ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2020;9(4):185-194

Journal of Police Medicine

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

Original Article **Open Access**

Application and Comparison of Conventional, Nested, and Multiplex PCR for Discriminating between Human and Animal Origin for Blood Stains

Shirin Jalili

Research Institute of Law Enforcement Sciences & Social Studies, Tehran, Iran

ABSTRACT

Aims: Suspected blood stains are among common forms of trace evidence found at crime scenes. Therefore, discriminating between human and animal origin for blood stains is one of the fundamental analyses in forensic laboratories. Currently, tests for determining the origin of bloodstains, such as serology and presumptive tests, are time-consuming and destructive to the sample. However, different polymerase chain reaction (PCR) methods can be used as highly sensitive and specific techniques for determining a bloodstain's origin.

Materials & Methods: This experimental study was performed to evaluate conventional, nested, and multiplex PCR for discriminating between human and animal bloodstains, and using them in criminal investigations. These methods were designed based on the PCR amplification of cytochrome b and 16S ribosomal mitochondrial DNA fragment.

Findings: The presence of a single band 157 and 170 base pair (bp) in nested and conventional PCR, respectively, as well as two bands 157 and 359 in multiplex PCR, indicates a human blood sample. However, the presence of a single band 359 bp in multiplex PCR and multiple bands in conventional PCR points to the sample's non-human origin.

Conclusion: This study demonstrated that a multiplex PCR assay designed based on the identification of mitochondrial ribosomal 16S gene has high accuracy in differentiating between human and non-human bloodstains, in addition to being affordable in terms of time and cost. This assay can be useful for forensic purposes because the 16S ribosomal mitochondrial fragment is a small human-specific fragment that is easily amplifiable, even in degraded DNA samples from biological materials.

KEYWORD: Blood Stains; Diagnosis; Polymerase Chain Reaction (PCR); Nested PCR; Multiplex PCR.

How to cite this article
Jalili S. *Application and Comparison of Conventional, Nested, and Multiplex PCR for Discriminating between Human and Animal Origin for Blood Stains.* J Police Med. 2020;9(4):185-194.

***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: a.jalili.shirin@yahoo.com

Article History
Received: 24/06/2020
Accepted: 19/08/2020
ePublished: 06/10/2020

CITATION LINKS

[1] Shotgun metagenomics of biological stains using ultra-deep DNA sequencing ... [2] A simple and inexpensive molecular method for sexing and identification ... [3] Assigning African elephant DNA to geographic region of origin ... [4] Development of swine-specific DNA markers for biosensor-based ... [5] A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products ... [6] Food authentication of commercially-relevant shrimp and prawn species ... [7] Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones ... [8] Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetic ... [9] Recommendations for animal DNA forensic and identity ... [10] Comparison of different DNA extraction and preparation methods ... [11] Direct PCR as a rapid and simple forensic technique for detection of DNA ... [12] A multiplex PCR method to identify bushmeat species in wildlife forensics. Forensic ... [13] Automated forensic animal family identification by nested PCR and melt ... [14] A rapid multiplex PCR assay for presumptive species identification of rhinoceros ... [15] Validation of a multiplex PCR assay for the forensic ...

Copyright © 2020, 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(4):185-194

مجله طب انتظامی

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

مقاله اصیل

دسترسی آزاد

بکارگیری و مقایسه روش‌های پی‌سی‌آر معمولی، آشیانه‌ای و چندگانه در تشخیص منشأ حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های خون

شیرین جلیلی

پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا، تهران، ایران

چکیده

اهداف: لکه‌های مشکوک به خون، جزو رایج‌ترین مدارکی است که در صحنه جرم وجود دارد، از این‌رو تعیین منشاء حیوانی یا انسانی بودن این نمونه‌ها از اساسی‌ترین آنالیزها در آزمایشگاه‌های جنایی محسوب می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بکارگیری و مقایسه روش‌های PCR معمولی، آشیانه‌ای و چندگانه در تشخیص منشأ حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های خون انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی به منظور تشخیص منشأ حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های خونی و بکارگیری آن‌ها در بررسی‌های جنایی، روش‌های مختلف PCR آشیانه‌ای، چندگانه و معمولی مورد ارزیابی قرار گرفت. روش‌های PCR بر اساس تکثیر قطعاتی از سیتوکروم b و قطعه S۱۶ ریبوزومی میتوکندری طراحی شدند.

یافته‌ها: حضور تک باند ۱۵۷ و ۱۷۰ جفت بازی به ترتیب در PCR آشیانه‌ای و معمولی و دو باند ۱۵۷ و ۳۵۹ در واکنش چندگانه نشان‌دهنده نمونه‌های خونی انسانی بود. حضور تک باند ۳۵۹ در واکنش چندگانه و باندهای چندتایی در PCR معمولی نشان‌دهنده نمونه‌های خونی با منشأ غیرانسانی بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش PCR چندگانه که بر پایه شناسایی ژن S۱۶ ریبوزومی میتوکندری طراحی شده، علاوه بر مقرون به صرفه بودن از لحاظ زمان و هزینه، دارای دقت بالایی در تشخیص منشأ حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌ها است و می‌تواند برای اهداف جنایی بسیار مفید باشد. زیرا قطعه S۱۶ یک قطعه کوچک ویژه انسانی می‌باشد که به راحتی در نمونه‌هایی که DNA آن‌ها تخریب شده است با این روش قابل تکثیر است.

کلیدواژه‌ها: لکه‌های خون، تشخیص، پی سی آر معمولی، پی سی آر آشیانه‌ای، پی سی آر چندگانه

نحوه استناد به این مقاله

Jalili S. Application and Comparison of Conventional, Nested, and Multiplex PCR for Discriminating between Human and Animal Origin for Blood Stains. J Police Med. 2020;9(4):185-194.

نویسنده مسئول*:

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

کدپستی: ۱۹۳۹۵-۶۵۱۶

تلفن همراه: -

تلفن ثابت: ۸۱۸۸۶۰۶۲-۰۲۱

فکس: -

پست الکترونیک:

a.jalili.shirin@yahoo.com

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۰۴

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۹

چاپ: ۱۳۹۹/۰۷/۱۵

لینک‌های استناد

[1] Shotgun metagenomics of biological stains using ultra-deep DNA sequencing ... [2] A simple and inexpensive molecular method for sexing and identification ... [3] Assigning African elephant DNA to geographic region of origin ... [4] Development of swine-specific DNA markers for biosensor-based ... [5] A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products ... [6] Food authentication of commercially-relevant shrimp and prawn species ... [7] Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones ... [8] Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetic ... [9] Recommendations for animal DNA forensic and identity ... [10] Comparison of different DNA extraction and preparation methods ... [11] Direct PCR as a rapid and simple forensic technique for detection of DNA ... [12] A multiplex PCR method to identify bushmeat species in wildlife forensics. Forensic ... [13] Automated forensic animal family identification by nested PCR and melt ... [14] A rapid multiplex PCR assay for presumptive species identification of rhinoceros ... [15] Validation of a multiplex PCR assay for the forensic ...

Copyright © 2020, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

مقدمه

یکی از سرنخ‌های کلیدی که در کشف جرم به کارشناسان مربوطه کمک می‌کند، نمونه‌های زیستی متعددی است که از صحنه جرم به‌دست می‌آید. معمولاً در محلی که جرم اتفاق می‌افتد، حداقل چندین نمونه زیستی به خصوص نمونه‌های خونی وجود دارد. این نمونه‌های کشف‌شده از صحنه جرم، مهم‌ترین مدرک و شاهد برای حل پرونده موردنظر هستند. به همین دلیل تشخیص نوع مایعات زیستی به خصوص نمونه‌های خونی که در صحنه جرم باقی مانده است، از این نظر که نمونه‌ها مربوط به انسان است یا حیوان، بسیار حائز اهمیت است. به ویژه زمانی که در محل وقوع حادثه حیوانات خانگی هم وجود داشته باشند.

از سوی دیگر تعیین گونه نمونه‌های ناشناخته و همچنین تعیین منشاء حیوانی یا انسانی بودن یک نمونه برای پژوهشگران حوزه ژنتیک و بیولوژی سلولی ملکولی بسیار مهم است. به عنوان مثال، در پزشکی قانونی و علوم جنایی، تعیین گونه می‌تواند به تحقیقات پلیس در زمینه‌های گوناگون ازجمله شناسایی منشاء حیوانی یا انسانی بودن لکه‌های کشف‌شده در صحنه جرم [۱]، حل و پیگیری مواردی که در آنها شکار غیرقانونی دیده می‌شود [۲]، کمک به محافظت و شناسایی گونه‌های که در معرض خطر انقراض هستند و مبارزه با تجارت قاچاق حیوانات [۳]، پیگیری کیفیت و اصالت مواد غذایی گوشتی ازجمله تعیین نوع گوشت قرمز یا سفید و گوشت انواع ماهی‌ها در صنایع غذایی [۶-۴]، باستان‌شناسی نمونه‌های کشف‌شده و بررسی بقایای انسانی از نمونه‌های غیرانسانی [۷]، کمک کند. بدین ترتیب استفاده از روشی مناسب جهت تشخیص منشاء انسانی یا حیوانی بودن این گونه نمونه‌ها ضروری است.

برای این منظور می‌توان به روش‌های سرولوژی اشاره نمود که اساس آن استفاده از آنتی‌بادی‌ها است. در این روش اگر از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال استفاده شود، بخاطر واکنش‌های تداخلی که رخ می‌دهد، نتایج قابل قبولی حاصل نمی‌شود. استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال جایگزینی برای این مشکل است اما هزینه بالای تهیه این آنتی‌بادی‌ها ازجمله موارد محدودیت استفاده از آنها در کارهای تشخیصی در آزمایشگاه تلقی می‌شود. به همین دلیل جایگزین شدن این روش‌ها با روش‌های ملکولی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. امروزه روش PCR (Polymerase Chain Reaction) جایگاه بسیار مهمی را در جنبه‌های مختلف مهندسی ژنتیک، زیست‌شناسی مولکولی، میکروب‌شناسی تشخیصی، تشخیص سرطان و بیماری‌های ژنتیک، تشخیص هویت، جرم شناسی (پزشکی قانونی جهت تشخیص منشأ نمونه اسپرم، خون و غیره)، تعیین ترادف، باستان‌شناسی، مطالعات تکاملی موجودات و غیره پیدا کرده است. کاربرد بیشتر و دقیق‌تر روش PCR در تشخیص، منجر به توسعه روش‌های تکامل‌یافته‌ای از جمله PCR آشیانه‌ای، چندگانه و غیره شده است که در انواع تست‌های تشخیصی از جمله تشخیص منشأ حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های زیستی کشف شده از صحنه جرم بسیار کارا هستند. در روش چندگانه از چندین جفت پرایمر اختصاصی در یک محلول PCR جهت تکثیر چندین توالی هدف در یک زمان استفاده می‌شود و می‌توان هم‌زمان چندین جایگاه را مورد بررسی قرار داد. بنابراین می‌توان با آزمایشات کمتر و زمان کوتاه‌تر اطلاعات بیشتری جمع‌آوری کرد.

روش آشیانه‌ای راه‌حلی برای افزایش حساسیت و دقت PCR است و جداسازی محصول اختصاصی موردنظر را از بین انبوه محصولات غیراختصاصی میسر می‌سازد. در این روش از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود، به طوری که جفت دوم در بین جفت اول جای می‌گیرد. با استفاده از جفت پرایمر داخلی ترادف کوچک‌تری از DNA که درون محصول PCR اولی است، تکثیر می‌شود. احتمال بسیار ضعیفی وجود دارد که محصولات غیراختصاصی برای جفت پرایمر داخلی نیز دارای محل شناسایی باشند. این امر باعث افزایش نسبت محصول واقعی به محصول غیراختصاصی خواهد شد.

از این‌رو ژن‌های متمایزکننده بین انسان و حیوانات مختلف گزینه کلیدی بسیار مهمی هستند. توالی تعدادی از ژن‌های موجود در ژنوم میتوکندری تا حد زیادی در اکثر مهره‌داران یکسان است. اما تعدادی از ژن‌های موجود در ژنوم میتوکندری مانند cox1، D-Loop، cob و 16 sRNA هستند که توالی نوکلئوتیدی آنها در مهره‌داران مختلف تفاوت‌های زیادی دارند و از همین ژن‌ها در مطالعات مربوط به تعیین گونه‌ها با روش‌های نوین مولکولی در پزشکی قانونی و علوم جنایی استفاده می‌شود [۹،۸]. برای این منظور می‌توان از روش‌های متعدد مولکولی از جمله انواع واکنش‌های PCR بر اساس وجود یک نشانگر ژنی مانند ژن 16 SrRNA، ناحیه D-Loop میتوکندری، ژن سیتوکروم b (Cyt b) و غیره بهره برد. لذا هدف مطالعه حاضر بکارگیری و مقایسه روش‌های مختلف PCR در تشخیص منشأ حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های مورد آزمایش بر اساس تکثیر قطعاتی از ژن‌های سیتوکروم b و قطعه 16S ریبوزومی میتوکندری بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌ها

این مطالعه تجربی در فاصله زمانی ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران انجام شد. برای جمع‌آوری نمونه‌های حیوانی به صورت پایلوت، از سه بیمارستان حیوانات خانگی در طی چند مرحله ۱۹ نمونه خونی تهیه شد. نمونه‌ها توسط دامپزشک مربوطه از سه نوع حیوان موش، سگ و گربه به ترتیب به تعداد ۷، ۶ و ۶ حیوان تهیه شد. از هر حیوان بین یک تا دو سی‌سی خون گرفته و در لوله‌های مخصوص حاوی ماده ضد انعقاد ریخته شد. این نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه به چند قسمت تقسیم شد. بخشی از این نمونه‌ها در دماهای ۲۰-، ۳۰- و ۷۰- درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف یک هفته، دو هفته، سه هفته و یک ماه برای استخراج DNA ذخیره شدند. نمونه‌های خونی انسانی مورد نیاز نیز از اعضاء آزمایشگاه (۸ نفر) با رضایت شخصی افراد و رعایت تمامی ملاحظات اخلاقی و در نظر گرفتن موازین هلسینکی تهیه شد. این نمونه‌ها نیز مانند نمونه‌های حیوانی در دماهای مختلف و زمان‌های موردنظر ذخیره شدند. حجم ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از نمونه‌های انسانی و حیوانی مورد آزمایش روی پارچه‌های تنظیف نخی ریخته شد. این نمونه‌ها در دمای اتاق، خشک و نگهداری شدند. از این نمونه‌ها نیز به ترتیب بعد از گذشت یک هفته، دو هفته، سه هفته و یک ماه، استخراج DNA انجام شد.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های تهیه‌شده، با استفاده از روش‌های تغییریافته آلکالین و روش چلکس (modified alkaline and chelex) انجام شد [۱۰]. در روش

تغییر یافته آلکالین نمونه‌های موردنظر در میکروتیوپ‌ها ریخته و سپس به هر میکروتیوپ ۲۰ میکرولیتر از محلول ۰/۲ مولار NaoH اضافه کرده و به مدت ۶ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمودیم. بعد از اتمام انکوباسیون به محلول فوق، ۱۸۰ میکرولیتر از محلول ۰/۰۴ مولار Tris-HCl با pH حدود ۷/۵ اضافه کرده و سپس محلول حاصل را ورتکس نمودیم. بعد از انجام ورتکس، محلول حاصل حاوی DNA استخراج شده از نمونه‌های موردنظر است. از DNA استخراج شده به این روش می‌توان در همه کارهای مولکولی از جمله PCR استفاده کرد.

در روش چلکس به میکروتیوپ‌های حاوی نمونه‌های مورد آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر از محلول چلکس ۵ درصد اضافه کرده و بعد از ورتکس مخلوط آن را به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم. بعد از اتمام انکوباسیون محلول موردنظر را به مدت ۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ کرده و سپس محلول رویی که حاوی DNA استخراج شده است را برای کارهای بعدی جداسازی نمودیم.

بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از طیف سنجی با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر نانودرآپ و همچنین الکتروفورز روی ژل یک درصد بررسی شد.

واکنش‌های PCR

PCR قطعه ۳۰۰ جفت بازی از توالی ژن 16S rRNA

برای تأیید این که تمامی نمونه‌های که بکارگیری‌شده در روش‌های مختلف PCR حاوی DNA هستند، قطعه‌ای از توالی ژن 16S rRNA (مشترک بین انسان و حیوان) با پرایمرهای مخصوص این قطعه تکثیر داده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این واکنش PCR عبارتند از:

Forward = L16S 300: 5′-GCCTGTTTACCAAAAACATCAC-3
Revers = H 16S 300: 5′-CTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT-3′

جدول ۱ مقدار مواد به کار رفته در PCR قطعه ۳۰۰ جفت بازی از توالی ژن 16S rRNA را نشان می‌دهد. شرایط انجام این مرحله PCR در جدول ۲ آمده است. پس از اتمام واکنش، لوله‌ها بلافاصله به ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و آماده الکتروفورز شدند. محصول حاصل از این PCR تکثیر یک قطعه ۳۰۰ جفت بازی بود که در صورت وجود DNA استخراج شده در هر نمونه قابل مشاهده است. بعد از انجام PCR، محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده شد.

جدول ۱) ترکیبات موردنیاز در PCR قطعه ۳۰۰ جفت بازی از توالی ژن 16S rRNA

مقدار (µl)	مواد
۰/۵	dNTPs
۱/۱	MgCl2
۲/۵	1× PCR buffer
۰/۴	Taq DNA polymerase
۰/۷	پرایمر Forward(10 pmol)
۰/۷	پرایمر Reverse(10 pmol)
۰/۷	DNA الگو (با غلظت ۵-۱۰ نانوگرم)
۱۳/۴	ddH2O

جدول ۲) شرایط و چگونگی انجام PCR در ترموسایکلر برای تکثیر قطعه ۳۰۰ جفت بازی از توالی ژن 16S rRNA

مراحل	حرارت(°C)	زمان	چرخه (Cycle)
دناتوره کردن اولیه	۹۵	۸ دقیقه	۱
دناتوره کردن	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
جفت شدن پرایمرها	۶۴	۳۵ ثانیه	
پلی مریزه شدن	۷۲	۳۵ ثانیه	
پلی مریزه شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

تشخیص منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های خونی با استفاده از PCR قطعه ژنی سیتوکروم b

از نمونه‌های حیوانی و انسانی که استخراج DNA آنها مثبت بود و قطعه ۳۰۰ جفت بازی در آنها تکثیر شده بود، به عنوان نمونه‌های مورد آزمایش در این روش استفاده شد. در نمونه‌های منتخب، PCR با پرایمرهای که برای قسمتی از ژن سیتوکروم b طراحی شده بود، انجام گردید.توالی پرایمرهای مورد استفاده در این PCR عبارتند از:

Forward =B3cytb: 5′-ATGATGGTAAAAGGGTAGCT-3′
Revers = F3cytb: 5′-AACTAGGAGGCGTCCTTG-3′

جدول ۳ مقدار مواد به‌کار رفته در PCR مربوط به قطعه ۱۷۰ جفت بازی از توالی ژن سیتوکروم b را نشان می‌دهد. شرایط انجام این PCR در جدول ۴ آمده است.

جدول ۳) ترکیبات موردنیاز در PCR مربوط به قطعه ۱۷۰ جفت بازی از توالی ژن سیتوکروم b

مقدار (µl)	مواد
۰/۵	dNTPs
۱/۳	MgCl2
۲/۵	1× PCR buffer
۰/۴	Taq DNA polymerase
۰/۶	پرایمر Forward(10 pmol)
۰/۶	پرایمر Reverse(10 pmol)
۰/۶	DNA الگو (با غلظت ۵-۱۰ نانوگرم)
۱۳/۵	ddH2O

جدول ۴) شرایط و چگونگی انجام واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز در ترموسایکلر برای تکثیر قطعه ۱۷۰ جفت بازی از توالی ژن سیتوکروم b

مراحل	حرارت (°C)	زمان	چرخه (Cycle)
دناتوره کردن اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
دناتوره کردن	۹۶	۳۰ ثانیه	۳۵
جفت شدن پرایمرها	۵۹	۴۰ ثانیه	
پلی مریزه شدن	۷۲	۶۰ ثانیه	
پلی مریزه شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

محصول حاصل از این PCR تکثیر یک قطعه ۱۷۰ جفت بازی به صورت تک‌باند مربوط به نمونه‌های انسانی بود که در صورت وجود DNA استخراج شده در هر نمونه انسانی قابل مشاهده است. در حالی که در نمونه‌های حیوانی قطعاتی با طول‌های متفاوت به صورت یک باند لدر تکثیر می‌یابد.

تشخیص منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های خونی با استفاده از PCR چندگانه قطعات ژنی سیتوکروم b و 16S rRNA

در این PCR هم‌زمان از دو ژن سیتوکروم b و 16S rRNA برای تشخیص منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های خونی استفاده شد. پرایمرهای مربوط به این دو ژن طوری طراحی شد که در یک PCR بطور هم‌زمان هم می‌توان فهمید که آیا استخراج DNA نمونه‌های مورد آزمایش به خوبی انجام شده است یا نه، که در صورت استخراج DNA مناسب در تمامی نمونه‌ها چه انسانی چه حیوانی قطعه تکثیر یافته قابل مشاهده است. علاوه بر این هم زمان با آن می‌توان به منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌ها پی برد. محصولات تکثیر یافته توسط این نوع PCR تکثیر دو قطعه ژنی یکی به طول ۳۵۹ جفت باز مربوط به ژن سیتوکروم b است که در صورت استخراج DNA از تمامی نمونه‌ها این قطعه در تمامی نمونه‌ها قابل مشاهده است و دیگری که در این روش بر روی ژل آگارز قابل مشاهده بود، قطعه‌ای به طول ۱۵۷ جفت باز است که مربوط به ژن 16S rRNA است. پرایمر مربوط به این توالی صرفاً از نواحی کاملاً حفظ شده در انسان طراحی شده است. جدول ۵ مقدار مواد به کار رفته در PCR مربوط به این قطعات ژنی را نشان می‌دهد. شرایط انجام این PCR نیز در جدول ۶ آمده است. توالی پرایمرهای مربوط به دو ژن سیتوکروم b و ژن 16S rRNA مورد استفاده در این PCR عبارتند از:

Forward = cytb: 5¶-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3¶
Reverse =cytb:5¶-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3¶9
Forward =16S rRNA: 5¶-CAATTGGACCAATCTATCACC-3¶
Reverse =16S rRNA: 5¶-GTGAGGGTAATAATGACTTGT-3¶

جدول ۵) ترکیبات مورد نیاز در PCR چندگانه مربوط به قطعات ژنی سیتوکروم b و 16S rRNA

مقدار (µl)	مواد
۰/۵	dNTPs
۱/۳	MgCl2
۲/۵	1× PCR buffer
۰/۴	Taq DNA polymerase
۰/۶	پرایمر Forward cytb (10 pmol)
۰/۴	پرایمر Reverse cytb (10 pmol)
۰/۴	پرایمر Forward 16S (10 pmol)
۰/۶	پرایمر Reverse 16S (10 pmol)
۰/۶	DNA الگو (با غلظت ۵-۱۰ نانوگرم)
۰/۷	ddH2O
۱۲/۶	حجم نهایی

جدول ۶) شرایط و چگونگی انجام واکنش در PCR چندگانه مربوط به قطعات ژنی سیتوکروم b و 16S rRNA

مراحل	حرارت (°C)	زمان	چرخه (Cycle)
دناتوره کردن اولیه	۹۴	۱ دقیقه	۱
دناتوره کردن	۹۴	۵ ثانیه	۴۰
جفت شدن پرایمرها	۵۰	۳۰ ثانیه	
پلی مریزه شدن	۷۲	۴۰ ثانیه	
پلی مریزه شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

تشخیص منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های خونی با استفاده از PCR آشیانه‌ای ژن سیتوکروم b

ژن مورد استفاده در این روش سیتوکروم b است. برای تکثیر این ژن و به منظور افزایش اختصاصیت واکنش از روش PCR آشیانه‌ای استفاده شد. در این روش محصول PCR نخست به عنوان الگو برای PCR دوم مورد استفاده قرار گرفت. قطعه ژنی که در واکنش PCR اول توسط پرایمرهای مربوطه تکثیر یافت، قطعه با طول تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز است. محصول این PCR به‌عنوان الگو برای PCR دو مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای مربوط به PCR دوم برای بخش داخلی ژن سیتوکروم b و نواحی کاملاً حفاظت شده و مختص انسان طراحی شده بود که نتیجه آن تکثیر یک قطعه ۱۵۷ جفت بازی است که منحصراً در نمونه‌های انسانی تکثیر می‌یابد.

PCR اولیه

در PCR اولیه DNA استخراج‌شده به عنوان الگو جهت ساخت قطعه اولیه از ژن سیتوکروم b مورد استفاده قرار گرفت. جدول ۷ مقدار مواد به کار رفته در PCR اولیه را نشان می‌دهد. شرایط انجام این مرحله PCR در جدول ۸ آمده است.

توالی پرایمرهای استفاده شده در PCR اول برای تکثیر قطعه اولیه ژن سیتوکروم b

Forward = 1Ncytb: 5' -AACCATCGTTGTATTTCAACT-3¶ '
Reverse = 1Ncytb:5'¶-ATTTGAGTATTTTGTTTTC-3¶'

جدول ۷) ترکیبات مورد نیاز در PCR اول

مقدار (µl)	مواد
۰/۵	dNTPs
۱/۱	MgCl2
۲/۵	1× PCR buffer
۰/۴	Taq DNA polymerase
۰/۶	پرایمر Forward(10 pmol)
۰/۶	پرایمر Reverse(10 pmol)
۰/۶	DNA الگو (با غلظت ۵-۱۰ نانوگرم)
۱۳/۷	ddH2O

جدول ۸) شرایط و چگونگی انجام PCR در ترموسایکلر برای تکثیر اولیه ژن سیتوکروم b

مراحل	حرارت (°C)	زمان	چرخه (Cycle)
دناتوره کردن اولیه	۹۵	۸ دقیقه	۱
دناتوره کردن	۹۶	۳۰ ثانیه	۳۵
جفت شدن پرایمرها	۵۰	۴۰ ثانیه	
پلی مریزه شدن	۷۲	۶۰ ثانیه	
پلی مریزه شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

ارزیابی محصول PCR

برای ارزیابی محصول PCR و استفاده از آن برای PCR ثانویه، الکتروفورز محصول، و در نهایت تخلیص آن در بهتر شدن نتایج مؤثر است. قطعات آگارز حاوی DNA الکتروفورز شده از مرحله PCR اول با استفاده از کیت تخلیص ژل شرکت Bioneer مطابق پروتکل شرکت، تخلیص شد.

PCR ثانویه

مراحل انجام PCR ثانویه با یک سری تغییرات مشابه PCR اولیه می‌باشد. در صورت تکثیر این قطعه در نمونه مورد آزمایش، مشخص می‌شود که نمونه موردنظر منشاء انسانی دارد و در صورت عدم تکثیر قطعه موردنظر در PCR ثانویه مشخص می‌گردد نمونه موردنظر منشاء حیوانی دارد.

توالی پرایمرهای استفاده شده در PCR ثانویه برای تکثیر قطعه داخلی ژن سیتوکروم b

Forward = 2Ncytb: 5- TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATAT-3¶
Reverse =2Ncytb:5¶- ACTTGTCCAATGATGGTAAAAGG-3¶9

جدول ۹ مقدار مواد به کار رفته در PCR ثانویه را نشان می‌دهد. شرایط انجام این مرحله PCR در جدول ۱۰ آمده است.

تشخیص منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های خونی با استفاده PCR یک مرحله‌ای از ژن سیتوکروم b

در صورت کمبود وقت، می‌توان مستقیماً PCR ثانویه را بر روی DNA استخراج شده از نمونه‌هایی که از وجود استخراج DNA در آنها مطمئن هستیم انجام دهیم. شرایط PCR و مقادیر مواد موردنیاز برای تکثیر قطعه موردنظر از ژن سیتوکروم b دقیقاً شبیه به PCR ثانویه است. در صورت تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۵۷ جفت باز در نمونه مورد آزمایش مشخص می‌گردد که نمونه موردنظر منشاء انسانی دارد و در صورت عدم تکثیر قطعه موردنظر مشخص می‌گردد که نمونه مورد آزمایش مربوط به حیوان است.

جدول ۹) مخلوط PCR برای تکثیر قطعه داخلی سیتوکروم b در PCR ثانویه

مقدار (µl)	مواد
۰/۵	dNTPs
۱/۴	MgCl2
۲/۵	1× PCR buffer
۰/۴	Taq DNA polymerase
۰/۶	پرایمر Forward(10 pmol)
۰/۶	پرایمر Reverse(10 pmol)
۰/۶	DNA الگو (با غلظت ۵-۱۰ نانوگرم)
۱۳/۳	ddH2O

جدول ۱۰) شرایط و چگونگی انجام PCR در ترموسایکلر برای تکثیر قطعه داخلی ژن سیتوکروم b در PCR ثانویه

مراحل	حرارت (°C)	زمان	چرخه (Cycle)
دناتوره کردن اولیه	۹۵	۸ دقیقه	۱
دناتوره کردن	۹۶	۳۰ ثانیه	۲۰
جفت شدن پرایمرها	۵۹	۴۰ ثانیه	
پلی مریزه شدن	۷۲	۶۰ ثانیه	
پلی مریزه شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

یافته‌ها

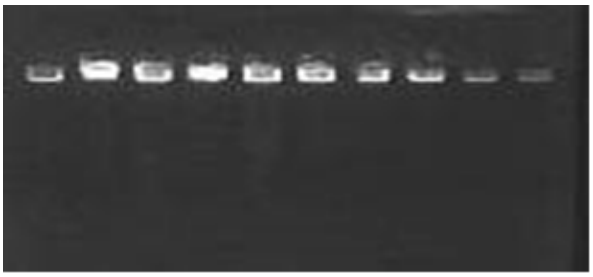
نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

روش الکتروفورز

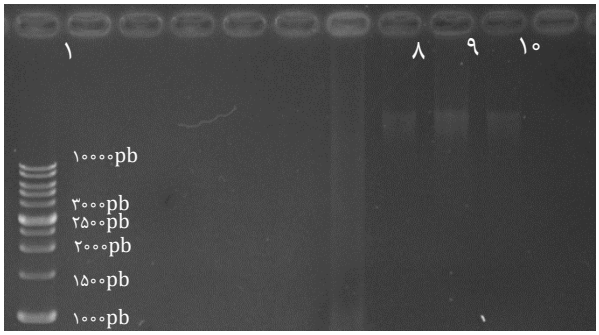
بررسی شدت باندهای DNA بر روی ژل آگارز (۱ درصد) نشان داد که DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد آزمایش از کمیت و کیفیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش‌های مختلف PCR برخوردار است. شکل ۱ و شکل ۲ نمونه‌هایی از DNA استخراج شده به سه روشی که ذکر شد، بر روی ژل آگارز یک درصد را نشان می‌دهد.

نتایج آزمایش PCR ژن 16S rRNA برای تکثیر قطعه ۳۰۰ جفت بازی

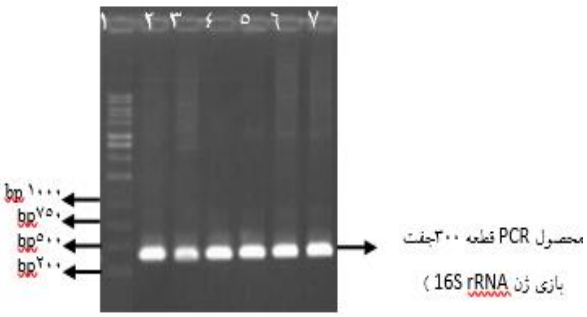
برای اطمینان از اینکه تمامی نمونه‌هایی که در انواع روش‌های PCR که در این مطالعه استفاده می‌شوند حاوی DNA هستند و برای جلوگیری از نتایج منفی کاذب، قطعه‌ای از توالی ژن 16S rRNA که در تمامی موجودات مشترک است با پرایمرهای مخصوص این قطعه تکثیر داده شد. بررسی محصول PCR مربوط به قطعه مشترک ژن 16S rRNA نمونه‌های مورد آزمایش، بر روی ژل آگارز ۲ درصد به همراه DNA مارکر، نشان‌دهنده تکثیر قطعه واحدی به طول ۳۰۰ جفت باز بود. در تمامی نمونه‌هایی که برای مراحل بعدی کار انتخاب شدند، این قطعه تکثیر شده بود و همچنین محصول تکثیر شده PCR دارای کمیت و کیفیت خوبی بود (شکل ۳).



شکل ۱) نتایج حاصل از استخراج DNA نمونه‌های مختلف خونی (نمونه خون منجمد- لخته شده- فریز شده و غیره) به روش نمک اشباع بر روی ژل آگارز یک درصد.



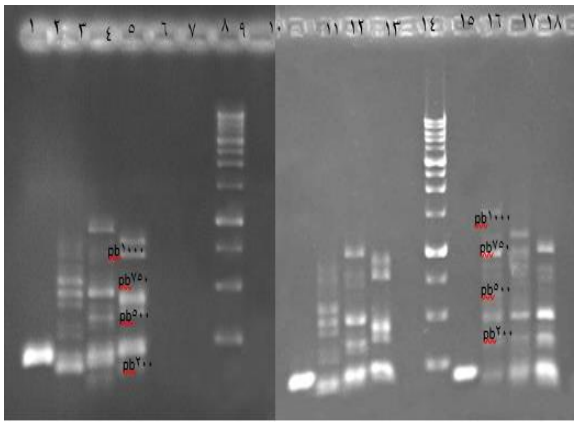
شکل ۲) الکتروفورز DNA استخراج شده (ستون‌های ۸، ۹ و ۱۰) با روش چلکس از نمونه‌های خونی مختلف بر روی ژل آگارز یک درصد، ستون ۱ استاندارد وزن مولکولی.



شکل ۳) ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر قطعه ۳۰۰ جفت بازی از ژن 16S rRNA نمونه‌های حیوانی و انسانی بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ستون یک استاندارد وزن مولکولی DNA، ستون ۲ و ۳ نمونه‌های انسانی، ستون ۴ تا ۷ مربوط به نمونه‌های حیوانات مختلف.

نتایج آزمایشات PCR مربوط به ژن سیتوکروم b به منظور تشخیص منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌ها

بر روی نمونه‌هایی که استخراج DNA آنها، از طریق تکثیر قطعه ۳۰۰ جفت بازی مربوط به ژن 16 sRNA تأیید شده بود، واکنش PCR انجام شد. این واکنش با پرایمرهای اختصاصی که منحصراً به قطعه خاصی از ژنوم انسانی متصل می‌شود، انجام شد که نتیجه آن تکثیر یک باند به طول ۱۷۰ جفت باز است. بررسی محصولات حاصل از PCR ژن سیتوکروم b در این آزمایش که روی نمونه‌های انسانی و حیوانی انجام شده بود، بر روی ژل آگارز ۲ درصد به همراه DNA مارکر، نشان‌دهنده تکثیر قطعه واحدی به طول ۱۷۰ جفت باز برای تمامی نمونه‌های انسانی مورد آزمایش بود. از سوی دیگر الگوی باندی ایجادشده بر روی ژل آگارز برای تمامی نمونه‌های حیوانی مورد آزمایش به صورت چندین باند بود که در شکل ۴ نتایج مربوط به این آزمایش آمده است. قطعه تکثیر یافته از ژن سیتوکروم b که توسط پرایمرهای اختصاصی ویژه انسان طراحی شده است، قطعه‌ای به طول ۱۷۰ جفت باز برای نمونه‌هایی است که منشاء انسانی دارند.



شکل ۴) ژل الکتروفورز محصول PCR ژن سیتوکروم b، بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ستون‌های ۱، ۷ و ۱۱ مربوط به نمونه‌های انسانی. ستون‌های ۲، ۳، ۴، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ مربوط به نمونه‌های حیوانی مختلف. ستون‌های ۵، ۱۵، ۱۶ و ۱۸ کنترل منفی. ستون‌های ۶ و ۱۷ استاندارد وزن مولکولی DNA

نتایج مربوط به بررسی PCR چندگانه قطعات ژنی سیتوکروم b و 16S rRNA به منظور تشخیص منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های مورد آزمایش

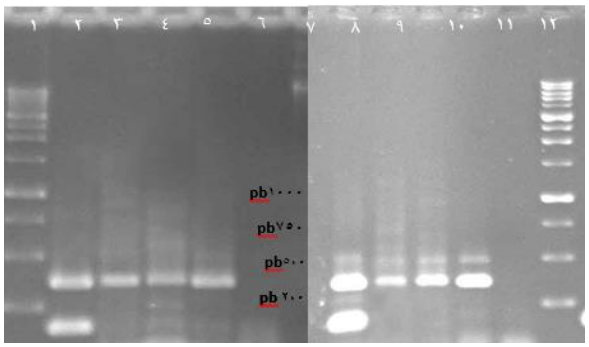
محصولات تکثیر یافته توسط این نوع PCR، تکثیر دو قطعه ژنی یکی به طول ۳۵۹ جفت باز مربوط به ژن سیتوکروم است که در صورت استخراج DNA مناسب از نمونه‌ها این قطعه در تمام نمونه‌ها قابل مشاهده است و دیگری که در این روش بر روی ژل آگارز قابل مشاهده است، قطعه ۱۵۷ جفت بازی مربوط به ژن 16S rRNA است. پرایمر مربوط به این توالی صرفاً از نواحی کاملاً حفظ شده در انسان طراحی شد. به طوری که بعد از تکثیر فقط نمونه‌های که حاوی منشاء انسانی هستند این باند ۱۵۷ جفت بازی در آنها قابل مشاهده بود. بررسی محصولات حاصل، بر روی ژل آگارز ۲ درصد به همراه DNA مارکر، نشان‌دهنده تکثیر قطعاتی به طول به طول ۳۵۹ و ۱۵۷ جفت باز می‌باشد. تکثیر قطعه ۳۵۹ جفت بازی در صورت استخراج DNA در تمامی نمونه‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۵).

طبق نتایج حاصل از این آزمایش برای تمامی نمونه‌های انسانی مورد آزمایش هر دو قطعه ۱۵۷ و ۳۵۹ جفت بازی قابل مشاهده است. از سوی دیگر الگوی باندی ایجاد شده بر روی ژل آگارز برای تمامی نمونه‌های مورد آزمایش که منشاء حیوانی داشتند به صورت یک تک باند در ناحیه ۳۵۹ جفت بازی بود.

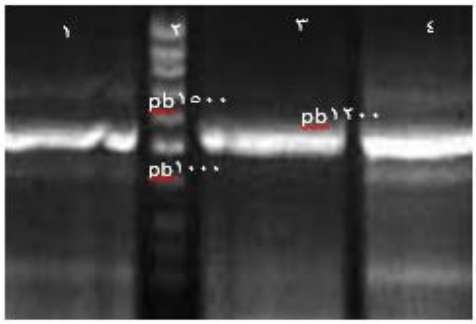
نتایج آزمایشات PCR آشیانه‌ای مربوط به ژن سیتوکروم b به منظور تشخیص منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌ها

نتایج الکتروفورز محصول PCR اول

بررسی محصولات حاصل از PCR ژن سیتوکروم b در این آزمایش که روی نمونه‌های انسانی و حیوانی انجام شد، بر روی ژل آگارز ۱ درصد به همراه DNA مارکر، نشان‌دهنده تکثیر قطعه واحدی به طول حدود ۱۲۰۰ جفت باز برای تمامی نمونه‌های مورد آزمایش بود. در شکل ۶ نتایج مربوط به اولین مرحله از آزمایش PCR آشیانه‌ای آمده است. این قطعه ژنی بعد از استخراج از ژل به عنوان الگو در در PCR دوم مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۵) ژل الکتروفورز محصول PCR چندگانه قطعات ژنی سیتوکروم b و 16SrRNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ستون‌های ۱ و ۸ مربوط به نمونه‌های انسانی. ستون‌های ۲، ۳، ۴، ۹، ۱۰ و ۱۱ مربوط به نمونه‌های حیوانی مختلف. ستون‌های ۵ و ۱۲ کنترل منفی. ستون‌های ۶ و ۷ استاندارد وزن مولکولی DNA.



شکل ۶) بررسی محصول PCR اول بر روی ژل آگارز یک درصد، ستون ۲ استاندارد وزن مولکولی DNA ستون ۱، ۳ و ۴ محصول PCR اول، باندی با وزن مولکولی حدود ۱۲۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد.

PCR دوم

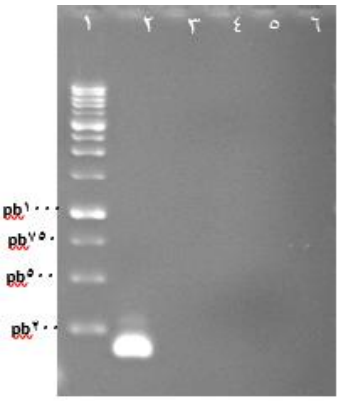
قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی پس از جداسازی و تخلیص از ژل آگارز توسط PCR دوم با پرایمرهایی که منحصراً برای متمایز کردن نمونه‌های انسانی از حیوانی طراحی شده بود تکثیر شد.

محصول PCR دوم قطعه ژنی با طول ۱۵۷ جفت باز بود و دارای توالی است که منحصراً در نمونه‌های انسانی تکثیر می‌یابد. شکل ۷ نشان‌دهنده نتایج PCR دوم است.

نتایج مربوط به PCR یک مرحله‌ای از ژن سیتوکروم b به منظور تشخیص منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های مورد آزمایش

در صورت کمبود وقت، می‌توان مستقیماً PCR ثانویه را بر روی DNA استخراج شده از نمونه‌هایی که از وجود استخراج DNA در آنها مطمئن هستیم نیز انجام داد. شرایط PCR و مقادیر مواد مورد نیاز برای تکثیر قطعه موردنظر از ژن سیتوکروم b دقیقاً شبیه به PCR ثانویه می‌باشد. در صورت تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۵۷ جفت باز در نمونه مورد آزمایش مشخص می‌گردد که نمونه موردنظر منشاء انسانی دارد و در صورت عدم تکثیر قطعه موردنظر نتیجه گیری می‌شود که نمونه مورد آزمایش مربوط به حیوان می‌باشد. نتایج این PCR در شکل ۸ آمده است. تفاوت نتایج این روش با روش PCR آشیانه‌ای فقط بر روی باندهای غیراختصاصی است که ممکن است در PCR که مستقیماً برای تکثیر قطعه ۱۵۷ جفت بازی از DNA استخراج شده استفاده می‌شود، مشاهده شود.

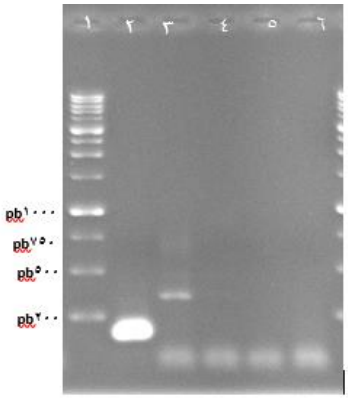
همان‌طور که در تصویر ژل الکتروفورز مربوط به محصول PCR این واکنش مشاهده می‌شود علاوه بر باند ۱۵۷ جفت بازی که در نمونه‌های انسانی تکثیر می‌شود یکسری باند غیراختصاصی نیز ممکن است در نمونه‌های دیگر (به طور مثال در ستون سه، این باند غیراختصاصی در این نمونه تکثیر شده است) تکثیر شود که در PCR آشیانه‌ای به علت ویژگی و حساسیتی که دارد این باندهای غیراختصاصی در محصول PCR دوم تولید نمی‌شوند.



شکل ۷) ژل الکتروفورز محصول PCR دوم قطعه داخلی ژن سیتوکروم b بر روی ژل آگارز دو درصد. ستون ۲ مربوط به نمونه تکثیر قطعه ۱۵۷ جفت بازی که منحصراً در نمونه انسانی تکثیر شده است. ستون‌های ۳، ۴ و ۵ مربوط به نمونه‌های حیوانی مختلف می‌باشد. ستون ۶ کنترل منفی. ستون ۱ استاندارد وزن مولکولی DNA.

بحث

با توجه به تنوع و گستردگی انواع روش‌های PCR امروزه شاهد این هستیم که این روش‌ها در پزشکی قانونی و علوم جنایی به خصوص در حوزه تشخیص هویت جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند [۱۳-۱۱]. هر کدام از این روش‌ها به نوبه خود مزایا و معایبی دارند که محققین و کارشناسان مربوط به هر رشته می‌توانند از این روش‌ها متناسب به نیاز خود بهره ببرند. در مطالعه حاضر با توجه به هدف اصلی و کاربردی آن که راه‌اندازی روش‌هایی متناسب با امکانات موجود در آزمایشگاه‌های جنایی کشور است، سعی شده که از چند روش متفاوت PCR جهت تعیین منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های موجود استفاده شود، که کارشناسان بتوانند با امکانات و موادی که در آزمایشگاه در دسترس دارند به این هدف نائل شوند. در این مطالعه از روش‌های PCR متداول، PCR چندگانه و PCR آشیانه‌ای استفاده شد.



شکل ۸) ژل الکتروفورز محصول PCR مستقیم بر روی قطعه داخلی ژن سیتوکروم b بر روی ژل آگارز دو درصد. ستون ۲ مربوط به تکثیر قطعه ۱۵۷ جفت بازی که منحصراً در نمونه انسانی تکثیر شده است. ستون‌های ۳، ۴ و ۵ مربوط به نمونه‌های حیوانی مختلف می‌باشد. ستون ۶ کنترل منفی. ستون ۱ استاندارد وزن مولکولی DNA.

PCR چندگانه یکی از روش‌های تکامل‌یافته PCR است که برعکس PCR معمولی که تنها یک جایگاه ژنی در آن مورد بررسی قرار می‌گیرد، با استفاده از پرایمرهای مختلف می‌توان چندین جایگاه را همزمان بررسی کرد و از چندین جفت پرایمر اختصاصی جهت تکثیر استفاده نمود. یکی از مزایای عمده این روش که موجب شد برای این مطالعه انتخاب گردد، تشخیص سریع نمونه موردنظر در مدت زمان کوتاه است، به گونه‌ای که پس از استخراج DNA از نمونه‌های مورد بررسی، در عرض کمتر از سه ساعت، هم می‌توان از صحت استخراج DNA در نمونه‌ها مطمئن شد و هم اینکه شناسایی و تعیین منشاء حیوانی و یا انسانی بودن نمونه‌ها امکان‌پذیر است. از این‌رو PCR چندگانه به عنوان یکی از پرکاربردترین روش‌های PCR در علوم جنایی بخصوص در زمینه تشخیص گونه‌های حیوانی تلقی می‌شود [۱۴].

از سوی دیگر چون این دو واکنش در یک مرحله PCR انجام می‌شود احتمال آلودگی و خطاء در نمونه‌ها کمتر می‌گردد. همچنین با یک مرحله ژل آگارز هم می‌توان از نتیجه استخراج DNA مطمئن شد و هم منشاء نمونه‌ها را مشخص نمود که این خود موجب کاهش زمان از طریق الکتروفورز کردن نتایج نمونه‌ها در یک مرحله می‌شود. همچنین در مصرف مواد ژل آگارز نیز صرفه‌جویی می‌کند. از طرف دیگر در آزمایشگاه‌هایی که برای رنگ‌آمیزی ژل آگارز از اتیدیوم بروماید استفاده می‌شود، سبب کاهش خطرهای احتمالی کار با این ماده در یک مرحله ژل‌گذاری می‌شود. طی مقایسه نتایج حاصل از این واکنش با سایر روش‌های PCR مشخص شد که این روش یک مرحله‌ای (که هم برای تأیید DNA استخراج شده و هم تعیین منشاء انسانی یا حیوانی بودن نمونه‌های مورد آزمایش بکار می‌رود) از اختصاصیت صددرصدی برخوردار است و تمامی نمونه‌ها به درستی در یک مرحله از PCR تشخیص داده می‌شوند. این مطلب بیانگر این است که نواحی انتخاب شده برای اتصال آغازگرها و طراحی خود آغازگرها به گونه‌ای بوده که شرایط اتصال آنها به توالی‌ها موردنظر رعایت شده است، در غیر این صورت هر دو واکنش

نمی‌توانست در یک مرحله PCR با یک شرایط دمایی و زمانی واحد در دستگاه ترموسایکلر انجام شود، از سوی دیگر این اتصال نشان می‌دهد که نواحی ژنی انتخاب شده قادر به شناسایی دقیق نمونه‌ها می‌باشند.

همان‌طور که ذکر شد، تکثیر سریع و هم‌زمان چند ژن در یک مخلوط واکنش یکی از اهدافی است که در روش PCR چندگانه دنبال می‌شود. مزیت استفاده از این روش علاوه بر سریع و مقرون به صرفه بودن، به حداقل رساندن احتمال آلودگی نمونه مورد بررسی نیز است. به همین دلیل محققین علوم جنایی از این روش در بررسی پرونده‌های جنایی بسیار استفاده می‌نمایند. در این خصوص می‌توان به مطالعه *Ewart* و همکارانش در سال ۲۰۱۸ اشاره داشت که با استفاده از PCR چندگانه ژن سیتوکروم b، قادر به شناسایی گونه‌های مختلف کرگدن شدند که به منظور شناسایی سریع و دقیق گونه‌های قاچاق شده کرگدن توسط این گروه طراحی شد [۱۴]. در مطالعه دیگری که توسط *Meganathan* و همکارانش در مرکز جنایی هند انجام شد، با طراحی یک PCR چندگانه موفق به شناسایی سه گونه کروکودیل شدند [۱۵]. با این تفاسیر می‌توان گفت از این روش می‌توان جهت تعیین سریع و دقیق منشاء حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های موردنظر استفاده کرد.

در روش PCR آشیانه‌ای از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود، طوری که جفت دوم در بین جفت اول جای می‌گیرد. در این روش ابتدا پرایمر بیرونی توالی هدف در طول ۳۰-۱۵ چرخه تکثیر می‌شود، سپس محصول PCR حاصل به لوله‌ای دیگر منتقل می‌شود و به‌عنوان الگو و با استفاده از جفت پرایمر داخلی مرحله دوم PCR انجام شده و ترادف کوچک‌تری از DNA که درون PCR اولی است، به اندازه ۴۰-۱۵ چرخه تکثیر می‌شود. مزایای این روش تغییریافته PCR عبارتند از ۱- حساسیت در این روش به میزان زیادی بالاتر است ۲- با این روش احتمال تکثیر توالی‌های غیراختصاصی بسیار کم می‌شود که حتی نتایج این تست با PCR یک مرحله‌ای ژن سیتوکروم b که در بخش نتایج آورده شده است گواه این مطلب است. ۳- به دلیل انتقال محصول PCR دور اول به لوله جدید، ممانعت‌کننده‌ها رقیق می‌شوند.

در این مطالعه جهت به حداقل رساندن تکثیر غیراختصاصی و محصولات کاذب، این نوع PCR طراحی شده است که نتیجه آن کاهش احتمال اتصال آغازگرها به جایگاه‌های پیش‌بینی نشده و ناخواسته و نهایتاً ممانعت از تکثیر توالی‌های غیراختصاصی بود که نتایج به دست آمده تأییدکننده این مطلب است. با توجه به اینکه جایگاه اتصال دسته دوم پرایمرها، در داخل قطعه‌ای تکثیریافته به وسیله پرایمرهای دسته اول است، بسیار بعید است که توالی کاذب یا ناخواسته، جایگاه اتصال برای هر دو مجموعه آغازگرها را داشته باشد. اما نکته‌ای که باید به آن توجه داشت این است که در PCR آشیانه‌ای به علت دو مرحله‌ای بودن واکنش، امکان آلودگی نمونه‌ها در حین کار وجود دارد. از این رو کارشناسان مربوطه حین کار باید دقت بیشتری داشته باشند.

نتیجه‌گیری

در مقایسه‌ای که بین سه روش PCR متداول، آشیانه‌ای و چندگانه جهت تشخیص منشأ حیوانی یا انسانی این نمونه‌ها صورت گرفت، مشخص شد که روش یک‌مرحله‌ای که، هم برای تأیید DNA استخراج‌شده و هم تعیین منشاء انسانی یا حیوانی بودن نمونه‌های مورد آزمایش در PCR چندگانه طراحی شده است، با کاهش زمان و هزینه و همچنین با کاهش میزان آلودگی (به دلیل یک مرحله‌ای بودن) با دقت بسیار بالایی قادر به تشخیص منشأ نمونه‌های مورد آزمایش بود. از سوی دیگر چون این واکنش بر پایه قطعه ویژه از ژن S۱۶ ریبوزومی میتوکندری انسانی طراحی شده است به لحاظ اینکه قطعه بسیار کوچکی است و به راحتی در نمونه‌هایی که DNA آنها تخریب شده است با این روش قابل تکثیر است، جهت شناسایی این دسته از نمونه‌ها بسیار سودمند است. از این‌رو این روش به عنوان یک روش مقرون به صرفه و با دقت بالا جهت شناسایی منشأ حیوانی یا انسانی بودن نمونه‌های زیستی در آزمایشگاه‌ها به خصوص آزمایشگاه جنایی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی: این پژوهش با حمایت مالی و معنوی پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا انجام شد که بدین وسیله از مسئولین ذیربط کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

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

سهم نویسندگان: شیرین جلیلی، ارائه ایده و طراحی مطالعه، جمع‌آوری داده، تفسیر داده، تحلیل آماری داده؛ نویسنده با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرد.

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

References

1- Brenig B, Beck J, Schütz E. Shotgun metagenomics of biological stains using ultra-deep DNA sequencing. Forensic Science International: Genetics. 2010;4(4):228-31.
2. Gupta SK, Thangaraj K, Singh L. A simple and inexpensive molecular method for sexing and identification of the forensic samples of elephant origin. J forensic sci. 2006;51(4):805-7.
3. Wasser SK, Shedlock AM, Comstock K, Ostrander EA, Mutayoba B, Stephens M. Assigning African elephant DNA to geographic region of origin: applications to the ivory trade. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(41):14847-52.
4. Uda H, Muhammad K, Shuhaimi M, Yaakob CM. Development of swine-specific DNA markers for biosensor-based halal authentication. Genet Mol Res. 2012; 11(2):1762-1772.
5. Sakaridis I, Ganopoulos I, Argiriou A, Tsaftaris A. A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis. Meat Sci. 2013;94(1):84-8.
6. Ortea I, Pascoal A, Cañas B, Gallardo JM, Barros-Velázquez J, Calo-Mata P. Food authentication of commercially-relevant shrimp and prawn species: from classical methods to foodomics. Electrophoresis. 2012;33(15):2201-11.

7. Malmström H, Storå J, Dalén L, Holmlund G, Götherström A. Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth. Molecular biology and evolution. 2005;22(10):2040-7.
8. Pereira SL. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. Gen Molecular Biol. 2000;23(4):745-52.
9. Budowle B, Garofano P, Hellman A, Ketchum M, Kanthaswamy S, Parson W, et al. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. Int J Legal Med. 2005;119(5):295-302.
10. Jalili S, Shirzad H. Comparison of different DNA extraction and preparation methods for forensic application of Blood Samples. J Police Med. 2018;7(4):167-172. [Persian]
11. Mohammed-Geba K. Direct PCR as a rapid and simple forensic technique for detection of DNA profiles from human hair samples. J Bioscience Applied Res. 2017;3(1):90-6.
12. Morf NV, Wood KL, Köppel R, Felderer N, Daniels M, Tenger B, et al. A multiplex PCR method to identify bushmeat species in wildlife forensics. Forensic Science International: Gen Suppl Serie. 2013;4(1):e202-3.
13. Keller M, Naue J, Zengerle R, von Stetten F, Schmidt U. Automated forensic animal family identification by nested PCR and melt curve analysis on an off-the-shelf thermocycler augmented with a centrifugal microfluidic disk segment. PloS one. 2015;10(7):e0131845.
14. Ewart KM, Frankham GJ, McEwing R, Hogg CJ, Wade C, Lo N, et al. A rapid multiplex PCR assay for presumptive species identification of rhinoceros horns and its implementation in Vietnam. PloS one. 2018;13(6):e0198565.
15. Meganathan PR, Dubey B, Jogayya KN, Haque I. Validation of a multiplex PCR assay for the forensic identification of Indian crocodiles. J forensic sci. 2011;56(5):1241-4.