

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

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

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----***-----

ĐÀM THỊ HUỆ

**NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỊNH HƯỚNG
DẤU VẾT MÁU BẰNG DUNG DỊCH
PHENOLPHTHALEIN PHỤC VỤ CÔNG TÁC
GIÁM ĐỊNH SINH HỌC PHÁP LÝ TẠI VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2015

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 PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỊNH HƯỚNG
DẤU VẾT MÁU BẰNG DUNG DỊCH
PHENOLPHTHALEIN PHỤC VỤ CÔNG TÁC
GIÁM ĐỊNH SINH HỌC PHÁP LÝ TẠI VIỆT NAM**

Học viên:

Đàm Thị Huệ

Chuyên ngành:

Sinh học thực nghiệm

Mã số:

60420114

Người hướng dẫn:

PGS - TS Nguyễn Văn Hà

Hà Nội – 2015

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới Đại tá, PGS-TS Nguyễn Văn Hà – Phó giám đốc – Phụ trách Trung tâm giám định Sinh học Pháp lý – Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an đã tận tình hướng dẫn trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành bản luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Lãnh đạo Viện Khoa học hình sự, Lãnh đạo Trung tâm và các đồng chí đồng nghiệp trong Trung tâm giám định Sinh học Pháp lý - Viện Khoa học hình sự đã tạo điều kiện về thời gian và cơ sở vật chất để tôi thực hiện các quy trình thí nghiệm của đề tài luận văn. Cảm ơn phòng kỹ thuật hình sự Công an các tỉnh Vĩnh Phúc, Bắc Giang, Thanh Hóa, TP Hồ Chí Minh và phân viện KHHS tại TP Hồ Chí Minh đã thử nghiệm và đánh giá bộ kit tại địa phương.

Tôi xin chân thành cảm ơn Lãnh đạo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, các thầy cô giáo thuộc Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã tận tình truyền đạt kiến thức, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, bạn bè đã động viên, góp ý, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Học viên

Đàm Thị Huệ

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu	2
4. Nội dung nghiên cứu.....	3
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.....	3
6. Cấu trúc của đề tài	4
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. Khái niệm về máu về dấu vết máu	5
1.1.1. Khái niệm về máu	5
1.1.2. Dấu vết máu.....	7
1.1.3. Ý nghĩa của giám định dấu vết máu.....	8
1.1.4. Phương pháp phát hiện, ghi nhận dấu vết máu tại hiện trường ...	10
1.2. Cơ sở khoa học, nguyên lý chung của các phương pháp giám định định hướng dấu vết máu.....	11
1.3. Các phương pháp giám định định hướng dấu vết máu trên thế giới	14
Dưới đây là cấu tạo hóa học của một số cơ chất.....	14
1.3.1. Kít thử định hướng dấu vết máu phenolphthalein.....	15
1.3.2. Benzidine.....	16
1.3.3. Que thử Hemastix.....	17
1.3.4. Kít thử định hướng dấu vết máu O – Tolidine	17
1.3.5. Kít thử định hướng dấu vết máu bằng TMB – dẫn suất của benzidine	18
1.3.6. Kít thử định hướng dấu vết máu LMG.....	19
1.3.7. Kít thử định hướng dấu vết máu quang hóa và huỳnh quang	19
1.3.8. Luminol	20

1.4. Phương pháp giám định định hướng dấu vết máu hiện được sử dụng tại Việt Nam.....	21
1.4.1. Phương pháp Benzidine	21
1.4.2. Bộ test thử định hướng dấu vết máu “hemo test” của Viện kỹ thuật hóa sinh và tài liệu nghiệp vụ - Bộ Công an	22
1.4.3. Cách tiếp cận phương pháp thử định hướng dấu vết máu.....	22
Chương 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	25
2.1. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ	25
2.1.1. Hóa chất.....	25
2.1.2. Thiết bị	25
2.1.3. Dụng cụ	25
2.2. Phương pháp nghiên cứu	26
2.2.1. Phương pháp pha loãng máu người toàn phần.....	26
2.2.2. Các phương pháp tiến hành.....	27
2.3. Các phương pháp nghiên cứu bổ trợ.....	29
2.3.1. Phương pháp xác định máu loài theo Ochternoly.....	29
2.3.2. Phương pháp tách DNA bằng Chelex®.....	30
2.3.3. Phương pháp định lượng DNA bằng kit Quantifiler™ Human DNA Quantification.	31
2.3.4. Sử dụng kỹ thuật PCR bằng bộ kit AmpFlSTR Identifier PCR Amplification Kit để nhân bội ADN từ các dấu vết máu đã được thử bằng phenolphthalein	33
2.3.5. Phương pháp điện di huỳnh quang	34
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	36
3.1. Kết quả nghiên cứu	36
3.1.1. Kết quả xác định hóa chất chuyển đổi phenolphthalein từ dạng oxi hóa sang dạng khử.....	36

3.1.2. Kết quả xác định nồng độ hóa chất tối ưu cho dung dịch thuốc thử..	40
3.1.3. Kết quả xác định độ nhạy của dung dịch thuốc thử phenolphthalein	40
3.1.4. Kết quả xác định sự dương tính giả của thuốc thử đối với những chất không phải là máu.....	42
3.1.5. Nghiên cứu về điều kiện và khả năng bảo quản của bộ kit.....	43
3.1.6. Thử nghiệm với máu bị phân hủy trong điều kiện môi trường....	45
3.2. So sánh độ nhạy của thuốc thử đối với các phương pháp phân tích dấu vết máu hiện có	47
3.2.1. Với kháng huyết thanh kháng protein người	47
3.2.2. Với kit định lượng ADN người (Human Quantifiler) do Applybiosystems (Mỹ) sản xuất.....	48
3.7.3. Với kit truy nguyên cá thể người Identifiler do Applybiosystems (Mỹ) sản xuất.....	48
3.3. So sánh độ nhạy của thuốc thử phenolphthalein với các phương pháp thử định hướng khác	50
3.3.1. So sánh với phương pháp benzydine truyền thống.....	50
3.3.2. So sánh với kit phenolphthalein của hãng Medtech (Đức).....	51
3.3.3. So sánh với kit Hemastix của hãng Roche.....	51
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	56
TÀI LIỆU THAM KHẢO	58

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

ADN (DNA):	Axit deoxyribonucleic
PCR:	Polymerase Chain Reaction (phản ứng nhân bội gen)
STRs:	short tandem repeat: các trình tự AND lặp lại ngắn
TMB:	Tetramethylbenzidine
LMG:	Leucomalachite green
KTHS:	kỹ thuật hình sự
KHHS:	Khoa học hình sự
Hb:	Hemoglobin.
C54:	Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an
PC54:	Phòng kỹ thuật hình sự - Công an các tỉnh, thành phố.

DANH MỤC BẢNG BIỂU, SƠ ĐỒ VÀ HÌNH**Bảng biểu**

Bảng 2.1. Độ pha loãng máu và mật độ hồng cầu trung bình.....	26
Bảng 2.2. Thành phần của phản ứng PCR sử dụng kit Identifiler.....	33
Bảng 2.3. Chu trình nhiệt được sử dụng cho phản ứng nhân gen.....	33
Bảng 2.4. Thành phần của hỗn hợp điện di trên máy AB 3130.....	35
Bảng 3.1. Kết quả chuyển màu của phenolphthalein trong môi trường kiềm mạnh không tác động nhiệt	37
Bảng 3.2. Đánh giá độ đậm màu của dung dịch phenolphthalein trong dung dịch kiềm.	37
Bảng 3.3. Kết quả chuyển màu của phenolphthalein trong môi trường kiềm mạnh tác động nhiệt (đun sôi trên máy khuấy từ gia nhiệt).....	38
Bảng 3.4. Độ ổn định màu của dung dịch thuốc thử theo thời gian	39
Bảng 3.5. Thử nghiệm thuốc thử với độ pha loãng máu khác nhau	41
Bảng 3.6. Kết quả thử nghiệm dương tính giả với các chất tẩy rửa	42
Bảng 3.7. Kết quả thử nghiệm dương tính giả với các nhựa thực vật	42
Bảng 3.8. Kết quả thực nghiệm dương tính giả với các chất hóa tổng hợp... ..	42
Bảng 3.9. Kết quả thử nghiệm với các máu của động vật	43
Bảng 3.10. Kết quả xác định độ bền thuốc thử theo thời gian bảo quản	44
Bảng 3.11. Kết quả thử nghiệm với máu đã bị phân hủy	46
Bảng 3.12. Xác định hàm lượng ADN người ở các nồng độ.....	48
pha loãng máu khác nhau	48
Bảng 3.13. Bảng tổng hợp kết quả so sánh độ nhạy của thuốc thử phenolphthalein đối với các phương pháp phân tích dấu vết máu hiện có.....	49
Bảng 3.14. Kết quả tổng hợp so sánh độ nhạy của phản ứng đối với.....	53
các kit thử định hướng thương mại	53

Sơ đồ

Sơ đồ 1.1. Nguyên lý của các phương pháp định hướng dấu vết máu 12
Sơ đồ 1.2. Cơ chế phản ứng thử định hướng dấu máu sử dụng phenolphthalein. 15
Sơ đồ 1.3. Cơ chế phản ứng thử định hướng vết máu sử dụng Benzidine 17
Sơ đồ 1.4. Cơ chế của phản ứng thử định hướng vết máu sử dụng LMG 19
Sơ đồ 1.5. Cơ chế của phản ứng thử định hướng vết máu sử dụng Luminol . 20
Sơ đồ 2.1. Sơ đồ pha loãng máu từ máu toàn phần 26

Hình

Hình 1. Kết quả thử với dung dịch máu pha loãng để ở các 47
điều kiện sau 2 tháng 47
Hình 2. Kết quả xác định độ nhạy của máu pha loãng với kháng huyết thanh
kháng protein người 48
Hình 3. So sánh trực tiếp giữa thuốc thử định hướng phenolphthalein và dung
dịch benzidine truyền thống 50
Hình 4. So sánh với kit phenolphthalein của hãng Medtech (Đức) 51
Hình 5. So sánh với kit Hemastix của hãng Roche 51

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của 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 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. Dấu vết máu được tìm thấy ở hiện trường trở thành các chứng cứ trực tiếp để giải quyết các vụ án hình sự.

Trong giám định sinh học pháp lí, bước giám định định hướng các loại dấu vết nói chung và dấu vết máu nói riêng là vô cùng quan trọng vì đây không chỉ là phương pháp xác định vị trí dấu vết trên vật mang góp phần làm rõ cơ chế hình thành dấu vết mà còn nhằm loại trừ nhanh các dấu vết tại hiện trường, giảm đi số lượng các dấu vết cần phải gửi tới cơ quan giám định.

Từ trước đến nay, phương pháp giám định định hướng dấu vết máu tại Viện Khoa học hình sự là sử dụng dung dịch Benzidine bão hòa trong axit axetic (CH_3COOH). Benzidine là một chất độc hại, là nhân tố gây ung thư và rất khó phân hủy trong môi trường tự nhiên. Các phòng giám định sinh học trên thế giới từ rất lâu đã cấm sử dụng Benzidine và thay thế bằng dẫn xuất của Benzidine hoặc cơ chất khác ít độc hại để bảo vệ sức khỏe người giám định viên và bảo vệ môi trường. Mặt khác công tác giám định định hướng dấu vết máu nếu triển khai tại Việt Nam bằng các kit thử định hướng dấu vết máu của các hãng sản xuất đòi hỏi kinh phí rất cao và phải nhập khẩu.

Vì vậy mục đích của đề tài đặt ra là phải tìm ra một phương pháp giám định định hướng có độ nhạy tương đương với phương pháp sử dụng dung dịch Benzidine mà hóa chất sử dụng dễ tìm kiếm, chi phí thấp, không bay hơi trong môi trường thí nghiệm, tiện sử dụng. Đặc biệt, hiện nay công tác giám