

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

ĐẶNG THỊ THU GIANG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT
ADN TỪ DẤU VẾT MÁU TRÊN CÁC VẬT MANG LÀ VẢI
SAU KHI BỊ GIẶT BẰNG XÀ PHÒNG TRONG CÁC VỤ ÁN
HÌNH SỰ PHỤC VỤ CÔNG TÁC GIÁM ĐỊNH ADN**

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

ĐẶNG THỊ THU GIANG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT
ADN TỪ DẤU VẾT MÁU TRÊN CÁC VẬT MANG LÀ VẢI
SAU KHI BỊ GIẶT BẰNG XÀ PHÒNG TRONG CÁC VỤ ÁN
HÌNH SỰ PHỤC VỤ CÔNG TÁC GIÁM ĐỊNH ADN**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Nguyễn Văn Hà

HÀ NỘI - 2015

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành bản luận văn này tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới Đại tá, PGS.TS Nguyễn Văn Hà - Phó giám đốc Trung tâm giám định Sinh học Pháp lý - Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an đã rất tận tình hướng dẫn tôi 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 nghiệp trong Trung tâm giám định Sinh học Pháp lý - Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an đã động viên, giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình làm luận văn.

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

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình và bạn bè, đã động viên, góp ý và tạo điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Học viên

Đặng Thị Thu Giang

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của việc nghiên cứu đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	3
3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	4
4. Nội dung nghiên cứu.....	4
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.....	5
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
1.1. Lịch sử giám định gen trong khoa học hình sự.....	6
1.2. Nhận thức chung về dấu vết máu trong khoa học hình sự.....	7
1.2.1. Khái niệm về máu	7
1.2.2. Cơ sở khoa học của giám định dấu vết máu	8
1.3. Ảnh hưởng của xà phòng lên dấu vết máu	9
1.4. Phát hiện dấu vết máu trên vật mang là vải sau khi bị giặt bằng xà phòng	11
1.4.1. Mục đích	11
1.4.2. Phương pháp thu lượm dấu vết máu trên vật mang là vải.....	12
1.4.3. Giám định định hướng dấu vết máu và xác định tính đặc hiệu loài	12
1.5. Tách chiết ADN từ dấu vết máu	15
1.6. Định lượng ADN.....	16
1.7. Khuếch đại ADN (PCR)	17
1.8. Những khó khăn trong nâng cao hiệu quả PCR và chất lượng ADN...	21
1.9. Kỹ thuật điện di.....	22
1.9.1. Nguyên lý của kỹ thuật điện di	22
1.9.2. Nguyên lý điện di trên máy giải trình tự gen ABI Prism 3130 Genetic Analyzer	23
1.10. Phân tích dấu vết ADN khi bị lẫn	23
1.11. Vấn đề nhiễm ADN	24

1.12. Tình hình nghiên cứu trong nước và ngoài nước đối với lĩnh vực nghiên cứu của đề tài	26
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	28
2.1. Vật liệu	28
2.1.1. Thiết bị máy móc	28
2.1.2. Dụng cụ.....	28
2.2. Hóa chất	29
2.3. Phương pháp nghiên cứu	29
2.3.1. Phương pháp thu lượm dấu vết máu trên vật mang là vải	29
2.3.2. Phương pháp giám định định hướng dấu vết máu	29
2.3.3. Phương pháp miễn dịch khuếch tán kép – Ouchterlony	30
2.3.4. Phương pháp tách chiết ADN từ dấu vết máu	31
2.3.5. Định lượng ADN	34
2.3.6. Phương pháp PCR.....	36
2.3.7. Kỹ thuật điện di trên máy điện di mao dẫn(Capillary Electrophoresis - CE). 36	
2.4. Thiết kế bố trí thí nghiệm.....	37
2.4.1. Các mẫu khảo nghiệm được tạo ra	37
2.4.2. Các mẫu tạo ra được ký hiệu 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 5C, 6A, 6B, 7A, 7B, được tiến hành các bước thí nghiệm như sau:	43
2.4.3. Tách chiết ADN bằng dung dịch Chelex 5% và bộ kit PrepFiler ..	44
2.4.4. Thử nghiệm kết quả tách chiết bằng bộ kit PrepFiler trên các mẫu từ các vụ án cụ thể	44
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	47
3.1. Kết quả nghiên cứu	47
3.1.1. Kết quả xác định định hướng dấu vết máu thu từ các vụ án với dung dịch phenolphthalein.....	47

3.1.2. Kết quả xác định protein loài sử dụng kỹ thuật khuếch tán miễn dịch kép theo Ouchterlony	47
3.1.3. Kết quả thực nghiệm tách chiết bằng phương pháp sử dụng chelex 5% và tách chiết bằng bộ kit PrepFiler	47
3.1.4. Kết quả tách chiết bằng phương pháp PrepFiler ứng dụng vào mẫu vụ án thực tế	56
3.1.5. Hình ảnh điện di một số mẫu thực nghiệm, mẫu án thực tế	58
3.2. Thảo luận kết quả nghiên cứu	66
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	67
TÀI LIỆU THAM KHẢO	69

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

ADN (DNA)	: Axit deoxyribonucleic
ARN	: Axit ribonucleic
LR	: Likelihood Ratio (tỉ lệ khả dĩ)
RFU	: Relative Fluorescence Units (đơn vị huỳnh quang tương đối)
RFLP	: Restriction fragment Length Polymorphism (đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (phản ứng nhân bội gen)
ProK	: Proteinaza K
STR	: Short Tandem Repeat (đoạn lặp lại ngắn)
VNTR	: Variable Number Tandem Repeats (đoạn lặp có độ dài trung bình)
KHHS	: Khoa học hình sự

DANH MỤC CÁC BẢNG, HÌNH MINH HỌA

Bảng 1.1: Thành phần và thể tích phản ứng PCR.....	36
Bảng 1.2: Các thành phần hóa chất sử dụng để điện di mao quản	37
Bảng 2.1: Kết quả định lượng ADN tách chiết bằng chelex 5%	48
Bảng 2.2: Chất lượng ADN tách chiết bằng chelex 5%	50
Bảng 2.3: Kết quả định lượng ADN tách chiết bằng bộ kit PrepFiler.....	52
Bảng 2.4: Chất lượng ADN tách chiết bằng bộ kit PrepFiler.....	54
Bảng 3.1: Kết quả định lượng ADN với mẫu máu trên vải đã bị giặt trong vụ án cụ thể.....	56
Bảng 3.2: Chất lượng ADN thu được từ dấu vết máu đã bị giặt trong các vụ án cụ thể	57
Hình 4.1: Biểu đồ kết quả điện di mẫu 1A, lần thực nghiệm 1.1	58
Hình 4.2: Biểu đồ kết quả điện di mẫu 1B, lần thực nghiệm 1.2.....	59
Hình 4.3: Biểu đồ kết quả điện di mẫu 6B, lần thực nghiệm 1.2.....	60
Hình 4.4: Biểu đồ kết quả điện di mẫu MA1.1	61
Hình 4.5: Biểu đồ kết quả điện di mẫu MA2.1	62
Hình 4.6: Biểu đồ kết quả điện di mẫu MA2.2	63
Hình 4.7: Biểu đồ kết quả điện di mẫu MA3.2	64
Hình 4.8: Biểu đồ kết quả điện di mẫu MA4.2	65

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của việc nghiên cứu đề tài

Phân tích dấu vết ADN đã trở thành một phần không thể thiếu trong công tác giám định hình sự nói chung và giám định dấu vết sinh học nói riêng và là một công cụ quan trọng cho các nhà điều tra phá án. Thông qua phân tích ADN có thể truy nguyên, nhận dạng cá thể trong các vụ án hình sự, tìm tung tích nạn nhân, người mất tích trong các vụ cháy, vụ tai nạn, thảm họa... hoặc xác định quan hệ huyết thống.

Mỗi năm Viện Khoa học hình sự nhận được hàng trăm trung cầu giám định ADN từ các vụ án, chủ yếu là từ dấu vết máu, tinh trùng, tóc, tế bào, răng xương, mô và tổ chức cơ thể, móng tay móng chân... Thống kê năm 2014 tại Viện Khoa học hình sự có 421 vụ án yêu cầu giám định ADN, trong đó số lượng trung cầu giám định ADN từ dấu vết máu là 146 vụ và số vụ án có dấu vết máu trên vật mang là vải như quần áo, chăn ga, gối đệm... là 54 vụ với 144 mẫu cần giám định, trong số đó có nhiều vụ án vật mang dấu vết máu là vải được đưa đến giám định trong tình trạng đã qua ngâm giặt bằng xà phòng, dấu vết trên vật mang không còn nguyên vẹn, giảm đáng kể về số lượng và chất lượng ADN. Gây khó khăn rất lớn trong công tác giám định.

Trong các vụ án hình sự việc khẳng định dấu vết máu của nạn nhân để lại trên quần áo của đối tượng gây án hay máu của đối tượng bám dính trên các vật mang là vải để lại hiện trường là một nguồn chứng cứ rất quan trọng, thủ phạm có thể do vô tình hay cố ý đã dùng hóa chất như xà phòng, chất tẩy rửa để giặt quần áo, hay các vật mang là vải có bám dính dấu vết máu trên đó. Vì vậy việc tách chiết ADN từ các dấu vết máu này gặp rất nhiều khó khăn. Do chất tẩy rửa tác động lên dấu vết phá hủy và rửa trôi dấu vết. Trong thực tế khi gặp những trường hợp như vậy mà áp dụng phương pháp tách chiết thông thường như đối với các dấu vết máu có chất lượng tốt thì tỉ lệ thành

công là rất thấp. Hơn nữa do phải tách chiết, PCR, chạy điện di nhiều lần gây tổn kém hóa chất và mất rất nhiều thời gian, mặt khác do lượng dấu vết thường không nhiều nên đòi hỏi phải có phương pháp tách chiết hiệu quả để tránh sử dụng hết dấu vết mà không cho kết quả phân tích ADN dẫn đến không góp phần giải quyết được vụ án.

Trong thực tế các vụ án có dấu vết máu trên các vật mang là vải theo như lời khai của đối tượng là đã qua ngâm giặt bằng xà phòng và thực tế trong giám định quan sát bằng mắt cũng thấy vật mang dấu vết tương đối sạch, lượng dấu vết bám dính trên vật mang là khá mờ nhạt thì với phương pháp tách chiết thông thường hiện nay là dùng chelex 5% không cho hiệu quả cao với lý do:

- Lượng ADN tách chiết được không đủ để thực hiện phản ứng PCR.
- Không loại bỏ được hết các chất ức chế ảnh hưởng đến chất lượng ADN.
- Hình ảnh điện di kém: Mất alen, nhiều alen lặp ảnh hưởng đến việc phân tích kiểu gen.

Trong quá trình giải quyết các vụ án thực tế thấy rằng nhiều khi dấu vết máu để lại trên vật mang là nguồn chứng cứ duy nhất nếu không tách chiết được ADN có chứa trên đó để phân tích giám định thì vụ án sẽ đi vào bế tắc.

Trước tình hình đó, chúng tôi thấy rằng việc nghiên cứu thử nghiệm các phương pháp tách chiết khác nhau đối với dấu vết máu trên vật mang là vải sau khi bị giặt bằng xà phòng là rất cần thiết, nhằm tạo ra quy trình ổn định trong tách chiết ADN từ dấu vết máu trên các vật mang là vải đã bị giặt bằng xà phòng trong các vụ án, góp phần giải quyết yêu cầu thực tế đặt ra, cũng như góp phần hoàn thiện quy trình giám định ADN đối với loại dấu vết khó thường gặp và có giá trị này. Vì vậy việc tiến hành triển khai đề tài: ***“Nghiên cứu một số phương pháp tách chiết ADN từ dấu vết máu trên các vật mang là vải sau khi bị giặt bằng xà phòng trong các vụ án hình sự phục vụ công tác giám định ADN”*** là một yêu cầu cấp thiết.