

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Việt Vinh

**HOÀN THIỆN PHƯƠNG PHÁP PHÂN LOẠI NHANH MẪU
XƯƠNG DỰA TRÊN HÌNH THÁI NHẪM PHỤC VỤ CÔNG
TÁC GIÁM ĐỊNH HÀI CỐT LIỆT SĨ TẠI VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội - 2024

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Việt Vinh

**HOÀN THIỆN PHƯƠNG PHÁP PHÂN LOẠI NHANH MẪU
XƯƠNG DỰA TRÊN HÌNH THÁI NHẪM PHỤC VỤ CÔNG
TÁC GIÁM ĐỊNH HÀI CỐT LIỆT SĨ TẠI VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Trần Minh Đức

Hà Nội - 2024

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 toàn chịu trách nhiệm.

Hà nội, ngày 30 tháng 05 năm 2024

Học viên



Trần Việt Vinh

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ nhiệt tình về tinh thần, kiến thức cũng như cơ sở vật chất của các nhà khoa học, các cơ sở nghiên cứu.

Đặc biệt tôi xin được bày tỏ sự kính trọng và biết ơn sâu sắc tới TS. **Trần Minh Đức** - người thầy đã tận tình định hướng, hướng dẫn và giúp đỡ tôi hết sức tận tình trong suốt thời gian tôi nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Kết quả nghiên cứu được hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu: **Nghiên cứu đánh giá mức độ phân huỷ của ADN tách chiết từ mẫu hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam phục vụ cho công tác giám định**. Mã số: CSCL08.01/23-24.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học và Trung tâm giám định ADN đã tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi suốt quá trình nghiên cứu học tập tại viện.

Bên cạnh đó tôi cũng trân trọng cảm ơn sự hướng dẫn tận tình của **ThS. Lê Thị Dung và ThS. Nguyễn Ngọc Nam** cùng toàn thể cán bộ Trung tâm giám định ADN – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong suốt quá trình tôi làm nghiên cứu luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ và các thầy cô giáo Khoa Công Nghệ Sinh học - Học viện Khoa học Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về sự dạy dỗ và chỉ bảo tận tình trong quá trình tôi học tập.

Nhân dịp này tôi đặc biệt gửi lời cảm ơn đến gia đình thân yêu luôn hi sinh và ủng hộ tôi, tôi gửi lời cảm ơn đến bạn bè và các anh chị đồng nghiệp đã động viên và giúp đỡ để tôi hoàn thành luận văn này.

Hà nội, ngày 30 tháng 05 năm 2024

Học viên



Trần Việt Vinh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. TỔNG QUAN HỆ XƯƠNG NGƯỜI.....	3
1.1.1. Giải phẫu hệ xương người.....	3
1.1.2. Thành phần hóa học của xương	7
1.1.3. Phân bố ADN trong xương.....	9
1.2. XÁC ĐỊNH VÀ PHÂN TÍCH ADN TRONG XƯƠNG NGƯỜI	11
1.2.1. Nghiên cứu ADN nhân trong xương người.....	12
1.2.2. Nghiên cứu ADN ty thể trong xương người	13
1.2.3. Nguyên lý tách chiết ADN trong xương người.....	15
1.2.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến cấu trúc và sự tồn tại của ADN hài cốt.....	17
1.3. MỨC ĐỘ ƯU TIÊN CỦA MẪU GIÁM ĐỊNH DỰA THEO VỊ TRÍ LẤY MẪU	21
1.4. ĐÁNH GIÁ HÌNH THÁI MẪU THEO GIAI ĐOẠN PHONG HÓA	25
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU.....	27
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	27
2.1.2. Nguyên vật liệu nghiên cứu	27
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	28
2.2.1. Phương pháp thu mẫu hài cốt liệt sĩ Việt Nam.....	28

2.2.2. Phương pháp đánh giá hình thái mẫu hài cốt	29
2.2.3. Phương pháp tách chiết ADN các mẫu hài cốt nghiên cứu.....	29
2.2.3.1. Chuẩn bị mẫu và xử lý mẫu ban đầu	29
2.2.3.2. Quy trình tách chiết ADN	30
2.2.4. Định lượng ADN gen nhân và ADN ty thể mẫu nghiên cứu bằng kỹ thuật Realtime PCR.....	30
2.2.4.1. Định lượng ADN gen nhân :	30
2.2.4.2. Định lượng ADN ty thể:	32
2.2.5. Phân tích trình tự ADN ty thể.....	32
2.2.6. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu	33
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	34
3.1. THU THẬP VÀ PHÂN LOẠI MẪU HÀI CỐT TẠI NGHĨA TRANG LIỆT SĨ QUỐC TẾ VIỆT LÀO.....	34
3.2. ĐÁNH GIÁ ĐỘ PHONG HÓA MẪU DỰA TRÊN THANG ĐIỂM BEHRENSMEYER.....	37
3.3. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG THU HỒI ADN VÀ MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA HÌNH THÁI MẪU VÀ CÁC KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG ADN.....	39
3.3.1. Định lượng ADN gen nhân mẫu nghiên cứu.....	39
3.3.2. Định lượng ADN ty thể mẫu nghiên cứu	43
3.3.3. Mối tương quan giữa hình thái mẫu và kết quả định lượng ADN	47
3.4. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ ADN TY THỂ	49
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	50
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	51
PHỤ LỤC.....	A

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng việt
ADN	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
AP	Apurinic/Apyrimidinic	
bp	Base pair	
HA	Hydroxyapatite	
ICMP	International Commission on Missing Persons	Ủy ban quốc tế về người mất tích
NTLS		Nghĩa trang liệt sĩ
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RE	Restriction enzyme	Enzyme giới hạn
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Đa hình độ dài đoạn giới hạn
STR	Short Tandem Repeat	Lặp lại song song ngắn
VNTR	Variable-number tandem repeat	Lặp lại song song số biến
NC	Negative Control	Kiểm soát âm tính
SA	Small Autosomal	Gen đích nhỏ trên nhiễm sắc thể thường
LA	Large Autosomal	Gen đích lớn trên nhiễm sắc thể thường
Y	Y Target	Gen đích Y
qPCR	Realtime Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực
Nu	Nucleotide	

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1. 1. Vị trí lấy mẫu thường được sử dụng để giám định ADN	21
Bảng 1. 2. Danh sách các yếu tố răng và xương với hệ thống xếp hạng và mã hóa ưu tiên	24
Bảng 2. 1. Danh sách hoá chất chủ yếu trong thí nghiệm.....	28
Bảng 2. 2. Gen đích của Bộ định lượng DNA Quantifiler™ Trio	31
Bảng 2. 3. Khoảng và trung bình của các giá trị độ dốc đường cong tiêu chuẩn	31
Bảng 3. 1. Tổng hợp số lượng mẫu theo loại mẫu thu được.....	35
Bảng 3. 2. Số lượng loại mẫu được sử dụng trong thí nghiệm	35
Bảng 3. 3. Giai đoạn phong hóa mẫu theo hệ thống phân loại của Behrensmeyer (1978)	37
Bảng 3. 4. Tỷ lệ mẫu thu hồi được ADN nhân trong từng nhóm mẫu theo loại xương.....	41
Bảng 3. 5. Tỷ lệ mẫu thu hồi được ADN nhân trong từng nhóm mẫu theo thang điểm phong hóa	43
Bảng 3. 6. Tỷ lệ mẫu thu hồi được ADN ty thể và nồng độ ADN ty thể trung bình trong từng loại xương.....	45
Bảng 3. 7. Tỷ lệ mẫu thu hồi được ADN ty thể và nồng độ ADN ty thể trung bình trong từng nhóm mẫu theo thang điểm phong hóa	46

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1. 1. Bộ xương người nhìn từ phía trước và sau	3
Hình 1. 2. Xương cột sống của con người	4
Hình 1. 3. Xương lồng ngực của con người.....	5
Hình 1. 4. Xương sọ của con người	5
Hình 1. 5. Giải phẫu vỏ xương.....	6
Hình 1. 6. Các loại tế bào trong mô xương	7
Hình 1. 7. Cấu trúc ADN ty thể	14
Hình 1. 8. Cấu tạo xương dài	18
Hình 1. 9. Cấu tạo răng người.....	19
Hình 1. 10. Tỷ lệ tách chiết ADN thành công từ các loại mẫu hài cốt	20
Hình 1. 11. Các giai đoạn phong hóa của mẫu hài cốt.....	26
Hình 3. 1. Ảnh chụp hồ sơ giám định mẫu A6.023.....	34
Hình 3. 2. Tỷ lệ mẫu theo vị trí.....	36
Hình 3. 3. Nồng độ định lượng đích ADN dài (LA) của 24 mẫu hài cốt.....	39
Hình 3. 4. Nồng độ định lượng đích ADN ngắn (SA) của 71 mẫu hài cốt.....	40
Hình 3. 5. Chỉ số phân hủy (DI) của 24 mẫu hài cốt	40
Hình 3. 6. Phân tích hậu định Dunn giữa bốn loại xương	42
Hình 3. 7. Nồng độ định lượng đích ADN ty thể của 115 mẫu hài cốt.....	44

MỞ ĐẦU

Các cuộc chiến tranh bảo vệ tổ quốc của dân tộc Việt Nam đã lùi xa nhiều năm nhưng những hậu quả của cuộc chiến vẫn vô cùng nặng nề, nó ảnh hưởng rất lớn đến đời sống văn hoá tinh thần của người dân, nhất là những người có người thân đã hi sinh trong sự nghiệp đấu tranh giành độc lập của dân tộc. Ở nước ta hiện nay, một số lượng lớn hài cốt các chiến sĩ đã hi sinh trong các cuộc chiến tranh giành độc lập của dân tộc vẫn chưa xác định được danh tính. Vì vậy, vấn đề cấp bách được đặt ra đối với đảng, nhà nước và nhân dân ta là xác định danh tính hài cốt liệt sĩ còn thiếu thông tin. Do sự thiếu hụt các thông tin cá nhân liên quan cũng như hồ sơ y tế và dữ liệu răng hàm mặt, nên việc xác định danh tính liệt sĩ - nhận dạng pháp y chủ yếu phụ thuộc vào việc giám định ADN từ các bộ xương có sẵn, bao gồm xương và răng [1-3].

Mẫu hài cốt liệt sĩ Việt Nam được thu thập tại các nghĩa trang khác nhau trên cả nước nên độ phân hủy cũng khác nhau, mức độ phân hủy tùy thuộc vào điều kiện khí hậu thổ nhưỡng từng vùng. Tuổi của mẫu khác nhau theo từng thời kỳ kháng chiến nên mẫu có tuổi càng lớn thì mức độ bị phân hủy mẫu do môi trường tác động càng mạnh. Hơn nữa, điều kiện mai táng và tác động của vi sinh vật trong đất cũng là những yếu tố ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự toàn vẹn của ADN trong mẫu [1, 4-6]. Những mẫu hài cốt này thường có chất lượng kém nên gây khó khăn trong nhận dạng pháp y. Vì vậy, việc lựa chọn phương pháp giám định ADN là rất cần thiết, giúp giảm thời gian, công sức và chi phí giám định.

Trên thế giới và Việt Nam hiện nay, các phương pháp giám định ADN chủ yếu dựa vào các chỉ thị phân tử trên ADN ty thể (vùng D-loop) và ADN gen nhân (STR, SNP...). Để áp dụng được các phương pháp giám định này trên mẫu xương hài cốt thì ADN tách chiết từ các mẫu này phải có chất lượng tốt và đồng đều. Các mẫu xương hài cốt ở Việt Nam thường có chất lượng và mức độ phân hủy khác nhau nên gây rất nhiều khó khăn cho việc tách chiết ADN. Đã có rất nhiều các phương pháp tách chiết khác nhau đã được nghiên cứu và đưa ra bởi các nhà khoa học trên thế giới, trong đó mỗi phương pháp tách chiết lại tối ưu cho từng loại mẫu khác nhau [3]. Do đó, việc đánh giá và phân loại mẫu

dựa trên hình thái xương là rất cần thiết cho việc tối ưu hoá tách chiết ADN và xa hơn là nâng cao hiệu quả giám định.

Xuất phát từ các cơ sở khoa học và thực tiễn trên chúng tôi tiến hành đề tài: **“Hoàn thiện phương pháp phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái nhằm phục vụ công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam”**. Nghiên cứu này sẽ cung cấp các thông tin có giá trị cho phục vụ công tác giám định tại Trung tâm Giám định ADN.

Mục tiêu của đề tài:

1. Đánh giá hiệu quả của việc sử dụng tiêu chí đánh giá bên ngoài mẫu bao gồm: vị trí lấy mẫu và thang điểm Beyensmeyer đối với khả năng thu hồi ADN của mẫu hài cốt lâu năm.
2. Góp phần hoàn thiện phương pháp phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái nhằm phục vụ công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam.

Nội dung nghiên cứu:

Nội dung 1: Thu thập và phân loại mẫu hài cốt tại nghĩa trang liệt sĩ Quốc tế Việt Lào, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An.

Nội dung 2: Đánh giá độ phong hóa mẫu dựa trên thang điểm Behrensmeyer.

Nội dung 3: Đánh giá khả năng thu hồi ADN từ các mẫu nghiên cứu và đánh giá mối tương quan giữa hình thái mẫu và các kết quả ADN thu được.

Nội dung 4: Phân tích trình tự ADN ty thể mẫu nghiên cứu.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN HỆ XƯƠNG NGƯỜI

1.1.1. Giải phẫu hệ xương người

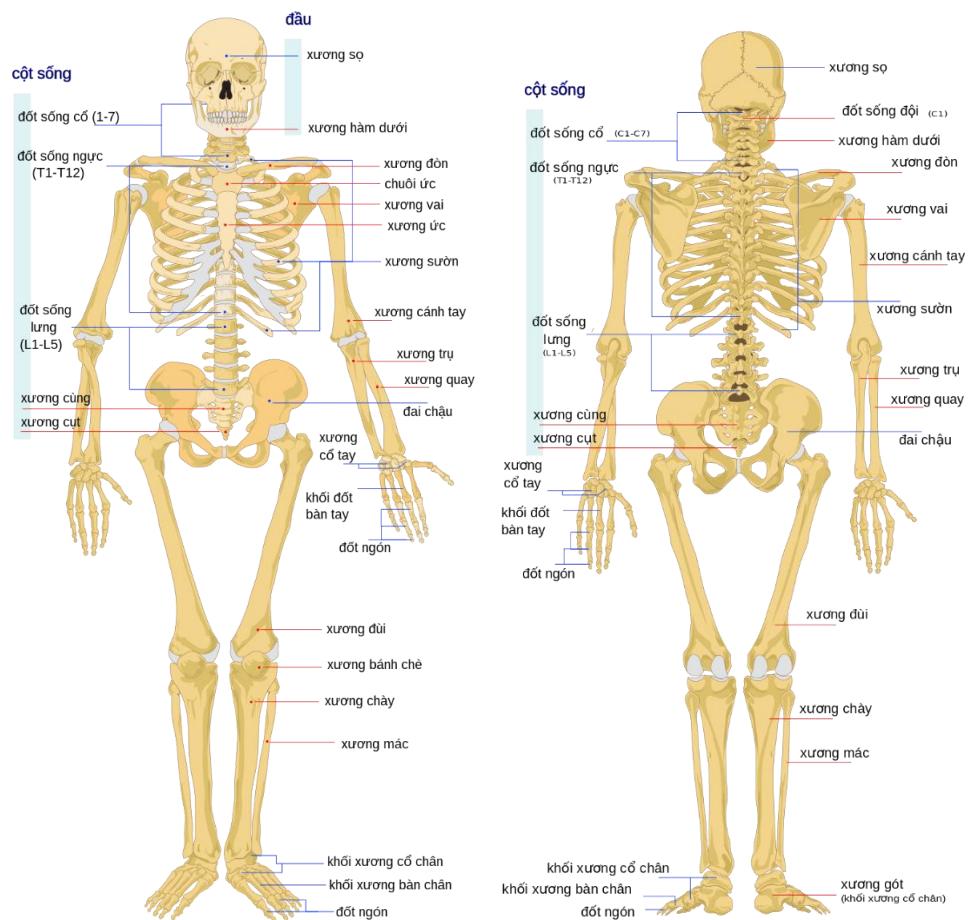
Xương là những bộ phận rắn được cấu tạo bởi mô liên kết rắn có 4 chức năng:

Nâng đỡ: tạo 1 khung cứng để nâng đỡ cơ thể và là nơi bám của các cơ

Bảo vệ: xương đầu mặt bảo vệ não, lồng ngực bảo vệ tim phổi, khung chậu bảo vệ bàng quang, tử cung.

Vận động: các cơ bám vào xương, khi cơ co sẽ làm xương chuyển động quanh các khớp.

Tạo máu và trao đổi các chất: tủy xương tạo hồng cầu, bạch cầu hạt và tiểu cầu. Xương cũng là nơi dự trữ và trao đổi mỡ, canxi, photpho khi cần cơ thể có thể huy động lấy ra.

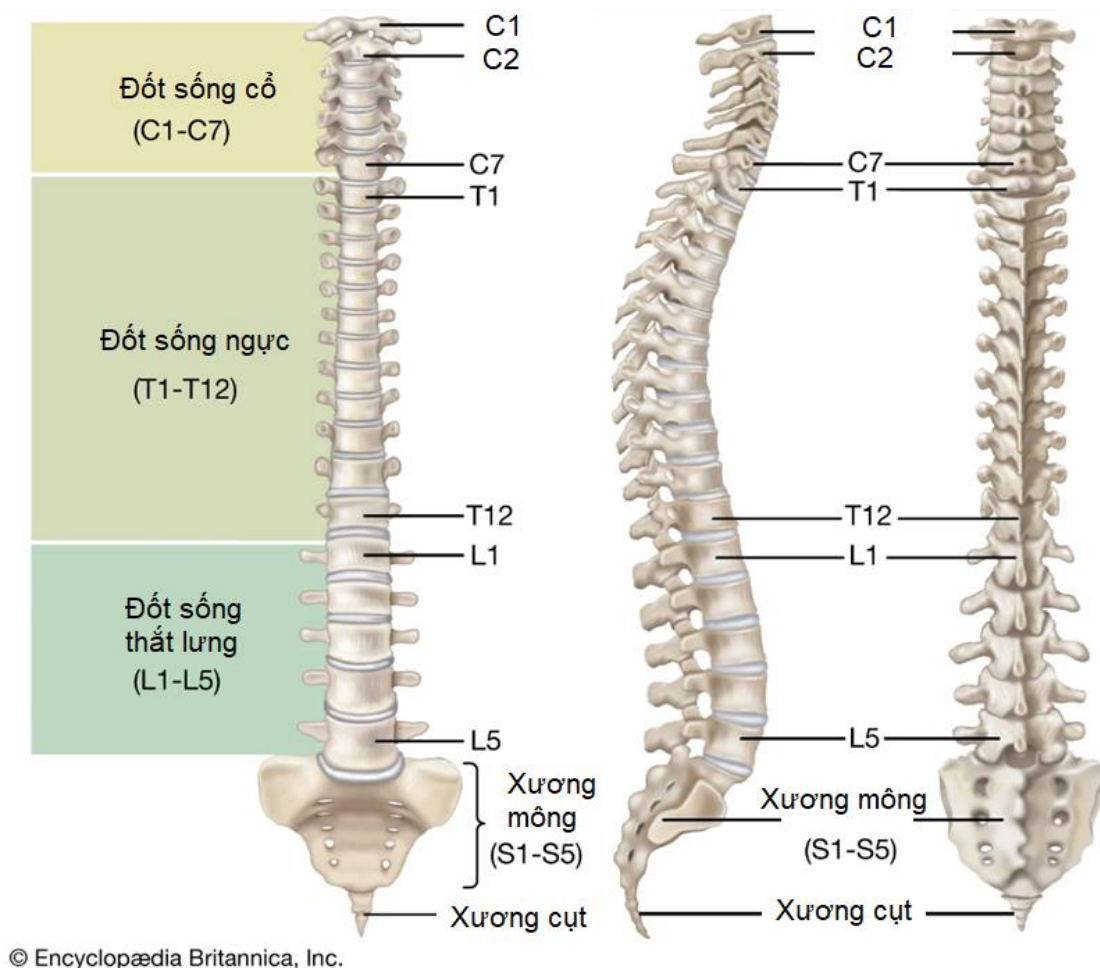


Hình 1. 1. Bộ xương người nhìn từ phía trước và sau [7]

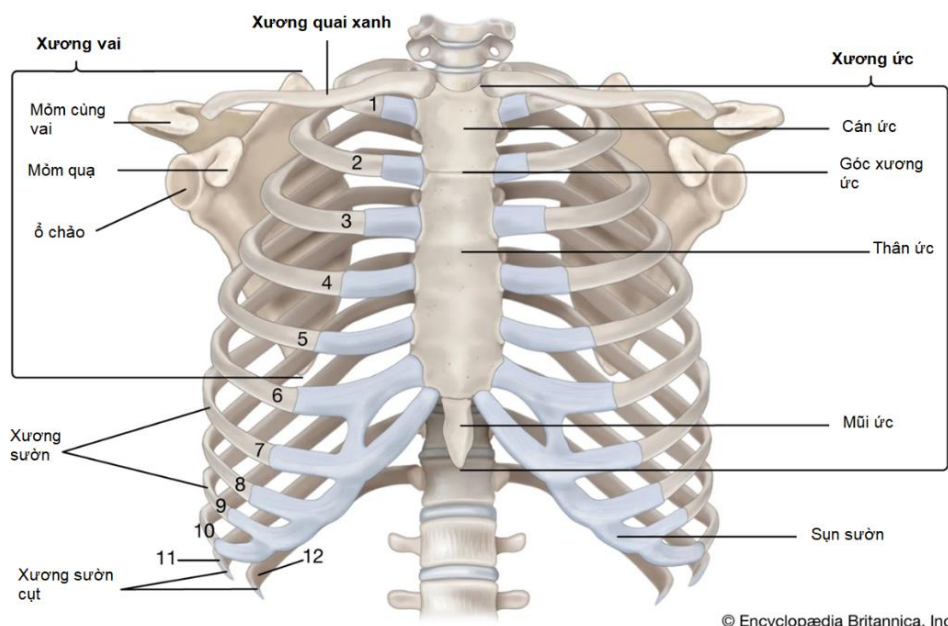
Bộ xương người trưởng thành gồm 206 xương phần lớn là xương đôi được phân thành 3 nhóm chính (hình 1.1) [8]:

Xương chi trên và xương chi dưới: Chi trên dính vào thân bởi đai vai (gồm xương đòn và xương vai); chi dưới dính vào thân bởi đai chậu (gồm 2 xương chậu dính thẳng vào xương cùng của cột sống). Mỗi chi có 3 đoạn: cánh tay hoặc đùi, cẳng tay hoặc cẳng chân, bàn tay hoặc bàn chân (gồm có cổ tay hoặc cổ chân, bàn tay hoặc bàn chân, ngón tay hoặc ngón chân). Cấu trúc xương được tạo thành từ hai loại mô xương: xương vò và xương ống.

Xương mình gồm cột sống (hình 1.2) và lồng ngực (hình 1.3). Cột sống có 32 đốt sống, trong đó có 5 đốt sống cùng dính liền nhau tạo nên xương cùng và 3 đốt sống cụt cũng dính liền nhau tạo nên xương cụt. Lồng ngực gồm có đoạn cột sống ngực, xương ức và 12 đôi xương sườn.

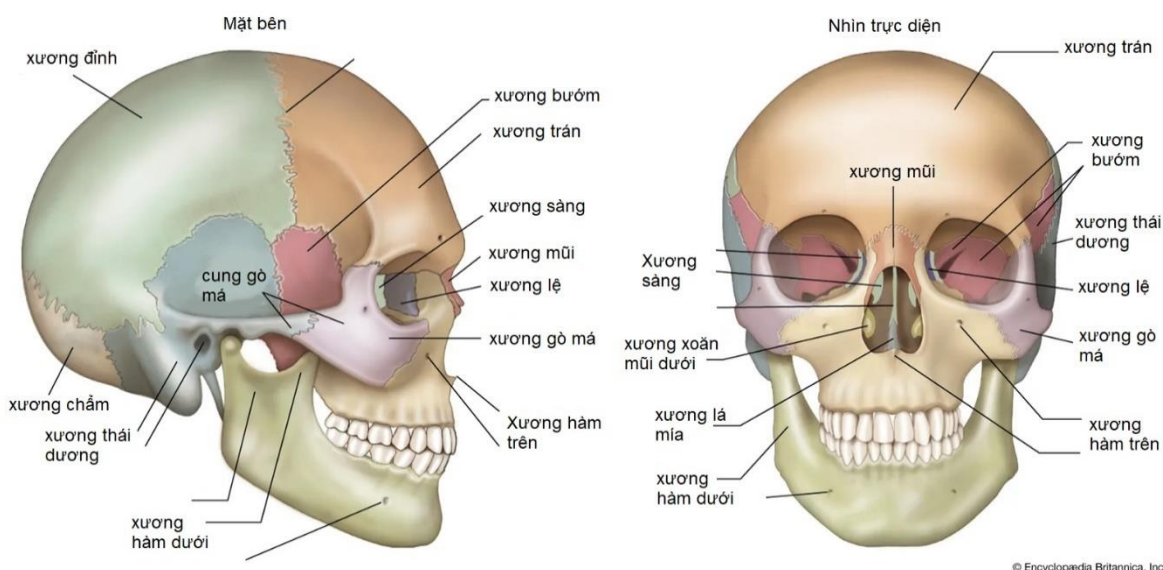


Hình 1. 2. Xương cột sống của con người [9]



Hình 1. 3. Xương lồng ngực của con người [9]

Xương sọ mặt gồm 8 xương sọ và 14 xương mặt hợp thành hộp sọ và khối xương mặt (hình 1.4).

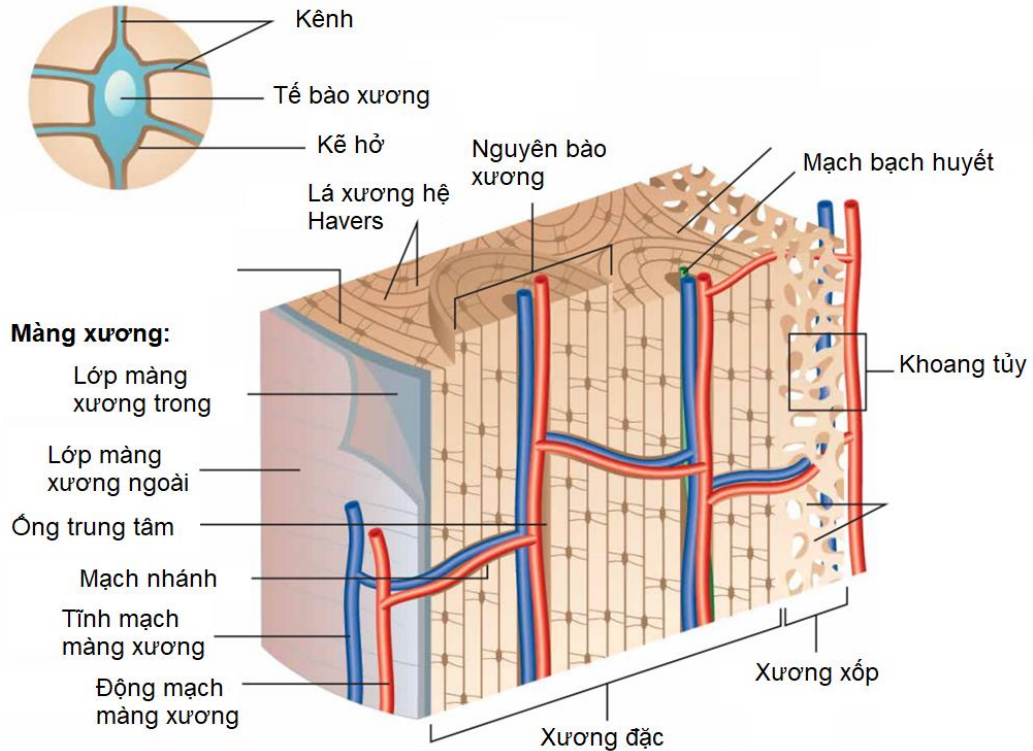


Hình 1. 4. Xương sọ của con người [9]

Về mặt đại thể, xương gồm 2 dạng (loại) cấu tạo (hình 1.5):

Xương dẹt và đầu của xương dài: gồm có một lớp bên ngoài vững chắc (vỏ xương) bao quanh một mạng lưới chịu lực hình thành từ lá xương tạo thành một hệ thống vách mỏng không đều được gọi là bè xương, xếp theo nhiều hướng khác nhau và có thể nối với nhau gọi là mô xốp. Giữa các bè có những hốc chứa tủy xương.

Xương dài: Phần thân xương có các lá xương xếp đồng tâm tạo thành những cấu trúc đặc biệt được gọi là hệ thống Havers. Mỗi hệ thống có dạng hình trụ, gồm những lá xương xếp vòng, ở chính giữa khối trụ đó là ống Havers chứa mạch máu, mô liên kết [10, 11].



Hình 1.5. Giải phẫu vỏ xương [11]

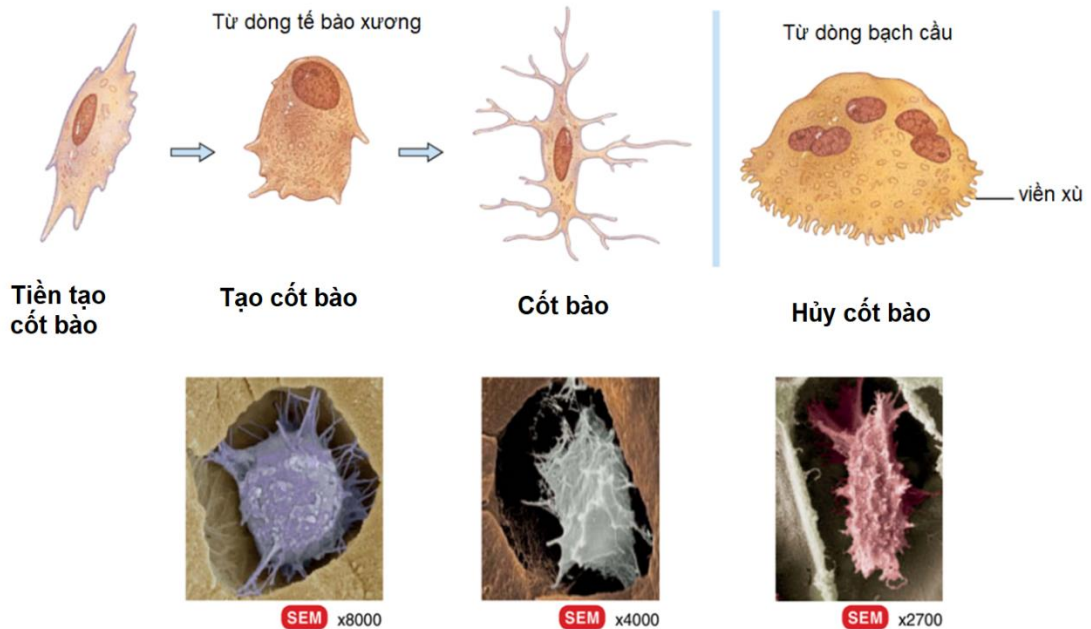
Ở mức độ hiển vi, xương cấu tạo từ vật liệu cứng, đồng nhất, bên trong hoặc xen lẫn giữa chúng là bốn loại tế bào: tiền tạo cốt bào, tạo cốt bào, cốt bào và hủy cốt bào (hình 1.6).

Tiền tạo cốt bào (Osteoprogenitor cells) là các tế bào gốc xương không chuyên biệt có nguồn gốc từ trung mô. Chúng là những tế bào xương duy nhất trải qua quá trình phân chia tế bào; các tế bào này sẽ phát triển thành các nguyên bào xương. Các tế bào tiền thân xương được tìm thấy dọc theo phần bên trong của màng xương, ở lớp nội mạc và trong các ống chứa mạch máu trong xương.

Tạo cốt bào (Osteoblasts) là tế bào tạo xương. Chúng tổng hợp, tiết ra các sợi collagen và các thành phần hữu cơ khác cần thiết để xây dựng ma trận ngoại bào của mô xương và chúng bắt đầu quá trình vôi hóa. Khi ma trận ngoại bào bao quanh các nguyên bào xương, chúng bị mắc kẹt trong chất tiết và trở thành tế bào xương.

Cốt bào (Osteocyte), tế bào xương trưởng thành là những tế bào chính trong mô xương và duy trì quá trình trao đổi chất hàng ngày của nó, chẳng hạn như trao đổi chất dinh dưỡng và chất thải bằng máu. Giống như các nguyên bào xương, tế bào xương không trải qua quá trình phân chia tế bào.

Hủy cốt bào (Osteoclasts) là những tế bào khổng lồ có nguồn gốc từ sự hợp nhất của khoảng 50 tế bào đơn nhân (một loại tế bào bạch cầu) và tập trung ở nội mạc, nằm trên vách xương trong một cấu trúc gọi là ổ Howship (hay hố tái hấp thu), trong bào tương có nhiều ti thể, các bào quan khác kém phát triển. Chúng là tế bào tiêu hủy xương và hủy sụn nhiễm can xi với cường độ cao, đóng vai trò quyết định trong việc tu sửa xương. Các hủy cốt bào có nguồn gốc từ một dòng tế bào đơn nhân (mono bào) đặc biệt trong tủy xương [12-14]



Hình 1. 6. Các loại tế bào trong mô xương [14]

1.1.2. Thành phần hóa học của xương

Xương là một vật liệu tổng hợp bao gồm cả thành phần vô cơ và hữu cơ. Thành phần vô cơ chủ yếu là hydroxyapatite (HA): $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Thành phần hữu cơ của xương bao gồm hơn 30 protein với collagen loại I chiếm nhiều nhất (>90%). Theo trọng lượng, thành phần vô cơ chiếm khoảng 60% trong khi thành phần hữu cơ chiếm khoảng 30%, 10% còn lại là nước. Theo thể tích, thành phần vô cơ, thành phần hữu cơ và nước lần lượt là khoảng 40%, 35% và 25% [15-17].

Thành phần hữu cơ của xương được tạo thành từ khoảng 90% sợi collagen loại I và 10% protein khác, chẳng hạn như glycoprotein, osteocalcin và proteoglycans [10]. Nó tạo thành khung cho xương, được làm cứng lại thông qua sự lắng đọng canxi và các khoáng chất khác xung quanh các sợi [18].

Thành phần vô cơ là muối khoáng được lắng đọng giữa các khoảng trống trong các lớp collagen, sau khi các khoảng trống này được lấp đầy, các khoáng chất sẽ tích tụ xung quanh các sợi collagen, kết tinh và làm cho mô cứng lại; quá trình này được gọi là cốt hóa [19]. Độ cứng của xương phụ thuộc vào loại và số lượng khoáng chất mà cơ thể có thể sử dụng; hydroxyapatite là một trong những khoáng chất chính có trong xương. Mặc dù xương cần đủ khoáng chất để tăng cường sức mạnh nhưng chúng cũng cần tránh bị gãy bằng cách duy trì đủ độ dẻo để chịu được các lực tác động hàng ngày lên chúng.

Tính mềm dẻo và độ cứng của xương có được từ các sợi collagen. Quá trình khoáng hóa quá mức của các sợi hoặc sản xuất collagen bị suy giảm có thể làm tăng độ giòn của xương như với chứng rối loạn di truyền tạo xương không hoàn hảo [20].

Xương khô còn 2/3 là chất vô cơ và 1/3 là chất hữu cơ:

- Chất hữu cơ (33,30%): chủ yếu là chất cốt giao (osseine), gồm các sợi keo và các tế bào xương.
- Chất vô cơ (66,70%): chủ yếu là các chất muối vôi.

Canxi photphat: 51,04%

Canxi cacbonat: 11,30%

Canxi florua: 2.00%

Magie Photphat: 1,16%

Cacbonat và canxi clorua: 1,2% [21]

Các thành phần hóa học cũng thay đổi theo chức phận của mỗi xương, theo tuổi, giới, chế độ dinh dưỡng và bệnh tật. Đặc biệt, một số vitamin A, D, C và một số bệnh nội tiết có thể ảnh hưởng đến kiến trúc và cấu tạo hóa học của xương.

1.1.3. Phân bố ADN trong xương

Thời gian tồn tại của mô xương sau khi cơ thể chết phụ thuộc điều kiện môi trường như chôn trong đất, phơi trực tiếp trong không khí hay ngâm trong nước (mặn hoặc ngọt)... Dưới tác động của các tác nhân, quá trình phân hủy xương diễn ra theo một cơ chế xác định, ví dụ như trong đất thì xương phân hủy do nấm, vi khuẩn trong đất xâm nhập vào các khe hở màng xương và bắt đầu phân hủy ma trận khoáng, chất nền xương sau một vài năm. Trong môi trường nước, vi khuẩn lam có vai trò quyết định, chúng đẩy nhanh sự phân hủy bằng cách tăng độ xốp của xương. Mặc dù cơ chế phân hủy của mô xương đã được nghiên cứu rõ ràng nhưng sự thoái hóa của ADN trong xương theo thời gian, đặc biệt là nguồn gốc và vị trí ADN nằm trong xương lại chưa được làm rõ. Hiện nay còn tồn tại nhiều giả thuyết khác nhau, đôi khi trái ngược nhau. Tuy nhiên, hầu hết các giả thuyết đều thống nhất rằng: ADN trong mô xương mới phần lớn có nguồn gốc từ các tế bào xương, còn với các xương lâu năm ADN có nguồn gốc từ ma trận khoáng. Sự tồn tại ADN lâu dài trong xương là nhờ vào ma trận khoáng và quá trình canxi hóa đóng vai trò quan trọng trong việc “lưu trữ, bảo quản” ADN. Đây cũng là cơ sở khoa học của bước khử khoáng được áp dụng trong hầu hết các phương pháp tách chiết ADN từ xương [22].

Các tác giả Lindahl, 1993 và Okazaki, 2001 cho rằng ADN được hấp thụ trên các HA (hydroxyapatite) trong quá trình hình thành tinh thể của ma trận khoáng xương [23]. Các tác giả này đưa ra giả thuyết rằng trong xương tồn tại loại tinh thể bioapatite tạo thành từ sự hấp thụ của ADN trên bề mặt HA, chính nhờ sự tương tác này mà cấu trúc của ADN có thể được bảo tồn trong thời gian dài. Ở cơ thể sống, sự hình thành bioapatite diễn ra trong quá trình canxi hóa tạo xương hoặc quá trình tiêu sụn tái cấu trúc của xương. Một cơ chế tạo bioapatite khác ở xương sau khi cơ thể bị chết là các thành phần tế bào của mô xương sau khi phân hủy sẽ giải phóng các đoạn ADN có độ dài khác nhau vào các khe hở cực nhỏ của xương, ở đó chúng được trộn lẫn trong dung dịch bão hòa các ion canxi và phosphate, và sau đó được hấp thụ hoặc bị gói gọn trong quá trình kết tinh HA. Hỗ trợ thêm cho giả thuyết này là bằng chứng các trình tự ADN tìm thấy trong xương cổ hoặc xương lâu năm thường có kích thước 60-150 bp xấp xỉ 25-54 nm tương đương với kích thước điển hình của

ting thể HA được tìm thấy trong xương: dày 2-5 nm; rộng 5-24 nm; dài 15-55 nm [24].

Các thí nghiệm của Kitamura năm 1997 và mô hình lý thuyết của Mrevlishvili và Svintradze năm 2005 lại đặt giả thuyết rằng ADN nhân từ các tế bào xương liên kết chủ yếu với các phân tử collagen. Ngoài ra ADN nhân còn hoạt động như một “giàn giáo” trong việc tập hợp các phân tử collagen thành sợi. Lực tương tác giữa collagen và ADN chủ yếu được hình thành bằng các liên kết hydro, mỗi liên kết này rất chặt chẽ [25, 26].

Năm 2006, Orgel và cộng sự cho rằng các mảnh ngắn ADN nhân, ADN ty thể sẽ mắc kẹt lại trong quá trình tổng hợp sợi và canxi hóa collagen, chủ yếu liên kết phân tử tropocollagen, một phần khác hấp phụ lên bề mặt HA và sau đó sẽ “đóng gói” trong tinh thể của ma trận xương [27]. Điều này hoàn toàn có thể xảy ra vì trong quá trình canxi hóa tạo xương hoặc quá trình tiêu sụn, một lượng lớn ADN ty thể, ADN nhân được giải phóng vào chất nền xương sau khi hủy cốt bào hoặc tạo cốt bào bị chết (apoptosis). Những sợi hay đoạn ADN này sau đó có thể liên kết trực tiếp với bề mặt các sợi collagen hoặc hấp phụ lên bề mặt của tinh thể HA (hydroxyapatite) đang trong quá trình hình thành.

Năm 2012, áp dụng các phương pháp phân tích hiện đại, nhóm nghiên cứu của Paula F. Campos và cộng sự đã đưa ra giả thuyết về 4 vị trí ADN có thể tồn tại trong xương cổ, dựa vào sự liên kết của ADN với HA (hydroxyapatite) và collagen [28, 29]:

- a. ADN liên kết với các sợi collagen và sau đó phủ bởi HA hình thành các sợi canxi hóa.
- b. ADN bị ràng buộc chặt chẽ và đóng gói trong quá trình phát triển của tinh thể HA ở khu vực bên trong các sợi collagen trong quá trình canxi hóa.
- c. ADN hấp thụ lên các sợi collagen tự do hình thành trong quá trình mất nước của xương khi canxi hóa (thay thế phân tử nước bằng các sợi khoáng) dưới sự tác động của hóa chất hoặc tấn công của vi sinh vật khi xương thoái hóa.
- d. ADN liên kết hoặc bọc trong tinh thể HA khi xương tái kết tinh hoặc tiêu hủy.

Cơ chế (a) và (b) diễn ra trong cơ thể sống còn (c) và (d) diễn ra sau khi chết. Mô hình lý thuyết này được ủng hộ nhiều hơn cả, đặc biệt khi kết quả của các phương pháp tách chiết ADN từ xương sử dụng cả bước khử khoáng hoàn toàn lẫn phân giải protein bằng proteinase K cho kết quả khả quan nhất.

1.2. XÁC ĐỊNH VÀ PHÂN TÍCH ADN TRONG XƯƠNG NGƯỜI

Năm 1985, Jeffreys và cộng sự phát hiện tính đa hình axit deoxyribonucleic (ADN) là một công cụ mạnh mẽ trong các xét nghiệm nhận dạng, kể từ lần đầu tiên được sử dụng trong điều tra vụ án pháp y [30]. Ông đã tiến hành kiểm tra rất nhiều vùng ADN của bộ gen người cùng một lúc. Kết quả thu được là dạng ADN có rất nhiều băng. Sự phức tạp và đa dạng của nó làm người ta liên tưởng đến 1 dấu ấn điểm chỉ và nó chỉ có thể duy nhất đối với một cá thể (trừ hai anh em sinh đôi cùng trứng). Vì tính phức tạp của các băng ADN, người ta đã quyết định chỉ tiến hành xét nghiệm theo các vùng (locus) di truyền nhất định. Qua đó cung cấp một kết quả chân thực hơn để đánh giá về mặt số lượng và kích thước của các dạng di truyền. Phương pháp này gọi là ADN typing hoặc ADN profiling.

Tính đa hình trong trình tự ADN là cơ sở của nhận dạng cá thể, có các loại đa hình trình tự ADN như sau:

- Đa hình theo trình tự: Các gốc nucleotide trong đoạn ADN được xấp xếp một cách ngẫu nhiên không theo quy luật.
- Đa hình theo chiều dài (STR): Một số gốc nucleotide được lặp đi lặp lại nhiều lần trên chiều dài của đoạn ADN, Ví dụ:

Cá thể thứ nhất: -ATAT ATAT ATAT- → 3 đoạn lặp ATAT

Cá thể thứ hai: -ATAT ATAT ATAT ATAT- → 4 đoạn lặp ATAT

- Đa hình theo chiều dài được cắt bằng enzym giới hạn (RE): Các enzym giới hạn cắt tại các vị trí nhận biết trình tự nucleotide đặc trưng trên đoạn ADN nhất định. Các trình tự này thường bao gồm từ 4 - 8 nucleotide. Điểm đặc biệt của trình tự nhận biết là hoàn toàn giống nhau trên hai sợi bổ sung khi chúng được đọc theo chiều 5' - 3'. Việc cắt của RE tạo ra các đoạn dài ngắn khác nhau và được phân tích thông qua kỹ thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

1.2.1. Nghiên cứu ADN nhân trong xương người

Năm 1991, Hochmeister và cộng sự báo cáo việc sử dụng ADN chiết xuất từ xương đùi của một xác chết ngâm dưới nước 18 tháng và một xác ướp 11 tuổi [31], sử dụng RFLP và Variable Number Tandem Repeat (VNTR) locus được khuếch đại bằng PCR, cũng như HLA DQ A1, các nghiên cứu khác trong tài liệu báo cáo RFLP, STR và bộ kit Amelogenin Typing, trình tự khuếch đại PCR của gen HLA DRB1 và bộ kit PM Amplitype với xương bằng các phương pháp chiết khác nhau [32-40].

Danh tính của gia đình Romanov (Sa hoàng Nicolas II, Sa hoàng Alexandra và 3 người con), bị giết năm 1918 trong cuộc cách mạng Nga, đã được xác nhận bằng cách sử dụng ADN chiết xuất từ các mảnh xương và khuếch đại cho 5 locus STR (HUMTH01, HUMVWA31, HUMF13A1, HUMFES / FPS và HUMACTPB2) và amelogenin. Trong nghiên cứu này, để thiết lập mối quan hệ giữa con cháu theo dòng mẹ, việc phân tích ADN ty thể cũng được thực hiện [35].

Hochmeister và cộng sự (1995) mô tả trường hợp đầu tiên sử dụng bộ dụng cụ thương mại có sẵn - bộ PCR AmpliType PM và bộ GenePrint STR Triplex - xác nhận danh tính của hài cốt người được tìm thấy trong một khu rừng, khoảng 1 năm sau khi được báo cáo mất tích [34].

Năm 1995, Cattaneo và cộng sự sử dụng đốt sống lưng và xương đùi tươi trong 2 trường hợp sau khi chết 3 và 9 tháng, mô tả phương pháp kết tủa sodium acetate bão hòa để loại bỏ vật liệu không phải ADN và khuếch đại PCR dương tính của HLA-DRB1 [38].

Năm 1997, Cattaneo và cộng sự đã phân tích 32 bộ xương bằng cách sử dụng natri axetat, hạt từ tính, phương pháp chiết xuất glass-milk và khuếch đại PCR cho HLA DPB1 (327 pb), amelogenin (106/112 pb) và locus ADN ty thể. Các mẫu xương được phân tích là từ 6 đầu xương đùi từ phẫu thuật, 4 đầu xương đùi được khám nghiệm tử thi từ 3 đến 6 năm và 22 mẫu thân đốt sống từ 3 đến 43 năm sau khi chết. Sự khuếch đại tốt nhất là của ADN ty thể, tiếp theo là HLA DPB1 khuếch đại ở cùng tần số của locus amelogenin; và khuếch đại có thể xảy ra ở 11 trong tổng số 32 bộ xương [37].

Năm 1997, Evison và cộng sự đã phân tích các mẫu xương người từ năm 1986 đến năm 1994 trong các trường hợp pháp y hoặc vật liệu khai quật được chôn cất từ năm 1904 đến năm 1984, cũng như từ răng người và vết máu từ 3 tháng đến 91 năm tuổi [36]. Việc trích xuất ADN của các mẫu đó được thực hiện bằng phương pháp silica. Sau đó, quá trình khuếch đại và phân tích trình tự amelogenin, gen HLA-DPB1 và ADN ty thể đã được thực hiện. Không có mối tương quan giữa độ tuổi của mẫu vật và mức độ bảo quản ADN.

Năm 1998, Yamamoto và cộng sự đã mô tả trong báo cáo trường hợp hài cốt của một em bé 1 tuổi rưỡi được tìm thấy trong một căn hộ 16 năm sau khi em qua đời [32]. ADN xương được chiết xuất bằng phenol/chloroform và được phân tích thành công 3 locus thuộc vùng HLA lớp II (HLA-DQA1, -DPB1, và -DRB1), 5 locus bằng bộ AmpliType PM (LDLR, GYPA, HBG, D7S8 và GC), 5 locus STR (LPL, vWA, F13B, TH01 và TPOX) và vùng điều khiển trong ADN ty thể.

Việc sử dụng xương và hài cốt người làm nguồn phát hiện tính đa hình ADN là một tiến bộ tương đối gần đây trong nhận dạng pháp y. Một vấn đề chung với loại phân tích này là việc bảo quản ADN. Chúng ta biết rằng ngoài sự phân hủy bởi vi khuẩn và các vi sinh vật khác, việc tiếp xúc đồng thời với các tác nhân môi trường còn dẫn đến sự suy thoái ADN trong các mô sau khi chết.

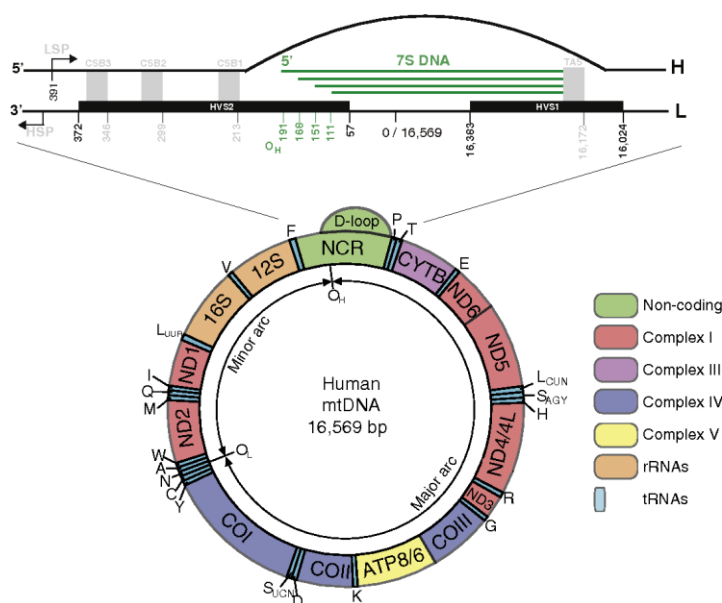
1.2.2. Nghiên cứu ADN ty thể trong xương người

Mặc dù ADN nhân được tập trung rộng rãi cho mẫu người sống, nhưng ADN ty thể lại được chọn để phân tích xương lâu năm. Lý do là vì:

- ADN ty thể hữu ích vì nó có mặt với số lượng bản sao cao trong tế bào.
- Nó có nhiều khả năng tồn tại trong thời gian dài hơn so với ADN nhân.
- Do di truyền theo dòng mẹ duy nhất của nó, ADN ty thể cũng rất hữu ích trong các trường hợp xác định pháp y và để xác định các mối quan hệ họ ngoại khi tồn tại khoảng cách vài thế hệ giữa tổ tiên và con cháu.

ADN ty thể rất đa dạng trong các quần thể tự nhiên vì tỷ lệ đột biến cao (hình 1.7). Sigurđardóttir đã ước tính tỷ lệ đột biến trong vùng điều khiển của ADN ty thể ở người là $0,32 \times 10^{-6}$ / vị trí / năm [41] so với tỷ lệ đột biến $0,5 \times 10^{-9}$ / vị trí / năm trong hệ gen nhân [42]. Hầu hết sự biến đổi trình tự giữa các

cá nhân được tìm thấy trong vùng siêu biến 1 (HVI, vị trí 16024 đến 16365) và trong vùng siêu biến 2 (HVII, vị trí 73 đến 340) thuộc vùng điều khiển [43]. Những sai khác trong trình tự nucleotide thuộc hai vùng này từ lâu đã được coi như chỉ thị sinh học đặc trưng cho từng cá nhân. Vùng siêu biến thứ ba (HVIII, vị trí 438 đến 574), với các vị trí đa hình bổ sung có thể hữu ích trong trường hợp trình tự HVI và HVII các mẫu giống nhau.



Hình 1. 7. Cấu trúc ADN ty thể [44]

Các nghiên cứu về xương người thông qua ADN ty thể có thể giúp xác định hài cốt xương người, cũng như làm rõ các sự kiện lịch sử trong quá khứ.

ADN ty thể được chiết xuất từ xương người (xương đùi người lấy từ một nghĩa trang, khoảng 750 năm tuổi, xương chày mới lấy từ một bộ xương được chôn ở Argentina khoảng 13 năm, một xương mác ở Polynesia có niên đại trước năm 1778) cũng như xương động vật (xương lợn từ năm 1545) và được khuếch đại bằng PCR chứng minh rằng lượng thông tin di truyền đáng kể có thể tồn tại trong thời gian dài [45]. Tất cả các mẫu được thu thập từ các cuộc khai quật và lưu trữ trong hộp trong nhiều năm.

ADN ty thể và gen tương đồng X-Y amelogenin đã được phân tích để xác định danh tính gia đình của Hoàng tử Branciforte Barresi, 2 người con của ông, anh trai ông và một thành viên vị thành niên khác trong gia đình, sống từ thế kỷ 16 đến thế kỷ 17 (có báo cáo cho rằng hài cốt được tìm thấy ở Sicily có niên đại từ năm 1622) [46]. Các phân tích di truyền phân tử phù hợp với kỳ

vọng lịch sử, mặc dù chúng không trực tiếp chứng minh rằng đây thực tế là hài cốt của Hoàng tử và những người thân của ông, do không thể lấy được ADN từ những người họ hàng bên ngoài còn sống của Hoàng tử. Tất cả các xương được bảo quản tốt ở bên ngoài và các cấu trúc vi mô.

Ở Argentina, người ta đã tìm thấy khoảng 340 bộ xương (những người bị giết từ năm 1976 đến năm 1983 trong thời kỳ độc tài quân sự). Một số lượng rất nhỏ những cá nhân này được xác định bằng các phương pháp pháp y truyền thống và chỉ có 1 họ được xác định bằng phân tích ADN ty thể. Các phương pháp ADN typing, STR nhiễm sắc thể Y và nhiễm sắc thể thường sử dụng các đoạn mồi lồng nhau, đã được sử dụng nhằm nỗ lực xác định nhiều cá thể hơn [47].

1.2.3. Nguyên lý tách chiết ADN trong xương người

Các phương pháp tách chiết ADN từ mẫu hài cốt được áp dụng tại các phòng thí nghiệm pháp y trên thế giới hiện nay rất đa dạng. Việc lựa chọn phương pháp tùy thuộc vào điều kiện cũng như kinh nghiệm của phòng thí nghiệm đó. Cách chọn mẫu vật để tiến hành tách chiết ADN phụ thuộc vào tình trạng mẫu, hơn nữa việc lựa chọn răng hay xương để tiến hành giám định cũng là một vấn đề mà các phòng thí nghiệm cần phải cân nhắc [48]. Rất nhiều phương pháp tách chiết ADN đã được nghiên cứu và phát triển để phù hợp với từng loại mẫu với những đặc tính khác nhau. Các phương pháp có thể kể đến như: phương pháp hữu cơ (phenol–chloroform) [49]; phương pháp khử khoáng toàn phần [50]; phương pháp tách chiết sử dụng hạt từ [51]...

Việc tách ADN từ xương người bao gồm một số bước để phân lập và tách chiết ADN từ mô xương. Dưới đây là tổng quan về quy trình trích xuất ADN điển hình từ xương người:

Chuẩn bị mẫu: Mẫu xương được làm sạch để loại bỏ bất kỳ chất gây ô nhiễm hoặc mảnh vụn bề mặt nào. Tùy thuộc vào nguồn gốc và tình trạng của xương, chúng có thể được làm sạch bằng máy, rửa bằng chất tẩy rửa hoặc xử lý bằng thuốc tẩy hoặc chất khử trùng khác để loại bỏ các chất gây ô nhiễm ADN bên ngoài.

Nghiền mẫu: Mẫu xương sau đó được nghiền thành bột bằng phương pháp cơ học hoặc hóa học thành bột mịn để tăng diện tích bề mặt cho quá trình

tách ADN. Điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng cối và chày, máy nghiền bi hoặc thiết bị chuyên dụng được thiết kế để nghiền xương thành bột.

Khử canxi (Tùy chọn): Nếu mô xương bị vôi hóa nặng, có thể cần phải khử canxi mẫu để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách ADN. Quá trình khử khoáng bao gồm việc xử lý bột xương bằng chất khử khoáng, chẳng hạn như EDTA (axit ethylenediaminetetraacetic), chất này hòa tan muối canxi mà không ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của ADN.

Phân giải: Bột xương được khử canxi sau đó được phân giải bằng enzyme để phá vỡ ma trận hữu cơ và giải phóng ADN bị mắc kẹt trong ma trận xương. Các enzyme phân giải thường được sử dụng bao gồm proteinase K, phân giải protein và SDS (natri dodecyl sulfate), phá vỡ màng tế bào.

Ly giải: Bột xương đã phân giải được trộn với dung dịch đệm ly giải có chứa chất tẩy rửa và chất chaotropic để phá vỡ màng tế bào và màng nhân, giải phóng ADN vào dung dịch. Dung dịch đệm ly giải giúp hòa tan ADN và bảo vệ nó khỏi sự phân hủy bởi các nuclease.

Tinh chế: Dịch ly giải chứa ADN sau đó được tinh chế để loại bỏ các chất gây ô nhiễm như protein, lipid và các mảnh vụn tế bào khác. Điều này thường đạt được bằng cách sử dụng kết hợp phương pháp chiết hữu cơ, phương pháp tách chiết hạt từ và phương pháp kết tủa bằng cồn... sau đó là ly tâm để tách ADN [38, 51-53].

Rửa và tái huyền phù: dịch ADN tinh chế được rửa bằng etanol hoặc các dung môi khác để loại bỏ các chất ô nhiễm và muối còn sót lại. Sau đó, ADN được cho vào trong dung dịch đệm thích hợp, chẳng hạn như dung dịch đệm TE (Tris-EDTA), để ổn định ADN và chuẩn bị cho phân tích tiếp theo.

Đánh giá định lượng và chất lượng: ADN chiết xuất được định lượng bằng phương pháp đo quang phổ hoặc đo huỳnh quang để xác định nồng độ và độ tinh khiết của nó. Ngoài ra, tính toàn vẹn của ADN được đánh giá bằng các kỹ thuật như điện di trên gel agarose hoặc điện di mao mạch...

Bảo quản: ADN chiết xuất có thể được bảo quản ở -20°C hoặc -80°C để bảo quản lâu dài cho đến khi thực hiện phân tích sâu hơn.

Nhìn chung, việc trích xuất ADN từ xương người bao gồm một loạt các bước để phân lập và tinh chế ADN từ mô xương, cho phép phân tích vật liệu di

truyền sau đó cho các ứng dụng khác nhau trong nghiên cứu pháp y, khảo cổ học và nhân chủng học.

1.2.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến cấu trúc và sự tồn tại của ADN hài cốt

ADN trong các mẫu hài cốt có thể bị biến đổi do tác động của các yếu tố môi trường không thuận lợi như tia UV, nhiệt độ, độ ẩm cao. Cấu trúc phân tử ADN cũng bị ảnh hưởng tiêu cực từ các quá trình oxy hóa, thủy phân...

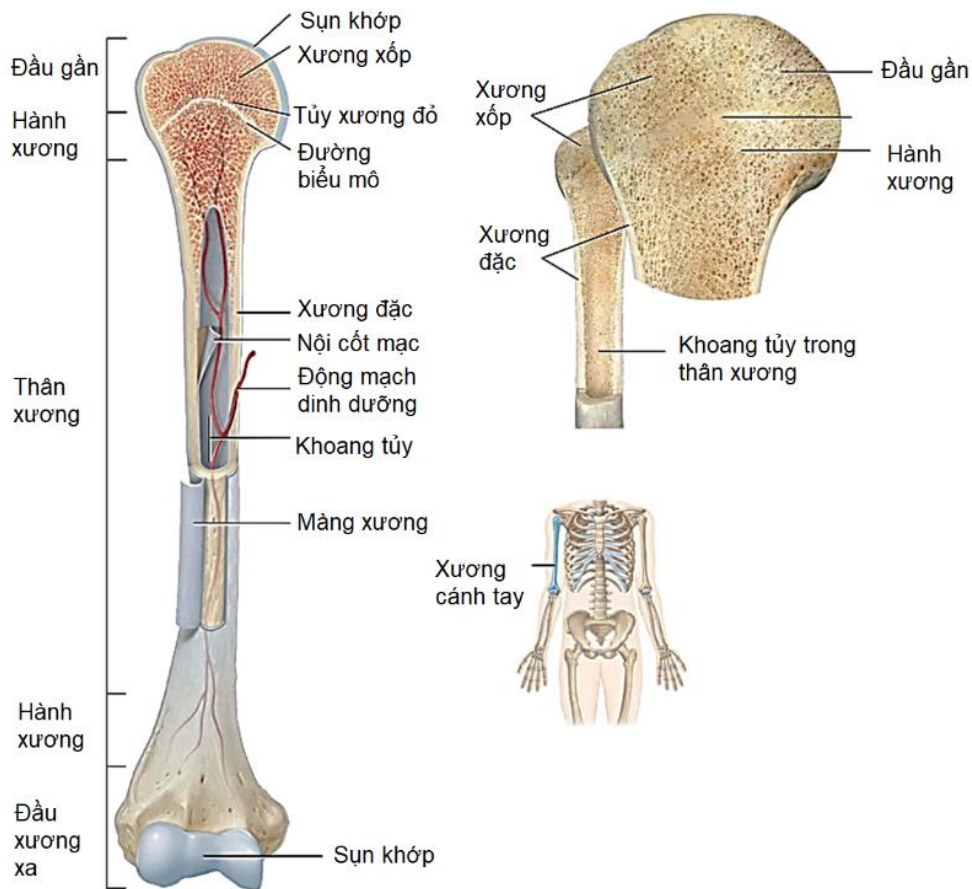
Mức độ phân huỷ sinh học phụ thuộc chủ yếu vào hai yếu tố: thời gian và điều kiện môi trường [54]. Tác động khác từ bên ngoài như: nhiệt độ cao, (đôi khi là cháy), ngâm trong nước, chôn trong đất và vi sinh vật phát triển là những yếu tố làm gia tăng sự phân huỷ của hài cốt và sự đứt gãy của chuỗi ADN [55, 56]. Sự gia tăng nhiệt độ và độ ẩm dẫn đến một sự tăng trưởng về số lượng vi sinh vật và tăng cường hoạt động của enzyme DNase. Suy thoái ADN bởi sự kết hợp của các yếu tố môi trường chứ không phải bất kỳ sự tác động đơn lẻ của từng yếu tố [57].

Cơ chế biến đổi cấu trúc và tổn thương phân tử ADN là do cơ chế nội sinh của tế bào và do các yếu tố ngoại cảnh tác động [58]. Nhưng dù là cơ chế nào, sự phá hủy cấu trúc ADN cũng ảnh hưởng lớn đến quá trình nhân bội ADN (PCR), do đó làm giảm khả năng thành công của phân tích dữ liệu ADN cá thể, có khi sự biến đổi này làm cho xét nghiệm không thể thực hiện được hoặc đạt kết quả không như mong muốn [59]. Trong số những cơ chế đó thì quá trình oxy hóa, thủy phân là phổ biến nhất trong các mẫu hài cốt được chôn trong môi trường đất [60]. Phản ứng thủy phân tác động đến liên kết dễ bị tổn thương nhất của ADN là liên kết N-glycosyl [61]. Kết quả thủy phân liên kết này sẽ làm mất một base để lại một vị trí apurinic/aprimidinic (AP) mà cuối cùng sẽ tạo thành điểm đứt trên một sợi của phân tử ADN sợi đôi.

Tác động của enzyme của vi khuẩn: Vi sinh vật và hệ động vật, thực vật (bao gồm nấm, nấm mốc và tảo) là chất gây nhiễm phổ biến của hài cốt ở hiện trường vụ án, thảm họa hàng loạt và các xương chôn trong đất [62]. Số lượng vi sinh vật gia tăng sẽ là một nguyên nhân đáng kể gây tổn thương ADN và cạnh tranh ADN đích dẫn đến việc không thể giám định ADN của các mẫu hài cốt.

Cơ chế gây ra sự suy thoái ADN có thể khác nhau nhưng kết quả cuối cùng vẫn là chuỗi ADN xoắn kép bị phân cắt thành trình tự ngắn. Khi chiều dài đoạn ADN trung bình giảm xuống dưới 300 bp [63], một lượng thông tin ADN đáng kể bị mất do không có trình tự đích để nhân bội. Tế bào chết ở hai dạng: chết theo chương trình (apoptosis) hoặc hoại tử. Dù cơ chế chết tế bào là như thế nào thì ADN đều bị chia thành các mảnh nhỏ do enzym nội sinh gây ra làm cho mẫu phân hủy mạnh và rất khó để tiến hành các phân tích.

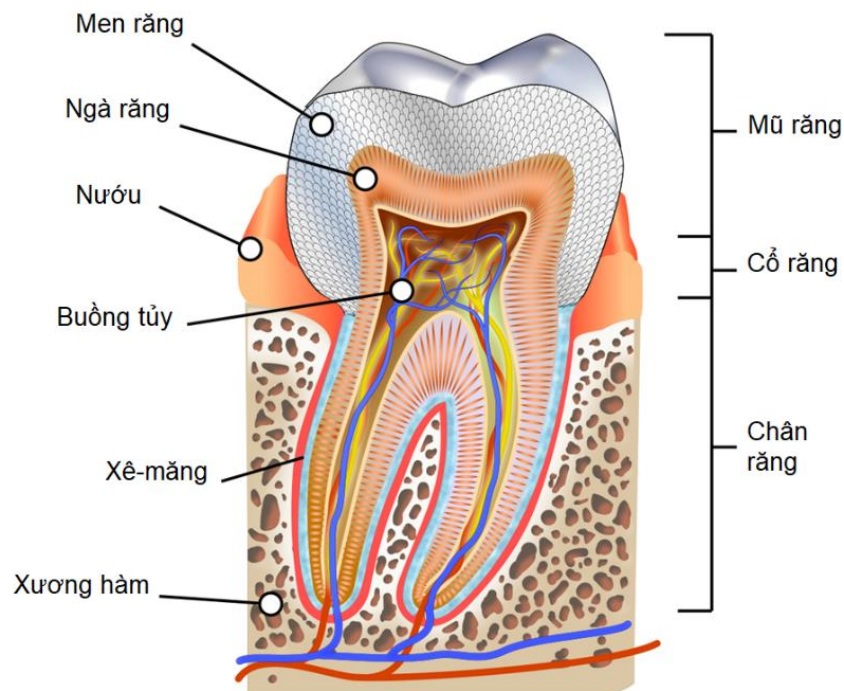
Màng xương là lớp màng bảo vệ bên ngoài cùng của xương, khi màng xương bị phá hủy thì các yếu tố trên gây tác động đến ADN trong xương. Chính vì vậy đánh giá sự thay đổi màng xương sẽ là yếu tố được quan tâm trong giám định ADN mẫu hài cốt. Phong hóa được định nghĩa là quá trình trong đó các thành phần vô cơ và hữu cơ cực nhỏ ban đầu của xương bị tách ra khỏi nhau và bị phá hủy bởi các tác nhân vật lý và hóa học hoạt động trên xương tại chỗ, trên bề mặt hoặc trong vùng đất. Thiệt hại vật chất do động vật ăn thịt nhai, giẫm đạp, vận chuyển dòng chảy và những thay đổi địa hóa diễn ra trong quá trình hóa thạch được loại trừ khỏi việc xem xét đánh giá phong hóa [64].



Hình 1. 8. Cấu tạo xương dài [14]

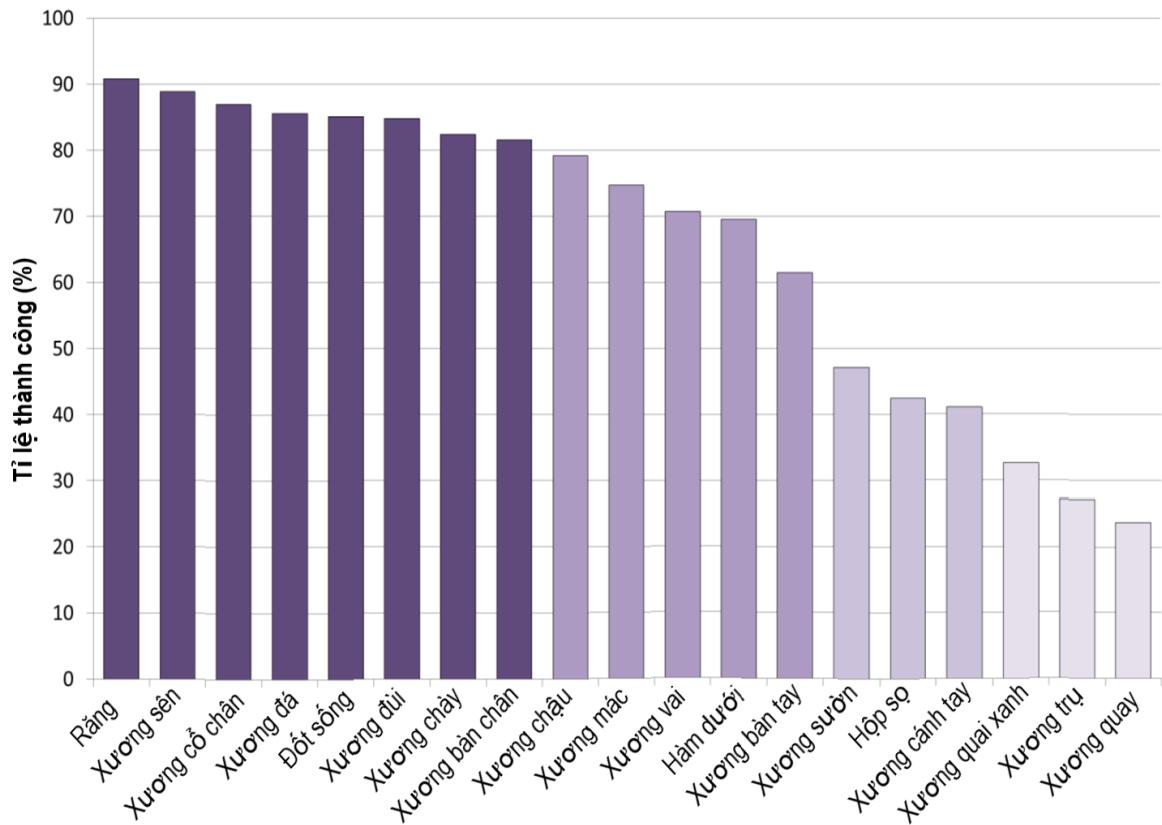
Trong giám định ADN mẫu hài cốt, vị trí lấy mẫu giám định cũng rất quan trọng. Hai đầu của xương dài là các xương xốp do nhiều bè xương bất chéo nhau chằng chịt, để hở những hốc nhỏ trông như bọt biển. Ở thân xương dài lớp xương đặc ở ngoài làm thành một ống xương dày ở giữa, và mỏng dần ở 2 đầu; lớp xương xốp ở trong, ngược lại, mỏng ở giữa và dày dần lên ở 2 đầu (hình 1.8). Trong thời gian dài ở ngoài môi trường, xương bị tác động bởi rất nhiều yếu tố dẫn đến xương xốp bị phân hủy mạnh hơn so với xương đặc. Chính vì vậy ADN ở vị trí thân xương được bảo tồn tốt hơn so với ở vị trí hai đầu xương dài.

Ở răng người trưởng thành, ngà răng, mô mềm trong buồng tủy và các thành phần có nhân của máu là nguồn ADN phong phú (hình 1.9). Còn men răng cấu tạo chủ yếu từ khoáng chất (96%), phần còn lại là nước và chất hữu cơ nên không được sử dụng trong giám định ADN. Kinh nghiệm cho thấy ADN từ các mô cứng như xương và răng ổn định nhất ngay cả sau khi cơ thể bị thối rữa [65]. Ở mẫu hài cốt lâu năm, dưới tác động của nhiều yếu tố trong thời gian dài, mô mềm trong buồng tủy đã bị phân hủy. Các yếu tố ngoại lai xâm nhập vào trong răng thông qua lỗ máu ở chân răng, dẫn tới răng có xu hướng chân răng sẽ bị phân hủy trước sau đó tới thân ngà răng.



Hình 1. 9. Cấu tạo răng người [66]

Tỉ lệ tách chiết thành công ở mỗi loại xương trong cùng điều kiện có sự khác biệt được ủy ban quốc tế về người mất tích (ICMP) đưa ra trong quy trình hoạt động tiêu chuẩn để lấy mẫu mẫu xương, răng từ hài cốt người để xét nghiệm ADN tại ICMP năm 2015 (hình 1.10) [67].






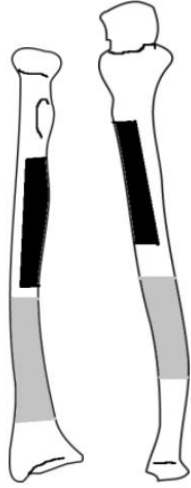


Hình 1. 10. Tỉ lệ tách chiết ADN thành công từ các loại mẫu hài cốt[67]

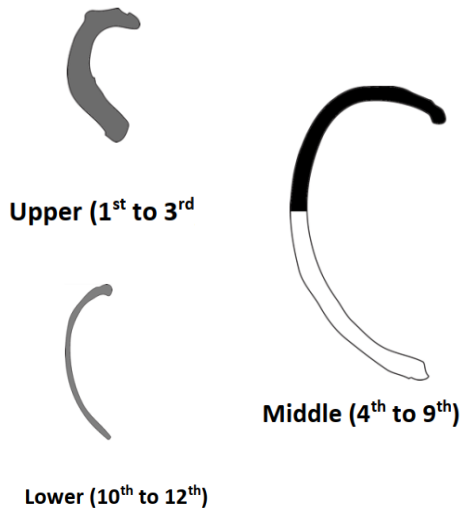
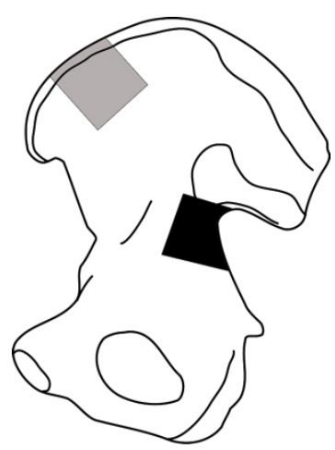
1.3. MỨC ĐỘ ƯU TIÊN CỦA MẪU GIÁM ĐỊNH DỰA THEO VỊ TRÍ LẤY MẪU

Vị trí lấy mẫu trên xương và việc lựa chọn các răng cụ thể dựa trên nhiều yếu tố khác nhau (bảng 1.1).

Bảng 1. 1. Vị trí lấy mẫu thường được sử dụng để giám định ADN [67]

<p style="text-align: center;">Răng:</p> <p>Mức độ ưu tiên:</p> <p>(1) Răng hàm số 6 và răng số 7</p> <p>(2) Răng số 4, răng số 5 và răng số 8</p> <p>(3) Răng số 3, răng số 2, răng số 1</p>	
<p style="text-align: center;">Xương đùi</p> <p>Mức độ ưu tiên:</p> <p>(1) Phần mẫu gần đầu trên (màu đen);</p> <p>(2) Phần mẫu gần đầu dưới (màu xám).</p>	
<p style="text-align: center;">Xương chày</p> <p>Mức độ ưu tiên:</p> <p>(1) phần mẫu gần đầu trên (màu đen)</p> <p>(2) phần mẫu gần đầu dưới (màu xám).</p>	

<p><i>Xương trụ và xương quay</i></p> <p>Ưu tiên đầu tiên là một phần xương được lấy ở phần phía trên (màu đen).</p> <p>Ưu tiên thứ hai là một phần xương được lấy ở phần phía dưới (màu xám)</p>	
<p><i>Xương cánh tay</i></p> <p>Mức độ ưu tiên:</p> <p>(1) phần xương cách rãnh trochlea khoảng 2cm (màu đen);</p> <p>(2) phần xương ở trục giữa hoặc gần trục giữa (màu xám).</p>	
<p><i>Xương mác</i></p> <p>Mức độ ưu tiên: phần mẫu gần đầu dưới (màu đen).</p>	

<p><i>Xương sườn</i></p> <p>Ưu tiên nửa đốt sống (màu đen) của một xương sườn giữa.</p> <p>Gân trên hoặc sườn dưới hoàn chỉnh hoặc gần như hoàn chỉnh (màu xám) là ưu tiên thứ hai để chọn mẫu sườn</p>	 <p>Upper (1st to 3rd)</p> <p>Middle (4th to 9th)</p> <p>Lower (10th to 12th)</p>
<p><i>Xương chậu</i></p> <p>Ưu tiên hàng đầu là phần hình chữ nhật được cắt từ vùng khía lớn hơn (màu đen). Đảm bảo ghi lại các giá trị xác định giới tính của vết khía trước khi lấy mẫu.</p> <p>Ưu tiên thứ hai là phần hình chữ nhật từ đỉnh chậu gần khu vực phía trước (màu xám)</p>	

Mỗi yếu tố xương đều có khuyến nghị cụ thể và được xem xét riêng lẻ (bảng 1.2). Tránh lấy mẫu ở những khu vực có xương bị đổi màu vì điều này có thể cho thấy nồng độ của một số kim loại nhất định trong đất tăng lên hoặc độ ẩm cao trong môi trường mộ có thể dẫn đến sự thoái hóa DNA của xương. Tránh các khu vực lấy mẫu nhất định thể hiện các đặc điểm cá nhân có thể được sử dụng cho mục đích nhận dạng, ví dụ như góc dưới của hàm dưới hoặc răng có thể phát hiện theo nha khoa. Tránh lấy mẫu các khu vực cho thấy chấn thương, chẳng hạn như dọc theo các cạnh gãy xương.

Bảng 1. 2. Danh sách các yếu tố răng và xương với hệ thống xếp hạng và mã hóa ưu tiên [67]

Lưu ý rằng mỗi khu vực của bộ xương có các vị trí mẫu với nhiều điểm ưu tiên theo thứ tự ưu tiên lấy mẫu nhiều nhất đến ít nhất là: ưu tiên 1 (nhiều nhất), ưu tiên 2, ưu tiên 3, ưu tiên 4, ưu tiên 5, ưu tiên 6 (ít nhất).

Vùng	Yếu tố xương / răng	Ưu tiên	Vùng	Yếu tố xương / răng	Ưu tiên
ĐẦU	Răng hàm dưới	1	CÁNH TAY	Xương cánh tay	4
	Răng hàm trên	1		Xương quay	5
	Xương thái dương/xương đá	1		Xương trụ	5
	Hàm dưới	2	TAY	Xương bàn tay	3
	Châm	3		Xương cổ tay	4
	Xương đỉnh	4		Xương ngón tay	4
	Hộp sọ-Vòm sọ	4	CHÂN	Xương đùi	1
	Xương sọ mặt	6		Xương chày	1
THÂN	Khung chậu	1		Xương mác	2
	Đốt sống cổ	2		Xương bánh chèo	3
	Đốt sống ngực	2	BÀN CHÂN	Xương bàn chân	1
	Đốt sống thắt lưng	2		Xương mắt cá	1
	Xương bả vai	3		Xương cổ chân	3
	Xương sườn	4		Xương gót chân	3
	Xương đòn	5		Xương ngón chân	4
	Xương cùng	6			
	Xương ức	6			

1.4. ĐÁNH GIÁ HÌNH THÁI MẪU THEO GIAI ĐOẠN PHONG HÓA

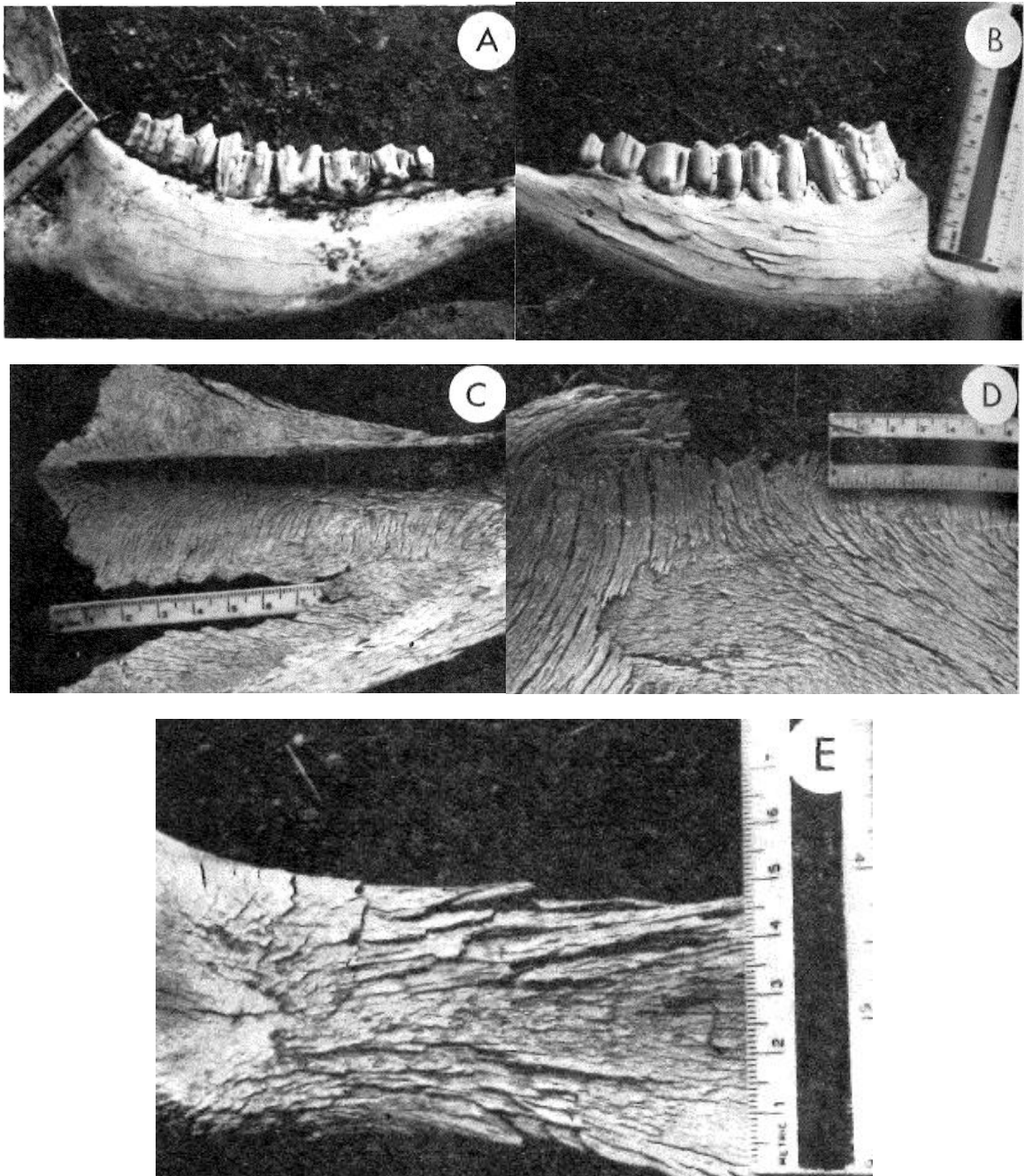
Ở ngoài cùng, bọc lớp xương đặc là màng ngoài hay ngoại cốt mạc (periosteum) là một màng liên kết mỏng dưới 2mm, chắc, dính chặt vào xương giúp bảo vệ xương khỏi các tổn thương bên ngoài (Hình 1.8). Đồng thời, hỗ trợ bảo vệ các cơ quan và mô mềm xung quanh xương thông qua việc hấp thụ và phân tán các lực tác động. Ngoài ra, trong màng xương có chứa protein collagen, tạo thành một chiếc khung mềm bảo vệ các tác nhân lạ xâm nhập vào trong xương. Vì vậy, đánh giá màng ngoài của xương là tiêu chí đầu tiên để đánh giá mức độ phân hủy của mẫu xương hài cốt.

Nghiên cứu về quá trình phong hóa xương phát triển từ một chương trình lấy mẫu xương rộng hơn được khởi xướng vào năm 1975. Kết quả của nghiên cứu tổng thể về tập hợp xương ở lưu vực Amboseli được báo cáo ở nơi khác [68]. Việc lấy mẫu tập hợp xương ở lưu vực trung tâm Amboseli nằm ở rìa phía bắc của núi Kilimanjaro ở miền nam Kenya được thực hiện bằng cách sử dụng các mặt cắt tuyến tính bao phủ các phần của sáu môi trường sống chính. Những môi trường sống này bao gồm đầm lầy, rừng rậm, đất rừng thưa, đồng bằng, bụi rậm và lòng hồ. Lòng hồ hầu như khô quanh năm, thỉnh thoảng bị ngập từ 1 đến 2 tháng sau những đợt mưa lớn. Các giai đoạn phong hóa được xác định bằng các tiêu chí dễ quan sát đã được thiết lập sớm trong chương trình lấy mẫu và được sử dụng trong suốt nghiên cứu. Xương và hình ảnh tham khảo được sử dụng làm tiêu chuẩn so sánh.

Hệ thống phân loại hình thái mẫu hài cốt từ Behrensmeyer [64] sử dụng thang đo từ 0 đến 5 chi tiết như:

- Giai đoạn 0: Bề mặt xương không có dấu hiệu nứt hoặc bong tróc do lão hóa (phong hóa).
- Giai đoạn 1: Xương có một số vết nứt, thường là theo chiều dọc trong xương dài. (hình 1.11A)
- Giai đoạn 2: Một số vết nứt và bong tróc rõ ràng, đặc biệt là ở các lớp mỏng đồng tâm ngoài cùng của xương. (hình 1.11B)
- Giai đoạn 3: Bề mặt xương có các mảng thô ráp của xương nhỏ gọn bị phong hóa; các lớp đồng tâm bên ngoài đã được loại bỏ, nhưng phong hóa không xâm nhập sâu hơn 1,0–1,5 mm. (hình 1.11C)

- Giai đoạn 4: Bề mặt xương thô và mảnh vụn có thể tồn tại; phong hóa vươn vào các khoang bên trong. (hình 1.11D)
- Giai đoạn 5: Xương có mảnh vụn lớn và dễ bị gãy; hình dạng xương ban đầu có thể không xác định được (hình 1.11E)



Hình 1. 11. Các giai đoạn phong hóa của mẫu hài cốt [64]

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Tổng số 120 mẫu hài cốt liệt sĩ còn thiếu thông tin thu được tại nghĩa trang liệt sĩ Quốc tế Việt Lào, thị trấn Anh Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An – thời gian mất 1965-1975 được sử dụng trong nghiên cứu này. Các mẫu được thu thập theo quy trình thao tác tiêu chuẩn lấy mẫu xương và mẫu răng từ hài cốt người để xét nghiệm ADN tại ICMP (2015). Mẫu hài cốt được bảo quản tại trung tâm giám định ADN và được sử dụng để làm thí nghiệm.

2.1.2. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Hóa chất:

Ethanol 96°, ethanol 70°, javen... Các hoá chất sử dụng trong nghiên cứu là các hoá chất phục vụ cho công đoạn xử lý xương, răng ban đầu, ủ khoáng. ADN mẫu nghiên cứu được tách chiết bằng bộ kit EZ1&2 DNA Investigator Kit. Quantifiler Trio DNA Quantification Kit được sử dụng để định lượng ADN nhân có trong mẫu hài cốt thông qua ba đối tượng mục tiêu khác nhau. Định lượng ADN ty thể sử dụng: GoTaq® Probe qPCR Master Mix và The GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System.

Đồ bảo hộ: Găng tay cao su y tế, khẩu trang, kính an toàn, bọc giày, bọc cổ tay, quần áo thí nghiệm...

Thiết bị: Box chuyên dụng, nồi hấp khử trùng, cân phân tích, tủ sấy, máy lắc, ống fancel, máy PCR Eppendorf, bể điện di, máy chụp ảnh bản gel, máy ảnh, máy nghiền mẫu TissueLyser II (Qiagen), máy EZ1 Advanced XL (Qiagen, Hilden, Đức), máy 7500 Real-time PCR (Applied Biosystems), QuantStudio 6 pro Real-Time PCR (Applied Biosystems).

Bảng 2. 1. Danh sách hoá chất chủ yếu trong thí nghiệm

STT	Tên	Hãng sản xuất
1	EZ1 DNA Investigator Kit	Qiagen
2	EDTA (0,5M, pH 8,0)	Invitrogen
3	Distilled water (DW)	Invitrogen
4	NaOAc (3M, pH 5,2)	Thermo Scientific
5	Quantifiler Trio DNA Quantification Kit	Applied Biosystems
6	GoTaq® Probe qPCR Master Mix	Promega
7	Proteinase K	Qiagen
8	The GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System	Promega

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp thu mẫu hài cốt liệt sĩ Việt Nam

Để đảm bảo tách chiết ADN tối ưu, việc lựa chọn mẫu ban đầu là rất quan trọng. Tuy nhiên khi lấy mẫu thực tế ở các nghĩa trang liệt sĩ ở Việt Nam, mẫu hài cốt thường có xu hướng bị phá hủy mạnh do nhiều yếu tố tác động đến. Do đó, thứ tự ưu tiên đã được điều chỉnh dựa theo quy trình thao tác tiêu chuẩn lấy mẫu xương và răng từ hài cốt người để xét nghiệm ADN tại ICMP (2015) [67] và điều kiện thực tế như sau:

1. Răng
2. Xương đùi, xương chày, xương cánh tay
3. Xương quay, xương trụ, xương mác,
4. Xương sườn, xương sọ,
5. Xương chậu, đốt sống...

Số lượng mẫu lấy:

1. Đối với mẫu răng lấy từ 4-6 chiếc răng hàm.
2. Đối với mẫu xương lấy 1 đoạn khoảng 5 cm.

2.2.2. Phương pháp đánh giá hình thái mẫu hài cốt

Mẫu nghiên cứu được đánh giá phân loại dựa vào hệ thống phân loại hình thái mẫu hài cốt từ Behrensmeyer sử dụng thang đo từ 0 đến 5 [64]. Mẫu được xem xét có hay không có vết nứt. Sau đó, đánh giá sự bong tróc của màng ngoài và lá xương, ta sử dụng thước kẹp pháp y đo độ sâu của lớp xương bị mất đi từ màng ngoài vào thân xương. Trong quá trình đánh giá, mẫu xương dễ gãy, không xác định được hình dạng cũng được để ý tới và ghi lại. Phần mềm excel được sử dụng cho việc thống kê các giai đoạn phong hóa của mẫu.

2.2.3. Phương pháp tách chiết ADN các mẫu hài cốt nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu được xử lý mẫu ban đầu theo qui trình chuẩn do Trung tâm Giám định ADN phát triển và tách chiết theo qui trình của bộ kit EZ1&2 DNA Investigator Kit

2.2.3.1. Chuẩn bị mẫu và xử lý mẫu ban đầu

Khử trùng khu vực làm việc bằng javen 10%, lau sạch bằng nước và sử dụng giấy thấm cồn 70% để làm khô. Bật đèn tím UV 30 phút trước khi làm việc. Kiểm tra và đối chiếu tên mẫu trong danh sách với các mẫu được nhận. Sau đó, mẫu được cắt bằng máy với kích thước theo yêu cầu trong danh sách. Cho mẫu vào ống 50 ml, dán tên mẫu và chuyển sang bước tiếp. Mẫu còn lại cần được làm khô, đóng gói và bàn giao cho người lưu mẫu.

Mẫu sau khi cắt được thêm 10 ml javen 10% vào mỗi mẫu, lắc đều bằng tay trong 30 giây và đổ dịch (lặp lại 2 lần). Sau đó, mẫu được thêm 20 ml nước khử ion, lắc đều bằng tay trong 60 giây và đổ dịch (lặp lại 2 lần). Tiếp theo, bổ sung 20 ml ethanol 96% vào mỗi mẫu, lắc đều trong 60 giây và đổ hết dịch. Phơi khô mẫu trong tủ sấy với nhiệt độ 56° trong 5 tiếng. Nghiền mẫu bằng máy nghiền TissueLyser II (Qiagen) với tần số 30 lần/giây trong 30 giây. Mẫu sau khi nghiền được chuyển sang ống 2 ml với khối lượng 200 - 500 mg bột xương.

2.2.3.2. Quy trình tách chiết ADN

Khử trùng khu vực làm việc bằng javen 10%, lau sạch bằng nước và sử dụng giấy thấm cồn 70% để làm khô. Bật đèn tím UV 30 phút trước khi làm việc.

Kiểm tra và đối chiếu tên mẫu trong danh sách với các mẫu được nhận. Mẫu được bổ sung 1,5 ml EDTA 0,5M pH 8, bọc parafilm, lắc kỹ bằng máy đến khi dung dịch mẫu đều nhau, treo mẫu lên máy Rotating mixer ở nhiệt độ 4°C qua đêm (khoảng 16-24 giờ). Sau đó, mẫu được li tâm mẫu với tốc độ 6000 vòng/phút trong 4 phút, loại bỏ dịch nổi. Bổ sung 550 µl G2 lysis buffer, 50 µl proteinase K vào mỗi mẫu, bọc parafilm, lắc đều. Chuyển mẫu sang máy lắc ở nhiệt độ 56°C, 750 vòng/phút, ủ qua đêm.

Tách chiết ADN được thực hiện sau khi ủ lysis. Mẫu đã ủ được li tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 500 µl dịch nổi chuyển sang ống đựng mẫu theo kit sau đó bổ sung 400 µl MTL Buffer, 1 µl cRNA, 50 µl NaOAc (3M, pH 5,2) vào mỗi mẫu, lắc đều bằng máy, li tâm nhẹ để mẫu lắng xuống. Mẫu đã chuẩn bị theo quy trình của bộ kit được chuyển vào hệ thống máy EZ1 Advanced XL, thực hiện theo chương trình *The Large-Volume Protocol*, đợi máy kết thúc quy trình, thu 40 µl ADN tách chiết. Kiểm tra đối chiếu thông tin mẫu theo hồ sơ và bảo quản ở -20°C.

2.2.4. Định lượng ADN gen nhân và ADN ty thể mẫu nghiên cứu bằng kỹ thuật Realtime PCR

2.2.4.1. Định lượng ADN gen nhân :

Quantifiler Trio DNA Quantification Kit được sử dụng để định lượng ADN nhân có trong mẫu hài cốt thông qua ba đối tượng mục tiêu khác nhau và gen nội chuẩn IPC (bảng 2.2). Đường chuẩn được xây dựng dựa trên 5 nồng độ của mẫu chuẩn có trong bộ kit được pha loãng 10 lần từ 0,005 – 50 ng/µl theo hướng dẫn của nhà sản xuất [69].

Thành phần phản ứng bao gồm 8 µl Quantifiler™ Trio Primer Mix, 10 µl Quantifiler™ Trio THP PCR Reaction Mix, 2 µl ADN. Chu trình nhiệt khởi đầu bằng bước biến tính 95°C 2 phút, sau đó là 40 chu kỳ với mỗi chu kỳ (95°C, 9 giây; 60°C, 30 giây). Toàn bộ phản ứng và phân tích kết quả được thực hiện trên hệ thống 7500 Real– time PCR (Applied Biosystems).

Khoảng khuyến nghị của bộ kit DNA Quantifiler™ Trio: giá trị $R^2 > 0,98$; phạm vi độ dốc (slope) của bộ kit khoảng -3,0 đến -3,7 (bảng 2.3).

Bảng 2. 2. Gen đích của Bộ định lượng DNA Quantifiler™ Trio

Tên	Chiều dài (bp)	Kiểu gen	Số bản sao	Dye/ Quencher
Đích ADN dài (LA)	214	Luỡng bội	Nhiều bản sao	ABY/QSY
Đích ADN ngắn (SA)	80	Luỡng bội	Nhiều bản sao	VIC/QSY
Đích Y	75	Đơn bội	Nhiều bản sao	PAM/MG B
IPC	130		Sẵn có	JUN/QSY

Bảng 2. 3. Khoảng và trung bình của các giá trị độ dốc đường cong tiêu chuẩn [69]

Quantifiler™ Trio gen đích	Độ dốc điển hình (phạm vi)	Độ dốc trung bình
Đích ADN ngắn (SA)	-3,0 to -3,6	-3,3
Đích ADN dài (LA)	-3,1 to -3,7	-3,4
Đích Y (Y)	-3,0 to -3,6	-3,3

2.2.4.2. Định lượng ADN ty thể:

Việc định lượng ADN ty thể được thực hiện bằng realtime PCR tự thiết kế sử dụng đầu dò huỳnh quang TaqMan và các đoạn mồi cụ thể nhắm vào đoạn 170 bp trong vùng HVI.

Các chuỗi oligonucleotide đặt từ hãng Integrated DNA Technologies (IDT) như sau:

- Đầu dò tự thiết kế 5'-FAM-CCCATCAACAACCGCTATGTATT-MGB-3'
- Mồi xuôi F15989: 5'-CCCAAAGCT AAGATTCTAAT-3'
- Mồi ngược R16158: 5'-TACTACAGGTGGTCAAGTAT-3' [70]

Quá trình khuếch đại realtime PCR được thực hiện trong phản ứng 20 μ l chứa 1X Go Taq Probe qPCR Master Mix (Promega, WI, USA), mỗi mồi 500 nM, 250 nM đầu dò và 2 μ l ADN tách chiết. Điều kiện chu kỳ nhiệt được bắt đầu bằng chu kỳ 95°C trong 2 phút, sau đó là 40 chu kỳ 95°C trong 15 giây và 60°C trong 1 phút.

Đường chuẩn xây dựng dựa trên 5 nồng độ của sản phẩm PCR 443 bp trong vùng HVI được pha loãng 10 lần từ 0,006 đến 60 pg \sim $6,58 \times 10^4$ đến $6,58 \times 10^8$ bản sao. Hai mẫu không có ADN được đưa vào thí nghiệm để làm đối chứng âm. Toàn bộ phản ứng được thực hiện trên hệ thống QuantStudio 6 pro Real-Time PCR (Applied Biosystems) và phân tích kết quả được thực hiện trên phần mềm QuantStudio™ Design & Analysis 2.6.0 (Applied Biosystems).

2.2.5. Phân tích trình tự ADN ty thể

Toàn bộ 120 mẫu hài cốt đã được giải trình tự trong quá trình giám định thường quy tại Trung tâm giám định ADN. Hai cặp mồi khuếch đại hai tiểu vùng PS1 (F15989: 5'-CCCAAAGCTAAGATTSTAAT-3' và R16251: 5'-GGA GTTGCAGTTGATGT-3') và PS2 (F16190: 5'-CCCATGCTTACAAGCAAGT-3' và R16410: 5'-GAGGATGGTGGTCAAGGGGAC-3') thuộc vùng HVI của ADN ty thể được sử dụng. Trình tự ADN ty thể của 120 mẫu được đánh giá, phân tích sử dụng phần mềm Sequencher version 5.4.6 (GenCodes, Hoa Kỳ). Trình tự mẫu được tiền xử lý bằng cách loại bỏ các vùng trình tự mồi, sửa chữa thủ công các vị trí nucleotide gọi sai bởi phần mềm. Tiếp đó, trình tự mẫu được so sánh giống hàng (align) với trình tự ADN ty thể tham chiếu (rCRS) [71]. Hồ sơ ADN ty thể của mẫu sẽ được xuất dưới dạng các biến thể (sai khác giữa trình

tự của mẫu và rCRS các ở vị trí nhất định) kèm theo thông tin về đoạn trình tự phân tích. Các biến thể được kiểm tra một lần nữa để đảm bảo tuân thủ danh pháp quy định bởi Ủy ban ADN của Hiệp hội Di truyền Pháp y Quốc tế [72]. Hồ sơ ADN ty thể của từng mẫu được so sánh với hồ sơ ADN ty thể của các cán bộ tham gia quá trình thí nghiệm và hồ sơ ADN ty thể của các mẫu có liên quan (ví dụ: cùng lượt tách chiết) để kiểm soát tạp nhiễm. Số lượng nucleotide ADN ty thể xác định được tính toán bằng công thức:

$$n = \text{chiều dài đoạn phân tích} - \text{số lượng } N$$

Trong đó N là các vị trí nằm trong đoạn phân tích nhưng không thể xác định nucleotide.

2.2.6. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Toàn bộ phản ứng và phân tích kết quả định lượng ADN gen nhân mẫu nghiên cứu được thực hiện trên hệ thống 7500 Real-time PCR (Applied Biosystems). Toàn bộ phản ứng định lượng ADN ty thể được thực hiện trên hệ thống QuantStudio 6 pro Real-Time PCR (Applied Biosystems) và phân tích kết quả được thực hiện trên phần mềm QuantStudio™ Design & Analysis 2.6.0 (Applied Biosystems).

Số liệu được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Microsoft office - Microsoft 365, R-4.3.3 và Rstudio.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

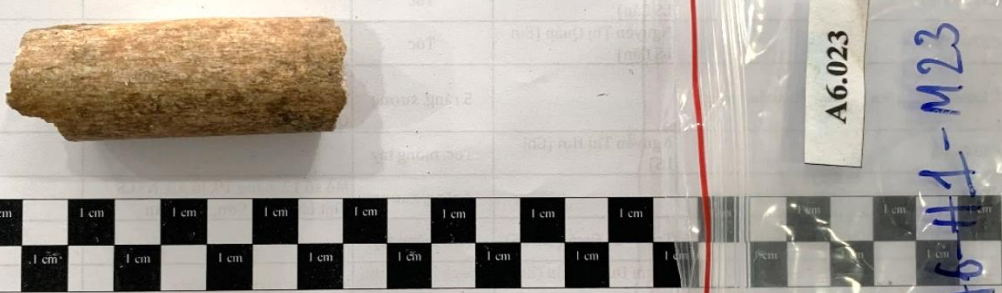
3.1. THU THẬP VÀ PHÂN LOẠI MẪU HÀI CỐT TẠI NGHĨA TRANG LIỆT SĨ QUỐC TẾ VIỆT LÀO

Số lượng và kích thước của 120 mẫu hài cốt được thu cho nghiên cứu này thể hiện ở phụ lục 1.

Tất cả các mẫu sau khi được làm sạch và làm khô sẽ được chụp ảnh lưu hồ sơ thông tin mẫu. Đây là bước quan trọng cho việc lưu mẫu và đối chiếu kết quả nghiên cứu sau này. Thông tin mẫu nghiên cứu được tiến hành như sau: mẫu được đặt lên trên bề mặt giấy A4 đã có thông tin trùng khớp với thông tin trên túi lưu mẫu và được chụp ảnh (phụ lục 2). Các mẫu sẽ được tiến hành lần lượt và cuối cùng thông tin các mẫu sẽ được lưu hồ sơ quản lý mẫu.

Hình 3.1 thể hiện mẫu A6.023 được chụp ảnh hồ sơ giám định sau khi làm khô và ghi mô tả mẫu.

Trường hợp		Xác định hài cốt liệt sĩ còn thiếu thông tin					Đơn vị: TT GD ADN	
<i>Khu</i>		<i>Lô</i>	<i>A6</i>	<i>Hàng</i>	<i>1</i>	<i>Mộ số</i>	<i>23</i>	Người thực hiện: <i>Tinh - Phương Dung</i>
NTLS Việt – Lào, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An							Ngày tiền xử lý: <i>28/01/2021</i>	



Mô tả:	Mã hóa	Mã số y	Phân Loại	Chất Lượng
<i>.01. Đoạn xương ống . 6.5 x . 2.7cm</i>	A6.023			

Thông tin chi tiết trình bày trong hồ sơ theo dõi mẫu, lưu tại Trung tâm giám định ADN

Hình 3. 1. Ảnh chụp hồ sơ giám định mẫu A6.023

Trong số 120 mẫu nghiên cứu thì có 7 mẫu xương chày, 25 mẫu xương đùi, 56 mẫu răng và 1 mẫu xương cánh tay, 11 mẫu có cả răng và xương chày, 19 mẫu có cả răng và xương đùi, 1 mẫu có cả răng và xương tay (bảng 3.1).

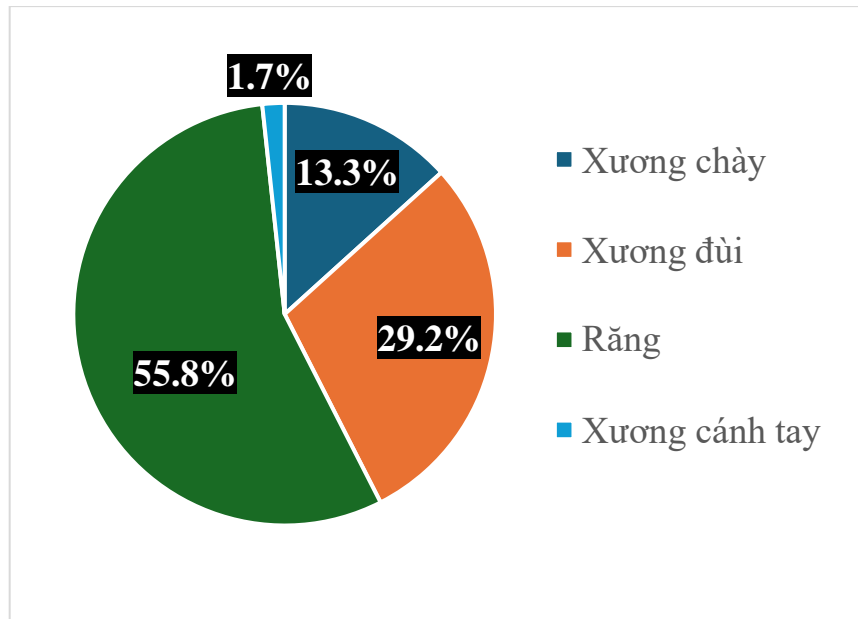
Bảng 3. 1. Tổng hợp số lượng mẫu theo loại mẫu thu được

STT	Loại mẫu	Số lượng mẫu
1	Xương chày	7
2	Xương đùi	25
3	Răng	56
4	Răng và xương chày	11
5	Răng và xương đùi	19
6	Răng và xương cánh tay	1
7	Xương cánh tay	1
Tổng:		120

Trong các mẫu gồm cả răng và xương thì loại mẫu nào có độ cứng cao và hình thái ít bị biến đổi nhất được chọn sử dụng cho thí nghiệm (phụ lục 3, bảng 3.2)

Bảng 3. 2. Số lượng loại mẫu được sử dụng trong thí nghiệm

Mẫu sử dụng trong thí nghiệm	
	Số lượng mẫu
Xương chày	16
Xương đùi	35
Răng	67
Xương cánh tay	2
Tổng:	120



Hình 3. 2. Tỷ lệ mẫu theo vị trí

Các mẫu này được chôn cất tại cùng nghĩa trang, thời gian mất khoảng 1965-1975. Từ biểu đồ và các điều kiện giống nhau, ta có thể thấy khi chọn các mẫu tốt đưa vào thí nghiệm thì tỉ lệ mẫu răng là lớn nhất 55,8%, thứ hai là mẫu xương đùi 29,2%, thứ ba là xương chày 13,3% và ít nhất là xương cánh tay 1,7% (hình 3.2). Điều này có thể được giải thích là:

Về cấu tạo: răng có vỏ ngoài là men răng được cấu tạo từ canxi photphat là một khoáng chất rất chắc khỏe giúp bảo vệ răng khỏi các tác nhân bên ngoài xâm nhập vào bên trong răng. Bọc ngoài lớp xương đặc là màng ngoài, một màng liên kết mỏng dưới 2mm giúp bảo vệ xương khỏi các tổn thương bên ngoài. Xương đùi, xương chày là hai xương lớn, mật độ xương đặc chiếm tỉ lệ cao hơn so với xương xốp có trong từng loại xương này. Mật độ, độ dày xương đặc có trong xương cánh tay và các xương khác thấp hơn nhiều so với xương đùi và xương chày, điều này dẫn đến trong cùng điều kiện thì các xương lớn sẽ có chất lượng tốt hơn các xương còn lại.

Về ngoại lực tác động: trong chiến tranh, mẫu hài cốt không còn nguyên vẹn do bom đạn tác động, điều kiện mai táng còn thô sơ, hài cốt được quy tập sau khi mất nhiều năm... các yếu tố trên dẫn đến hài cốt không còn đầy đủ bộ phận, khi lấy mẫu giám định không thu được đa dạng loại mẫu, điều đó ảnh hưởng lớn tới công tác đánh giá và giám định hài cốt liệt sĩ còn thiếu thông tin.

3.2. ĐÁNH GIÁ ĐỘ PHONG HÓA MẪU DỰA TRÊN THANG ĐIỂM BEHRENSMEYER

Các mẫu nghiên cứu sau khi được làm sạch thì đã được đánh giá hình thái theo hệ thống phân loại của Behrensmeyer (bảng 3.3).

Trong 120 mẫu nghiên cứu: 05 mẫu có chất lượng tương đối tốt khi mẫu được đánh giá đang ở giai đoạn phong hóa 1; 18 mẫu có chất lượng khá ở giai đoạn phong hóa 2; có 71 mẫu có chất lượng trung bình khi các mẫu đang trong giai đoạn phong hóa 3; còn lại 26 mẫu khá xấu ở giai đoạn phong hóa 4.

Điều này cho thấy, mặc dù lấy mẫu cùng 1 nghĩa trang nhưng các mẫu rất đa dạng về chất lượng, hình thái.

Bảng 3. 3. Giai đoạn phong hóa mẫu theo hệ thống phân loại của Behrensmeyer (1978)

STT	Tên mẫu	Giai đoạn	STT	Tên mẫu	Giai đoạn	STT	Tên mẫu	Giai đoạn
1	A6.015	3	41	A6.376	4	81	A6.780	2
2	A6.023	1	42	A6.378	3	82	A6.782	3
3	A6.038	3	43	A6.383	2	83	A6.798	3
4	A6.046	2	44	A6.385	3	84	A6.800	3
5	A6.051	2	45	A6.391	3	85	AB030111	3
6	A6.068	3	46	A6.427	3	86	AB030123	3
7	A6.070	3	47	A6.428	1	87	AB030202	4
8	A6.090	3	48	A6.441	3	88	AB030214	3
9	A6.104	3	49	A6.460	4	89	AB030221	2
10	A6.152	3	50	A6.463	3	90	AB030223	3
11	A6.162	2	51	A6.464	3	91	AB030305	4
12	A6.164	4	52	A6.479	4	92	AB030308	3
13	A6.166	2	53	A6.485	1	93	AB030311	3
14	A6.187	3	54	A6.488	3	94	AB030315	2

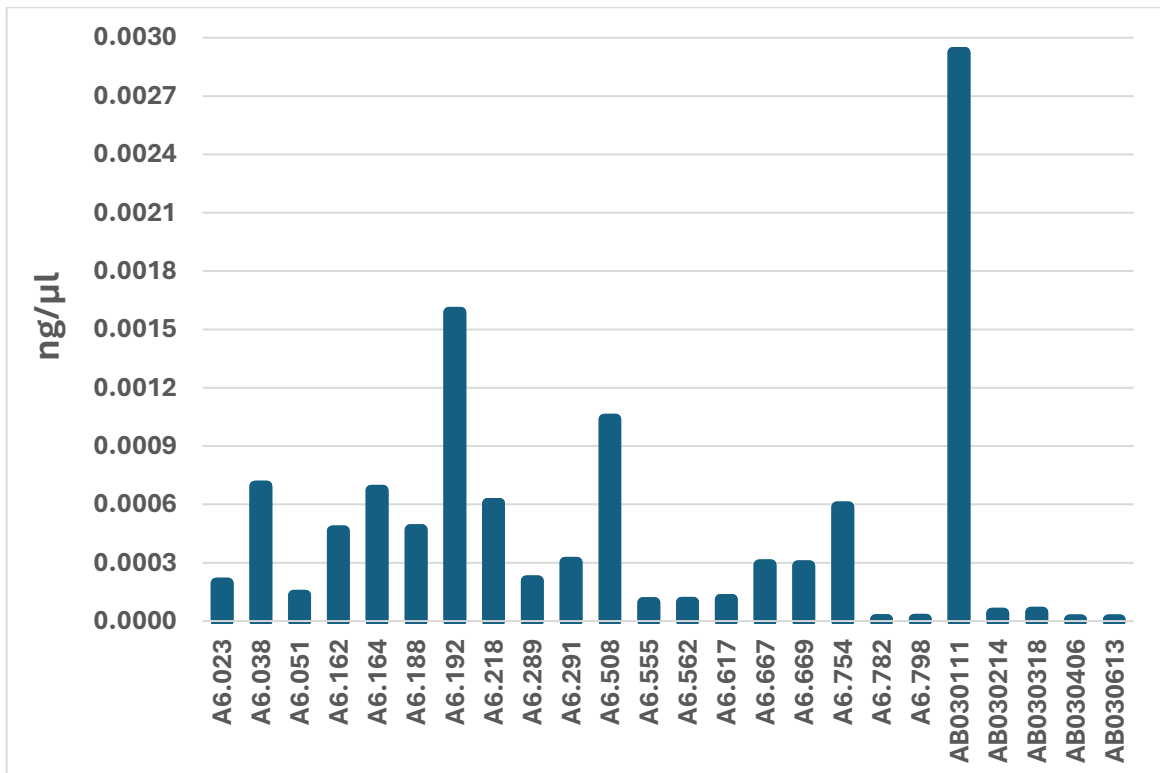
STT	Tên mẫu	Giai đoạn	STT	Tên mẫu	Giai đoạn	STT	Tên mẫu	Giai đoạn
15	A6.188	4	55	A6.500	3	95	AB030317	4
16	A6.192	2	56	A6.508	2	96	AB030318	3
17	A6.195	3	57	A6.514	4	97	AB030406	3
18	A6.200	4	58	A6.537	3	98	AB030409	3
19	A6.218	3	59	A6.538	4	99	AB030501	3
20	A6.237	3	60	A6.539	1	100	AB030503	4
21	A6.247	4	61	A6.555	1	101	AB030509	3
22	A6.254	3	62	A6.561	2	102	AB030510	3
23	A6.258	2	63	A6.562	3	103	AB030512	3
24	A6.262	4	64	A6.570	3	104	AB030513	2
25	A6.287	4	65	A6.575	2	105	AB030515	4
26	A6.289	2	66	A6.606	4	106	AB030601	3
27	A6.291	3	67	A6.607	3	107	AB030603	2
28	A6.302	4	68	A6.617	3	108	AB030604	3
29	A6.317	3	69	A6.638	4	109	AB030608	3
30	A6.324	3	70	A6.667	3	110	AB030611	4
31	A6.331	3	71	A6.669	3	111	AB030612	3
32	A6.334	3	72	A6.690	3	112	AB030613	3
33	A6.344	3	73	A6.700	3	113	AB030616	3
34	A6.346	3	74	A6.746	3	114	AB030620	4
35	A6.351	4	75	A6.754	3	115	AB030622	2
36	A6.357	3	76	A6.758	3	116	AB030701	4
37	A6.358	3	77	A6.759	3	117	AB030714	4
38	A6.367	3	78	A6.760	2	118	AB030721	3
39	A6.370	3	79	A6.768	3	119	AB031006	3
40	A6.373	4	80	A6.776	3	120	AB031022	4

3.3. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG THU HỒI ADN VÀ MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA HÌNH THÁI MẪU VÀ CÁC KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG ADN

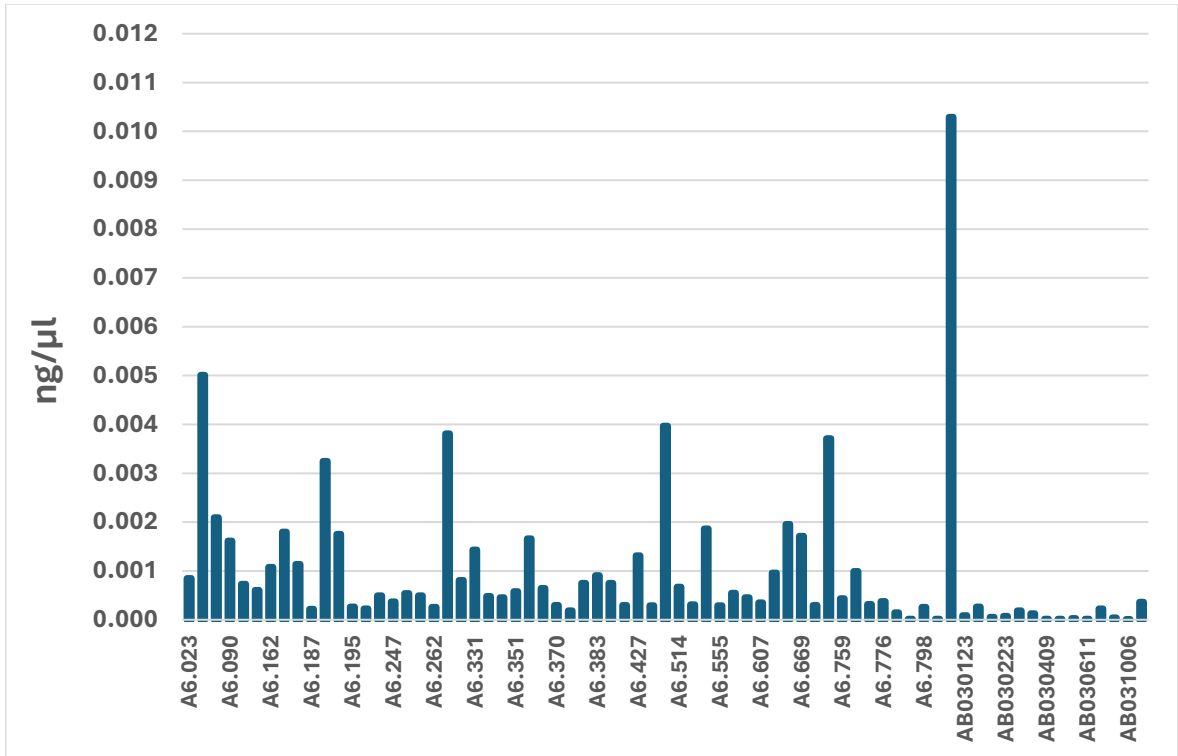
3.3.1. Định lượng ADN gen nhân mẫu nghiên cứu

Kết quả xây dựng đường chuẩn định lượng ADN nhân được thể hiện ở phụ lục 4. Giá trị $R^2 = 0,999$; $R^2 = 1$ cho thấy sự phù hợp chặt chẽ giữa đường hồi quy đường cong chuẩn và các điểm dữ liệu C_T riêng lẻ của phản ứng chuẩn định lượng. Độ dốc cho từng đích LA, SA, Y trong phản ứng lần lượt là -3,37; -3,409; -3,499 nằm trong phạm vi bộ kit khuyến cáo dùng (bảng 2.3).

Dữ liệu định lượng ADN nhân bằng bộ kit Quantifiler Trio DNA Quantification cho thấy trong tổng số 120 mẫu, 71 mẫu xác định được ADN nhân ở mức nồng độ rất thấp và không đồng đều (phụ lục 6, hình 3.3 và hình 3.4). Đối với đích ADN dài (LA), 24 mẫu cho kết quả định lượng. Nồng độ LA cao nhất quan sát được ở mẫu AB030111 ($2,92 \times 10^{-3}$ ng/ μ l), nồng độ LA thấp nhất ($5,96 \times 10^{-6}$ ng/ μ l) đo được ở mẫu AB030406. Đối với đích ADN ngắn (SA), 71 mẫu có kết quả định lượng với nồng độ phân bố trong khoảng từ $9,989 \times 10^{-6}$ ng/ μ l (mẫu AB031006) đến $1,03 \times 10^{-2}$ ng/ μ l (mẫu AB030111).

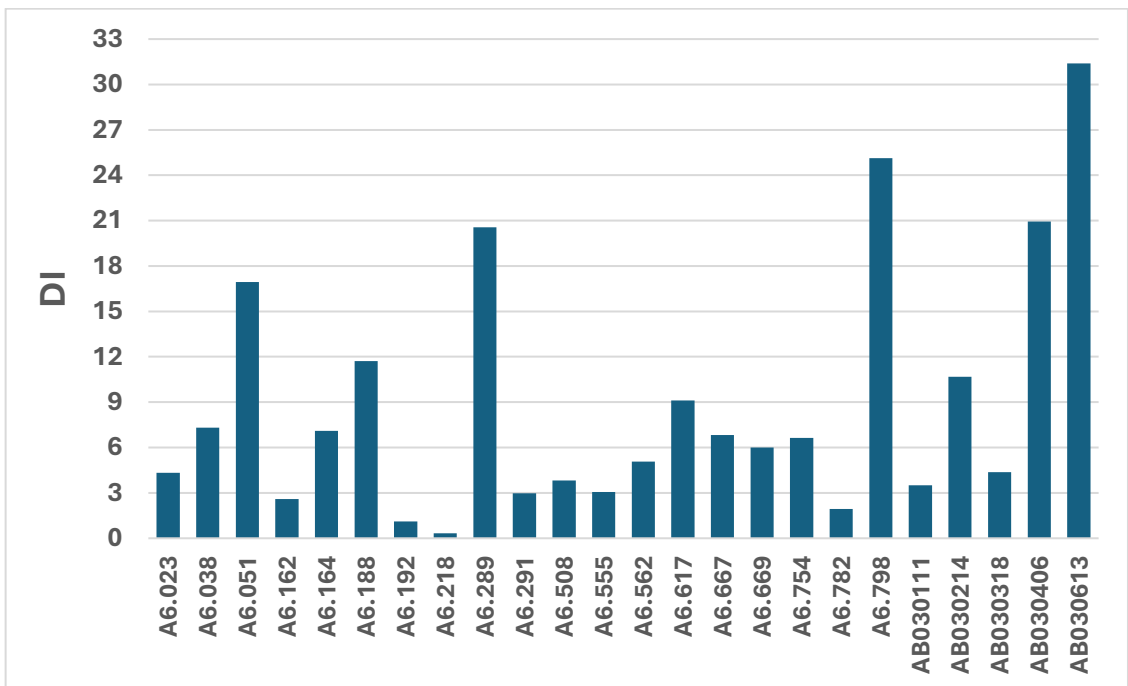


Hình 3. 3. Nồng độ định lượng đích ADN dài (LA) của 24 mẫu hài cốt



Hình 3. 4. Nồng độ định lượng đích ADN ngắn (SA) của 71 mẫu hài cốt

Chỉ số phân hủy (degradation index - DI) chỉ có thể được tính toán cho 24 mẫu có kết quả định lượng LA (hình 3.5). Trong đó, duy nhất mẫu A6.218 cho $DI < 1$, các mẫu còn lại đều cho DI ở mức lớn hơn 1. Kết quả này thể hiện các mẫu hài cốt đã bị phân hủy hết sức nặng nề.



Hình 3. 5. Chỉ số phân hủy (DI) của 24 mẫu hài cốt

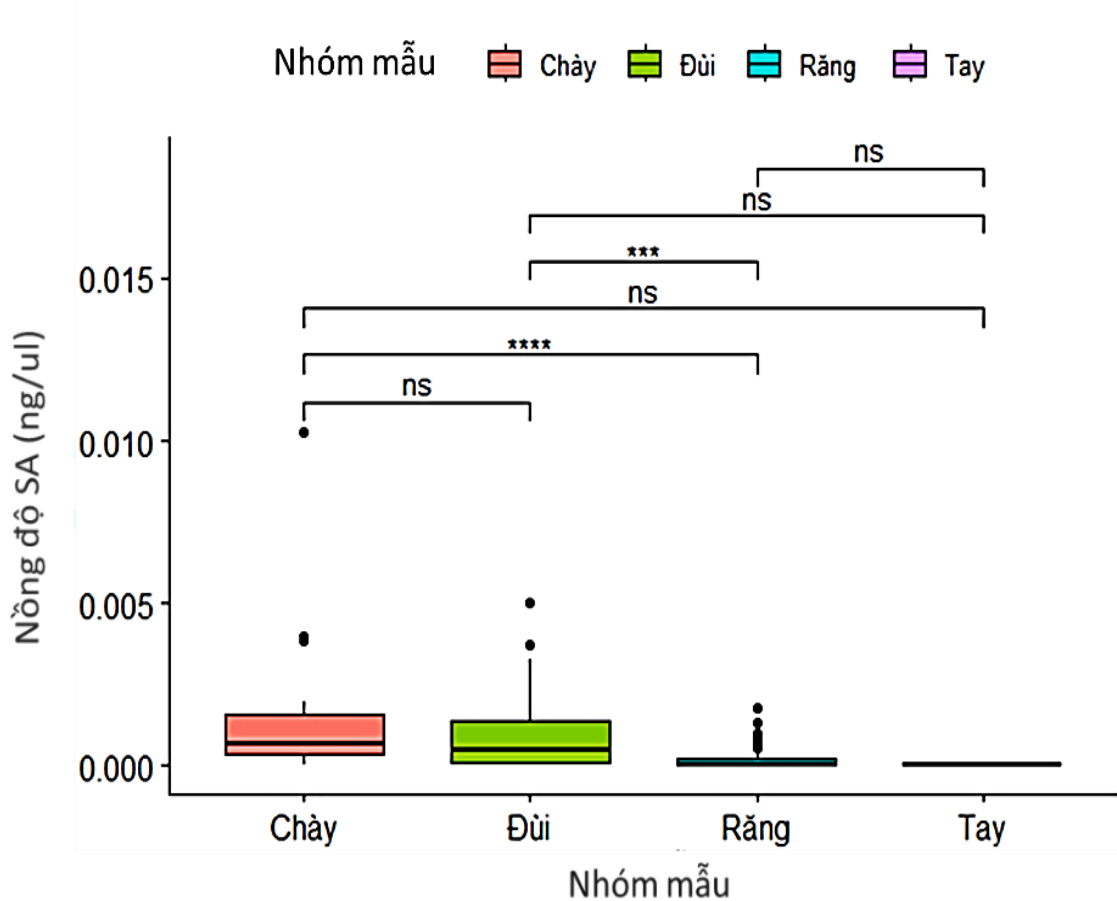
Mối liên quan giữa dữ liệu định lượng, loại xương và dựa theo thang điểm phong hóa được đánh giá.

Xét theo loại xương, nhóm xương chày có tỷ lệ mẫu chứa ADN nhân cao nhất (93,75%), tiếp đó là nhóm xương đùi (74,29%), nhóm răng (44,78%). Hai mẫu nhóm xương tay cho kết quả khuếch đại ADN nhân âm tính (bảng 3.4).

Bảng 3. 4. Tỷ lệ mẫu thu hồi được ADN nhân trong từng nhóm mẫu theo loại xương

Nhóm mẫu	Xương chày	Xương đùi	Răng	Xương cánh tay
Số lượng mẫu	16	35	67	2
Số lượng mẫu định lượng được ADN nhân	15	26	30	0
Tỷ lệ mẫu định lượng được ADN nhân (%)	93,75	74,29	44,78	0,00
Nồng độ ADN nhân (SA) trung bình (ng/ μ l)	1,665 x 10^{-3}	9,04 x 10^{-4}	1,57 x 10^{-4}	0

Kết quả phân tích Kruskal – Wallis cho thấy sự khác biệt về nồng độ ADN nhân (SA) giữa các nhóm mẫu (xương chày, xương đùi, răng, tay) có ý nghĩa thống kê ($\chi^2 = 34,178$; $df = 3$; $p = 1,817e-07 < 0,05$). Để biết sự khác biệt giữa các nhóm mẫu, phân tích hậu định Dunn được sử dụng.



Hình 3. 6. Phân tích hậu định Dunn giữa bốn loại xương

(ns: không có ý nghĩa thống kê, *** có ý nghĩa thống kê)

Phân tích hậu định Dunn cho biết sự khác biệt này diễn ra giữa nhóm xương chày – răng, xương đùi – răng (hình 3.6). Giữa các nhóm còn lại, sự khác biệt về nồng độ không có ý nghĩa thống kê.

Xét theo thang điểm phong hóa, 60% các mẫu điểm 1 (điểm tốt nhất) cho kết quả định lượng ADN nhân, 72,22%, 61,97% và 42,31% đối với các mẫu điểm 2, 3 và 4 cũng có ADN nhân trong dịch tách chiết (bảng 3.5). Nồng độ ADN nhân (SA) tính toán cho 4 nhóm mẫu này lần lượt là 6×10^{-4} (nhóm điểm 1); $9,43 \times 10^{-4}$ (nhóm điểm 2); $5,77 \times 10^{-4}$ (nhóm điểm 3) và $3,01 \times 10^{-4}$ (nhóm điểm 4). Tuy nhiên, phân tích Kruskal – Wallis ($\chi^2 = 6,6063$; $df = 3$; $p = 0,08556 > 0,05$) cho thấy sự khác biệt về nồng độ giữa các nhóm phân theo thang điểm phong hóa không có ý nghĩa thống kê.

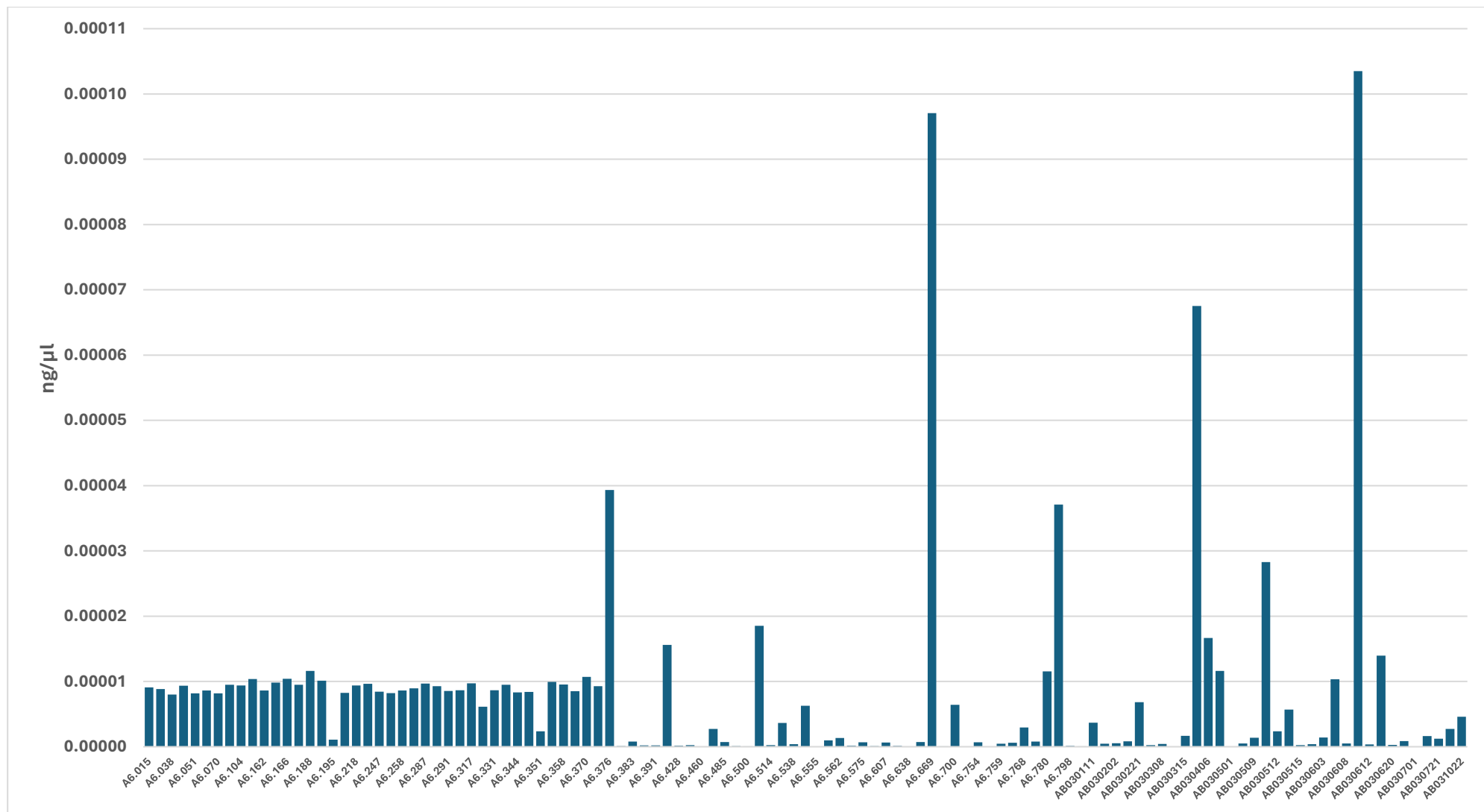
Bảng 3. 5. Tỷ lệ mẫu thu hồi được ADN nhân trong từng nhóm mẫu theo thang điểm phong hóa

Điểm phong hóa	1	2	3	4
Số lượng mẫu	5	18	71	26
Số lượng mẫu định lượng được ADN nhân	3	13	44	11
Tỷ lệ mẫu định lượng được ADN nhân (%)	60,00	72,22	61,97	42,31
Nồng độ ADN nhân (SA) trung bình (ng/ μ l)	0,0006	0,0009	0,00057	0,0003

Kết quả phân tích ADN nhân của 120 mẫu cho thấy mẫu hài cốt liệt sĩ đã bị phân hủy hết sức nặng nề. Hơn 40% số mẫu thậm chí không phát hiện được ADN nhân trong dịch tách chiết. Trong các mẫu còn lại, phần lớn ADN đã bị đứt gãy, tồn tại ở dạng đoạn ngắn, với lượng cực kỳ thấp. Một nghiên cứu trên bộ 75 mẫu hài cốt trong chiến tranh thế giới thứ 2 cho kết quả tương tự với nồng độ ADN nhân của các mẫu ở mức thấp, phân bố trong khoảng 0,0022 ng/ μ l đến 0,3283 ng/ μ l [73]. Mặc dù 120 mẫu hài cốt liệt sĩ trong nghiên cứu của chúng tôi hi sinh cách đây khoảng 50 năm, thời gian chôn cất ngắn hơn 75 mẫu trong nghiên cứu của Obal và cộng sự, lượng ADN nhân phát hiện được trong 120 mẫu thấp hơn nhiều lần so với bộ 75 mẫu. Nguyên nhân có thể là do điều kiện môi trường ở Việt Nam khiến xương phân hủy nhanh hơn. Điều này cho thấy thách thức trong tách chiết và phân tích ADN mẫu hài cốt liệt sĩ ở Việt Nam không chỉ là thời gian mà còn nhiều yếu tố khác.

3.3.2. Định lượng ADN ty thể mẫu nghiên cứu

Kết quả xây dựng đường chuẩn định lượng ADN ty thể được thể hiện ở phụ lục 5. Giá trị $R^2 = 0,999$ cho thấy sự phù hợp chặt chẽ giữa đường hồi quy đường cong chuẩn và các điểm dữ liệu C_T riêng lẻ của phản ứng chuẩn định lượng. Độ dốc cho gen đích Target1 (5'-FAM-CCCATCAACAACCGCTATGT ATT-MGB-3') trong phản ứng là -3,53 nằm trong phạm vi bộ kit khuyến cáo dùng.



Hình 3. 7. Nồng độ định lượng đích ADN ty thể của 115 mẫu hài cốt

Trong tổng số 120 mẫu hài cốt, 115 mẫu định lượng được ADN ty thể (hình 3.7). Trong đó, mẫu AB030611 cho kết quả định lượng cao nhất ($1,035 \times 10^{-4}$ ng/ μ l), tương đương 567.307 bản copy. Mẫu A6.638 cho kết quả định lượng thấp nhất ($1,8 \times 10^{-9}$ ng/ μ l), tương đương 9 bản copy (Phụ lục 6). Năm mẫu không định lượng được ADN ty thể mặc dù trước đó có cho kết quả trình tự: A6.463, A6.479, AB030305, AB030317, AB030616. Điều này có thể giải thích: sau khi tách chiết, mẫu được giải trình tự ADN ty thể ngay sau đó trong một dự án khác. Lượng ADN còn lại để định lượng được lưu trữ trong một khoảng thời gian dài đã bị phân hủy.

Phần lớn mẫu trong các nhóm loại xương đều cho kết quả định lượng ADN ty thể và nồng độ ADN ty thể trong các nhóm này có sự chênh lệch (bảng 3.6). Nhóm xương đùi có 34/35 mẫu định lượng được ADN ty thể, với nồng độ trung bình $8,667 \times 10^{-6}$ ng/ μ l. Nhóm răng có 63/67 mẫu có kết quả định lượng, nồng độ trung bình là $7,482 \times 10^{-6}$ ng/ μ l. Tất cả các mẫu trong nhóm xương chày và xương cánh tay đều cho kết quả định lượng ADN ty thể, với nồng độ trung bình lần lượt là $4,944 \times 10^{-6}$ và $4,141 \times 10^{-6}$ ng/ μ l. Các khác biệt về nồng độ ADN ty thể giữa loại xương không có ý nghĩa thống kê, khi phân tích Kruskal – Wallis cho kết quả $\chi^2 = 0,74727$; $df = 3$; $p = 0,862 > 0,05$.

Bảng 3. 6. Tỷ lệ mẫu thu hồi được ADN ty thể và nồng độ ADN ty thể trung bình trong từng loại xương

Nhóm mẫu	Xương chày	Xương đùi	Răng	Xương cánh tay
Số lượng mẫu	16	35	67	2
Số lượng mẫu định lượng được ADN ty thể	16	34	63	2
Tỷ lệ mẫu định lượng được ADN ty thể (%)	100,00	97,14	94,03	100,00
Nồng độ ADN ty thể trung bình (ng/ μ l)	$4,944 \times 10^{-6}$	$8,667 \times 10^{-6}$	$7,482 \times 10^{-6}$	$4,141 \times 10^{-6}$

Một cách tương tự, các nhóm mẫu dựa theo thang điểm phong hóa có những khác biệt về nồng độ ADN ty thể (bảng 3.7) nhưng không mang ý nghĩa thống kê (kết quả từ phân tích Kruskal – Wallis: $\chi^2 = 4,4033$; $df = 3$; $p = 0,2211 > 0,05$).

Bảng 3. 7. Tỷ lệ mẫu thu hồi được ADN ty thể và nồng độ ADN ty thể trung bình trong từng nhóm mẫu theo thang điểm phong hóa

Điểm phong hóa	1	2	3	4
Số lượng mẫu	5	18	71	26
Số lượng mẫu định lượng được ADN ty thể	5	18	69	23
Tỷ lệ mẫu định lượng được ADN ty thể (%)	100,00	100,00	97,18	88,46
Nồng độ ADN ty thể trung bình (ng/ μ l)	3,208 x 10^{-06}	6,338 x 10^{-06}	7,513 x 10^{-06}	8,788 x 10^{-06}

Như dự đoán, ADN ty thể bền hơn ADN nhân khi gần 96% số mẫu có thể định lượng ADN ty thể. Tuy vậy, ADN ty thể trong 120 mẫu hài cốt liệt sĩ cũng tồn tại ở lượng thấp. Đặc biệt là, so với nồng độ ADN nhân (đích ADN ngắn - SA), 68 mẫu cho nồng độ ADN ty thể thấp hơn. Một trong những nguyên nhân có thể là do kích thước đích ADN ty thể là 170 bp, dài hơn so với đích ADN ngắn (SA) – 80 bp nên khả năng khuếch đại ADN ty thể trong những mẫu này bị suy giảm. Điều này cho thấy không chỉ ADN nhân mà ADN ty thể của những mẫu này đã bị phân hủy mạnh. Tình trạng phân hủy của ADN ty thể trong mẫu lâu năm cũng đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu trên thế giới [74-77].

3.3.3. Mối tương quan giữa hình thái mẫu và kết quả định lượng ADN

Trong nghiên cứu của này, tính phân hủy của cả ADN nhân và ADN ty thể trong mẫu hài cốt liệt sĩ Việt Nam đã được xem xét. Dữ liệu thực nghiệm về loại mẫu xương nào cho kết quả phân tích ADN tốt nhất đã được công bố [78, 79]. Không có sự thống nhất tuyệt đối giữa các nghiên cứu, nhưng chiến lược thu mẫu truyền thống thường tập trung vào các xương đặc như xương răng, xương đùi. Trong một số nghiên cứu gần đây hơn [80, 81], xương nhỏ của bàn tay và chân đã được chọn và lượng ADN cao hơn đã được báo cáo. Dữ liệu của ICMP lại cho thấy rằng cho lượng ADN cao nhất [67]. Haarkötter và cộng sự năm 2023 báo cáo xương đùi, xương chày, răng và gân dây hơn là xương đá được coi là những loại mẫu tiềm năng nhất để phân tích ADN. Xương đá mang lại nhiều ADN nhất, sau đó đến răng, xương chày và cuối cùng là xương đùi; tuy nhiên, số lượng alen STR tương đương đã thu được ở mẫu xương đá và răng. Dựa vào kết quả này, các tác giả khuyến nghị sử dụng cả mẫu xương đá và răng để thực hiện phân tích ADN từ hài cốt người đã bị phân hủy nghiêm trọng. Đối với trường hợp hài cốt liệt sĩ Việt Nam trong nghiên cứu hiện tại, các mẫu xương răng đang cho nồng độ ADN nhân thấp hơn nhóm xương đùi và xương chày. Nồng độ ADN thấp hơn quan sát được ở răng trái ngược với quan niệm thường thấy rằng răng là mẫu tối ưu để phân tích ADN do cấu trúc men răng dày đặc của chúng. Sự khác biệt này nhấn mạnh sự phức tạp của cơ chế bảo tồn ADN trong các loại xương khác nhau ở các điều kiện chôn cất khác nhau và nêu bật sự cần thiết phải nghiên cứu sâu hơn về vấn đề này. Tóm lại, dù tồn tại những điểm khác biệt nhưng có thể thấy rằng, nghiên cứu này đồng thuận với nhiều nghiên cứu trước đây về khả năng thu được ADN nhân thay đổi phụ thuộc vị trí trên cơ thể mà mẫu được lấy. Do đó, vị trí lấy mẫu có thể được sử dụng như một hệ thống đánh giá nhanh khi thu mẫu hiện trường. Tuy nhiên, hệ thống này có thể chưa hiệu quả trong việc dự đoán khả năng thu được ADN ty thể ở mẫu hài cốt liệt sĩ Việt Nam.

Một kết quả khác từ nghiên cứu này chỉ ra rằng không có sự khác biệt đáng kể về nồng độ ADN giữa các nhóm mẫu được phân loại theo điểm Behrensmeyer, một hệ thống tính điểm phong hóa dành cho các mẫu xương. Điều này cho thấy mức độ phong hóa của xương có thể không đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn ADN. Nhiều nghiên cứu trước đây cũng báo cáo

những phát hiện tương tự về phong hóa hay đặc điểm bên ngoài mẫu xương không có tác động đến chất lượng và số lượng ADN [82]. Mặc dù điểm phong hóa cao hơn thường tương quan với tình trạng thoái hóa xương nhiều hơn, nhưng mối tương quan với việc bảo tồn ADN có thể khác nhau tùy thuộc vào loại mẫu, các yếu tố môi trường và điều kiện chôn cất. Nồng độ ADN cực thấp quan sát được trong 120 mẫu hài cốt liệt sĩ nhấn mạnh sự cần thiết phải nghiên cứu sâu hơn về sự tương tác phức tạp của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phục hồi ADN bất kể mức độ phong hóa của mẫu như thế nào. Điều này có thể bao gồm việc tập trung vào các hệ thống đánh giá khác, cũng như phát triển và tối ưu các phương pháp tách chiết ADN dành cho các mẫu khó. Tóm lại, việc đánh giá mẫu dựa trên một hay kết hợp nhiều tiêu chí cần được nghiên cứu thêm và sẽ cung cấp nhiều thông tin hữu ích trong việc dự đoán thành công của quá trình tách chiết ADN và các quy trình giải trình tự sau đó.

3.4. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ ADN TY THỂ

Dữ liệu từ giải trình tự Sanger được phân tích bởi hai nhà nghiên cứu độc lập sử dụng phần mềm Sequencher v5.4.6 (Gene-Codes, MI, USA) với trình tự tham chiếu Cambridge [71]. Kết quả phân tích trình tự ADN ty thể được thể hiện trong phụ lục 7.

Toàn bộ 120 mẫu đều được giải trình tự ADN ty thể thành công, tuy nhiên kích thước trình tự phân tích có những khác biệt. Trong đó, 82 mẫu thu được trình tự thuộc hai tiểu vùng PS1 và PS2, 6 mẫu chỉ phân tích được tiểu vùng PS1 và 32 mẫu chỉ có trình tự tiểu vùng PS2.

Kết quả phân tích Kruskal – Wallis: $\chi^2 = 3,0664$; $df = 3$; $p = 0,3815 > 0,05$ cho thấy không có mối liên hệ giữa kết quả giải trình tự ADN ty thể (số lượng nucleotide được xác định) và loại xương.

Một cách tương tự, kết quả giải trình tự ADN ty thể (số lượng nucleotide được xác định) và các nhóm mẫu dựa theo thang điểm phong hóa không mang ý nghĩa thống kê, khi kết quả từ phân tích Kruskal – Wallis: $\chi^2 = 6,695$; $df = 3$; $p = 0,08228 > 0,05$.

Trong nghiên cứu này, toàn bộ 120 mẫu hài cốt đã được đọc trình tự ADN ty thể trước khi tiến hành định lượng. Năm mẫu không cho kết quả định lượng ADN ty thể bao gồm A6.463, A6.479, AB030305, AB030317 và AB030616. Ba mẫu A6.463, AB030317 và AB030616 chỉ có thể khuếch đại tiểu vùng PS2 (16210 – 16365) trong khi đích ADN ty thể trong phản ứng định lượng được thiết kế thuộc tiểu vùng PS1. Điều này có thể giải thích cho kết quả định lượng âm tính của ba mẫu này. Tiểu vùng PS1 của mẫu A6.479 và cả hai tiểu vùng PS1 và PS2 của mẫu AB030305 đã được giải trình tự nhưng nồng độ định lượng ADN ty thể bằng 0 có thể do ADN trong dịch tách chiết lưu trữ trong một khoảng thời gian dài đã phân hủy hoàn toàn.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đã thu được 120 mẫu hài cốt nghiên cứu gồm: 7 mẫu xương chày, 25 mẫu xương đùi, 56 mẫu răng và 1 mẫu xương cánh tay, 11 mẫu có cả răng và xương chày, 19 mẫu có cả răng và xương đùi, 1 mẫu có cả răng và xương tay từ nghĩa trang liệt sĩ Quốc tế Việt Lào.

Đã đánh giá giai đoạn phong hóa theo Behrensmeyer 120 mẫu nghiên cứu: 05 mẫu giai đoạn phong hóa 1; 18 mẫu ở giai đoạn phong hóa 2; 71 mẫu giai đoạn phong hóa 3; 26 mẫu giai đoạn phong hóa 4.

Đã định lượng ADN nhân 120 mẫu nghiên cứu thu được ADN nhân ở mức nồng độ rất thấp: đối với đích ADN ngắn (SA) có 71 mẫu cho kết quả định lượng với nồng độ từ $9,989 \times 10^{-6}$ ng/ μ l đến $1,03 \times 10^{-2}$ ng/ μ l; đối với đích ADN dài (LA) có 24 mẫu cho kết quả định lượng với nồng độ từ $5,96 \times 10^{-6}$ đến $2,92 \times 10^{-3}$ ng/ μ l.

Đã định lượng ADN ty thể 120 mẫu thu được 115 mẫu có kết quả với nồng độ phân bố trong khoảng $1,8 \times 10^{-9}$ ng/ μ l tương đương 9 bản copy đến $1,035 \times 10^{-4}$ ng/ μ l tương đương 567.307 bản copy.

Vị trí lấy mẫu có ảnh hưởng đến nồng độ ADN nhân trong mẫu hài cốt, do đó thang điểm này có tiềm năng sử dụng như một thang điểm nhanh tại hiện trường.

Đã phân tích thành công trình tự ADN ty thể 120 mẫu nghiên cứu: 82 mẫu thu được trình tự thuộc hai tiểu vùng PS1 và PS2, 6 mẫu chỉ phân tích được tiểu vùng PS1 và 32 mẫu chỉ có trình tự tiểu vùng PS2.

KIẾN NGHỊ

Cần thực hiện nghiên cứu với số lượng mẫu lớn hơn, đại diện hơn cho các nhóm điểm để đánh giá chính xác các thang điểm này.

Kết hợp các thang điểm khác trong đánh giá mẫu, đặc biệt là các thang điểm được xây dựng dựa trên các đặc tính bên trong mẫu

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rothe, J., Nagy, M., 2016, Comparison of two silica-based extraction methods for DNA isolation from bones, *Legal Medicine*, 22, p. 36-41.
2. Alvarez-Cubero, M.J., Saiz, M., Martinez-Gonzalez, L.J., Alvarez, J.C., Eisenberg, A.J., Budowle, B., Lorente, J.A., 2012, Genetic identification of missing persons: DNA analysis of human remains and compromised samples, *Pathobiology*, 79(5), p. 228-238.
3. Ferreira, S.T.G., Paula, K.A., Maia, F.A., Moraes, A.V., 2013, A comparative study between two protocols for DNA extraction from bones, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), p. e374-e375.
4. Zeng, X., Elwick, K., Mayes, C., Takahashi, M., King, J.L., Gangitano, D., Budowle, B., Hughes-Stamm, S., 2019, Assessment of impact of DNA extraction methods on analysis of human remain samples on massively parallel sequencing success, *International journal of legal medicine*, 133, p. 51-58.
5. Mundorff, A.Z., Bartelink, E.J., Mar-Cash, E., 2009, DNA preservation in skeletal elements from the World Trade Center disaster: recommendations for mass fatality management, *Journal of forensic sciences*, 54(4), p. 739-745.
6. Alonso, A., Andelinović, S., Martín, P., Sutlović, D., Erceg, I., Huffine, E.F., Simón, L.F.D., Albarrán, C., Definis-Gojanović, M., Fernández-Rodríguez, A., García, P., Drmić, I., Rezić, B., Kuret, S., Sancho, M., Primorac, D., 2001, DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples, *Croatian medical journal*, 42(3), p. 260-266.
7. Wikipedia, 2023, Bộ xương người. Available from: https://vi.wikipedia.org/wiki/B%E1%BB%99_x%C6%B0%C6%A1ng_ng%C6%B0%E1%BB%9Di.
8. Đỗ Xuân Hợp, 1971, *Giải phẫu đại cương đầu mặt cổ*, Y học-Hà Nội.
9. Andrew, W., 2024, Human skeleton. [cited 2024 March 1]; Available from: <https://www.britannica.com/science/human-skeleton>.

10. Bartl, R., Bartl, C., 2017, Structure and Architecture of Bone, in *Bone Disorders : Biology, Diagnosis, Prevention, Therapy*, Springer International Publishing: Cham. p. 11-20.
11. Walker, J., 2020, Skeletal system 1: the anatomy and physiology of bones, *Nursing Times*, 116(2), p. 38-42.
12. Armstrong, W.D., Singer, L., 1965, Composition and constitution of the mineral phase of bone, *Clinical orthopaedics and related research*, 38, p. 179-90.
13. Agha, J.W., Knowles Jr, H.C., Alverson, G., 1958, The mineral content of normal human bone, *The Journal of clinical investigation*, 37(10), p. 1357-1361.
14. Tortora, G.J., Derrickson, B., 2014, The skeletal system: Bone tissue, in *Principles of Anatomy and Physiology, 14th Edition*. p. 171–193.
15. Morgan, E.F., Barnes, G.L., Einhorn, T.A., 2008, The bone organ system: form and function-In: Marcus, R., Feldman, D., Nelson, DA, Rosen, CJ (Eds.), *Osteoporosis*, Elsevier Academic Press, Burlington, MA.
16. Zhu, W., Robey, P.G., Boskey, A.L., 2009, The regulatory role of matrix proteins in mineralization of bone, *Fundamentals of osteoporosis*, p. 153-202.
17. Baron, R., 2003, General principles of bone biology, *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, p. 1-8.
18. Robson, L., Court, D.S., 2018, Bone, muscle, skin and connective tissue, *Medical Sciences*. : London: Elsevier.
19. Tortora, G.J., Derrickson, B., 2009, The skeletal system: bone tissue, in *Principles of Anatomy and Physiology*: Chichester: John Wiley & Sons.
20. Ralston, S.H., McInnes, I.B., 2014, Rheumatology and bone disease, *Davidson's Principles and Practice of Medicine. 22nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone*.
21. Bộ Y Tế, 2011, *Giải Phẫu Người*, NXB Giáo Dục. Vol. Tập 1.
22. Villa, C., Lynnerup, N., 2014, Age estimation of skeletal remains: principal methods, *Research and Reports in Forensic Medical Science*, p. 3-9.

23. Palmer, L.C., Newcomb, C.J., Kaltz, S.R., Spoerke, E.D., Stupp, S.I., 2008, Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel, *Chemical reviews*, 108(11), p. 4754-4783.
24. Iwamura, E.S.M., Soares-Vieira, J.A., Muñoz, D.R., 2004, Human identification and analysis of DNA in bones, *Revista do Hospital das Clínicas*, 59, p. 383-388.
25. Kitamura, S., Sugihara, K., Kuwasako, M., Tatsumi, K., 1997, The role of mammalian intestinal bacteria in the reductive metabolism of zonisamide, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 49(3), p. 253-256.
26. Svintradze, D.V., Mrevlishvili, G.M., 2005, Fiber molecular model of atelocollagen–small interfering RNA (siRNA) complex, *International journal of biological macromolecules*, 37(5), p. 283-286.
27. Orgel, J.P., Irving, T.C., Miller, A., Wess, T.J., 2006, Microfibrillar structure of type I collagen in situ, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), p. 9001-9005.
28. Campos, P.F., Craig, O.E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., Gilbert, M.T.P., 2012, DNA in ancient bone—Where is it located and how should we extract it?, *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194(1), p. 7-16.
29. Cunha, E., Baccino, E., Martrille, L., Ramsthaller, F., Prieto, J., Schuliar, Y., Cattaneo, C., Lynnerup, N., 2009, The problem of aging human remains and living individuals: a review, *Forensic science international*, 193(1-3), p. 1-13.
30. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985, Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA, *Nature*, 316(6023), p. 76-79.
31. Hochmeister, M.N., Budowle, B., Borer, U.V., Eggmann, U., Comey, C.T., Dirnhofer, R., 1991, Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains, *J Forensic Sci*, 36, p. 1649-1661.
32. Yamamoto, T., Uchihi, R., Kojima, T., Nozawa, H., Huang, X.L., Tamaki, K., Katsumata, Y., 1998, Maternal identification from skeletal remains of an infant kept by the alleged mother for 16 years with DNA typing, *Journal of forensic sciences*, 43(3), p. 701-705.

33. Rankin, D.R., Narveson, S.D., Birkby, W.H., Lai, J., 1996, Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis on DNA from human compact bone, *Journal of forensic sciences*, 41(1), p. 40-46.
34. Hochmeister, M.N., Budowle, B., Borer, U.V., Rudin, O., Bohnert, M., Dirnhofer, R., 1995, Confirmation of the identity of human skeletal remains using multiplex PCR amplification and typing kits, *Journal of forensic sciences*, 40(4), p. 701-705.
35. Gill, P., Ivanov, P.L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E., Sullivan, K., 1994, Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis, *Nature genetics*, 6(2), p. 130-135.
36. Evison, M.P., Smillie, D.M., Chamberlain, A.T., 1997, Extraction of single-copy nuclear DNA from forensic specimens with a variety of postmortem histories, *Journal of Forensic Sciences*, 42(6), p. 1032-1038.
37. Cattaneo, C., Craig, O.E., James, N.T., Sokol, R.J., 1997, Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences, *Journal of Forensic Sciences*, 42(6), p. 1126-1135.
38. Cattaneo, C., Smillie, D.M., Gelsthorpe, K., Piccinini, A., Gelsthorpe, A.R., Sokol, R.J., 1995, A simple method for extracting DNA from old skeletal material, *Forensic Science International*, 74(3), p. 167-174.
39. Alonso, A., Andelinovic, S., Martín, P., Sutlovic, D., Erceg, I., Huffine, E.F., Simón, L.F.D., Albarrán, C., Definis-Gojanovic, M., Fernández-Rodríguez, A., 2001, DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples, *Croatian medical journal*, 42(3), p. 260-266.
40. Primorac, D., Andelinovic, S., Definis-Gojanovic, M., Drmic, I., Rezic, B., Baden, M.M., Kennedy, M.A., Schanfield, M.S., Skakel, S.B., Lee, H.C., 1996, Identification of war victims from mass graves in Croatia, Bosnia, and Herzegovina by the use of standard forensic methods and DNA typing, *Journal of forensic sciences*, 41(5), p. 891-894.
41. Sigurðardóttir, S., Helgason, A., Gulcher, J.R., Stefansson, K., Donnelly, P., 2000, The mutation rate in the human mtDNA control region, *The American Journal of Human Genetics*, 66(5), p. 1599-1609.

42. Scally, A., 2016, The mutation rate in human evolution and demographic inference, *Current opinion in genetics & development*, 41, p. 36-43.
43. Greenberg, B.D., Newbold, J.E., Sugino, A., 1983, Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA, *Gene*, 21(1-2), p. 33-49.
44. Nicholls, T.J., Minczuk, M., 2014, In D-loop: 40years of mitochondrial 7S DNA, *Experimental Gerontology*, 56, p. 175-181.
45. Hummel, S., Schultes, T., Bramanti, B., Herrmann, B., 1999, Ancient DNA profiling by megaplex amplications, *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 20(8), p. 1717-1721.
46. Rickards, O., Martínez-Labarga, C., Favaro, M., Frezza, D., Mallegni, F., 2001, DNA analyses of the remains of the Prince Branciforte Barresi family, *International Journal of Legal Medicine*, 114, p. 141-146.
47. Corach, D., Sala, A., Penacino, G., Iannucci, N., Bernardi, P., Doretti, M., Fondebrider, L., Ginarte, A., Inchaurregui, A., Omigiana, C., 1997, Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: the search for “missing” persons killed during the last dictatorship in Argentina, *Electrophoresis*, 18(9), p. 1608-1612.
48. Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., Bellis, G.D., Caramelli, D., 2012, Ancient DNA studies: new perspectives on old samples, *Genetics Selection Evolution*, 44, p. 1-19.
49. Hochmeister, M.N., Budowle, B., Borer, U.V., Eggmann, U., Comey, C.T., Dirnhofer, R., 1991, Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains, *Journal of Forensic Sciences*, 36(6), p. 1649-1661.
50. Loreille, O.M., Diegoli, T.M., Irwin, J.A., Coble, M.D., Parsons, T.J., 2007, High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization, *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), p. 191-195.
51. Höss, M., Pääbo, S., 1993, DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method, *Nucleic acids research*, 21(16), p. 3913.
52. Meijer, H., Perizonius, W.R.K., Geraedts, J.P.M., 1992, Recovery and identification of DNA sequences harboured in preserved ancient human

- bones, *Biochemical and biophysical research communications*, 183(2), p. 367-374.
53. Fisher, D.L., Holland, M.M., Mitchell, L., Sledzik, P.S., Wilcox, A.W., Wadhams, M., Weedn, V.W., 1993, Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone, *Journal of Forensic Sciences*, 38(1), p. 60-68.
 54. Taylor, A.H., Miller, R., Gray, R.D., 2012, New Caledonian crows reason about hidden causal agents, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), p. 16389-16391.
 55. Fondevila, M., Phillips, C., Naverán, N., Cerezo, M., Rodríguez, A., Calvo, R., Fernández, L.M., Carracedo, Á., Lareu, M.V., 2008, Challenging DNA: assessment of a range of genotyping approaches for highly degraded forensic samples, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), p. 26-28.
 56. Nissanka, N., Moraes, C.T., 2018, Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease, *FEBS letters*, 592(5), p. 728-742.
 57. Thomas, M., Gilbert, P., 2006, Postmortem damage of mitochondrial DNA, in *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens*, Springer. p. 91-115.
 58. Meindl, R.S., Lovejoy, C.O., 1985, Ectocranial suture closure: A revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral-anterior sutures, *American journal of physical anthropology*, 68(1), p. 57-66.
 59. Ambekar, S.S., Hattur, S.S., Bule, P.B., 2017, DNA: Damage and repair mechanisms in humans, *group*, 1, p. 7.
 60. Franklin, D., 2010, Forensic age estimation in human skeletal remains: current concepts and future directions, *Legal Medicine*, 12(1), p. 1-7.
 61. Drohat, A.C., Maiti, A., 2014, Mechanisms for enzymatic cleavage of the N-glycosidic bond in DNA, *Organic & biomolecular chemistry*, 12(42), p. 8367-8378.
 62. Tridico, S.R., Koch, S., Michaud, A., Thomson, G., Kirkbride, K.P., Bunce, M., 2014, Interpreting biological degradative processes acting on mammalian hair in the living and the dead: which ones are taphonomic?,

- Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1796), p. 20141755.
63. Briggs, A.W., Good, J.M., Green, R.E., Krause, J., Maricic, T., Stenzel, U., Lalueza-Fox, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Z., Gusic, I., Schmitz, R., Doronichev, V.B., Golovanova, L.V., Rasilla, M.D.L., Fortea, J., Rosas, A., Pääbo, S., 2009, Targeted retrieval and analysis of five Neandertal mtDNA genomes, *Science*, 325(5938), p. 318-321.
 64. Behrensmeyer, A.K., 1978, Taphonomic and ecologic information from bone weathering, *Paleobiology*, 4(2), p. 150-162.
 65. Boles, T.C., Snow, C.C., Stover, E., 1995, Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala, *Journal of Forensic Sciences*, 40(3), p. 349-355.
 66. Wikipedia, 2024, Human tooth. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Human_tooth.
 67. International Commission on Missing Persons, 2015, Standard operating procedure for sampling bone and tooth specimens from human remains for DNA testing at the ICMP.
 68. Behrensmeyer, A.K., Boaz, D.E.D., Hill, A.P., 1980, The recent bones of Amboseli Park, Kenya, in relation to East African paleoecology, *Fossils in the making: Vertebrate taphonomy and paleoecology*, 69, p. 72-92.
 69. Thermo Fisher Scientific, 2018 Quantifiler HP and Trio DNA Quantification Kits User Guide (Pub. No. 4485354 Rev. H).
 70. Gabriel, M.N., Huffine, E.F., Ryan, J.H., Holland, M.M., Parsons, T.J., 2001, Improved MtDNA sequence analysis of forensic remains using a “mini-primer set” amplification strategy, *Journal of forensic sciences*, 46(2), p. 247-253.
 71. Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., Howell, N., 1999, Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA, *Nature genetics*, 23(2), p. 147-147.
 72. Parson, W., Gusmao, L., Hares, D.R., Irwin, J.A., Mayr, W.R., Morling, N., Pokorak, E., Prinz, M., Salas, A., Schneider, P.M., 2014, DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised

- and extended guidelines for mitochondrial DNA typing, *Forensic Science International: Genetics*, 13, p. 134-142.
73. Obal, M., Zupanc, T., Pajnič, I.Z., 2023, Measure quantity of mitochondrial DNA in aged bones or calculate it from nuclear DNA quantitative PCR results?, *International journal of legal medicine*, 137(6), p. 1653-1659.
 74. Pajnič, I.Z., Inkret, J., Zupanc, T., Podovšovnik, E., 2021, Comparison of nuclear DNA yield and STR typing success in Second World War petrous bones and metacarpals III, *Forensic Science International: Genetics*, 55, p. 102578.
 75. Šuligoj, A., Mesesnel, S., Leskovar, T., Podovšovnik, E., Pajnič, I.Z., 2022, Comparison of DNA preservation between adult and non-adult ancient skeletons, *International Journal of Legal Medicine*, 136(6), p. 1521-1539.
 76. Zupanc, T., Podovšovnik, E., Obal, M., Pajnič, I.Z., 2021, High DNA yield from metatarsal and metacarpal bones from Slovenian Second World War skeletal remains, *Forensic Science International: Genetics*, 51, p. 102426.
 77. Božič, L., Bevc, T.B., Podovšovnik, E., Zupanc, T., Pajnič, I.Z., 2022, Comparison of DNA preservation between ribs and vertebrae, *International Journal of Legal Medicine*, 136(5), p. 1247-1253.
 78. Boer, H.H.D., Roberts, J., Delabarde, T., Mundorff, A.Z., Blau, S., 2020, Disaster victim identification operations with fragmented, burnt, or commingled remains: experience-based recommendations, *Forensic Sciences Research*, 5(3), p. 191-201.
 79. Edson, S.M., Ross, J.P., Coble, M.D., Parson, T.J., Barritt, S.M., 2004, Naming the dead-confronting the realities of the rapid identification of degraded skeletal remains, *Forensic science review*, 16(1), p. 63-88.
 80. Ferreira, S.T.G., Kuser, H.H., Garrido, R.G., Trindade-Filho, A., Paula, K.A., Galvão, M.F., Moraes, A.V., 2011, Floods and mudslides in the State of Rio de Janeiro and a plane crash in the Brazilian Amazon rainforest: A study of two different experiences in disaster victim identification (DVI), *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), p. e516-e517.

81. Mundorff, A.Z., Davoren, J.M., 2014, Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals, *Forensic Science International: Genetics*, 8(1), p. 55-63.
82. Misner, L.M., Halvorson, A.C., Dreier, J.L., Ubelaker, D.H., Foran, D.R., 2009, The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity, *Journal of forensic sciences*, 54(4), p. 822-828.

A

PHỤ LỤC**Phụ lục 1: Danh sách mẫu và loại mẫu hài cốt liệt sĩ nghiên cứu**

STT	Tên mẫu	Loại mẫu
1	A6.015	03 răng + 01 đoạn xương chày 11cm x 2,5cm
2	A6.023	01 đoạn xương đùi 6,5cm x 2,7cm
3	A6.038	01 đoạn xương đùi 8,7cm x 2,5cm
4	A6.046	06 răng
5	A6.051	01 đoạn xương đùi 8,1cm x 2,5cm
6	A6.068	06 răng
7	A6.070	01 đoạn xương đùi 8,2cm x 2,2cm
8	A6.090	01 đoạn xương đùi 7cm x 2,8cm +01 đoạn xương đùi 4cm x 2,8cm
9	A6.104	04 răng + 01 đoạn xương chày 7cm x 2,2cm
10	A6.152	01 đoạn xương đùi 8,7cm x 2,6cm
11	A6.162	01 đoạn xương chày 7,4cm x 2,4cm
12	A6.164	01 đoạn xương đùi 7cm x 2,2cm
13	A6.166	01 đoạn xương đùi 9cm x 2,2cm
14	A6.187	02 răng hàm
15	A6.188	01 đoạn xương đùi 8cm x 2cm
16	A6.192	03 răng + 01 đoạn xương đùi 9cm x 2cm
17	A6.195	02 răng
18	A6.200	01 đoạn xương cánh tay 8cm x 2cm
19	A6.218	07 răng
20	A6.237	01 đoạn xương đùi 6,5cm x 2,5cm
21	A6.247	03 răng
22	A6.254	01 đoạn xương chày 6cm x 2cm
23	A6.258	01 đoạn xương đùi 7cm x 2cm
24	A6.262	01 đoạn xương đùi 9cm x 2cm
25	A6.287	02 răng + 01 đoạn xương đùi 5cm x 2cm
26	A6.289	02 răng + 01 đoạn xương chày 6cm x 2cm

B

STT	Tên mẫu	Loại mẫu
27	A6.291	04 răng + 01 đoạn xương đùi 5cm x 2cm
28	A6.302	03 răng + 01 đoạn xương đùi 9cm x 2cm
29	A6.317	05 răng
30	A6.324	03 răng
31	A6.331	01 đoạn xương chày 8,3cm x 2,9cm
32	A6.334	02 răng + 01 đoạn xương chày 7cm x 2,3cm
33	A6.344	01 đoạn xương đùi 9cm x 2,1cm
34	A6.346	01 đoạn xương đùi 7,5cm x 2cm
35	A6.351	02 răng
36	A6.357	05 răng + 01 đoạn xương đùi 6cm x 2cm
37	A6.358	05 răng + 01 đoạn xương đùi 7,5cm x 2,5cm
38	A6.367	01 đoạn xương đùi 8cm x 2cm
39	A6.370	01 Răng hàm
40	A6.373	03 răng + 01 đoạn xương đùi 6,5cm x 2,5cm
41	A6.376	01 đoạn xương đùi 8,5cm x 2,5cm
42	A6.378	03 răng + 01 đoạn xương đùi 8cm x 2,5cm
43	A6.383	02 răng + 01 đoạn xương đùi 8cm x 2,5cm
44	A6.385	02 răng + 01 đoạn xương đùi 8cm x 2,5cm
45	A6.391	03 răng + 01 đoạn xương đùi 8cm x 2,5cm
46	A6.427	02 răng
47	A6.428	07 răng
48	A6.441	04 răng + 01 đoạn xương chày 5cm x 2,5cm
49	A6.460	03 răng + 01 đoạn xương cánh tay 8cm x 2cm
50	A6.463	04 răng
51	A6.464	06 răng
52	A6.479	01 đoạn xương đùi 7,5cm x 2,5cm
53	A6.485	05 răng
54	A6.488	05 răng
55	A6.500	01 răng + 01 đoạn xương đùi 9cm x 2,5cm

C

STT	Tên mẫu	Loại mẫu
56	A6.508	01 răng + 01 đoạn xương chày 7cm x 3cm
57	A6.514	03 răng
58	A6.537	05 răng + 01 đoạn xương đùi 9cm x 2,2cm
59	A6.538	03 răng + 01 đoạn xương đùi 6,7cm x 2,5cm
60	A6.539	03 răng + 01 đoạn xương đùi 8,9cm x 2,8cm
61	A6.555	04 răng + 01 đoạn xương chày 7cm x 2,5cm
62	A6.561	04 răng + 01 đoạn xương chày 7cm x 2cm
63	A6.562	01 đoạn xương chày 6,5cm x 3cm
64	A6.570	05 răng
65	A6.575	04 răng + 01 đoạn xương đùi 7cm x 3cm
66	A6.606	03 răng + 01 đoạn xương chày 7,2cm x 2,2cm
67	A6.607	01 đoạn xương chày 5cm x 2,7cm
68	A6.617	05 răng + 01 đoạn xương chày 8cm x 2,2cm
69	A6.638	05 răng
70	A6.667	01 đoạn xương chày 7,2cm x 2,3cm
71	A6.669	01 đoạn xương đùi 8,3cm x 2,5cm
72	A6.690	01 đoạn xương đùi 6,3cm x 2,3cm
73	A6.700	04 răng + 01 đoạn xương đùi 9cm x 2cm
74	A6.746	01 đoạn xương đùi 7,8cm x 2,7cm
75	A6.754	04 răng + 01 đoạn xương đùi 8,6cm x 2,2cm
76	A6.758	01 đoạn xương đùi 6,8cm x 2,6cm
77	A6.759	05 răng + 01 đoạn xương chày 7cm x 2,6cm
78	A6.760	02 răng
79	A6.768	02 răng
80	A6.776	03 răng
81	A6.780	02 răng
82	A6.782	02 răng
83	A6.798	01 đoạn xương đùi 7,5cm x 2,8cm
84	A6.800	05 răng + 01 đoạn xương chày 6,7cm x 2,8cm

D

STT	Tên mẫu	Loại mẫu
85	AB030111	01 đoạn xương chày 3,2cm x 2,2cm
86	AB030123	02 răng
87	AB030202	02 răng
88	AB030214	01 đoạn xương đùi 3,8cm x 2,5cm
89	AB030221	02 răng
90	AB030223	02 răng
91	AB030305	02 răng
92	AB030308	01 răng
93	AB030311	01 răng
94	AB030315	02 răng
95	AB030317	02 răng
96	AB030318	02 răng
97	AB030406	02 răng
98	AB030409	03 răng
99	AB030501	02 răng
100	AB030503	02 răng
101	AB030509	02 răng
102	AB030510	02 răng
103	AB030512	02 răng
104	AB030513	02 răng
105	AB030515	05 mảnh xương đùi
106	AB030601	02 răng
107	AB030603	02 răng
108	AB030604	02 răng
109	AB030608	03 răng
110	AB030611	02 răng
111	AB030612	03 răng
112	AB030613	03 răng
113	AB030616	02 răng

E

STT	Tên mẫu	Loại mẫu
114	AB030620	03 răng
115	AB030622	01 đoạn xương đùi 5cm x 2,1cm
116	AB030701	02 răng
117	AB030714	02 răng
118	AB030721	03 răng
119	AB031006	03 răng
120	AB031022	03 răng

F

Phụ lục 2: Ảnh chụp hồ sơ giám định mẫu nghiên cứu



G



H



Phụ lục 3: Danh sách loại mẫu sử dụng trong thí nghiệm

STT	Tên mẫu	Loại mẫu gốc	Loại mẫu thí nghiệm
1	A6.015	Răng + xương chày	Răng
2	A6.023	Xương đùi	Xương đùi
3	A6.038	Xương đùi	Xương đùi
4	A6.046	Răng	Răng
5	A6.051	Xương đùi	Xương đùi
6	A6.068	Răng	Răng
7	A6.070	Xương đùi	Xương đùi
8	A6.090	Xương đùi	Xương đùi
9	A6.104	Răng + xương chày	xương chày
10	A6.152	Xương đùi	Xương đùi
11	A6.162	Xương chày	Xương chày
12	A6.164	Xương đùi	Xương đùi
13	A6.166	Xương đùi	Xương đùi
14	A6.187	Răng	Răng
15	A6.188	Xương đùi	Xương đùi
16	A6.192	Răng + xương đùi	Răng
17	A6.195	Răng	Răng
18	A6.200	Xương cánh tay	Xương cánh tay
19	A6.218	Răng	Răng
20	A6.237	Xương đùi	Xương đùi
21	A6.247	Răng	Răng
22	A6.254	Xương chày	Xương chày
23	A6.258	Xương đùi	Xương đùi
24	A6.262	Xương đùi	Xương đùi
25	A6.287	Răng + xương đùi	Răng
26	A6.289	Răng + xương chày	Xương chày
27	A6.291	Răng + xương đùi	Răng
28	A6.302	Răng + xương đùi	Răng
29	A6.317	Răng	Răng
30	A6.324	Răng	Răng
31	A6.331	Xương chày	Xương chày
32	A6.334	Răng + xương chày	Xương chày
33	A6.344	Xương đùi	Xương đùi
34	A6.346	Xương đùi	Xương đùi
35	A6.351	Răng	Răng

STT	Tên mẫu	Loại mẫu gốc	Loại mẫu thí nghiệm
36	A6.357	Răng + xương đùi	Răng
37	A6.358	Răng + xương đùi	Xương đùi
38	A6.367	Xương đùi	Xương đùi
39	A6.370	Răng	Răng
40	A6.373	Răng + xương đùi	Xương đùi
41	A6.376	Xương đùi	Xương đùi
42	A6.378	Răng + xương đùi	Xương đùi
43	A6.383	Răng + xương đùi	Xương đùi
44	A6.385	Răng + xương đùi	Xương đùi
45	A6.391	Răng + xương đùi	Xương đùi
46	A6.427	Răng	Răng
47	A6.428	Răng	Răng
48	A6.441	Răng + xương chày	Xương chày
49	A6.460	Răng + xương cánh tay	Xương cánh tay
50	A6.463	Răng	Răng
51	A6.464	Răng	Răng
52	A6.479	Xương đùi	Xương đùi
53	A6.485	Răng	Răng
54	A6.488	Răng	Răng
55	A6.500	Răng + xương đùi	Xương đùi
56	A6.508	Răng + xương chày	Xương chày
57	A6.514	Răng	Răng
58	A6.537	Răng + xương đùi	Răng
59	A6.538	Răng + xương đùi	Xương đùi
60	A6.539	Răng + xương đùi	Xương đùi
61	A6.555	Răng + xương chày	Xương chày
62	A6.561	Răng + xương chày	Răng
63	A6.562	Xương chày	Xương chày
64	A6.570	Răng	Răng
65	A6.575	Răng + xương đùi	Răng
66	A6.606	Răng + xương chày	Xương chày
67	A6.607	Xương chày	Xương chày
68	A6.617	Răng + xương chày	Xương chày
69	A6.638	Răng	Răng
70	A6.667	Xương chày	Xương chày
71	A6.669	Xương đùi	Xương đùi

K

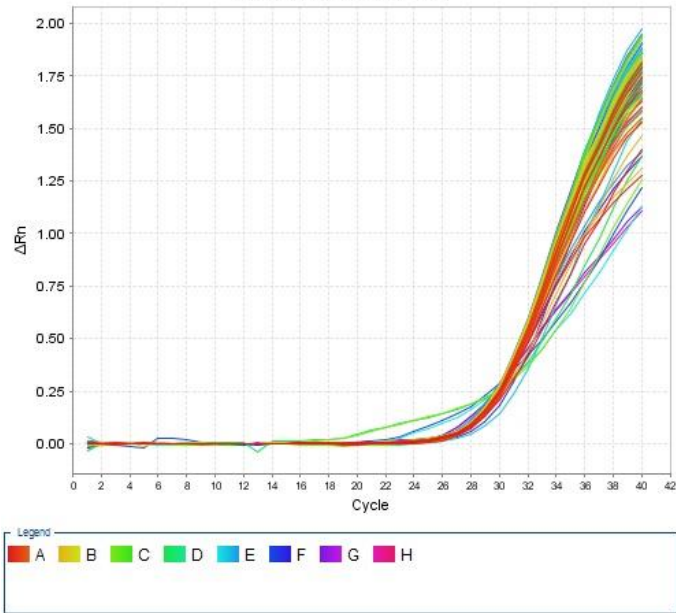
STT	Tên mẫu	Loại mẫu gốc	Loại mẫu thí nghiệm
72	A6.690	Xương đùi	Xương đùi
73	A6.700	Răng + xương đùi	Răng
74	A6.746	Xương đùi	Xương đùi
75	A6.754	Răng + xương đùi	Xương đùi
76	A6.758	Xương đùi	Xương đùi
77	A6.759	Răng + xương chày	Răng
78	A6.760	Răng	Răng
79	A6.768	Răng	Răng
80	A6.776	Răng	Răng
81	A6.780	Răng	Răng
82	A6.782	Răng	Răng
83	A6.798	Xương đùi	Xương đùi
84	A6.800	Răng + xương chày	Xương chày
85	AB030111	Xương chày	Xương chày
86	AB030123	Răng	Răng
87	AB030202	Răng	Răng
88	AB030214	Xương đùi	Xương đùi
89	AB030221	Răng	Răng
90	AB030223	Răng	Răng
91	AB030305	Răng	Răng
92	AB030308	Răng	Răng
93	AB030311	Răng	Răng
94	AB030315	Răng	Răng
95	AB030317	Răng	Răng
96	AB030318	Răng	Răng
97	AB030406	Răng	Răng
98	AB030409	Răng	Răng
99	AB030501	Răng	Răng
100	AB030503	Răng	Răng
101	AB030509	Răng	Răng
102	AB030510	Răng	Răng
103	AB030512	Răng	Răng
104	AB030513	Răng	Răng
105	AB030515	Xương đùi	Xương đùi
106	AB030601	Răng	Răng
107	AB030603	Răng	Răng

L

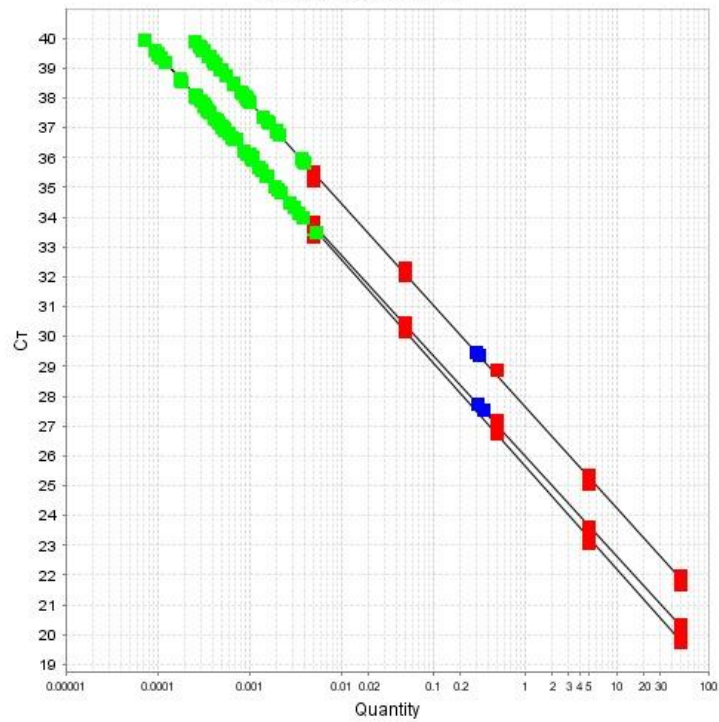
STT	Tên mẫu	Loại mẫu gốc	Loại mẫu thí nghiệm
108	AB030604	Răng	Răng
109	AB030608	Răng	Răng
110	AB030611	Răng	Răng
111	AB030612	Răng	Răng
112	AB030613	Răng	Răng
113	AB030616	Răng	Răng
114	AB030620	Răng	Răng
115	AB030622	Xương đùi	Xương đùi
116	AB030701	Răng	Răng
117	AB030714	Răng	Răng
118	AB030721	Răng	Răng
119	AB031006	Răng	Răng
120	AB031022	Răng	Răng

Phụ lục 4: Đường cong nhân bản và đường chuẩn định lượng ADN nhân

Amplification Plot



Standard Curve



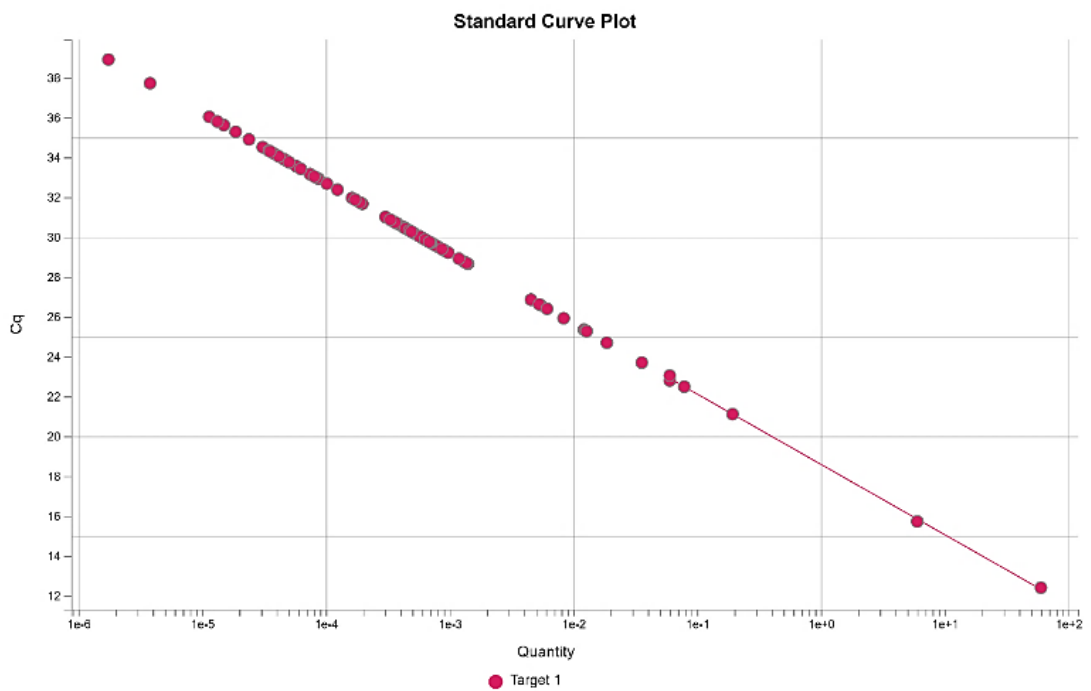
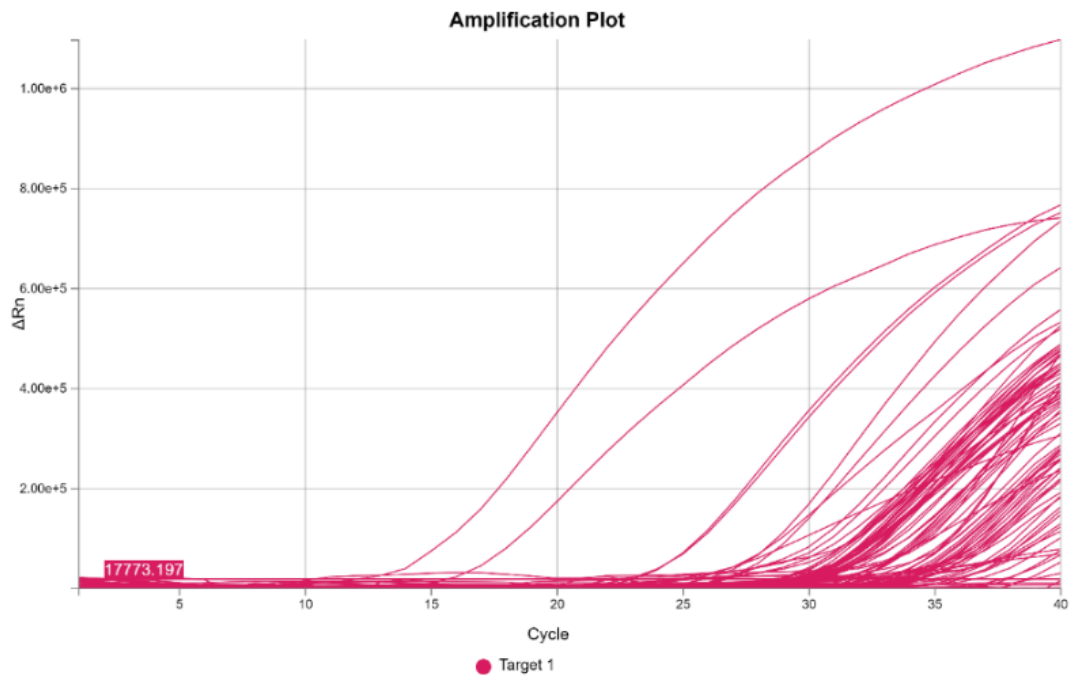
Target: T.Large Autosomal **Slope:** -3.37 **Y-Inter:** 26.014 **R²:** 1 **Eff%:** 98.036

Target: T.Small Autosomal **Slope:** -3.409 **Y-Inter:** 27.658 **R²:** 0.999 **Eff%:** 96.502

Target: T.Y **Slope:** -3.449 **Y-Inter:** 25.669 **R²:** 0.999 **Eff%:** 94.946



Phụ lục 5: Đường cong nhân bản và đường chuẩn định lượng ADN ty thể



Target: Target 1 Slop: -3.53 R²: 0.999 Y-Inter: 18.593 Eff%: 92.008 Error: 0.063

Phụ lục 6: Tên mẫu và kết quả định lượng ADN nhân, ADN ty thể

STT	Tên mẫu	Loại mẫu	Định lượng ADN nhân (ng / μ L)		Chỉ số suy thoái (DI)	Số lượng ADN ty thể (Copies)
			Đích ADN nhỏ (SA)	Đích ADN lớn (LA)		
1	A6.015	Răng	NA	NA	NA	$4,99 \times 10^4$
2	A6.023	Đùi	0.000848	0.000196	4.327841	$4,85 \times 10^4$
3	A6.038	Đùi	0.005007	0.000694	7.310805	$4,39 \times 10^4$
4	A6.046	Răng	NA	NA	NA	$5,12 \times 10^4$
5	A6.051	Đùi	0.002089	0.000133	16.939899	$4,47 \times 10^4$
6	A6.068	Răng	NA	NA	NA	$4,72 \times 10^4$
7	A6.070	Đùi	NA	NA	NA	$4,49 \times 10^4$
8	A6.090	Đùi	0.001617	NA	NA	$5,20 \times 10^4$
9	A6.104	Chày	0.000731	NA	NA	$5,14 \times 10^4$
10	A6.152	Đùi	0.000604	NA	NA	$5,69 \times 10^4$
11	A6.162	Chày	0.001074	0.000464	2.5880601	$4,72 \times 10^4$
12	A6.164	Đùi	0.001798	0.000673	7.099625	$5,38 \times 10^4$
13	A6.166	Đùi	0.001136	NA	NA	$5,70 \times 10^4$
14	A6.187	Răng	0.000217	NA	NA	$5,21 \times 10^4$
15	A6.188	Đùi	0.003248	0.000471	11.712278	$6,36 \times 10^4$
16	A6.192	Răng	0.001749	0.001588	1.107249	$5,54 \times 10^4$
17	A6.195	Răng	0.000266	NA	NA	$5,84 \times 10^3$
18	A6.200	Tay	NA	NA	NA	$4,535 \times 10^4$
19	A6.218	Răng	0.000222	0.000606	0.336674	$5,14 \times 10^4$
20	A6.237	Đùi	0.000495	NA	NA	$5,28 \times 10^4$
21	A6.247	Răng	0.000369	NA	NA	$4,63 \times 10^4$
22	A6.254	Chày	0.000541	NA	NA	$4,50 \times 10^4$
23	A6.258	Đùi	0.000494	NA	NA	$4,72 \times 10^4$
24	A6.262	Đùi	0.000259	NA	NA	$4,91 \times 10^4$
25	A6.287	Răng	NA	NA	NA	$5,30 \times 10^4$
26	A6.289	Chày	0.003810	0.000207	20.549746	$5,08 \times 10^4$
27	A6.291	Răng	0.000810	0.000303	2.976037	$4,69 \times 10^4$
28	A6.302	Răng	NA	NA	NA	$4,75 \times 10^4$
29	A6.317	Răng	NA	NA	NA	$5,33 \times 10^4$
30	A6.324	Răng	NA	NA	NA	$3,35 \times 10^4$
31	A6.331	Chày	0.001430	NA	NA	$4,75 \times 10^4$

P

STT	Tên mẫu	Loại mẫu	Định lượng ADN nhân (ng / μ L)		Chỉ số suy thoái (DI)	Số lượng ADN ty thể (Copies)
			Đích ADN nhỏ (SA)	Đích ADN lớn (LA)		
32	A6.334	Chày	0.000483	NA	NA	$5,21 \times 10^4$
33	A6.344	Đùi	NA	NA	NA	$4,56 \times 10^4$
34	A6.346	Đùi	0.000452	NA	NA	$4,60 \times 10^4$
35	A6.351	Răng	0.000580	NA	NA	$1,30 \times 10^4$
36	A6.357	Răng	NA	NA	NA	$5,44 \times 10^4$
37	A6.358	Đùi	0.001660	NA	NA	$5,22 \times 10^4$
38	A6.367	Đùi	0.000644	NA	NA	$4,66 \times 10^4$
39	A6.370	Răng	0.000296	NA	NA	$5,87 \times 10^4$
40	A6.373	Đùi	0.000186	NA	NA	$5,09 \times 10^4$
41	A6.376	Đùi	NA	NA	NA	$2,16 \times 10^5$
42	A6.378	Đùi	0.000748	NA	NA	$5,11 \times 10^2$
43	A6.383	Đùi	0.000907	NA	NA	$4,27 \times 10^3$
44	A6.385	Đùi	0.000747	NA	NA	$1,05 \times 10^3$
45	A6.391	Đùi	0.000296	NA	NA	$1,05 \times 10^3$
46	A6.427	Răng	0.001312	NA	NA	$8,54 \times 10^4$
47	A6.428	Răng	NA	NA	NA	$1,01 \times 10^3$
48	A6.441	Chày	0.000287	NA	NA	$1,38 \times 10^3$
49	A6.460	Tay	NA	NA	NA	$1,31 \times 10^2$
50	A6.463	Răng	NA	NA	NA	0
51	A6.464	Răng	NA	NA	NA	$1,49 \times 10^4$
52	A6.479	Đùi	NA	NA	NA	0
53	A6.485	Răng	NA	NA	NA	$3,87 \times 10^3$
54	A6.488	Răng	NA	NA	NA	$4,44 \times 10^2$
55	A6.500	Đùi	NA	NA	NA	$3,81 \times 10^2$
56	A6.508	Chày	0.003965	0.001039	3.825458	$1,02 \times 10^5$
57	A6.514	Răng	0.000670	NA	NA	$1,43 \times 10^3$
58	A6.537	Răng	NA	NA	NA	$2,00 \times 10^4$
59	A6.538	Đùi	0.000312	NA	NA	$2,23 \times 10^3$
60	A6.539	Đùi	0.001860	NA	NA	$3,43 \times 10^4$
61	A6.555	Chày	0.000290	0.000095	3.053608	$2,00 \times 10^2$
62	A6.561	Răng	0.000544	NA	NA	$5,41 \times 10^3$
63	A6.562	Chày	0.000456	0.000097	5.076607	$7,30 \times 10^3$

Q

STT	Tên mẫu	Loại mẫu	Định lượng ADN nhân (ng / μ L)		Chỉ số suy thoái (DI)	Số lượng ADN ty thể (Copies)
			Đích ADN nhỏ (SA)	Đích ADN lớn (LA)		
64	A6.570	Răng	NA	NA	NA	$9,18 \times 10^2$
65	A6.575	Răng	NA	NA	NA	$3,84 \times 10^3$
66	A6.606	Chày	NA	NA	NA	$2,21 \times 10^2$
67	A6.607	Chày	0.000351	NA	NA	$3,62 \times 10^3$
68	A6.617	Chày	0.000955	0.000111	9.110577	$6,80 \times 10^2$
69	A6.638	Răng	NA	NA	NA	$9,59 \times 10^0$
70	A6.667	Chày	0.001955	0.000289	6.835095	$3,84 \times 10^3$
71	A6.669	Đùi	0.001712	0.000284	6.003031	$5,32 \times 10^5$
72	A6.690	Đùi	0.000298	NA	NA	$3,01 \times 10^2$
73	A6.700	Răng	NA	NA	NA	$3,52 \times 10^4$
74	A6.746	Đùi	NA	NA	NA	$2,11 \times 10^2$
75	A6.754	Đùi	0.003709	0.000588	6.641322	$3,71 \times 10^3$
76	A6.758	Đùi	NA	NA	NA	$4,17 \times 10^1$
77	A6.759	Răng	0.000432	NA	NA	$2,61 \times 10^3$
78	A6.760	Răng	0.000990	NA	NA	$3,31 \times 10^3$
79	A6.768	Răng	0.000313	NA	NA	$1,62 \times 10^4$
80	A6.776	Răng	0.000374	NA	NA	$4,25 \times 10^3$
81	A6.780	Răng	0.000145	NA	NA	$6,32 \times 10^4$
82	A6.782	Răng	0.000016	0.000008	1.946767	$2,03 \times 10^5$
83	A6.798	Đùi	0.000256	0.000010	25.133604	$6,91 \times 10^2$
84	A6.800	Chày	0.000016	NA	NA	$4,25 \times 10^2$
85	AB030111	Chày	0.010295	0.002924	3.506082	$2,08 \times 10^4$
86	AB030123	Răng	0.000086	NA	NA	$2,48 \times 10^3$
87	AB030202	Răng	NA	NA	NA	$3,00 \times 10^3$
88	AB030214	Đùi	0.000264	0.000041	10.674672	$4,48 \times 10^3$
89	AB030221	Răng	0.000051	NA	NA	$3,75 \times 10^4$
90	AB030223	Răng	0.000073	NA	NA	$1,25 \times 10^3$
91	AB030305	Răng	NA	NA	NA	0
92	AB030308	Răng	NA	NA	NA	$2,39 \times 10^3$
93	AB030311	Răng	NA	NA	NA	$2,37 \times 10^1$
94	AB030315	Răng	NA	NA	NA	$9,13 \times 10^3$
95	AB030317	Răng	NA	NA	NA	0

R

STT	Tên mẫu	Loại mẫu	Định lượng ADN nhân (ng / μ L)		Chỉ số suy thoái (DI)	Số lượng ADN ty thể (Copies)
			Đích ADN nhỏ (SA)	Đích ADN lớn (LA)		
96	AB030318	Răng	0.000184	0.000045	4.368227	$3,70 \times 10^5$
97	AB030406	Răng	0.000128	0.00000596	20.93474	$9,13 \times 10^4$
98	AB030409	Răng	0.000017	NA	NA	$6,37 \times 10^4$
99	AB030501	Răng	NA	NA	NA	$1,07 \times 10^2$
100	AB030503	Răng	NA	NA	NA	$2,81 \times 10^3$
101	AB030509	Răng	NA	NA	NA	$7,53 \times 10^3$
102	AB030510	Răng	0.000012	NA	NA	$1,55 \times 10^5$
103	AB030512	Răng	NA	NA	NA	$1,30 \times 10^4$
104	AB030513	Răng	0.000029	NA	NA	$3,12 \times 10^4$
105	AB030515	Đùi	NA	NA	NA	$1,41 \times 10^3$
106	AB030601	Răng	NA	NA	NA	$2,17 \times 10^3$
107	AB030603	Răng	NA	NA	NA	$7,66 \times 10^3$
108	AB030604	Răng	NA	NA	NA	$5,67 \times 10^4$
109	AB030608	Răng	NA	NA	NA	$2,79 \times 10^3$
110	AB030611	Răng	0.000017	NA	NA	$5,67 \times 10^5$
111	AB030612	Răng	NA	NA	NA	$1,90 \times 10^3$
112	AB030613	Răng	0.000227	0.000007	31.384848	$7,64 \times 10^4$
113	AB030616	Răng	NA	NA	NA	0
114	AB030620	Răng	0.000038	NA	NA	$1,61 \times 10^3$
115	AB030622	Đùi	NA	NA	NA	$4,76 \times 10^3$
116	AB030701	Răng	NA	NA	NA	$1,94 \times 10^1$
117	AB030714	Răng	NA	NA	NA	$9,01 \times 10^3$
118	AB030721	Răng	NA	NA	NA	$6,81 \times 10^3$
119	AB031006	Răng	0.000010	NA	NA	$1,50 \times 10^4$
120	AB031022	Răng	0.000363	NA	NA	$2,51 \times 10^4$

Phụ lục 7: Kết quả giải trình tự ADN ty thể mẫu nghiên cứu

STT	Tên mẫu	Đoạn	Tiểu vùng	số lượng Nu
1	A6.015	16024 – 16365	PS1, PS2	342
2	A6.023	16046 -16365	PS1, PS2	320
3	A6.038	16210 -16365	PS2	156
4	A6.046	16041 - 16193; 16210 - 16365	PS1, PS2	309
5	A6.051	16043 - 16191; 16210 - 16365	PS1, PS2	305
6	A6.068	16040 - 16193; 16236 - 16365	PS1, PS2	284
7	A6.070	16055 -16365	PS1, PS2	311
8	A6.090	16043 -16234	PS1, PS2	191
9	A6.104	16024 – 16365	PS1, PS2	342
10	A6.152	16024 – 16365	PS1, PS2	342
11	A6.162	16024 – 16365	PS1, PS2	342
12	A6.164	16140 -16192; 16249 - 16365	PS1, PS2	170
13	A6.166	16024 -16365	PS1, PS2	342
14	A6.187	16024-16390	PS1, PS2	367
15	A6.188	16024 -16365	PS1, PS2	342
16	A6.192	16040 - 16193; 16210 - 16365	PS1, PS2	310
17	A6.195	16024-16365	PS1, PS2	342
18	A6.200	16040 -16234	PS1	193
19	A6.218	16046 -16365	PS1, PS2	320
20	A6.237	16243 - 16365	PS2	123
21	A6.247	16210 - 16365	PS2	156
22	A6.254	16024 – 16365	PS1, PS2	341
23	A6.258	16040 – 16365	PS1, PS2	326
24	A6.262	16237 -16365	PS2	129
25	A6.287	16232 – 16365	PS2	134
26	A6.289	16024 - 16234; 16249 - 16365	PS1, PS2	328
27	A6.291	16210 -16365	PS2	156
28	A6.302	16040 -16193; 16241 - 16365	PS1, PS2	327
29	A6.317	16040 -16139; 16243 - 16365	PS1, PS2	221
30	A6.324	16210 – 16365	PS2	156
31	A6.331	16032 -16365	PS1, PS2	334
32	A6.334	16040 – 16365	PS1, PS2	326
33	A6.344	16034 - 16191; 16210 - 16365	PS1, PS2	311
34	A6.346	16024 - 16234; 16238 - 16365	PS1, PS2	339
35	A6.351	16024-16365	PS1, PS2	342
36	A6.357	16060 - 16188; 16206 - 16365	PS1, PS2	289
37	A6.358	16024 – 16365	PS1, PS2	342
38	A6.367	16238 -16365	PS2	128
39	A6.370	16024-16365	PS1, PS2	342
40	A6.373	16246 – 16365	PS2	120
41	A6.376	16210 – 16365	PS2	155
42	A6.378	16210 – 16365	PS2	156

T

STT	Tên mẫu	Đoạn	Tiểu vùng	số lượng Nu
43	A6.383	16024 -16365	PS1, PS2	342
44	A6.385	16239 -16365	PS2	127
45	A6.391	16050 - 16193; 16210 - 16365	PS1, PS2	300
46	A6.427	16024-16365	PS1, PS2	342
47	A6.428	16041 -16365	PS1, PS2	324
48	A6.441	16210 -16365	PS2	156
49	A6.460	16210 -16365	PS2	156
50	A6.463	16246 -16365	PS2	115
51	A6.464	16024 -16365	PS1, PS2	342
52	A6.479	16024 -16234	PS1	211
53	A6.485	16040 - 16193; 16210 - 16365	PS1, PS2	310
54	A6.488	16043 -16193; 16210 - 16365	PS1, PS2	307
55	A6.500	16239 -16365	PS2	127
56	A6.508	16210 -16365	PS2	156
57	A6.514	16210-16365	PS2	156
58	A6.537	16024 -16365	PS1, PS2	342
59	A6.538	16044 -16365	PS1, PS2	317
60	A6.539	16210 – 16365	PS2	156
61	A6.555	16210 -16365	PS2	156
62	A6.561	16024 -16365	PS1, PS2	342
63	A6.562	16052 - 16193; 16210 - 16365	PS1, PS2	298
64	A6.570	16210 – 16365	PS2	156
65	A6.575	16024 -16365	PS1, PS2	342
66	A6.606	16044 – 16234	PS1	190
67	A6.607	16044 - 16193; 16210 - 16365	PS1, PS2	306
68	A6.617	16248 – 16365	PS2	118
69	A6.638	16210 -16365	PS2	156
70	A6.667	16024 -16365	PS1, PS2	342
71	A6.669	16024 -16365	PS1, PS2	342
72	A6.690	16055 - 16234; 16237 - 16365	PS1, PS2	308
73	A6.700	16024 -16365	PS1, PS2	342
74	A6.746	16024 - 16234; 16245 - 16365	PS1, PS2	332
75	A6.754	16024 -16365	PS1, PS2	342
76	A6.758	16246 – 16365	PS2	120
77	A6.759	16044 - 16193; 16210 - 16365	PS1, PS2	305
78	A6.760	16024-16365	PS1, PS2	342
79	A6.768	16039-16192; 16210-16365	PS1, PS2	310
80	A6.776	16024-16365	PS1, PS2	342
81	A6.780	16024-16365	PS1, PS2	342
82	A6.782	16041-16193; 16210-16365	PS1, PS2	309
83	A6.798	16024 -16365	PS1, PS2	342
84	A6.800	16043 - 16234; 16240 - 16365	PS1, PS2	318
85	AB030111	16024-16365	PS1, PS2	342
86	AB030123	16024-16365	PS1, PS2	342

U

STT	Tên mẫu	Đoạn	Tiểu vùng	số lượng Nu
87	AB030202	16024-16365	PS1, PS2	342
88	AB030214	16024-16365	PS1, PS2	342
89	AB030221	16024-16365	PS1, PS2	342
90	AB030223	16024-16365	PS1, PS2	342
91	AB030305	16024-16365	PS1, PS2	342
92	AB030308	16210 -16365	PS2	156
93	AB030311	16024-16234	PS1	211
94	AB030315	16210-16365	PS2	156
95	AB030317	16210-16365	PS2	156
96	AB030318	16044-16192;16210-16365	PS1, PS2	305
97	AB030406	16040-16192; 16210-16365	PS1, PS2	309
98	AB030409	16024-16365	PS1, PS2	342
99	AB030501	16210-16365	PS2	155
100	AB030503	16046-16193; 16210-16365	PS1, PS2	304
101	AB030509	16024-16365	PS1, PS2	342
102	AB030510	16039-16193; 16210-16365	PS1, PS2	311
103	AB030512	16024-16365	PS1, PS2	342
104	AB030513	16039-16193; 16210-16365	PS1, PS2	311
105	AB030515	16024-16365	PS1, PS2	341
106	AB030601	16052-16365	PS1, PS2	314
107	AB030603	16040-16192; 16210-16365	PS1, PS2	309
108	AB030604	16024-16234	PS1	211
109	AB030608	16210-16365	PS2	156
110	AB030611	16024-16365	PS1, PS2	342
111	AB030612	16024-16365	PS1, PS2	340
112	AB030613	16024-16365	PS1, PS2	342
113	AB030616	16210-16365	PS2	156
114	AB030620	16210-16365	PS2	156
115	AB030622	16024-16365	PS1, PS2	342
116	AB030701	16210-16365	PS2	156
117	AB030714	16024-16365	PS1, PS2	342
118	AB030721	16039-16193	PS1	155
119	AB031006	16039-16193; 16210-16365	PS1, PS2	311
120	AB031022	16024-16365	PS1, PS2	342

Số: 381/QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 25 tháng 04 năm 2024

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 15/2014/TT-BGDĐT ngày 15/5/2014 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 775/QĐ-HVKHCN ngày 21/11/2016 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 850/QĐ-HVKHCN ngày 31/05/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 1 năm 2021;

Căn cứ Quyết định số 1413/QĐ-HVKHCN ngày 16/09/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1242/QĐ-HVKHCN ngày 25/10/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc gia hạn thời gian học tập lần 2 cho học viên Trần Việt Vinh;

Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Trần Việt Vinh với đề tài: “Hoàn thiện phương pháp phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái nhằm phục vụ công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam”.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.14.

GIÁM ĐỐC



GS.TS. Vũ Đình Lâm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 381/QĐ-HVKHCN ngày 25/04/2024
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Cho luận văn của học viên: Trần Việt Vinh

Tên đề tài: Hoàn thiện phương pháp phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái nhằm phục vụ công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: TS. Trần Minh Đức

- Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	GS.TS. Chu Hoàng Hà	Công nghệ sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	TS. Nguyễn Lê Cát	Y học	Viện Pháp y Quân đội, Bộ Quốc phòng	Phản biện
3.	PGS.TS. Đỗ Thị Huyền	Hóa sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện
4.	TS. Hoàng Thị Thu Hằng	Di truyền - Truyền nhiễm	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên Thư ký
5.	PGS.TS. Nguyễn Quang Huy	Hóa sinh học	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./. *Je*

Hà Nội, ngày 24 tháng 05 năm 2024

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 381/QĐ-HVKHCN ngày 25/04/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Trần Việt Vinh

Tên đề tài: Hoàn thiện phương pháp phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái nhằm phục vụ công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 24/05/2024 Hội đồng đã họp tại phòng họp 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 14 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

- | | |
|------------------------------|-------------------|
| 1. GS.TS. Chu Hoàng Hà | Chủ tịch hội đồng |
| 2. TS. Hoàng Thị Thu Hằng | Thư ký hội đồng |
| 3. TS. Nguyễn Lê Cát | Phản biện 1 |
| 4. PGS. TS. Đỗ Thị Huyền | Phản biện 2 |
| 5. PGS. TS. Nguyễn Quang Huy | Ủy viên hội đồng |

Thành viên vắng mặt: 0 (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
- Phản biện 1: - Nghiên cứu có đóng góp mới, có ý nghĩa khoa học; thiết kế phù hợp; quá trình thực hiện, nghiên cứu, đúc kết...
- Thiếu tổng quan về răng; Bộ răng phương pháp; kết quả; cần cập nhật tài liệu tham khảo; chỉnh sửa chỉnh tả.
- Nếu chỉnh sửa, luận văn có thể trình bày thành bài báo quốc tế
- Luận văn đạt yêu cầu.....



6. Phản biện 2:

— Đề tài có kết quả phù hợp mục tiêu đề ra, có độ tin cậy cao
 — Chất lượng tốt, nghiêm túc; kết quả có giá trị khoa học.
 — Cấu chỉnh sửa lại nội dung nghiên cứu (4 mục); Việt hóa và
 số hình ảnh; chỉnh sửa kết luận, TLTK. Đánh giá cao luận văn.

7. Học viên trả lời:

— Học viên xin tiếp thu ý kiến góp ý của Hội đồng
 về chỉnh sửa luận văn

8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

— PGS.TS. Nguyễn Quang Huy: Đề tài thực hiện nghiêm túc;
 cấu chỉnh sửa một số hình ảnh ở phần tổng kết và
 kết quả. Chỉnh kết luận. Đánh giá cao luận văn

— TS. Hoàng Thị Thu Hằng: cấu chỉnh sửa lại một số từ
 ngữ từ 8, 16, 18, 26, 31, 41, 42, 51. Bổ sung mẫu chuẩn từ 29

9. Học viên trả lời

Format TLTK theo đúng quy định

— Học viên xin chỉnh sửa theo ý kiến hội đồng

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: ... PGS.TS. Đỗ Thị Huyền

Ủy viên: ... PGS.TS. Nguyễn Quang Huy

Ủy viên: ... TS. Hoàng Thị Thu Hằng

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: ... 05

Số phiếu thu về: ... 05

Tổng số điểm: ... 41,8

Điểm trung bình: ... 8,4

Điểm thưởng công trình công bố:.....0.....

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố:....8.4.....

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận vănĐạt..... (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố:
.....Không trùng lặp.....

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

.....Luận văn đảm bảo các yêu cầu của Luận văn Thạc sỹ ngành Sinh học Thực nghiệm để nghi học viên chỉnh sửa, bổ sung theo góp ý của các thành viên Hội đồng.....

Buổi họp đã kết thúc vào 17 giờ 00 phút, ngày 24/5/2024

Hà Nội, ngày 24 tháng 5 năm 2024

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

Hoàng Thị Thu Hằng

Chm Hoàng Tà

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
GIÁM ĐỐC



Vũ Đình Lâm



BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Lê Cát

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 1

Cơ quan công tác: Viện Pháp y Quân đội, Bộ Quốc Phòng

Họ và tên học viên: Trần Việt Vinh

Tên đề tài: Hoàn thiện phương pháp phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái nhằm phục vụ công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam.

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Theo số liệu thống kê, hiện cả nước có 1.146.250 liệt sĩ. Trong đó, tổng số mộ liệt sĩ trong các nghĩa trang liệt sĩ là 871.373, số mộ gia đình quản lý là 156.000; số mộ có đầy đủ thông tin trong nghĩa trang là trên 15.493; số mộ còn thiếu thông tin là 855.880 mộ (*626.886 mộ liệt sĩ thiếu 1 phần thông tin, 225.647 mộ liệt sĩ thiếu hoàn toàn thông tin và 347 mộ liệt sĩ tập thể*). Giám định xác định danh tính hài cốt còn thiếu thông tin là thực hiện đạo lý uống nước nhớ nguồn, là chủ trương, quan điểm nhất quán của Đảng, Nhà nước ta.

Tuy nhiên, việc xác định danh tính các HCLS còn thiếu thông tin hiện đang vô cùng khó khăn. Thời gian trôi qua đã xóa đi nhiều dẫn cứ, mất mát đi nhiều thông tin, những thông tin đã được ghi chép lại bị mất đi nhiều do chiến tranh cũng như do điều kiện bảo quản, những đồng đội của các liệt sĩ cũng đã mất đi nhiều hay tuổi tác cao không còn nhớ rõ. TNLS cũng ngày một ít đi. Và đặc biệt, HCLS được chôn cất trong thời gian dài, thực hiện di chuyển một số lần đã ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng, làm cho việc phân tích ADN ngày càng khó khăn hơn.

Vì vậy, đề tài: “Hoàn thiện phương pháp phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái nhằm phục vụ công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam” có tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài nghiên cứu có một số nội dung đã được đề cập trong “Quy trình xác định danh tính HCLS còn thiếu thông tin”, nhưng đây là một nghiên cứu có đóng góp mới, không trùng lặp với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước.

Đề tài trích dẫn 77 tài liệu tham khảo, các tài liệu trích dẫn đúng quy định và đầy đủ trong nội dung luận văn.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo, có tính khái quát và bao hàm được nội dung của đề tài; phù hợp với mục tiêu và 06 nội dung nghiên cứu.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Phương pháp nghiên cứu khoa học, có độ tin cậy cao; được thực hiện ở một cơ sở nghiên cứu uy tín, có đầy đủ trang thiết bị đồng bộ và hiện đại đã bảo đảm cho các kết quả nghiên cứu là đáng tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Luận văn được thực hiện với đối tượng nghiên cứu là 120 mẫu HCLS với thiết kế nghiên cứu phù hợp. Các chỉ tiêu đánh giá rõ ràng, có cơ sở khoa học; phân tích xử lý số liệu nghiên cứu đúng quy định.

Luận văn được trình bày rõ ràng, gồm 60 trang chính, trong đó: mở đầu 02 trang, tổng quan nghiên cứu 23 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 07 trang, kết quả nghiên cứu 23 trang, thảo luận 04 trang, kết luận và kiến nghị 01 trang.

Kết quả nghiên cứu của luận văn đáp ứng được mục tiêu và các nội dung nghiên cứu đã đề ra.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

Mục tiêu nghiên cứu viết còn dài, với nội dung đã nêu nên chia thành 2 mục tiêu.

Phần tổng quan nghiên cứu còn có một số khái niệm chưa phù hợp trong phân loại xương người trưởng thành, thiếu phần tổng quan về răng (chiếm số lượng lớn trong tổng số mẫu nghiên cứu)

Phần kết quả nghiên cứu hơi dài, một số ảnh mẫu và bảng nên đưa vào phần Phụ lục.

Nên minh họa thêm các kết quả nghiên cứu (PCR, realtime PCR, sequencing ...) trong phần phụ lục để viện dẫn và chứng minh kết quả.

Phần thảo luận ngắn, chưa tương xứng với kết quả nghiên cứu, chưa bám sát với các nội dung và kết quả nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo mới có tỷ lệ thấp, nên cập nhật những tài liệu mới hơn (trong 5 năm gần đây).

Luận văn còn một số lỗi chính tả, ngữ pháp, chữ viết tắt cần được sửa chữa.

Câu hỏi: Trên cơ sở khoa học của nghiên cứu này và thực tiễn lấy mẫu tại các Nghĩa trang liệt sĩ, tác giả có đề xuất, kiến nghị gì thêm để việc giám định ADN trong xác định danh tính hài cốt liệt sĩ còn thiếu thông tin đạt hiệu quả cao hơn?

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Nếu được chỉnh sửa theo ý kiến của hội đồng thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Luận văn là một công trình nghiên cứu nghiêm túc, có ý nghĩa về mặt khoa học và thực tiễn đối với chuyên ngành và công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam.

Luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày...16...tháng...5...năm 2024.

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)

TS. Nguyễn Lê Cát.

Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Minh Tâm phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT02438689977-0946082099

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Đỗ Thị Huyền Học hàm, học vị: PGS. TS
Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 2
Cơ quan công tác: Viện Công nghệ sinh học

Họ và tên học viên: Trần Việt Vinh
Tên đề tài: Hoàn thiện phương pháp phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái nhằm phục vụ công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam.
Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm. Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Việc định danh hài cốt liệt sĩ còn thiếu thông tin là một trong những hoạt động Đền ơn, đáp nghĩa của chính phủ với các gia đình liệt sĩ. Tuy nhiên, công tác nghiên cứu định danh này là một thách thức rất lớn do tuổi xương ngày một cao (50-60 năm), khí hậu nóng ẩm dẫn đến xương bị phân hủy ngày càng mạnh, nguồn xương của Liệt sĩ hi sinh trong chiến tranh không toàn vẹn, ít ỏi, kém đa dạng nên việc thu thập được nguồn gen cho phân tích gặp rất nhiều khó khăn. Để chạy đua với thời gian, việc nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và trên hiện trường lấy mẫu cần phải tiến hành gấp rút, cấp bách nhằm định danh được các chiến sĩ càng sớm càng tốt. Vì vậy, công tác thu thập, phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái là công việc hết sức cấp thiết giúp nâng cao khả năng phân tích mẫu. Đề tài luận văn có tính cấp thiết, thời sự, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Theo hiểu biết của người nhận xét, đề tài luận văn thạc sĩ của học viên cao học Trần Việt Vinh không trùng lặp với các luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước. Các kiến thức được tham khảo từ các bài báo và các công trình công bố trên thế giới và trong nước đều được trích dẫn đầy đủ, trung thực, rõ ràng.



3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Luận văn đã thực hiện ba nhóm công việc chính bao gồm: (1) Thu thập mẫu hài cốt liệt sĩ tại Nghĩa trang Liệt sĩ quốc tế Việt-Lào; (2) Phân loại mẫu xương theo giai đoạn phong hóa mẫu theo tiêu chuẩn Behrensmeyer; (3) Định lượng DNA nhân và đánh giá mối liên quan giữa lượng DNA nhân với nhóm xương; (4) Định lượng DNA ti thể và đánh giá mối liên quan giữa lượng DNA ti thể với nhóm xương; (5) Giải trình tự hệ gen ty thể và so sánh với nhóm xương. Nội dung nghiên cứu phù hợp với tên đề tài và phù hợp với chuyên ngành Sinh học thực nghiệm và mã số chuyên ngành.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Để thực hiện luận văn, học viên cao học đã sử dụng chủ yếu là các phương pháp sinh trắc học đánh giá tính chất của xương, mức độ phong hóa xương; sử dụng phương pháp realtime PCR để định lượng DNA chiết từ nhân và ty thể; sử dụng phương pháp giải trình tự kết hợp với phương pháp phân tích tin sinh học để xác định được các vùng gen thể đã được khuếch đại. Các kết quả thu được được so sánh xử lý thống kê. Các phương pháp nghiên cứu phù hợp với nội dung và đảm bảo kết quả thu được có độ tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đã thu thập được 120 mẫu hài cốt liệt sĩ còn thiếu thông tin tại Nghĩa trang Liệt sĩ Quốc tế Việt - Lào, tuổi xương 40-50 năm, trong đó xương răng chiếm 55.8%, xương đùi chiếm 13.3%, xương chày chiếm 29.2% và xương cánh tay chiếm 1.7% số lượng mẫu;
- DNA nhân đã được phát hiện và định lượng thành công trong 71 mẫu (chiếm 59%), trong đó chỉ có 22 mẫu có nồng độ DNA đoạn dài cao từ $6,9 \times 10^{-6}$ ng/ μ l đến $2,9 \times 10^{-3}$ ng/ μ l. Trong số 22 mẫu có DNA đoạn dài được phát hiện chỉ có một mẫu duy nhất có mức độ phân hủy $DI < 1$. Trong số 120 mẫu thu thập, 93,75% mẫu xương chày, 74,29% mẫu xương đùi, 44,78% mẫu xương răng cho tách chiết DNA nhân thành công. Tỷ lệ tách chiết thành công DNA nhân không có mối liên hệ chặt chẽ với thang điểm Behrensmeyer;
- DNA ty thể được tách chiết thành công từ 115 mẫu trong 120 mẫu thu thập, trong đó 100% xương đùi, xương cánh tay đều cho tách chiết thành công DNA ty thể. Tỷ lệ tách chiết thành công DNA nhân không có mối liên hệ chặt chẽ với thang điểm Behrensmeyer;
- Trình tự tiểu vùng PS1, PS2 của DNA ty thể đã được giải trình tự từ DNA tách chiết từ 120 mẫu xương và chưa tìm thấy mối liên quan giữa việc giải trình tự thành công hệ gen ty thể với loại xương được thu thập

cũng như chỉ số đánh giá mức độ phong hóa theo thang điểm Behrensmeyer.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

Ưu điểm của luận văn: Luận văn là công trình nghiên cứu nghiêm túc, tỷ mỉ, công phu, với chất lượng nghiên cứu tốt. Phần tổng quan và phần kết quả được trình bày khá rõ ràng, gắn kết. Các nhóm phương pháp sử dụng được viết khá chi tiết. Kết quả thu được trong luận văn là xác thực, đẹp, có độ tin cậy cao. Luận văn thể hiện học viên cao học đã hiểu tường tận về lĩnh vực nghiên cứu của mình, có năng lực tìm tòi, khám phá, lập luận cho các kết quả thu được. Đặc biệt, luận văn có phần thảo luận, tuy ngắn nhưng phần đó được viết khá hay. Tôi đánh giá cao tinh thần học tập, nghiên cứu của học viên cao học Trần Việt Vinh.

Những góp ý:

Mục tiêu cần chỉnh sửa cho ngắn gọn, rõ ràng: Đánh giá được loại xương hài cốt, và độ phong hóa theo thang điểm Beyensmeyer tới khả năng thu hồi DNA của hài cốt lâu năm. Phần Nội dung nghiên cứu (trang 2) cần chỉnh sửa chính xác theo mục trong phần kết quả. Gợi ý: ND1: Thu thập, phân loại, đánh giá độ phong hóa mẫu hài cốt tại Nghĩa trang Liệt sĩ Quốc tế Việt Lào; ND2: Nghiên cứu đánh giá khả năng thu hồi DNA nhân từ các loại mẫu xương khác nhau; ND3: Nghiên cứu đánh giá khả năng thu hồi DNA ty thể từ các loại mẫu xương khác nhau; ND4: Nghiên cứu đánh giá khả năng giải được trình tự DNA ty thể từ DNA các mẫu xương khác nhau.

Phần tổng quan của luận văn còn khá nhiều hình ảnh chưa được Việt hóa, Học viên nên Việt hóa. Phần phương pháp tách chiết ADN trong xương người ở trang 15 thực tế là nguyên lý để tách chiết nên Học viên cần chỉnh lại tên cho phù hợp. Các hình ảnh có tên của các trục quá nhỏ như Hình 1.10, cần tăng cỡ chữ cho rõ ràng; Danh sách hóa chất Bảng 2.1 nên thay tên bằng: “Danh sách hóa chất chủ yếu sử dụng trong thí nghiệm”; Một số phương pháp cần trình bày rõ ràng hơn như phương pháp đánh giá độ phong hóa mẫu theo thang điểm Behrensmeyer; Phương pháp tách chiết AND cần viết theo đoạn văn với các thông tin chi tiết, rõ ràng để có thể lặp lại được. Các hóa chất khi viết tên đầy đủ thì không viết hoa. Tên bảng 2.2 cần chỉnh lại thành Gen đích của bộ định lượng, thống nhất đơn vị ml hay mL. Phần kết quả: Nên thay từ “vị trí lấy mẫu” bằng từ “loại xương” để tránh nhầm lẫn với vị trí mẫu ngoài thực địa. Hình 3.1 cần có một hình ảnh to, ghi rõ chú thích các mẫu được mã hóa và đánh số mẫu vào từng mẫu nghiên cứu; Các hình 3.6, 3.7, 3.11 chỉ cần đưa kết quả của các mẫu dương tính, thay đổi scale của trục

tung để thể hiện rõ được cả mẫu nồng độ thấp và nồng độ cao; Cả bài nên chỉnh sửa. Phần kết luận: Học viên cần chỉnh sửa kết luận tương ứng với nội dung công việc thực hiện và phù hợp với mục tiêu. Phần Tài liệu tham khảo cần chỉnh sửa cho thống nhất format. Luận văn còn một số lỗi chính tả, lỗi câu cần chỉnh sửa.

7. Nếu tác giả chưa viết bào báo hoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Nội dung của luận văn có thể được viết thành bài báo.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ, luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?

Luận văn đáp ứng tốt yêu cầu về nội dung, hình thức và hàm lượng khoa học của một luận văn thạc sĩ sinh học. Đồng ý cho luận văn được đưa ra bảo vệ để học viên nhận học vị Thạc sĩ sinh học./.

Hà Nội, ngày 15 tháng 05 năm 2024

Người nhận xét



Đỗ Thị Huyền

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Trần Việt Vinh

Lớp: BIO21A

Tên đề tài luận văn: Hoàn thiện phương pháp đánh giá phân loại nhanh mẫu xương dựa trên hình thái nhằm phục vụ công tác giám định hài cốt liệt sĩ tại Việt Nam.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn khoa học: TS. Trần Minh Đức

Ngày bảo vệ luận văn: 24/5/2024



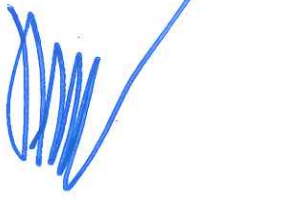
Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Thu gọn 6 nội dung nghiên cứu.	Đã gộp thành 4 nội dung
2	Việt hóa hình 1.2, hình 1.3, hình 1.4, hình 1.5, hình 1.6, hình 1.7, hình 1.9, hình 1.10	Đã việt hóa hình ảnh trong luận văn
3	Chuyển bảng 3.1, hình 3.1, hình 3.3, hình 3.4, hình 3.9, hình 3.10, bảng 3.9 về phần phụ lục	Đã chuyển bảng và hình về phần phụ lục
4	Gộp chương 3 và chương 4	Đã gộp thành chương 3: Kết quả và thảo luận

5	Tên tác giả tài liệu tham khảo cần thống nhất viết tắt	Đã chỉnh sửa tài liệu tham khảo.
6	Kết luận cần chỉnh sửa theo các nội dung nghiên cứu	Đã chỉnh sửa kết luận thuộc chương 4

Hà Nội, ngày 29 tháng 05 năm 2024

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



S.TS. Chu Hoàng Hà

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN



TS. Trần Minh Đức

HỌC VIÊN



Trần Việt Vinh

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

