ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2020;9(2):85-92

Journal of Police Medicine

Journal Homepage: http://teb.police.ir/teb/

Original Article **Open Access**

Limitations of Forensic Kits in Identifying the Number of People in Blood Mix Samples of Relatives and Non-Relatives in a Pilot Study

Seyed Mehdi Shafaat[1], Shirin Jalili[2], Sirous Zeinali[1], Gelareh Rabie Salehi[1], Hadi Shirzad[2*]

[1] Kawsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran
[2] Research Institute of Police Science & Social Studies, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Aims: A DNA mixture is an sample of at least two individuals having the genetic material mixed together. In criminal cases related to rape or murder, several individuals have been mixed together in crime scenes through sperm, blood, and etc. Identifying the number of people in a mixed DNA sample is very effective in solving criminal cases. The purpose of this study was to investigate the limitations of identity kits for the identification of more than one person's mixed blood samples.

Materials & Methods: This pilot study was conducted at a medical genetic laboratory in Tehran, Iran in 2018-19. The 17 blood mixtures of relatives and non-relatives were combined and then amplified using an identity recognition kit containing 17 STR markers. The number of alleles in each locus was read by XL 3130 Genetic Analyzer to calculate the genotype of the samples and the number of alleles at each specific site and the number of individuals from each blood mix. Samples were analyzed using Gene Mapper 4.1 software.

Findings: Maximum four, six, six and four alleles were observed in the samples of a mixture of two, three and four unrelated and three unrelated individuals, respectively. As a result, it was not possible to accurately detect the number of individuals involved in the samples of more than three individuals using kits with a maximum of 17 markers.

Conclusion: One of the major limitations of conventional STR kits with up to 17 STR markers is the identification of more than three individuals in mixed samples. This limitation is much greater for mixed samples in which individuals are related.

KEYWORD: DNA Profiling; STR; Criminology

How to cite this article
Shafaat SM, Jalili S, Zeinali S, Rabie Salehi G, Shirzad H. *Limitations of Forensic Kits in Identifying the Number of People in Blood Mix Samples of Relatives and Non-Relatives in a Pilot Study*. J Police Med. 2020;9(2):85-92.

***Correspondence:**
Address: Research Institute of Police Science and Social Studies, Vali-e-Asr Street, Tehran, Iran.
Postal Code: 6516-19395
Phone: -
Tel: +982181886062
Fax: -
Mail: hadi_shirzad@yahoo.com

Article History
Received: 28/12/2019
Accepted: 10/03/2020
ePublished: 03/04/2020

CITATION LINKS

[1] Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines ... [2] DNA commission of the international society of forensic genetics ... [3] Discovery, development, and current applications of DNA identity testing ... [4] Forensic trace DNA: a review ... [5] Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used ... [6] Genotyping and interpretation of STR-DNA: Low-template, mixtures ... [7] DNA in Forensics ... [8] Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational ... [9] DNA profiling of spermatozoa by laser capture microdissection ... [10] Identification and isolation of male cells using fluorescence in situ ... [11] A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites ... [12] Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines ...

Copyright © 2018, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2020;9(2):85-92

مجله طب انتظامی

وب‌سایت مجله: http://teb.police.ir/teb/

مقاله اصلی

دسترسی آزاد

محدودیت کیت‌های تشخیص هویت در شناسایی تعداد افراد موجود در نمونه‌های مخلوط خونی افراد خویشاوند و غیرخویشاوند در یک مطالعه پایلوت

سید مهدی شفاعت[1]، شیرین جلیلی[2]، سیروس زینلی[1]، گلاره ربیع صالحی[1]، هادی شیرزاد[2*]

[1] مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران.

[2] پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران.

چکیده

اهداف: مخلوط DNA، نمونه‌ای است که حداقل مادهٔ ژنتیکی دو فرد با یکدیگر مخلوط شده باشد. در پرونده‌های جنایی مرتبط با تجاوز یا قتل دیده شده که نمونه‌های چند فرد از طریق اسپرم، خون و غیره در صحنه‌های جرم با یکدیگر مخلوط شده است. شناسایی تعداد افراد موجود در یک نمونه DNA مخلوط در حل پرونده‌های جنایی بسیار مؤثر است. هدف از این مطالعه، بررسی محدودیت‌های کیت‌های تشخیص هویت در شناسایی نمونه‌های مخلوط خونی مربوط به بیش از یک نفر بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه پایلوت در سال ۹۸-۱۳۹۷ در یک آزمایشگاه ژنتیک پزشکی در شهر تهران انجام شد. ۱۷ مخلوط خونی از افراد خویشاوند و غیرخویشاوند با یکدیگر ترکیب و سپس با استفاده از کیت تشخیص هویتی که دارای ۱۷ جایگاه STR بود، تکثیر شدند. تعداد آلل‌های موجود در هر جایگاه توسط دستگاه ژنتیک آنالایزر XL 3130 مورد خوانش قرار گرفتند تا ژنوتیپ نمونه‌ها و تعداد آلل در هر محل مشخص و تعداد افراد مربوط به هر مخلوط خونی محاسبه گردد. نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Gene Mapper 4.1 آنالیز شدند.

یافته‌ها: در نمونه‌های مربوط به مخلوط دو، سه و چهار فرد غیرخویشاوند و سه فرد خویشاوند، به ترتیب حداکثر چهار، شش، شش و چهار آلل مشاهده شد. درنتیجه تشخیص دقیق تعداد افراد دخیل در نمونه‌های بیش از سه نفر با استفاده از کیت‌هایی با حداکثر ۱۷ جایگاه، میسر نبود.

نتیجه‌گیری: از محدویت‌های اصلی کیت‌های تشخیص هویت مرسوم با حداکثر ۱۷ جایگاه STR، شناسایی تعداد افراد در نمونه‌های مخلوط بیش از سه نفر است. این محدودیت برای نمونه‌های مخلوطی که در آن افراد با یکدیگر رابطه خویشاوندی دارند، بسیار بیشتر است.

کلیدواژه‌ها: پروفایل DNA، STR، جرم‌شناسی

نحوه استناد به این مقاله

Shafaat SM, Jalili S, Zeinali S, Rabie Salehi G, Shirzad H. *Limitations of Forensic Kits in Identifying the Number of People in Blood Mix Samples of Relatives and Non-Relatives in a Pilot Study*. J Police Med. 2020;9(2):85-92.

نویسنده مسئول*:

آدرس پستی: تهران، خیابان ولیعصر (عج)، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا، تهران، ایران.

کدپستی: ۱۹۳۹۵-۶۵۱۶

تلفن همراه: -

تلفن ثابت: ۰۲۱۸۱۸۸۶۰۶۲

فکس: -

پست الکترونیک:

hadi_shirzad@yahoo.com

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۷

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰

چاپ: ۱۳۹۹/۰۱/۱۵

لینک‌های استناد

[1] Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines … [2] DNA commission of the international society of forensic genetics … [3] Discovery, development, and current applications of DNA identity testing … [4] Forensic trace DNA: a review … [5] Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used … [6] Genotyping and interpretation of STR-DNA: Low-template, mixtures … [7] DNA in Forensics … [8] Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational … [9] DNA profiling of spermatozoa by laser capture microdissection … [10] Identification and isolation of male cells using fluorescence in situ … [11] A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites … [12] Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines …

Copyright © 2018, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

مقدمه

DNA مخلوط، به نمونه‌هایی گفته می‌شود که از مخلوط‌شدن ماده ژنتیکی حداقل دو نفر یا بیشتر تشکیل شده باشد. این نوع نمونه‌ها به خصوص نمونه‌های ترکیبی مرد–زن در موارد تجاوز جنسی یا نمونه‌های ترکیب‌شده از چند نفر در پرونده‌های مرتبط با قتل به فور در صحنهٔ جرم به‌دست می‌آید [۱, ۲]. برای بررسی این نوع نمونه‌ها و در تست‌های پزشکی قانونی امروزی، ریزماهواره‌ها یا تکرارهای پشت سر هم با توالی کوتاه (Short Tandem Repeat) که به اختصار نشانگر STR نامیده می‌شود، به دلیل ماهیت چندشکلی و قابلیت الکتروفورز مویین و قطعات نسبتاً کوتاه و قابل طرح‌واره کردن، بیشترین کاربرد را دارند. این روش بر اساس قوانین توارث ژنتیکی مبتنی است و انتظار می‌رود که یک فرزند نیمی از اطلاعات STR را از هر والد بر اساس مدل مندلی به ارث ببرد.

قابل توجه‌ترین پیشرفت در عرصه تجزیه و تحلیل پزشکی قانونی DNA در دهه اخیر، توانایی شناسایی افراد بر اساس پروفایل‌های STR است که از مقادیر ناچیز نمونه DNA می‌توان برای این کار بهره جست [۴]. STR، توالی‌های تکرار شونده با طول ۱ تا ۶ جفت باز را شامل می‌شوند. این توالی‌ها در سراسر ژنوم پراکنده‌اند اما دارای جایگاه ثابتی درون ژنوم جمعیت‌ها هستند و تنها تعداد واحدهای تکراری آنهاست که بین افراد مختلف متفاوت است و سبب تولید آلل‌های گوناگون در یک جمعیت می‌شوند. اما در هر فرد تنها دو آلل از هر لوکوس وجود دارد که هریک را از یک والد خود به ارث برده‌اند [۵, ۶]. سهولت تکثیر آلل‌های STR با استفاده از واکنش PCR، حساسیت بالای آن و قابل مقایسه بودن نتایج حاصل از تکثیر لوکوس‌های STR در آزمایشگاه‌های مختلف، از عواملی است که قابلیت استفاده از STR را به عنوان مارکرهایی برای اهداف تشخیص هویت آشکار ساخته است. تاکنون هزاران STR شناسایی شده‌اند که تنها تعداد محدودی از آنها به‌طور متداول در آنالیزهای پزشکی قانونی و تشخیص هویت استفاده می‌شود [۷، ۸].

آنالیز چند DNA مخلوط‌شده به‌ویژه ترکیباتی که شامل چندین پروفایل DNA هستند (بیشتر از ۴ مورد)، در ژنتیک پزشکی قانونی مدرن بسیار چالش برانگیز است و برای بهبود این آنالیزها نیاز به پیشرفت‌های جدید در روش‌های آزمایشگاهی، مدل‌های آماری و نرم‌افزارهای تخصصی است [۲, ۴]. طی تحقیقات جنایی، نمونه‌های خون، اسپرم و مایعات ترشح‌شده مانند بزاق که اغلب مربوط به چند نفر است و با یکدیگر مخلوط می‌شوند، بیشتر در پرونده‌های مرتبط به تجاوز به زنان مشاهده می‌شود. مخلوط پیچیده‌ای از DNA مانند مخلوط اسپرم یا خون چند نفر در موارد مربوط به تجاوزهای گروهی یا قتل، چالش سختی برای آنالیز نمونه‌ها است. گاهی وجود آلودگی در محیط می‌تواند سبب اشتباه در هنگام آنالیز گردد؛ بدین صورت که در یک محل پیکی مشاهده گردد که پیک واقعی یا آلل واقعی مربوط به افراد نباشد و صرفاً آلودگی محیطی باشد [۹, ۱۰].

نمونه‌های مخلوط چند DNA می‌توانند شامل نمونه‌های پوست، مو، بزاق و ناخن هم باشند. در موارد تجاوز جنسی به‌طور معمول نمونه‌های افراد مذکر و مؤنث با هم مخلوط می‌شوند که در این موارد نمی‌توان از مارکرهای STR مربوط به کروموزوم Y یا X استفاده کرد، چرا که اگر از مارکرهای کروموزوم Y استفاده کنیم، نمونه‌های افراد مؤنث مشخص نمی‌شود. لذا ایده‌آل‌ترین راه، استفاده از مارکرهای مربوط به کروموزوم‌های اتوزوم است. آنالیز تعداد نمونه‌های مخلوط‌شده با هم در تجاوزات گروهی (چند مرد به یک زن) بسیار مشکل است؛ زیرا نمونه‌های چند فرد مذکر با یک مؤنث مخلوط می‌شوند و در نتیجه تشخیص نمونه مؤنث در حجم انبوهی از نمونه‌های مذکر مشکل‌ساز می‌گردد [۱۱].

در حال حاضر محققان توجه ویژه‌ای به نقش نمونه‌های مخلوط DNA به عنوان شواهد پزشکی قانونی دارند و این تمرکز ویژه موجب می‌شود که محققان روش‌های سریع‌تر، قابل اعتمادتر و قابل فهم را برای کاربردهای قانونی توسعه دهند. امروزه کیت‌های تجاری زیادی بر پایهٔ STRها طراحی شده‌اند که می‌توان این کیت‌ها را از لحاظ بافر PCR، طراحی پرایمر و افزودن محل‌های بیشتر یا بهبود شرایط PCR بهینه کرد تا بتوان جواب‌های دقیق‌تر و مطمئن‌تری برای نمونه‌های مخلوط‌شده به‌دست آورد [۴, ۷, ۱۲].

شناسایی و تشخیص دقیق تعداد افراد موجود در یک نمونهٔ مخلوط DNA در حل پرونده‌های جنایی به‌خصوص پرونده‌های مربوط به تجاوز گروهی که منجر به ایجاد چندین پروفایل ترکیبی DNA می‌شود، بسیار حائز اهمیت است. لذا محققین علوم جنایی ضمن بررسی محدودیت‌های کیت‌های تشخیص هویتی که در حال حاضر در شناسایی این نوع نمونه‌ها به‌کار گرفته می‌شوند، سعی در توسعه تکنیک‌های آزمایشی نوین و نرم‌افزارهای مناسب برای تجزیه و تحلیل نمونه‌های ترکیبی DNA دارند. شناسایی این نمونه‌ها در آزمایشگاه‌های جنایی با مشکلات زیادی همراه است. عمده‌ترین مشکلات معطوف به کیت‌های تشخیص هویتی است که در حال حاضر برای شناسایی این نوع نمونه‌ها به‌کار گرفته می‌شود. معمولاً در آزمایشگاه‌های جنایی با توجه به اینکه نمونه‌های مورد بررسی اکثراً مربوط به یک فرد است، کیت‌های تشخیص هویتی که در حال حاضر برای شناسایی این نوع نمونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، مناسب است. اما متأسفانه شناسایی نمونه‌های مخلوط با این نوع کیت‌ها که حداکثر ۱۷ جایگاه STR دارند، با محدودیت‌هایی همراه می‌شود.

با توجه به دانش و بررسی پژوهشگران این مطالعه، تاکنون گزارشی در خصوص بررسی محدودیت‌های کیت‌های تشخیص هویت در شناسایی تعداد افراد موجود در یک نمونه مخلوط در جمعیت ایرانی، گزارش نشده است. لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی توانایی‌ها و محدودیت‌های کیت‌های تشخیص هویت مرسوم با حداکثر ۱۷ جایگاه، در شناسایی نمونه‌های مخلوط خونی مربوط به بیش از یک نفر (خویشاوند و غیرخویشاوند) بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه پایلوت در سال ۹۸-۱۳۹۷ در یک آزمایشگاه ژنتیک پزشکی در شهر تهران انجام شد. در این مطالعه، ۱۷ مخلوط خونی از افراد خویشاوند و غیرخویشاوند با نسبت‌های معینی مطابق با جدول ۱ ترکیب شدند. در تمام مخلوط‌های تهیه‌شده حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر بود. رضایت شخصی تمام افرادی که از آنها نمونه تهیه شده بود، برای ورود به مطالعه اخذ گردید و به شرکت‌کنندگان اطمینان داده شد که اسامی ایشان محرمانه باقی خواهد ماند. سپس این مخلوط‌های خونی بر روی کارت‌های نگهداری خون یا

DBC (DNA Banking Cards) ریخته شد که از آن به عنوان الگو برای واکنش PCR استفاده گردد.

جدول ۱) مشخصات و نسبت نمونه‌های خونی مخلوط‌شده

شماره مخلوط خون	نسبت حجم خون مخلوط‌شده	نسبت افراد با یکدیگر
۱	۱/۱	دو فرد غیرخویشاوند مذکر و مؤنث
۲	۱/۳	
۳	۱/۹	
۴	۱/۱/۱	سه فرد غیرخویشاوند (یک مذکر و دو مؤنث)
۵	۱/۱/۲	
۶	۱/۱/۵	
۷	۱/۲/۴	
۸	۱/۱/۱/۱	چهار فرد مذکر غیرخویشاوند
۹	۱/۱/۲/۲	
۱۰	۱/۲/۴/۸	
۱۱	۱/۱/۵/۵	
۱۲	۱/۱	دو فرد خویشاوند (دو برادر)
۱۳	۱/۴	
۱۴	۱/۹	
۱۵	۱/۱/۱	سه فرد خویشاوند (مادر و یک فرزند دختر و یک فرزند پسر)
۱۶	۱/۲/۴	
۱۷	۱/۱/۹	

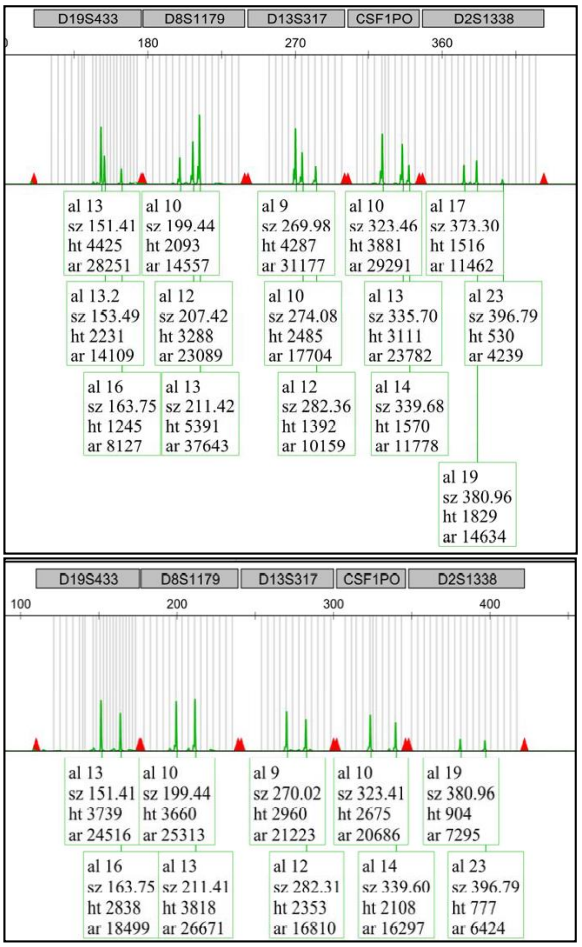
واکنش‌های PCR در این مطالعه با استفاده از کیت تشخیص هویتی با ۱۷ جایگاه STR، انجام شد. اساس این کیت، PCR چندگانه است و ۱۷ محل به‌طور هم‌زمان با یک واکنش PCR تکثیر می‌گردند. این کیت دارای پرایمرهای رنگی و فلورسانت است که امکان تکثیر هم‌زمان همهٔ نشانگرها را مهیا می‌سازد.

طبق دستورالعمل کیت، روی هر مخلوط DNA با استفاده از این کیت، واکنش PCR انجام شد. سپس با استفاده از الکتروفورز و ژل آگارز محصول PCRها بررسی شدند و درصورت داشتن باندهای مناسب، این نمونه‌های مخلوط توسط دستگاه ژنتیک آنالایزر 3130 XL مورد خوانش قرار گرفتند تا ژنوتیپ نمونه‌ها و تعداد آلل در هر محل مشخص و تعداد افراد مربوط به هر مخلوط خونی محاسبه گردد.

آنالیز داده‌ها: نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Gene Mapper 4.1 آنالیز شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۷ مخلوط خونی با نسبت‌های متفاوتی از افراد خویشاوند و غیرخویشاوند، با استفاده از کیت تعیین هویتی با ۱۷ جایگاه STR، تکثیر شدند. در مخلوط های خونی که خون دو فرد خویشاوند یا غیرخویشاوند با یکدیگر ترکیب شده بودند (نمونه‌های ۳-۱ و ۱۴-۱۲)، در برخی محل‌ها، دو آلل، در برخی محل‌ها چهار آلل و در بیشتر محل‌ها سه آلل مشاهده شد که این نتایج نشان‌دهنده این بود که خون دو فرد با یکدیگر مخلوط شده بود؛ زیرا حداقل دو آلل و حداکثر چهار آلل در تمامی محل‌های تکثیرشده به وسیله این کیت در نتایج مشاهده شد. البته لازم به ذکر است که مطابق با شکل ۱، غلظت خون‌های ترکیب‌شده با هم نیز در روند نتیجه‌گیری بسیار مهم بود؛ زیرا در نتیجه به‌دست‌آمده در نسبت ۹/۱ در بعضی از محل‌ها تعداد آلل‌ها در مقایسه با نسبت ۱/۱ کاهش یافته بود که دلیل آن هم مقدار ناچیز DNA فرد با نسبت ۱ در مقایسه با DNA دیگر با نسبت ۹ بود. درنتیجه در بعضی از محل‌ها آلل‌های نسبت ۱ در مقایسه با نسبت ۹ کمتر تکثیر شده بودند. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص شد، در پنج محل مشاهده‌شده در نسبت ۹/۱ تعداد آلل‌ها در مقایسه با نسبت ۱/۱ کمتر بود. می‌توان از این نتیجه دریافت که آلل‌هایی که در شکل ۱-بالا وجود داشت اما در شکل ۱-پایین نبود، مربوط به خونی بود که در نسبت ۹/۱، دارای نسبت ۱ بود؛ یعنی میزان آن ۹ برابر از خون دیگر در مخلوط خونی کمتر بود و درنتیجه آلل‌ها تکثیر نشدند.



شکل ۱) در این شکل خون دو فرد با دو نسبت متفاوت (شکل بالا با نسبت ۱/۱ و شکل پایین با نسبت ۹/۱) با یکدیگر مخلوط شدند.

در مخلوط‌های خونی متعلق به سه فرد غیرخویشاوند با یکدیگر شامل یک مذکر و دو مؤنث (نمونه‌های ۷-۴)، در چهار محل از ۱۷ محل کیت، پنج آلل و در یک محل، شِش آلل تکثیر شده بود که این نتایج حاکی از آن بود که این مخلوط خونی حداقل متعلق به سه نفر بود. البته این نتایج در نسبت‌های خونی ۱/۱/۱ و ۲/۱/۱ مشاهده شد اما در نسبت‌های ۴/۲/۱ و ۵/۱/۱ در هیچ محلی شِش آلل مشاهده نگردید و فقط در دو محل، پنج آلل مشاهده شد که این نتایج هم نشان‌دهنده این بود که این مخلوط‌های خونی حداقل متعلق به سه نفر بودند اما چون نسبت خونی ۱ در مقایسه با نسبت خونی ۵ (۵/۱/۱) یا نسبت ۱ به ۴ (۴/۲/۱) ۵ برابر یا ۴ برابر کمتر بود، درنتیجه در برخی محل‌ها آلل‌های نسبت ۱ نتوانستند تکثیر شوند و تعداد آلل‌ها کاهش یافته بود. بنابراین، نوع نسبت‌هایی که مخلوط‌های خونی بر اساس آن تشکیل شده بودند، در تکثیر تعداد

آل‌ها بسیار حائز اهمیت بود. هرچه نسبت‌هایی که نمونه‌ها با یکدیگر مخلوط شده بودند، به یکدیگر نزدیک‌تر بودند، آل‌های مربوط به افراد موجود در نمونه مخلوط به یک نسبت تکثیر می‌شدند و هرچه این نسبت‌ها با هم متفاوت بودند، آل‌هایی که مربوط به فرد با سهم کمتری در مخلوط نمونه بود، کمتر بود و در نسبت‌های خیلی متفاوت (۹/۱) آل مربوط به فردی که نمونه آن رقیق شده بود، از بین رفت و سبب تفسیر اشتباه تعداد افراد موجود در نمونه‌ها بر پایه تعداد آل‌های ایجادشده، شد.

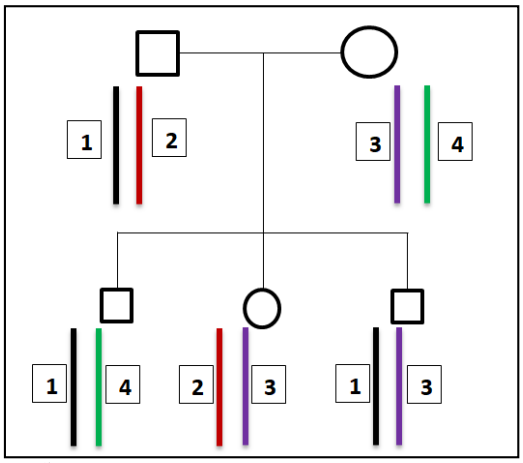
در مخلوط‌های خونی متعلق به سه فرد خویشاوند (مادر، پسر و دختر؛ نمونه‌های ۱۷-۱۵)، حداکثر چهار آل در هر محل مشاهده شد. زیرا هر فرد برای هرکدام از کروموزوم‌ها دارای دو آل بود و اگر مادر دارای دو آل متفاوت و پدر هم دارای دو آل متفاوت دیگر بود (در مجموع چهار آل متفاوت)، قطعاً تمام بچه‌های این خانواده باید هر کدام دو آل از این چهار آل را داشته باشند. درنتیجه از آنجا که خون دو فرزند با مادرشان مخلوط شده بود، بیشتر از چهار نوع آل برای هر STR مشاهده نشد که درنتیجه تشخیص ارتباط این چهار آل با تعداد نفرات، دو نفر (دو فرد هتروزیگوت) یا سه نفر (یک فرد هتروزیگوت و دو هموزیگوت) یا حتی چهار نفر (چهار فرد هموزیگوت)، بسیار سخت بود. لذا با مخلوط کردن DNA سه فرد خویشاوند یا بیشتر با یکدیگر، امکان تشخیص دقیق تعداد نفرات وجود نداشت.

در مخلوط‌های خونی مربوط به چهار فرد مذکر غیرخویشاوند (نمونه‌های ۱۱-۸)، احتمال تشخیص دقیق تعداد افرادی که مخلوط متعلق به آنها بود، ضعیف بود. زیرا در این نوع مخلوط، حداکثر تعداد آللی که در هر محل مشاهده شد، چه برای مخلوط نمونه‌های خونی افراد خویشاوند و چه افراد غیرخویشاوند، حداکثر شش آل بود و درنتیجه امکان تشخیص دقیق این‌که این شش آل مربوط به سه، چهار یا حتی پنج نفر است، وجود نداشت.

بحث

هدف از این مطالعه، بررسی محدودیت‌های کیت‌های تشخیص هویت با حداکثر ۱۷ جایگاه STR، در تشخیص تعداد افراد موجود در یک نمونه مخلوط خونی بود. در مخلوط DNA سه فرد خویشاوند یا بیشتر با یکدیگر، امکان تشخیص دقیق تعداد نفرات وجود نداشت. در مخلوط‌های خونی مربوط به چهار فرد مذکر غیرخویشاوند نیز احتمال تشخیص دقیق تعداد افرادی که مخلوط متعلق به آنها بود، ضعیف بود. اما در نمونه هایی که خون افراد غیرخویشاوند با یکدیگر مخلوط شده بودند، می‌توان تعداد آل‌های بیشتری را نسبت به نمونه‌هایی که شامل مخلوط خونی افراد خویشاوند بودند، مشاهده نمود (به دلیل تنوع تعداد تکرارهای STR در هر محل).

برای تبیین این یافته، مطابق با شکل ۲، در یک خانواده با سه فرزند، هریک از فرزندان یک آل خود را از پدر و دیگری را از مادر به ارث می‌برند. در نتیجه اگر پدر دارای آل‌های ۱ و ۲ باشد و مادر هم دارای آل‌های ۳ و ۴ باشد (پدر و مادر آل مشترک با یکدیگر نداشته باشند)، قطعاً فرزندان هم آل‌های ۱ یا ۲ را از پدر و ۳ یا ۴ را از مادر خواهند داشت. در نتیجه اگر DNA افراد این خانواده با یکدیگر مخلوط شود، بیش از ۴ نوع آل در هر محل STR مشاهده نخواهد شد و تشخیص دقیق تعداد افرادی که مخلوط خون متعلق به آنهاست، میسر نخواهد بود. در افراد خویشاوند به لحاظ تعداد آل‌های مشترک، آل‌های ایجادشده نسبت به افراد غیرخویشاوند کمتر بوده و سبب تفسیر غلط بر پایه تعداد آل‌های ایجادشده در هر جایگاه می‌شود. لذا در افراد خویشاوند به لحاظ کاهش تعداد آل‌ها در یک جایگاه به دلیل وجود آل‌های مشترک، تشخیص دقیق اینکه مخلوط خونی متعلق به چند فرد بود، نسبت به افراد غیرخویشاوند سخت‌تر است.



شکل ۲) هاپلوتایپ یک خانواده پنج‌نفره (پدر، مادر و سه فرزند) و آل‌های افراد خانواده. پدر دارای الل های ۱ و ۲ و مادر دارای الل‌های ۳ و ۴ است.

در این مطالعه از کیت تشخیص هویتی استفاده شد که به‌طور همزمان ۱۶ محل از کروموزوم‌های اتوزوم و یک محل از کروموزوم های جنسی (AMXY) را تکثیر می‌نمود. مارکر AMXY شامل یک STR در کروموزوم X و یک STR در کروموزوم Y است. لذا اگر خون یک فرد مذکر و مؤنث با یکدیگر مخلوط شده باشند، در این محل باید دو پیک دیده شود (یک پیک مربوط به کروموزوم X فرد مؤنث و یک پیک هم مربوط به کروموزوم Y فرد مذکر). همچنین اندازه ارتفاع پیک کروموزوم X باید نسبت به کروموزوم Y بلندتر باشد زیرا افراد مذکر دارای یک کروموزوم X نیز هستند که با ۲ کروموزوم Xخانم‌ها، ارتفاع بلندتری نسبت به پیک کروموزوم Y نشان می‌دهند. اما اگر خون دو فرد مؤنث با یکدیگر مخلوط شده باشند، نباید پیک مربوط به کروموزوم Y در این محل دیده شود.

اگرچه تعداد نشانگرهای STR که بر روی کروموزوم‌های مختلف قرار دارند، بسیار زیاد هستند، اما برای مطالعات جمعیتی و ژنتیک قانونی از تعداد محدودی نشانگر استفاده می‌شود که ترجیحاً دارای تکرارهای چهارتایی بوده و در جمعیت، فراوانی مناسبی داشته باشند. با فراگیرشدن الکتروفورز مویین، استفاده از STRها بسیار گسترده شد و کیت‌های تجاری زیادی عرضه شد که تعداد محل‌های متفاوتی را بررسی می‌نمایند. همهٔ این کیت‌ها تعدادی جایگاه STR را توسط واکنش PCR تکثیر نموده و به علت فلورسانت بودن پرایمرها، محصول PCR در دستگاه کپیلاری الکتروفورز خوانده می‌شود و نتایج به صورت پیک‌هایی مشاهده می‌گردد. نقش این نوع کیت‌ها در شناسایی و تشخیص هویت فرد، صاحب یک نمونه بیولوژیکی بر کسی پوشیده نیست.

یکی از مشکلات اساسی این کیت‌ها، تشخیص درست تعداد افرادی است که در یک نمونه مخلوط وجود دارند. زیرا همان‌طور که

در نتایج مربوط به این تحقیق نیز مشخص شد، در نمونه‌های مخلوطی که مربوط به بیش از سه فرد متفاوت بود تشخیص اینکه این نمونه مربوط به چهار فرد یا حتی بیشتر باشد، عملاً غیرممکن بود. این محدودیت در نمونه‌های مخلوطی که مربوط به افراد خویشاوند بود، بیشتر مشاهده شد. به همین دلیل است که برای بررسی نمونه‌های مخلوط چند DNA با استفاده از کیت‌های تشخیص هویت بر پایه STRها، نمی‌توان با قطعیت تعداد نمونه‌های مخلوط‌شده را تشخیص داد و به صورت تقریبی با استفاده از تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در هر محل، این کار انجام می‌شود [۱۱].

لذا برای دست‌یافتن به جواب دقیق‌تر بایستی تعداد جایگاه‌های بیشتری با فراوانی تعداد آلل بیشتر، مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان حداقل در چند محل تعداد حداکثر آلل‌های موجود، مشاهده گردد و بتوان جواب دقیق‌تری ارائه داد. برای مثال اگر در یک محل پنج آلل دیده شود، می توان گفت که این نمونه مخلوط‌شده حداقل متعلق به سه نفر است و لذا بایستی برای اطمینان بیشتر از جایگاه‌هایی که دارای تعداد آلل بیشتری هستند برای این مخلوط استفاده کرد تا جواب مطمئن‌تری داد و این کار مستلزم طراحی کیت‌های تشخیص هویتی با تعداد آلل بیشتر در هر جایگاه STR متناسب با جمعیت مورد بررسی است.

گاهی اوقات در بعضی از نمونه‌های مخلوط هنگام آنالیز، در برخی محل‌ها آلل مشترک وجود داشته باشد یعنی مثلا در مخلوط ۳ نفر با هم، این ۳ نفر در چند محل دارای الل مشترک باشند. این حالت زمانی که افراد باهم رابطه خویشاوندی داشته باشند با درصد بالایی رخ می‌دهد و ممکن است در یک یا چند محل فقط یک یا دو الل دیده شود که در این صورت اگر تعداد محل‌های بیشتری بررسی نگردد، امکان تشخیص اشتباه تعداد افراد موجود در نمونه بسیار وجود دارد که به جای مخلوط سه نفر مخلوطدو۲ نفر جواب داده می‌شود. این مسئله خود دلیلی است بر تأکید مکرر بررسی تعداد محل‌های بیشتر در مخلوط چند نمونه [۱۲].

از دیگر مواردی که تأثیر مستقیم بر کیفیت آنالیز نمونه‌های مخلوط DNA می‌گذارد، نوع استخراج DNA یا کیفیت نمونه‌های خونی مخلوط‌شده با یکدیگر است. اگر استخراج DNA استخراج خوبی نباشد و ناخالصی وجود داشته باشد، می‌تواند سبب ایجاد پیک‌های اضافه یا stutter پیک‌ها شود. همچنین اگر غلظت DNA اولیه نیز پایین باشد، در بسیاری از محل‌ها ارتفاع پیک‌ها بسیار پایین خواهد بود و همچنین شاید برخی محل‌ها هم اصلاً تکثیر نشوند.

ازجمله محدودیت‌های این مطالعه، عدم امکان استفاده از STRهای موجود در کروموزوم Y بود زیرا در مواردی که نمونه‌های پدر و فرزند پسر، دو برادر تنی با یکدیگر یا عمو و برادرزاده با یکدیگر مخلوط شده باشد، پروفایل‌ها همانند یکدیگر خواهند بود و امکان تفکیک از یکدیگر وجود ندارد (به دلیل مشترک بودن کروموزوم Y در هر دو). پیشنهاد می‌شود با توجه به محدودیت‌های کیت‌های تشخیص هویت مرسوم برای تشخیص تعداد افراد دخیل در نمونه‌های مخلوط، برای به‌دست‌آوردن نتایج دقیق‌تر، از مارکرهای STR با جایگاه‌های آللی بیشتر استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

از محدویت‌های اصلی کیت‌های تشخیص هویت مرسوم با حداکثر ۱۷ جایگاه STR، شناسایی تعداد افراد در نمونه‌های مخلوط بیش از سه نفر است. این محدودیت برای نمونه‌های مخلوطی که در آن افراد با یکدیگر رابطه خویشاوندی دارند، بسیار بیشتر است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از همکاری مسئول و کارمندان آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر که در انجام این طرح تحقیقاتی کمک نمودند، تشکر و تقدیر می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: این مطالعه در شورای پژوهشی پژوهشگاه علوم انتظامی بررسی و در اسفند ۱۳۹۶ به عنوان طرح کسری خدمت نویسنده اول تصویب شد.

تعارض منافع: بدین وسیله نویسندگان مقاله تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در قبال مطالعه حاضر وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سید مهدی شفاعت (نویسنده اول)، جمع‌آوری داده، تجزیه و تحلیل داده؛ شیرین جلیلی (نویسنده دوم) ارائه ایده و طراحی مطالعه، تجزیه و تحلیل داده؛ سیروس زینلی (نویسنده سوم)، جمع‌آوری داده؛ گلاره ربیع صالحی (نویسنده چهارم)، جمع‌آوری داده؛ هادی شیرزاد (نویسنده پنجم)، تجزیه و تحلیل داده؛ همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله و بازنگری آن سهیم بودند و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

منابع مالی: این پژوهش با حمایت مالی پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا انجام شده است.

References

1- Gill P, Buckleton J, Commentary on: Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, Della Manna A, Gross AM, Guerrieri RA, Luttman JC, McClure DL. Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. J Forensic Sci 2009;54(4):810-21.

2- Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR, et al. DNA commission of the international society of forensic genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. Forensic Sci Int. 2006;160(2-3):90-101.

3- Saad R. Discovery, development, and current applications of DNA identity testing. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2005;18(2):130-3.

4- Van Oorschot RA, Ballantyne KN, Mitchell RJ. Forensic trace DNA: a review. Investig Genet. 2010;1(1):14.

5- Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. J Forensic Sci. 2006;51(2):253-65

6- Gill P, Haned H, Bleka O, Hansson O, Dørum G, Egeland T. Genotyping and interpretation of STR-DNA: Low-template, mixtures and database matches-Twenty years of research and development. Forensic Sci Int Genet. 2015;18:100-17.

7- Desmyter S, Noël F, Verscheure S; NICC Organizing Committee, Parson W, Roewer L; Scientific Committee. Introduction. DNA in Forensics 2014. Forensic Sci Int Genet. 2015;15:1.
8- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol Ecol. 2002;11(12):2453-65.
9- Cai-xia L, Jun-ping H, Wen-yan R, An-quan J, Xiu-lan X, Lan H. DNA profiling of spermatozoa by laser capture microdissection and low volume-PCR. PLoS One. 2011;6(8):e22316.
10- Murray C, McAlister C, Elliott K. Identification and isolation of male cells using fluorescence in situ hybridiation and laser microdissection, for use in the investigation of sexual assault. Forensic Sci Int Genet. 2007;1(3-4):247-52.
11- Kayser M, Kittler R, Erler A, Hedman M, Lee A, Mohyuddin A, et al. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. Am J Hum Genet. 2004;74(6):1183-97.
12- Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, Della Manna A, Gross AM, Guerrieri RA, et al. Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. J Forensic Sci. 2009;54(4):810-21.

این صفحه آگاهانه سفید گذاشته شده است