

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

BÙI ANH TUẤN

**NGHIÊN CỨU SỰ TỒN TẠI CỦA DẤU VẾT MÁU DƯỚI
MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN MÔI TRƯỜNG NHẤT ĐỊNH PHỤC VỤ
CÔNG TÁC GIÁM ĐỊNH SINH HỌC HÌNH SỰ**

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

HÀ NỘI - NĂM 2013

MỤC LỤC

Nội dung	Trang
MỞ ĐẦU	1
1. Sự cần thiết của việc nghiên cứu đề tài.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu	3
4. Nội dung nghiên cứu.....	4
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.....	6
Chương I.....	7
MỘT SỐ VẤN ĐỀ VỀ DẤU VẾT MÁU VÀ.....	7
GIÁM ĐỊNH DẤU VẾT MÁU	7
1. Đại cương về dấu vết máu	7
1.1. Khái niệm dấu vết máu	7
1.2. Phương pháp phát hiện, ghi nhận, thu lượm, bảo quản dấu vết máu tại hiện trường	9
1.3. Các phương pháp giám định định hướng dấu vết máu	10
1.4. Phương pháp miễn dịch khuếch tán kép - Ouchterlony:.....	11
2. Tác động của một số yếu tố môi trường đến sự toàn vẹn của phân tử ADN.....	12
2.1. ADN trong tế bào máu.....	12
2.2. Cấu trúc của ADN.....	13
2.2. Sự tác động đến tính toàn vẹn của phân tử ADN	14
3. Giám định ADN từ dấu vết máu	17
3.1. Khái niệm và sự ra đời của giám định gen (ADN).....	17
3.2. Cơ sở khoa học của giám định gen.....	22
4. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về lĩnh vực liên quan đến đề tài.....	25
4.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước	25
4.2. Tình hình nghiên cứu trong nước	29
Chương II.....	31
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	31
1. Vật liệu:.....	31
1.1. Vật liệu dùng trong tách chiết và định lượng ADN.....	31
1.2. Chọn lựa, thu thập mẫu:.....	32

2. Phương pháp nghiên cứu:	32
2.1. Bố trí thí nghiệm	32
2.2. Giám định định hướng dấu vết máu	35
2.3. Xác định protein loài theo Ochterlony từ dấu vết máu [2,3]	36
2.4. Tách chiết ADN từ những mẫu máu thu nhận ở hiện trường:	37
2.5. Định lượng sản phẩm ADN sau tách chiết:	39
2.6. Phương pháp định lượng ADN bằng kit Quantifiler™ Human ADN Quantification ..	39
2.7. Nhân bội sản phẩm ADN sau tách chiết bằng phản ứng PCR.....	40
2.8. Điện di và phân tích kết quả:	43
2.8.1. Nguyên lý điện di trên máy giải trình tự gen ABI Prism 3130 Genetic Analyzer....	43
2.8.2. Các bước tiến hành điện di	44
Chương III	45
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN.....	45
1. Kết quả nghiên cứu	45
1.1. Kết quả xác định định hướng dấu vết máu thu từ các vụ án với dung dịch phenolphthalein:.....	45
1.2. Kết quả xác định protein loài sử dụng kỹ thuật khuếch tán miễn dịch kép theo Ouchterlony:	45
1.3. Kết quả định lượng ADN tổng số từ những dấu vết máu bằng kỹ thuật Realtime – PCR :	46
1.3.1. Kết quả định lượng với các mẫu thu từ các vụ án:	47
1.3.2. Kết quả định lượng ADN đối với các mẫu khảo nghiệm	50
1.4. Kết quả phân tích điện di sản phẩm PCR sử dụng phần mềm GeneMapper ID v.3.2	50
2.2. Đối với các mẫu khảo nghiệm	62
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	67
1. Kết luận.....	67
2. Kiến nghị.....	68

MỞ ĐẦU

1. Sự cần thiết của việc nghiên cứu đề tài

Trong các vụ án hình sự, đặc biệt là các vụ án xâm phạm tính mạng, sức khỏe và nhân phẩm con người, máu là loại dấu vết thường gặp nhất do máu là hệ quả điển hình của sự tác động qua lại giữa đối tượng và nạn nhân trong cơ chế hình thành dấu vết của các hoạt động phạm tội hình sự. Dấu vết máu cũng là dạng dấu vết vật chất có vai trò là những nguồn cung cấp thông tin rất có giá trị trong công tác điều tra, xét xử các vụ án. [5] Thực tế công tác giám định gen (ADN) trong các vụ án hình sự, các dấu vết máu được đưa đến phòng thí nghiệm với sự không đồng đều cả về chất lượng và số lượng. Các phòng giám định gen thường xuyên phải giải quyết những mẫu khó, chất lượng thấp được thu thập từ những dấu vết ở hiện trường sau khi tồn tại ở môi trường tự nhiên trong thời gian dài. Dấu vết máu được thu lượm ở hiện trường thường ở dạng dấu vết khô, đã bị phân hủy ít hay nhiều, bị tạp nhiễm bởi nhiều chất có thể gây ức chế phản ứng PCR. Chất lượng của dấu vết máu ảnh hưởng rất lớn đến chất và lượng ADN tách chiết trực tiếp được từ tế bào máu. Đối với những mẫu máu chất lượng kém, bị thổi rửa, phân hủy hay lẫn các chất ức chế thường gây cho giám định viên không ít những khó khăn trong các công đoạn của quy trình giám định ADN.

Ở Việt Nam, việc khai thác, nghiên cứu, sử dụng dấu vết máu trong giám định ADN hình sự còn nhiều hạn chế, thiếu sót chưa đáp ứng được yêu cầu thực tiễn. Do nhiều nguyên nhân, trong đó công tác phát hiện, nhận định, thu lượm, bảo quản dấu vết máu khi khám nghiệm hiện trường còn có nhiều sai sót, chưa được tiến hành nhanh chóng, kịp thời, chính xác. Việc thu dấu vết máu không đúng cách, không đảm bảo về số lượng, chất lượng, bảo quản dấu vết máu còn rất sơ sài, qua loa, không đảm bảo các yêu cầu về mặt kỹ thuật. Điều đó làm cho chất lượng dấu vết không tốt hoặc bị hư hỏng dẫn đến

không thể đánh giá, giám định để khai thác triệt để các thông tin về vụ án. Về mặt lý luận, trên thế giới, đã có số lượng nhất định những công trình nghiên cứu về chất lượng của một số dấu vết sinh vật nhưng chưa có nghiên cứu nào cụ thể chuyên sâu về chất lượng dấu vết máu phục vụ giám định sinh học hình sự trong điều kiện Việt Nam.

Việc nghiên cứu đánh giá chất lượng ADN thu được từ dấu vết máu dưới tác động của môi trường tự nhiên và thời gian tồn tại góp phần đưa ra các phương thức tốt nhất để cải tiến các kỹ thuật, công đoạn trong công tác khám nghiệm hiện trường, đánh giá, thu thập và bảo quản dấu vết máu, cũng như thủ thuật phân tích ADN tại phòng thí nghiệm. Giúp cho công tác điều tra, khám nghiệm hiện trường và giám định ADN từ dấu vết máu đạt hiệu quả cao, qua đó góp phần giải quyết nhanh chóng các vụ án hình sự. Xuất phát từ vấn đề nêu trên, việc thực hiện Đề tài: “Nghiên cứu chất lượng dấu vết máu dưới tác động của một số điều kiện môi trường nhất định phục vụ công tác giám định sinh học hình sự” là cấp thiết cả về phương diện lý luận và thực tiễn.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích phân tích, đánh giá sự tác động của một số yếu tố môi trường trong khoảng thời gian nhất định lên chất lượng của dấu vết máu trong giám định định hướng, xác định tính đặc hiệu loài, chất lượng và số lượng ADN tách chiết được từ các dấu vết máu thu ở hiện trường vụ án và từ các mẫu khảo nghiệm.

Trên cơ sở kết quả nghiên cứu, đưa ra những nhận định giúp cho cán bộ khám nghiệm hiện trường có các giải pháp trong phát hiện, thu lượm, bảo quản, đánh giá dấu vết máu; các giám định viên có những thủ thuật thực hiện giám định và đánh giá kết quả.

3. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu

Dấu vết sinh vật ở hiện trường các vụ án thường chịu tác động bởi đa dạng các yếu tố khách quan và chủ quan như thời tiết, khí hậu (nhiệt độ, độ ẩm) cũng như ý thức và trình độ cán bộ khám nghiệm hiện trường. Do điều kiện hạn hẹp, đề tài chỉ tập trung nghiên cứu sự tác động của các yếu tố về khí hậu và thời tiết ở điều kiện trong nhà và ngoài trời, qua bốn mùa trong năm đối với các mẫu thu được từ những vụ án thực tế. Đề tài chưa thể đi sâu nghiên cứu các tác động mang tính chủ quan khác như tác động của con người, động vật (giặt, tẩy, sử dụng hóa chất, chùi, xóa, ...); các điều kiện thiên nhiên đặc biệt (mưa, bão, lũ lụt,...); các yếu tố cơ học hay sự tác động của yếu tố vật mang lên sự tồn tại của dấu vết.

Đề tài luận văn chỉ tập trung nghiên cứu dấu vết máu ở dạng khô bám dính trên bề mặt một vật mang thường gặp là vải cotton.

Ngoài các yếu tố điều kiện môi trường, kết quả giám định dấu vết máu còn phụ thuộc vào khối lượng dấu vết, do đó các dấu vết được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu sẽ được nhận định trước về lượng bằng cảm quan.

Với các mẫu khảo nghiệm, Đề tài tập trung nghiên cứu vào hai điều kiện vật lý thường tác động đến chất lượng của dấu vết máu nhất trong hiện trường thực tế các vụ án đó là: nhiệt độ và độ ẩm theo không gian và thời gian.

Về mặt thời gian, không gian khảo sát: dấu vết máu trong các vụ án xảy ra tại địa bàn Miền Bắc Việt Nam, bốn mùa trong năm 2012 và tồn tại qua 3 mốc thời gian là 3 ngày, 10 ngày và 5 tuần.

Việc sử dụng kỹ thuật realtime PCR định lượng ADN chỉ là một khâu trong quy trình giám định sinh học giúp ta đánh giá được về hàm lượng ADN tách chiết được từ các dấu vết máu, từ đó định hướng điều chỉnh hàm lượng

ADN khuôn đưa vào mỗi phản ứng PCR. Việc đánh giá về chất lượng của dấu vết máu là đối tượng nghiên cứu của đề tài phải được kết hợp ở cả 4 công đoạn của quy trình giám định, đó là giám định định hướng, xác định tính đặc hiệu loài, định lượng ADN tổng số sau tách chiết và phân tích kết quả điện di sản phẩm PCR.

Quá trình nghiên cứu được tiến hành trong phòng thí nghiệm của Trung tâm Giám định sinh học pháp lý, Viện Khoa học hình sự, Bộ Công an.

4. Nội dung nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu thu được từ 2 nguồn:

- Các dấu vết máu thu thập được từ những vụ án giết người, cướp của

Các dấu vết này ở trong những điều kiện khác nhau về khí hậu, và thời gian tồn tại. Cụ thể là mẫu máu từ các vụ án được chọn lựa theo các tiêu chí tồn tại qua các mốc thời gian và xảy ra ở nơi có khí hậu 4 mùa rõ rệt là miền Bắc Việt Nam. Tất cả các đối tượng nghiên cứu được chia vào 2 nhóm tách biệt là dấu vết máu được tồn tại ở điều kiện trong nhà và ngoài trời và qua 3 mốc thời gian là 3 ngày, 10 ngày và 5 tuần:

6 mẫu trong các vụ án hình sự (có ký hiệu từ MA1 – MA6) là các dấu vết máu có điều kiện tồn tại ở trong nhà.

6 mẫu trong các vụ án hình sự (có ký hiệu từ MA7 – MA12) là các dấu vết máu có điều kiện tồn tại ở ngoài trời vào mùa xuân.

6 mẫu trong các vụ án hình sự (có ký hiệu MA13 – MA18) là các dấu vết máu có điều kiện tồn tại ở ngoài trời vào mùa hè.

6 mẫu trong các vụ án hình sự (có ký hiệu từ MA19 – MA24) là các dấu vết máu có điều kiện tồn tại ở ngoài trời vào mùa thu.

6 mẫu trong các vụ án hình sự (có ký hiệu từ MA25 – MA30) là các dấu vết máu có điều kiện tồn tại ở ngoài trời vào mùa đông.

Tổng số mẫu từ các vụ án được chọn làm đối tượng nghiên cứu là 6 mẫu x 5 nhóm = 30 mẫu.

- Các mẫu khảo nghiệm được tạo ra:

Quy trình: lấy các mẫu máu tươi của người nhỏ với lượng khoảng 50 ul lên vật mang là những mảnh vải cotton khô, sạch sau đó được đưa vào các điều kiện giả định về môi trường, khí hậu.

6 mẫu khảo nghiệm (có ký hiệu từ KN1 – KN6) là các dấu vết máu tạo được tạo ra trong phòng thí nghiệm để đưa vào các điều kiện về nhiệt độ khác nhau.

6 mẫu khảo nghiệm (có ký hiệu từ KN7 – KN12) là các dấu vết máu tạo được tạo ra trong phòng thí nghiệm để đưa vào các điều kiện về ẩm độ khác nhau.

Địa điểm tiến hành thí nghiệm là Phòng thí nghiệm của Trung tâm giám định Sinh học pháp lý - Viện Khoa học hình sự.

Mẫu khảo nghiệm được lưu trữ tương ứng với 3 mốc thời gian là 3, 10 ngày và 5 tuần ở điều kiện nhiệt độ và ẩm độ khác nhau.

Số lượng mẫu ứng với từng điều kiện cụ thể như sau:

Tổng số mẫu khảo nghiệm là: $6 \times 2 = 12$ mẫu.

Các mẫu được đánh giá chất lượng gián tiếp qua các bước của quy trình giám định như sau:

Sử dụng dung dịch phenolphthalein để xác định định hướng dấu vết máu. Sử dụng phương pháp khuếch tán miễn dịch kép trên thạch theo Ouchterlony để xác định tính đặc hiệu loài của protein trong dấu vết.

ADN được tách chiết theo quy trình chuẩn bằng phương pháp vô cơ sử dụng hạt Chelex (quy trình đã được phòng thí nghiệm ADN hình sự của Cảnh sát bang Victoria - Liên bang Úc phê chuẩn).

Sử dụng bộ kit *Quantifiler Human ADN*, máy Realtime PCR 7500 của hãng ABI (Mỹ) để định lượng ADN tổng số từ mẫu được tách chiết. Đơn vị định lượng là: ng/ μ l

Sử dụng bộ kit *Identifiler*TM của hãng ABI (Mỹ), với phức hệ mồi STR gồm 16 locus gen trên máy chu trình nhiệt ABI - 9700.

Sau khi thu được sản phẩm PCR, tiến hành xác định kiểu gen của các mẫu nghiên cứu bằng phương pháp điện di huỳnh quang (điện di mao quản) trên máy giải trình tự gen AB 3130 của hãng Applied Biosystems.

Các kết quả thu được được xử lý bằng phần mềm *Genemapper ID v.3.2* để xác định hình ảnh đặc trưng của các peak, hình thái các alen của mỗi locus, qua đó đánh giá chất lượng kiểu gen thu được từ sản phẩm PCR, gián tiếp xác định được chất lượng ADN khuôn thu được từ các đối tượng nghiên cứu.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Nghiên cứu này sẽ đưa ra các mức đánh giá tác động đến chất lượng và số lượng của ADN tách chiết được từ những dấu vết máu dưới những điều kiện nhiệt độ và độ ẩm trong khoảng thời gian cụ thể.

Việc nghiên cứu đánh giá chất lượng ADN của dấu vết máu góp phần đưa ra các phương thức tốt nhất để cải tiến các kỹ thuật, công đoạn trong công tác khám nghiệm hiện trường, đánh giá, thu thập và bảo quản dấu vết máu, cũng như giám định, phân tích ADN tại phòng thí nghiệm. Từ đó giúp cho việc khai thác hiệu quả tối đa thông tin từ dấu vết máu góp phần giải quyết các vụ án. Hoàn thiện cơ sở lý luận về giám định sinh học pháp lý nói chung và giám định gen (ADN) nói riêng phục vụ cho công tác thực tiễn đấu tranh phòng chống tội phạm, cũng như nghiên cứu và đào tạo.

Chương I.

MỘT SỐ VẤN ĐỀ VỀ DẤU VẾT MÁU VÀ GIÁM ĐỊNH DẤU VẾT MÁU

1. Đại cương về dấu vết máu

Khái niệm dấu vết máu

Dấu vết máu là lượng máu được tìm thấy ở hiện trường, trên công cụ, phương tiện gây án, trên quần, áo, đồ dùng, thân thể của nạn nhân hay của thủ phạm... Sự xuất hiện của dấu vết máu là hậu quả của các hành vi đã xảy ra trong vụ việc có tính hình sự, được thu và giám định theo qui định của pháp luật.[2]

Qua thống kê, dấu vết máu chiếm tới 60% trong tổng số các loại dấu vết sinh vật hình thành và tồn tại liên quan đến vụ việc hình sự cần điều tra khám phá. Máu thuộc loại mô lỏng lưu thông trong hệ thống tuần hoàn của người và động vật. Ở giới động vật, trong thành phần cấu tạo của hemoglobin trong máu có ion sắt hóa trị 2 (Fe^{++}) nên máu bao giờ cũng có màu đỏ. Trong cơ thể người, máu chiếm 8% trọng lượng cơ thể, thành phần bao gồm hồng cầu, các loại bạch cầu, tiểu cầu, sợi huyết và huyết thanh. Người bình thường trong 1ml máu có từ 4,5-5,0 triệu hồng cầu và 7000-9000 bạch cầu. Đối tượng chính dùng để giám định gen là bạch cầu (chủ yếu là bạch cầu limpho). Số lượng và tỷ lệ bạch cầu ở người lớn và trẻ em có biểu hiện khác nhau. Người lớn bạch cầu limpho chiếm 20-23%. Do đó chỉ cần một lượng máu nhỏ cũng đủ để giám định..[4]

Phương pháp cơ bản để tìm dấu vết máu tại hiện trường cũng như khi giám định các đồ vật nghi dính máu là quan sát trong điều kiện chiếu sáng tốt, có thể sử dụng công cụ hỗ trợ như kính lúp đèn chiếu xiên hoặc kit định hướng để tìm các vết máu đã bị chùi, xoá.