

KHẢO SÁT QUY TRÌNH LY TRÍCH NHANH DNA - ĐỀ XUẤT QUY TRÌNH LY TRÍCH TỐI ƯU CHO NIÊM MẠC MIỆNG ỨNG DỤNG TRONG XÉT NGHIỆM QUAN HỆ HUYẾT THỐNG

Huỳnh Việt Lộc, Tăng Ngọc Kiều Vy*,
Dương Hồ Diễm Trâm, Chu Nguyễn Thanh Thủy
Viện Sinh học Phân tử LOCI

TÓM TẮT

Khảo sát một số quy trình ly trích đã có cho thấy, phương pháp ly trích nhanh DNA bằng NaOH - SDS kết hợp với sốc nhiệt cho kết quả khả quan hơn so với các phương pháp còn lại. Khi so sánh hiệu quả ly trích ở các nồng độ SDS khác nhau, 0,01% là nồng độ SDS tối ưu. Quy trình đề xuất được đánh giá thông qua việc so sánh với bộ ly trích cột thương mại OMEGA và ly trích thử nghiệm trên 200 mẫu niêm mạc miệng. Kết quả so sánh với bộ ly trích thương mại, DNA ly trích bởi quy trình đề xuất cho sản phẩm PCR có cường độ huỳnh quang trung bình thấp hơn nhưng kết quả phân tích vẫn chính xác và trùng khớp. Trên 200 mẫu thực tế, không có mẫu nào bị ức chế, hơn 90% mẫu cho sản phẩm PCR có cường độ huỳnh quang trên 100 RFU và 100% cho tín hiệu cao trên 50 RFU. Đối với các cặp mẫu đã biết mối quan hệ huyết thống, kết quả trả về là trùng khớp.

Từ khóa: Ly trích nhanh DNA; niêm mạc miệng; ly trích thô; SDS-NaOH; xét nghiệm DNA huyết thống...

Ngày nhận bài: 23/7/2020; Ngày hoàn thiện: 14/9/2020; Ngày đăng: 21/10/2020

SURVEY QUICK DNA EXTRACTION PROTOCOLS - PROPOSITION OF A DNA EXTRACTION PROCESSES THAT IS OPTIMAL FOR DNA PATERNITY TESTING

Huynh Viet Loc, Tang Ngoc Kieu Vy*,
Duong Ho Diem Tram, Chu Nguyen Thanh Thuy
LOCI Institute of Molecular Biology

ABSTRACT

After experiment, the process used NaOH - SDS combine with thermal shock was found to be the DNA extraction method more efficient than the other. Comparing extraction efficiency at different SDS concentrations to propose the optimal extraction procedure, the result showed that 0.01% is the suitable SDS concentration. To evaluate the effectiveness of the improved extracting procedure, we compared it with a commercially available kit (E.Z.N.A Forensic DNA kit) on 10 samples and applied to extract DNA on 200 samples. After extracted, all samples have been used for STR-PCR reaction. On 10 samples, average fluorescence signal from the improved extraction procedure is lower than the commercial kit, but the results were accurate and consistent. On 200 samples, the results showed that no samples were inhibited, more than 90% of samples for PCR product had fluorescence intensity above 100 RFU and 100% for signal above 50 RFU. On the samples have been known the parentage relationship, the result is match.

Keywords: Quick DNA extraction; Buccal swab; rapid DNA extraction; SDS-NaOH solution; DNA paternity testing...

Received: 23/7/2020; Revised: 14/9/2020; Published: 21/10/2020

* Corresponding author. Email: vyvykieu89@gmail.com

1. Giới thiệu

Nguồn DNA đầu vào là yếu tố quyết định đến kết quả của phản ứng PCR. Các quy trình ly trích DNA truyền thống bằng phenol, phương pháp Boom và cả các bộ ly trích đã được thương mại hiện nay như QIAamp DNA investigator kit (Qiagen), DNA IQ system (Promega), E.Z.N.A Forensic DNA kit (Omega)... đều có nhiều bước thực hiện nhằm giúp sản phẩm DNA thu được cuối cùng có độ tinh sạch đủ để tham gia phản ứng PCR [1, 2]. Nhược điểm lớn của các quy trình này là thực hiện nhiều bước phức tạp dễ gây sai sót, nhầm lẫn, kéo dài thời gian xét nghiệm gây những khó khăn nhất định cho kỹ thuật viên. Đã có các quy trình ly trích thô DNA trong một đến hai bước thao tác được báo cáo trước đây. Tuy nhiên sản phẩm DNA thu được từ các quy trình này chỉ tham gia được một số phản ứng PCR đơn giản [3]. Vì vậy, vào thời điểm đó, các báo cáo này không được ứng dụng trong thực tiễn.

Hiện nay, công nghệ sinh học đã có những bước tiến đáng kể trong kỹ thuật enzyme tái tổ hợp, các nhà sản xuất như Qiagen, Promega lần lượt cho ra các sản phẩm taq polymerase kháng ức chế [4]. Nghĩa là phản ứng PCR phức tạp nhất vẫn có thể được thực

hiện trên đối tượng DNA không đạt yêu cầu về độ tinh sạch.

Nhu cầu xét nghiệm quan hệ huyết thống, xét nghiệm di truyền gen ngày càng lớn. Niêm mạc miệng đang dần trở thành dạng mẫu được ưu tiên thu nhận cho các xét nghiệm này do đặc tính dễ bảo quản, không xâm lấn, lượng DNA dồi dào [5]. Thêm vào đó, cũng đã có một số qui trình ly trích nhanh DNA từ niêm mạc miệng được công bố trước đây bởi Daniel (1995), Brenda (1992) [6]... Từ các cơ sở này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình ly trích nhanh DNA từ niêm mạc miệng, tham gia được phản ứng PCR của bộ kit PowerPlex ®Fusion System dùng trong xác định quan hệ huyết thống, nhận diện cá thể.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Khảo sát quy trình ly trích đã có

Tiến hành ly trích song song 3 quy trình ly trích DNA đã được báo cáo bởi các tác giả (bảng 1 - bảng 2 - bảng 3) so sánh với quy trình ly trích đối chứng là bộ ly trích cột E.Z.N.A Forensic DNA kit -OMEGA [7] trên đối tượng mẫu là niêm mạc miệng để lựa chọn ra quy trình ly trích ưu thế. Mỗi phương pháp ly trích được lặp lại 5 lần, chạy PCR trên bộ kit PowerPlex ®Fusion System và phân tích kết quả bằng hệ thống điện di mao quản ABI 3130XL.

Bảng 1. Quy trình ly trích bằng Triton X100

Quy trình A: Ly trích bằng Triton X100 theo Daniel (1995) [8]	
Công thức pha đệm ly giải:	Quy trình ly trích:
- Tris-HCl : 10 mM, pH 8	- Ủ 100 µl mẫu với 500µl dịch ly giải ở 95°C/ 30 phút => Tạo hỗn hợp có nồng độ Triton X100 là 1%.
- EDTA: 0,1 mM	- Làm lạnh ở 4°C/ 10 phút
- Triton X100: 1,2%	- Ly tâm 12000g/10 phút
	- Hút dịch nổi, pha loãng 5 lần trong TE1X

Bảng 2. Quy trình ly trích bằng NaOH

Quy trình B: Ly trích bằng NaOH theo Brenda (1992) [9]	
Công thức pha đệm ly giải:	Quy trình ly trích:
- NaOH : 60 mM	- 500µl NaOH (60mM) + 100 µl mẫu => Tạo hỗn hợp có nồng độ NaOH là 50mM
	- Ủ 95°C/5 phút
	- Trung hòa bằng 60 µl 1M Tris HCl pH8.
	- Pha loãng 5 lần trong TE1X

do dư lượng SDS còn lại trong dịch ly trích gây ức chế phản ứng PCR. Do đó các quy trình ly trích có sự tham gia của SDS đều có bước tinh sạch phía sau. Theo báo cáo Daniel và cộng sự (1995), trong quy trình ly trích bằng SDS, nồng độ SDS vẫn cho phép phản ứng PCR diễn ra là 0,005% [8]. Trong quy trình chúng tôi thực hiện, nồng độ SDS cuối cùng tồn dư trong mix PCR là 0,001%. Có thể thấy rằng, sử dụng quy trình ly trích bằng SDS giúp tăng hiệu quả ly giải. Việc điều chỉnh đúng lượng SDS trong giai đoạn ly giải và pha loãng dịch ly trích về nồng độ SDS phù hợp giúp phản ứng PCR vẫn thực hiện được.

3.2. Kết quả tối ưu nồng độ SDS

Trên cơ sở giữ nguyên nồng độ NaOH vì đây là nồng độ phù hợp cho biến tính protein, nghiên cứu tiến hành điều chỉnh hàm lượng SDS trong dịch ly trích nhằm tìm ra nồng độ SDS phù hợp nhất giúp cải tiến quy trình.

Bảng 5 cho thấy, ở nồng độ SDS 0,045% và 0,035% gây ra tình trạng ức chế, không cho đủ sản phẩm PCR ở 24 vị trí, tín hiệu huỳnh quang thấp. Trong khi ở quy trình ly trích ban đầu (có nồng độ SDS là 0,025%) lên đủ peak ở tất cả các vùng, cường độ huỳnh quang trung bình là 252 RFU, cho thấy việc tăng nồng độ SDS lên trên 0,025% là không khả thi.

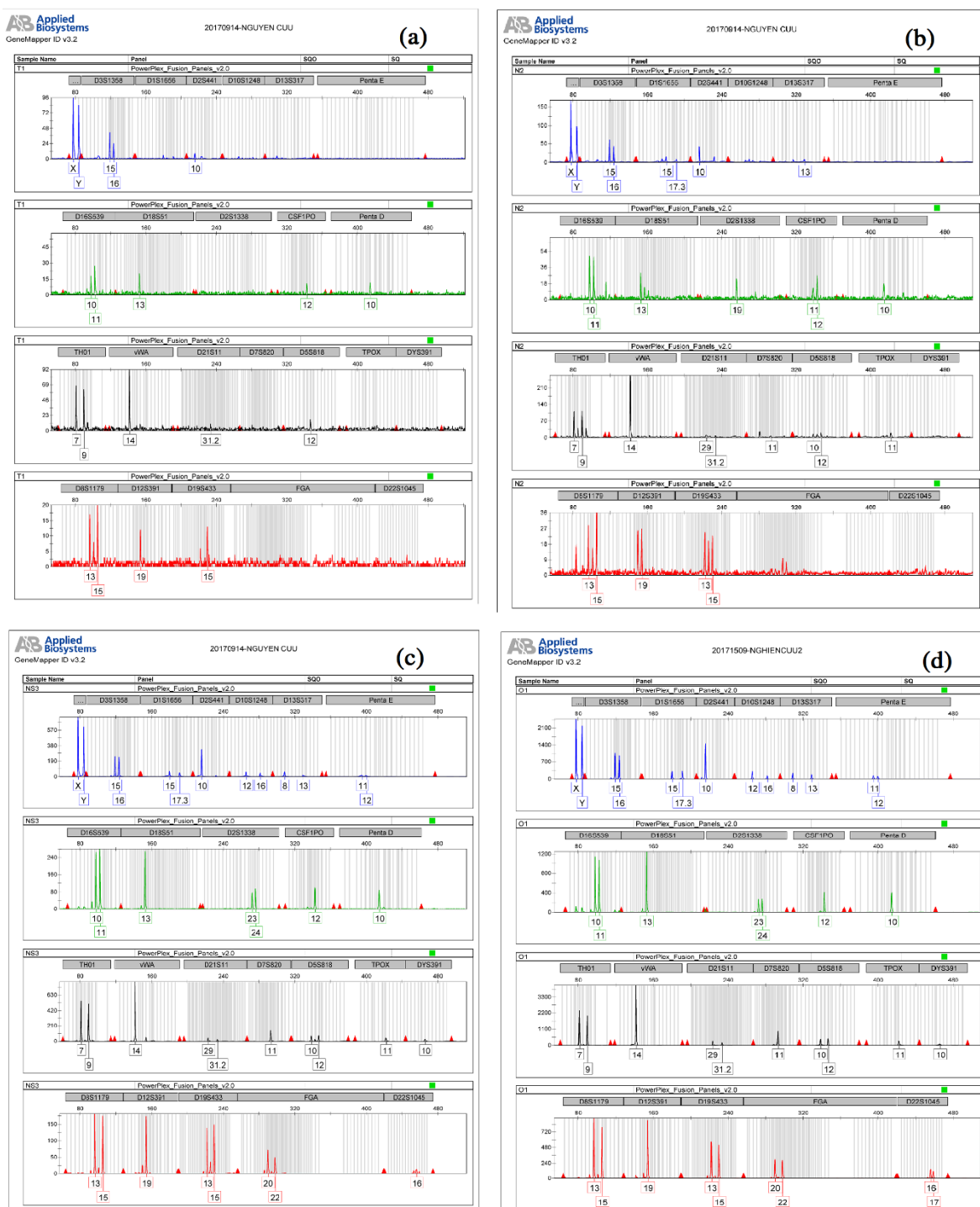
Tại quy trình ly trích chứa 0,025%, 0,015%, 0,01% SDS, đều cho sản phẩm PCR lên đủ ở 24 vị trí STR, cho thấy lượng SDS tồn dư trong dịch ly trích không làm ức chế phản ứng

PCR. Cường độ tín hiệu huỳnh quang trung bình của sản phẩm PCR lần lượt là 252 RFU, 517 RFU, 567 RFU tương ứng với phần trăm SDS trong mix PCR là 0,001%, 0,0006%, 0,0004%. Ở quy trình có lượng SDS trong dịch ly giải thấp nhất 0,005% cho cường độ tín hiệu huỳnh quang thấp nhất 42 RFU, phần trăm peak lên trung bình 67%. Do đó chúng tôi kết luận lượng SDS 0,005% trong dung dịch ly giải không đủ để phá vỡ tế bào giải phóng DNA.

Điều chỉnh nồng độ SDS giảm xuống 0,015% và 0,01% sẽ cho kết quả PCR tốt hơn quy trình gốc (0,025%). Quy trình có nồng độ SDS 0,01% cho chiều cao peak trung bình trên 5 mẫu là 567 RFU cao hơn so với phương pháp SDS 0,015% cho giá trị RFU trung bình là 517 RFU. Phần mềm phân tích kết quả GeneMapper ID V3.2 đã khuyến cáo cường độ huỳnh quang giữa hai lần phân tích trên cùng một mẫu có thể dao động thay đổi trong khoảng 100 RFU tùy thuộc vào phần mềm [7]. Do đó, sự chênh lệch giữa 567 RFU và 517 RFU không có ý nghĩa bởi nó có thể gây ra do máy móc và quá ít để kết luận là có sự sụt giảm lượng sản phẩm PCR tạo thành. Tuy nhiên, để đảm bảo hàm lượng SDS không ảnh hưởng đến phản ứng PCR, chúng tôi lựa chọn nồng độ SDS tối ưu trong ly trích niêm mạc miệng là 0,01%.

Bảng 4. Kết quả so sánh hiệu quả ly trích

Yếu tố khảo sát	Quy trình A Triton X100	Quy trình B NaOH	Quy trình C NaOH + SDS	Quy trình đối chứng
Số mẫu ức chế (không có sản phẩm PCR)	0	0	0	0
Chiều cao peak trung bình trên mẫu (RFU)	33	46	242	759
	33	45	208	661
	36	42	299	608
	36	38	198	595
	45	43	277	530
Chiều cao peak trung bình của quy trình (RFU)	37	43	245	631
% số peak lên trên mỗi mẫu	49	67	100	100
	56	77	100	100
	38	62	100	100
	59	49	100	100
	74	59	100	100
Trung bình % số peak lên trên 5 mẫu	55	63	100	100



Hình 1. Kết quả điện di STR trên mẫu ly trích bằng các phương pháp

(a) Triton X100

(b) NaOH

(c) NaOH + SDS

(d) E.Z.N.A.®Forensic DNA Kit (quy trình đối chứng)

Bảng 5. Kết quả điều chỉnh nồng độ SDS

Nồng độ SDS trong hóa chất ly giải	0,045 %	0,035 %	0,025 %	0,015 %	0,01 %	0,005 %
Nồng độ SDS trong mix PCR						
Số mẫu ức chế	0	0	0	0	0	0
Chiều cao peak trung bình trên mỗi mẫu (RFU)	42	142	209	546	470	47
	37	134	297	532	411	46
	46	108	241	551	531	45
	47	119	277	544	655	36
	56	111	235	412	769	33
Chiều cao peak TB	46	123	252	517	567	42
	56	97	100	100	100	67
% số peak lên trên mỗi mẫu	54	97	100	100	100	77
	54	97	100	100	100	74
	64	97	100	100	100	59
	64	97	100	100	100	56
TB % số peak lên	58	97	100	100	100	67

Các kết quả cho phép nghiên cứu kết luận 0,01% SDS trong dịch ly trích là ngưỡng SDS thấp nhất và phù hợp nhất cho phép tách chiết được DNA từ tế bào niêm mạc miệng. Ngoài ra, nghiên cứu còn ghi nhận được báo cáo của Daniel về nồng độ SDS vẫn cho phép phản ứng PCR diễn ra là 0,005% chỉ phù hợp cho phản ứng single PCR. Trong phản ứng PCR multiplex trên 24 vị trí sử dụng cho xét nghiệm DNA, tồn dư SDS cho phép trong mix PCR tối đa là 0,001% để đảm bảo không gây ức chế phản ứng PCR.

3.3. Đánh giá hiệu quả của quy trình ly trích được cải tiến

3.3.1. So sánh quy trình đã cải tiến với quy trình thương mại (đối chứng)

Tiến hành ly trích song song trên 10 mẫu, chạy PCR so sánh quy trình đã cải tiến với quy trình ly trích bằng bộ kit thương mại E.Z.N.A.®Forensic DNA Kit. Kết quả cho thấy không có mẫu nào bị ức chế trong cả hai phương pháp, phần trăm số peak lên là 100%. Kết quả phân tích các vị trí STR là tương đồng giữa hai quy trình. DNA ly trích bằng NaOH + SDS cho sản phẩm PCR đúng kích thước, không xuất hiện band DNA phụ. Đây là kết quả quan trọng cho thấy dịch DNA ly trích bằng NaOH-SDS 0,01% có chất lượng phù hợp cho xét nghiệm huyết thống.

Khi so sánh giá trị cường độ huỳnh quang trung bình, quy trình ly trích cải tiến có tín hiệu huỳnh quang trung bình là 1658 RFU thấp hơn quy trình thương mại (RFU trung bình là 1796). Tuy nhiên, sự thấp hơn này là hợp lý bởi có sự khác nhau về độ tinh sạch của dịch ly trích. Nghiên cứu chấp nhận kết quả này do cường độ huỳnh quang trung bình tuy thấp hơn nhưng vẫn đủ để phân tích kết quả, không ảnh hưởng đến độ chính xác của kết quả.

3.3.2. Ly trích thử nghiệm trên 200 mẫu

Tiến hành ly trích thử nghiệm trên 200 mẫu, trong đó, 160 mẫu thu từ các cá thể ngẫu nhiên, 10 cặp có quan hệ huyết thống (2 mẫu), 10 cặp không có quan hệ huyết thống (20 mẫu).

Theo khuyến cáo của phần mềm phân tích kết quả Gene Mapper ID v3.2, độ tin cậy của tín hiệu peak cao trên 25 RFU là 100%. Để hỗ trợ cho việc phân tích kết quả được chính xác, đảm bảo cho độ nhạy của xét nghiệm, khi đánh giá hiệu quả của quy trình ly trích đã xây dựng được, nghiên cứu đưa ra thêm điều kiện là trên 90% peak có chiều cao trên 100 RFU và không có peak thấp dưới 50 RFU.

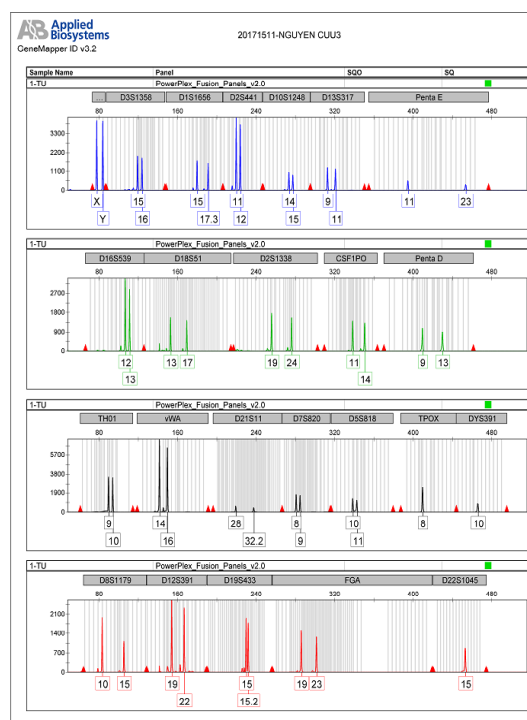
Các thông số được ghi nhận trên 200 mẫu bao gồm: Số mẫu ức chế; Phần trăm mẫu lên đủ peak ở 24 vị trí STR; Phần trăm mẫu có tín hiệu peak thấp dưới 100RFU, 50RFU; Độ

chính xác của kết quả trên các cặp xét nghiệm có và không có quan hệ huyết thống.

Hình 2 là kết quả điện di STR trên 1 mẫu được ly trích bằng phương pháp đã cải tiến. Kết quả trên bảng 6 cho thấy, không có mẫu nào bị ức chế, 100% mẫu lên đủ ở 24 vị trí STR. Trong số 200 mẫu thử nghiệm, có 13 mẫu có xuất hiện peak có chiều cao dưới 100 RFU chiếm 6,5%, nghĩa là trên 90% mẫu được ly trích cho chiều cao các peak trên 100 RFU. Trên cả 13 mẫu này, 11 mẫu có vị trí peak cao dưới 100 RFU ở vị trí locus Penta E và 2 mẫu có vị trí peak cao dưới 100 RFU ở locus Penta E và locus D22S1045. Penta E và D22S1045 đều là những vị trí được khuyến cáo là sẽ có tín hiệu peak thấp [7]. Ở 20 cặp mẫu đã biết quan hệ huyết thống, kết quả trả về là trùng khớp.

Thông qua việc ly trích trên 200 mẫu, có thể kết luận quy trình ly trích thô bằng SDS và NaOH mà nghiên cứu đã cải tiến cho phép ly trích DNA từ niêm mạc miệng. Sản phẩm ly trích tham gia hiệu quả vào phản ứng PCR và

có thể ứng dụng trong xét nghiệm huyết thống trên bộ kit PowerPlex® Fusion System.



Hình 2. Kết quả điện di STR trên mẫu ly trích bằng SDS + NaOH đã cải tiến

Bảng 6. Kết quả đánh giá hiệu quả ly trích trên 200 mẫu

STT	Chỉ tiêu đánh giá	Kết quả	Kết luận
01	Số mẫu ức chế	0 % (trên 200 mẫu)	Đạt
02	Phần trăm mẫu lên đủ peak ở 24 vị trí STR	100% (trên 200 mẫu)	Đạt
03	Phần trăm mẫu có chiều cao peak trên 100 RFU	93,5% (trên 200 mẫu)	Đạt
05	Phần trăm mẫu có chiều cao peak trên 50 RFU	100% (trên 200 mẫu)	Đạt
06	10 cặp cha con	Có quan hệ huyết thống	Đạt
07	10 cặp không cha con	Không có quan hệ huyết thống	Đạt

Bảng 7. Quy trình ly trích DNA niêm mạc miệng đề xuất

Công thức pha đệm ly giải:	Quy trình ly trích:
- NaOH : 50 mM	- Ủ mẫu với dịch ly giải ở 95°C/15 phút
- SDS: 0,01%	- Trung hòa bằng 60 µl 1M Tris pH8.
	- Pha loãng 5 lần trong TE1X

4. Kết luận

Thông qua các kết quả thu được từ nghiên cứu, chúng tôi đề xuất quy trình ly trích DNA từ niêm mạc miệng - ứng dụng trong xét nghiệm quan hệ huyết thống như bảng 7.

Quy trình ly trích DNA từ mẫu niêm mạc miệng trên cho thấy ưu điểm nổi trội so với bộ kit ly trích trên thị trường hiện nay:

- Thao tác kỹ thuật đơn giản hai bước thực hiện, rút ngắn thời gian ly trích.
- Giảm giá thành ly trích đáng kể trong khoảng 5.000 VNĐ/1 mẫu so với giá thành của các bộ kit ly trích đang bán trên thị trường 50.000 – 80.000 VNĐ/1 mẫu.
- Xây dựng được quy trình ly trích có thể áp dụng trong thực tế giúp ta chủ động về mặt kỹ thuật, tránh được sự phụ thuộc vào bộ kit ly trích nước ngoài.

Trong quá trình khảo sát nồng độ SDS phù hợp, nghiên cứu cũng rút ra được kết luận đối với dịch DNA tham gia phản ứng PCR multiplex, tồn dư SDS trong mix PCR tối đa là 0,001% để đảm bảo không gây ức chế phản ứng PCR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. O. Nick, "The Basics: How Phenol Extraction Works," 2015. [Online]. Available: <http://bitesizebio.com/384/the-basics-how-phenol-extraction-works>. [Accessed Aug. 25, 2015].
- [2]. S. Berensmeier, "Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 73, no.3, pp. 495-504, 2006.
- [3]. M. Miura *et al.*, "Comparison of six commercially-available DNA polymerases for direct PCR," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 55, no. 6, pp. 401-406, 2013.
- [4]. B. K. Milko, "Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples," *Nucleic Acids Research*, vol. 37, no. 5, pp. 40-58, 2009.
- [5]. M. S. Adamowicz *et al.*, "Evaluation of Methods to Improve the Extraction and Recovery of DNA from Cotton Swabs for Forensic Analysis," *Plos one*, vol. 9, p. 2, 2014.
- [6]. L. Moore, "Evaluation of buccal cell collection protocols for genetic susceptibility studies," *Biomarkers*, vol. 6, no. 6, pp. 448-454, 2001.
- [7]. PowerPlex® Fusion System Technical Manual, *Promega Corporation*, TMD039, 2017.
- [8]. Daniel, "A Simple "Universal" DNA Extraction Procedure Using SDS and Proteinase K Is Compatible with Direct PCR Amplification," *Genome Research*, vol. 4, pp. 368-370, 1995.
- [9]. B. Richards. "Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swab," *Human Molecular Genetics*, vol. 2, no. 2, pp. 159-163, 1992.
- [10]. M. Klitsch, and F. Neuhuber, "Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis," *J Forensic Sci*, vol. 45, pp. 669-673, 2000.
- [11]. A. H. Walker *et al.*, "Collection of Genomic DNA by Buccal Swabs for Polymerase Chain Reaction-Based Biomarker Assays," *Environmental Health Perspectives*, vol. 107, pp. 517-520, 1999.
- [12]. K. Sung *et al.*, "A simple and efficient Triton X-100 boiling and chloroform extraction method of RNA isolation from Gram-positive and Gram-negative bacteria," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 229, pp. 97-101, 2003.
- [13]. J. M. Walker, *The Protein Protocols Handbook. (Third Edition)*. New York (NY): Springer-Verlag New York, LLC, 2009.