

PHÂN BIỆT GIỚI TÍNH NGƯỜI BẰNG KỸ THUẬT LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)

Nguyễn Bảo Quốc^{1*}, Nguyễn Thị Thạch Thảo¹, Nguyễn Đoàn Nguyên Phương¹, Nguyễn Ngọc Bảo Châu²

¹ Viện Nghiên Cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

² Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Việc xác định giới tính từ những những dấu vết DNA hoặc vết máu tại hiện trường là một bước quan trọng trong lĩnh vực pháp y. SRY gene (sex determining region) là gene riêng biệt nằm trên nhiễm sắc thể Y nên chỉ có ở nam giới và được sử dụng để chỉ ra kiểu gene nam giới. Dựa trên đặc điểm của SRY gene, kỹ thuật sinh học phân tử PCR đã được sử dụng để khuếch đại SRY gene nhằm phân biệt giới tính từ mẫu máu người. Tuy nhiên, phương pháp PCR vẫn có một số nhược điểm như tốn thời gian và chi phí cho việc thực hiện, cần đầu tư nhiều thiết bị đắt tiền và không thể thực hiện được tại hiện trường. Trong nghiên cứu này, phương pháp LAMP được sử dụng vốn được biết là một phương pháp đơn giản, nhanh, có độ tin cậy cao, giá thành thấp, dễ thực hiện, phát hiện nhanh tại hiện trường được sử dụng cho việc phân biệt giới tính người trực tiếp từ mẫu máu mà không cần qua ly trích DNA. Phản ứng LAMP được thực hiện ở nhiệt độ 65°C với các mẫu máu tươi và mẫu máu để khô thấm qua giấy lọc. Kết quả đạt được ở hai loại mẫu khi sử dụng kỹ thuật LAMP đều thu được dương tính với mẫu có giới tính nam. Qua đó, có thể khẳng định rằng phương pháp LAMP có khả năng phân biệt giới tính trên mẫu máu người nhanh chóng và độ nhạy của LAMP cao hơn so với kỹ thuật PCR. Điều này có ý nghĩa rất lớn cho công tác xác định nhanh giới tính người trong pháp y và nhiều ứng dụng khác trong y sinh.

Từ khóa: Sex determination, SRY, LAMP, phát hiện nhanh, PCR, pháp y.

MỞ ĐẦU

Bộ nhiễm sắc thể của người bình thường bao gồm 22 cặp nhiễm sắc thể thường và 1 cặp nhiễm sắc thể giới tính, XX quy định giới tính nữ hoặc XY quy định giới tính nam. Trên nhiễm sắc thể X và Y, có tồn tại rất nhiều gene quy định các tính trạng khác nhau và trong số những gene đó, xuất hiện một gene đặc biệt chỉ nằm trên vai ngắn nhiễm sắc thể Y giúp ích cho việc nhận dạng giới tính trong sinh học phân tử đó là SRY (Sex determining region Y) (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990). Gene SRY mã hóa protein có chứa nhóm HMG khoảng 78 amino acid. Protein này gắn ADN hoạt hóa một hay nhiều gen khác trong hệ thống các nhân tố hoạt hóa các gen điều khiển sự phát triển của tinh hoàn (Kellermayer *et al.*, 2005). Khi thiếu sự hiện diện của TDF (testisdetermining factor) mô sinh dục sẽ phát triển thành noãn hoàng. TDF có tính bảo tồn ở động vật có vú, chúng có nhiều điểm giống nhau giữa các loài. Vào giữa tuần thứ 5 và thứ 6 của phôi thì gen SRY xuất hiện. Nó khởi động một loạt quá trình phức tạp: những tế bào nguyên thủy của tinh hoàn, dương vật xuất hiện. Testosterone từ tinh hoàn tiết ra làm biệt hóa phôi thành bé trai. Hiện nay việc định lượng và xác định giới tính phục vụ trong y học và lĩnh vực pháp y được thực hiện bằng kỹ thuật PCR, multiplex PCR và realtime PCR (Andreasson, Allen, 2003; Kastelic, 2009; Finch *et al.*, 1996). Ưu điểm của những phương pháp này chính là tính chính xác, độ nhạy, độ tin cậy và có tính ứng dụng cao trong xét nghiệm pháp y. Tuy nhiên, những phương pháp trên đòi hỏi phải được thực hiện trong phòng thí nghiệm, chi phí đầu tư trang thiết bị cao, mất thời gian trong phân tích, cán bộ kỹ thuật phải có kỹ năng, chi phí cao và điều quan trọng là không thực hiện chẩn đoán nhanh tại hiện trường. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) được xem là một phương pháp mang tính thay thế vì những ưu điểm là chẩn đoán nhanh trong vòng 30 phút, không bị ảnh hưởng bởi chất lượng DNA, chi phí ít, độ nhạy và độ chính xác cao và quan trọng là có thể thực hiện được tại hiện trường. Việc xác định giới tính bằng kỹ thuật LAMP cũng được phát triển dựa trên trình tự của gen TTTY và SRY vốn là 2 gen tiêu biểu nằm trên nhiễm sắc thể Y (Anantasomboon, 2016; Almasi, Almasi, 2017). Các phương pháp này chủ yếu sử dụng DNA tinh sạch trực tiếp từ mẫu máu và nước tiểu không thích hợp cho việc phát hiện nhanh tại hiện trường. Trong nghiên cứu này việc phân biệt giới tính người bằng kỹ thuật LAMP sẽ được thực hiện trực tiếp trên mẫu máu không qua ly trích DNA. Kết quả đạt được trong nghiên cứu này sẽ có ý nghĩa rất lớn trong công tác pháp y tại hiện trường.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Ly trích DNA từ mẫu máu

Tiến hành tách chiết DNA từ 9 mẫu máu thu thập từ bệnh viện, những mẫu này đã nắm rõ và xác định được thông tin giới tính. Phương pháp tách chiết DNA từ mẫu máu tươi bằng hóa chất được thực hiện như sau: Mẫu được rửa đông sau đó hút 1ml máu cho vào ống eppendorf thể tích 2 ml. Thêm 0,8 ml 1X SSC buffer, mix, và ly

tâm 12000 rpm/1 phút. Loại bỏ 1 ml dịch nổi, thêm 1 ml 1X SSC buffer, vortex, ly tâm 12000 rpm/1 phút sau đó bỏ hết dịch nổi. Thêm 0,375 ml và NaOAc 0,2 M, vortex nhanh, sau đó thêm vào 0,025 ml 10% SDS và 0,005 ml proteinase K, vortex nhanh, ủ 1 giờ ở nhiệt độ 55°C. Bước tiếp theo thêm 120 ml Phenol:Chloroform:Isoamyl:Alcohol vào các tuýp eppendorf đã ủ, vortex khoảng 30 giây. Sau đó, ly tâm 12000 rpm/2 phút. Hút dịch nổi qua tuýp mới, thêm 1 ml cold 100% ethanol, mix, ủ 15 phút ở nhiệt độ - 20°C. Ly tâm 12000 rpm/2 phút, loại dịch nổi để ráo tự nhiên. Thêm 0,18 ml 10:1 TE buffer, vortex, ủ 10 phút ở nhiệt độ 55°C. Sau đó ta thêm vào 0,02 ml NaOAc 2 M vào eppendorf đã ủ, mix đều bằng pipet, tiếp theo cho thêm 0,5 ml 100% ethanol vào tuýp đã mix. Hỗn hợp được mang đi ly tâm 12000 rpm/1 phút. Sau ly tâm, dịch nổi được loại bỏ, tiến hành rửa pellet bằng 1 ml ethanol 80%. Ly tâm 12000 rpm/1 phút. Loại dịch nổi, để pellet khô (khoảng 10 phút) cho đến khi khô. Cố định pellet bằng 0,2 ml 10:1 TE buffer. Giữ mẫu qua đêm ở 55°C, vortex định kì để hòa tan DNA bộ gene. Bảo quản ở - 20°C. Các mẫu DNA sau ly trích sẽ được điện di trên gel agarose có nồng độ 1% và chạy ở nhiệt độ 100°C trong 25 phút và 100 V. Sau đó kết quả sẽ được quan sát và chụp bên dưới đèn UV 302 nm (UVP, Hoa Kỳ).

Phương pháp sốc nhiệt

Số lượng mẫu được sốc nhiệt bao gồm: 3 mẫu máu tươi ở nam, 3 mẫu máu tươi ở nữ, các mẫu máu khô theo các mốc thời gian bao gồm sau 3 và 5 tháng. Phương pháp sốc nhiệt được thực hiện bằng cách pha loãng mẫu với nước cất khử ion (đối với mẫu máu tươi) và TE buffer (đối với các mẫu máu khô), khi pha loãng phải mix đều giữa máu và nước đối với mẫu máu tươi hoặc TE đối với mẫu khô. Sau đó mẫu pha loãng sẽ được tách riêng nam và nữ tránh bị tạp nhiễm và được giữ trong tủ ủ nhiệt với nhiệt độ 100°C trong 10 phút. Mẫu được ủ sau 10 phút được mang đi ly tâm 12000 rpm/3 phút. Cuối cùng hút dịch nổi chuyển sang tuýp mới, phần dịch nổi này là phần máu tương đã được phá vỡ tế bào, phần cặn được loại bỏ. Mẫu sau khi sốc nhiệt có thể được dùng trực tiếp để thực hiện phản ứng LAMP mà không cần phải giữ qua đêm.

Phản ứng PCR

Khuếch đại PCR được thực hiện bằng mỗi của 2 gen ATL1 và SRY được liệt kê trong bảng 1. Gen ATL1 là gen đầu xuất hiện ở nam và nữ giới cho nên gen ATL1 được sử dụng như là đối chứng nội để đánh giá chất lượng DNA sau khi ly trích từ mẫu máu. Gene SRY là gene chỉ xuất hiện ở nam giới mà không xuất hiện ở nữ giới. Thể tích phản ứng PCR là 25 µl bao gồm: 12,5 µl GoTaq của nhà sản xuất Omega, 1,2 µl mỗi xuôi, 1,2 µl mỗi ngược, 9,5 µl nước cất khử ion, 1 µl DNA mẫu. Chu trình phản ứng PCR bao gồm 95°C trong 2 phút, 35 chu kỳ với 95°C trong 1 phút, 48°C (ATL1)/ 52°C (SRY) trong 30 giây và 72°C trong 30 giây. Phản ứng PCR được giữ ở 72°C trong 5 phút. Phản ứng PCR được điện di trên gel agarose gel 1,5% nhuộm với thuốc GelRed, chạy trong đệm 0,5 X TBE buffer ở 100 V trong 30 phút và sau đó được quan sát và chụp dưới đèn chiếu UV 302 nm.

Phản ứng LAMP

Phản ứng LAMP được thực hiện bởi bộ mỗi được thiết kế cho việc phát hiện gen SRY (Bảng 1). Các mẫu máu tươi và mẫu máu khô đều sử dụng trong nghiên cứu này. Phương pháp sốc nhiệt được thực hiện bằng cách pha loãng mẫu với nước cất khử ion (đối với mẫu máu tươi) và TE buffer (đối với mẫu máu khô), khi pha loãng phải mix đều giữa máu và nước đối với mẫu máu tươi hoặc TE đối với mẫu khô. Sau đó, mẫu pha loãng sẽ được tách riêng nam và nữ tránh bị tạp nhiễm và được giữ trong tủ sấy ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút. Mẫu được ủ sau 10 phút được mang đi ly tâm 12000 rpm/3 phút. Cuối cùng hút dịch nổi chuyển sang tuýp mới, phần dịch nổi này là phần máu tương đã được phá vỡ tế bào, phần cặn được loại bỏ. Mẫu sau khi sốc nhiệt có thể được dùng trực tiếp trong thí nghiệm này. Phản ứng LAMP được chuẩn bị với nồng độ mỗi phù hợp (1,6 µM of F3/B3, 0,4 µM of FIP/BIP, 3,2 µM of LoopF/LoopB), 15 µl isothermal Master Mix (OptiGene, UK) và 1 µl DNA khuôn. Các mẫu máu tươi và khô sau khi sốc nhiệt có thể sử dụng trực tiếp cho phản ứng LAMP được thực hiện ở nhiệt độ 65°C và được thực hiện bằng máy Genie III của nhà sản xuất Optigene, Anh quốc. Mẫu sau phản ứng LAMP được điện di ở 50 V trong 50 phút, gel agarose nồng độ 1,5%, GelRed (TBR, Vietnam). Sau đó quan sát và chụp hình dưới ánh đèn UV 302 nm.

Kiểm tra độ nhạy của phản ứng LAMP

Độ nhạy, ngưỡng phát hiện của phương pháp LAMP được đánh giá qua các nồng độ giảm dần của DNA. Phản ứng bao gồm DNA đối chứng dương và mẫu máu nam đã được sốc nhiệt từ máu tươi được pha loãng đến 10^{-7} , mẫu LAMP âm (nước cất hai lần). Phản ứng LAMP diễn ra với hỗn hợp Master mix, 7 mẫu ở các nồng độ pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-7} , bộ mỗi LAMP của gene SRY và nước cất. Phản ứng được thực hiện bằng máy Genie II bởi nhà sản xuất Optigene, Anh Quốc.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

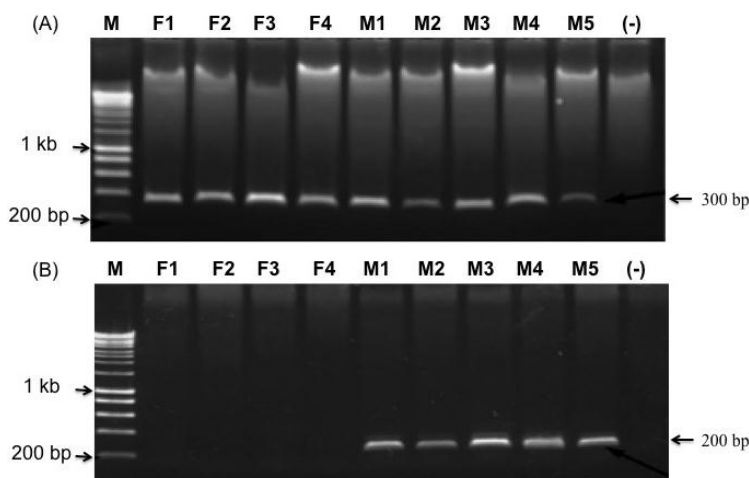
Phân biệt giới tính người bằng kỹ thuật PCR

Tổng cộng 9 mẫu máu trong nghiên cứu này bao gồm 5 nam và 4 nữ được ly trích DNA và đánh giá khả năng khuếch đại PCR bằng mỗi ATL1 vốn hiện diện trên nhiễm sắc thể X và Y. Kết quả qua khuếch đại cho thấy sản phẩm PCR với kích thước khoảng 300 bp được ghi nhận trên các mẫu DNA của cả nam giới và nữ giới

(hình 1A). Điều này cho thấy chất lượng DNA sau khi ly trích từ mẫu máu là đạt chất lượng, không bị tạp nhiễm, chất lượng mỗi ATL1 tốt và đặc hiệu do không xuất hiện các band phụ, các thành phần sử dụng cho phản ứng PCR không bị tạp nhiễm, độ sáng sản phẩm khuếch đại tốt, đúng kích thước của gene ATL1. Sản phẩm DNA của 9 mẫu máu này tiếp tục được sử dụng cho việc đánh giá khả năng phân biệt giới tính bằng kỹ thuật PCR sử dụng mỗi F3 và B3 của gen SRY (bảng 1). Mỗi F3 và B3 là hai mỗi vùng ngoài của đoạn trình tự dùng để thiết kế mỗi LAMP với kích thước là 200 bp. Kết quả cho thấy đoạn khuếch đại 200 bp xuất hiện trên các mẫu DNA của nam giới nhưng lại không xuất hiện trên các mẫu DNA nữ giới (hình 1B). Kết quả này tương đồng với kết quả của các nghiên cứu trước đây chỉ ra tính chuyên biệt của gen SRY trong việc phân biệt giới tính người (Kanchanaphum, 2013). Việc sử dụng gen SRY trong phân tích pháp y và y sinh đã chứng minh tính hiệu quả của gen này trong việc phân biệt nam giới một cách dễ dàng thông qua các phương pháp sinh học phân tử như PCR, nested PCR và realtime PCR (Andreasson, Allen, 2003; Kastelic, 2009; Finch *et al.*, 1996).

Bảng 1. Bảng liệt kê mỗi PCR và LAMP dùng trong nghiên cứu này

Gen	Trình tự nucleotide	Ghi chú
ATL1-F	5' CCCTGATGAAGAAGCTTGTATCTC 3'	Gunter <i>et al.</i> , 1998
ATL1-R	5' GAAATTACACACATAGGTGGCACT 3'	
SRY-F3	5' AACAGTAAAGGCAACGTCCA 3'	Mỗi F3 và B3 cho phản ứng PCR
SRY-B3	5' TCTCTGTGCATGGCCTGTA 3'	
SRY-F3	5' AACAGTAAAGGCAACGTCCA 3'	Mỗi SRY cho phản ứng LAMP
SRY-B3	5' TCTCTGTGCATGGCCTGTA 3'	
SRY-FIB	5' CCATCTTGCGCCTCTGATCGCTTTTAGA GTGAAGCGACCCATGAA 3'	
SRY-BIP	5' AGAGATCAGCAAGCAGCTGGGTTTTAGA ATGGCCATTTTTCGGCT 3'	
SRY – LoopF	5' AGACCACACGATGAATGC 3'	
SRY – LoopR	5' CCAGTGGAAAATGCTTACT 3'	



Hình 1. Kết quả phân biệt giới tính người bằng kỹ thuật PCR

(A) Kết quả điện di sản phẩm PCR của gen ATL1 (B) Kết quả điện di của gen SRY.

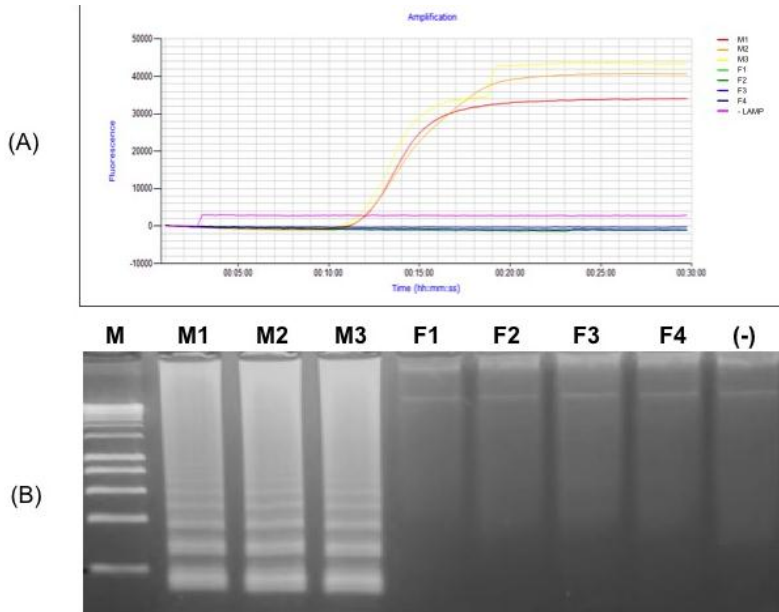
Mẫu nam giới: M1, M2, M3, M4, M5; mẫu nữ giới: F1, F2, F3, F4; đối chứng âm: (-); ladder 1Kb: M.

Phân biệt giới tính người bằng kỹ thuật LAMP

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP trước đây trong việc phân biệt giới tính ở người chủ yếu là sử dụng DNA ly trích từ mẫu máu của các thai phụ ở tuần thứ 8 và mẫu nước tiểu lần lượt dựa trên gen SRY và TTTY (Almasi and Almasi, 2017; Anantasomboon, 2016). Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu khả năng ứng dụng LAMP trong việc phân biệt giới tính người trực tiếp trên mẫu máu tươi và máu khô mà không qua ly trích DNA. Trong nghiên cứu này thí nghiệm được thực hiện với 3 mẫu máu tươi của nam và 3 mẫu máu tươi của nữ. Mẫu thí nghiệm được xử lý bằng phương pháp sốc nhiệt trước khi tiến hành phản ứng LAMP bằng thiết bị Geniell (Optigene, Anh quốc). Kết quả chỉ ra rằng đường khuếch đại (amplification blot) được thấy trên 3 mẫu nam giới nhưng không có trên 4 mẫu nữ giới và mẫu âm tính (hình 2A). Kết quả điện di sản phẩm LAMP cũng chỉ ra rằng chỉ có 3 mẫu nam giới thể hiện dương tính là những vệt DNA dạng hình thang nhưng không có trên các mẫu nữ giới và mẫu âm tính (hình 2B).

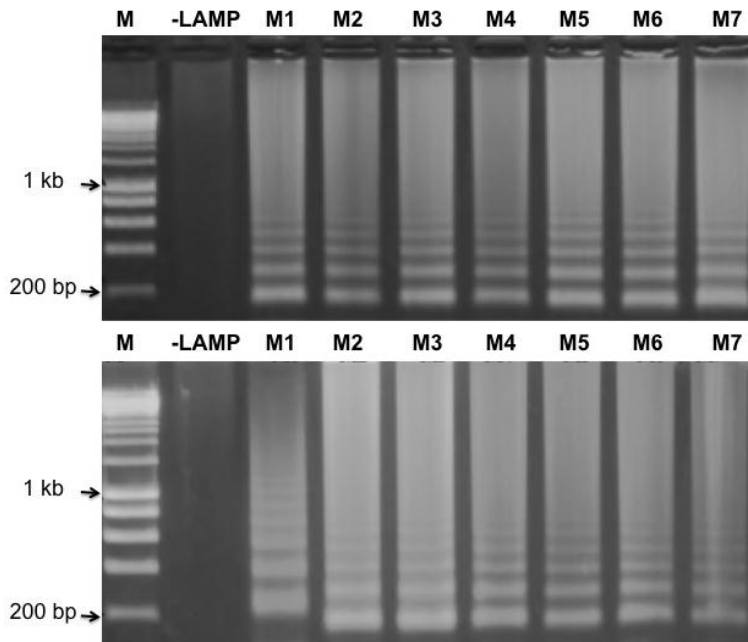
Để đánh giá khả năng phân biệt giới tính người trên vệt máu khô bằng kỹ thuật LAMP, 7 mẫu máu của nam giới được nhỏ vào giấy lọc, để khô ở nhiệt độ phòng theo các mốc thời gian khác nhau gồm, 3 và 5 tháng và được xử lý bằng sốc nhiệt trước khi thực hiện phản ứng LAMP. Kết quả điện di sản phẩm LAMP trên agarose gel chỉ ra rằng tất cả các mẫu máu nam sau 3 và 5 tháng đều xuất hiện vạch thang DNA so với mẫu âm LAMP không xuất

hiện vạch thang DNA (hình 3A và 3B). Kết quả này cho thấy dù điều kiện chất lượng mẫu phức tạp do để khô lâu, đi kèm với ly trích sốc nhiệt trong môi trường không lý tưởng nhưng phương pháp LAMP vẫn có thể phát hiện được gene SRY trong mẫu.



Hình 2. Kết quả phân biệt giới tính người bằng kỹ thuật LAMP

(A) Đường cong khuếch đại sản phẩm LAMP được quan sát trên các mẫu nam giới dựa trên thiết bị GeniIII (Optigene, Anh quốc). (B) Kết quả điện di sản phẩm LAMP trên gel agarose. Mẫu nam giới: M1, M2, M3; mẫu nữ giới: F1, F2, F3, F4; đối chứng âm: (-), Ladder 1Kb: M



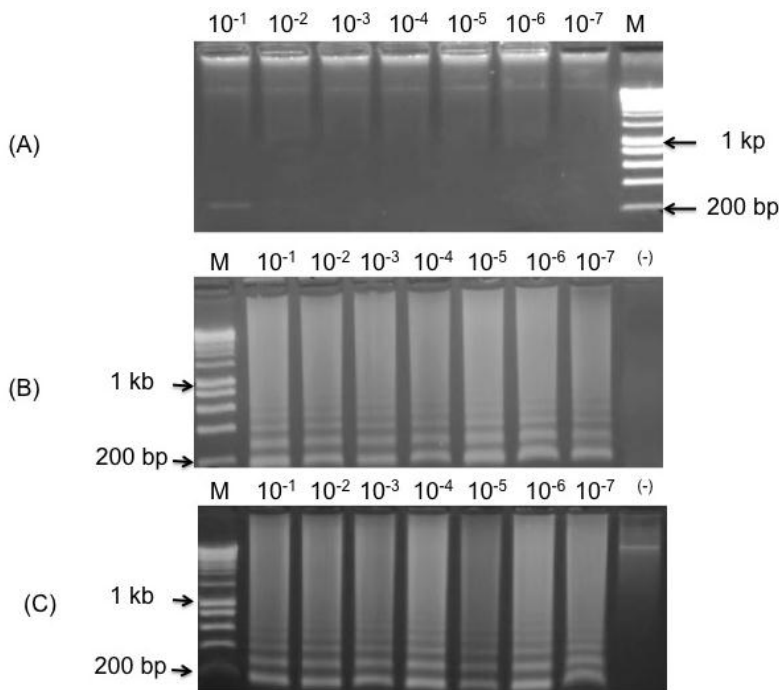
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm LAMP của gen SRY trên gel agarose

(A) Mẫu máu khô sau 3 tháng (B) Mẫu máu khô sau 5 tháng.
Mẫu nam giới: M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7; đối chứng âm: (-LAMP), Ladder 1Kb: M

So sánh độ nhạy của phản ứng PCR và LAMP

Pha loãng mẫu DNA nam giới theo cấp độ từ 10^{-1} - 10^{-7} cho việc so sánh độ nhạy của phản ứng PCR và LAMP trong việc phân biệt giới tính ở người. Kết quả phản ứng PCR cho thấy chỉ phát hiện được SRY ở nồng độ pha loãng là 10^{-1} trong khi các nồng độ khác không phát hiện được (hình 4A). Trong khi đó LAMP có thể phát hiện SRY không chỉ trên các mẫu DNA mà cả trên mẫu máu sau khi sốc nhiệt ở các nồng độ pha loãng đến 10^{-7}

(hình 4B và 4C). Kết quả này cho thấy, độ nhạy của LAMP cao hơn so với PCR và có một số ưu điểm mà PCR không thể thực hiện được chính là khả năng phát hiện tại hiện trường trong thời gian rất ngắn khoảng 30 phút, không cần ly trích DNA mà chỉ cần vết máu ở nồng độ rất ít vẫn có thể phát hiện được. Điều này có ý nghĩa rất lớn và quan trọng trong pháp y giúp phân biệt giới tính người một cách nhanh chóng và chính xác.



Hình 4. So sánh độ nhạy của hai phương pháp PCR và LAMP trong việc phân biệt giới tính người

(A) Kết quả kiểm tra độ nhạy của phản ứng PCR (B) Kết quả kiểm tra độ nhạy của phản ứng LAMP trên mẫu DNA pha loãng ở các nồng độ khác nhau (C) Kết quả kiểm tra độ nhạy của phản ứng LAMP trên mẫu máu pha loãng ở các nồng độ khác nhau. đối chứng LAMP âm: (-), Ladder 1Kb: M

KẾT LUẬN

Việc xây dựng phương pháp LAMP phân biệt giới tính người bằng mẫu máu xử lý sốc nhiệt đã chỉ ra những ưu điểm của phương pháp này so với kết quả của một số nghiên cứu trước đây (Finch *et al.*, 1996; Kasteic *et al.*, 2009; Almasi, Almasi, 2017). Phương pháp LAMP không đòi hỏi nhiều hoá chất hay thiết bị đắt tiền, thời gian phát hiện rất nhanh, không cần DNA tinh sạch và điều đặc biệt là có khả năng phân biệt giới tính người tại hiện trường với những vết máu khô vốn rất khó khăn khi sử dụng các phương pháp truyền thống. Kết quả đạt được trong nghiên cứu này minh chứng rất rõ nét việc ứng dụng kỹ thuật LAMP cho việc phân biệt giới tính là vô cùng hữu ích và hiệu quả, hỗ trợ đầy ý nghĩa trong pháp y và trong nhiều ứng dụng khác trong lĩnh vực y sinh.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh và Bệnh viện Ung bướu Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Almasi MA, Almasi G (2017) Loop mediated isothermal amplification (LAMP) for embryo sex determination in pregnant women eat eight weeks of pregnancy. *J Reproduct Infert* 18(1): 197-204.
- Anantasomboon G (2016) Human sex-identification using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique of Gene TTTY in urine samples. *Siriraj Med J* 68: 3.
- Andréasson H, Allen M (2003) Rapid quantification and sex determination of forensic evidence materials. *J Forensic Sci* 48:1280-7.
- Finch J, Hope RM, van Daal A (1996) Human sex determination using multiplex polymerase chain reaction. *Sci Just* 36: 93-5.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.

Gunter C, Paradee W, Crawford DC, Meadows KA, Newman J, Kunst CB, Nelson DL, Schwartz C, Murray A, Macphersn JN, Sherman SL, Warren ST (1998) Re-examination of factors associated with expansion of CGG repeats using a single nucleotide polymorphism in FMR1. *Human Mol Genet* 7(12):1935-1946.

Kanchanaphum P (2013) Development of Loop mediated isothermal amplification (LAMP) of Gene SRY in human blood samples for sex determination. *Rangsit J Art Sci* 3: 129-135.

Kastelic V, Budowle B, Drobic K (2009) Validation of SRY marker for forensic casework analysis. *J Forensic Sci* 54: 551-555.

Kellermayer R, Halvax L, Crzko M, Shahid M, Dhillon VS, Husain SA, Sule N, Gomori E, Mammel M, Kosztolanyi G (2005) A novel frame shift mutation in the HMG box of the SRY gene in a patient with complete 46, XY pure gonadal dysgenesis. *Diagn Mol Pathol* 14(3): 159-63.

Sinclair AH, Berta P, Balmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJFoster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.

SEX DETERMINATION IN HUMAN USING LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) APPROACH.

Nguyen Bao Quoc^{1*}, Nguyen Thi Thach Thao¹, Nguyen Doan Nguyen Phuong¹, Nguyen Ngoc Bao Chau²

¹ *Research Institute of Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City*

² *Faculty of Biotechnology, Open University Ho Chi Minh City*

SUMMARY

On-site sex determination from DNA or blood traces is essential for forensic science. The SRY gene (sex-determining region) is found on the Y chromosome that can be used for identifying the male genotype. Previous studies showed that sex determination can be done from human blood samples by using PCR technique based on the SRY gene. However, PCR has some obstacles such as time-consuming and costly for implementation, well-equipped facilities, well trained human resource and impossible for on-site detection. Here in, the LAMP approach has been known to be a simple, fast and reliable method, low cost and particularly in on-site detection. The LAMP reactions were performed at 65⁰C with heat-shocked fresh and dry blood samples. The results obtained in two kinds of blood samples, when using the LAMP approach, were positive for samples with male sex. Thereby, this study confirmed that sex determination can be done rapidly when using the LAMP approach and the sensitivity of LAMP is higher than PCR technique. This has great implications for the rapid identification of human sex in forensics and biomedical applications.

Keywords: Sex determination, SRY, LAMP, diagnosis, PCR, forensics.

* Author for corresspondence: Tel: +84-0932082205; Email: baoquoc@hcmuaf.edu.vn