

کارآیی DNA Typing بعنوان یک روش قطعی در تعیین رابطه نسبیت

دکتر حسن توفیق، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه پزشکی قانونی و طب کار

دکتر حسین حسینیان مقدم، متخصص پزشکی قانونی، بهارستان لقمان

دکتر معصومه ناجی، دکترای علوم آزمایشگاهی

افروز نیکیخت دهکردی، کارشناسی ارشد اپرتوکوژی، بخش DNA سازمان پزشکی قانونی کشور

دکتر هادی غازی، دکترای علوم آزمایشگاهی، بخش DNA سازمان پزشکی قانونی کشور

Efficacy of DNA Typing As An Accurate Method in Forensic Medicine

ABSTRACT

DNA typing is a new method with important applications in forensic medicine. In the present study, we evaluated application of DNA typing in Iran. Loci Hum LPL, Hum Tpox, Hum F13, Hum vw 31A, Hum TH01 and Hum FES/FPS of DNA short tandem repeats were studied. To determine Sensitivity of the test, 85 mother-child couples (1020 chromosomes) that were referred to DNA section of legal medicine organization of Iran were included and for determination of it's Specificity 42 brother-sister couples (1200 chromosomes) and 58 non-relative couples were examined. The results show lack of mutations in the studied loci and acceptable sensitivity of the test. Of 12 alleles of siblings, there were 2-6 differences, in contrast with 3-9 differences in non-relatives, so the test has 100% specificity in these loci. Considering polymorphism, power of exclusion of these six sites was 99 percent.

Key Words : Short tandem repeats, DNA typing, Forensic medicine

چکیده

تست جدیدی است که یکی از کاربردهای آن در علوم جنایی بررسی ابیوت و اثبات نسبت است. این بررسی از نظر حقوقی و کیفری در قوانین ما جایگاهی خاص دارد. در این تحقیق کارآیی تست DNA typing در ایران با بررسی ۶ لکوس‌های Hum F13، Hum vw 31A و Hum FES/FPS، Hum LPL، Hum Tpox و Hum TH01 از مناطق Short tandem repeats مولکول DNA مورد بررسی قرار گرفته است. برای بررسی حساسیت تست ۸۵ زوج مادر و فرزند (۱۰۲۰ کروموزوم) از میان مادران و فرزندان ارجاعی به بخش DNA سازمان پزشکی قانونی کشور و برای بررسی ویژگی تست تعداد ۱۲۰۰ کروموزوم

افراد خوشاوند (۴۲ زوج خواهر و برادر) و افراد غیرخوشاوند (۵۸ زوج) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نمایانگر عدم ایجاد متوالیات در مناطق فوق و حساسیت کافی روش می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه در افراد خوشاوند درجه اول (خواهر-خواهر، خواهر-برادر و برادر-برادر) از مجموع ۱۲ آلل مورد بررسی بین دو فرد حداقل یک آلل و حداقل ۶ آلل اختلاف وجود داشته است و حداقل یک آلل و حداقل ۶ آلل اختلاف وجود داشته است و در مورد افراد غیرخوشاوند این ارقام حداقل ۳ آلل و حداقل ۹ آلل بوده است ویژگی ۱۰۰ درصد این تست را در مناطق مورد بررسی نشان می‌دهد. قدرت تشخیص عدم تجانس (Power of exclusion) ۶ سایت با توجه به پلی مرفیسم این مناطق ۹۹ درصد محاسبه گردید.

1.5 μm MgCl₂
 200 μm Cach dNTP
 0.25 Cach primer
 1.2 units Taq DNA polymerase
 1 mg genomic DNA

جداسازی

جداسازی قطعات تکثیر شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد، در طول ۳۴ سانتیمتر و ضخامت ۸/۰ میلیمتر با سیستم الکتروفورز مدل Gibco BRL SA60 و نیز سیستم الکتروفورز مدل پویا پژوهش انجام و حاصل کار با رنگ آمیزی نیترات نقره نمایان گردید.

بررسی آلتی

شماره‌گذاری آلتلهای هر فرد در مقایسه با همان لکوس ^(۱)Allelic Ladder صورت گرفت. ترتیب شماره‌گذاری هر یک از آلتلهای برحسب اندازه قطعه و به ترتیب از کوچکترین قطعه انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

از آنجایی که وراثت هر سایت جدا از سایت دیگر می‌باشد، بررسی هر فرد در ۶ سایت مورد اشاره به مفهوم بررسی ۱۲ کروموزوم برای هر نفر می‌باشد. در این تحقیق با توجه به محاسبات آماری انجام شده طبق توزیع بواسون و با استفاده از فرمول $np = \lambda$ برای رسیدن به $P < 0.005$ در بررسی حساسیت و تأیید اینکه میزان موتاسیون در سایتهای مورد بررسی بسیار ناچیز بوده است و از لحاظ آماری در پژوهشی قانونی (بطور تصادفی) بررسی شد. همچنین جهت تعیین احتمال تشابه کروموزوم‌ها در ۶ سایت (بررسی ویژگی) تیز بر طبق همین توزیع جمعاً ۱۲۰۰ کروموزوم از افراد خویشاوند (خواهران و برادران) و افراد غیرخویشاوند (به ترتیب و به تفکیک ۵۰۴ و ۶۹۶ کروموزوم) مورد آزمایش فرار گرفت.

مقدمه

مناطق Short tandem repeats (STR) لکوسهای تکرارشونده‌ای هستند که متشکل از ۶-۱۶ جفت باز می‌باشد و بدلیل اندازه کوچکشان (300 bp) در Forensic DNA typing که معمولاً با نمونه‌های فاسد و تخریب شده مواجه هستیم، کاربرد زیادی پیدا کرده‌اند و بعنوان روش انتخابی در حل مسایل پژوهشی قانونی، از جمله بررسی ابوب و تعیین هویت، مورد استفاده قرار می‌گیرند.

امروزه لکوسهای STR متعددی در طول مولکول DNA شناسایی شده‌اند که هر یک دارای چندین آلل می‌باشد. از آنجاکه بکارگیری این نشانگرها در تعیین هویت جنایی نیازمند آمار جمعیتی از آلتلهای منطقه‌ای می‌باشد و با توجه به اینکه چنین آمارهایی قبل از توسط مرکز تعیین هویت سازمان پژوهشی قانونی تهیه شده است، بر آن شدیدم تا با انجام یک مطالعه آماری ارزش تشخیصی این روش را با توجه به پلی مرفیسم آلتلهای جمعیت ایران بدست آورده از دقت پاسخهای آن در مقایسه با روش‌های روش اول گذشته اطمینان حاصل نمایم (۱، ۲، ۳).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

جمع آوری اطلاعات ابتدایی بصورت مصاحبه‌ای مقدماتی در مورد نسبت خویشاوندی افراد مورد مطالعه، با توجه به شناسنامه و سوابق و سپس نمونه‌گیری بوده است. از هر نفر حدود ۵ میلی‌لیتر خون تازه بر روی ضدانعقاد EDTA اخذ و تخلیص DNA از خون به روش Bolling انجام گرفت (۴). سپس غلاظت DNA حاصل توسط اسپکتروفوتومتری UV تعیین و محاسبه شد، تا مقدار مناسب DNA که بایستی برای PCR برداشت شود مشخص گردد (۴).

PCR

تکثیر هر یک از شش محل یاد شده، در حجم ۵۰ میکرولیتر و در بافری مشکل از مواد با غلظتهاز زیر و پرایمر اختصاصی هر محل، با استفاده از ترمومویلکلر فارما ماسیا مدل Gene ATAQ در ۳۰ سیکل انجام گرفت (۱، ۲، ۵، ۶).

10 μm Tris-Cl (pH = 8.3)
 50 μm KCl

- مارکری است که خاری تمام النهای بذلت آمده از لکوس مورد نظر در حسابات مورد بررسی می‌باشد.

و فرزند در هر سایت آزمایش شدند و در هیچ یک از موارد، آللي در فرزند وجود نداشت که مادر فاقد آن باشد. لذا همانگونه که در مطالعات قبلی نیز ذکر شده بود(۲)، احتمال پیدایش موتاسیون در سایتهاي فوق در حدی ناجيز می باشد. که از نظر آماري نمی تواند اختلافی در محاسبات ایجاد نماید. این امر می تواند نمایانگر درجه قابل اطمینان بودن استفاده از این مناطق در حل مسایل قانونی باشد.

همچنین در آزمایش کروموزوم خواهران و برادران شناخته شده و مقایسه آن با افرادی که ارتباط خوبشاوندی نداشتند، مشخص شد که از نظر آماری نه تنها در افرادی که وابستگی فاميلي نزديک ندارند، بلکه حتی در خواهران و برادران تنی که هر دو از یک پدر و مادر می باشند، احتمال اينکه ۲ نفر در تمامی شش منطقه مورد بررسی دارای آللهاي يكسان باشند بسيار پايان می باشد و اين امر می تواند نشانگر ويزگي كامل اين مناطق در هر فرد باشد.

گرچه ما در مطالعه خود در تمامی موارد توانيم اختلافات دو فرد را مشخص سازيم و ميزان حساسيت و اختصاصي بودن تست DNA typing را در حد قابل قبولی مشاهده نمایيم، ولی در نهايى توجه به پلي مرفيسم منطقه اي در تفسير نتائج حاصل از اين تست برای بدست آوردن رقم آماري قابل قبول در اثبات ابوت یا تعين هویت امری اجتناب ناپذير می باشد. لذا می بايست قدرت هر سایت در نشان دادن عدم تشابه (Power of exclusion) PE به توجه به پلي مرفيسم منطقه اي و نزادي محاسبه گردد، تا رقم کلى در شش سایت بدست آيد. اين مهم در سازمان پزشكى قانوني كشور بخش DNA صورت گرفته و بر اساس آن PE کل برای شش سایت مورد بررسی فرق برابر ۹۹ درصد بدست آمده است(۹،۱۰).

ناگفته نماند که ممکن است بررسی همین ۶ منطقه در يك كشور که در منطقه جغرافيايي ديجري واقع شده کافい نبوده و برای اثبات يك جرم بررسی مناطق بيشرتی لازم گردد ولی نباید فراموش کرده برسی بيشرت هيچگاه به مفهوم مخدوش كردن ارزش اختصاصي هر يك از مناطق STR فوق و اصولاً ارزش تست DNA typing در حل مسایل قانوني نمی باشد.

پس از بدست آمدن نوع آللهاي هر فرد در هر سایت افراد خوبشاوند و غيرخوبشاوند جداگانه از نظر نوع آللها، مورد مقایسه تک به تک قرار گرفتند و ۱۲ آلل (در ۶ سایت مورد بررسی) از نظر ميزان شباخت و عدم تشابه مشخص گردیدند. وجود حتی يك اختلاف در ۱۲ آلل مورد بررسی به معنای عدم تجانس در دو نفر مورد توجه قرار گرفت.

يافته‌ها

۸۵ زوج مادر و فرزند در هر سایت آزمایش شدند و در هیچ یک از موارد، آللي در فرزند وجود نداشت که مادر فاقد آن باشد.

در آزمایش ۱۲۰۰ کروموزوم از خواهران و برادران شناخته شده و مقایسه آن با افرادی که ارتباط خوبشاوندی نداشتند (جدول ۱) مشخص شد که از نظر آماری نه تنها در افرادی که وابستگی فاميلي نزديک ندارند، بلکه حتی در خواهران و برادران تنی که هر دو از یک پدر و مادر می باشند، احتمال اينکه ۲ نفر در تمامی شش منطقه مورد بررسی دارای آللهاي يكسان باشند، بسيار پايان است.

جدول ۱- قدرت سیستمهای مورد بررسی در نشان دادن عدم تشابه در افراد خوبشاوند و غیرخوبشاوند

سایت مورد بررسی	خوبشاوند	غیرخوبشاوند
FES	%۷۹	%۶۴
TH01	%۹۱	%۶۲
TPOX	%۷۷/۵	%۶۲
VWA	%۹۶/۵	%۴۵/۵
F13	%۸۱	%۵۲
IPI	%۸۶	%۴۴/۵

در مطالعه ما توانيم در تمامی موارد، اختلافات دو فرد را مشخص سازيم.

بحث

از آنجاکه توارث آللها در هر لکوس بر اساس قوانین مندل و بصورت Codominant صورت می گيرد جهت بررسی وضعیت موتاسیون در ملکولهای مورد بررسی، ۸۵ زوج مادر

منابع

- 1- Robertson JM. Forensic application of a rapid sensitive, and precise multiplex analysis of the four short tandem repeat loci Hum VWF31/A, Hum tH01, Hum F13A1 and Hum FES/FPS. Electrophoresis 1995; 16: 1568-76.
 - 2- Pestoni C. The use of the STRS Hum VWA31/1A Hum F13A1, Hum FES/FPS, Hum LPL, in forensic application. Int J Legal Med 1995; 107: 283-90.
 - 3- Hammond HA. Evaluation of 13 short tandem repeat Loci for use in personal identification application. Am J Hum Genet 1994; 55: 175-89.
 - 4- Sambrook, Fritsch, Maniatis. Molecular cloning: A laboratory manual. 2th ed. CSII; 1989.
 - 5- Pfilzainger H, Ludes B. French caucasian population data for Hum TH01 and Hum FES/FPS short tandem repeat (STR) systems.
 - 6- Drozd MA, Archard L. An investigation of the Hum VWA31/A Lous in British caucasians. Forens Sci Int 1994; 69: 161-70.
 - 7- Enhuang N, Schimm J, Budoule B. Chinese population, data on three tetrameric short Tandem repeat Loci Hum TH01-Tpox and CSF 1Po derived using multiplex PCR and manual typing. Forens Sci Int 1995; 71: 131-6.
 - 8- Zulianin G, Hobbs HH. Tetranucleotide repeat polymorphism in the LPL gene. Nucleic Acid Res. Vol 18, No 16.
- ۹- ناجی م، نیکیخت دهکردی الف، لشگری ز، نمازی ه. اولین همایش بین المللی زنیک مولولتها. دانشگاه علوم پزشکی و توانبخشی. فروردین ۱۳۷۸ ۲۴-۲۵
- ۱۰- توفیقی ح، ناجی م، لشگری ز، نیکیخت دهکردی الف، شفیعی جندقی ل. بررسی توزیع فراوانی آلتها در سه مplate کوتاه دنکارشونده زنوم انسان در جمعیت ایران. مجله علمی پزشکی فاروش فروردین داردیجهت ۱۳۷۷ ۱۲(۱)
- ۱۱- ناجی م. بررسی برآینده‌گی آلت‌های مplate دنکارشونده زنوم انسان در جمعیت ایران. مجله علمی پزشکی فاروشی دی و بهمن ۱۳۷۷ ۱۳(۱)