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 حسنیان مقدم، متخصص پزشکی قانونی، بهارستان لقمان
دکتر معصومه ناجی، دکترای علوم آزمایشگاهی
افروز نیکبخت دهکردی، کارشناسی ارشد ایمونولوژی، بخش DNA سازمان پزشکی قانونی کشور
دکتر هادی نمازی، 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 chromosoms) that were reffered to DNA section of legal medicine organization of Iran were included and for determination of it's Specificity 42 brother-sister couples (1200 chromosoms) 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

DNA typing تست جدیدی است که یکی از کاربردهای آن در علوم جنایی بررسی ابوت 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 vw 31A، Hum F13، Hum Tpox، Hum LPL، Hum FES/FPS 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 خویشاوند (۴۲ زوج خواهر و برادر) و افراد غیرخویشاوند (۵۸ زوج) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نمایانگر عدم ایجاد موتاسیون در مناطق فوق و حساسیت کافی روش می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه در افراد خویشاوند درجه اول (خواهر-خواهر، خواهر-برادر و برادر-برادر) از مجموع ۱۲ آلل مورد بررسی بین دو فرد حداقل یک آلل و حداکثر ۶ آلل اختلاف وجود داشته است و در مورد افراد غیرخویشاوند این ارقام حداقل ۳ آلل و حداکثر 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 پلی‌مرفیسم این مناطق ۹۹ درصد محاسبه گردید.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]

مقدمه

مناطق Short tandem repeats (STR) لکوسهای تکرارشونده‌ای هستند که متشکل از ۶-۱ جفت باز می‌باشند 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 پزشکی قانونی، از جمله بررسی ابوت و تعیین هویت، مورد استفاده قرار می‌گیرند.

امروزه لکوسهای STR متعددی در طول مولکول DNA شناسایی شده‌اند که هر یک دارای چندین آلل می‌باشند. از آنجا که بکارگیری این نشانگرها در تعیین هویت جنایی نیازمند آمار جمعیتی از آللهای منطقه‌ای می‌باشد و با توجه به اینکه چنین آمارهایی قبلاً توسط مرکز تعیین هویت سازمان پزشکی قانونی تهیه شده‌است، بر آن شدیم تا با انجام یک مطالعه آماری ارزش تشخیصی این روش را با توجه به پلی‌مرفیسم آللهای جمعیت ایران بدست آورده از دقت پاسخهای آن در مقایسه با روشهای روش اول گذشته اطمینان حاصل نماییم(۱،۲،۳).

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

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 غلظت DNA حاصل توسط اسپکتروفتومتری 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 متشکل از مواد با غلظتهای زیر و پرایمر اختصاصی هر محل، با استفاده از ترموسایکلر فارماسیا مدل Genc ATAQ در ۳۰ سیکل انجام گرفت (۱،۵،۶،۷،۸).

10 μm Tris-Cl (pH = 8.3)

50 μm KCl

1.5 μm MgCl2

200 μm Cach dNTP

0.25 Cach primer

1.2 units Taq DNA polymerase

1 mg genonic DNA

جداسازی

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

بررسی آللی

شماره‌گذاری آللهای هر فرد در مقایسه با Allelic Ladder[1] همان لکوس که قبلاً در سازمان تهیه شده بود(۹،۱۰،۱۱) صورت گرفت. ترتیب شماره‌گذاری هر یک از آللها برحسب اندازه قطعه و به ترتیب از کوچکترین قطعه انجام گرفت.

تجزیه وتحلیل 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 پواسون و با استفاده از فرمول $\lambda = np$ برای رسیدن به $P< ۰/۰۰۵$ در بررسی حساسیت و تأیید اینکه میزان موتاسیون در سایتهای مورد بررسی بسیار ناچیز بوده‌است و از لحاظ آماری در پزشکی قانونی قابل اعتماد می‌باشد، تعداد ۱۰۲۰ کروموزوم از میان مادران و فرزندان ارجاعی به بخش DNA سازمان پزشکی قانونی (بطور تصادفی) بررسی شد. همچنین جهت تعیین احتمال تشابه کروموزوم‌ها در ۶ سایت (بررسی ویژگی) نیز بر طبق همین توزیع جمعاً ۱۲۰۰ کروموزوم از افراد خویشاوند (خواهران و برادران) و افراد غیرخویشاوند (به ترتیب و به تفکیک ۵۰۴ و ۶۹۶کروموزوم) مورد آزمایش قرار گرفت.

۱- مارکری است که حاوی تمام آللهای بدست آمده از لکوس مورد نظر در جمعیت مورد بررسی می‌باشد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]

پس از بدست آمدن نوع آللهای هر فرد در هر سایت افراد خویشاوند و غیرخویشاوند جداگانه از نظر نوع آللها، مورد مقایسه تک به تک قرار گرفتند و ۱۲ آلل (در ۶ سایت مورد بررسی) از نظر میزان شباهت و عدم تشابه مشخص گردیدند.

وجود حتی یک اختلاف در ۱۲ آلل مورد بررسی به معنای عدم تجانس در دو نفر مورد توجه قرار گرفت.

یافته‌ها

۸۵ زوج مادر و فرزند در هر سایت آزمایش شدند و در هیچ یک از موارد، آللی 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 خویشاوندی نداشتند (جدول ۱) مشخص شد که از نظر آماری نه تنها در افرادی که وابستگی فامیلی نزدیک ندارند، بلکه حتی در خواهران و برادران تنی که هر دو از یک پدر و مادر می‌باشند، احتمال اینکه ۲ نفر در تمامی شش منطقه مورد بررسی دارای آللهای یکسان باشند، بسیار پایین است.

جدول ۱ـ قدرت سیستمهای مورد بررسی در نشان دادن عدم تشابه در افراد خویشاوند و غیرخویشاوند

سایت مورد بررسی	خویشاوند	غیرخویشاوند
FES	٪۶۴	٪۷۹
TH01	٪۶۲	٪۹۱
TPOX	٪۶۲	٪۷۷/۵
VWA	٪۴۵/۵	٪۹۶/۵
F13	٪۵۲	٪۸۱
IPI	٪۵۴/۵	٪۸۶

در مطالعه ما توانستیم در تمامی موارد، اختلافات دو فرد را مشخص سازیم.

بحث

از آنجا که توارث آللها در هر لکوس بر اساس قوانین مندل و بصورت Codominent صورت می‌گیرد جهت بررسی وضعیت موتاسیون در ملکولهای مورد بررسی، ۸۵ زوج مادر و فرزند در هر سایت آزمایش شدند و در هیچ یک از موارد، آللی در فرزند وجود نداشت که مادر فاقد آن باشد. لذا همانگونه که در مطالعات قبلی نیز ذکر شده بود(۳)، احتمال پیدایش موتاسیون در سایتهای فوق در حدی ناچیز می‌باشد که از نظر آماری نمی‌تواند اختلالی در محاسبات ایجاد نماید. این امر می‌تواند 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 خویشاوندی نداشتند، مشخص شد که از نظر آماری نه تنها در افرادی که وابستگی فامیلی نزدیک ندارند، بلکه حتی در خواهران و برادران تنی که هر دو از یک پدر و مادر می‌باشند، احتمال اینکه ۲ نفر در تمامی شش منطقه مورد بررسی دارای آللهای یکسان باشند بسیار پایین می‌باشد و این امر می‌تواند نشانگر ویژگی کامل این مناطق در هر فرد باشد.

گرچه ما در مطالعه خود در تمامی موارد توانستیم اختلافات دو فرد را مشخص سازیم و میزان حساسیت و اختصاصی بودن تست DNA typing را در حد قابل قبولی مشاهده نماییم، ولی در نهایت توجه به پلی‌مرفیسم منطقه‌ای در تفسیر نتایج حاصل از این تست برای بدست آوردن رقم آماری قابل قبول در اثبات ابوت یا تعیین هویت امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. لذا می‌بایست قدرت هر سایت در نشان دادن عدم تشابه PE (Power of exclusion) با توجه به پلی‌مرفیسم منطقه‌ای و نژادی محاسبه گردد، تا رقم کلی در شش سایت بدست آید. این مهم در سازمان پزشکی قانونی کشور بخش DNA صورت گرفته و بر اساس آن PE کل برای شش سایت مورد بررسی فوق برابر ۹۹ درصد بدست آمده است(۹،۱۰،۱۱).

ناگفته نماند که ممکن است بررسی همین ۶ منطقه در یک کشور که در منطقه جغرافیایی دیگری واقع شده کافی نبوده و برای اثبات یک جرم بررسی مناطق بیشتری لازم گردد ولی نباید فراموش کرد که بررسی بیشتر هیچگاه به مفهوم مخدوش کردن ارزش اختصاصی هر یک از مناطق STR فوق و اصولاً ارزش تست DNA typing در حل مسایل قانونی نمی‌باشد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]

منابع

1- Robertson JM. Forensic application of a rapid sensitive, and precise multiplex annalysis of the four short tandem repeat loci Hum VWF31/A, Hum tHol, 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, Mmanlatis. Molecular cloning: A laboratory manual. 2th ed. CSH; 1989.

5- Pfilzainger H, Ludes B. French caucasian population data for Hum THol and Hum FES/FPS short tandem repeat (STR) systems.

6- Drozd MA, Archard L. An investivation 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 geme. Nucleic Acid Res. Vol 18, No 16.

۹. ناجی م، نیکبخت دهکردی الف، لشگری ز، نمازی ه. اولین همایش بین‌المللی ژنتیک معلولیتها. دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی. فروردین ۱۳۷۸. ۲۵-۲۳

۱۰. توفیقی ح، ناجی م،لشگری ز، نیکبخت دهکردی الف، شفیعی جندقی ز. بررسی توزیع فراوانی آللها در سه منطقه کوتاه تکرارشونده ژنوم انسانی در جمعیت ایران. مجله علمی پزشکی قانونی فروردین و اردیبهشت ۱۳۷۷؛ (۱۳):۴

۱۱. ناجی م. بررسی پراکندگی آللهای منطقه تکرار شونده Hum LPL در جمعیت ایران. مجله علمی پزشکی قانونی دی و بهمن ۱۳۷۷؛ (۱۵):۴

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]