

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

LÊ THỊ VUI

**NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT THROMBIN TỪ PHỔI BÒ ỨNG
DỤNG LÀM NGUYÊN LIỆU TẠO BĂNG GẠC CẦM MÁU
NHANH VẾT THƯƠNG**

(Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm)

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2015

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

LÊ THỊ VUI

**NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT THROMBIN TỪ PHỔI BÒ ỨNG DỤNG
LÀM NGUYÊN LIỆU TẠO BĂNG GẠC CẦM MÁU NHANH VẾT
THƯƠNG**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

**HƯỚNG DẪN KHOA HỌC : TS. LÊ MINH TRÍ
VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ QUÂN SỰ VIỆT NAM**

e

Hà Nội - 2015

MỤC LỤC

MỤC LỤC	3
LỜI CAM ĐOAN.....	6
LỜI CẢM ƠN	7
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	8
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	9
MỞ ĐẦU	11
1. Lý do chọn đề tài.....	11
2. Mục tiêu nghiên cứu	12
3. Nội dung nghiên cứu.....	12
4. Những điểm mới của đề tài.....	Error! Bookmark not defined.
4.1. Trên thế giới	Error! Bookmark not defined.
4.2. Trong nước	Error! Bookmark not defined.
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	13
1.1 CƠ CHẾ CẦM MÁU VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP CẦM MÁU.....	13
1.1.1. Cơ chế cầm máu	13
1.1.2. Các yếu tố đông máu.....	13
1.1.3. Các giai đoạn của cầm máu.....	14
1.1.3.1. Co mạch tại chỗ	14
1.1.3.2. Tạo nút tiểu cầu	14
1.1.3.3. Tạo cục máu đông.....	15
1.1.3.4. Co cục máu đông và tan cục máu đông.....	18
1.1.4. Các phương pháp cầm máu	19
1.1.4.1. Cầm máu bằng lá và thảo dược	19
1.1.4.2. Cầm máu bằng phương pháp vật lý.....	19
1.1.4.3. Cầm máu bằng một số chất hóa học.....	20
1.2. THROMBIN	20
1.2.1. Khái quát chung về thrombin.....	20
1.2.1.1. Cấu trúc và chức năng.....	20

1.2.1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của thrombin	22
1.2.1.4. Ứng dụng của thrombin	23
1.2.2. Prothrombin.....	24
1.2.2.1. Thành phần của prothrombin	24
1.2.2.2. Thời gian prothrombin.....	25
1.2.2.3. Kích hoạt prothrombin.....	25
1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU	27
CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị	30
2.1.1. Vật liệu	30
2.1.2. Hóa chất.....	31
2.1.3. Dung dịch và đệm	31
2.1.4. Dụng cụ, thiết bị thí nghiệm.....	32
2.1.4.1. Dụng cụ	32
2.1.4.2. Thiết bị	32
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	33
2.2.1. Khảo sát hàm lượng thrombin trong phổi bò	33
2.2.1.1. Tách chiết thrombin từ mẫu phổi bò.....	33
2.2.1.3. Khảo sát thrombin trong mẫu phổi.....	33
2.2.1.4. Khảo sát hoạt tính thrombin.....	33
2.2.2. Tối ưu hóa quy trình tách chiết thrombin từ phổi bò	33
2.2.2.1. Tách thrombin ở nồng độ ethanol khác nhau.....	33
2.2.2.2. Tách thrombin ở nồng độ aceton khác nhau	35
2.2.2.3. Tách chiết thrombin ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau	36
2.2.2.4. Tách chiết thrombin ở độ pH khác nhau	38
2.2.2.5. Tách chiết thrombin với các ngưỡng thời gian ngâm tách mẫu khác nhau.....	40
2.2.2.6. Tối ưu hóa quy trình tách chiết thrombin từ phổi bò	43
2.2.3. Nghiên cứu bổ sung các chất an định (bền) cấu trúc của thrombin và tannic acid ở điều kiện môi trường thường	43
2.2.9.1. Đánh giá khả năng chuyển hóa fibrinogen của thrombin.....	43
2.2.9.2. Ảnh hưởng của các chất an định	43
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	44

3.1 Khảo sát hoạt tính của thrombin ở một số mẫu phổi bò được thu thập ở các vùng khác nhau.....	44
3.2. Tối ưu hóa quy trình tách chiết thrombin từ phổi bò	46
3.2.1. Tách thrombin ở nồng độ ethanol khác nhau.....	46
3.2.2. Tách prothrombin ở nồng độ acetone khác nhau.....	49
3.2.3. Tách thrombin ở điều kiện nhiệt độ khác nhau.....	49
3.2.4. Tách thrombin ở cách ngưỡng pH khác nhau	53
3.2.5. Tách thrombin với các ngưỡng thời gian ngâm tách mẫu khác nhau	54
3.3. Tối ưu hóa quy trình tách chiết thrombin từ phổi bò	56
3.4. Kết quả nghiên cứu bổ sung các chất an định (bền) cấu trúc của thrombin và tannic acid ở điều kiện môi trường thường.....	59
3.4.1. Đánh giá ảnh hưởng của các chất an định đối với acid tannic và thrombin ..	59
3.4.2. Ảnh hưởng của các chất an định đối với thrombin	59
3.4.3. Ảnh hưởng của các chất an định đối với thrombin bổ sung 0,05% tannic acid	62
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	66
1. Kết luận.....	66
2. Kiến nghị.....	66
TÀI LIỆU THAM KHẢO	67
I. Tài liệu Tiếng Việt.....	67
II. Tài liệu Tiếng Anh.....	68
PHỤ LỤC	73
PHỤ LỤC 1: Quy trình công nghệ gắn thrombin lên băng gạc bằng các phương pháp khác nhau (phun, tẩm).	73
PHỤ LỤC 2: Một số hình ảnh thử nghiệm cầm máu trên thỏ bằng băng gạc tẩm thrombin.	75

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và được sự hướng dẫn khoa học của Ts. Lê Minh Trí. Các nội dung nghiên cứu, kết quả, số liệu công bố trong đề tài này là trung thực và đảm bảo độ tin cậy. Những số liệu trong các bảng biểu phục vụ cho việc phân tích, nhận xét, đánh giá được chính tác giả thu thập từ các nguồn khác nhau có ghi rõ trong phần tài liệu tham khảo.

Ngoài ra, trong luận văn còn sử dụng một số nhận xét, đánh giá cũng như số liệu của các tác giả khác, cơ quan tổ chức khác đều có trích dẫn và chú thích nguồn gốc.

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Tác giả

Lê Thị Vui

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Lê Minh Trí – Phòng Hóa sinh - Viện Hóa học - Vật liệu, Viện KH & CN Quân sự Việt Nam - người đã trực tiếp hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu của mình, đem lại cho tôi những kiến thức bổ trợ, vô cùng có ích trong thời gian thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của toàn thể cán bộ - nhân viên Phòng Công nghệ Enzyme – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt nam đã nhiệt tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất để tôi thực hiện nghiên cứu này.

Cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo sau đại học, Đại học Thái Nguyên, Ban Chủ nhiệm Viện Hoá học – Vật liệu, Viện KH & CN Quân sự Việt Nam đã tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Công trình được hỗ trợ từ nhiệm vụ cấp Bộ Quốc phòng « Nghiên cứu chế tạo băng gạc cầm máu nhanh vết thương từ thrombin và tannic acid ».

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, bạn bè, những người đã luôn bên tôi, động viên và khuyến khích tôi trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu của mình.

Hà Nội, ngày 18 tháng 11 năm 2015.

Lê Thị Vui

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
1.1	Các yếu tố đông máu	
2.1	Hóa chất sử dụng	
2.2	Các dung dịch và đệm	
2.3	Các thiết bị được sử dụng	
3.1	Ảnh hưởng của nồng độ ethanol trong quá trình tách tới hoạt tính thrombin	
3.2	Ảnh hưởng của nồng độ acetone trong quá trình tách tới hoạt tính thrombin	
3.3	Ảnh hưởng của nhiệt độ trong quá trình tách tới hoạt tính thrombin	
3.4	Ảnh hưởng của pH trong quá trình tách tới hoạt tính thrombin	
3.5	Ảnh hưởng của thời gian ngâm tách mẫu trong quá trình tách tới hoạt tính thrombin	
3.6	Ảnh hưởng của một số yếu tố tới hoạt tính của thrombin	
3.7	Đánh giá các chất an định đến đối với thrombin	
3.8	Đánh giá các chất an định đến đối với thrombin bổ sung 0,05% tannic acid	

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1	Minh hoạ đông máu nội sinh và ngoại sinh	
1.2	Cấu trúc thrombin ở người	
1.3	Cấu trúc không gian của prothrombin	
1.4	Cơ chế hoạt động của thrombin	
1.5	Thành phần prothrombin	
1.6	Sơ đồ về sự hoạt động của prothrombin	
2.1	Các mẫu phổi thu thập	
3.1	Điện di đồ SDS-PAGE	
3.2	Khảo sát hoạt tính của thrombin của các mẫu phổi bò khác nhau	
3.3	SDS-PAGE protein tách từ mẫu phổi bò sử dụng ethanol	
3.4	SDS-PAGE protein tách từ mẫu phổi bò sử dụng acetone	
3.5	SDS-PAGE protein tách từ mẫu phổi bò ở các nhiệt độ khác nhau	
3.6	SDS-PAGE protein tách từ mẫu phổi bò ở pH khác nhau	
3.7	SDS-PAGE protein tách từ mẫu phổi bò khi ngâm mẫu	
3.8	Khảo sát khả năng chuyển hóa fibrinogen của thrombin và acid tannic	
3.9	Ảnh hưởng của Tween 20 đối với thrombin ở thời điểm ban đầu	
3.10	Ảnh hưởng của tween 80 đối với thrombin ở thời điểm ban đầu	
3.11	Ảnh hưởng của triton x100 đối với thrombin ở thời điểm ban đầu	
3.12	Ảnh hưởng của SDS đối với thrombin ở thời điểm ban đầu	
3.13	. Ảnh hưởng của PEG 4000 đối với thrombin	

3.14	Ảnh hưởng của tween 20 đối với thrombin bổ sung 0,05% acid tannic ở thời điểm ban đầu	
3.15	Ảnh hưởng của tween 80 đối với thrombin bổ sung 0,05% acid tannic ở thời điểm ban đầu	
3.16	Ảnh hưởng của triton x100 đối với thrombin bổ sung 0,05% acid tannic ở thời điểm ban đầu	
3.17	Ảnh hưởng của PEG 4000 đối với thrombin bổ sung 0,05% acid tannic ở thời điểm ban đầu	
3.18	Ảnh hưởng của SDS đối với thrombin bổ sung 0,05% acid tannic ở thời điểm ban đầu	