



RRPG89070066 (.P)

法務部法醫研究所
八十九年度委託專題研究計畫期末報告書

計畫編號：IFM89-B010

計畫名稱	中文 HLA SSP 分型技術在臺不同族群刑事鑑識運用之研究
	英文 Study on HLA SSP techniques in forensic use for populations living in Taiwan

執行機關： 法務部調查局

計畫主持人： 蒲長恩

E-MAIL 信箱 pu4431@ms14.hinet.net

連絡電話： 02-29112241-3741

傳真號碼 02-29138599

執行期限： 88.7.1—89.12.31

計畫名稱：HLA SSP 分型技術在臺不同族群刑事鑑識運用之研究

目 錄	頁 碼
一、目錄	(2)
二、計畫中文摘要	(3)
三、計畫英文摘要	(4)
四、計畫緣由、目的	(5)
五、研究方法	(6)
六、研究結果與討論	(6)
七、計畫成果自評	(8)
八、參考文獻	(9)
九、附圖表	(11)
十、其他(請註明)	()

共 頁

HLA SSP 分型技術在臺不同族群刑事鑑識運用之研究

摘要

蒲長恩、鄭秀銘、陳孟宜、張琪媛

法務部調查局第六處法醫檢驗科

人類白血球抗原係第六對染色體上基因控制，係迄今所知最為複雜的一個遺傳多型性(polymorphism)系統，至今已被檢出A、B、C、DP、DQ及DR等幾個遺傳基因座。Human MHC-HLA的多型性於人體免疫反應、器官移植及自體免疫疾病均有極大相關性，在人類族群遺傳研究上經常採用HLA的頻率分佈數據予以分析，而在刑事科學領域，由於HLA系統之高多型性，正可運用於人別鑑識及親子血緣關係之鑑定。

本研究採用之DNA HLA DQB、DNA HLA DRB之SSP(sequence specific primers)分型法為美國生物合成公司(BioSyntheses Incorporated)開發之套件，DQ之SSP分型系統具有32個等位基因，DR之SSP分型系統具有40個等位基因，為多型性極高之系統。分析所需時間，僅約需四小時，較傳統方法節省甚多時間，且操作簡易，不需使用DNA定序儀，型別區分明確，為HLA分析之一大革新。

以臺灣地區無血緣關係男女檢體之400個等位基因，分析DNA HLA DRB1頻率分佈，共發現19個等位基因型，其中以0401型佔0.2000為最多，次為0901型佔0.1600；鑑定分析206個DNA HLA DQB1等位基因，亦發現19個等位基因型，其頻率分佈以0301型佔0.2685為最多，次為03032型佔0.1620。經計算常用法醫檢驗用數據，DNA HLA DRB1異合子度觀察值：0.820，人別區別力DP：0.976，親子血緣關係平均排除率MEP：0.762；DNA HLA DQB1相關數據為異合子度觀察值：0.528，人別區別力：0.968，親子血緣關係平均排除率MEP：0.717。另計算臺灣地區泰國人DRB1及DQB1兩系統之法醫檢驗相關數據，DRB1之DP為0.9652，MEP為0.6987；DQB1之DP為0.9697，MEP為0.7278，各項數據均高，亦適用於法醫檢驗。

經採取足量之隨機人口血液檢體，分析基因頻率分佈及最低DNA模版量，認為DRB1及DQB1系統能運用於法醫檢驗，作為補強系統，另採泰國人(在台泰勞)檢體測試，其基因頻率分佈與臺灣人並不同，認為必需建立不同族群基因頻率資料庫供法醫檢驗所需，方能計算正確之父權機率及重複率。

關鍵字：刑事鑑識、人類白血球抗原、多型性。

Study on HLA SSP techniques in forensic use for populations living in Taiwan

Chang-En Pu, Shui-Ming Cheng, Meng-Yi Chen, Chi-Yuan Chang

Scientific and Technical Research Center, Ministry Justice Investigation Bureau

HLA (human leukocyte antigen) is controlled by chromosome 6, it is by far the most polymorphic system, and the major loci A, B, C, DP, DQ and DR have been identified. Polymorphisms in Human MHC-HLA are strongly related to autoimmune system of body and marrow transplantation, and it has also contributed a lot in population genetics, owing to the high polymorphism of HLA, it would be suitable for forensic uses.

In this study, we used the DNA DQ,DR SSP commercial kit for frequency distribution study. It takes only 4 hours to extract DNA, process PCR reaction and run the agarose electrophoresis, the time consumed is much less than that needed for serological test of HLA.

There were 19 alleles found for HLA DRB1 system in a population of 200 and the frequencies distribution were 0401: 0.2000, 0901: 0.1600, 1501: 0.1250, 1106: 0.1000 etc; there were also 19 alleles found for HLA DQB1 system in a population of 108 individuals and the frequencies distribution were 0301: 0.2685, 03032: 0.1620, 0502: 0.1343 etc. Allele frequencies showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Comparing the forensic parameters among DNA HLA DRB1 system, DNA HLA DQB1 system and DNA STR Profiler system, DRB1 and DQB1 have the highest and next highest DP (discrimination power) and MEP (mean exclusion probability) value in these 11 systems totally. The MEP were 0.762 for HLA DRB1 system, 0.717 for HLA DQB1 system, the DP were 0.976 for HLA DRB1 system, 0.968 for HLA DQB1 system. The 2 systems studied provide a high power of DP and MEP for use in forensic testing. A population of Thais of 100 individuals was also tested to get SSP typings, the DP and MEP of DRB1 system are 0.9652 and 0.6987, and the DP and MEP of DQB1 system are 0.9697 and 0.7278, both of them are high enough for forensic testing.

RXC contingency table test was used to compare the distribution of frequencies of DRB1 and DQB1, the probability was far below 0.1%, it means that we should use population data from race related population instead of other race unrelated population to count forensic data.

Key Words: HLA, Polymorphism, Forensic Science, population genetics

計畫緣由、目的：

自1987年DNA鑑定技術RFLP(DNA片段長度多態性指紋法)等被運用於刑事鑑識以來，鑑識學家們即不斷開發新的DNA鑑定方法及系統，以大幅提升人別鑑定之確認率。

Human MHC-HLA的多型性之研究原為醫學上關於人體免疫反應、器官移植及自體免疫疾病之領域，但於傳統白血球抗原抗體法時代即能運用於親子血緣關係之鑑定，不過由於受鑑檢體需含大量而完整之白血球，因此刑事鑑識上常見之檢體如血跡、精液斑等均無法運用，自1985年PCR技術發展之後，刑事鑑識技術有了極大幅度之進展，於1989年起多位學者(1-4)更利用此PCR技術發展出SSP之鑑定法，使得HLA之鑑定再次進入刑事科學之領域。

本研究擬採用 DNA HLA DQ、DNA HLA DR之SSP分型法之套件，DQ之SSP分型系統具有二十三個等位基因，基因型有二百七十六型，DR之SSP分型系統具有三十五個等位基因，基因型有六百三十型(5)，具有高度之多型性，極具人別鑑定之價值。

由於本法係等位基因特異性，瑞典學者Allen等人於1995年將之運用於混合二人以上 DNA 之檢體或微量之檢體均有很高之檢出成功率(6)，1997年日本學者Ota以此法施用於微量血跡等刑事相關證物亦能檢出(7)，加以DQ、DR段之DNA經PCR放大後所得之DNA片段僅為95個鹼基對至255個鹼基對之間，對於性犯罪及暴力犯罪現場所遺留之血跡、精斑上降解之DNA亦能分析，於刑事科學之運用極具開發之價值。

關於HLA DQ、DR系統族群遺傳之研究，於歐美地區(8,9,10,11)及亞洲地區之中國大陸(12)、香港(13)、巴基斯坦(14)及日本等地均有進展，惟臺灣地區對於HLA之研究係以疾病相關者為主(15,16,17,18,19)，對於族群遺傳研究僅有少數學者開始進行(20,21)，為求本法於刑事科學之運用，著手臺灣地區HLA DQ、DR系統族群遺傳及法醫檢驗相關事項之研究。

研究方法：

蒐集不存在親緣關係之臺灣地區住民、在臺菲勞及在臺泰勞血液檢體共約數百份，以本項HLA DRB1及DQB1套件分析其基因型，並以族群遺傳相關軟體，分析此三族群之基因頻率分佈情形並計算刑事鑑識相關之數據如DP(discriminating probability)、MEP (mean exclusion probability) 及h(heterozygosity)等。

蒐集存在親緣關係之家庭成員血液，分析本套件遺傳情形。

製做血跡斑，模擬犯罪現場遺留之證物，供本法測試。

等倍序列稀釋受測DNA，以瞭解本法之敏感度。

研究結果與討論：

1. 臺灣地區無血緣關係男女 200 人檢體(400 個等位基因)，經以本法測試，能獲得 HLA DRB1 型別(其中四人之型別參圖一)，經彙整分析其基因型頻率分佈詳如表一，其中以 0401 型佔 0.2000 為最多，次為 0901 型佔 0.1600，再次為 1501 型佔 0.125，其餘均為 10%以下。共發現等位基因十九型。
2. 臺灣地區無血緣關係男女 103 人檢體(206 個等位基因)，經以本法測試，能獲得 HLA DQB1 型別(其中四人之型別參圖二)，經彙整分析其基因型頻率分佈詳如表二，其中以 0301 型佔 0.2685 為最多，次為 03032 型佔 0.1620，0502 佔 0.1343，0302 佔 0.1111，餘均為 10%以下，共發現等位基因二十型。
3. 以上述 DNA HLA DRB1 頻率分佈數據進行統計與分析，計算出常用法醫檢驗用數據如下：人別區別力〈discrimination power 《DP》〉：0.976。親子血緣關係平均排除率〈mean exclusion probability 《MEP》〉：0.762；DNA HLA DQB1 相關數據為人別區別力為 0.968。親子血緣關係平均排除率為 0.717。
4. DNA STR 九個系統綜合累計之 DP、MEP 值均可達 0.999，而 HLA DRB1 及 DQB1 累計 DP 亦達 0.999、MEP 達 0.933，故僅使用 HLA 二

種系統即可獲得九種 STR 系統(Profiler Kit, ABI, Foster City, USA)之效果(惟 STR 分型均以自動化儀器同時分析多型,為其長處,不若 HLA SSP 之操作目前僅能以人工為之,較難自動化)。經實際運用於親子鑑定案例約一百餘案,HLA DRB1 及 HLA DQB1 系統均符合遺傳法則,能實際運用於案件,迄至目前未發現突變情形。

5. 法醫檢驗之檢體一般而言 DNA 含量均不高,為求得所需 DNA 之最少量,遞減 DNA 模版量(每個作用孔添加量)為 60ng、30ng、15ng、5ng、1ng、0.5ng 及 0.25ng,經 PCR 反應,其 PCR 產物以電泳分析之強度變化情形詳如附圖三,可見每個作用孔添加 5ng 以上之 DNA 即能獲得令人滿意之電泳結果,反之每個作用孔添加 2ng 以下不足之 DNA,則很可能發生等位基因"遺失之情形"(allele drop-out),如刑事證物分析結果類此,判讀時必需十分謹慎。
6. 為測試本法是否能運用於法醫檢驗之乾燥證物,經以乾燥血跡(約 10ul)、唾液濾紙(約 0.5cm 見方)施以 Chelex DNA 抽提法,均能分析出型別,惟對照電泳條帶較不明顯為其缺點。
7. 為比較臺灣地區不同族群 DQB1 基因頻率之異同,蒐集在台泰國人檢體一百份,經試驗得到基因頻率分佈情形詳如表三及表四,發現泰國人 DRB1 基因之等位基因共有二十一型(不計次分型),其中以 1501 型佔 0.301 為最多,次為 1201 型佔 0.153,再次為 0401 型佔 0.087,其餘均為 8.2%以下;DQB1 基因之等位基因則共有十七型,其中以 0502 型佔 0.250 為最多,次為 0501 型佔 0.175,再次為 0301 型佔 0.135,其餘均為 9.5%以下。
8. 經以 RC 列聯表比較法比較臺灣地區臺灣人與臺灣地區泰國人 DRB1 及 DQB1 頻率分佈情形,其顯著機率均低於 0.1%,表示其頻率分佈確有不同,故運用此項系統於國人或泰國人時,必須引用同一族群之基因頻率數據,方能計算正確之重複率及父權機率。
9. 另計算臺灣地區泰國人 DRB1 及 DQB1 兩系統之法醫檢驗相關數據,DRB1 之 DP 為 0.9652,MEP 為 0.6987;DQB1 之 DP 為 0.9697,MEP 為 0.7278,各項數據均高,適用於法醫檢驗。
10. 本研究經採取足量之隨機人口血液檢體,經試驗分析基因頻率分佈及最低 DNA 模版量,認為 DRB1 及 DQB1 系統能運用法醫檢驗,作為補強系統,另採泰國人(泰勞)檢體測試,其頻率分佈與臺灣人並不同,認為必需建立不同族群基因頻率庫供法醫檢驗所需。

計畫成果自評：本項 HLA DQB1 及 DRB1 鑑定法能運用於法醫檢驗案件，可視為選擇性之補強項目，並能適用於在臺菲律賓人或泰國人，本研究計畫所獲研究結果符合現階段法醫檢驗之需要。

預期執行進度

100

%

實際執行進度

100

%

參考文獻：

1. Wu D.Y., et. Al.: Allele-specific enzymatic amplification of B-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc. Natl. Acad Sci.* 86:2757-60, 1989.
2. Olerup, O., et. Al.: HLA-DRB*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: A sensitive, specific and rapid techniques. *Tissue Antigens* 37:197-204, 1991.
3. Olerup, O., et. Al.: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39:225-35, 1991.
4. Bunce, M., et. Al.: Rapid HLA-DRB typing by eight polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP). *Human Immunology* 37:201-206, 1993.
5. HLA Typing Protocol for the FASTYPE System, BIO.SYNTHESES incorporated, 1996.
6. M. Allen, Saldeen T. and Gyllensten U.: Allele-Specific HLA-DRB1 Amplification of Forensic Evidence Samples with Mixed Genotypes. *BioTechniques*, Vol 19 , No. 3:454-459, 1995.
7. Ota M., Katsuyama Y., Liu C.Y., Arakura A. and Fukushima H.: Validation of HLA-DR locus typing in forensic specimens by combining PCR-SSP with PCR-RFLP., *J Forensic Sci*, 42(5):9299-34, 1997.
8. Constantinidou N., et. Al.: Polymorphism and distribution of HLA-DR2 alleles and haplotypes in a Greek population. *Tissue Antigens* 52(2):153-7, 1998.
9. Darke C., et. Al.: HLA class I(A,B) and II(DR,DQ) gene and haplotypes frequencies in blood donors from Wales. *Exp Clin Immunogenet*, 15(2):69-83, 1998.
10. CechovE., et. al.: HLA-DRB1, and -DPB1 polymorphism in the Slovak population. *Tissue Antigens*, 51(5):574-6, 1998.
11. Allen M., Saldeen T., Pettersson U., Gyllensten U.: Genetic typing of HLA class II genes in Swedish populations: application to forensic analysis., *J Forensic Sci*, 38(3):554-70, 1993.
12. Feng M.L., et. al.: [HLA-Cw genotyping of serologically and non-serologically defined alleles using sequence-specific primers(PCR-SSP) in a Shanghai Han population]., *Ichuan Hsueh Pao*, 25(2):95-102. Chinese, 1998.
13. Chang Y.W., et. Al.: HLA class I and class II frequencies of a Hong Kong Chinese population based bone marrow donor registry data., *Hum Immunol.*, 56(1-2):125-35, 1997.
14. Hameed K., et al: The association of HLA-DRB genes and the shared epitope with rheumatoid arthritis in Pakistan., *Br J Rheumatol*, 36(11):1184-8, 1997.
15. Huang F.Y., et al.: DQA1*Arg52, DQB1*nonAsp57, and DRB1*04 genotypes in Chines children with insulin-dependent diabets mellitus., *Exp Clin Immunogenet*. 15(1):33-45, 1998.
16. Chuang L.M., et al: HLA DRB1/DQA1/DQB1 haplotype determines thyroid autoimmunity in patients with insulin-dependent diabets mellitus., *Clin Endocrinol (oxf)*, 45(5):631-6, 1996.

17. Huang H.S. et al: HLA-encoded susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus is determined by DR and DQ genes as well as their linkage disequilibria in a Chinese population., *Hum Immunol.*, 44(4):210-9, 1995.
18. Chuang L.M. et al: Transcomplementation of HLA DQA1-DQB1 in DR3/DR4 and DR3/DR9 heterozygotes and IDDM in Taiwanese families., *Diabetes Care.*, 18(11):1483-6, 1995.
19. Yen J.H. et al: HLA-DRB1 genotyping in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan., *J Rheumatol.*, 22(8):1450-4, 1995.
20. Shaw C.K. et al: HLA polymorphism and probability of finding HLA-matched unrelated marrow donors for Chinese in Taiwan., *Tissue Antigens.*, 50(6):610-9, 1997.
21. Shen S.W., Hu C.Y., Lin C.Y., Hsieh R.P., Human leukocyte antigen polymorphisms in the Taiwanese population, *J Formos Med Assoc* (1999) 98(1):11-8.

格式廿九 (篇幅不足, 請自行複製使用)

第 頁

主持人簽章:

日期: 89年 12月 1日

表一、臺灣地區居民之 DNA HLA DRB1 等位基因型頻率分佈表(n=400)

等位基因 \ 基因座	HLA DR B1
0101	0.0025
0301	0.0725
0401	0.2000
0701	0.0175
0801	0.0850
0805	0.0025
0807	0.0025
0809	0.0075
0816	0.0025
0901	0.1600
1001	0.0100
1105	0.0025
1106	0.1000
1117	0.0025
1201	0.0825
1301	0.0350
1401	0.0350
1501	0.1250
1601	0.0550

表二、臺灣地區居民之 DNA HLA DQB1 等位基因型頻率分佈表(n=206)

等位基因 \ 基因座	HLA DR B1
0201	0.0556
0202	0.0139
0301	0.2685
0302	0.1111
0303	0.0231
03032	0.1620
0401	0.0324
0402	0.0139
0501	0.0324
0502	0.1343
0503	0.0093
05031	0.0324
0601	0.0185
06011	0.0093
0602	0.0463
0603	0.0093
0604	0.0046
0609	0.0139
0610	0.0093

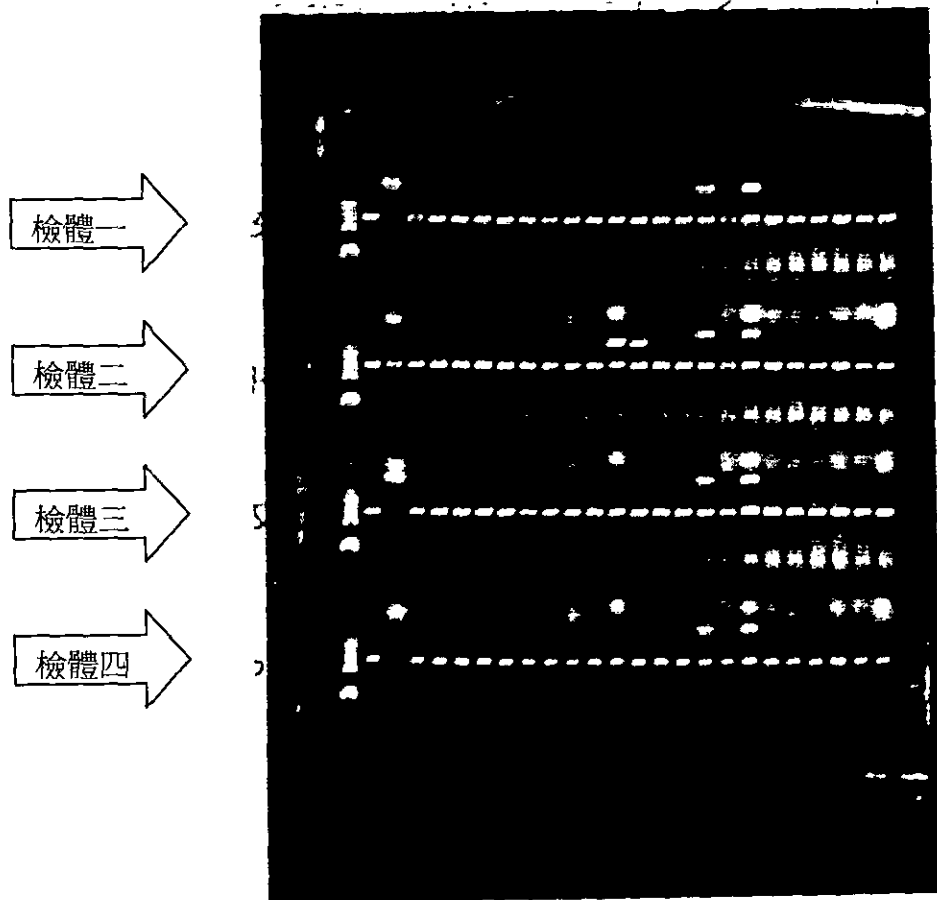
表三、臺灣地區泰國人 DNA HLA DRB1 等位基因型頻率分佈表(n=99)

等位基因 \ 基因座	HLA DR B1
01011	0.005
0301	0.015
03011	0.020
0401	0.087
0422	0.010
0701	0.061
0801	0.005
09011	0.082
09012	0.031
1001	0.010
1101	0.015
11011	0.026
1201	0.153
1204	0.005
1301	0.015
1309	0.010
1401	0.036
1405	0.005
1408	0.026
1501	0.082
15011	0.219
1601	0.066
30101	0.005
401011	0.005
50101	0.005

表四、臺灣地區態國人 DNA HLA DQB1 等位基因型頻率分佈表(n=100)

等位基因 \ 基因座	HLA DR B1
0201	0.020
0202	0.065
0301	0.135
0302	0.030
0303	0.060
03032	0.095
0401	0.025
0402	0.015
0501	0.175
0502	0.250
0503	0.015
05031	0.035
0601	0.020
06011	0.030
0602	0.010
0603	0.010
0606	0.010

圖一、HLA DRB1 電泳分析圖



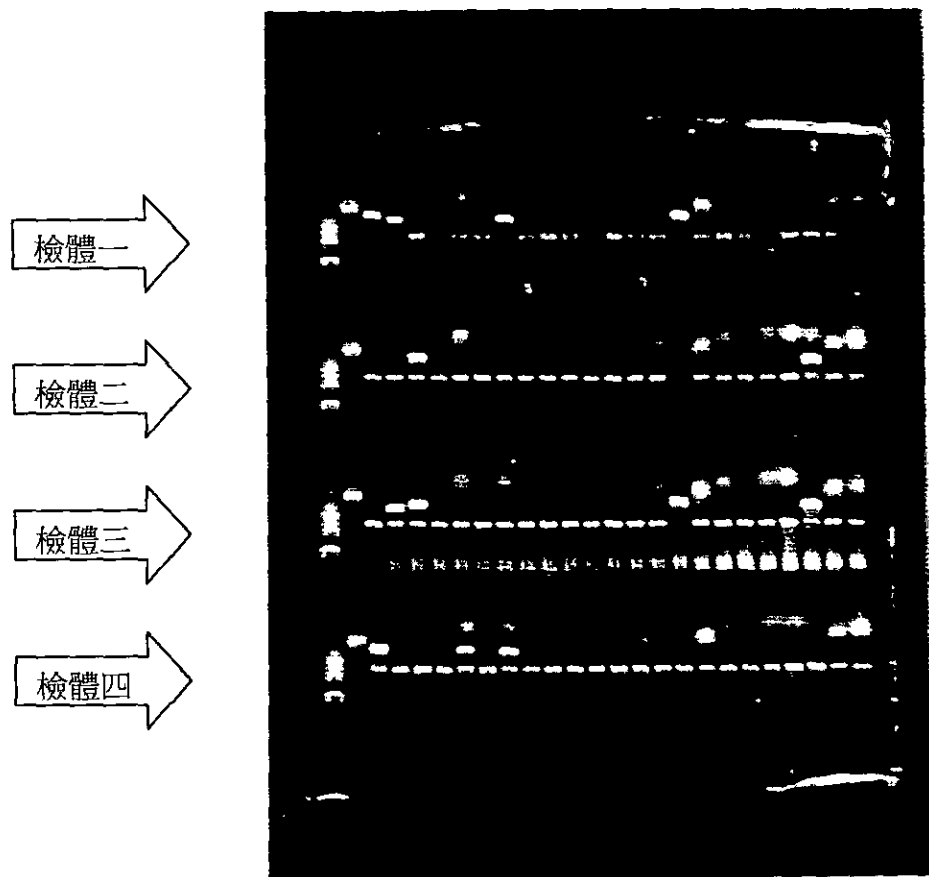
檢體一：1201/0701

檢體二：1501/1501

檢體三：1501/1204

檢體四：0701/09012

圖二、HLA DQB1 電泳分析圖



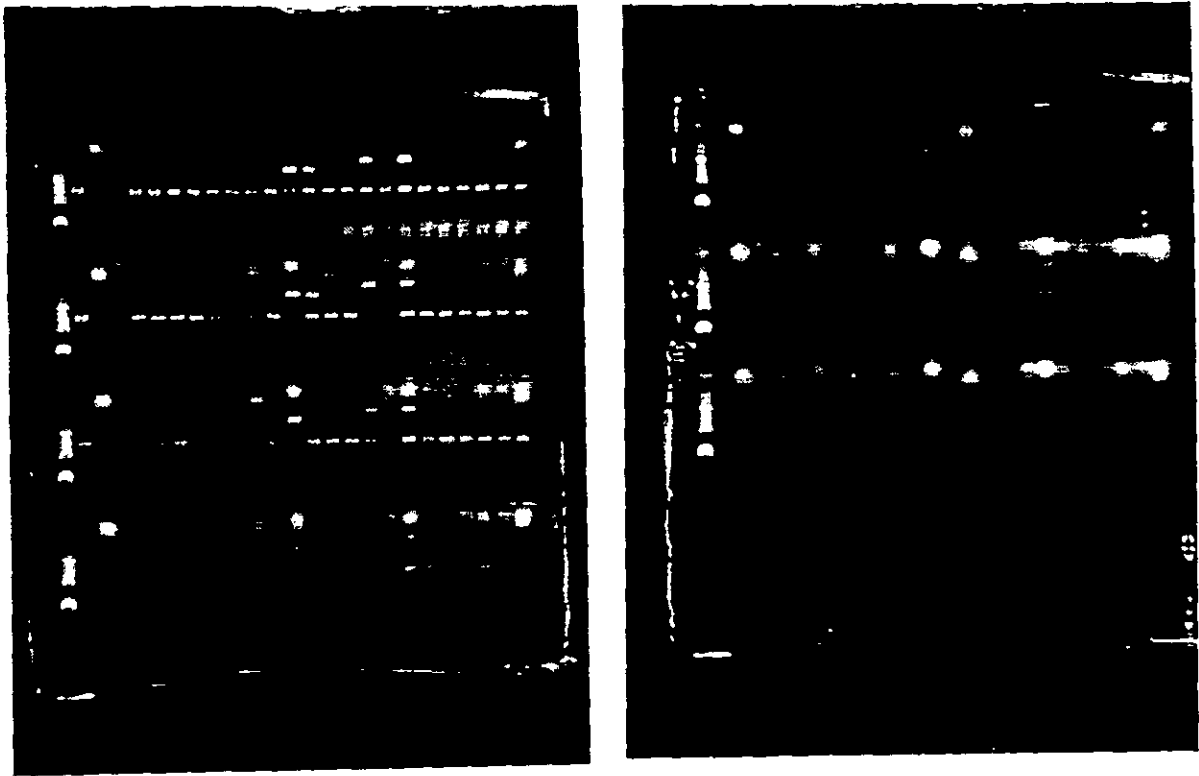
檢體一：0502/0303

檢體二：0606/0303

檢體三：0502/0303

檢體四：0303/0303

圖三、HLA DQB1 系統施用於不同濃度 DNA 模版電泳條帶亮度變化圖



遞減 DNA 模版量(每個作用孔添加量)為 60ng、30ng、15ng、5ng、1ng、0.5ng 及 0.25ng(左上至右下)，經 PCR 反應，其 PCR 產物電泳條帶強度遞減情形。

法務部法醫研究所專題研究計畫期末報告審查表

計畫名稱	HLA SSP 分型技術在臺不同族群刑事鑑識運用之研究	計畫編號	IFM89-B010
執行機關	法務部調查局	計畫主持人	蒲長恩
<p>審查意見：</p> <p>一、報告之內容組織、條理及資料分析（25%）</p> <p>極優 優 可 尚可 差 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>其他：</p> <p>二、所遇之困難及解決之辦法適當否（25%）</p> <p>是 否 其他： <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>三、研究結果之分析（25%）</p> <p>極優 優 可 尚可 差 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>其他：</p> <p>四、執行進度可否達成研究目的（25%）</p> <p>可 否 其他： <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">總分_____</p> <p style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/>極優 <input type="checkbox"/>優 <input type="checkbox"/>可 <input type="checkbox"/>尚可 <input type="checkbox"/>差 分數 100-90 80-89 70-79 60-69 60 以下 </p> <p>五、建議與評語</p>			
審查人簽章		日期	