

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

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

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

LÊ THU TRANG

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH SẢN XUẤT
KHÁNG HUYẾT THANH PHỤC VỤ CÔNG TÁC
GIÁM ĐỊNH SINH HỌC PHÁP LÝ TẠI VIỆN
KHOA HỌC HÌNH SỰ - BỘ CÔNG AN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2013

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

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

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Đề tài :

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH SẢN XUẤT
KHÁNG HUYẾT THANH PHỤC VỤ CÔNG TÁC
GIÁM ĐỊNH SINH HỌC PHÁP LÝ TẠI VIỆN
KHOA HỌC HÌNH SỰ - BỘ CÔNG AN**

Học viên: Lê Thu Trang

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 01 14

Người hướng dẫn: PGS. TS. Nguyễn Văn Hà

HÀ NỘI - 2013

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn Đại tá, PSG. TS. Nguyễn Văn Hà – Phó Giám đốc Trung tâm giám định sinh học Pháp lý – Viện Khoa học hình sự, trong thời gian qua đã dìu dắt và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành tốt luận văn này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn các cán bộ Trung tâm giám định sinh học Pháp lý – Viện Khoa học hình sự đã tận tình giúp đỡ và chỉ bảo cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến các thầy cô giáo của Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật – Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam đã dạy dỗ tận tình và tạo một môi trường học tập lành mạnh cùng những điều kiện trang thiết bị vật chất tốt nhất cho tôi học tập tốt.

Bên cạnh đó tôi xin tỏ lòng biết ơn và những lời cảm ơn chân thành nhất đến gia đình, bạn bè, những người luôn chia sẻ, động viên và giúp tôi đạt được kết quả học tập tốt cũng như hoàn thành tốt khóa luận này.

Một lần nữa tôi xin chân thành cảm ơn.

Hà Nội, tháng 12 năm 2013

Học viên

Lê Thu Trang

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

APC	Antigen presenting cell (Tế bào trình diện kháng nguyên)
CD	Cluster of differentiation (Danh pháp chỉ dấu ấn trên bề mặt bạch cầu và tiểu cầu được xác định bởi kháng thể đơn dòng)
Ig	Immunoglobulin (Globulin miễn dịch)
KN-KT	Kháng nguyên – Kháng thể
MHC	Major histocompatibility complex (Các kháng nguyên phù hợp tổ chức)
NK	Natural killer (Tế bào giết tự nhiên)
TCR	T cell receptor (Thụ quan bề mặt tế bào T)
T _H	Lympho T helper cell (Tế bào lympho T hỗ trợ)
Tế bào B	Tiền thân của tế bào plasma sản xuất kháng thể
Tế bào T	Quần thể tế bào lympho biệt hóa trong tuyến ức
T _C	Cytotoxic T cell (Tế bào T gây độc tế bào)
T _{DTH}	Delayed type hypersensitivity T cell (Tế bào T gây quá mẫn muộn)

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
I. Một số vấn đề cơ bản về miễn dịch học.....	3
1. Lịch sử phát triển của miễn dịch học.....	3
2. Các trạng thái miễn dịch.....	4
2.1. Cơ chế bảo vệ không đặc hiệu.....	4
2.2. Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.....	4
3. Các phản ứng miễn dịch.....	5
3.1. Miễn dịch thể dịch.....	5
3.2. Miễn dịch qua trung gian tế bào.....	6
4. Chất sinh miễn dịch và kháng nguyên.....	6
4.1. Chất sinh miễn dịch.....	6
4.2. Tính đặc hiệu của kháng nguyên.....	7
4.3. Các loại kháng nguyên.....	8
4.4. Cách gây miễn dịch và đường vào của kháng nguyên.....	8
5. Kháng thể.....	9
5.1. Tính chất của kháng thể.....	9
5.2. Các loại kháng thể.....	10
5.3. Cấu trúc của kháng thể miễn dịch.....	10
5.4. Cơ sở di truyền tính không đồng nhất ở các kháng thể.....	12
5.5. Cơ chế sinh tổng hợp kháng thể.....	13
5.6. Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies).....	14
6. Phản ứng kháng nguyên – kháng thể.....	15
6.1. Phản ứng của kháng thể với các kháng nguyên hữu hình.....	15
6.2. Phản ứng với kháng nguyên hoà tan (phản ứng kết tủa Ouchterlony).....	16
7. Tình hình nghiên cứu kháng huyết thanh nước ngoài và ở Việt Nam.....	17

7.1. Tình hình nghiên cứu nước ngoài	17
7.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam	18
II. Một số đặc điểm của thỏ.....	19
III. Tá chất (Adjuval)	21
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG	
HUYẾT THANH	23
I. Thiết bị và dụng cụ	23
1. Thiết bị	23
2. Dụng cụ	23
3. Hóa chất.....	24
II. Phương pháp thu kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch trên thỏ	24
III. Phương pháp gây miễn dịch.....	26
1. Kết hợp kháng nguyên - tá chất	26
2. Phác đồ gây miễn dịch	26
IV. Phương pháp lấy máu thỏ đã gây miễn dịch.....	27
V. Phương pháp tách kháng huyết thanh	27
VI. Phản ứng khuếch tán miễn dịch kép (Phương pháp Ouchterlony).....	28
VII. Xác định thành phần cơ bản của kháng huyết thanh bằng phương pháp điện di miễn dịch.	30
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.....	
I. Kết quả thử nghiệm liều tiêm kháng huyết thanh.....	32
II. Kiểm tra tính đặc hiệu của kháng huyết thanh thu được.....	32
1. Kết quả mũi tiêm thứ 1	32
2. Kết quả mũi tiêm thứ 2.....	33
3. Kết quả mũi tiêm thứ 3.....	34
4. Kết quả mũi tiêm thứ 4.....	35
III. Xác định hiệu giá kháng huyết thanh.....	36
1. Pha loãng kháng nguyên	37

2. Thực hiện phản ứng Ouchterlony	37
IV. Kết quả xác định thành phần cơ bản của kháng huyết thanh bằng phương pháp điện di miễn dịch.	40
V. Bảo quản kháng huyết thanh:	41
VI. Bàn luận	41
1. Diễn biến sinh lý thỏ	41
2. Chất lượng kháng huyết thanh	42
3. Ứng dụng.....	43
CHƯƠNG 4. SƠ ĐỒ QUY TRÌNH TỔNG QUÁT SẢN XUẤT KHÁNG HUYẾT THANH	45
QUY TRÌNH CHI TIẾT SẢN XUẤT KHÁNG HUYẾT THANH.....	46
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	49

DANH MỤC CÁC HÌNH VÀ BẢNG

Bảng 3.1. Bảng kết quả phản ứng đáp ứng miễn dịch của thỏ	32
Hình 3.1. Kết quả kháng huyết thanh người thu được sau 1 tuần tiêm mũi thứ 1.....	33
Hình 3.2. Kết quả kháng huyết thanh người thu được sau 1 tuần tiêm mũi thứ 2.....	34
Hình 3.3. Kết quả kháng huyết thanh người thu được sau 1 tuần tiêm mũi thứ 3.....	35
Hình 3.4. Kết quả kháng huyết thanh người thu được sau 1 tuần tiêm mũi thứ 4.....	36
Hình 3.5. Kháng huyết thanh người đạt hiệu giá 1/512	38
Hình 3.6. Kháng huyết thanh chó đạt hiệu giá 1/512.....	38
Hình 3.7. Kháng huyết thanh lợn đạt hiệu giá 1/512	39
Hình 3.8. Kháng huyết thanh gia cầm đạt hiệu giá 1/512.....	39
Hình 3.9. Kháng huyết thanh trâu bò đạt hiệu giá 1/1024	40
Hình 3.10. Điện di đồ huyết thanh kháng protein huyết thanh người	40
Hình 3.11. Sản phẩm kháng huyết thanh đóng lọ theo lô phục vụ công tác giám định.....	41
Hình 3.12. Hiệu giá kháng huyết thanh người do nước ngoài cung cấp	42
Hình 3.13. Hiệu giá kháng huyết thanh người do đề tài sản xuất	42
Hình 3.14. Kháng huyết thanh miễn dịch xác định dấu vết máu người do nước ngoài sản xuất.....	42
Hình 3.15. Kháng huyết thanh miễn dịch xác định dấu vết máu người do đề tài sản xuất.....	43

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Do mặt trái của cơ chế thị trường, trong những năm gần đây, tình hình tội phạm có nhiều diễn biến phức tạp, số lượng các vụ phạm tội không ngừng gia tăng đòi hỏi lực lượng công an nói chung và lực lượng kỹ thuật hình sự nói riêng phải không ngừng nâng cao chất lượng công tác góp phần tích cực trong công cuộc đấu tranh trấn áp tội phạm, giữ gìn trật tự an toàn xã hội. Trong công tác giám định hình sự, đặc biệt là giám định sinh học pháp lý, việc xác định rõ nguồn gốc các dấu vết, mẫu vật có ý nghĩa đặc biệt quan trọng góp phần làm sáng tỏ vụ án cũng như truy tìm thủ phạm. Tuy nhiên trong thực tế, khi mỗi vụ án xảy ra, cơ quan điều tra thường thu rất nhiều dấu vết, mẫu vật, trong đó có không ít các dấu vết, mẫu vật không có nguồn gốc từ cơ thể người hoặc cơ thể sinh vật khác, do đó để tiến hành giám định, các giám định viên phải loại trừ những dấu vết mẫu vật không có nguồn gốc sinh vật đồng thời phải xác định dấu vết, mẫu vật nào có nguồn gốc từ người, dấu vết nào có nguồn gốc từ các động vật thường gặp khác. Việc loại trừ cũng như khẳng định nguồn gốc (loài) của các dấu vết, mẫu vật gửi giám định không chỉ góp phần tiết kiệm thời gian, công sức, tiền bạc mà còn là cơ sở để thực hiện các bước giám định tiếp theo như giám định nhóm máu, giám định gen (ADN). Để xác định được nguồn gốc (loài) của các dấu vết, mẫu vật sinh học như dấu vết máu, dấu vết lông tóc, dấu vết mô, tổ chức cơ thể, dấu vết nước bọt,... một cách nhanh chóng và tiết kiệm nhất, các phòng thí nghiệm sinh học hình sự thường sử dụng kháng huyết thanh loài. Từ trước tới nay, kháng huyết thanh loài chỉ có thể mua từ một số ít các công ty chuyên sản xuất kháng huyết thanh để phục vụ công tác giám định, việc này làm cho công tác giám định hoàn toàn bị động và tốn kém tiền của nhà nước.

Hàng năm, Trung tâm giám định sinh học pháp lý – Viện Khoa học hình sự tiến hành giám định trên 500 vụ án với hàng nghìn mẫu vật có nguồn gốc sinh vật khác nhau, trong đó, các dấu vết có nguồn gốc từ cơ thể người và động vật chiếm tới 80% (khoảng 300 vụ). Để giải quyết các vụ án trên bắt buộc phải sử dụng một lượng lớn kháng huyết thanh loài nhằm xác định nguồn gốc của các dấu vết để lại tại hiện trường, phục vụ cho các công tác giám định tiếp theo

Để không bị động trong công tác, đáp ứng được yêu cầu thực tiễn đặt ra thì phải chủ động sản xuất được kháng huyết thanh các loài khác nhau, do vậy việc “*Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất kháng huyết thanh phục vụ cho công tác giám định sinh học pháp lý*” là hết sức cấp thiết, có ý nghĩa thực tiễn cao, nó giúp cho cơ quan giám định tự sản xuất được kháng huyết thanh, không thụ động chờ mua từ bên ngoài, góp phần thúc đẩy tiến độ giám định và giải quyết các vụ án được nhanh chóng. Do điều kiện kinh phí hạn hẹp, chúng tôi chỉ nghiên cứu quy trình sản xuất kháng huyết thanh đối với một số loài có dấu vết thường gặp trong các vụ án như người, chó, lợn, trâu bò và gia cầm.

2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

Xây dựng quy trình chuẩn để sản xuất kháng huyết thanh phục vụ cho công tác giám định sinh học tại viện Khoa học hình sự và các Phòng Kỹ thuật hình sự của Công an các địa phương trên cả nước.

3. Nội dung nghiên cứu của đề tài và các vấn đề cần giải quyết

- Xây dựng quy trình sản xuất kháng huyết thanh người, chó, lợn, trâu bò và gia cầm.
- Thu nhận và xác định hiệu giá các loại kháng huyết thanh sản xuất được.
- Đóng gói và bảo quản kháng huyết thanh