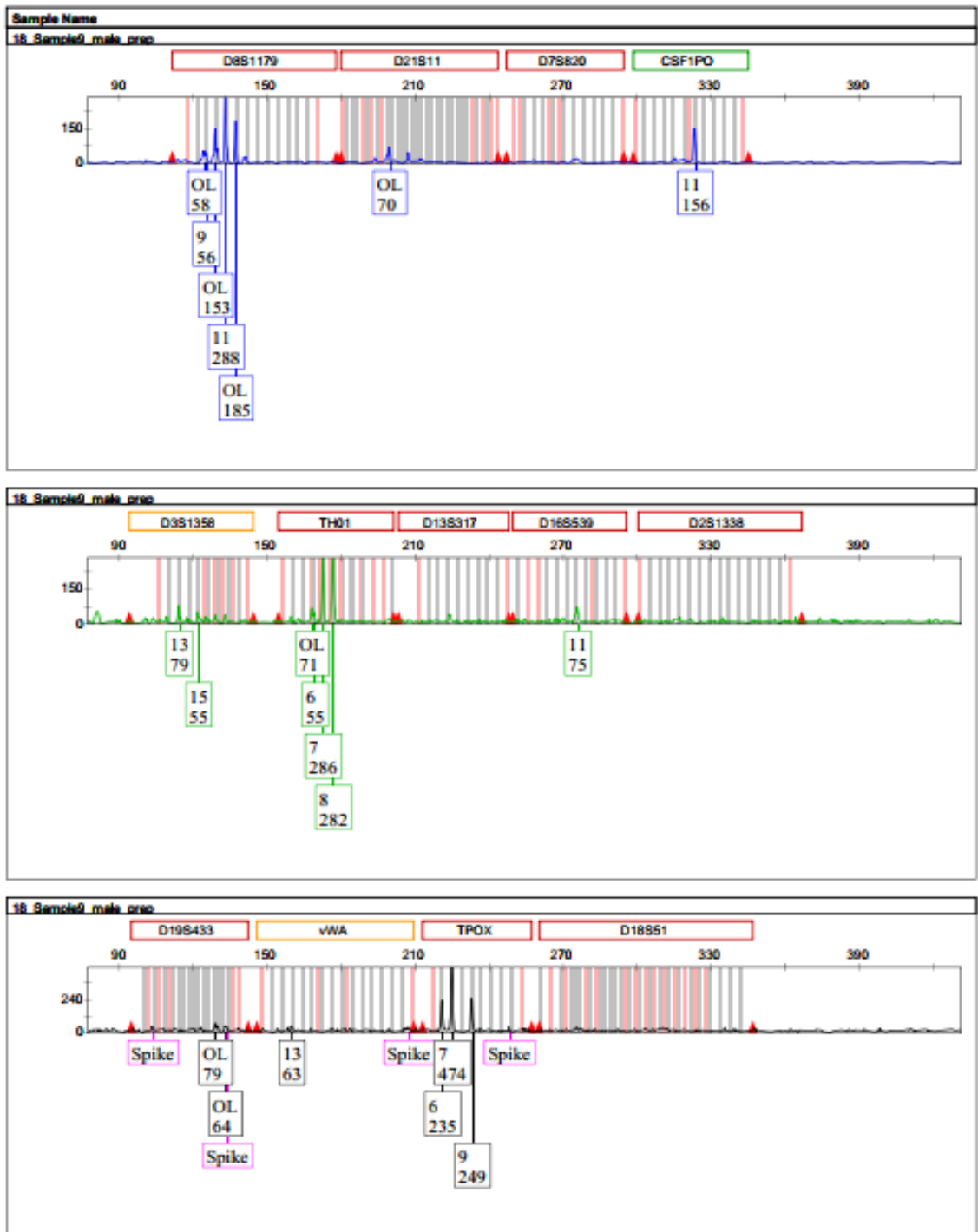
B: Mẫu nam 3;



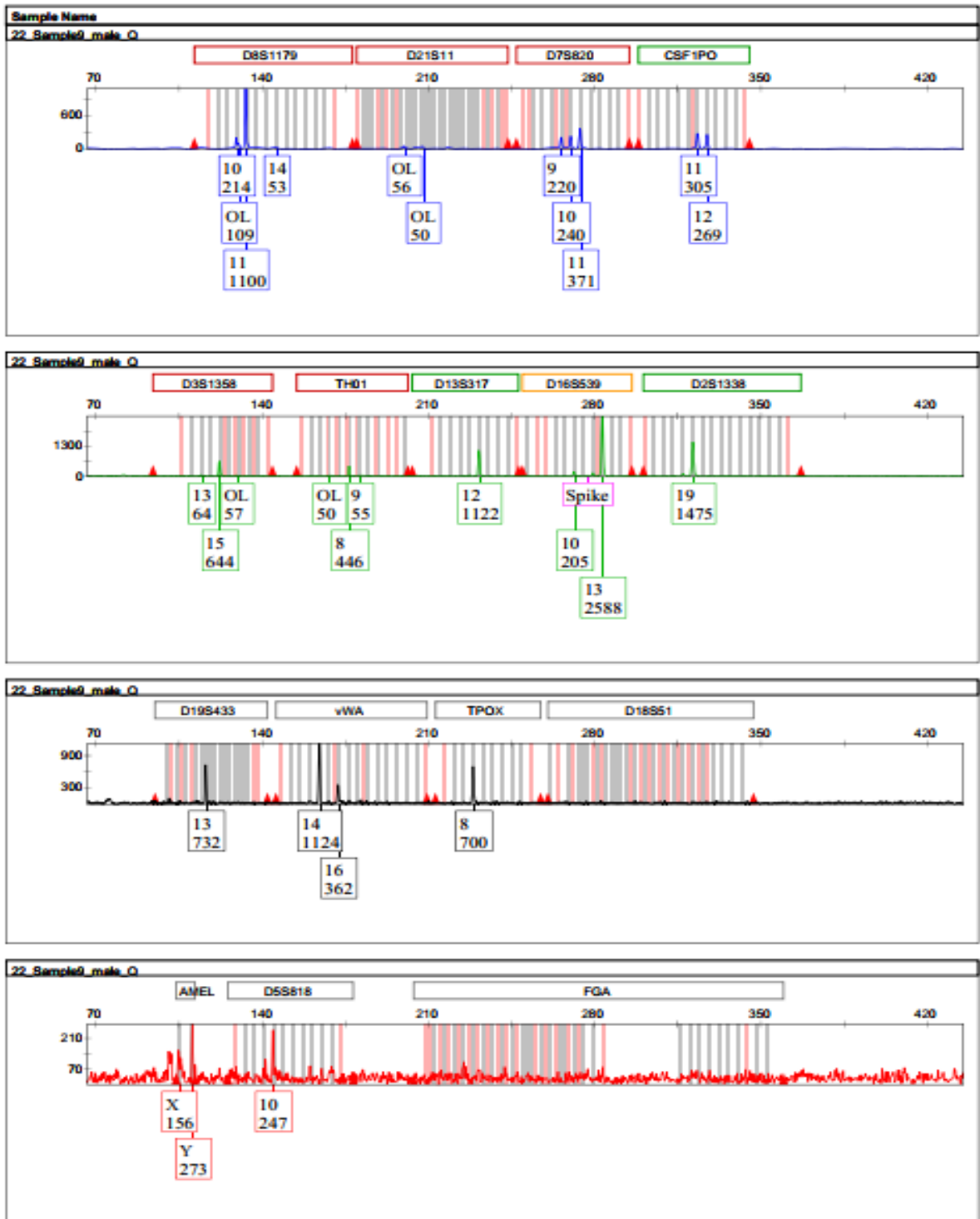
C: Mẫu nam 7

Hình 3.11. Kết quả điện di Mẫu nam 2, Mẫu nam 3 và Mẫu nam 7 tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction có hiện tượng pull up

Các mẫu 9, 10, 15, 19, 20 có kết quả định lượng thấp, hàm lượng DNA thu hồi được  $< 0.2\text{ng}/\mu\text{l}$  (thấp hơn lượng DNA đầu vào tối thiểu của phản ứng PCR) nên có hiện tượng mất peak, tỷ lệ peak bị lỗi cao, không phân tích được hồ sơ kiểu gen (hình 3.12). Nguyên nhân có thể do chất lượng dấu vết kém, lượng mẫu ít, dẫn đến quá trình tách chiết không thu được hiệu quả như mong muốn. Ví dụ ở Mẫu nam 9 (hình 3.12):



B: Mẫu nam 9 tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro;



B: Mẫu nam 9 tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction

Hình 3.12. Kết quả điện di Mẫu nam 9 tách chiết bằng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction; bộ kit QIAamp DNA Micro có hiện tượng mất peak

Kết quả nghiên cứu đã chứng minh tính hiệu quả của hai bộ kit thương mại là PrepFiler™ Forensic DNA Extraction và bộ kit QIAamp DNA Micro

so với phương pháp tách chiết truyền thống sử dụng Chelex<sup>®</sup> khi xét ở cả tiêu chí hàm lượng, chất lượng DNA thu được và khả năng phân tách nguồn DNA của người nam và người nữ giới. Hai bộ kit thương mại có tính ứng dụng cao đối với các vụ án khó, lượng dấu vết ít, chất lượng dấu vết kém, tuy nhiên giá thành của hai bộ kit thương mại trên là tương đối cao. Song song với đó, phương pháp tách chiết Chelex<sup>®</sup> với các mẫu mà lượng dấu vết nhiều, chất lượng tốt vẫn là phương pháp hiệu quả với chi phí thấp, lượng DNA thu hồi được từ phương pháp tách chiết Chelex<sup>®</sup> vẫn đạt yêu cầu để tiến hành các bước giám định tiếp theo.

### 3.4. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH PHƯƠNG SAI MỘT YẾU TỐ (KIỂM ĐỊNH ANOVA) SỬ DỤNG PHẦN MỀM SPSS ĐỐI VỚI HÀM LƯỢNG DNA TỔNG SỐ THU ĐƯỢC

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố trong SPSS đối với hàm lượng DNA tổng số thu được ở mẫu nam và mẫu nữ như sau:

**BẢNG MÔ TẢ**

Mẫu

	Số mẫu	Giá trị TB	Độ lệch chuẩn	Sai số	Khoảng tin cậy 95%		Giá trị nhỏ nhất	Giá trị lớn nhất
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên		
Qiagen	7	12.43	10.147	3.835	3.04	21.81	3	30
PrepFiler	18	18.06	8.264	1.948	13.95	22.17	2	29
Chelex	5	10.60	6.427	2.874	2.62	18.58	1	17
Tổng	30	15.50	8.803	1.607	12.21	18.79	1	30

#### Kiểm tra tính đồng nhất của phương sai

Mẫu

Kiểm định Leneve	Bậc tự do 1	Bậc tự do 2	Mức ý nghĩa
.653	2	27	.529

**BẢNG ANOVA**

Mẫu

Nguồn biến động	Tổng độ lệch bình phương	Bậc tự do	Phương sai	Tỷ số	Mức ý nghĩa
Giữa các mẫu	303.641	2	151.821	2.109	.141
Trong nội bộ mẫu	1943.859	27	71.995		
Tổng số	2247.500	29			

Hình 3.13. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của hàm lượng DNA tổng số thu được ở mẫu nam



**BẢNG MÔ TẢ**

Mẫu

	Số mẫu	Giá trị TB	Độ lệch chuẩn	Sai số	Khoảng tin cậy 95%		Giá trị nhỏ nhất	Giá trị lớn nhất
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên		
Qiagen	6	38.17	3.189	1.302	34.82	41.51	34	42
PrepFiler	20	47.35	8.893	1.988	43.19	51.51	31	59
Chelex	4	47.25	9.845	4.922	31.59	62.91	36	60
Tổng	30	45.50	8.803	1.607	42.21	48.79	31	60

**Kiểm tra tính đồng nhất của phương sai**

Mẫu

Kiểm định Leneve	Bậc tự do 1	Bậc tự do 2	Mức ý nghĩa
2.676	2	27	.087

**BẢNG ANOVA**

Mẫu

Nguồn biến động	Tổng độ lệch bình phương	Bậc tự do	Phương sai	Tỷ số	Mức ý nghĩa
Giữa các mẫu	403.367	2	201.683	2.953	.069
Trong nội bộ mẫu	1844.133	27	68.301		
Tổng số	2247.500	29			

Hình 3.14. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của hàm lượng DNA tổng số thu được ở mẫu nữ

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố (hình 3.13 và hình 3.14) cho thấy: Mức ý nghĩa của kiểm định Leneve ở hai phép tính lần lượt là 0.529 và 0.087, đều  $>0.05$ , do đó kết luận phương sai giữa các nhóm không có sự khác biệt, đủ điều kiện để phân tích ANOVA. Quan sát mức ý nghĩa ở bảng ANOVA ở hai hình, mức ý nghĩa lần lượt là 0.141 và 0.069, đều  $>0.05$ , do đó, ta kết luận: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ khác biệt trong hàm lượng DNA tổng số thu được ở mẫu nam giới và mẫu nữ từ ba phương pháp tách chiết khác nhau. Nguyên nhân có thể là do sự sai khác về số lượng mẫu (n) giữa ba phương pháp còn ít, chưa có sự chênh lệch rõ ràng trên tổng số mẫu nên kết quả phân tích khi chạy trên phần mềm chưa có ý nghĩa thống kê.

### 3.5. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH PHƯƠNG SAI MỘT YẾU TỐ (KIỂM ĐỊNH ANOVA) SỬ DỤNG PHẦN

## MỀM SPSS ĐỐI VỚI TỶ LỆ DNA BỊ BIẾN TÍNH

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố trong SPSS đối với tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nam như sau:

### BẢNG MÔ TẢ

Mẫu

	Số mẫu	Giá trị TB	Độ lệch chuẩn	Sai số	Khoảng tin cậy 95%		Giá trị nhỏ nhất	Giá trị lớn nhất
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên		
Qiagen	23	18.43	7.751	1.616	15.08	21.79	2	30
PrepFiler	3	7.33	2.082	1.202	2.16	12.50	5	9
Chelex	4	4.75	4.349	2.175	-2.17	11.67	1	11
Tổng	30	15.50	8.803	1.607	12.21	18.79	1	30

### Kiểm tra tính đồng nhất của phương sai

Mẫu

Kiểm định Leneve	Bậc tự do 1	Bậc tự do 2	Mức ý nghĩa
2.731	2	27	.083

### BẢNG ANOVA

Mẫu

Nguồn biến động	Tổng độ lệch bình phương	Bậc tự do	Phương sai	Tỷ số	Mức ý nghĩa
Giữa các mẫu	860.431	2	430.216	8.374	.001
Trong nội bộ mẫu	1387.069	27	51.373		
Tổng số	2247.500	29			

Hình 3.15. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nam

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố, hình 3.15 cho thấy: Mức ý nghĩa của kiểm định Leneve là  $0.083 > 0.05$ , do đó kết luận phương sai giữa các nhóm không có sự khác biệt, đủ điều kiện để phân tích ANOVA. Quan sát mức ý nghĩa ở bảng ANOVA, Mức ý nghĩa  $0.001 < 0.05$ , do đó, ta kết luận: Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ khác biệt trong tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nam từ ba phương pháp tách chiết khác nhau.

### Bảng so sánh giữa các nhóm

Biến phụ thuộc: Mẫu

(I) Sự khác biệt DI	(J) Sự khác biệt DI	Chênh lệch TB (I-J)	Sai số	Mức ý nghĩa	Khoảng tin cậy 95%	
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên
Qiagen	PrepFiler	11.101*	4.400	.018	2.07	20.13
	Chelex	13.685*	3.883	.002	5.72	21.65
PrepFiler	Qiagen	-11.101*	4.400	.018	-20.13	-2.07
	Chelex	2.583	5.474	.641	-8.65	13.82
Chelex	Qiagen	-13.685*	3.883	.002	-21.65	-5.72
	PrepFiler	-2.583	5.474	.641	-13.82	8.65

Hình 3.16. So sánh sự khác biệt của tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nam

Quan sát mức ý nghĩa ở bảng so sánh giữa các nhóm, ta thấy có hai mức ý nghĩa là 0.018 và 0.002 < 0.05, cho thấy có sự khác biệt về tỷ lệ DNA bị biến tính giữa phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro với hai phương pháp tách chiết bằng Chelex và bằng bộ kit PrepFiler. Cột chênh lệch trung bình (I-J) của phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro cho hai giá trị dương, chứng tỏ phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong kết quả tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nam so với hai phương pháp còn lại.

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố trong SPSS đối với tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nữ như sau:

**BẢNG MÔ TẢ**

Mẫu

	Số mẫu	Giá trị TB	Độ lệch chuẩn	Sai số	Khoảng tin cậy 95%		Giá trị nhỏ nhất	Giá trị lớn nhất
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên		
Qiagen	22	18.05	8.561	1.825	14.25	21.84	2	30
PrepFiler	5	10.20	4.207	1.881	4.98	15.42	6	17
Chelex	3	5.67	5.686	3.283	-8.46	19.79	1	12
Tổng	30	15.50	8.803	1.607	12.21	18.79	1	30

Kiểm tra tính đồng nhất của phương sai

Mẫu

Kiểm định Leneve	Bậc tự do 1	Bậc tự do 2	Mức ý nghĩa
2.145	2	27	.137

**BẢNG ANOVA**

Mẫu

Nguồn biến động	Tổng độ lệch bình phương	Bậc tự do	Phương sai	Tỷ số	Mức ý nghĩa
Giữa các mẫu	573.079	2	286.539	4.620	.019
Trong nội bộ mẫu	1674.421	27	62.016		
Tổng số	2247.500	29			

Hình 3.17. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nữ

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố (hình 3.17) cho thấy: Mức ý nghĩa của kiểm định Leneve là  $0.137 > 0.05$ , do đó kết luận phương sai giữa các nhóm không có sự khác biệt, đủ điều kiện để phân tích ANOVA. Quan sát mức ý nghĩa ở bảng ANOVA, mức ý nghĩa  $0.019 < 0.05$ , do đó, ta kết luận: Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ khác biệt trong tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nữ từ ba phương pháp tách chiết khác nhau.

### Bảng so sánh giữa các nhóm

Biến phụ thuộc: Mẫu

(I) Sự khác biệt DI	(J) Sự khác biệt DI	Chênh lệch TB (I-J)	Sai số	Mức ý nghĩa	Khoảng tin cậy 95%	
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên
Qiagen	PrepFiler	7.845	3.902	.054	-.16	15.85
	Chelex	12.379 <sup>*</sup>	4.847	.017	2.43	22.32
PrepFiler	Qiagen	-7.845	3.902	.054	-15.85	.16
	Chelex	4.533	5.751	.437	-7.27	16.33
Chelex	Qiagen	-12.379 <sup>*</sup>	4.847	.017	-22.32	-2.43
	PrepFiler	-4.533	5.751	.437	-16.33	7.27

Hình 3.18. So sánh sự khác biệt của tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nữ

Quan sát mức ý nghĩa ở bảng So sánh giữa các nhóm, ta thấy mức ý nghĩa là  $0.017 < 0.05$ , cho thấy có sự khác biệt về tỷ lệ DNA bị biến tính giữa phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro với phương pháp tách chiết bằng Chelex. Cột chênh lệch trung bình (I-J) của phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro cho giá trị dương, chứng tỏ phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong kết quả tỷ lệ DNA bị biến tính ở mẫu nữ so với phương pháp tách chiết bằng Chelex.

Kết quả trên có sự tương đồng với kết quả định lượng, có sự khác biệt rõ ràng giữa số lượng mẫu tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro cho kết quả tỷ lệ DNA bị biến tính thấp nhất so với hai phương pháp còn lại.

### 3.6. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH PHƯƠNG SAI MỘT YẾU TỐ (KIỂM ĐỊNH ANOVA) SỬ DỤNG PHẦN MỀM SPSS ĐỐI VỚI HÀM LƯỢNG DNA CỦA NGƯỜI NAM GIỚI THU HỒI ĐƯỢC

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố trong SPSS đối với hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được ở mẫu nam như sau:

Mẫu **BẢNG MÔ TẢ**

	Số mẫu	Giá trị TB	Độ lệch chuẩn	Sai số	Khoảng tin cậy 95%		Giá trị nhỏ nhất	Giá trị lớn nhất
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên		
Qiagen	6	15.17	12.513	5.108	2.04	28.30	3	30
PrepFiler	19	17.74	7.362	1.689	14.19	21.29	2	29
Chelex	5	7.40	4.037	1.806	2.39	12.41	1	11
Tổng	30	15.50	8.803	1.607	12.21	18.79	1	30

**Kiểm tra tính đồng nhất của phương sai**

Mẫu

Kiểm định Leneve	Bậc tự do 1	Bậc tự do 2	Mức ý nghĩa
7.036	2	27	.003

**Kiểm định bằng nhau về giá trị trung bình**

Mẫu

Kiểm định	Thống kê <sup>a</sup>	Bậc tự do 1	Bậc tự do 2	Mức ý nghĩa
Welch	8.273	2	9.863	.008

a. Tiệm cận f phân phối

*Hình 3.19. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của hàm lượng DNA của người nam giới thu được ở mẫu nam*

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố (hình 3.19) cho thấy: Mức ý nghĩa của kiểm định Leneve là  $0.003 < 0.05$ , do đó kết luận phương sai giữa các nhóm có sự khác biệt, không đủ điều kiện để phân tích ANOVA, ta tiến hành phân tích Welch. Quan sát mức ý nghĩa của Welch ở bảng Robust Test, mức ý nghĩa  $0.008 < 0.05$ , do đó, ta kết luận: Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ khác biệt trong hàm lượng DNA của người nam giới thu được ở mẫu nam từ ba phương pháp tách chiết khác nhau.

### Bảng so sánh giữa các nhóm

Biến phụ thuộc: Mẫu

(I) Sự khác biệt TY	(J) Sự khác biệt TY	Chênh lệch TB (I-J)	Sai số	Mức ý nghĩa	Khoảng tin cậy 95%	
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên
Qiagen	PrepFiler	-2.570	3.849	.510	-10.47	5.33
	Chelex	7.767	4.977	.130	-2.44	17.98
PrepFiler	Qiagen	2.570	3.849	.510	-5.33	10.47
	Chelex	10.337 <sup>*</sup>	4.131	.019	1.86	18.81
Chelex	Qiagen	-7.767	4.977	.130	-17.98	2.44
	PrepFiler	-10.337 <sup>*</sup>	4.131	.019	-18.81	-1.86

*Hình 3.20 So sánh sự khác biệt của hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được ở mẫu nam*

Quan sát mức ý nghĩa ở bảng so sánh giữa các nhóm, ta thấy mức ý nghĩa là  $0.019 < 0.05$ , cho thấy có sự khác biệt về hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được giữa phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler với phương pháp tách chiết bằng Chelex. Cột chênh lệch trung bình (I-J) của phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler cho giá trị dương, chứng tỏ phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được ở mẫu nam so với phương pháp tách chiết bằng Chelex.

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố trong SPSS đối với hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được ở mẫu nữ như sau:

**BẢNG MÔ TẢ**

Mẫu

	Số mẫu	Giá trị TB	Độ lệch chuẩn	Sai số	Khoảng tin cậy 95%		Giá trị nhỏ nhất	Giá trị lớn nhất
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên		
Qiagen	14	14.14	9.494	2.537	8.66	19.62	1	30
PrepFiler	4	8.00	4.082	2.041	1.50	14.50	4	12
Chelex	12	19.58	7.229	2.087	14.99	24.18	8	29
Tổng	30	15.50	8.803	1.607	12.21	18.79	1	30

**Kiểm tra tính đồng nhất của phương sai**

Mẫu

Kiểm định Leneve	Bậc tự do 1	Bậc tự do 2	Mức ý nghĩa
1.418	2	27	.260

**BẢNG ANOVA**

Mẫu

Nguồn biến động	Tổng độ lệch bình phương	Bậc tự do	Phương sai	Tỷ số	Mức ý nghĩa
Giữa các mẫu	450.869	2	225.435	3.388	.049
Trong nội bộ mẫu	1796.631	27	66.542		
Tổng số	2247.500	29			

*Hình 3.21. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố của hàm lượng DNA của người nam giới thu được ở mẫu nữ*

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố (Hình 3.21) cho thấy: Mức ý nghĩa của kiểm định Leneve là  $0.260 > 0.05$ , do đó kết luận phương sai giữa các nhóm không có sự khác biệt, đủ điều kiện để phân tích ANOVA. Quan sát mức ý nghĩa ở bảng ANOVA, mức ý nghĩa  $0.049 < 0.05$ , do đó, ta kết luận: Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ khác biệt trong hàm lượng DNA của người nam giới thu được ở mẫu nữ từ ba phương pháp tách chiết khác nhau.



### Bảng so sánh giữa các nhóm

Biến phụ thuộc: Mẫu

(I) Sự khác biệt TY	(J) Sự khác biệt TY	Chênh lệch TB (I-J)	Sai số	Mức ý nghĩa	Khoảng tin cậy 95%	
					Giới hạn dưới	Giới hạn trên
Qiagen	PrepFiler	6.143	4.625	.195	-3.35	15.63
	Chelex	-5.440	3.209	.102	-12.02	1.14
PrepFiler	Qiagen	-6.143	4.625	.195	-15.63	3.35
	Chelex	-11.583 <sup>*</sup>	4.710	.021	-21.25	-1.92
Chelex	Qiagen	5.440	3.209	.102	-1.14	12.02
	PrepFiler	11.583 <sup>*</sup>	4.710	.021	1.92	21.25

Hình 3.22. So sánh sự khác biệt của hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được ở mẫu nữ

Quan sát mức ý nghĩa ở bảng so sánh giữa các nhóm, ta thấy mức ý nghĩa là  $0.021 < 0.05$ , cho thấy có sự khác biệt về hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được giữa phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler với phương pháp tách chiết bằng Chelex. Cột chênh lệch trung bình (I-J) của phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler cho giá trị dương, chứng tỏ phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi được ở mẫu nữ so với phương pháp tách chiết bằng Chelex.

Kết quả phân tích thống kê trên có sự tương đồng với kết quả định lượng, có sự khác biệt rõ ràng giữa số lượng mẫu tách chiết bằng bộ kit PrepFiler cho kết quả hàm lượng DNA của người nam giới thu hồi nhiều nhất so với hai phương pháp còn lại.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

Hiệu quả tách chiết dấu vết tinh trùng bằng ba phương pháp:

Phương pháp thu được hàm lượng DNA tổng số cao nhất và hiệu quả nhất trong việc thu hồi DNA của người nam giới từ dấu vết tinh dịch, tinh trùng là phương pháp hạt từ sử dụng bộ kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction.

Phương pháp cho chất lượng DNA với tỷ lệ gãy đứt gãy và biến tính ít nhất trong quá trình tách chiết là phương pháp cột lọc sử dụng bộ kit QIAamp DNA Micro.

Phương pháp tách chiết sử dụng hai bộ kit thương mại phù hợp hơn với các dấu vết khó, chất lượng kém so với phương pháp sử dụng Chelex®. Phương pháp tách chiết bằng Chelex® vẫn đảm bảo được hiệu quả thu hồi DNA tổng số và hiệu quả thu hồi DNA của người nam giới trong quá trình tách chiết đối với các mẫu có chất lượng dấu vết tốt.

### KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu, sử dụng thêm phương pháp Tính toán tỷ lệ tiềm năng phân tách của phương pháp tách chiết phân biệt (SPRED) khi có đủ điều kiện về trang thiết bị phương tiện, đây cũng là một nhân tố đánh giá chính xác hiệu quả tách chiết DNA giữa các phương pháp.

Thử nghiệm và đánh giá hiệu quả của bộ kit DEPAarray™ Forensic SamplePrep Kit là phương pháp mới trong việc phát hiện và phân tách tế bào tinh trùng người từ các mẫu lẫn (bằng phương pháp nhuộm đặc hiệu tế bào), hướng tới ứng dụng trong xử lý các vụ án hình sự.

Kết quả nghiên cứu của đề tài này cần được ứng dụng trong chủ trương triển khai mở rộng phân cấp giám định DNA nói chung và giám định DNA từ dấu vết tinh dịch, tinh trùng nói riêng tại Phòng C09 - Công an các tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương. Cần tiếp tục sử dụng phương pháp tách chiết Chelex® khi phân cấp cho địa phương để giám định các vụ việc có lượng dấu vết nhiều, chất lượng dấu vết tốt nhằm tiết kiệm chi phí đầu tư và duy trì thường xuyên. Đối với các vụ việc khó khăn, phức tạp, lượng dấu vết ít, chất lượng dấu vết kém thì mới trung cầu giám định tuyến trên là Viện Khoa học hình sự để sử dụng các bộ kit thương mại một cách tiết kiệm, hiệu quả.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

Bài báo “ **Đánh giá hiệu quả một số phương pháp tách chiết ADN từ dấu vết tinh trùng phục vụ công tác giám định kỹ thuật hình sự**” đăng trên Tạp chí Khoa học Giáo dục Kỹ thuật – Hậu cần số 29, ISSN 2354-1008, xuất bản tháng 10/2022.

## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. L. Acosta, 2002, Collecting evidence for domestic and sexual assault: highlighting violence against women in health care system interventions, *International Journal of Gynecology & Obstetrics.*, 78 Suppl 1, pp. S99-104.
2. J. Horswell, 2004, Crime scene investigation, *The Practice Of Crime Scene Investigation*, pp. 33-76.
3. C. Jenny, 2010, *Child Abuse and Neglect E-Book: Diagnosis, Treatment and Evidence*, Elsevier Health Sciences, American.
4. J. E. Gould, J. W. Overstreet and F. W. Hanson, 1984, Assessment of human sperm function after recovery from the female reproductive tract, *Biology of Reproduction*, 31(5), pp. 888-94.
5. N. Kellogg, 2005, The evaluation of sexual abuse in children, *Pediatrics*, 116(2), pp. 506-12.
6. Đ. T. Phú and L. Đ. Tuấn, 2016, *Tài liệu chuyên Sinh học trung học phổ thông Sinh lí học động vật*, Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam, Việt Nam.
7. P. Hardinge, J. Allard, A. Wain and S. Watson, 2013, Optimisation of choline testing using Florence Iodine reagent, including comparative sensitivity and specificity with PSA and AP tests, *Science & Justice*, 53(1), pp. 34-40.
8. G. A. Harrison, 1933, The approximate determination of spermine in single human organs, *Biochemical Journal*, 27(4), pp. 1152–1156.
9. H. J. Kobus, E. Silenieks and J. Scharnberg, 2002, Improving the effectiveness of fluorescence for the detection of semen stains on fabrics, *Journal of Forensic Sciences*, 47(4), pp. 819-23.
10. W. S. Ward and D. S. Coffey, 1991, DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells, *Biology of Reproduction*, 44(4), pp. 569-74.
11. N. Küçük, 2018, Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm, *Turkish Journal of Urology*, 44(1), pp. 1-5.

12. F. H. Pruslin and T. C. Rodman, 1985, Proteins of demembrated mouse sperm heads. Characterization of a major sperm-unique component, *Journal of Biological Chemistry*, 260(9), pp. 5654-9.

13. W. S. Ward and D. S. Coffey, 1989, Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor, *Biology Reproduction*, 41(2), pp. 361-70.

14. B. R. Zirkin, D. A. Soucek and T. S. Chang, 1982, Sperm nuclear packing and regulation during spermatogenesis and fertilization, *The Johns Hopkins Medical Journal*, 151(3), pp. 101-12.

15. C. Rathke, W. M. Baarends, S. Awe and R. Renkawitz-Pohl, 2014, Chromatin dynamics during spermiogenesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(3), pp. 155-68.

16. C. C. Conwell, I. D. Vilfan and N. V. Hud, 2003, Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), pp. 9296-301.

17. N. V. Hud, M. J. Allen, K. H. Downing, J. Lee and R. Balhorn, 1993, Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 193(3), pp. 1347-54.

18. B. Sotolongo, E. Lino and W. S. Ward, 2003, Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA, *Biology of Reproduction*, 69(6), pp. 2029-35.

19. P. Gill, A. J. Jeffreys and D. J. Werrett, 1985, Forensic application of DNA 'fingerprints', *Nature*, 318(6046), pp. 577-9.

20. C. A. Lincoln, P. M. McBride, G. R. Turbett, C. D. Garbin and E. J. MacDonald, 2006, The use of an alternative light source to detect semen in clinical forensic medical practice, *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 13(4), pp. 215-218.

21. N. T. Quý, 2013, *Phát hiện, thu, bảo quản, nghiên cứu và giám định dấu vết sinh vật*, NXB Công an nhân dân, Việt Nam.

22. A. F. Schiff, 1978, Reliability of the acid phosphatase test for the identification of seminal fluid, *Journal of Forensic Sciences*, 23(4), pp. 833-44.
23. E. Borges, A. Degiuli, S. Desrentes, C. Popielarz, L. Blum and C. Marquette, 2017, Evaluation of the SPERM TRACKER™ for semen stain localization on fabrics, *Journal of Forensic Research*, 08(03).
24. W. D. Cavedon, 2018, *Innovative techniques for the localization of seminal stains and the identification of spermatozoa*, Boston University, England.
25. T. Sijen and S. Harbison, 2021, On the Identification of Body Fluids and Tissues: A Crucial Link in the Investigation and Solution of Crime, *Genes*, 12(11).
26. M. N. Hochmeister, B. Budowle, O. Rudin, C. Gehrig, U. Borer, M. Thali and R. Dirnhofer, 1999, Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid, *Journal of Forensic Sciences*, 44(5), pp. 1057-60.
27. P. Pulkkinen, S. Kanerva, K. Elfving and J. Jänne, 1975, Association of spermine and diamine oxidase activity with human spermatozoa, *Journal of reproduction and fertility*, 43(1), pp. 49-55.
28. S. S. Leubitz and R. A. Savage, 1984, Sensitivity of picroindigocarmine/nuclear fast red (PIC/NF) stain for detection of spermatozoa: a serial dilution study of human ejaculate, *American Journal of Clinical Pathology* 81(1), pp. 90-3.
29. P. F. Watson, 1975, Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa, *Veterinary Record*, 97(1), pp. 12-5.
30. J. P. Allery, N. Telmon, R. Mieusset, A. Blanc and D. Rougé, 2001, Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods, *Journal of Forensic Sciences*, 46(2), pp. 349-51.
31. K. Yoshida, K. Sekiguchi, N. Mizuno, K. Kasai, I. Sakai, H. Sato and S. Seta, 1995, The modified method of two-step differential extraction of

sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen, *Forensic Science International*, 72(1), pp. 25-33.

32. D. Di Martino, G. Giuffrè, N. Staiti, A. Simone, G. Sippelli, G. Tuccari and L. Saravo, 2006, LMD as a forensic tool in a sexual assault casework: LCN DNA typing to identify the responsible, *International Congress Series*, 1288, pp. 571-573.

33. C. Murray, C. McAlister and K. Elliott, 2007, Identification and isolation of male cells using fluorescence in situ hybridisation and laser microdissection, for use in the investigation of sexual assault, *Forensic Science International: Genetics*, 1(3-4), pp. 247-52.

34. C. T. Sanders, N. Sanchez, J. Ballantyne and D. A. Peterson, 2006, Laser microdissection separation of pure spermatozoa from epithelial cells for short tandem repeat analysis, *Journal of Forensic Sciences*, 51(4), pp. 748-57.

35. J. Chen, L. Kobilinsky, D. Wolosin, R. Shaler and H. Baum, 1998, A physical method for separating spermatozoa from epithelial cells in sexual assault evidence, *Journal of Forensic Sciences*, 43(1), pp. 114-8.

36. A. M. Garvin, 2003, Filtration based DNA preparation for sexual assault cases, *Journal of Forensic Sciences*, 48(5), pp. 1084-7.

37. W. M. Schoell, M. Klintschar, R. Mirhashemi and B. Pertl, 1999, Separation of sperm and vaginal cells with flow cytometry for DNA typing after sexual assault, *Obstetrics & Gynecology*, 94(4), pp. 623-7.

38. Z. J. Renata Jankovaa, Robert Janevskib, 2019, Differential extraction method as a golden standard in analyzing semen stains in sexual-assault cases, *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), pp. 838-840.

39. K. M. Horsman, S. L. Barker, J. P. Ferrance, K. A. Forrest, K. A. Koen and J. P. Landers, 2005, Separation of sperm and epithelial cells in a microfabricated device: potential application to forensic analysis of sexual assault evidence, *Analytical Chemistry*, 77(3), pp. 742-9.

40. M. D. T. Martin R. Buoncristiani, 2009, Development of a Procedure for Dielectrophoretic (DEP) Separation of Sperm and Epithelial

Cells for Application to Sexual Assault Case Evidence, *National Institute of Justice*, United States.

41. R. E. Martinez, 2015, *A novel differential extraction technique utilizing multiple enzymes developing separation of non-sperm and sperm fractions*, Boston University, England.

42. C. Valgren and E. Edenberger, 2008, Evaluation of the Differex™ System, *Forensic Science International: Genetics* 1(1), pp. 78-79.

43. A. Karp, P. G. Isaac and D. S. Ingram, 1998, Isolation of Nucleic Acids Using Silica-Gel Based Membranes: Methods Based on the Use of QIAamp Spin Columns, *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, 1441, pp.59-63

44. M. J. Davies, J. I. Taylor, N. Sachsinger and I. Bruce, 1998, Isolation of plasmid DNA using magnetite as a solid-phase adsorbent, *Analytical biochemistry*, 262(1), pp. 92-94.

45. S. Vuichard, U. Borer, M. Bottinelli, C. Cossu, N. Malik, V. Meier, C. Gehrig, A. Sulzer, M. L. Morerod and V. Castella, 2011, Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: a Swiss collaborative study, *Investigative Genetics*, 2, pp. 11.

46. N. Cerri, U. Ricci, I. Sani, A. Verzeletti and F. De Ferrari, 2003, Mixed stains from sexual assault cases: autosomal or Y-chromosome short tandem repeats?, *Croatian Medical Journal*, 44(3), pp. 289-92.

47. S. B. Klein and M. R. Buoncristiani, 2017, Evaluating the efficacy of DNA differential extraction methods for sexual assault evidence, *Forensic Science International: Genetics* 29, pp. 109-117.

48. G. Alderson, H. Gurevitch, T. Casimiro, B. Reid and J. Millman, 2018, Inferring the presence of spermatozoa in forensic samples based on male DNA fractionation following differential extraction, *Forensic Science International: Genetics*, 36, pp. 225-232.

49. V. S. M. I. Alfajri, Arief Budi Witarto, Ranny Is Maya, Ana Oktaviana, I. Made Wiranatha, 2018, Analysis the effect of different extraction methods towards the successfulness of amplification 24 loci short



tandem repeat (STR): Study of forensic samples, *AIP Conference Proceedings*, 2002(1).

50. K. Anslinger, M. Graw and B. Bayer, 2019, Deconvolution of blood-blood mixtures using DEPArray™ separated single cell STR profiling, *Rechtsmedizin*, 29(1), pp. 30-40.

51. V. R. Williamson, T. M. Laris, R. Romano and M. A. Marciano, 2018, Enhanced DNA mixture deconvolution of sexual offense samples using the DEPArray™ system, *Forensic Science International: Genetics*, 34, pp. 265-276.

52. B. B. Hợp, 2004, *Nghiên cứu khả năng tồn tại của dấu vết tinh dịch, tinh trùng người và một số phương pháp xác định dấu vết tinh trùng, tinh dịch người để sử dụng trong giám định Sinh học pháp lý*, Tổng cục cảnh sát, Việt Nam.

53. P. B. Danielson and H.E. McKiernan, 2017, Chapter 21 - Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science, *Academic Press*, 371-349.

54. J. Y. Liu, 2014, Direct qPCR quantification using the Quantifiler(®) Trio DNA quantification kit, *Forensic Science International: Genetics*, 13, pp. 10-9.

55. A. Edwards, H. A. Hammond, L. Jin, C. T. Caskey and R. Chakraborty, 1992, Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups, *Genomics*, 12(2), pp. 241-53.

56. X. Kong, K. Murphy, T. Raj, C. He, P. S. White and T. C. Matise, 2004, A combined linkage-physical map of the human genome, *American Journal of Human Genetics*, 75(6), pp. 1143-8.

57. Y. Nakahori, O. Takenaka and Y. Nakagome, 1991, A human X-Y homologous region encodes "amelogenin", *Genomics*, 9(2), pp. 264-9.

58. R. E. Straub, M. C. Speer, Y. Luo, K. Rojas, J. Overhauser, J. Ott and T. C. Gilliam, 1993, A microsatellite genetic linkage map of human chromosome 18, *Genomics*, 15(1), pp. 48-56.

59. M. D. Barber, B. J. McKeown and B. H. Parkin, 1996, Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus, *International Journal of Legal Medicine*, 108(4), pp. 180-5.
60. H. Li, L. Schmidt, M. H. Wei, T. Hustad, M. I. Lerman, B. Zbar and K. Tory, 1993, Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352; D3S1358; D3S1359, *Human Molecular Genetics*, 2(8), pp. 1327.
61. V. Sharma and M. Litt, 1992, Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus, *Human Molecular Genetics*, 1(1), pp. 67.
62. K. A. Mills, D. Even and J. C. Murray, 1992, Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA), *Human Molecular Genetics*, 1(9), pp. 779.
63. L. Hasap, W. Chotigeat, J. Pradutkanchana, W. Asawutmangkul, T. Kitpipit and P. Thanakiatkrai, 2019, Comparison of two DNA extraction methods: PrepFiler® BTA and modified PCI-silica based for DNA analysis from bone, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), pp. 669-670.

## ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT ADN TỪ DẤU VẾT TINH TRÙNG PHỤC VỤ CÔNG TÁC GIÁM ĐỊNH KỸ THUẬT HÌNH SỰ

Ngô Thị Thu Trang\* - TS. Bùi Anh Tuấn\*

ThS. Phạm Ngọc Sơn\* - PGS.TS. Võ Thị Bích Thủy\*\*

**Tóm tắt:** Trong các vụ việc mang tính hình sự, dấu vết tinh trùng, tinh dịch thường xuất hiện và tồn tại trên các bộ phận của cơ thể, bao cao su, quần áo, giường, chiếu, vật dụng cá nhân, tư trang... Thông qua quá trình giám định, giám định viên xác định và so sánh hồ sơ kiểu gen (ADN) của đối tượng nghi vấn với kiểu gen thu được từ dấu vết tinh trùng, tinh dịch đó, sẽ là bằng chứng xác thực cho hành vi phạm tội của đối tượng. Việc so sánh, đánh giá tính hiệu quả của phương pháp tách chiết ADN truyền thống sử dụng Chelex với các bộ kit thương mại PrepFiler® (hãng Thermo Fisher, Mỹ) và QIAamp DNA Micro (hãng Qiagen, Đức) giúp giám định viên chọn lựa được phương pháp tách chiết thích hợp với từng loại dấu vết tinh trùng trong mỗi vụ việc cụ thể, giúp cho việc khai thác hiệu quả tối đa thông tin từ dấu vết, đồng thời định hướng triển khai, phân cấp giám định ADN diện rộng cho lực lượng Kỹ thuật hình sự Công an cấp tỉnh.

**Từ khóa:** ADN; Kỹ thuật hình sự; dấu vết tinh trùng, tinh dịch; tách chiết ADN.

**Abstract:** In criminal cases, sperm and semen traces often appear and exist on parts of the body, condoms, clothes, beds, mats, personal items, personal belongings... Through the examination process, the assessor determines and compares the genotype (DNA) of the suspect with the genotype obtained from that sperm trace, which will be the definitive evidence for the subject's offense. The comparison and evaluation of the effectiveness of the traditional DNA extraction method using Chelex with PrepFiler® commercial kits (Thermo Fisher, USA) and QIAamp DNA Micro (Qiagen, Germany) helps the assessor to choose the appropriate extraction method for each type of sperm trace in each specific case, helping to maximize the efficiency of information from the trace, and at the same time orienting the deployment and decentralization of large-scale DNA assessment for the Criminal Technical Force of the Provincial Police.

**Key words:** DNA, sperm traces, Criminal Technical Force, DNA Extraction

### 1. Đặt vấn đề

Trong giám định kỹ thuật hình sự, dấu vết tinh dịch, tinh trùng là một loại dấu vết khó, do đặc trưng của dấu vết được hình thành bởi sự tác động qua lại giữa cơ thể hoặc dịch tiết cơ thể của nạn nhân và đối tượng, nên dễ có sự lẫn, nhầm giữa tế bào của đối tượng và nạn nhân

(tế bào tinh trùng, biểu mô của đối tượng với tế bào biểu mô, máu kinh nguyệt của nạn nhân...). Bên cạnh đó, trong một số vụ việc, đối tượng phạm tội có hành vi không xuất tinh, xuất tinh ngoài âm đạo, hoặc đối tượng đã thất ống dẫn tinh cũng là những thách thức không nhỏ cho giám định viên khi phải đối mặt với các dấu



\* Viện Khoa học hình sự, Bộ Công an

\*\* Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam

vết nghi do đối tượng để lại. Quá trình giám định ADN từ loại dấu vết này gặp những trở ngại, trong đó bước tách chiết ADN có ý nghĩa quyết định. Quy trình tách chiết ADN từ dấu vết tinh dịch, tinh trùng khá phức tạp và đòi hỏi phải sử dụng nhiều loại hóa chất để phân tách các nguồn ADN (từ những cá thể khác nhau) hơn so với các loại dấu vết khác.

Phương pháp tách chiết sử dụng Chelex® được thực hiện tại Viện Khoa học từ năm 1999 (từ khi bắt đầu triển khai giám định ADN tại Việt Nam) là phương pháp thao tác đơn giản, chi phí thấp. Tuy nhiên, phương pháp này mất nhiều thời gian, cần lượng dấu vết lớn, chất lượng dấu vết tốt. Do đó, việc lựa chọn phương pháp tách chiết hiện đại hơn để thu được các hồ sơ kiểu gen rõ ràng và hoàn chỉnh, giảm thiểu sự nhiễm, lẫn ADN là rất quan trọng. Đồng thời, so sánh và đánh giá với phương pháp sử dụng Chelex® để định hướng triển khai, phân cấp giám định ADN tại Phòng Kỹ thuật hình sự - Công an các tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương.

## **2. Quy trình tách chiết DNA từ dấu vết tinh dịch, tinh trùng bằng ba phương pháp: Phương pháp tách chiết sử dụng Chelex®, phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler® và phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro®**

Với quy trình tách chiết phân biệt truyền thống sử dụng Chelex®: Các tế bào biểu mô đầu tiên được ly giải bằng cách bổ sung SDS và proteinase K. Các tế bào tinh trùng nói chung có khả năng chống lại sự ly giải bởi các hóa chất này. Khi các tế bào biểu mô đã bị ly giải, tế bào tinh trùng sẽ được giữ lại bằng cách ly tâm thu cặn tế bào. Sau đó, ADN từ

các tế bào biểu mô nằm ở phần dịch nổi sẽ được tách chiết ở một ống riêng, ADN từ các tế bào tinh trùng nằm ở phần cặn sẽ được tách chiết ở một ống khác, theo các bước khác nhau. Các tế bào tinh trùng sau khi tách riêng được ly giải bằng cách bổ sung SDS, proteinase K và DTT. DTT làm gãy các liên kết disulfide có trong màng tế bào tinh trùng, giải phóng ADN của tế bào tinh trùng [1]. ADN từ tế bào tinh trùng và tế bào biểu mô sau đó được tách chiết theo phương pháp tách chiết vô cơ sử dụng hạt Chelex®. Quy trình tách chiết bằng bộ kit PrepFiler® và phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất [2,3].

## **3. Kết quả**

Nghiên cứu được tiến hành với 30 mẫu dấu vết tinh trùng từ các vụ việc mang tính hình sự có hoạt động xâm hại tình dục thực tế xảy ra trong hai năm 2021 - 2022. Các mẫu được chọn là các mẫu tồn tại trên cùng một loại vật mang là bông tai, lượng mẫu cất vào mỗi ống tách chiết được ước lượng là có kích thước tương đương nhau. Các dấu vết tinh trùng được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu của đề tài đều là các mẫu được thu thập và để khô tự nhiên, chưa qua xử lý bằng hóa chất.

Hàm lượng của ADN tổng số, hàm lượng ADN từ riêng nguồn tế bào của người nam giới, tỷ lệ ADN bị biến tính được đánh giá thông qua kết quả định lượng các sản phẩm tách chiết phân biệt bằng phương pháp Realtime PCR với bộ kit định lượng DNA Quantifiler™ Trio DNA Quantification, sử dụng máy Realtime PCR 7500.

Kết quả định lượng, đánh giá chất lượng ADN được thể hiện trong bảng sau:

Tên mẫu	Hàm lượng ADN tổng số cao nhất (ng/ $\mu$ l)		Tỷ lệ ADN bị biến tính thấp nhất (%)		Hàm lượng ADN của người nam giới cao nhất (ng/ $\mu$ l)	Hàm lượng ADN của người nam giới thấp nhất (ng/ $\mu$ l)
	Nam (Male)	Nữ (Female)	Nam (Male)	Nữ (Female)	Nam (Male)	Nữ (Female)
Mẫu 1	13.557 <sup>C</sup>	11.799 <sup>B</sup>	0.513 <sup>C</sup>	0.725 <sup>C</sup>	19.439 <sup>C</sup>	10.057 <sup>A</sup>
Mẫu 2	17.672 <sup>B</sup>	15.867 <sup>B</sup>	0.510 <sup>A</sup>	0.616 <sup>A</sup>	14.577 <sup>B</sup>	10.603 <sup>A</sup>
Mẫu 3	34.623 <sup>A</sup>	33.646 <sup>B</sup>	0.955 <sup>C</sup>	0.892 <sup>A</sup>	27.658 <sup>A</sup>	21.025 <sup>A</sup>
Mẫu 4	21.611 <sup>A</sup>	22.365 <sup>A</sup>	0.606 <sup>C</sup>	1.278 <sup>C</sup>	22.860 <sup>A</sup>	19.915 <sup>B</sup>
Mẫu 5	12.584 <sup>A</sup>	10.323 <sup>A</sup>	0.553 <sup>B</sup>	0.833 <sup>A</sup>	12.304 <sup>A</sup>	6.864 <sup>B</sup>
Mẫu 6	52.736 <sup>B</sup>	36.827 <sup>C</sup>	0.766 <sup>A</sup>	0.491 <sup>B</sup>	42.666 <sup>C</sup>	20.252 <sup>A</sup>
Mẫu 7	37.949 <sup>B</sup>	35.915 <sup>B</sup>	0.400 <sup>A</sup>	0.963 <sup>A</sup>	34.090 <sup>B</sup>	20.155 <sup>A</sup>
Mẫu 8	88.904 <sup>B</sup>	30.139 <sup>A</sup>	0.597 <sup>B</sup>	0.636 <sup>B</sup>	56.522 <sup>B</sup>	20.140 <sup>C</sup>
Mẫu 9	0.256 <sup>C</sup>	0.151 <sup>A</sup>	0.682 <sup>B</sup>	0.721 <sup>B</sup>	0.188 <sup>C</sup>	0.010 <sup>C</sup>
Mẫu 10	0.052 <sup>C</sup>	0.054 <sup>B</sup>	0.642 <sup>A</sup>	0.572 <sup>A</sup>	0.066 <sup>C</sup>	0.007 <sup>C</sup>
Mẫu 11	1.138 <sup>A</sup>	2.231 <sup>A</sup>	0.779 <sup>C</sup>	1.048 <sup>B</sup>	0.773 <sup>C</sup>	0.021 <sup>B</sup>
Mẫu 12	25.509 <sup>A</sup>	22.179 <sup>A</sup>	0.627 <sup>A</sup>	0.498 <sup>C</sup>	11.117 <sup>B</sup>	10.029 <sup>B</sup>
Mẫu 13	4.862 <sup>B</sup>	5.537 <sup>B</sup>	0.817 <sup>A</sup>	1.310 <sup>A</sup>	3.702 <sup>B</sup>	1.037 <sup>A</sup>
Mẫu 14	37.154 <sup>B</sup>	33.158 <sup>B</sup>	0.857 <sup>A</sup>	0.735 <sup>A</sup>	29.875 <sup>B</sup>	20.380 <sup>A</sup>
Mẫu 15	1.826 <sup>B</sup>	1.328 <sup>B</sup>	0.865 <sup>A</sup>	0.532 <sup>A</sup>	1.015 <sup>B</sup>	0.038 <sup>A</sup>
Mẫu 16	2.635 <sup>C</sup>	2.310 <sup>C</sup>	0.642 <sup>A</sup>	0.839 <sup>A</sup>	1.349 <sup>B</sup>	0.378 <sup>A</sup>
Mẫu 17	31.096 <sup>C</sup>	30.890 <sup>C</sup>	0.825 <sup>A</sup>	0.937 <sup>B</sup>	21.409 <sup>B</sup>	20.022 <sup>A</sup>
Mẫu 18	7.017 <sup>B</sup>	5.086 <sup>B</sup>	1.171 <sup>A</sup>	0.996 <sup>A</sup>	4.664 <sup>B</sup>	3.001 <sup>C</sup>
Mẫu 19	1.452 <sup>B</sup>	2.012 <sup>B</sup>	0.729 <sup>A</sup>	0.657 <sup>A</sup>	0.126 <sup>B</sup>	1.020 <sup>C</sup>
Mẫu 20	1.035 <sup>B</sup>	2.302 <sup>B</sup>	0.842 <sup>A</sup>	1.200 <sup>A</sup>	0.988 <sup>B</sup>	0.186 <sup>C</sup>
Mẫu 21	1.084 <sup>B</sup>	1.010 <sup>B</sup>	0.722 <sup>A</sup>	0.628 <sup>A</sup>	0.841 <sup>B</sup>	0.055 <sup>C</sup>
Mẫu 22	0.571 <sup>A</sup>	0.775 <sup>B</sup>	0.754 <sup>A</sup>	0.612 <sup>A</sup>	0.463 <sup>A</sup>	0.056 <sup>A</sup>
Mẫu 23	2.017 <sup>B</sup>	2.086 <sup>B</sup>	1.101 <sup>A</sup>	0.896 <sup>A</sup>	2.064 <sup>B</sup>	0.120 <sup>C</sup>
Mẫu 24	1.052 <sup>B</sup>	1.012 <sup>B</sup>	0.529 <sup>A</sup>	0.457 <sup>A</sup>	0.326 <sup>B</sup>	0.200 <sup>C</sup>
Mẫu 25	3.035 <sup>B</sup>	2.302 <sup>B</sup>	0.342 <sup>A</sup>	1.002 <sup>A</sup>	1.988 <sup>B</sup>	1.094 <sup>A</sup>
Mẫu 26	4.084 <sup>B</sup>	6.010 <sup>B</sup>	0.522 <sup>A</sup>	0.628 <sup>A</sup>	3.841 <sup>B</sup>	1.055 <sup>C</sup>
Mẫu 27	4.730 <sup>B</sup>	4.775 <sup>B</sup>	0.554 <sup>A</sup>	0.412 <sup>A</sup>	3.463 <sup>A</sup>	3.056 <sup>A</sup>
Mẫu 28	1.035 <sup>B</sup>	2.302 <sup>B</sup>	0.842 <sup>A</sup>	0.122 <sup>A</sup>	1.988 <sup>B</sup>	0.019 <sup>C</sup>
Mẫu 29	1.084 <sup>B</sup>	1.010 <sup>B</sup>	0.722 <sup>A</sup>	0.528 <sup>A</sup>	0.841 <sup>B</sup>	0.470 <sup>C</sup>
Mẫu 30	1.571 <sup>A</sup>	1.961 <sup>C</sup>	0.754 <sup>A</sup>	0.612 <sup>A</sup>	1.463 <sup>A</sup>	0.564 <sup>A</sup>

Chú thích bảng:

A: Mẫu tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro

B: Mẫu tách chiết bằng bộ kit PrepFiler®

C: Mẫu tách chiết bằng Chelex®

Từ bảng kết quả định lượng, cho thấy: Có 60% mẫu Nam và 66,67% mẫu Nữ tách chiết bằng bộ kit PrepFiler® cho kết quả hàm lượng ADN tổng số thu hồi được là cao nhất. Phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro cho kết quả tỷ lệ ADN bị biến tính thấp

nhất đối với cả mẫu Nam (76,7%) và mẫu Nữ (70%). Có 63% mẫu Nam tách chiết bằng bộ kit PrepFiler® cho kết quả hàm lượng ADN của người nam giới thu hồi được là cao nhất. Có 46% mẫu Nữ tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro cho kết quả hàm lượng ADN của



người nam giới là thấp nhất. Có sự chênh lệch về hàm lượng ADN thu hồi của cùng một phương pháp giữa các mẫu nguyên nhân là do các mẫu là mẫu từ các vụ án thực tế, nên chất lượng dấu vết của từng vụ án là không đồng đều.

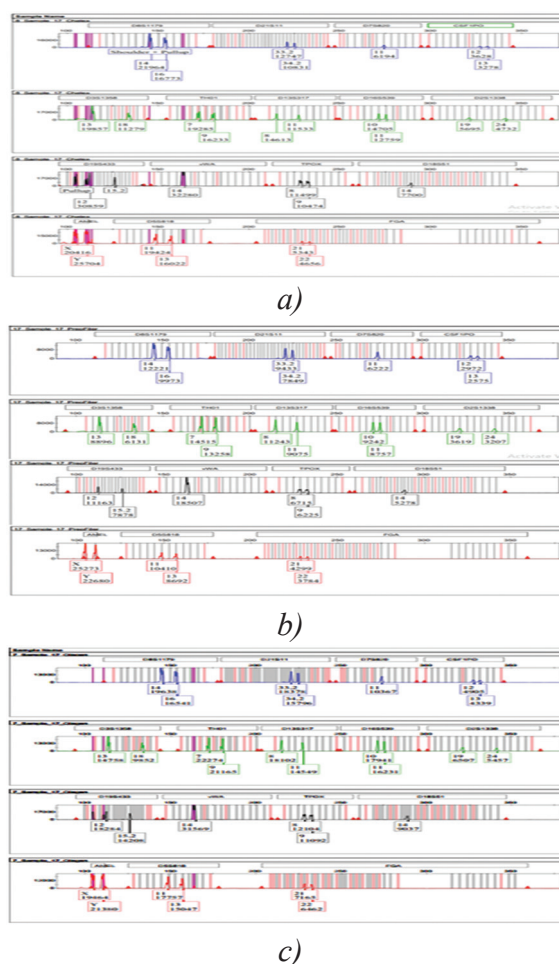
Điểm chung của hai phương pháp tách chiết bằng bộ kit thương mại là trong hai bộ kit đều có dung dịch rửa giải (lysis), giúp rút gọn bước tinh sạch ADN, vì vậy, hiệu quả tách chiết cao hơn so với phương pháp Chelex®, tỷ lệ ADN bị đứt gãy và biến tính trong quá trình tách chiết cũng thấp hơn.

Phương pháp tách chiết sử dụng bộ kit PrepFiler® cho hàm lượng ADN thu hồi được cao nhất là do bộ kit có các dung dịch rửa và loại bỏ các protein gây nhiễm lẫn, thu hồi được ADN ở dạng đã tinh sạch. Cơ chế tách chiết của bộ kit là tạo một từ trường duy trì suốt quá trình tách chiết, sử dụng các hạt từ liên kết với các phân tử chứa axit cacboxylic tự do, lần lượt liên kết với ADN hoặc ARN, liên kết này rất bền vững [4]. Trong quá trình tách chiết chỉ sử dụng một ống tách chiết, ít có sự hút ra hút vào giữa các ống, tránh được sự hao hụt ADN không đáng có.

Kết quả nghiên cứu của đề tài có sự tương đồng với các nghiên cứu năm 2011 của một nhóm các phòng thí nghiệm ở Thụy Sĩ và nghiên cứu năm 2019 của Hasap và cộng sự. Nghiên cứu hợp tác giữa 9 phòng thí nghiệm ở Thụy Sĩ đã chỉ ra rằng: Hàm lượng ADN tổng số và hàm lượng ADN của người nam giới thu hồi được bằng phương pháp tách chiết sử dụng bộ kit QIAamp DNA Micro cao hơn phương pháp tách chiết phân biệt sử dụng Chelex® [5]. Năm 2019, nghiên cứu của Hasap và cộng sự nhằm so sánh hiệu quả tách chiết giữa hai bộ kit PrepFiler® và QIAamp DNA Micro cũng đi đến kết luận rằng khả năng thu hồi ADN tổng số của bộ kit PrepFiler® tốt hơn [6]. Năm 2018, một nghiên cứu nhằm đánh giá hiệu quả tách chiết của ba phương pháp trên với các loại dấu vết khác nhau của Alfajri và cộng sự đã khẳng định hiệu quả tách chiết của bộ kit PrepFiler® đối với dấu vết tinh dịch, tinh trùng [7].

Sau khi thu được sản phẩm PCR, tiến hành xác định hồ sơ kiểu gen của các mẫu nghiên cứu bằng phương pháp điện di mao quản trên máy giải trình tự ABI3500 của hãng Thermo Fisher. Kết quả điện di phù hợp với kết quả định lượng tương ứng ở trên. Điện di đồ cho thấy, 100% tất cả các mẫu cho kết quả hàm lượng ADN tổng số cao, tỷ lệ biến tính thấp đều lên đủ peak, không có hiện tượng mất peak.

Ví dụ ở mẫu 17:



Hình 1. Điện di đồ của mẫu 17  
a) Mẫu tách chiết bằng Chelex®;  
b) Mẫu tách chiết bằng bộ kit PrepFiler®;  
c) Mẫu tách chiết bằng bộ kit Qiagen

Kết quả định lượng của mẫu 17 cho thấy, hàm lượng ADN tổng số thu được bằng phương pháp tách chiết sử dụng Chelex® là cao nhất, chiều cao peak trung bình của mẫu tách bằng phương pháp Chelex® là 14227, cao hơn so với chiều cao peak trung bình của

mẫu tách bằng bộ kit PrepFiler® và bằng bộ kit QIAamp DNA Micro lần lượt là 14195 và 9313. Kết quả điện di cho thấy ở mẫu tách bằng phương pháp Chelex® có hiện tượng kéo peak (pull up) và hiện tượng sẻ peak (shoulder) do lượng ADN nhiều, trong khi đó ở mẫu tách bằng bộ kit PrepFiler® và bằng bộ kit QIAamp DNA Micro không có hiện tượng này.

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy:

1. Phương pháp tách chiết bằng bộ kit PrepFiler® là phương pháp thu được hàm lượng ADN tổng số cao nhất và hiệu quả nhất trong việc thu hồi ADN của người nam giới từ dấu vết tinh dịch, tinh trùng.

2. Phương pháp tách chiết bằng bộ kit QIAamp DNA Micro cho chất lượng ADN với tỷ lệ gãy đứt gãy và biến tính ít nhất trong quá trình tách chiết.

3. Phương pháp tách chiết bằng Chelex vẫn đảm bảo được hiệu quả thu hồi ADN tổng số và hiệu quả thu hồi ADN của người nam giới trong quá trình tách chiết.

#### 4. Kết luận và kiến nghị

Nghiên cứu đã chứng minh tính hiệu quả của hai bộ kit thương mại là PrepFiler® và bộ kit QIAamp DNA Micro so với phương pháp tách chiết truyền thống sử dụng Chelex®. Hai bộ kit thương mại có tính ứng dụng cao đối với các vụ án khó, lượng dấu vết ít, chất lượng dấu vết kém, tuy nhiên giá thành của hai bộ kit thương mại trên là tương đối cao, khó có thể triển khai trên diện rộng ở toàn bộ các địa phương. Song song với đó, phương pháp tách chiết Chelex® với các mẫu mà lượng dấu vết nhiều, chất lượng tốt vẫn là phương pháp hiệu quả với chi phí thấp.

Thực hiện Nghị quyết số 12-NQ/TW ngày 16/3/2022 của Bộ Chính trị về đẩy mạnh xây dựng lực lượng Công an nhân dân thật sự trong sạch, vững mạnh, chính quy, tinh nhuệ, hiện đại đáp ứng yêu cầu nhiệm vụ trong tình hình mới, trong đó lực lượng Kỹ thuật hình sự là một trong những lực lượng tiến lên hiện đại vào năm 2025, việc triển khai giám định ADN nói chung và giám định ADN từ dấu

vết tinh dịch, tinh trùng nói riêng tại Phòng C09 - Công an các tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương là nhiệm vụ cấp thiết.

Từ kết quả nghiên cứu trên, tác giả kiến nghị và đề xuất khi triển khai lĩnh vực giám định ADN tại Công an các địa phương, cần tiếp tục sử dụng phương pháp tách chiết Chelex® và phân cấp giám định các vụ việc có lượng dấu vết nhiều, chất lượng dấu vết tốt để giảm chi phí đầu tư và duy trì thường xuyên. Đối với các vụ việc khó khăn, phức tạp, lượng dấu vết ít, chất lượng dấu vết kém thì mới trung cầu giám định tuyến trên là Viện Khoa học hình sự.

**N.T.T.T - B.A.T - P.N.S - V.T.B.T**

#### Tài liệu tham khảo

1. P. B. D. H.E. McKiernan, 2017, Chapter 21 - Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science, Academic Press, 371-349.

2. A. Karp, P. G. Isaac and D. S. Ingram, 1998, Isolation of Nucleic Acids Using Silica-Gel Based Membranes: Methods Based on the Use of QIAamp Spin Columns.

3. J. Y. Liu, 2014, Direct qPCR quantification using the Quantifiler® Trio DNA quantification kit, Forensic Science International: Genetics, 13, pp.10-9.

4. M. J. Davies, J. I. Taylor, N. Sachsinger and I. Bruce, 1998, Isolation of plasmid DNA using magnetite as a solid-phase adsorbent, Analytical biochemistry, 262(1), pp.92-94.

5. S. Vuichard, U. Borer, M. Bottinelli, C. Cossu, N. Malik, V. Meier, C. Gehrig, A. Sulzer, M. L. Morerod and V. Castella, 2011, Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: a Swiss collaborative study, Investigative Genetics, 2, pp.11.

6. V. S. Mochammad Isro Alfajri, Arief Budi Witarto, Ranny Is Maya, Ana Oktaviana, I. Made Wiranatha, 2018, Analysis the effect of different extraction methods towards the successfulness of amplification 24 loci short tandem repeat (STR): Study of forensic samples, AIP publishing.

7. Laila Hasap, Wilaiwan Chotigeat, Jintana Pradutkanchana, Watee Asawutmangkul, Thitika Kitpipit, Phuvadol Thanakiatkrai, 2019, Comparison of two DNA extraction methods: PrepFiler® BTA and modified PCI-silica based for DNA analysis from bone, Forensic Science International: Genetics Supplement Series.

