



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم
الحياة

دراسة في واسمات مكررات المترادفة القصيرة الجسمية STR في محافظة كربلاء

رسالة

مقدمة إلى مجلس عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان

من قبل

حسين ماجد محمود العبيدي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم / 2007

بإشراف

أ.د. ياسمين خضير الغانمي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ ^ص قُلِ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ
رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

الآية (٨٥) سورة الأسراء

إقرار المشرف على الرسالة

أشهد أن هذه الرسالة بعنوان (دراسة في واسمات مكررات المترادفة القصيرة الجسمية STR في محافظة كربلاء) تم إعدادها تحت إشرافي من قبل (حسين ماجد محمود مشكور) في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان وهذا العمل لم ينشر في أي مكان.

التوقيع:

الاسم: د. ياسمين خضير خلف

المرتبة العلمية: أستاذ

الكلية والجامعة: قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2021

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة الى التوصيات المقدمة أعلاه من الأستاذ المشرف، أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: نصير ميرزا حمزة

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

الكلية والجامعة: رئيس قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2021

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة (دراسة في واسمات مكررات المترادفة القصيرة الجسمية STR في محافظة كربلاء) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم: نعمان جرو علي

المرتبة العلمية: مدرس مساعد

الكلية والجامعة: كلية التربية للعلوم الانسانية / جامعة كربلاء

التاريخ: 2021 / 1 /

إقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه نشهد بأننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة (دراسة في واسمات مكررات المترادفة القصيرة الجسمية STR في محافظة كربلاء) المقدمة من قبل الطالب (حسين ماجد محمود مشكور) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير / علم الحيوان / علم الوراثة، وبعد اجراء المناقشة العلنية وجد انه مستوفي لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير (امتياز)

رئيس لجنة المناقشة	عضو اللجنة
التوقيع	التوقيع
الاسم: أ.د. خالد حمدان غثوان	الاسم: أ.د. الاء شاكر حنتوش
المرتبة العلمية: أستاذ	المرتبة العلمية: أستاذ
مكان العمل: جامعة بغداد - كلية طب الاسنان	مكان العمل: جامعة الكوفة - كلية العلوم
التاريخ / 1 / 2021	التاريخ / 1 / 2021

عضو اللجنة	عضو ومشرفا
التوقيع	التوقيع
الاسم: م.د. زينب نزار جواد	الاسم: أ.د. ياسمين خضير خلف
المرتبة العلمية: مدرس	المرتبة العلمية: أستاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة	مكان العمل: جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ / 1 / 2021	التاريخ / 1 / 2021

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

اصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع

الاسم: أ.د. حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ / 1 / 2021

الإهداء

إلى طيب القلب والدي العزيز . . .

إلى نبع الحنان والدي العزيزة . . .

إلى مرفيقة دمربي نزوجتي الغالية . . .

إلى نور عيني وفرحتي بالحياة أولادي . . . (يوسف ، زهراء ، فاطمة)

إلى إخواني وأخواتي الأعزاء . . .

إلى كل من علمني حرفاً وملكني عبداً اساتذتي الأفاضل . . .

إلى كل أصدقائي وأحبيتي . . .

إلى جميع اخوتي بالسلح والدم ضباط القوى الامنية بمختلف الوزارات والاصناف . . .

إلى كل من يسعده نجاحي . . .

اهدي ثمرة جهدي المتواضع

الباحث

شكر وتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم والصلاة والسلام على سيد المرسلين (محمد) وعلى أهل بيته الطيبين الطاهرين ومن تبعهم إلى يوم الدين ...

الشكر لله دائماً وأبداً على توفيقه بأكمال هذه الرسالة العلمية ... فلا يسعني وأنا أكمل كتابة رسالتي إلا إن أتقدم بجزيل الشكر والامتنان إلى الأستاذة الفاضلة الدكتورة (أ.د. ياسمين خضير خلف) لاقتراحها موضوع الرسالة ولتوجيهاتها السديدة طيلة مدة البحث والكتابة، كما يطيب لي تقديم جزيل الشكر والامتنان إلى جميع أساتذتي في جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة وفي مقدمتهم رئيس الجامعة وعميد الكلية وأعضاء الهيئة التدريسية المحترمين ، كما لا يفوتني الشكر والتقدير إلى خبراء مديرية تحقيق الأدلة الجنائية الرائد احمد توفيق والنقيب باسم عباس طالب والنقيب وسام ابراهيم عباس وجميع ضباط ومنتسبي قسم الحامض النووي في مديرية تحقيق الأدلة الجنائية لوقوفهم معي طيلة عملي في المختبر ، والشكر موصول ايضاً إلى جميع الكادر الطبي في مستشفى الكندي التعليمي ومستشفى الشهيد غازي وعلى رأسهم الدكتور مثنى إسماعيل صدام والدكتور علي احسان والدكتور ماجد اسود والدكتور غيث. والشكر الجزيل إلى كل شخص تبرع بالعينات من أجل انجاح دراستي وجميع من فانتني ذكر اسمه الطيب ...

الباحث

الخلاصة

الخلاصة

تحليل التكرار المترادف القصير يعتبر حاليا الطريقة الأمثل استخداما في الطب العدلي، يستخدم في اثبات المشتبه به بمسرح الجريمة، وحل المشاكل المتعلقة بالعلاقات البيولوجية، ايضا في ضحايا الكوارث.

حيث تظهر بعض المناطق غير المشفرة من الحامض النووي اختلافات كبيرة في تسلسل الزوج الأساسي بين الأفراد. تم استخلاص الحامض النووي من عينات العظام و الدم ، وقد تم تقدير وتقييم الحامض النووي باستخدام التفسير الإحصائي مثل نسبة الاحتمال ومؤشر الأبوة والأمومة لتقييم الأدلة البيولوجية.

شملت الدراسة (82) عينة منها عينات عظم عدد (50) و (16) عينة دم للاباء و (16) عينة دم للامهات لغرض المطابقة، وقد وزعت على شكل 16 حالة واجريت عليها التحاليل والاختبارات في استخلاص وتقدير كمية وتضخيم الحامض النووي وتحليل بيانات التكرار المترادف القصير لـ 24 موقع والتي تشمل , Amilogen,D3S1358, D1S1656, D10S1248, D13S317, Penta E , TH01, vWA, D21S11, D7S820, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D مديره DYS391, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA ,D22S1045,D5S818, TPOX تحقيق الادله الجنائية التابعه لوزارة الداخليه العراقيه حيث كانت مدة الدراسه (7) اشهر من شهر تشرين الثاني لغاية شهر أيار.

عن طريق التحليلات الاحصائية في برنامج 3 GenoProof التي اجريناها على السمات الوراثية للحامض النووي للابن ، الاب و الام لـ 24 موقع للتكرار المترادف القصير و خمس مواقع للتكرار المترادف القصير، نلاحظ ان في الحالة الاولى تم الحصول على تطابق تام لعينات الابن مع عينات الاب والام والتي اعطت نتائج اكثر من (99.9%) والتي هي مقبولة بالنسبة للمختبر الجنائي وتوصيات الجمعية الدولية لعلم الوراثة الجنائي. وفي الحالة الثانية لـ 5 مواقع للتكرار المترادف القصير كانت القيم التي تم الحصول عليها اقل من قيمة التوصية (99.9%) والتي هي مقبولة بالنسبة للمختبر الجنائي وتوصيات الجمعية الدولية لعلم الوراثة الجنائي ، عليه تم استخدام الطريقة الثانية عن طريق حساب مؤشر الابوة المشترك لـ 16 حالة لـ مواقع كانت النتائج كالآتي (99.99473712% , 99.99990909% , 99.99846156% , 99.99750006% , 99.92313605% ,

,99.99956522% ,99.99545475% ,99.99841272% ,99.99545475%
,99.99998925% ,99.9996% ,99.99947369% ,99.99947369% ,99.97298028%
,99.99967742% ,99.99827589%) كانت جميع النتائج التي تم استخدام طريقة مؤشر الابوة
اعلاه مقبولة بالنسبة للمختبر الجنائي وتوصيات الجمعية الدولية لعلم الوراثة الجنائي.

قائمة المحتويات

الصفحة	العناوين	فهرس
I	ملخص	
III	قائمة المحتويات	
V	قائمة الأشكال	
VI	قائمة جداول	
IX	قائمة الاختصارات	
الفصل الأول: المقدمة		
1	المقدمة	1
2	هدف الدراسة	
الفصل الثاني: استعراض المراجع		
3	الطب الشرعي	1-2
3	تاريخ الطب الشرعي	1-1-2
4	المبادئ الأساسية للطب الشرعي	2-1-2
5	الطب الشرعي وتحديد هوية الأشخاص	3-1-2
6	المنطقة المستهدفة لتطبيقات الطب الشرعي	4-1-2
6	العظام	2-2
8	اشكال العظام	1-2-2
9	خلايا العظم	2-2-2
10	الحامض النووي	3-2
11	تاريخ وتطور الحامض النووي الشرعي	1-3-2
12	الحامض النووي في العظم	2-3-2

13	بصمة الحامض النووي	3-3-2
13	تعدد أشكال الحامض النووي	4-3-2
14	تحلل الحامض النووي	5-3-2
15	الحامض النووي كأداة لتحديد الهوية	6-3-2
16	التكرار الترادفي	4-2
16	تكرار الرقم المتغير المتكرر (VNTRs)	1-4-2
17	التكرار المترادف القصير (STR)	2-4-2
18	استخدامات التكرار المترادف القصير (STR) في الطب الشرعي	3-4-2
20	تسمية علامات الحامض النووي (STR)	4-4-2
الفصل الثالث: مواد وطرائق عمل		
24	المواد	1-3
24	الأجهزة والمعدات المختبرية	1-1-3
25	المواد الكيميائية والمحاليل	2-1-3
27	طرائق العمل	2-3
27	موقع اجراء الدراسة	1-2-3
27	جمع العينات	2-2-3
27	تحضير العينة	3-2-3
29	أستخلاص الحامض النووي	4-2-3
30	تقدير كمية الحامض النووي	5-2-3
33	تضخيم الحامض النووي	6-2-3
33	تضخيم عينات العظم	1-6-2-3
34	تضخيم عينات الدم	2-6-2-3
35	الترحيل الكهربائي	7-2-3

35	تحليل البيانات	8-2-3
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		
36	جمع العينات	1-4
37	أستخلاص الحامض النووي	2-4
37	تقدير كمية الحامض النووي	3-4
41	تضخيم الحامض النووي	4-4
42	اظهار السمات الوراثية	5-4
47	حساب مؤشر الابوة	6-4
الاستنتاجات والتوصيات		
71	الاستنتاجات	I
72	التوصيات	II
73	المصادر	
84	الملخص انكليزي	

قائمة الأشكال

الصفحة	العناوين	رقم الشكل
الفصل الثاني: استعراض المراجع		
4	نظرة عامة تخطيطية للعظم يظهر فيه تركيب العظم الداخلي	1-2

الفصل الثالث: مواد وطرائق عمل

26	ألوان الفلورسنت الأربعة ألوان لـ 24 موقع STR	1-3
30	جهاز EZ1 Advanced XL (1) الصف الأول A1 : انبوب فارغ حجم 2 مل. (2) الصف الثاني A2 : يوضع فيه اللانجر الذي يحتوي على المرشح. (3) الصف الثالث : انبوبة العينة. (4) يوضع فيه كارتريدج (cartridge).	2-3
32	البيانات التي تم ادخالها في برنامج HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2	3-3
34	الدورات الحرارية لعدة PowerPlex® Fusion System	4-3
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		
39	رسم بياني تركيز المادة الوراثية للعينات	1-4
40	المنحنى القياسي لتقدير كمية الحامض النووي بواسطة جهاز تفاعل السلسلة المتبلمر في الوقت الحقيقي 7500	2-4
43	ملف STR للعينة S42. يظهر فيها السمات الوراثية لـ 24 موقع.	3-4
44	ملف STR للعينة S28. يظهر فيها السمات الوراثية لـ 23 موقع.	4-4
48	ملف STR للعينة S2 للابن. يظهر فيها كل السمات الوراثية لـ 24 موقع	5-4
49	ملف STR للعينة S2F للاب. يظهر فيها كل السمات الوراثية لـ 24 موقع	6-4
50	ملف STR للعينة S2M للام. يظهر فيها كل السمات الوراثية لـ 24 موقع	7-4

قائمة الجداول

رقم الشكل	العناوين	الصفحة
الفصل الثالث: مواد وطرائق عمل		
1-3	الاجهزة والمعدات المختبرية المستخدمة في إجراءات هذه الدراسة .	24
2-3	المواد الكيميائية والمحاليل التي استخدمت في إجراءات هذه الدراسة .	25
3-3	الكشف عن أربعة ألوان صبغة الفلورسنت لـ 24 موقع.	26
4-3	تراكيز التخفيفات القياسية لتقدير كمية الحامض النووي	31
5-3	مكونات عدة Quantifiler™ Trio لجهاز نظام تفاعل السلسلة المتبلمر في الوقت الحقيقي 7500	31
6-3	مزيج تضخيم PCR لتضخيم الحامض النووي المستخرج	33
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		
1-4	المعلومات التي تم اخذها من الاشخاص المرضى بعد الحصول على العينات منهم	36
2-4	نتائج تقدير كمية الحامض النووي ومقدار التخفيف لكل عينة ومؤشر التحكم الداخلي لتفاعل البلمرة المتسلسل (IPC).	38
3-4	السمات الوراثية التي تم الحصول عليها من 50 عينة عظم عن طريق تحليلها احصائيا بواسطة برنامج (GeneMarker Software (HID).	45
4-4	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S1 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	51
5-4	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S2 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	52

53	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S3 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	6-4
54	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S4 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	7-4
55	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S5 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	8-4
56	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S6 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	9-4
57	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S7 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	10-4
58	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S8 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	11-4
59	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S9 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	12-4
60	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S10 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	13-4
61	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S11 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	14-4
62	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S12 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	15-4
63	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S13 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	16-4
64	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S14 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	17-4
65	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S15 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	18-4

66	السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S16 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع	19-4
68	نتائج تحديد الابوة لخمس مواقع STR باستخدام طريقه حساب حساب مؤشر الابوة	20-4

قائمة الاختصارات

الاختصار	المعنى
ABI	Applied Biological Systems
BMU	Basic Metabolic Unit
CODIS	Common DNA Index System
CPI	Combined Paternity Index
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate
GRCh38	Genome Reference Consortium Human Build 38
HUM	Human
ISFG	International Society for Forensic Genetics
NIST	National Institute of Standards and Technology
PC	Promega Corporation
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Power Of Discrimination
PE	Power Of Exclusion

PI	Paternity Index
PIC	Polymorphism Information Content
POP4	Performance Optimizing Polymer
PTH	Parathyroid Hormone
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RFU	Relative Fluorescent Unit
SFG	Sum- Frequency Generation
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STRs	Short Tandem Repeats
VNTRs	Variable Number Of Tandem Repeats

الفصل الأول

المقدمة

الفصل الاول

المقدمة

علم الطب العدلي هو مجال يعمل على حل الدعاوي القانونية المختصة في القضايا الجنائية والمدنية (Jobling and Gill, 2004). يعد الطب العدلي مزيج من فروع العلوم المختلفة التي يمكن أن توفر معلومات إلى المحاكم القانونية التي يتم فرضها من قبل الجهات التحقيقية في نظام العدالة الجنائية في جميع أنحاء العالم.(Saferstein & Hall, 2020)

علم الطب العدلي هو مجال متعدد التخصصات، يساعد في إعادة بناء مسرح الجريمة على أساس جمع وتحليل وتفسير الأدلة العلمية. تعد كل جريمة فريدة بطريقتها الخاصة؛ وذلك لأن طبيعة الجريمة التي تم ارتكابها، ومكان مسرح الجريمة، والأشخاص المتورطين في ارتكاب الجريمة، والأدوات التي تم استخدامها، كلها تختلف من مسرح جريمة الى آخر (Houck and Siegel, 2010).

إن توفر عينات الحامض النووي مهم جدا لتحليل الحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين في دراسة الطب العدلي. تحليل الحامض النووي هي طريقة تستخدم فيها الاختلافات الجينية على مستوى الحامض النووي لتحديد هوية الفرد (Alaeddini, Walsh, & Abbas, 2010).

قد تكون عينات الحامض النووي الموجودة في مسرح الجريمة أو الكوارث الجماعية غير كافية من الناحية النوعية والكمية؛ لأنها احياناً قد تحتوي على كميات قليلة جداً من الحامض النووي او المتحللة بسبب التعرض لمدة طويلة للظروف البيئية المختلفة مثل درجات الحرارة ، الضوء، الرطوبة والكائنات الحية الدقيقة (Diegoli, Farr, Cromartie, Coble, & Bille, 2012). كما هو معروف في دراسة الطب العدلي عندما يتم تحليل الحامض النووي، من الممكن أن نواجه عينات الحامض النووي المتحللة والتي يتم الحصول عليها من مجموعة متنوعة من المصادر، لذلك من الافضل أن يتم جمعها بصورة سليمة، والتعامل معها بعناية خلال تحليل الحامض النووي لتقليل فرص التلوث الخارجي. (Zehner, 2007)

العظام هي أحد الأدلة المهمة التي توجد احياناً في مسرح الجريمة المتعلق بالكوارث الجماعية والإرهاب، المفقودين والاتجار بالبشر. (Ziętkiewicz *et al.*, 2012). حيث تستخدم العظام في بعض الاحيان في دراسات الطب العدلي ؛ لأن لديها القدرة على مقاومة الظروف القاسية والشديدة مثل: ارتفاع درجات الحرارة، الرطوبة والبكتريا، حيث تكون العظام المصدر الرئيس للعينات في تحديد هوية الأفراد والتحقيقات الجنائية في حالات الكوارث الجماعية وحالات الأشخاص المجهولين (Ziętkiewicz *et al.*, 2012) (İmamoğlu, Karapirli, & Akboyun, 2012).

تحليل الحامض النووي له تأثير كبير على المجتمع عن طريق تقديم أدلة موثوقة لإدانة المتهمين وتبرئة الأشخاص المشتبه فيهم الأبرياء. مجال اخر لتطبيق تحديد نمط الحامض النووي هو اختبارات الأبوة، والامومة باستخدام علامات الحامض النووي للكروموسومات الجسدية (autosomal)، الميتوكوندريا أو كروموسوم Y (Santos, 2013) (Kayser, 2017).

في كثير من الاحيان يشار الى الحامض النووي بأسم "المخطط الجيني للحياة" ويتم تشفير التركيب الجيني للفرد في الحامض النووي. هذا يعني أن الحامض النووي ينتقل من الآباء إلى نسلهم، والخصائص المظهرية التي يظهرها الفرد، مثل لون العين والشعر، هي نتيجة التركيب الجيني (Snustad and Simmons, 2015)

تعرف العلامات المستخدمة حالياً بأسم تكرارات الترادف القصيرة (STR)، وهي تعددية الأشكال الطولي. STR هي تسلسلات متكررة قصيرة موجودة في المناطق غير المشفرة من الحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين ، إما داخل الجينات أو بينها (Butler, 2005).

هدف البحث :

التحري عن دور واسمات المتكررات المترادفة القصيرة (STR) في التشخيص الجزيئي لمعرفة عائلية عينات العظام ونسبها الى الالباء والتي تساعد فيما بعد الدراسة في الكشف عن هوية الافراد في الكوارث او الجرائم.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

الفصل الثاني

استعراض المراجع

1-2 الطب الشرعي Forensic

علم الطب الشرعي هو مجال يحل القضايا القانونية في القانون الجنائي وكذلك في القضايا المدنية (Miloš and Gill, 2004). إن توفر عينات الحامض النووي امر مهم جدا لتحديد نمط الحامض النووي في دراسة الطب الشرعي. إن تحديد نمط الحامض النووي هو طريقة يتم فيها استخدام الاختلافات الجينية على مستوى الحامض النووي لتحديد هوية الفرد. كثيرا ما يواجه خبراء الادلة الجنائية عينات الحامض النووي المتحللة (Alaeddini et al., 2010). قد تكون عينات الحامض النووي الموجودة في مسرح الجريمة أو الكوارث الجماعية غير كافية من حيث النوعية والكمية؛ لأنها قد تحتوي في كثير من الأحيان على كميات قليلة جدا من الحامض النووي واحيانا تكون متحللة بسبب التعرض لفترات طويلة لظروف بيئية مختلفة مثل درجات الحرارة والضوء والرطوبة والكائنات الحية الدقيقة (Bender et al., 2004).

غالباً ما تكون العظام هي المصدر الرئيسي للعينات في تحديد هوية الأفراد (Fondevila et al., 2008). العظام لديها القدرة في الحفاظ على الحامض النووي حتى لو كانت مدفونة في التربة لمدة طويلة؛ لذلك فهي أفضل مصادر للعينات التي يتم استخدامها في علم الطب الشرعي للحمض النووي لتحديد هوية الأشخاص المفقودين، وتحليل الحامض النووي القديم والكوارث الجماعية (Loreille et al., 2007) (Seo et al., 2010).

1-1-2 تاريخ الطب الشرعي History of forensic medicine

في عام 1986، تم استخدام ادلة الحامض النووي لأول مرة في قضية جنائية وتم تحديد كولين بيتشفورك على أنه قاتل طالبتين في ليسترشاير، المملكة المتحدة. وكان قد أدين في يناير 1988. وسرعان ما تم الاعتماد على استخدام علم الوراثة من قبل مجتمع الطب الشرعي ولعب دورا مهما في جميع أنحاء العالم في التحقيق في الجريمة (Seo et al., 2010).

في الطب الشرعي، يتم استخدام تحليل الحامض النووي في العديد من انواع القضايا القانونية. في حالة الجريمة، على سبيل المثال، يتم استخدام ملف التعريف الجيني عندما يكون هناك حاجة ضرورية لتحديد الجاني أو ربطه بالادله الموجوده في مسرح الجريمة، والذي يمكن استخدامها أيضا للتنازل في القضايا المدنية، كما هو الحال في حالات اثبات الأبوة وتحديد هوية ضحايا الكوارث الجماعية، فإن الحامض النووي هو الأداة المستخدمة في الكثير من الحالات قد تكون الشكل الوحيد لتحديد الهوية (Pinheiro, 2010).

2-1-2 المبادئ الأساسية للطب الشرعي The basic principles of forensic medicine

المبدأ الأساس لتحقيقات علم الطب الشرعي هو أن المجرم يجلب أو يترك شيئاً ما في مسرح الجريمة يمكن استخدامه كدليل للمحققين أو القائمين في التحقيق. ويشمل ذلك بصمات الاصابع، آثار الاقدام، الدم، السائل المنوي، الشعر، الالياف، الزجاج المكسور، السكين، البندقية، الرصاصة أو الأشياء غير الملموسة مثل طبيعة الجروح أو الكدمات التي تركت على جسم الضحية، والتي قد تشير إلى طبيعة السلاح المستخدم أو طريقة الاعتداء (Jobling and Gill, 2004). (Norrgard, 2008).

تم الإشارة إلى أن ملف تعريف الحامض النووي الشرعي لا يمثل التركيب الجيني الكامل للفرد، بل هو مجموعة مختارة من أجزاء DNA التي يمكن استخدامها كعلامات لتحديد الهوية. الفائدة الرئيسية لإجراء تحديد نمط الحامض النووي هو استخدام عدد مناسب ومجموعة من التحقيقات التي تشير إلى أن كل فرد لديه نمط فريد، باستثناء التوائم المتطابقة (Loftus, 2005).

واحدة من أهم قضايا الطب الشرعي هي تفرد بصمة الحامض النووي، لذلك يمكن تحديد هوية الشخص عن طريق تحديد نمط الحامض النووي، بشرط فحص مواقع الاختلاف الكافية ومع ذلك، فإن أنظمة تحديد نمط الحامض النووي المستخدمة اليوم تفحص فقط مواقع قليلة من الاختلافات ولديها دقة محدودة فقط لقياس التباين في كل موقع، باستخدام 3-5 مواقع، يمكن اعتبار التتابع بين نمطين من

الحامض النووي دليلاً قوياً على أن العينتين جاءت من نفس الشخص (Cummings and Starr, 2014).

3-1-2 الطب الشرعي وتحديد هوية الأشخاص Forensic and Person Identification

الحالات المدنية الأكثر شيوعاً في مختبرات الطب الشرعي هي حالات إثبات النسب والغرض من هذه الاختبارات هو تحديد الابن مع الام والاب فيما إذا كان الأخير هو الاب البيولوجي، في بعض الحالات يكون الاب المحتمل غائباً أو ميتاً، في هذه الحالة يتم استخدام اقارب نفس الشخص، مما يجعل الاختبار أكثر تعقيداً، أو يتم اللجوء إلى استخراج الجثة من القبر في حالة الوفاة (Pinheiro, 2010) (Iwamura *et al.*, 2004).

تكون العينات الموجودة في حالة استخراج الجثة حسب الفترة الزمنية للوفاة، حيث تكون العظام المصدر الرئيس لعينات الحامض النووي، وهذه عينات صعبة للحصول على البروتين الجيني (Pinheiro, 2010) على الرغم من أن الحامض النووي في حالة استخراج الجثة قد يكون متحلل جداً، ومن الصعب إجراء تحليل الحامض النووي.

تعد الكوارث الكبرى هي الصعوبات الرئيسية التي يواجهها الخبراء، بسبب جميع المتغيرات المرتبطة بها، يمكن تصنيف الكوارث على أنها إما كارثة من صنع الإنسان، مثل الإرهاب، أو الكوارث الطبيعية، مثل تسونامي، ويمكن أيضاً تصنيفها على أنها مفتوحة، بدون معلومات دقيقة عن عدد الضحايا، كما هو الحال مع تسونامي، وفي كارثة مغلقة، إذ توجد بيانات قبل الحدث لتحديد هوية الضحايا، على سبيل المثال قائمة الركاب عند تحطم طائرة (Butler and Hill, 2012) (Siriboonpiputtana *et al.*, 2018)

نقطة مهمة لتحليل الحامض النووي، هي العينات المرجعية (المعروفة)، والتي لا تقل أهمية عن العينات غير المعروفة في علم الطب الشرعي، الملف الوراثي وحده لا يقدم أي إجابة، ويعتمد تحليل الحامض النووي على المقارنات. في هذه الحالات، يتم مقارنة الملف الوراثي الذي تم الحصول

عليه من العينة المجهولة باستخدام برامج الكمبيوتر مع الملفات الشخصية المختلفة المعروفة لتسهيل التحليل، عادة ما تشمل هذه الحوادث على عدد كبير من الضحايا والتي تفترض أيضا وجود عدد كبير من العينات المرجعية (Butler and Hill, 2012) (Montelius and Lindblom, 2012).

4-1-2 المنطقة المستهدفة لتطبيقات الطب الشرعي The Target Area for Forensic Applications

من الضروري جداً معرفة المنطقة المستهدفة التي يتم اختيارها لتكون مفيدة لتطبيقات الطب الشرعي. مع التقدم في تقنيات البيولوجيا الجزيئية، أصبح من الممكن الآن تحليل أي منطقة ضمن 3.2 مليار قاعدة والتي تشكل الجينوم البشري، يُجب أن يحتوي موقع الحامض النووي الذي سيتم استخدامه في علم الطب الشرعي بعض الخصائص الرئيسية :

- يجب أن يكون متعدد الأشكال (متنوع على نطاق واسع بين الأفراد).
- يجب أن تكون سهلة ورخيصة لتوصيفه.
- تقديم ملفات تعريف سهلة التفسير ومقارنتها بين المختبرات.
- لا تكن تحت أي ضغط انتقائي.
- يجب أن يكون معدل الطفرة منخفضاً.

تم إحراز تقدم كبير في فهم الجينوم البشري في السنوات الأخيرة، ولاسيما عن طريق عمل مشروع الجينوم البشري (Goodwin et al., 2011).

2-2 العظام

العظم هو نسيج صلب يدعم ويحمي مختلف أعضاء الجسم، ونخاع العظم ينتج خلايا الدم الحمراء والبيضاء، ويخزن المعادن، يعتبر العظم من الأنسجة الضامة الكثيفة حيث تتصلب مكوناتها

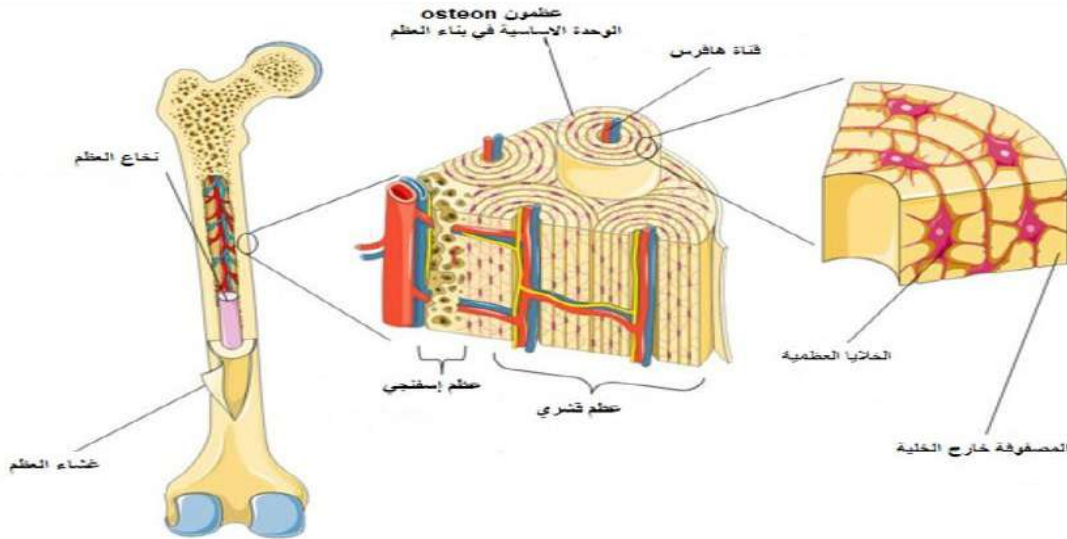
خارج الخلية لتوفير القوة والصلابة، وهذا يجعلها قادرة على أداء دورها الرئيس في تكوين الهيكل العظمي (Weatherholt *et al.*, 2012).

العظم يتكون من الكولاجين (collagen) وهو بروتين مرن يزيد من المقاومة للكسور، والمعادن غير العضوية والتي تسمى هيدروكسيباتيت (hydroxyapatite) هذا هو معدن العظام الذي يعطي العظام صلابتها (Boskey, 2013). الحامض النووي يرتبط ارتباطاً جيداً مع الهيدروكسيباتيت إذ يرتبط تحلله بمدى فقدان البلورة في الهيدروكسيباتيت وكذلك فقدان الكولاجين (Campos *et al.*, 2012).

تتميز العظام بصلابتها، قوتها وقدرتها على التجدد، وتشارك أيضاً في تخزين المعادن وتوازن الحامض القاعدي وتنظيم درجة الحموضة في الدم وجميع الوظائف الثانوية الأخرى (Taichman, 2005).

العظام عبارة عن مركب مكون من 25% من المواد العضوية و 75% من المواد غير العضوية، تتكون المادة الخلوية من حوالي 90-95% من ألياف الكولاجين، فيما تكون المادة الأساسية النسبة الباقية، تتكون العظام من عنصرين تركيبين أساسيين، العظام القشرية أو المدمجة (Cortical bone) يشكل العظم القشري القشرة الخارجية الصلبة للعظم، يعطي العظم القشري العظمة مظهرها الأبيض، الصلب، الأملس، ويمثل 80% من الكتلة العظمية الكلية في هيكل الشخص البالغ (Bao *et al.*, 2013). العظم التريبيقي أو الإسفنجي (Trabecular bone) والمعروف أيضاً بأسم العظام الأسفنجية، هو النسيج الداخلي للعظمة الهيكلية وهو عبارة عن شبكة خلوية مسامية مفتوحة، يمتلك العظم الإسفنجي نسبة مساحة السطح للحجم أكبر من تلك في العظم القشري نظراً لأنه أقل كثافة، يجعله هذا أضعف وأكثر مرونة (Bao *et al.*, 2013). الفرق الرئيس بين هذين النوعين من أنسجة العظام هو مساماتها (White *et al.*, 2011) كثافة العظام عامل رئيس في بقاء المادة العظمية، هناك فرق كبير في كثافة العظام بين الرجال والنساء، وفي مناطق مختلفة من تكوين الهيكل العظمي (Topić *et al.*, 2018).

تلعب العظام دوراً رئيسياً في تكون الدم، واستقلاب الكالسيوم. بلورات العظام هي المستودع الرئيسي للكالسيوم والفوسفات والأيونات الأساسية لعمليات التمثيل الغذائي والفيولوجي (Oryan *et al.*, 2015). تتغير العظام شكلها أثناء نمو الجنين وتطوره حتى بلوغه سن الرشد، اعتماداً على آثاره الفسيولوجية أو القوة الميكانيكية؛ ويحافظ على إعادة بناء العظام على بنية العظام، ويصلح تلف أنسجة العظام، ويحافظ على توازن الكالسيوم والفوسفور (Topić *et al.*, 2018).



شكل (1-2) نظرة عامة تخطيطية للعظم يظهر فيه تركيب العظم الداخلي . مأخوذ من (Bao *et al.*, 2013)

من المعروف أن أنسجة العظام تتحمل الظروف البيئية مثل ارتفاع درجة الحرارة والرطوبة وتنشيط الكائنات الحية الدقيقة، وأنها تحافظ على خصائصها الهيكلية لفترة طويلة من الزمن حتى إذا كانت الجثة متآكلة، ويوفر هذا النسيج معلومات مهمة في علم الطب الشرعي؛ لأنه يكشف عن عدد من الخصائص الشخصية للضحايا (Yukseloglu *et al.*, 2019). العظام حتى بعد عدة سنوات من التعفن، هي أفضل أنسجة DNA المحفوظة مقارنة بالأنسجة الأخرى (Mayall *et al.*, 2013).

2-2-1 اشكال العظام Bone shapes

تنقسم العظام إلى خمسة أشكال حسب شكلها: (Mayall *et al.*, 2013)

1. عظام طويلة (Long Bones) مثل: عظم الفخذ، عظم العضد، عظم القصبية. لها شكل أنبوبي مع نهايات مشتركة موسعة ولها طول أكبر من عرضها، عادة ما تكون هذه العظام منحنية قليلا، هذا الانحناء يمتص ضغط القوى الميكانيكية، مثل وزن الجسم، ويوزعه بالتساوي ويمنع تكسر العظام، هذه العظام هي في الغالب عظام الأطراف الموجودة في اليدين والقدمين، على الرغم من الاختلافات الواضحة في شكل هذه الأنواع المختلفة من العظام، فإن تشريحها متشابه بشكل ملحوظ (White *et al.*, 2011).
2. عظام قصيرة (Short Bones) مثل: مشط الكف، مشط القدم، عظام الارساع، مكعبة الشكل، أي أنها متساوية تقريبا في الطول والعرض، وهي تتكون من عظم إسفنجي مغطى بطبقة رقيقة من العظم المضغوط (Jarmey, 2018).
3. عظام مسطحة (Flat Bones) مثل: قوس الجمجمة، الأضلاع وعظام الكتف، عادة ما تكون رقيقة وتتكون من لوحين (خارجي وداخلي) متوازيين تقريبا من العظم مضغوط بطبقة بيئية من العظم الإسفنجي؛ وهي عظام ذات حركة قليلة او معدومة الحركة، حيث يوفر هذا النوع من العظام الحماية (White *et al.*, 2011).
4. عظام غير منتظمة (Irregular Bones) مثل: عظام الفقرات وعظم الورك وعظام قاعدة الجمجمة، هي عظام غير منتظمة معقدة في الشكل ومن ثم لا يمكن تصنيفها في أي من الفئات الأخرى (White *et al.*, 2011).
5. العظام السيسمائية (Sesamoid Bones) وهي عظام صغيرة ومستديرة، اصلها غضروف و تتعظم في مرحلة البلوغ، مغلقة في بعض اوتار العضلات عند مرورها بالقرب من العظم باستثناء السطح الذي يتم فصل به العظم (Nwawka *et al.*, 2013).

2-2-2 خلايا العظم Bone Cells

هناك العديد من الأنواع المختلفة من الخلايا في أنسجة العظام: الخلايا البانية للعظم (osteoblasts) التي تشارك في صنع وتمعدن نسيج العظم، الخلايا العظمية (osteocytes)، الخلايا المحطمة للعظم (Osteoclasts)، وخلايا السليفة العظمية (Osteoprogenitors). تُشتق الخلايا العظمية وبانيات العظم من خلايا السليفة العظمية، فيما تُشتق ناقضات العظم من نفس الخلايا التي تتمايز لتكوين بلاعم وخلايا وحيدة. (Florencio-Silva *et al.*, 2015)

بانيات العظم هي خلايا أحادية النواة مكونة للعظم. توجد على سطح طبقات العظمون وتصنع مزيج من البروتينات يعرف باسم النسيج العظماني، والذي يتمعدن ليصبح عظما، الخلايا العظمية هي غالباً بانيات عظم غير نشطة، تنشأ الخلايا العظمية من بانيات العظم التي هاجرت للداخل وأصبحت محتجزة ومحاطة بالمادة الخلوية للعظام التي أنتجتها بنفسها. الخلايا المحطمة للعظم هي خلايا كبيرة جدا متعددة النوى مسؤولة عن انهيار العظام عن طريق عملية تشرب العظم؛ يتم بعد ذلك تكوين عظم جديد بوساطة بانيات العظم. يتم باستمرار تجدد العظم عن طريق التشرب والتصنيع (Đudarić *et al.*, 2014).

الخلايا المحطمة للعظم هي خلايا كبيرة فيها العديد من الانوية التي تنشأ من الخلايا الوحيدة، دورها الرئيسي هو هضم العظم الزائد وغير المفيد عن طريق إفراز الكولاجينيز والإنزيمات الأخرى التي تكسر بلورات الكولاجين وأملاح الكالسيوم، الخلايا العظمية هي الأكثر وجودا وأكبر عدد من خلايا أنسجة العظام، وتتكون عن طريق دفن الخلايا البانية للعظم في مصفوفة العظام، وتقع في الفجوات بين الصفائح العظمية وتحتوي كل فجوة على خلية عظمية واحدة، وتحتوي كل خلية عظمية على العديد من البراعم السيتوبلازمية الموجودة في القنويات (canaliculi)، كذلك ترتبط الخلايا العظمية بشكل جيد بخلايا أنسجة العظام الأخرى، تسجل الخلايا العظمية التغيرات في أنسجة العظام التي تنظم نشاط الخلايا المحطمة للعظم والخلايا البانية للعظم (Pajnič *et al.*, 2016). مقارنة بالخلايا العظمية الأخرى، تعبر الخلايا العظمية عن المستقبلات الكربوكسيلية لهرمون الغدة الدرقية (PTH) وهو أمر مهم في إرسال الإشارات داخل الخلايا والنشاط الاستباقي لخلايا العظام (Đudarić *et al.*, 2014).

2-3 الحامض النووي DNA

يتكون الحامض النووي للفرد من شريط مزدوج، النصف الاول من الأب والنصف الاخر من الام، لهذا السبب يمكن استخدام الحامض النووي كدليل لأثبات الابوة (Luftig and Richey, 2000) (Olivier, 2001).

تم العثور على الحامض النووي في كل خلية من خلايا الجسم تقريبا باستثناء خلايا الدم الحمراء (Goodwin *et al.*, 2011)، أن معظم الحامض النووي الموجود في الكروموسومات ليس له وظيفة معروفة وغالباً ما يشار إليه باسم الحامض النووي غير المرغوب فيه (junk)، هذا النوع من الحامض النووي له أهمية خاصة لتطبيقات الطب الشرعي (Jagannathan *et al.*, 2018)، ويمكن استخدام الحامض النووي في العديد من الحالات، بما في ذلك تحديد الأشخاص المجهولين، ويتم تحقيق ذلك عن طريق تحديد معلومات تسلسل الحامض النووي، والتي تميز أقسام صغيرة من الحامض النووي التي تختلف من فرد لآخر (Olivier, 2001).

2-3-1 تاريخ وتطور الحامض النووي الشرعي History and Development of Forensic DNA

في عام 1980 تم وصف أول تعدد اشكال طول قطع التقييد Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). كان تعدد اشكال طول قطع التقييد يمثل الأهداف الجزيئية الأصلية المستخدمة لرسم الخرائط الجينية، وتحديد هوية الإنسان، واختبارات النسب. تم ملاحظة تعدد اشكال طول قطع التقييد على أنها اختلافات في أحجام وعدد الاجزاء الناتجة عن تقييد إنزيم هضم الحامض النووي (Saad, 2005) (Rasmussen, 2012).

في عام 1985، تم وصف بصمة الحامض النووي أو تحديد نمط الحامض النووي (التنميط) كما هو معروف الآن، من قبل الدكتور أليك جيفريز. إذ وجد أن بعض مناطق الحامض النووي تحتوي على تسلسل من الحامض النووي الذي يتكرر عدة مرات بجانب بعضها بعض. اكتشف أيضاً أن عدد الأقسام المتكررة الموجودة في العينة يمكن أن يختلف من فرد لآخر (Goodwin *et al.*, 2011).

أصبحت مناطق تكرار الحامض النووي المعروفة باسم التكررات المترادفة مختلفة العدد (VNTRs) variable number tandem repeat. كانت التقنية التي استخدمها الدكتور جيفريز لفحص التكررات المترادفة مختلفة العدد تدعى تعدد اشكال طول قطع التقييد؛ لأنها تضمنت استخدام إنزيم التقييد لقطع مناطق الحامض النووي المحيطة بـ (VNTRs) (Butler, 2005).

التكررات المترادفة مختلفة العدد هي مناطق الحامض النووي التي يتكرر فيها تسلسل قصير، عادة ما يكون من 8 إلى 35 قاعدة، يختلف العدد الدقيق للتكررات اختلافا كبيرا من شخص لآخر، لذلك يوفر مقدار كبيرا من الاختلاف. عادة ما يكون عدد أنواع الطول التي يمكن تمييزها بشكل موثوق هو 20 إلى 30 لكل موقع في الكروموسوم. مع وجود 5 أو 6 مواقع، يكون عدد المجموعات ضخما واحتمال مطابقة شخص عشوائي للملف الشخصي مع المشتبه به هو واحد من 100 مليار أو أقل. في منتصف التسعينيات، بدأت التكررات المترادفة مختلفة العدد في استخدام STR، ونادرا ما تستخدم التكررات المترادفة مختلفة العدد في الأونة الأخيرة للاستخدام الجنائي (Butler, 2005) (Goodwin et al., 2011).

2-3-2 الحامض النووي في العظم DNA in the bone

يرتبط استقرار الحامض النووي لمدة طويلة في الهيكل العظمي على أنه يمكن أن يرتبط بالهيدروكسيباتيت، المكون الرئيس لأنسجة العظام، مما يجعله أقل عرضة للتحلل بواسطة الإنزيمات (Brundin et al., 2013).

يوجد الحامض النووي عادة داخل الخلايا العظمية، ويمكن العثور عليه في الدم والخلايا الليمفاوية (Topić et al., 2018). واحدة من أكثر النظريات الفعالة في الحفاظ على الحامض النووي في العظام يشير إلى أن الحامض النووي يبقى في الجزء العضوي من المصفوفة خارج الخلية عن طريق ربطه بجزيئات الكولاجين أو الهيدروكسيباتيت (Yukseloglu et al., 2019).

تعد كثافة العظام عامل مهم في الحفاظ على العظام (Ambrus et al., 2010). عادة ما يكون الحامض النووي أقل تحللا في الأجزاء الأكثر كثافة من الهيكل العظمي، وخاصة في عناصر تحمل الوزن مثل عظم الفخذ والساق (Prinz et al., 2007). ومع ذلك، دراسات

قليلة بحثت بشكل منهجي الاختلافات في معدلات النجاح من تحديد نمط الحامض النووي بين العناصر الهيكلية (Miloš *et al.*, 2007).

2-3-3 بصمة الحامض النووي DNA Fingerprint

بصمة الحامض النووي هي الطريقة الوراثية الجزيئية التي تسمح للتعرف على الأفراد الذين يستخدمون الشعر أو الدم أو السائل المنوي أو العينات البيولوجية الأخرى، تحدد هذه الطريقة الافراد بناءً على تحديد نمط الحامض النووي الفريد الخاص بهم. تم وصفه لأول مرة في عام 1984 من قبل العالم البريطاني أليك جيفريز الذي ركز على تسلسل الحامض النووي المسمى التتابع الصغيرة، والذي يحتوي على أنماط متكررة من دون وظيفة معروفة (Jobling and Gill, 2004).

تتميز كفاءة بصمة الحامض النووي بدقة قدرة الاختبار على اكتشاف ملف تعريف الحامض النووي الصحيح. يتم تحديد تقييم الدقة الكلي عن طريق عدد العلامات الجينية التي تم فحصها، ودرجة الاختلافات الموجودة لكل علامة جينية، وكذلك إذا كانت العلامات الجينية المستخدمة تظهر درجة كبيرة من الاختلاف (Butler and Hill, 2012).

2-3-4 فئات وأنواع التكرار المترادف القصير Type of Short Tandem Repeat and Categories

لقد وجد أن الحامض النووي البشري متشابهة بنسبة 99.5% بين جميع الأفراد و 0.5% فقط يختلف من فرد لآخر (Feuk *et al.*, 2006). يوفر هذا الاختلاف في الحامض النووي الأساس لاغراض تحديد هوية الإنسان ويسمى تعدد اشكال الحامض النووي. لتعدد الأشكال نوعين من الحامض النووي (Kashyap *et al.*, 2004): تعدد الأشكال في المناطق المشفرة وتعدد الأشكال في المناطق غير المشفرة.

ينقسم تعدد الأشكال في المناطق غير المشفرة إلى نوعين: تعدد الأشكال المتسلسل وتعدد الأشكال الطولي. تعدد الأشكال المتسلسل هو الاختلاف في قاعدة واحدة أو أكثر في تسلسل الحامض

النووي في موقع معين في أفراد مختلفين (على سبيل المثال ، SNP)، في حين أن تعدد الأشكال الطولي هو الاختلاف في طول الحامض النووي في موقع معين في افراد مختلفين. من الأمثلة على تعدد الأشكال الطولي التتابع الصغيرة (minisatellites) (VNTR) والتتابع الدقيقة (microsatellites) (STR and mini-STR) (Butler *et al.*, 2007). يسمى موقع علامة DNA في الكروموسوم بالموقع الذي توجد فيه الأليلات، يؤدي وجود الأليلات في موقع جيني إلى ظهور النمط الجيني للفرد، يؤدي الجمع بين الأنماط الجينية من مواقع متعددة إلى إنشاء ملف تعريف الحامض النووي للفرد. ومن ثم، فإن عملية تحديد نمط الحامض النووي تتضمن تحديد النمط الجيني الموجود في مواقع محددة على طول جزيء الحامض النووي (Butler and Hill, 2012).

5-3-2 تحلل الحامض النووي DNA degradation

الحامض النووي هو جزيء مستقر، ولكن عندما يتعرض لتغيرات بيئية شديدة، والتي يمكن ملاحظتها في حالات الطب الشرعي المختلفة، يمكن أن يتحلل ويكون في كثير من الأحيان في خطر في تحليله. عوامل مثل درجة الحرارة والرطوبة ووجود الكائنات الحية الدقيقة تؤثر على تركيب الحامض النووي (Pinheiro, 2010) (Pajnič *et al.*, 2016).

يمثل تحلل الحامض النووي تحدياً في تحليل الطب الشرعي، ويمكن أن يؤدي إلى نتائج خاطئة أو عدم وجود نتائج (Yang and Speller, 2006). يمكن أن يؤثر هذا التحلل على التحليل الوراثي، أن تحلل الحامض النووي يمكن أن يغير من نجاح تضخيم المناطق التي يهتم بها الطب الشرعي، مع فقدان المعلومات الوراثية والفشل في اكتشاف التكرار المترادف القصير (STR) (Pinheiro, 2010). ويمكن أن يؤدي تحلل الحامض النووي أيضاً إلى خصائص وراثية غير مكتملة، مما يؤدي إلى تسرب الأليل. كما أنه يمنع تطور بوليميريز الحامض النووي ويزيد من التشفير، مما قد يكون له تأثير على تحليل الحامض النووي الشرعي (Sikorsky *et al.*, 2007). قد تتعرض العينات البيولوجية التي تم جمعها من مسرح الجريمة لظروف بيئية قاسية مثل درجة الحرارة وأشعة الشمس المباشرة والمياه (Misner *et al.*, 2009). يؤدي التعرض البيئي إلى إتلاف الحامض النووي عن طريق تحطيم الجزيئات إلى أجزاء صغيرة ويحدث هذا نتيجة لنشاط النيوكلياز. يحول الحامض

النووي التالف خطوة التمديد إلى تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction والقدرة على استرداد الأجزاء الكبيرة عبر تفاعل البلمرة المتسلسل يقلل التلف من مستويات الحامض النووي (Deagle *et al.*, 2006) مثبطات PCR، مثل بعض أصباغ الانسجة، يمكن أن تتداخل أيضا مع القدرة على استعادة الحامض النووي الكامل من الأدلة البيولوجية (Misner *et al.*, 2009).

بمرور الوقت، إذا لم يتم حفظ هذه العينات، فإن الحامض النووي في الخلية سوف يتحلل وحتى طرق اختبار الحامض النووي القائمة على PCR لن تكون ناجحة بعد الآن. يمكن أن يؤدي التضخيم غير الفعال لتسلسل الحامض النووي إلى زيادة في عدد دورات PCR لأغراض التحسين، مما يؤدي بدوره إلى زيادة احتمال التكوين الخاطئ للنوكليوتيدات (Wang *et al.*, 2004) (Foran, 2006).

يجري تطوير اختبارات الحامض النووي الجديدة لاستعادة المعلومات من مناطق صغيرة من الحامض النووي، والتي هي أكثر عرضة من أن تكون سليمة بعد تلف الحامض النووي. تشمل اختبارات الحامض النووي الجديدة هذه (miniSTRs) باستخدام primers بالقرب من منطقة تكرار (STR و SNPs) كما يتم تقييم اساليب تضخيم الجينوم وإصلاح الحامض النووي لتحديد إمكانية تضخيم PCR من قوالب الحامض النووي المحدودة أو التالفة (Misner *et al.*, 2009). تتمثل إحدى الطرق لاستعادة المعلومات من عينات الحامض النووي المتحللة في تقليل حجم منتجات PCR، عن طريق نقل البوادئ بأسرع ما يمكن إلى منطقة تكرار STR (Butler *et al.*, 2007).

2-3-6 الحامض النووي كأداة لتحديد الهوية DNA As An Identification Tool

منذ اكتشاف تركيب الحامض النووي في عام 1953، كان العلماء يستكشفون باستمرار كيف يمكننا فتح أسرار الحامض النووي لمجموعة متنوعة من الأغراض مثل اكتشاف الأمراض، واستكشاف النسب، وفهم علم الوراثة والتطور، وتعظيم القيمة الغذائية للطعام، وفي الآونة الأخيرة، لتخزين البيانات (Goldman *et al.*, 2013).

يشار إلى الحامض النووي احيانا باسم "المخطط الجيني للحياة" ويتم تشفير التركيب الجيني للفرد في الحامض النووي. هذا يعني أن الحامض النووي ينتقل من الآباء إلى نسلهم، والخصائص المظهرية التي يظهرها الفرد، مثل لون العين والشعر، هي نتيجة التركيب الجيني (Snustad and Simmons, 2015).

في كثير من الحالات، يكون الهدف هو تحديد الجهة المانحة لأدلة الحامض النووي، ليس من الضروري دراسة تسلسل الجينوم بأكمله، ستكون هذه عملية مكلفة للغاية وتستغرق وقتا طويلا. فضلا عن ذلك، فإن ما يقارب 99.5% من الجينوم البشري متطابق لجميع الافراد، لذلك، لأغراض تحديد الهوية البشرية (Rudin and Inman, 2001) نقوم بتحليل علامات تعدد الأشكال الطولية، في مواقع محددة داخل الجينوم النووي، والتي تختلف بين الأفراد. STR هي تسلسلات متكررة قصيرة توجد في المناطق غير المشفرة من الحامض النووي، إما داخل الجينات أو بينها (Butler, 2005).

4-2 التكرار الترادفي Tandem Repeat

هنالك فئتان مهمتان من التكرار الترادفي تستخدمان على نطاق واسع في مجال الطب الشرعي: التوابع المصغرة ، ويشار إليها أيضا باسم التكرار المترادف متغير الاعداد (VNTRs) و التوابع الدقيقة ، يشار إليها أيضا بتكرار الترادف القصير (STRs) الهيكل العام لل VNTRs و STRs هو نفسه. بسبب الاختلاف بين الأليلات المختلفة هو اختلاف في عدد وحدات التكرار التي ينتج عنها أليلات ذات أطوال مختلفة، ولهذا السبب التكرار المترادف متعدد الاشكال يعرف بتعدد الاشكال الطولي (Goodwin et al., 2011).

1-4-2 تكرار العدد المترادف المتغير variable number Tandem Repeat (VNTRs)

يتم تمثيل التكرارات الأساسية في بعض الأليلات الاف المرات، الفرق في عدد من حالات التكرار يخلق أليلات تتراوح في حجمها من 500 زوج قاعدة الى أكثر من 30 كيلوبايت. يمكن أن

يكون عدد الأليلات المحتملة كبيراً جداً (Berg *et al.*, 2003). يختلف العدد الدقيق للتكرارات اختلافاً كبيراً من شخص لآخر، لذلك يوفر هذا قدراً كبيراً من الاختلاف. عادة ما يكون عدد أنواع الطول التي يمكن التعرف عليها بشكل موثوق 20 إلى 30 لكل موقع من الكروموسومات (Butler, 2005) (Goodwin *et al.*, 2011).

ومع ذلك، يقتصر استخدام التكرار المترادف متغير الأعداد على نوع العينة التي يمكن تحليلها بنجاح؛ لأنها تتطلب كمية كبيرة من الحامض النووي عالي الوزن الجزيئي، قد يكون تفسير ملفات التكرار المترادف متغير الأعداد مشكلة أيضاً لأن استخدامها في علم الوراثة الشرعي تم استبداله الآن بالتكرار المترادف القصير (Nutini *et al.*, 2003).

2-4-2 التكرار المترادف القصير (STR) Short Tandem Repeat

هنالك مناطق غير مشفرة في مناطق الجينوم البشري، حيث توجد مجموعات من وحدات النكليوتيدات المتكررة التي يمكن أن تختلف في الطول وفي تكوين وحدة التكرار STR هذه هي أشكال DNA الموجودة بين العلامات الوراثية، الأكثر استخداماً في علم الطب الشرعي لتحديد جينات العينات (Pinheiro, 2010).

التكرار المترادف القصير، هي وحدات متكررة تتكون من 1-6 نقطة أساس والتي يبلغ مجموعها حوالي 3% من الجينوم البشري. لدى التكرار المترادف القصير معدل طفرة مرتفع؛ وذلك لأنها تسهم في نسبة كبيرة من الاختلافات الجينية البشرية (Zeng *et al.*, 2015). أن تحديد نمط STR هو الطريقة الأكثر استخداماً لتحديد هوية الإنسان في الطب الشرعي (Gymrek, 2017).

يمكن تضخيم التتابع الدقيقة STRs، التي تتراوح من 2 إلى 7 أزواج قاعدية بسهولة بواسطة تفاعل السلسلة المتبلر (PCR) وفصلها بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي. الاختلافات المستخدمة بشكل رئيسي في علم الطب الشرعي هي التتابع الدقيقة أو التكرار المترادف القصير (STRs). تحتل حوالي 3% من الجينوم البشري وتحدث في كل 10,000 نيوكليوتيدات (Butler, 2005). وقد ثبت أن (STR) التي تم اختياره لأغراض الطب الشرعي له روابط قليلة بالأمراض ويوجد بشكل

رئيسي في المناطق غير المشفرة (Thanakiatkrai *et al.*, 2013). وتشمل الشروط الأخرى عدم تماثل الزيغوت، والأليلات القابلة للتمييز والقدرة على تضخيمها بقوة (Butler, 2005).

تحلل العينات، يغير نجاح التضخيم. لزيادة كفاءة الحصول على ملف تعريف STR، من الممكن تقليل حجم منتج التضخيم، وإعادة تصميم البادئ من أجل الارتباط بشكل أقرب بمنطقة STR، والاحتفاظ بنفس المعلومات. تسمى هذه mini-STRs، وهي مفيدة للحالات التي تحتوي على عينات صعبة مثل العظام (Zeng *et al.*, 2015).

يمكن أن يكون STR جسمياً (يكون موجوده في الكروموسومات الجسمية) أو جنسياً (كروموسوم X وكروموسوم Y) تستخدم STR الجسمية اذا كان تحديد الهوية مطلوباً. اما إذا كانت هناك حاجة إلى معلومات إضافية، فيتم استخدام الكروموسومات الجنسية. في حالات اثبات الأبوة، يكون STR كروموسوم Y مفيداً لتحديد النسب الأبوية وتحديد الذكور، والذي يكون مفيداً في القضايا الجنائية في العينات الممزوجة. يستخدم STR كروموسوم X في قضايا الأبوة في حالة غياب الأب المزعوم (Pinheiro, 2010).

في عام 1997، أنشأ مكتب التحقيقات الفيدرالي مجموعة أساسية من 13 موقعاً لتحديد الهوية البشرية، شكلت هذه المواقع نظام مؤشر الحامض النووي المشترك (CODIS) وتشمل المواقع التالية: D18S51 , D16S539 , D13S317 , D8S1179 , D7S820 , D5S818 , D3S1358 , D21S11 , FGA , TH01 , TPOX و vWA (Lim *et al.*, 2015).

في عام 2017، تم تطوير مجموعة STR جديدة في الولايات المتحدة من 13 موقعاً أساسياً إلى 20 موقعاً أساسياً إذ تم إضافة D1S1656 , D2S441 , D10S1248 , D12S391 , D22S1045 , D2S1338 و D19S443 (Ludeman *et al.*, 2018).

3-4-2 استخدامات التكرار المترادف القصير (STR) في الطب الشرعي

Short Tandem Repeat (STR) uses in forensics

تحليل التكرار المترادف القصير (STR) هو الطريقة المفضلة حالياً لتحديد هوية الإنسان في قضايا الطب الشرعي (Butler, 2011) بسبب قدرته العالية على إنتاج ملفات تعريف مميزة من كميات قليلة من الحامض النووي (Liu et al., 2008). أصبح استخدام نمط (STR) أداة مهمة وأساسية لتحديد هوية الضحايا من مجموعه متنوعه من الكوارث الطبيعية، غالباً ما يوفر وسيلة موثوقة لتحديد الهوية عندما لا يمكن تطبيق طرق أخرى، غالباً ما يحدث ذلك في حالات تجزئة الجسم إذ لا يتم حفظ العينات بعد الوفاة او عندما لا تتوفر البيانات الطبية أو بصمات الأصابع للأشخاص المفقودين (Butler and Hill, 2012).

تنقسم تقنيات نمط STR إلى قسمين-التضخيم والكشف. على الرغم من وجود تداخل في بعض التقنيات، فإن الهدف النهائي لتحليل STR هو تضخيم سريع وقوي ورخيص ومحمول مع تفسير بسيط (Butler, 2005).

أغلب المواقع المستخدمة في مجالات الطب الشرعي هي تكرارات النوكليوتيد الرباعي، والتي تحتوي على أربعة أزواج من القواعد المتكررة لـ STR والتي تعزز جميع متطلبات علامات الطب الشرعي، حيث تكون:

- قوية، مما يؤدي إلى تحليل ناجح لمجموعة واسعة من المواد البيولوجية.
- يمكن مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها في المختبرات المختلفة بسهولة.
- مميزة للغاية، خاصة عند تحليل عدد كبير من المواقع في وقت واحد (تعدد الأرسال).
- حساس للغاية، لا يتطلب سوى عدد قليل من الخلايا لإجراء تحليل ناجح.
- سريع نسبياً وسهل لإنشاء ملفات تعريف الـ STR (Butler and Hill, 2012).

مع تزايد حالات تحديد الهوية الشرعية، طورت شركات التكنولوجيا الحيوية مثل الأنظمة الحيوية التطبيقية (ABI) وشركة بروميغا (PC) مجموعات للاستخدام في علم الطب الشرعي مع مراعاة مواضع STR المعروفة والمستخدمه بواسطة (CODIS). (Butler and Hill, 2012).

تساهم أربعة أشياء في جعل الحامض النووي مصدرا ممتازا للمعلومات التي تساعد على تفرد الطب الشرعي:

- (1) لا يوجد فرق تقريبا في الحامض النووي بين أنواع الخلايا.
- (2) لا يتغير الحامض النووي للفرد طوال حياته.
- (3) مقاومة تحلل الحامض النووي مقارنة بالبروتينات.
- (4) اختلافات عالية بين الأفراد وبين الأنواع (Butler, 2005).

4-4-2 تسمية علامات الحامض النووي (STR) Naming DNA markers

تسميات علامات الحامض النووي واضحة إلى حد ما. إذا كانت العلامة جزءاً من جين أو تقع داخل الجين، فسيتم استخدام اسم الجين في التسمية على سبيل المثال، تكون علامات التكرار الترادفي القصير (STR) والتي سيتم دراستها وفقاً لتسميتها وموقعها كالاتي:

- TH01 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات بسيط لجين هيدروكسيلاز التيروزين البشري الموجود على الكروموسوم 11. "01" يأتي جزءاً من TH01 من حقيقة أن التكرار المتضمن يقع في إنترون 1 من جين هيدروكسيلاز التيروزين. في بعض الأحيان يتم تضمين بادئة (HUM) في بداية اسم المكان للإشارة إلى أنه جينوم بشري. سيتم إدراج موقف TH01 STR بشكل صحيح على أنه HUMTH01 (Gazi *et al.*, 2010).
- TPOX هو تكرار رباعي النوكليوتيدات بسيط، موجود في إنترون 10 من الجين البشري الغدة الدرقية بيروكسيديز بالقرب من نهاية الذراع القصيرة للكروموسوم 2 (GRCh38، الكروموسوم 2، الموقع 1489653 إلى 1489684، تسمية الأليل 8). (Jiang *et al.*, 2011) (NIST).
- D1S1656 عبارة عن رباعي النوكليوتيدات مركب موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 1 مع الأليلات المتسلسلة التي تتراوح من 8 إلى 19.3 نيوكليوتيدات

- GRCh38، الكروموسوم 1، الموقع 230769616 إلى 230769683، تسمية الأليل (17) (Kline *et al.*, 2011). (Wang *et al.*, 2014).
- D2S1338 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات مركب موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 2، يبعد حوالي أكثر من 150 MB من موضع D2S441 (GRCh38، كروموسوم 2، الموقع من 218014859 إلى 218014950، تسمية الأليل (23) (Jiang *et al.*, 2011) (Kline *et al.*, 2011).
 - D3S1358 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات مركب موجود على الذراع القصير للكروموسوم 3 (GRCh38، كروموسوم 3، الموقع 45540739 إلى 45540802، تسمية الأليل (16) (Jiang *et al.*, 2011) (Kline *et al.*, 2011).
 - FGA عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات مركب موجود في انترون الثالث لموضع ألفا-فيرينوجين على الذراع الطويلة للكروموسوم 4 (GRCh38، الكروموسوم 4، الموقع 154587736 إلى 154587823، تسمية الأليل (22) (Cho *et al.*, 2011) (Phillips *et al.*, 2012).
 - D5S818 هو تكرار رباعي النوكليوتيدات بسيط موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 5. (GRCh38، الكروموسوم 5، يقع من 123775556 إلى 123775599، تسمية الأليل (11) (Cho *et al.*, 2011) (Dauber *et al.*, 2012).
 - CSF1PO هو تكرار رباعي النوكليوتيدات البسيط الموجود في انترون 6 على الذراع الطويل للكروموسوم 5 (GRCh38، كروموسوم 5، الموقع 150076324 إلى 150076375، تسمية الأليل (13) (Griffiths *et al.*, 1998).
 - D7S820 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات البسيط موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 7. تم العثور على وحدة تكرار GATA على الشريط العكسي للتسلسل المرجعي GenBank (GRCh38، Chromosome 7، الموقع 84160226 إلى 84160277، تسمية الأليل (13) (Allor *et al.*, 2005).

- D8S1179 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات مركب موجود على الكروموسوم 8 (GRCh38، كروموسوم 8، الموقع من 124894865 إلى 124894916، تسمية الأليل 13) (Jiang *et al.*, 2011)(Kline *et al.*, 2011)
- D10S1248 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات بسيط موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 10 مع الأليلات المتسلسلة التي تتراوح من 7 إلى 19 وحدة تكرار GGAA. تم العثور على موضعه في السلسلة الأمامية للتسلسل المرجعي GenBank (GRCh38، كروموسوم 10، الموقع 129294244 إلى 129294295، تسمية الأليل 13) (Kline *et al.*, 2011).
- VWA عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات مركب موجود في انترون الأربعين لجين فون ويلبراند على الذراع القصير للكروموسوم 12 (GRCh38، الكروموسوم 12، الموقع 5983977 إلى 5984044، تسمية الأليل 17) (Kline *et al.*, 2011).
- D12S391 هو مركب رباعي النوكليوتيدات متعدد الأشكال موجود على الذراع القصير للكروموسوم 12 (GRCh38، الكروموسوم 12، يقع من 12297020 إلى 12297095، تسمية الأليل 19) (Griffiths *et al.*, 1998).
- D13S317 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات بسيط موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 13 (GRCh38، الكروموسوم 13، الموقع 82148025 إلى 82148068، تسمية الأليل 11) (Cho *et al.*, 2011).
- Penta E عبارة عن تكرار خماسي النوكليوتيدات بسيط موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 15 (GRCh38، الكروموسوم 15، من 96831015 إلى 96831039، تسمية الأليل 5) (Jiang *et al.*, 2011).
- D16S539 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات بسيط GATA موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 16، والذي يتراوح طوله من 4 إلى 17 وحدة تكرار. (GRCh38، كروموسوم 16، الموقع 86352702 إلى 86352745، تسمية الأليل 11) (Kline *et al.*, 2011) (Dauber *et al.*, 2012).

- D18S51 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات بسيط موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 18 (GRCh38)، الكروموسوم 18، الموجود من 63281667 إلى 63281738، تسمية الأليل (18) (NIST).
- D19S433 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات مركب يقع على الكروموسوم 19 (GRCh38)، الكروموسوم 19، يقع من 29926235 إلى 29926298، تسمية الأليل (14) (Cho *et al.*, 2011).
- D21S11 عبارة عن تكرار رباعي النوكليوتيدات معقد موجود على الذراع الطويل للكروموسوم 21 (GRCh38)، كروموسوم 21، الموقع 19181973 إلى 19182099، تسمية الأليل (29) (NIST).
- Penta D عبارة عن تكرار خماسي النوكليوتيدات بسيط موجودة على الكروموسوم 21 ، يبعد حوالي 25 MB من موضع D21S11 (GRCh38)، كروموسوم 21، الموقع 43636205 إلى 43636269، تسمية الأليل (13) (Jiang *et al.*, 2011) (Dauber *et al.*, 2012).
- D22S1045 عبارة عن تكرار ثلاثي النوكليوتيدات مركب موجود على الكروموسوم 22 (GRCh38) ، كروموسوم 22، الموقع 37140287 إلى 37140337، تسمية الأليل (17) (Kline *et al.*, 2011).

يمكن تحديد علامات الحامض النووي التي تقع خارج مناطق الجينات حسب موضع الكروموسوم. يمثل موضعي STR (D5S818 و DYS19) أمثلة على العلامات التي لا توجد داخل مناطق الجينات. في هذه الحالات، يشير الحرف " D " إلى الحامض النووي. يشير الحرف التالي إلى رقم الكروموسوم، 5 لرقم الكروموسوم الخامس و Y للكروموسوم Y. يشير الحرف " S " إلى علامة الحامض النووي عبارة عن تسلسل نسخة واحدة. يشير الرقم النهائي إلى الترتيب الذي تم به اكتشاف العلامة وتصنيفها لكروموسوم معين. يتم استخدام الأرقام المتسلسلة لإعطاء التفرّد لكل علامة DNA التي تم تحديدها. وهكذا بالنسبة لعلامة الحامض النووي D16S539، DNA:D ، 16: كروموسوم 16، S : تسلسل نسخة واحدة، 539 : وصف موضع 539 على كروموسوم 16 (AL-Zubaidi, 2015).

الفصل الثالث

مواد وطرائق عمل

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

1-3 المواد Materials

1-1-3 الأجهزة والمعدات المختبرية

لتم استخدام الاجهزة والمعدات كما موضحة في الجدول (1-3):

الدولة	الشركة المصنعة	اسم الجهاز	ت
USA	OHAUS Pioneer	Sensitive balance	1
Germany	Eppendorf	centrifuge	2
Germany	Eppendorf	incubator	3
Germany	Eppendorf	Thermomixer confort	4
USA	Fisher scientific	Vortex Mixer	5
SINGAPORE	ESCO	Hood	6
Germany	QIAGEN	EZ1 Advanced XL	7
Germany	Applied Bio system	PCR system. 9700	8
USA	Applied Bio system	REAL-TIME PCR 7500	9
USA	Applied Bio system	3500 GENETIC ANALYZER	10
SINGAPORE	ESCO	REFRIGERATOR	11
Sony	Digital camera	آلة تصوير	12
SINGAPORE	ESCO	PCR CABINET	13
Germany	Eppendorf	MICROPIPETTE 0.5-10, 20-200, 100- 1000 μ L	14
Germany	Eppendorf	TIPS (0.5 μ L, 200, μ L 1000 μ L)	15
Germany	Eppendorf	rack	16
USA	Applied Bio system	Tray 96 well plate	17
USA	Applied Bio system	Optical adhesive film	18
Germany	QIAGEN	FTA™ Mini Card	19

الجدول (1-3) الاجهزة والمعدات المختبرية المستخدمة في إجراءات هذه الدراسة .

3-1-2 المواد الكيميائية والمحاليل

تم إدراج المواد الكيميائية والمحاليل التي استخدمت في هذه الدراسة مع مصادرها في الجدول (2-3) :

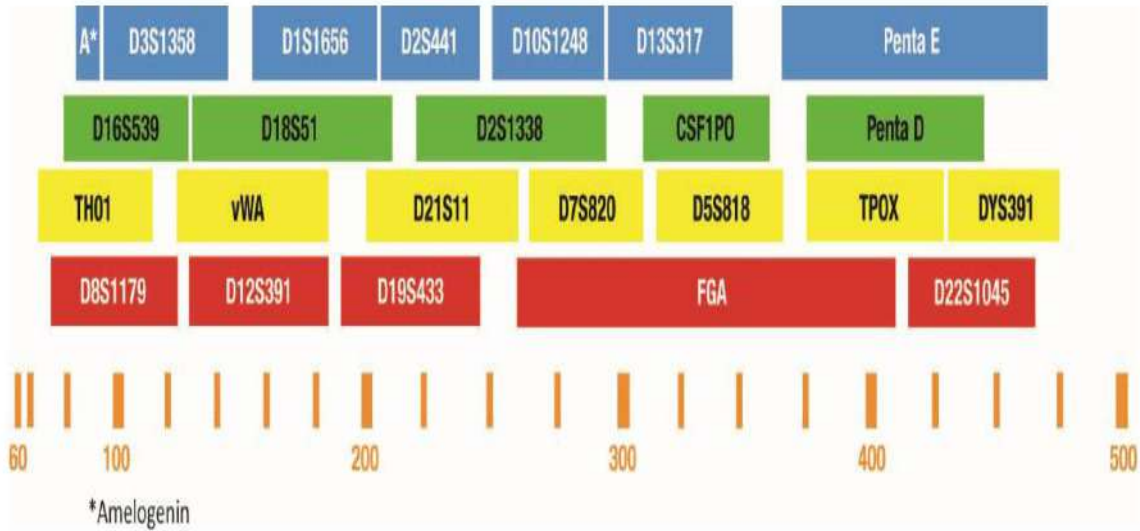
الدولة	الشركة المصنعة	اسم المادة	ت
USA	Sigma	Ethanol 96%	1
ANY	Commercial	Commercial Bleach (10% Sodium Hypochlorite)	2
Germany	QIAGEN	nuclease free water	3
Germany	QIAGEN	Proteinase k	4
Germany	QIAGEN	Buffer G2	5
Germany	QIAGEN	Carrier RNA	6
Germany	QIAGEN	0.5 M EDTA PH 8.0	7
Germany	QIAGEN	Nuclease Free Water	8
Germany	QIAGEN	Proteinase K	9
USA	Appliedbiosystems	Formamide HI-DI	10
Germany	QIAGEN	EZ1 DNA Investigator Kit (48)	11
USA	Promega	PowerPlex® Fusion System	12
USA	Appliedbiosystems	Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit	13

الجدول (2-3) المواد الكيميائية والمحاليل التي استخدمت في إجراءات هذه الدراسة .

يستخدم نظام PowerPlex® Fusion System لتحديد الهوية البشرية بما في ذلك تحليل الطب الشرعي واختبار الأبوة واستخدامات الأبحاث. يسمح النظام بالتضخيم المشترك والكشف عن ألوان الفلورسنت الأربعة ألوان لـ 24 موقع ، وهو موضح في الجدول (3-3) .

ت	الموقع	صبغة الفلورسنت
1	A*,D3S1358, D1S1656, D10S1248, D13S317, Penta E	الازرق
2	D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D	الاخضر
3	TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, DYS391	الاصفر
4	D8S1179, D12S391, D19S433, FGA ,D22S1045	الاحمر

الجدول (3-3) الكشف عن أربعة ألوان صبغة الفلورسنت لـ 24 موقع.



الشكل (1-3) ألوان الفلورسنت الأربعة ألوان لـ 24 موقع STR

2-3 طرائق العمل Material and Methods

1-2-3 موقع اجراء الدراسة (Study site) :

تم اجراء الدراسة في مختبرات الحامض النووي التابعه الى مديرية تحقيق الادلة الجنائية / وزارة الداخلية العراقية في محافظة بغداد.

2-2-3 جمع العينات (Sample collection) :

تم جمع العينات من مستشفى الشهيد غازي، ومستشفى الكندي التعليمي من الاشخاص المرضى والمصابين بحوادث السير و العمليات العسكرية من سكنة محافظة كربلاء للمدة من 2019/11/9 لغاية 2020 /1/7 إذ كان مجموع ما تم الحصول عليه من عينات العظام 50 عينة، وكانت على النحو التالي (عظم الفخذ : 13 ، عظم الورك : 10 ، عظم القصبة : 8 ، عظم الزند : 3 ، مشط القدم : 9 ، مشط اليد : 2 ، عظم الكعبرة : 3 ، عظم العضد : 2) وتم الحصول على 32 عينة دم منها 16 عينة من الاب و 16 عينة من الام للشخص بعد أن تم الحصول على موافقتهم وأخذ المعلومات الخاصة بهم والتي تتضمن (الاسم الثلاثي ، الجنس ، العمر ، المهنة ، الامراض ، الادوية التي يتم اخذها ، أسباب البتر ان وجدت وأي ملاحظات أخرى) .

تم الحصول على العينات من صالات العمليات مباشرة وتم نقلها مباشرة الى مختبر الادلة الجنائية (Hasap et al., 2020)، بينما تم حفظ عينات الدم ونقلها بوساطة بطاقات FTA™ Mini.

3-2-3 تحضير العينة (Sample Preparation) :

تم تحضير عينات العظام حسب (Huel et al., 2012) :

1. تقطيع العظام الكبيرة الى قطع صغيرة باستخدام جهاز دريل يدوي والذي يربط معه قرص دائري صغير الذي يستخدم لتقطيع الأسنان .
2. تنظيف العينات من الانسجة الملتصقة بالعظم باستخدام مشرط طبي .

3. يتم ازاله جزء من الكالسيوم باستخدام جهاز دريل يدوي والذي يربط معه حجر دائري صغير لكي نضمن تنظيف العينة بصورة صحيحة وعدم بقاء اي انسجة اخرى على العظم .
4. تم تحضير كل عينة على حده مع تنظيف الأدوات والمعدات بمحلول التبييض التجاري (هيبوكلوريد الصوديوم المخفف 10%) قبل تحضير كل عينة .
5. تنظيف العينات بواسطة محلول التبييض التجاري (هيبوكلوريد الصوديوم المخفف 10%) لمدة 30 ثانية بعد غمر العينة بالمحلول مع الرج اليدوي القوي، وتكرر هذه العملية من 1-3 مرات حسب الأنسجة الموجوده على عينات العظم .
6. غسل عينات العظم جيدا بواسطة ماء منزوع الأيونات لمدة 30 ثانية مع الرج اليدوي القوي وتكرر هذه العملية 1-3 مرات حسب الحاجة .
7. غسل العينة بواسطة محلول الايثانول 96% مع الرج اليدوي القوي للعينة بعد غمرها بالمحلول لمدة 20-30 ثانية .
8. توضع العينات في انابيب 5 مل مفتوحة وتوضع في الحاضنة بين 50 – 60 درجة مئوية الى أن تجف العينة .
9. بعد أن تجف العينة جيدا يتم وضعها في هاون مرمرى ويسكب عليها النتروجين السائل الى أن تغمر العينة، ويبدأ بتحريك عصا الهاون بحركة دائرية مستمرة الى ان يجف النتروجين ، يتم تكرار هذه العملية حتى يتم الحصول على مسحوق ناعم الحبيبات؛ لانه كلما كان المسحوق ناعما كلما حصلنا على نقاوة عالية من الحامض النووي (Kamoun et al., 2016).
10. يتم نقل المسحوق الى انبوب 5 مل جديد ويتم حفظه في الثلاجه تحت درجة -20 درجة مئوية لحين البدء بعملية الاستخلاص .

4-2-3 أستخلاص الحامض النووي (DNA extraction) :

تم استخلاص الحامض النووي حسب بروتوكول المجموعة الجاهزة EZ1 DNA (QIAGEN- Germany) Investigator Kit (48) وحسب الطريقة المعتمده في مختبرات الادلة الجنائية ، من أجل زيادة كفاءة استخلاص العينات الصعبة والتي تتلخص بالنقاط التالية :

1. وزن 150 ملغ من مسحوق العظم باستخدام الميزان الحساس ويتم وضع المسحوق في انبوب الطرد المركزي الموجود في الكت حجم 2 مل .
2. أضيف $700 \mu\text{l}$ من محلول EDTA (PH 8.3) 0.5mol .
3. رجت العينة باستخدام vortex وذلك لمزج العينة جيدا بالمحلول .
4. حضنت العينة على 37°C لمدة 48 ساعة .
5. أضفت $20 \mu\text{l}$ من Proteinase K .
6. عمل طرد مركزي على 6000 دورة / دقيقة لمدة 4 دقائق .
7. حضنت عند 56°C لمدة 3 ساعات وتم نقل $200 \mu\text{l}$ من الرائق الى انبوبة جديدة حجم 2 مل الموجودة في الكت .
8. بعد الحضانة تم نقل العينة الى جهاز EZ1 Advanced ويكون التحضير كالاتي :
 - أ. وضع العينة في حقل A4 .
 - ب. وضع الهولدر (لانجر) في حقل A2 .
 - ج. وضع انبوب فارغ حجم 2 مل في حقل A1 والذي سوف ينقل اليه الحامض النووي آليا بعد الانتهاء من عملية الاستخلاص .
 - د. يتم تشغيل الجهاز .
9. بعد انتهاء مدة 17 دقيقة تصبح لدينا عينة الحامض النووي جاهزة في الانبوب الجديد .



الشكل (2-3) لجهاز EZ1 Advanced XL (1) الصف الاول A1 : انبوب فارغ حجم 2 مل. (2) الصف الثاني A2: يوضع فيه اللانجر الذي يحتوي على المرشح. (3) الصف الثالث : انبوبة العينة. (4) يوضع فيه كارتريج (cartridge).

اما بالنسبة لعينات الدم التي تم جمعها بواسطة بطاقات FTA™ Mini Card فتستخدم مباشرة بعملية تضخيم الحامض النووي (PCR) التي سيتم ذكرها لاحقا .

5-2-3 تقدير كمية الحامض النووي Quantification DNA

تم تقدير كمية الحامض النووي المستخلص بواسطة مجموعة Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit ، باستخدام جهاز تفاعل السلسلة المتبلر في الوقت الحقيقي 7500 مع برنامج HID Real-Time PCR Analysis. يوفر هذا البرنامج العديد من المعايير لتحليل تشغيل qPCR ، مع تسليط الضوء على النتائج الفردية لكل عينة.

تم استخدام العدة الجاهزة Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit وكالاتي :

- 1- حضر التخفيفات القياسية (Standard) بخمسة تركيزات 5 ، 0.5 ، 0.05 ، 0.005 و 0.0005 ng/μl كما موضح بالجدول (3 - 4)

الجدول (4-3) التحضيرات القياسية لقياس كمية الحامض النووي.

	Standard	Dilution
STD1 5ng/μl	10 μl	10 μl
STD2 0.5ng/μl	10 μl STD1	90 μl Dilution
STD3 0.05ng/μl	10 μl STD2	90 μl Dilution
STD4 0.005ng/μl	10 μl STD3	90 μl Dilution
STD5 0.0005ng/μl	10 μl STD4	90 μl Dilution

- 2- حضر مزيج التفاعل من مادتي Primer Mix و Reaction Mix الموجودتان في العدة كما موضح في الجدول (3 - 5)

الجدول (3 - 5) مكونات عدة Quantifiler™ Trio لجهاز نظام تفاعل السلسلة المتبلر في الوقت الحقيقي 7500

الحجم النهائي	Reaction Mix	Primer Mix	لكل عينة (μl)
18	10	8	

- 3- إضافة التخفيفات القياسية (Standard) في اللوحة المكونة من 96 حقل (Optical 96 well plate) من مجموعه Applied Bio system إذ تم اضافته التخفيفات القياسية في حقل (A1,B1,C1,D1,E1) و (A2,B2,C2,D2,E2)
- 4- إضافة مزيج التفاعل في الحقول الاخرى من A3 الى حقل H8 وكما موضح في الشكل (3-3).

- 5- إضافة $2\mu\text{l}$ من عينة الحامض النووي في كل حقل من مزيج التفاعل إذ يصبح مجموع الخليط في كل حقل $20\mu\text{l}$.
- 6- غلق اللوحة بصورة محكمة بواسطة Adhesive Film لكي يمنع انتقال جزء من الخليط من حقل الى اخر اثناء عملية تقدير كمية الحامض النووي في جهاز 7500 REAL-TIME PCR
- 7- وضعت اللوحة في جهاز تفاعل السلسلة المتبلمر في الوقت الحقيقي 7500 بعد ان يتم تنزيل بيانات العينات في برنامج HID Real-Time PCR Analysis.
- 8- تشغيل البرنامج عن طريق الضغط على ايعاز start ومن ثم يبدأ تقدير كمية الحامض النووي واطهار النتائج بعد مدة 56 دقيقة.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	STD1	S1	S9	S17	S25	S33	S41				
B	STD2	STD2	S2	S10	S18	S26	S34	S42				
C	STD3	STD3	S3	S11	S19	S27	S35	S43				
D	STD4	STD4	S4	S12	S20	S28	S36	S44				
E	STD5	STD5	S5	S13	S21	S29	S37	S45				
F			S6	S14	S22	S30	S38	S46				
G			S7	S15	S23	S31	S39	S47				
H			S8	S16	S24	S32	S40	S48				

الشكل (3-3) البيانات التي تم ادخالها بي برنامج HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2

6-2-3 تضخيم الحامض النووي

1-6-2-3 تضخيم عينات العظم

تم استخدام PowerPlex® Fusion System (PC) لتضخيم STR من عينات العظام حسب دليل الاستخدام (Riss, 2017) :

تحضير خليط من محلول التفاعل لكل عينة في أنبوب 1.5 مل من كواشف ال PCR الموجودة في العدة كما موضح في الجدول (3- 6) .

Component	Volume Per Reaction	x	Number of Reactions	=	Final Volume
Water, Amplification Grade	To a final volume of 25.0µl	x		=	
PowerPlex® Fusion 5X Master Mix	5.0µl	x		=	
PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix	5.0µl	x		=	
Template DNA (0.25–0.5ng)	Up to 15µl				
Total volume	25µl				

الجدول (6-3) مزيج تضخيم PCR لتضخيم الحامض النووي المستخرج (Corporation,2015).

1. عمل vortex لكل انبوبة تحتوي على خليط التفاعل لمدة 5-10 ثواني.
2. أضفت 10µl من الحامض النووي الى الخليط ليصبح مجموع الخليط 25µl.
3. وضعت الانابيب في جهاز تفاعل السلسلة المتبلر.
4. تحديد الدورات عن طريق تحديد نوع الكت المستخدم في عملية تضخيم العينات بعد ذلك نضغط على كلمة Start ليبدأ الجهاز بالعمل .
5. تكون عدد الدورات ودرجة الحرارة كما موضح في الشكل (3 - 4)

Initiation	Cycles 30			Final extension	Final
96°C 1 minute	Denaturation	Annealing	extension	60°C 10 minute	4°C ∞
	94°C 10 seconds	59°C 1 minute	72°C 30 seconds		

الشكل (3-4) الدورات الحرارية لعدة PowerPlex® Fusion System

2-6-2-3 تضخيم عينات الدم

تم أخذ قطعة صغيرة بقطر 1.2 mm من البقع المجففة من كل عينة من العينات المحفوظة على بطاقات FTA™ تم تنظيف القطعة الصغيرة بالكحول لمنع التلوث المتبادل. تمت معالجة القطعة الصغيرة حسب تعليمات الشركة الصانعة. تم غسل القطعة الصغيرة ثلاث مرات باستخدام كاشف تنقية FTA™ لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة الغرفة ، متبوعا بغسيلين مع TE (10 mm pH Tris ، 8.0 ، 0.1 mm EDTA) . تم تجفيف القطعة الصغيرة المغسولة لمدة 30 دقيقة عند 60 درجة مئوية.

توضع FTA™ في أنابيب PCR ، بعد إضافة المكونات التالية وتعديل الحجم النهائي إلى 50 µl مع ماء مقطر مزدوج معقم: (200 nM لكل برايمر ، 800 µM DNTPs ، 1.5 mM MgCl₂ و 2.5 U: Taq polymerase . تم إجراء إعداد التفاعل الحراري والدوران وحسب الإجراءات الموضحة في دليل المستخدم لنظام PowerPlex® Fusion System (PC) . تم حفظ منتجات التفاعل عند 4 °C حتى الاستخدام (Vanek *et al.*, 2001) (Milne *et al.*, (Smith and Burgoyne, 2004) (Salvador and De Ungria, 2003) (2006).

7-2-3 الترحيل الكهربائي capillary electrophoresis

تم الكشف عن نتائج تفاعل السلسلة المتبلمر وفصلها بوساطة جهاز الترحيل الكهربائي الشعري 3500 محلل وراثي التطبيقي (Thermo Fisher Scientific, Oyster Point, CA) مع برنامج GeneMapper ID- X 1.4 حسب بروتوكول الاستخدام لكل مجموعة كالأتي :

- 1- تحضير خليط من 0.5 µl من ILS500 (standard WEN Internal Lane Standard) و 9.5 µl من Hi-Di™ Formamide.
- 2- نقل 10 µl من الخليط إلى كل حقل.
- 3- إضافة 1.0 µl من منتجات PCR إلى كل حقل.
- 4- إجراء الترحيل الكهربائي الشعري باستخدام إعدادات التشغيل كما هو موضح من قبل الشركة المصنعة لنظام PowerPlex® Fusion System - Promega Corporation .

8-2-3 تحليل البيانات :

تم تحليل جميع العينات باستخدام برنامج (GMID-X) GeneMapper® ID-X v1.4 التطبيقي Biosystems. تم استخدام الإصدار 1.2 من لوحات PowerPlex® Fusion. تم استخدام القيم الافتراضية للشركة المصنعة stutter filters في التحليل. كما تم إعداد الجداول والأشكال باستخدام برنامج Microsoft Office Excel 2016.

كما تم استخدام برنامج 3 GenoProof (Qualitytype GmbH, Dresden, Germany). لحساب العوامل الوراثية التي تهم الطب الشرعي، أي قوة التمييز، وقوة الاستبعاد، ومؤشر الأبوة، واحتمالية التطابق (Dumache *et al.*, 2017). كذلك تم استخدام اختبار T-test للعينة الواحدة لتحليل بيانات كمية الحامض النووي باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS V.23.

الفصل الرابع

النتائج و المناقشة

الفصل الرابع النتائج و المناقشة

1-4 جمع العينات

جمعت العينات من صالات العمليات التابعة الى مستشفيات الشهيد غازي و الكندي التعليمي من الاشخاص المرضى والمصابين من سكنة محافظة كربلاء بعد ان تم الحصول على موافقتهم واخذ المعلومات الخاصة بهم كما موضحة بالجدول (1-4) (Hasap *et al.*, 2020).

المتغيرات	العدد	النسبة (%)
1. الجنس	33	66
	17	34
2. العمر	20	40
	15	30
	15	30
3. الحالة الاجتماعية	17	34
	28	56
	5	10
	-----	-----
4. المهنة	16	32
	9	18
	7	14
	16	32
	2	4
5. الامراض	8	16
	37	74
	5	10
6. العلاج	45	90
	5	10
7. البتر	45	90
	5	10
8. نوع العظم	13	26
	9	18
	3	6
	3	6
	2	4
	8	16
	2	4
	9	18
	1	2

جدول (1-4) المعلومات التي تم اخذها من الاشخاص المرضى بعد الحصول على العينات منهم

2-4 استخلاص الحامض النووي

تم استخلاص الحامض النووي حسب العدة الجاهزة EZ1 DNA Investigator Kit والبروتوكول المستخدم في مديرية تحقيق الادلة الجنائية التابعة لوزارة الداخلية العراقية باستخدام جهاز Qiagen EZ1 Advanced XL.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Stangegaard *et al.*, 2009) (Davis *et al.*, 2012)

(Hanley, 2018) حول عملية الاستخلاص الالي للحمض النووي بواسطة جهاز EZ1 Advanced XI.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Zupanič Pajnič *et al.* 2012) (Abuidrees *et al.*, 2016) في تحديد كفاءة طرائق الاستخراج بالاعتماد على تقنية استخراج EZ1 advanced XL والذي تم الحصول على ملفات STR أكثر نقاوة مقارنة بالطريقة العضوية وعدم وجود اي ملوثات او تسرب أليي.

3-4 تقدير كمية الحامض النووي

تم قياس كمية الحامض النووي باستخدام العدة الجاهزة Quantifier® Trio Quantification Kit (Applied Biosystems® Foster City, CA). تم تحضير جميع تفاعلات Quantifier® Trio حسب العدة الجاهزة، تم قياس جميع العينات باستخدام نظام تفاعل السلسلة المتبلر في الوقت الحقيقي 7500 (Applied Biosystems®, Foster City, CA).

قبل البدء في اختبار قياس كمية الحامض النووي ، يجب إدخال اسم العينة في الحقل المطلوب. يتم عرض النتائج في تنسيقات مختلفة كالرسم البياني و الجدول ، والتي توفر معلومات مختلفة حول الاختبار الذي تم إجراؤه.

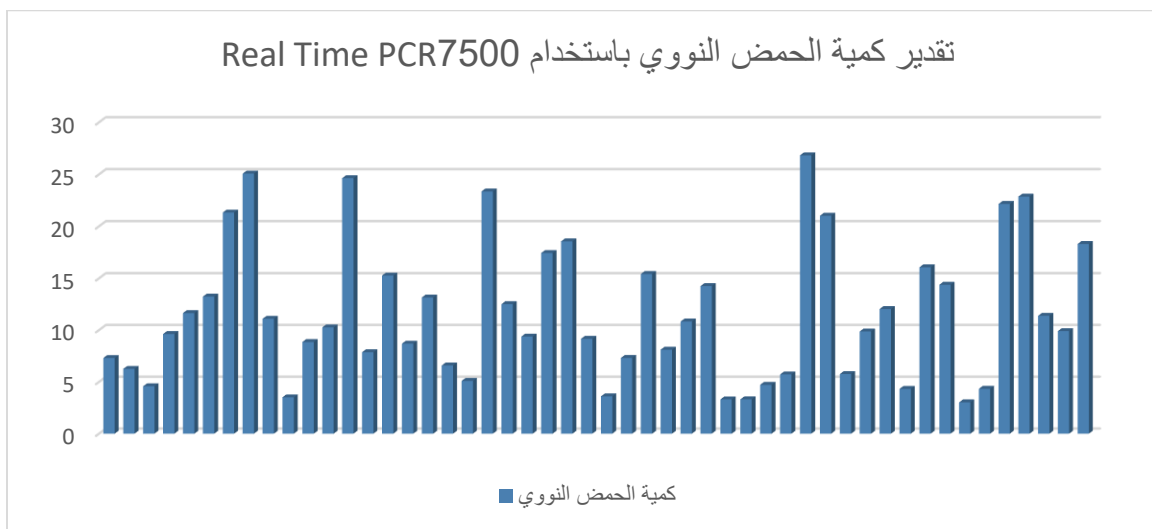
تم الحصول على كمية الحامض النووي و قيم التحكم الداخلي لتفاعل البلمرة المتسلسل internal PCR control (IPC) لتحديد ما إذا كانت العينة تحتوي على مثبطات والتخفيفات اللازمة لمرحلة تكثير الحامض النووي كما موضح في الجدول (2-4)

جدول (2-4) نتائج تقدير كمية الحامض النووي ومقدار التخفيف لكل عينة ومؤشر التحكم الداخلي لتفاعل البلمرة المتسلسل (IPC).

رقم العينة	DNA كمية ng/ µl	التحكم الداخلي لتفاعل البلمرة المتسلسل	التخفيف المطلوب
S1	7.3	28.203	35.5
S2	6.25	27.561	30.9
S3	4.576	27.842	21.5
S4	9.616	28.468	47.1
S5	11.635	28.452	57.2
S6	13.227	27.977	65.1
S7	21.316	28.281	105.6
S8	25.065	28.162	124.3
S9	11.089	N/A	54.4
S10	3.504	27.696	16.5
S11	8.843	29.14	43.2
S12	10.255	26.768	50.6
S13	24.628	28.959	120.8
S14	7.86	8.348	38.3
S15	15.256	28.961	75.3
S16	8.686	29.028	42.4
S17	13.139	29.054	64.7
S18	6.579	29.028	32.65
S19	5.089	28.566	24.4
S20	23.348	29.416	115.7
S21	12.5	27.256	61.7
S22	9.369	27.958	45.8
S23	17.43	28.145	85.9
S24	18.553	28.193	91.8
S25	9.156	27.119	45.2
S26	3.602	27.575	17.0
S27	7.309	28.018	35.5
S28	15.41	27.955	76.0
S29	8.105	27.778	39.5

53.1	28.516	10.826	S30
70.2	28.516	14.243	S31
15.5	28.235	3.304	S32
15.6	28.141	3.311	S33
22.5	27.957	4.712	S34
27.6	28.145	5.721	S35
131.9	28.43	26.822	S36
104.1	28.912	21.015	S37
27.8	27.427	5.754	S38
48.3	27.851	9.866	S39
59.263	28.663	12.029	S40
20.6	28.091	4.319	S41
14.1	27.724	3.021	S42
70.9	28.194	14.371	S43
79.2	27.286	16.054	S44
20.7	28.171	4.331	S45
109.7	29.361	22.149	S46
111.6	27.437	22.85	S47
55.9	29.259	11.379	S48
48.5	28.858	9.899	S49
90.5	28.916	18.301	S50

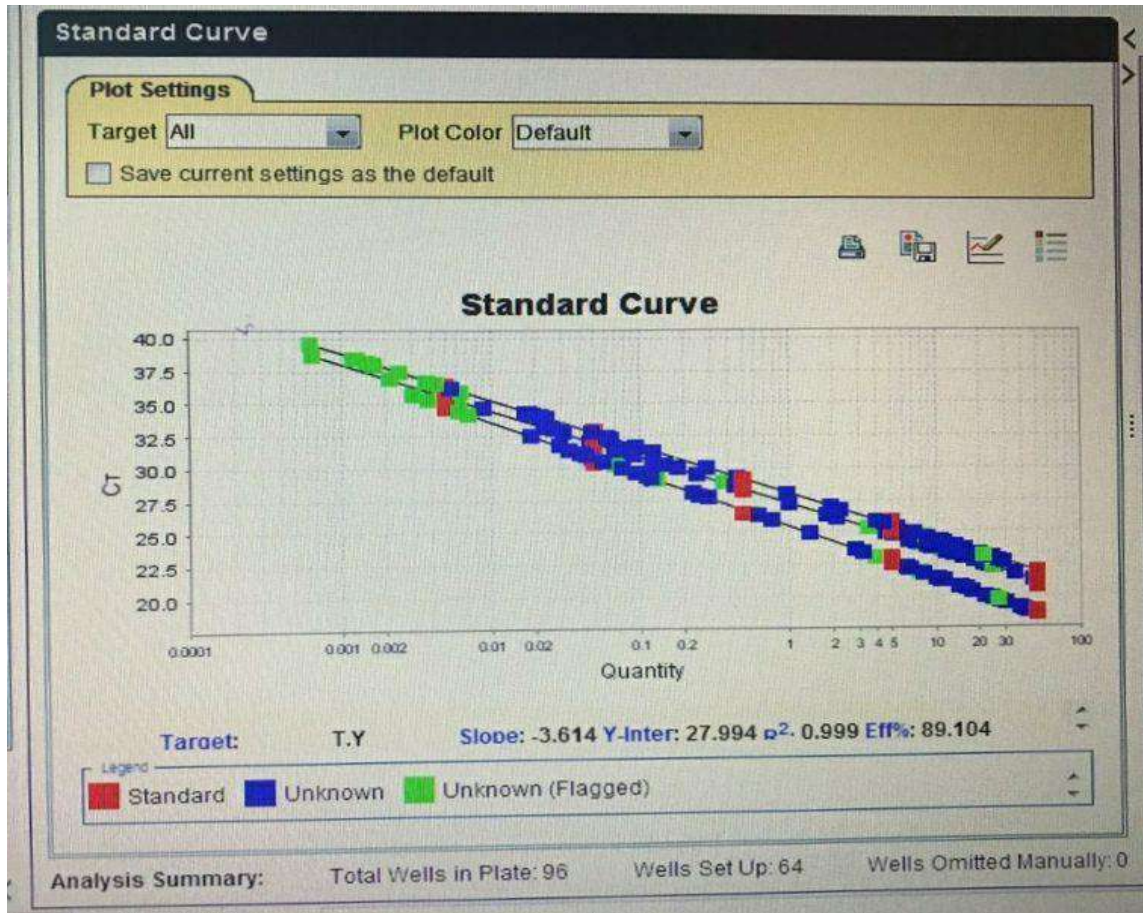
كانت القيم التي تم الحصول عليها لتركيز الحامض النووي تتراوح من 3.021 الى 26.822.



شكل رقم (1-4) رسم بياني لتركيز المادة الوراثية للعينات

أظهر اختبار تحكم PCR الداخلي (IPC) أن مثبطات PCR تمت إزالتها بنجاح من جميع عينات الحامض النووي المستخرج خلال Real Time-PCR ، مما يدل على قيم $CT > 30$. يعود ذلك إلى استخدام طريقة استخلاص الحامض النووي عالي الفعالية أدى إلى تحسين قياس كمية الحامض النووي وإزالة مثبطات PCR (Lee et al., 2010).

تم الحصول على المنحنى القياسي عن طريق متوسط قيم CT كما مبين في الشكل (2-4) ، المنحنى القياسي لديه معامل ارتباط قدره $(R^2 = 0.999)$.



الشكل (2-4) المنحنى القياسي لتقدير كمية الحامض النووي بواسطة جهاز 7500 Real Time-PCR

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Vernarecci *et al.* 2015) في استخدام العدة الجاهزة لتقدير كمية الحامض النووي Quantifiler1 Trio Kit باعتباره يمثل عدة جيدة في إدارة العينات في مختبرات الطب الشرعي ، ولتوفير الوقت والمال وزيادة كفاءة تحديد نمط الحامض النووي.

كذلك اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Phua *et al.* 2019) في استخدام عينات العظام الطازجة، والذي ادى الى الحصول على تركيزات كافية من الحامض النووي الضرورية في تحديد نمط مواقع STR، وتم ذلك خلال استخدام المحلول المنظم والذي ساعد في تحطيم مصفوفة العظام ومن ثم إطلاق الحامض النووي بداخله.

بينما لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع (Kitayama *et al.*, 2010) حيث تم استخلاص الحامض النووي من دون الحاجة الى تحويله الى مسحوق ناعم.

4-4 تضخيم وتحليل بيانات الحامض النووي

تم تضخيم المادة الوراثية بواسطة جهاز PCR system 9700 لعينات العظم والدم، بحسب العدة الجاهزة (Promega Corporation, 2017) والطريقة المستخدمة في مختبرات الادلة الجنائية. تم الحصول على ملفات تعريف الحامض النووي كاملة لجميع المواقع مع علامات الجنس amelogenin من عينات الحامض النووي المختلفة ثم تمت معالجة هذه العينات وتحليلها بواسطة GeneMapper ID- X 1.4 Software.

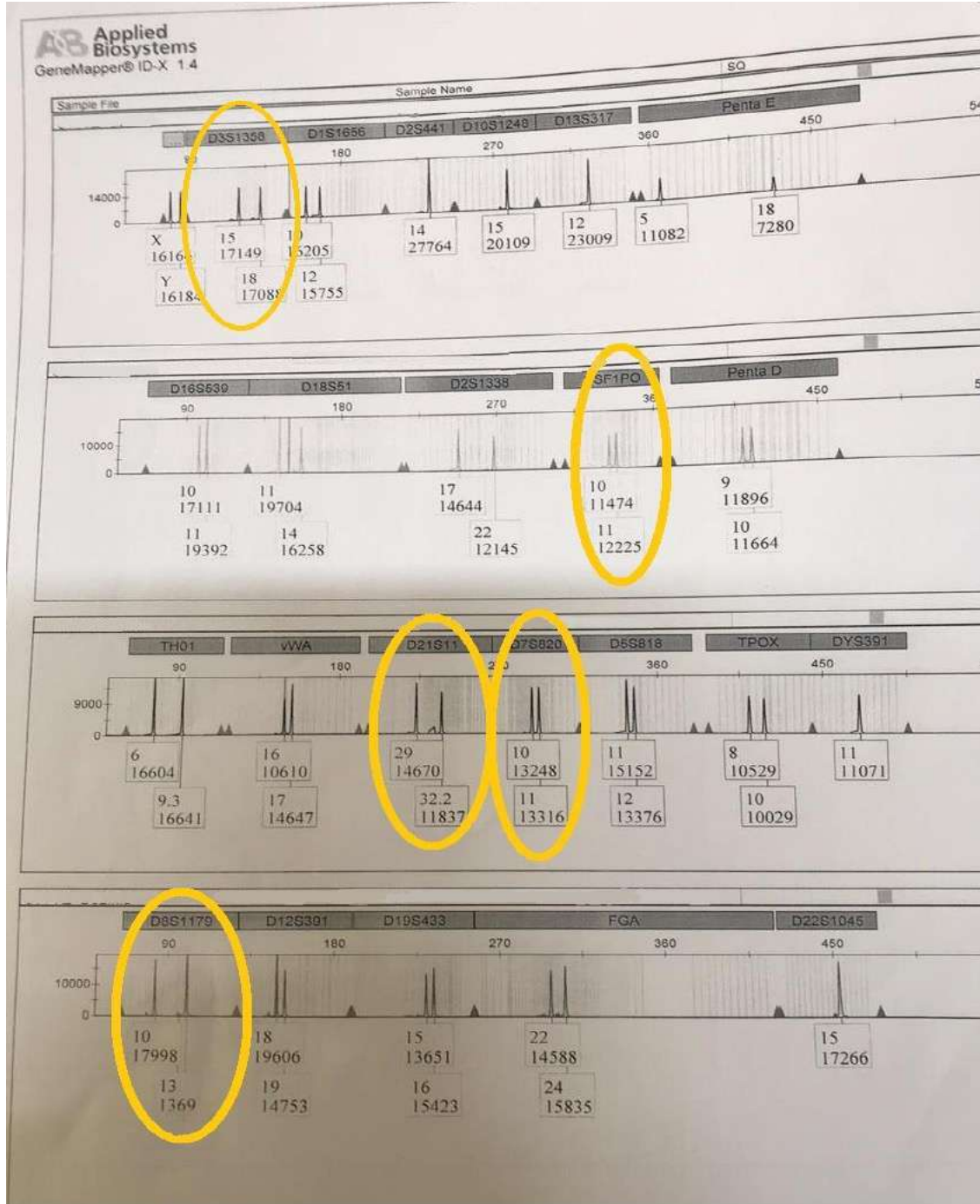
اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Vernarecci *et al.* 2015) ودراسة (Wheeler *et al.* 2017) والتي بينت ان نجاح عملية تضخيم مواقع STR لا تتغير بحسب كميات الحمض النووي التي تم الحصول عليها من العينات، فعند تضخيم العينة S42 والتي كانت قيمة كمية الحامض النووي فيها 3.021 والتي تعتبر اقل قيمة للحامض النووي التي تم الحصول عليها عن طريق تقدير الكمية والتي اعطت ملف كامل للحامض النووي عن طريق ظهور جميع مواقع STR اثناء التضخيم.

5-4 اظهار السمات الوراثية

تمت معالجة السمات الوراثية عن طريق تقنية PCR باستخدام مجموعه PowerPlex® Fusion System الذي يستخدم لتطبيقات تحديد الهوية البشرية بما في ذلك تحليل الطب الشرعي واختبار العلاقة واستخدامات البحث بالإضافة إلى أنه يحتوي على معدل أعلى من التمييز (Turrina *et al.*, 2014). يسمح النظام بالتكوين المشترك والكشف عن الفلورسنت بأربعة ألوان لـ أربعة وعشرين موقعاً (ثلاثة وعشرين موقع STR و علامة الجنس أميلوجينين) ، والذي يتضمن:

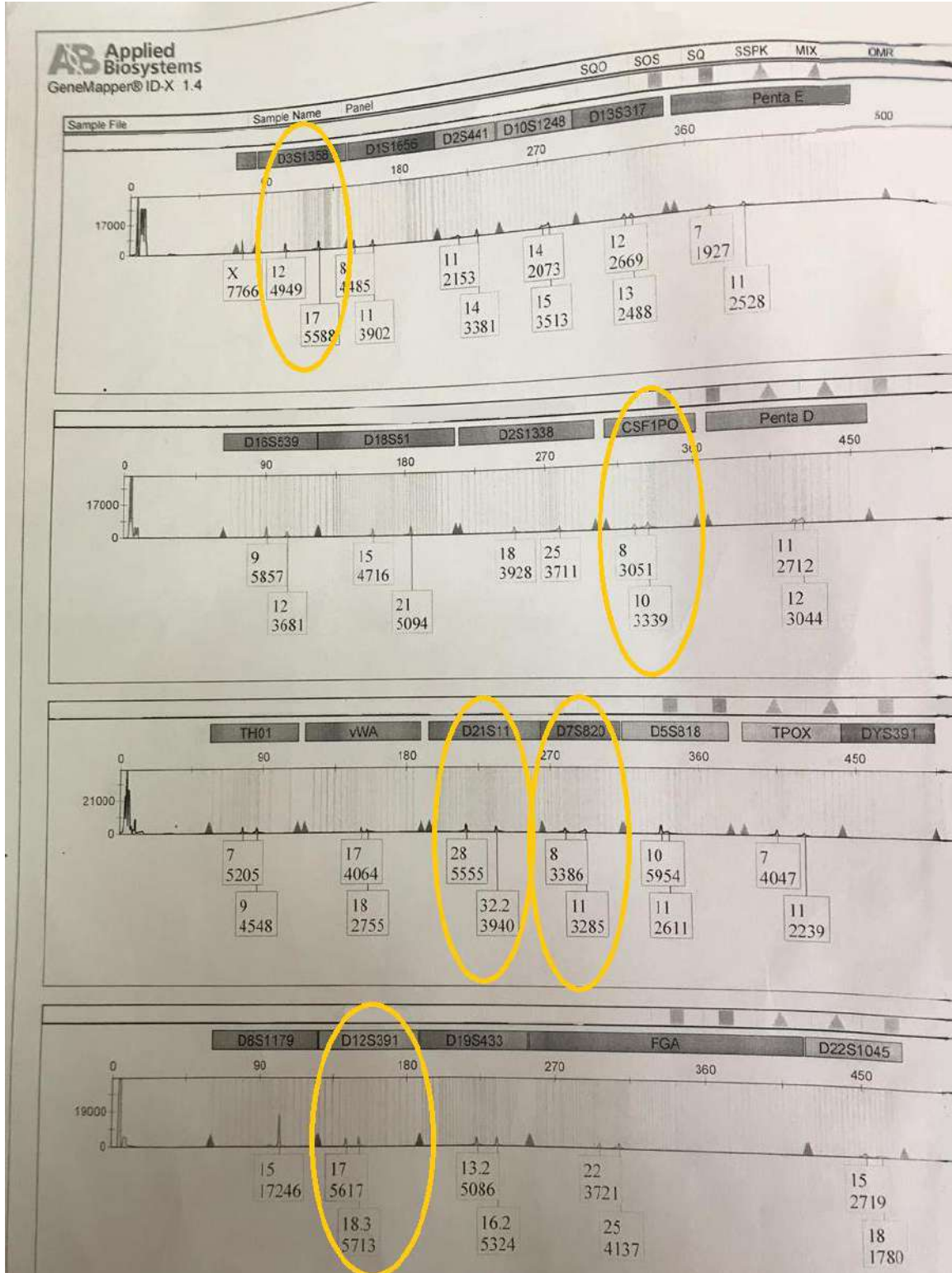
D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, Penta E, D16S539,
,D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, vWA, D21S11, D7S820
. FGA, DYS391, D22S1045,D19S433 , D12S391, TPOX, D8S1179,D5S818

تم ادراج ملفات STR الخاصة بالاشخاص التي تم الحصول عليها من عينات مختلفة كما موضحة في الاشكال (3-4) و (4-4) :



شكل رقم (3-4) ملف STR للعينة S42. يظهر فيها السمات الوراثية لـ 24 موقع.

تمثل الارقام والتي تم احاطتها في الدائرة الصفراء ارقام الاليلات لمواقع الـ STR



شكل رقم (4-4) ملف STR للعينة S28. يظهر فيها السمات الوراثية لـ 23 موقع.

تمثل الأرقام والتي تم أحاطتها في الدائرة الصفراء أرقام الأليلات لمواقع الـ STR

جدول (3-4) السمات الوراثية التي تم الحصول عليها من 50 عينة عظم عن طريق تحليلها احصائيا بوساطة برنامج

.GeneMarker Software (HID)

Sample	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Locus								
D3S1358	15/17	12/17	15/16	15	15/17	15/17	17/18	16/16
CSF1PO	10/12	10/13	11	11/12	10/12	11/12	11/11	10/12
D21S11	30/32.2	28/29	29/32.2	29/32.2	28/30	30/30	29/29	28/29
D7S820	10/12	8/9	9/11	10	10/11	8/10	10/11	11/12
D8S1179	13	12/15	10/11	10/11	13	11/12	11/15	12/12
sample	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
Locus								
D3S1358	16/17	15/16	15/16	16/18	16/18	16/17	18/18	15/16
CSF1PO	11/13	11/11	11/12	11/12	10/11	11/12	11/11	11/12
D21S11	29/30	31/32	29/31	27/28	29/29	30.2/32.2	27/28	28/30
D7S820	8/10	8/11	11/12	10/12	11/11	8/12	8/10	8/11
D8S1179	13/13	12/14	11/15	15/16	14/14	15/16	13/15	10/11
Sample	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24
Locus								
D3S1358	15/17	16/18	15/18	16/17	16/17	16	16	16/17
CSF1PO	10/12	11/12	10/12	11/12	11/12	12	12	19
D21S11	27/29	29/30	28/29	29/30	29/30	29/30	29/30	29/33.2
D7S820	11/12	10/12	11/12	10/12	8/11	11/12	8	8/12
D8S1179	14/15	12/14	14/16	15	8/13	13	12/13	12/13
Sample	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32
Locus								
D3S1358	15/16	16/18	16/14	12/17	16/16	15/17	16/17	15/16
CSF1PO	12	11/12	10/12	8/10	11/12	11/12	12/12	10/13
D21S11	29/30	29	31.2/33.2	28/32.2	30/31	27/30	29/30.2	29/30
D7S820	11/12	8/11	8/10	8/11	11/11	8/8	11/12	11/11
D8S1179	13/15	11/13	13	17/18.3	11/13	13/13	14/16	14/14
Sample	S33	S34	S35	S36	S37	S38	S39	S40
Locus								
D3S1358	15/17	15/16	15/18	15/17	16/17	15	17/18	15/16
CSF1PO	10/11	12/12	11/12	10/13	10/11	11/12	11/12	12
D21S11	28/29	29/30	30/31	30/32.2	30/32.2	29/30	29/30	28/31.2
D7S820	11/12	12/12	8/10	11/12	11/11	8/12	8/10	8/10
D8S1179	12/15	13/15	13/14	10/13	2/14	13/15	13/14	13
Sample	S41	S42	S43	S44	S45	S46	S47	S48

Locus								
D3S1358	15/16	15/18	15/17	16/17	15/17	16/17	15	15/18
CSF1PO	11/12	10/11	9/13	11/12	11/12	11/11	11/12	9/12
D21S11	29/30	29/32.2	29/32.2	28/30	28/29	31/31.2	29/30	27/29
D7S820	10/12	10/11	9/11	10/12	10/12	11/12	10/10	10/11
D8S1179	14/15	10/13	12/15	13	12/13	12/15	12/13	10/16
Sample	S49	S50						
Locus								
D3S1358	16/17	15/17						
CSF1PO	10	9/12						
D21S11	28/29	28/31						
D7S820	9/11	11						
D8S1179	12/13	15/16						

السمات الوراثية لكل منها قمة واحدة أو اثنتين في كل موقع ، وتمثل كل قمة معينة أليلا محددًا. في كل موقع قمتان للأليل غير متماثل (hetero allele) وقمة واحدة للأليل المتماثل (homo allele). جميع القمم التي يبلغ ارتفاعها أكثر من 300 وحدة فلورسنت نسبي (RFU) لقمم متماثل الزيجوت وقيم الأميلوجينين وما لا يقل عن 50 (RFU) لموقع متغاير الزيجوت، وهذا يعني أن جميع القمم مقبولة بحسب تعليمات الشركة المصنعة لتمثيل الأليل الحقيقي (Huel et al., 2012).

موقع (D3S1358) نلاحظ وجود قمة واحدة في العينات (S4 , S22 , S23 , S38 و S47). موقع (CSF1PO) نلاحظ وجود قمة واحدة في العينات (S3 , S22 , S23 , S24 , S25 , S28 , S40 و S49). موقع (D21S11) نلاحظ وجود قمة واحدة في العينات (S26) فقط . موقع (D7S820) نلاحظ وجود قمة واحدة في العينات (S4 , S23 و S50). موقع (D7S820) نلاحظ وجود قمة واحدة في العينات (S1 , S5 , S20 , S22 , S27 , S28 و S40) والتي تمثل الأليل المتماثل.

في الشكل (3-4) اظهر 24 موقع STR في ملف الحامض النووي بينما في الشكل (4-4) ظهر 23 موقع STR إذ لم يظهر موقع DYS391 كون هذا الموقع يضخم فقط في الذكور، حيث تم تضمين موضع DYS391 الخاص بالذكور لتحديد نتائج الأليل Y (Nazal et al., 2020).

اغلبه القمم كانت مرتفعة؛ وذلك يعتمد على كمية الحامض النووي وارتفاع وحدة الفلورسنت، كذلك لم يمكن هنالك أي تسرب للليل، إذ تم ظهور الأليلات في جميع مواقع STR لل 50 عينة المدروسة .

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Loreille *et al.* 2007) بتوفير بروتوكول إزالة المعادن ميزة كبيرة لاستخراج الحمض النووي بنجاح ، خاصة بالنسبة للعينات الصعبة مثل عينات العظام، والتي تم ملاحظة زيادة تراكيز الحمض النووي وكذلك زيادة جودة ملفات تعريف STR.

بينما لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع (Caputo *et al.* 2013) والتي بينت ان ملفات الحامض النووي لمواقع STR كانت في شرائح العظام افضل من مسحوق العظام، إذ تم ملاحظة تأثيرات عشوائية مثل تسرب الليل.

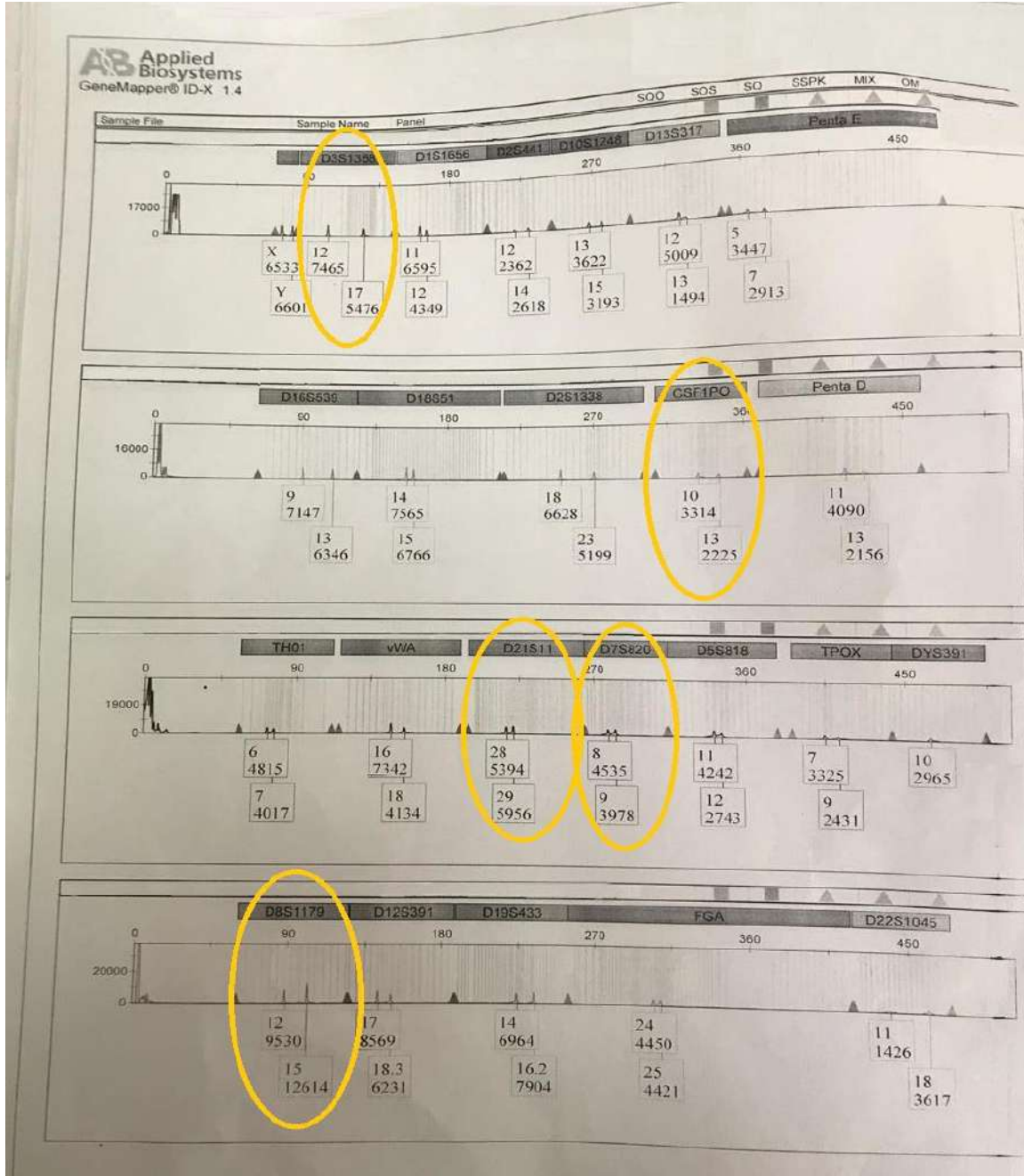
اظهرت دراسة (Thiede *et al.* 1999) عن طريق تضخيم اربع وعشرين موضعا من مواقع STR بنجاح ثم تحليلها بواسطة المحلل الجيني (Genetic Analyzer)، تم فحص ملفات تعريف STR بحثاً عن وجود مخاليط (أكثر من ذروتين لمتغاير الزيجوت) ، وأظهرت النتائج عدم وجود مخاليط في العينات وهذا يتفق مع نتائج دراستنا.

4-6 حساب مؤشر الأبوة

يعتمد اختبار الأبوة على الأليلات المطابقة في 24 موقع STR بين الطفل والأم والأب (الحالات الثلاث). في هذه الحالة ، لم يلحظ أي تناقض جيني للعلاقة المزعومة بين الأب والطفل في أي من مواقع STR 24.

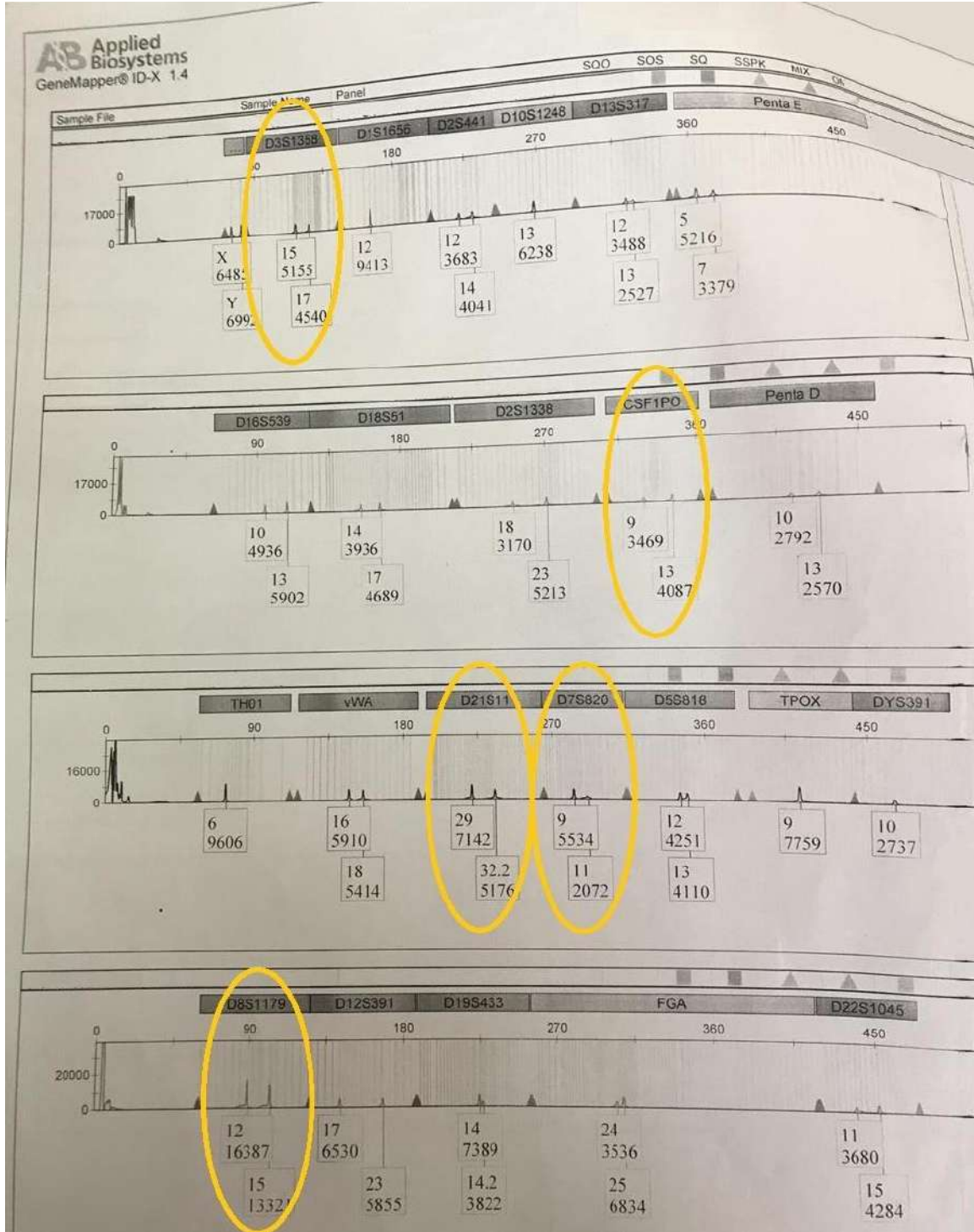
تم حساب مؤشر الأبوة والأمومة المدمج (CPI) واحتمالية الأبوة (W) للحالات الثلاث القياسية باستخدام برنامج GenoProof3 (Dumache *et al.*, 2017).

تم حساب مؤشر الايوة لـ 24 موقع و 5 مواقع STR لـ 16 عينة إذ تم الحصول على النتائج الموضحة ادناه :



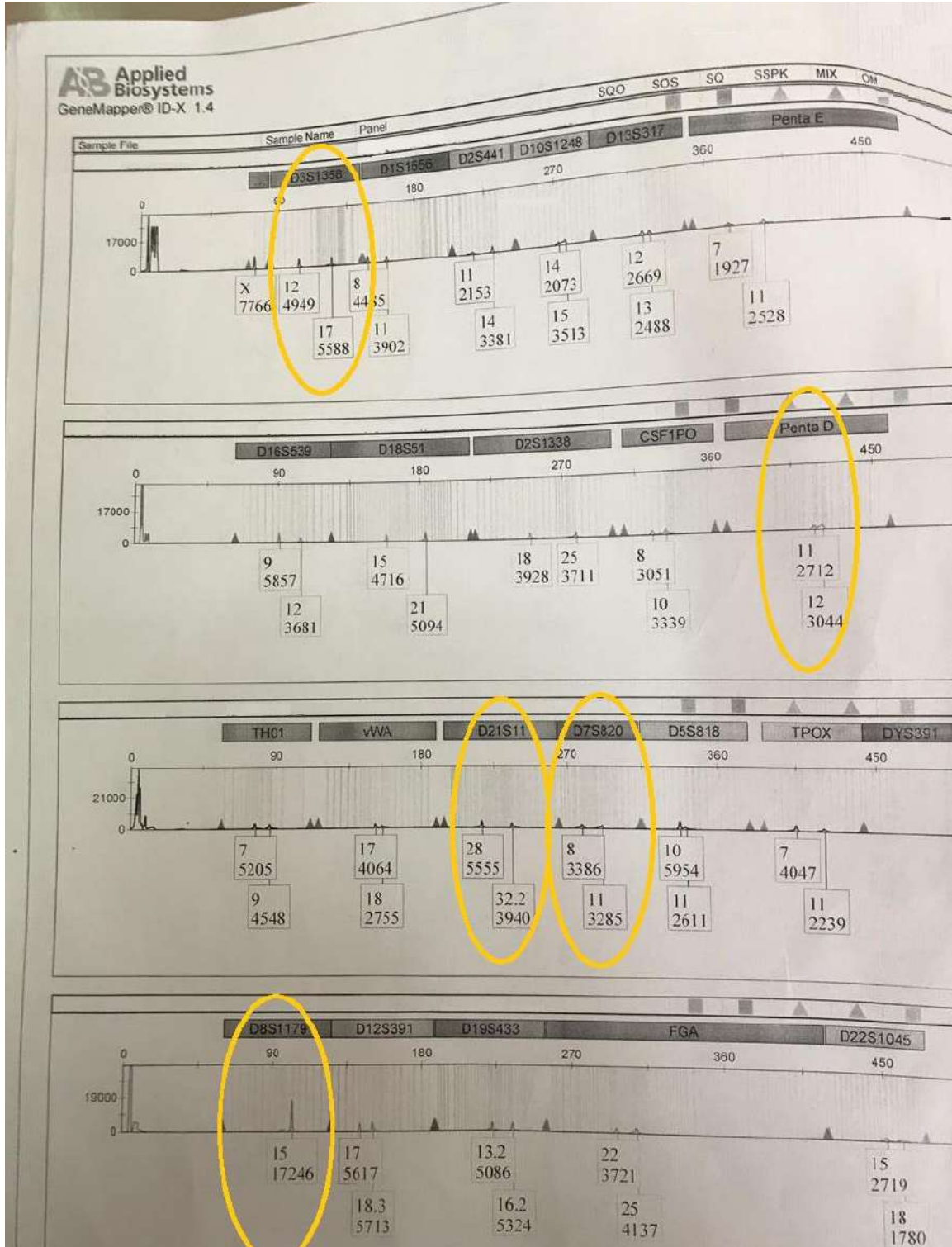
شكل رقم (4-5) صورة توضيحية للملف الشخصي STR للعينة S2 للابن. يظهر فيها كل السمات الوراثية لـ 24 موقع.

تمثل الارقام والتي تم احاطتها في الدائرة الصفراء ارقام الاليلت لمواقع الـ STR



شكل رقم (4-6) صورة توضيحية للملف الشخصي STR للعينة S2F للاب. يظهر فيها كل السمات الوراثية لـ 24 موقع

تمثل الارقام والتي تم أحاطتها في الدائرة الصفراء ارقام الاليلات لمواقع الـ STR



شكل رقم (7-4) صورة توضيحية للملف الشخصي STR للعينة S2M للام. يظهر فيها كل السمات الوراثية لـ 24 موقع

تمثل الارقام والتي تم أحاطتها في الدائرة الصفراء ارقام الاليلات لمواقع الـ STR

Case 1

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	15/17	16/17	15/18
D1S1656	13/15	12/13	11/15
D2S441	11/14	14	11
D10S1248	14/16	13/14	13/6
D13S317	12/14	12/14	12
Penta E	10/18	17/18	10
D16S539	11/12	11/12	11
D18S51	16	13/16	16
D2S1338	24	24/25	24
CSF1PO	10/12	11/12	10/12
Penta D	10	9/10	10
TH01	7/9	9	7/9
vWA	17	17	17/18
D21S11	30/32.2	28/30	32.2/33.2
D7S820	10/12	10/12	12
D5S818	11/12	11/12	11/12
TPOX	11/12	11/12	8/11
DYS391	10	10	--
D8S1179	13	13	13
D12S391	20	20	20/21
D19S433	13.2/14	14/14.2	13/13.2
FGA	22/26	22/23	20/26
D22S1045	16/17	16	16/17

جدول (4-4) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S1 لالابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 652,559,360,682

CPE: 99.999999999%

Probability: 99.9999999998%

5 مواقع

CPI: 27

CPE: 96.8783618408%

Probability: 96.3638147495%

Case 2

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	12/17	15/17	12/17
D1S1656	11/12	12	8/11
D2S441	12/14	12/14	11/14
D10S1248	13/15	13	14/15
D13S317	12/13	12/13	12/13
Penta E	5/7	5/7	7/11
D16S539	9/13	10/13	9/12
D18S51	14/15	14/17	15/21
D2S1338	18/23	18/23	18/25
CSF1PO	10/13	9/13	8/10
Penta D	11/13	10/13	11/12
TH01	6/7	6	7/9
vWA	16/18	16/18	17/18
D21S11	28/29	29/32.2	28/32.2
D7S820	8/9	9/11	8/11
D5S818	11/12	12/13	10/11
TPOX	7/9	9	7/11
DYS391	10	10	--
D8S1179	12/15	12/15	15
D12S391	17/18.3	17/23	17/18.3
D19S433	14/16.2	14/14.2	13.2/16.2
FGA	24/25	24/25	22/25
D22S1045	11/18	11/15	15/18

جدول (4-5) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S2 لالابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 4,551,267,998,683

CPE: 99.9999999999%

Probability: 99.9999999999%

5 مواقع

CPI: 436

CPE: 99.8499100739%

Probability: 99.7713418497%

Case 3

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	15/16	15/18	16/18
D1S1656	12	12/12	12/17.3
D2S441	11/14	14	11/14
D10S1248	13/15	15	13/14
D13S317	12	12	12/13
Penta E	5/8	5/8	7/8
D16S539	9/10	10/11	9/11
D18S51	12/14	11/14	11/12
D2S1338	17	17/22	17
CSF1PO	11	10/11	11/12
Penta D	9/10	9/10	9/10
TH01	6/8	6/9.3	8/9
vWA	17/18	16/17	17/18
D21S11	29/32.2	29/32.2	29
D7S820	9/11	10/11	9/10
D5S818	12	11/12	12
TPOX	8/10	8/10	8/11
DYS391	11	11	--
D8S1179	10/11	10/13	11/13
D12S391	18/19	18/19	18/21
D19S433	15/16	15/16	15/16
FGA	23/24	22/24	23/24
D22S1045	11/15	15	11

جدول (4-6) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S3 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 305,372,452,857

CPE: 99.999999973%

Probability: 99.999999996%

5 مواقع

CPI: 52

CPE: 98.7526449922%

Probability: 98.1097613437%

Case 4

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	15	15/16	15/17
D1S1656	12	12/13	12/15
D2S441	14	11/14	14
D10S1248	12/14	12/14	14/16
D13S317	11/12	8/11	11/12
Penta E	7/11	5/7	11/13
D16S539	10/12	10/12	11/12
D18S51	14	14/18	14
D2S1338	17/20	17/18	17/20
CSF1PO	11/12	11/12	10/12
Penta D	11	9/11	11
TH01	8/9.3	8	9/9.3
vWA	16/17	16/18	17/18
D21S11	29/32.2	29/30	29/32.2
D7S820	10	10/12	8/10
D5S818	13	10/13	13
TPOX	8	8/9	8
DYS391	--	--	--
D8S1179	10/11	10/15	11/14
D12S391	18/24	18/23	20/24
D19S433	12/14	14	12/14
FGA	21	21/29.2	21/24
D22S1045	11	11/15	11/17

جدول (4-7) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S4 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 2,008,537,679

CPE: 99.999999868%

Probability: 99.999999502%

5 مواقع

CPI: 63

CPE: 99.1623902647%

Probability: 98.4385937944%

Case 5

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	15/17	15/16	15/17
D1S1656	15/16	15/17	12/16
D2S441	12/14	11/12	12/14
D10S1248	14/15	13/15	13/14
D13S317	8/12	8/12	12/13
Penta E	5/7	5/18	7/9
D16S539	11/13	9/13	11/13
D18S51	18/21	14/21	18/22
D2S1338	17	17/20	17/24
CSF1PO	10/12	12	10
Penta D	12/13	12	10/13
TH01	6/9	6/9.3	6/9
vWA	15/16	16/19	15/17
D21S11	28/30	28/31.2	30/33.2
D7S820	10/11	8/10	10/11
D5S818	12	12	12/14
TPOX	10/12	10/11	10/12
DYS391	7/9	7/9	--
D8S1179	13	13	12/13
D12S391	19/22	19	19/22
D19S433	14/15	13/14	15
FGA	21/23	23/25	21/25
D22S1045	15/16	14/15	15/16

جدول (4-8) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S5 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 3,362,894,053

CPE: 99.999999966%

Probability: 99.9999999702%

5 مواقع

CPI: 35

CPE: 95.5490530918%

Probability: 97.1851748844%

Case 6

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	15/17	17/18	15/16
D1S1656	13/15	11/13	15
D2S441	12/13	10/12	12/13
D10S1248	13/14	14	13/15
D13S317	8/10	8/8	10/13
Penta E	7/18	5/7	5/18
D16S539	12/12	11/12	12/13
D18S51	16/16	15/16	16/17
D2S1338	20/23	20/20	17/23
CSF1PO	11/12	12/12	11/12
Penta D	9	9/13	9
TH01	9/9.3	8/9	8/9.3
vWA	18/20	17/20	18/20
D21S11	30/30	29/30	29/30
D7S820	8/10	8/10	10/10
D5S818	13/13	10/13	12/13
TPOX	8/8	8/8	8/8
DYS391	11	11	--
D8S1179	11/12	11/13	12/13
D12S391	19/20	18/19	19/20
D19S433	15/17	13/15	15/17
FGA	23/24	21/23	20/24
D22S1045	16	11/16	16/17

جدول (9-4) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S6 لابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 33,542,176,411

CPE: 99.999999922%

Probability: 99.99999997%

5 مواقع

CPI: 182

CPE: 99.4528141774%

Probability: 99.452988982%

Case 7

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	17/18	16/17	16/18
D1S1656	16/18	11/16	16/18
D2S441	10	10/14	10/11
D10S1248	14/15	13/15	14/15
D13S317	12/12	12/12	8/12
Penta E	7/18	15/18	5/7
D16S539	11/12	12/12	10/11
D18S51	14/18	12/18	12/14
D2S1338	16/19	17/19	16
CSF1PO	11/11	11/12	11/12
Penta D	9/12	12/13	9/9
TH01	8/9	7/9	6/8
vWA	19/20	16/19	19/20
D21S11	29/29	29/30	28/29
D7S820	10/11	10/11	10/10
D5S818	9/9	9/9	9/9
TPOX	11/11	9/11	8/11
DYS391	8.3/10	8.3/10	--
D8S1179	11/15	13/15	11/13
D12S391	21/25	15/21	19/25
D19S433	13/14	13/15.2	14
FGA	19/23	19/20	21.2/23
D22S1045	11/15	11	15/16

جدول (4-10) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S7 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 1,093,931,389,095

CPE: 99.9999999998%

Probability: 99.9999999999%

5 مواقع

CPI: 124

CPE: 99.5274548231%

Probability: 99.1983451587%

Case 8

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	16/16	16/17	15/16
D1S1656	16/18.3	16	11/18.3
D2S441	11/11.3	11/14	11/11.3
D10S1248	14	13/14	14/16
D13S317	12/13	13/13	11/12
Penta E	7/11	8/11	5/7
D16S539	12/12	12/13	12/12
D18S51	16/16	16/17	15/16
D2S1338	17/18	18/23	17/18
CSF1PO	10/12	10/11	11/12
Penta D	10	10/11	10
TH01	7/7	7/8	7/8
vWA	17/18	18/18	17/18
D21S11	28/29	29/30	28/29
D7S820	11/12	11/11	10/12
D5S818	11/12	11/12	12/13
TPOX	11/11	9/11	8/11
DYS391	10	10	--
D8S1179	12/12	12/14	12/13
D12S391	21/25	22/25	15/21
D19S433	13/14	13/14	12/14
FGA	23/24	23/23	23/24
D22S1045	16	16/17	15/16

جدول (4-11) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S8 لابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 25,017,963,856

CPE: 99.999999925%

Probability: 99.99999996%

5 مواقع

CPI: 92

CPE: 98.8822662247%

Probability: 98.9238790571%

Case 9

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	16/17	15/17	14/16
D1S1656	15	15/17	15
D2S441	11/11.3	10/11	11/11.3
D10S1248	14/16	11/14	16
D13S317	12/13	12/13	12/13
Penta E	5/10	5/7	10/12
D16S539	12/12	11/12	9/12
D18S51	13/14	12/14	13/13
D2S1338	18/20	20/20	17/18
CSF1PO	11/13	10/13	11/12
Penta D	10/11	9/11	10/13
TH01	6/7	6/6	6/9
vWA	16/18	15/18	16/18
D21S11	29/30	30/32.2	29/30
D7S820	8/10	10/12	8/10
D5S818	12	8/12	11/12
TPOX	8/9	9/11	8/10
DYS391	10	10	--
D8S1179	13/13	13/14	13/15
D12S391	19/20	19/20	19/25
D19S433	12/12	12/14	12/14
FGA	21/21	19/21	20/21
D22S1045	16/17	16/17	11/16

جدول (4-12) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S9 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 453,038,745

CPE: 99.999999632%

Probability: 99.9999997792%

5 مواقع

CPI: 37

CPE: 98.789517707%

Probability: 97.3400326643%

Case 10

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	15/16	15/18	16/17
D1S1656	11/16.3	11/16	15/16.3
D2S441	10	10/11	10
D10S1248	13/15	13/15	14/15
D13S317	11/12	9/12	9/11
Penta E	5/11	7/11	5/7
D16S539	10/12	10/12	10/12
D18S51	14/18	14/18	15/18
D2S1338	19/22	19/21	20/22
CSF1PO	11/11	11/12	11/11
Penta D	9	9/15	9/13
TH01	7/7	7/9	7/8
vWA	14/17	14/15	17/18
D21S11	31/32	30/32	31/31.2
D7S820	8/11	8/10	11/12
D5S818	12/14	13/14	10/12
TPOX	8/9	8/11	8/9
DYS391	10/10	10/10	--
D8S1179	12/14	13/14	12/15
D12S391	18/18	18/23	18/18.3
D19S433	13/14	14/14	13/15.2
FGA	23/23.2	22/23.2	23/23
D22S1045	15/16	16/17	11/15

جدول (4-13) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S10 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 4,837,584,758,232

CPE: 99.9999999999%

Probability: 99.9999999999%

5 مواقع

CPI: 1,014

CPE: 99.9394630966%

Probability: 99.9014889248%

Case 11

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	15/16	15/16	15/15
D1S1656	11/13	12/13	11/17.3
D2S441	10/11	10	11/14
D10S1248	14/15	13/15	14/15
D13S317	8/12	12/12	8/11
Penta E	7/18	5/7	5/18
D16S539	11/14	11/13	11/14
D18S51	17/18	13/17	17/18
D2S1338	19/20	20/22	19/19
CSF1PO	11/12	12/12	11/12
Penta D	11/13	10/13	11/12
TH01	6/9.3	6/7	9/9.3
vWA	17/18	15/18	16/17
D21S11	29/31	29/30	29/31
D7S820	11/12	12/12	10/11
D5S818	12/13	11/12	11/13
TPOX	8/8	8/11	8/8
DYS391	11/11	11/11	--
D8S1179	11/15	13/15	11/13
D12S391	18/19	19/20	18/19
D19S433	15/15.2	15/15	13/15.2
FGA	23/23	21/23	23/25
D22S1045	11	11/15	11/16

جدول (4-14) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S11 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 3,068,923,208

CPE: 99.9999999494%

Probability: 99.9999999674%

5 مواقع

CPI: 220

CPE: 99.1396518417%

Probability: 99.5470634036%

Case 12

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	16/18	15/16	15/18
D1S1656	13/15	12/13	11/15
D2S441	12/14	12/14	11/14
D10S1248	13/15	15	13/14
D13S317	10/11	8/11	8/8
Penta E	14/15	11/15	14/16
D16S539	13/13	12/13	13/13
D18S51	13/16	13/14	15/16
D2S1338	19/20	20/20	17/19
CSF1PO	11/12	10/11	9/12
Penta D	11/12	10/12	9/11
TH01	6/6	6/7	6/9.3
vWA	16/17	15/16	17/18
D21S11	27/28	28/29	27/29
D7S820	10/12	11/12	10/11
D5S818	11/13	11/11	13/13
TPOX	8/8	8/8	8/8
DYS391	9.3	9.3	
D8S1179	15/16	12/15	10/16
D12S391	18/24	18/23	20/24
D19S433	13/15	12/15	13/13
FGA	20/23	21/23	20/23
D22S1045	15/16	14/15	15/16

جدول (4-15) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S12 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 76,047,184,748

CPE: 99.999999986%

Probability: 99.999999986%

5 مواقع

CPI: 175

CPE: 99.6549334679%

Probability: 99.4322605704%

Case 13

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	16/18	16/18	15/16
D1S1656	12	12/13	12/15
D2S441	11/14	14	11
D10S1248	13/15	13	14/15
D13S317	8/13	8/13	8/11
Penta E	7/14	13/14	7/9
D16S539	9/13	11/13	9/11
D18S51	16/19	13/19	13/16
D2S1338	23/25	16/25	17/23
CSF1PO	10/11	10/13	11/11
Penta D	9/10	10/12	9/10
TH01	7/9	7/9	6/9
vWA	17/18	17/17	16/18
D21S11	29/29	29/30	29/29
D7S820	11/11	11/11	8/11
D5S818	10/12	10/12	10/11
TPOX	8/8	8/12	8/8
DYS391	11	11	--
D8S1179	14/14	14/14	13/14
D12S391	20/23	15/20	16/23
D19S433	13/16	13/14	14/16
FGA	21/21	21/23	21/22
D22S1045	11/15	15	11

جدول (4-16) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S13 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 194,517,436,486

CPE: 99.9999999974%

Probability: 99.9999999994%

5 مواقع

CPI: 324

CPE: 99.292133332%

Probability: 99.691925724%

Case 14

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	16/17	16/17	15/16
D1S1656	12	12/12	12/17.3
D2S441	14	11/14	14
D10S1248	14/16	13/14	13/16
D13S317	8/11	10/11	8/12
Penta E	7/14	12/14	5/7
D16S539	12/13	12/13	12/12
D18S51	14/19	16/19	14/17
D2S1338	17/25	17/20	17/25
CSF1PO	11/12	12/12	10/11
Penta D	11/11	11/12	9/11
TH01	9.3/9.3	6/9.3	9/9.3
vWA	17/17	17/18	17/17
D21S11	30.2/32.2	29/30.2	31.2/32.2
D7S820	8/12	11/12	8/11
D5S818	12/13	13/13	12/13
TPOX	9/11	8/11	11/11
DYS391	10	10	
D8S1179	15/16	14/16	12/15
D12S391	16/18	18/21	16/17
D19S433	12/14	12/14	14/15
FGA	21/21	20/21	20/21
D22S1045	11/18	11/15	15/18

جدول (4-17) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S14 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 176,512,622,425

CPE: 99.999999995%

Probability: 99.999999994%

5 مواقع

CPI: 3,650

CPE: 99.96317257%

Probability: 99.9726069536%

Case 15

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	18/18	16/18	17/18
D1S1656	12	12/13	12/15
D2S441	12/14	11/12	12/14
D10S1248	13/14	14	13/15
D13S317	8/11	9/11	8/11
Penta E	9/11	9/10	11/12
D16S539	8/13	9/13	8/14
D18S51	15/17	16/17	14/15
D2S1338	24	24/25	24
CSF1PO	11/11	11/12	11/13
Penta D	15/16	13/15	14/16
TH01	9/9.3	8/9	9.3/9.3
vWA	16/18	16/17	15/18
D21S11	27/28	27/30	28/30
D7S820	8/10	8/8	10/10
D5S818	12/13	12/13	12/12
TPOX	8/9	8/9	8/11
DYS391	8.3/10	8.3/10	--
D8S1179	13/15	13/13	14/15
D12S391	17/18	15/18	17/17
D19S433	14/16.2	14/14.2	13.2/16.2
FGA	20/24	20/21	24/24
D22S1045	11/15	15	11

جدول (4-18) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S15 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 51,637,272,228,769

CPE: 99.9999999999%

Probability: 99.9999999999%

5 مواقع

CPI: 2,656

CPE: 99.9088492235%

Probability: 99.9623586352%

Case 16

loci	son	father	mother
Amelo	XY	XY	XX
D3S1358	15/16	16/16	15/15
D1S1656	11/16.3	11/16	15/16.3
D2S441	11/11.3	10/11	11/11.3
D10S1248	14/15	13/15	13/14
D13S317	11/11	11/12	11/11
Penta E	11/16	16/19	7/11
D16S539	9/12	12/12	9/13
D18S51	16/18	16/18	14/16
D2S1338	20/23	23/23	18/20
CSF1PO	11/12	11/12	11/12
Penta D	10/12	11/12	8/10
TH01	6/7	7/9.3	6/9
vWA	16/18	18/18	15/16
D21S11	28/30	30/31	28/29
D7S820	8/11	8/11	8/12
D5S818	11/13	10/11	11/13
TPOX	8/8	8/11	8/11
DYS391	11/11	11/11	--
D8S1179	10/11	11/13	10/15
D12S391	19/20	18/19	19/20
D19S433	12/15.2	12/13	15.2/15.2
FGA	19/20	19/24	20/24
D22S1045	16	16/17	15/16

جدول (4-19) السمات الوراثية التي تم الحصول للعينة S16 للابن ، الاب والام لمجموعه استخلاص 24 موقع

24 موقع

CPI: 69,762,623,876

CPE: 99.9999999974%

Probability: 99.9999999985%

5 مواقع

CPI: 258

CPE: 99.2566713139%

Probability: 99.6140048556%

عن طريق التحليلات الاحصائية في برنامج (GenoProof 3) التي اجريناها على السمات الوراثية للحمض النووي للابن، الاب و الام لـ 24 موقع STR و خمسة مواقع STR، نلاحظ ان في الحالة الاولى تم الحصول على تطابق تام لعينات الابن مع عينات الاب والام والتي اعطت نتائج اكثر من 99.9% والتي هي مقبولة بالنسبة للمختبر الجنائي وتوصيات الجمعية الدولية لعلم الوراثة الجنائية (Gornik *et al.*, 2002) International Society for Forensic Genetics (ISFG) (Goodwin *et al.*, 2011). اي ان الابن يحمل نصف الاليات من الاب والنصف الاخر من الام (Olivier, 2001) (Luftig and Richey, 2000).

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (El-Alfy and Abd El-Hafez 2012) اعطت نتائج تحليل الحامض النووي للعينات الثلاث: الأب، الأم والطفل باستخدام نظام تضخيم مواقع STR، وحساب كل من (مؤشر الأبوة / موضع STR) و (مؤشر الأبوة المجتمعة) ، كان احتمال الأبوة محسوبة وكانت أكبر من 99.9%.

كانت الاحتمالات التي تم الحصول عليها في الحالة الثانية لـ 5 مواقع STR لاغلب العينات احصائيا كانت اقل من قيمة التوصية (99.9%) من للمختبر الجنائي وتوصيات الجمعية الدولية لعلم الوراثة الجنائية ، لذا فإن هذه الطريقة ليست الأفضل في هذه الحالة.

الطريقة الثانية هو تحديد النمط الوراثي للابن والاب والام لخمس مواقع STR بحسب الطريقة التالية :

احتمال نسبة احتمالية الأبوة المشترك CPI والذي يساوي مضاعفة مؤشر الأبوة لكل موقع مع الآخر (Farhan *et al.*, 2016).

احتمالية الابوة المشترك = مؤشر الابوة (موقع 1) X مؤشر الابوة (موقع 2) X مؤشر الابوة (موقع 3) X مؤشر الابوة (موقع 4) X مؤشر الابوة (موقع 5).

$$S1/ CPI = 1.9E+03$$

ومن ثم يتم حساب احتمالية مؤشر الابوة على وفق القانون التالي :

$$\text{احتمالية الأبوة} = \frac{CPI * 0.5}{\{CPI * 0.5 + (1 - 0.5)\}}$$

$$\text{احتمالية الابوة} = \frac{CPI}{CPI + 1}$$

$$99.94739611\% = \frac{19000}{19001}$$

وهذه القيمة جيدة ومقبولة بالنسبة للمختبر الجنائي وتوصيات الجمعية الدولية لعلم الوراثة الجنائية (Goodwin *et al.*, International Society for Forensic Genetics (ISFG) (2011).

تم حساب مؤشر الابوة المشترك لجميع الحالات، وتم الحصول على النتائج الموضحة في الجدول (20-4).

sample	CPI	W
S1	1.9E+03	9.99473712%
S2	1.1E+05	99.99990909%
S3	6.5E+03	99.99846156%
S4	4.0E+03	99.99750006%
S5	1.3E+02	99.92313605%
S6	2.2E+03	99.99545475%
S7	6.3E+03	99.99841272%
S8	2.2E+03	99.99545475%
S9	2.3E+04	99.99956522%
S10	3.7E+02	9.97298028%
S11	1.9E+04	99.99947369%
S12	1.9E+04	99.99947369%
S13	2.5E+04	99.9996%
S14	9.3E+04	9.99998925%
S15	3.1E+04	99.99967742%
S16	5.8E+03	99.99827589%

تعريفات : combined parenting index (CPI) مؤشر الابوة المشترك ، cumulative probability of (CPE) ، exclusion الاحتمال التراكمي للاستبعاد، Probability (W) الاحتمالات .

جدول (20-4) نتائج تحديد الابوة لخمس مواقع STR باستخدام طريقه حساب (Goodwin *et al.*, 2011).

جميع النتائج الموضحة في الجدول (4-20) والتي تم استخدام طريقة حساب مؤشر الأبوة فيها اعلاه مقبولة بالنسبة للمختبر الجنائي وتوصيات الجمعية الدولية لعلم الوراثة الجنائية (Goodwin et al., 2011).

توافقت هذه الدراسة مع (Coleman and Swenson., 2000), إذ تم تفسير مؤشر الأبوة، وتم حسابه لكل 24 موقعا ، ثم ضرب قيمة PI الفردية معًا للحصول على مؤشر الأبوة المجتمعة (CPI) لمجموعة كاملة من مواقع الجينات التي تم فحصها. وكانت نسبة حساب مؤشر الأبوة PI اكثر من 99.9% . كذلك اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Butler, 2005) في احتساب نسبة احتمالية الأبوة المشترك CPI والذي يساوي مضاعفة مؤشر الأبوة لكل موقع مع الآخر

فائدة النظام المستخدم في هذه الدراسة في تقييم الأبوة، تم اختبار طريقتين لتحديد الأبوة من عينات الحامض النووي للعظام والدم التي تم الحصول عليها من الابن ، الأب والام. تم حساب احتمالية الأبوة ومؤشر الأبوة المشترك لخمسة مواقع و 24 موقع STR في برنامج Genoproof 3 وكانت النتائج لل 24 موقع بنسبة 99.9% واكثر وهذه النسبة مطابقة لتوصيات الجمعية الدولية لعلم الوراثة الجزيئية. بينما معظم النتائج التي تم الحصول عليها لخمسة مواقع STR كانت تتراوح من 96.3638147495% الى 99.7713418497% والتي كانت اقل من نسبة 99.9%. اي أنه من المحتمل أن الأب ليس والد الابن البيولوجي. إذ تم استخدام الطريقة الثانية عن طريق ضرب قيمة PI الفردية معًا للحصول على مؤشر الأبوة المشترك (CPI) لمجموعة كاملة من المواقع الوراثية التي تم فحصها، ولقد تم الحصول على نتائج 99.9% والتي هي مقبولة بالنسبة للمختبر الجنائي و توصيات الجمعية الدولية لعلم الوراثة الجنائية (Goodwin et al., 2011).

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Davoren et al. 2007) في كيفية تنظيف العينات من الانسجة الملتصقة بالعظم وازاله جزء من الكالسيوم باستخدام جهاز دريل يدوي والذي يربط معه حجر دائري صغير وتنظيف العينات بوساطة محلول التبييض التجاري ومن ثم غسل عينات العظم جيدا بوساطة ماء منزوع الأيونات ومن ثم غسلها بمحلول الايثانول 96%

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Kempand Smith, 2005) (Lee *et al.* 2010) إذ أظهرت ان تنظيف العينات بوساطة محلول التبييض التجاري قد اعطت درجات افضل في جودة الحامض النووي، والتي تُعد وسيلة فعالة لتدمير تلوث الحمض النووي على أسطح العظام، كذلك لا ينصح ايضا باستخدام محلول التبييض لفترات طويلة بل يتم استخدام الغسل القصير للعينه.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Kamoun *et al.*, 2016) في كيفية تحضير مسحوق العظام الناعم باستخدام المدقة والهاون والتي اعطت نتائج جيدة في تراكيز الحامض النووي .

تتناقض هذه الدراسة مع (Kitayama *et al.*, 2010) إذ يتم استخلاص الحامض النووي دون الحاجة الى تحويله الى مسحوق ناعم ، أذ تبين أن المسحوق الناعم انتج كميات عالية من الحامض النووي والتي عن طريقها نستطيع الحصول على ملفات الحامض النووي عاليه الدقه واجراء التطابق بكل سهولة.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Davoren *et al.* 2007) (Rohland and Hofreiter 2007) (Seo *et al.* 2010) بانه عملية استخراج الحمض النووي المستخدمة في الدراسة افضل من طريقة الاستخراج العضوي باستخدام الفينول كلوروفورم؛ وذلك لانتاجها ملفات STR كامله لجميع المواقع المستخدمه حسب نوع العدة الجاهزة المستخدمة للدراسة.

بينما لا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع (الصقيه و الحربي.2012) والذي تم اعتبار ان طريقة الاستخراج العضوي باستخدام الفينول كلوروفورم افضل من طريقة الكياجين بوصفها طريقة اكثر فعالية في استخلاص الحامض النووي من عينات العظام لقدرتها على التخلص من المعوقات وامكانية الحصول على نتائج للمادة الوراثية.

الفصل الخامس

الاستنتاجات و التوصيات

الاستنتاجات

- 1- يُعد ملف تعريف الحامض النووي أحد المجالات المهمة جداً في علم الطب الشرعي والقضايا المدنية والجنائية.
- 2- اختيار طريقة استخلاص الحامض النووي باستخدام مجموعة EZ1 DNA Investigator Kit (48) وتقدير كمية الحمض النووي Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit ، عامل أساسي للحصول على أفضل النتائج.
- 3- تظهر هذه الدراسة نجاح استخراج العينات الصعبة (العظام) باستخدام مجموعة استخلاص الحامض النووي EZ1 DNA Investigator® Kit باستخدام جهاز الاستخراج الآلي EZ1 Advanced XL والذي يتم الحصول على كمية قليلة من التلوث.
- 4- استخلاص الحامض النووي بواسطة الجسيمات المغناطيسية يعطي كفاءة عالية في عينات العظام مع كمية 150 ملغ من باودر العظم ، وتم التخلص من الشوائب في الاستخراج.
- 5- ازدادت قوة التمييز في ملفات تعريف الحامض النووي عندما زاد عدد المواقع التي تم التحقيق منها.
- 6- ملفات تعريف الحامض النووي للطب الشرعي والتفسير الإحصائي مهمان في تحديد الأشخاص المفقودين والذي يعتمد على ملفات تعريف أقاربهم.

التوصيات

بناءً على نتائج هذه الدراسة ، يمكن اقتراح التوصيات التالية:

- 1- دعم المؤسسات التعليمية للطب الشرعي في العراق لتلعب دوراً مهماً في تطوير علم الوراثة الشرعي.
- 2- إنشاء المزيد من مختبرات وأقسام الحامض النووي في العديد من المحافظات العراقية لتغطية جميع أنحاء بلادنا.
- 3- استخدام عدة استخلاص الحامض النووي من مجموعه (EZ1 DNA Investigator Kit (48 وذلك لكونها من المواد الآمنة، سهلة الاستخدام وللحصول على نتائج سليمة.
- 4- انشاء مركز أبحاث يهتم بتطبيقات البصمة الوراثية سواءً الجنائية او الطبية او في مجال الأبحاث والدراسات.

References

المصادر العربية

الصقيه، عبدالله & الحربي، سامر. (2012) تقييم التقنيات المستخدمة في استخلاص الحامض النووي الـDNA من عينات العظم بمختبرات الإدارة العامة للأدلة الجنائية في المملكة العربية السعودية.

المصادر الانكليزية

- Abuidrees, A. S., Alhamad, N. A., & Alsaadany, K. (2016). A suitable method for DNA extraction from bones for forensic applications: a case study. *Arab J Forensic Sci Forensic Med*, 1(3), 346–352.
- Alaeddini, R., Walsh, S. J., & Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. *Forensic Science International: Genetics*, 4(3), 148–157.
- AL-Zubaidi, M. M. (2015). Internal Validation Guide of the Amp F_STR Identifiler PCR by Using Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification for Use Forensic Laboratories. *Al-Nahrain Journal of Science*, 18(4), 110–117.
- Allor, C., Einum, D. D., & Scarpetta, M. (2005). Identification and characterization of variant alleles at CODIS STR loci. *Journal of Forensic Science*, 50(5), JFS2005024-6.
- Ambrus, C., Marton, A., Nemeth, Z. K., & Mucsi, I. (2010). Bone mineral density in patients on maintenance dialysis. *International Urology and Nephrology*, 42(3), 723–739.
- Bao, C. L. M., Teo, E. Y., Chong, M. S. K., Liu, Y., Choolani, M., & Chan, J. K. Y. (2013). Advances in bone tissue engineering. In *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. IntechOpen.
- Bender, K., Farfán, M. J., & Schneider, P. M. (2004). Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Science*

International, 139(2–3), 135–140.

- Berg, I., Neumann, R., Cederberg, H., Rannug, U., & Jeffreys, A. J. (2003). Two modes of germline instability at human minisatellite MS1 (locus D1S7): complex rearrangements and paradoxical hyperdeletion. *The American Journal of Human Genetics*, 72(6), 1436–1447.
- Boskey, A. L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Reports*, 2, 447–447.
- Brundin, M., Figdor, D., Sundqvist, G., & Sjögren, U. (2013). DNA binding to hydroxyapatite: a potential mechanism for preservation of microbial DNA. *Journal of Endodontics*, 39(2), 211–216.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier.
- Butler, J. M. (2011). *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Academic press.
- Butler, J. M., Coble, M. D., & Vallone, P. M. (2007). STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 3(3), 200–205.
- Butler, J. M., & Hill, C. R. (2012). Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. *Forensic Science Review*, 24(1), 15.
- Campos, P. F., Craig, O. E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., & Gilbert, M. T. P. (2012). DNA in ancient bone—Where is it located and how should we extract it? *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 7–16.
- Caputo, M., Irisarri, M., Alechine, E., & Corach, D. (2013). A DNA extraction method of small quantities of bone for high-quality genotyping. *Forensic Science International: Genetics*, 7(5), 488–493.
- Cho, E. H., Lee, E. H., Kim, S. H., Kim, E. Y., & Kim, J. W. (2011). Variant alleles detected in a large Korean population using AmpFISTR Profiler Plus. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 552–554.
- Cummings, M. R., & Starr, C. (2014). *Human heredity: principles and issues*. Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Dauber, E.-M., Kratzer, A., Neuhuber, F., Parson, W., Klintschar, M., Bär, W., & Mayr, W. R. (2012). Germline mutations of STR-alleles include

multi-step mutations as defined by sequencing of repeat and flanking regions. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 381–386.

Davis, C. P., King, J. L., Budowle, B., Eisenberg, A. J., & Turnbough, M. A. (2012). Extraction platform evaluations: a comparison of AutoMate ExpressTM, EZ1® Advanced XL, and Maxwell® 16 Bench-top DNA extraction systems. *Legal Medicine*, 14(1), 36–39.

Davoren, J., Vanek, D., Konjhodžić, R., Crews, J., Huffine, E., & Parsons, T. J. (2007). Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croatian Medical Journal*, 48(4), 478.

Deagle, B. E., Eveson, J. P., & Jarman, S. N. (2006). Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples—a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3(1), 11.

Diegoli, T. M., Farr, M., Cromartie, C., Coble, M. D., & Bille, T. W. (2012). An optimized protocol for forensic application of the PreCRTM Repair Mix to multiplex STR amplification of UV-damaged DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 6(4), 498–503.

Đudarić, L., Zoričić Cvek, S., Cvijanović, O., Fužinac-Smojver, A., Čelić, T., & Martinović, D. (2014). Osnove biologije koštanog tkiva. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis*, 50(1), 21–38.

Dumache, R., Rogobete, A. F., Ciocan, V., Muresan, C. O., & Enache, A. (2017). DNA-Based Identification of a Carbonized Victim by Kinship Analysis. *Clinical Laboratory*, 63(5), 1035–1040.

El-Alfy, S. H., & Abd El-Hafez, A. F. (2012). Paternity testing and forensic DNA typing by multiplex STR analysis using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10(1), 101–112.

Feuk, L., Carson, A. R., & Scherer, S. W. (2006). Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 7(2), 85–97.

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>

Fondevila, M., Phillips, C., Naverán, N., Cerezo, M., Rodríguez, A., Calvo, R., ... Lareu, M. V. (2008). Challenging DNA: assessment of a range of

genotyping approaches for highly degraded forensic samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 26–28.

- Foran, D. R. (2006). Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: an experimental approach. *Journal of Forensic Sciences*, 51(4), 766–770.
- Gazi, H. M., Tawfeek, M. S., Hashim, N. G., & Lazim, H. H. (2010). Medico-Legal Applications of Multiplex STR System to Show Allel Frequencies of D16S 539, D13S317, and D7S820 in Iraqis. *Iraqi Academic Scientific Journal*, 9(4), 542–548.
- Goldman, N., Bertone, P., Chen, S., Dessimoz, C., LeProust, E. M., Sipos, B., & Birney, E. (2013). Towards practical, high-capacity, low-maintenance information storage in synthesized DNA. *Nature*, 494(7435), 77–80.
- Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011). *An introduction to forensic genetics (Vol. 2)*. John Wiley & Sons.
- Gornik, I., Marcikic, M., Kubat, M., Primorac, D., & Lauc, G. (2002). The identification of war victims by reverse paternity is associated with significant risks of false inclusion. *International Journal of Legal Medicine*, 116(5), 255–257.
- Griffiths, R. A. L., Barber, M. D., Johnson, P. E., Gillbard, S. M., Haywood, M. D., Smith, C. D., ... Gill, P. (1998). New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *International Journal of Legal Medicine*, 111(5), 267–272.
- Gymrek, M. (2017). A genomic view of short tandem repeats. *Current Opinion in Genetics & Development*, 44, 9–16.
- Hanley, A. E. (2018). DNA extraction with Qiagen bio-robot EZ1 DNA investigator kit, forensicGEM Sex Crime/Universal kit and Qiagen QIAamp investigator kit: a comparison and optimization study of DNA percent recovery on body fluids for forensic applications. Boston University.
- Hasap, L., Chotigeat, W., Pradutkanchana, J., Vongvatcharanon, U., Kitpipit, T., & Thanakiatkrai, P. (2020). A novel, 4-h DNA extraction method for STR typing of casework bone samples. *International Journal of Legal Medicine*, 134(2), 461–471.
- Houck, M. M., & Siegel, J. A. (2010). *Separation Methods: Fundamentals of*

Forensic Science. Amsterdam: Elsevier) p.

- Huel, R., Amory, S., Bilić, A., Vidović, S., Jasaragić, E., & Parsons, T. J. (2012). DNA extraction from aged skeletal samples for STR typing by capillary electrophoresis. In *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics* (pp. 185–198). Springer.
- İmamoğlu, Ö., Karapirli, M., & Akboyun, N. (2012). Comparison Of Dna Extraction Methods From Teeth Samples And Evaluation In Terms Of Forensic Sciences. *Turkish Journal of Forensic Medicine*, 26(1), 38–49.
- Iwamura, E. S. M., Soares-Vieira, J. A., & Muñoz, D. R. (2004). Human identification and analysis of DNA in bones. *Revista Do Hospital Das Clínicas*, 59(6), 383–388.
- Jagannathan, M., Cummings, R., & Yamashita, Y. M. (2018). A conserved function for pericentromeric satellite DNA. *bioRxiv*, 245589.
- Jarmey, C. (2018). *The Pocket Atlas of Human Anatomy: A Reference for Students of Physical Therapy, Medicine, Sports, and Bodywork*. North Atlantic Books.
- Jiang, W., Kline, M., Hu, P., & Wang, Y. (2011). Identification of dual false indirect exclusions on the D5S818 and FGA loci. *Legal Medicine*, 13(1), 30–34.
- Jobling, M. A., & Gill, P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*, 5(10), 739–751.
- Kamoun, A., Ben Amar, W., Mahfoudh, N., Maalej, L., Mallek, B., Nouma, Y., ... Maatoug, S. (2016). Extraction Strategy for DNA Recovery from Putrefied Teeth and Skull Bone. *Arab Journal of Forensic Sciences and Forensic Medicine*, 230(3950), 1–6.
- Kashyap, V. K., Sitalaximi, T., Chattopadhyay, P., & Trivedi, R. (2004). DNA profiling technologies in forensic analysis. *International Journal of Human Genetics*, 4(1), 11–30.
- Kayser, M. (2017). Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Human Genetics*, 136(5), 621–635.
- Kemp & Smith, 2005. (2005). Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Science International*, 154(1), 53–61.
- Kitayama, T., Ogawa, Y., Fujii, K., Nakahara, H., Mizuno, N., Sekiguchi,

- K., ... Fukuma, Y. (2010). Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. *Legal Medicine*, 12(2), 84–89.
- Kline, M. C., Hill, C. R., Decker, A. E., & Butler, J. M. (2011). STR sequence analysis for characterizing normal, variant, and null alleles. *Forensic Science International: Genetics*, 5(4), 329–332.
- Lee, E. J., Luedtke, J. G., Allison, J. L., Arber, C. E., Merriwether, D. A., & Steadman, D. W. (2010). The effects of different maceration techniques on nuclear DNA amplification using human bone. *Journal of Forensic Sciences*, 55(4), 1032–1038.
- Lee, H. Y., Park, M. J., Kim, N. Y., Sim, J. E., Yang, W. I., & Shin, K.-J. (2010). Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns. *Forensic Science International: Genetics*, 4(5), 275–280.
- Lim, S., Youn, J. P., Moon, S. O., Nam, Y. H., Hong, S. B., Choi, D., ... Hwang, S. Y. (2015). Characterization of human short tandem repeats (STRs) for individual identification using the Ion Torrent. *BioChip Journal*, 9(2), 164–172.
- Liu, P., Yeung, S. H. I., Crenshaw, K. A., Crouse, C. A., Scherer, J. R., & Mathies, R. A. (2008). Real-time forensic DNA analysis at a crime scene using a portable microchip analyzer. *Forensic Science International: Genetics*, 2(4), 301–309.
- Loftus, R. (2005). Traceability of biotech-derived animals: application of DNA technology. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 24(1), 231.
- Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., & Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 191–195.
- Ludeman, M. J., Zhong, C., Mulero, J. J., Lagacé, R. E., Hennessy, L. K., Short, M. L., & Wang, D. Y. (2018). Developmental validation of GlobalFiler™ PCR amplification kit: a 6-dye multiplex assay designed for amplification of casework samples. *International Journal of Legal Medicine*, 132(6), 1555–1573.
- Luftig, M. A., & Richey, S. (2000). DNA and forensic science. *New Eng. L.*

Rev., 35, 609.

- Mayall, S. S., Agarwal, P., & Vashisth, P. (2013). Dental DNA fingerprinting in identification of human remains. *Ann Dent Spec*, 1(1), 16–19.
- Milne, E., van Bockxmeer, F. M., Robertson, L., Brisbane, J. M., Ashton, L. J., Scott, R. J., & Armstrong, B. K. (2006). Buccal DNA collection: comparison of buccal swabs with FTA cards. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 15(4), 816–819.
- Miloš, A., Selmanović, A., Smajlović, L., Huel, R. L. M., Katzmarzyk, C., Rizvić, A., & Parsons, T. J. (2007). Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croatian Medical Journal*, 48(4), 486.
- Misner, L. M., Halvorson, A. C., Dreier, J. L., Ubelaker, D. H., & Foran, D. R. (2009). The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity. *Journal of Forensic Sciences*, 54(4), 822–828.
- Montelius, K., & Lindblom, B. (2012). DNA analysis in disaster victim identification. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 8(2), 140–147.
- Nazzal, M., Sur, S., Steele, R., Khatun, M., Patra, T., Phillips, N., ... Ray, R. B. (2020). Establishment of a PDX tumor from Hepatitis C Associated Liver Cancer and Evaluation of Imatinib Treatment Efficacy. *Hepatology*.
- Norrgard, K. (2008). Forensics, DNA fingerprinting, and CODIS. *Nature Education*, 1(1), 35.
- Nutini, A. L., Mariottini, A., Giunti, L., Torricelli, F., & Ricci, U. (2003). Double incompatibility at human alpha fibrinogen and penta E loci in paternity testing. *Croatian Medical Journal*, 44(3), 342–346.
- Nwawka, O. K., Hayashi, D., Diaz, L. E., Goud, A. R., Arndt, W. F., Roemer, F. W., ... Guermazi, A. (2013). Sesamoids and accessory ossicles of the foot: anatomical variability and related pathology. *Insights into Imaging*, 4(5), 581–593.
- Olivier, N. (2001). The role of DNA in the investigation of crime: A case study of South Africa investigators. *Police Practice Group, Technikon SA, Florida, South Africa*. Pg, 1–9.

- Oryan, A., Monazzah, S., & Bigham-Sadegh, A. (2015). Bone injury and fracture healing biology. *Biomedical and Environmental Sciences*, 28(1), 57–71.
- Pajnič, I. Z., Debska, M., Pogorelc, B. G., Mohorčič, K. V., Balažic, J., Zupanc, T., ... Geršak, K. (2016). Highly efficient automated extraction of DNA from old and contemporary skeletal remains. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 37, 78–86.
- Phillips, C., Ballard, D., Gill, P., Court, D. S., Carracedo, A., & Lareu, M. V. (2012). The recombination landscape around forensic STRs: accurate measurement of genetic distances between syntenic STR pairs using HapMap high density SNP data. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 354–365.
- Phua, C. H., Hasap, L., Thanakiatkrai, P., & Kitpipit, T. (2019). Simplified, rapid DNA extraction protocol for STR typing from bones. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), 607–608.
- Pinheiro, M. de F. T. (2010). *Genética Forense Perspectivas da Identificação Genética*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Prinz, M., Carracedo, A., Mayr, W. R., Morling, N., Parsons, T. J., Sajantila, A., ... Schneider, P. M. (2007). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International: Genetics*, 1(1), 3–12.
- Rasmussen, H. B. (2012). Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In *Gel electrophoresis-principles and basics*. InTechopen.
- Riss, T. (2017). Is your MTT assay really the best choice. Promega Corporation Website [Http://Www. Promega. in/Resources/Pubhub/Is-Your-Mtt-Assay-Really-the-Best-Choice/](http://www.promega.com/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/)(Accessed March 19 2018).
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756.
- Rudin, N., & Inman, K. (2001). *An introduction to forensic DNA analysis*. CRC press.
- Saad, R. (2005). Discovery, development, and current applications of DNA identity testing. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 18(2),

130–133. Taylor & Francis.

- Saferstein, R., & Hall, A. B. (Eds.). (2020). *Forensic Science Handbook, Volume I*. CRC Press.
- Salvador, J. M., & De Ungria, M. C. A. (2003). Isolation of DNA from saliva of betel quid chewers using treated cards. *Journal of Forensic Sciences*, 48(4), 794–797.
- Santos, R. (2013). Why Dna Databasing Is Good for Maryland—A DNA Analyst’s Perspective. *University of Baltimore Law Review*, 42(3), 9.
- Seo, S. B., Zhang, A., Kim, H. Y., Yi, J. A., Lee, H. Y., Shin, D. H., & Lee, S. D. (2010). Efficiency of total demineralization and ion-exchange column for DNA extraction from bone. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 141(1), 158–162.
- Sikorsky, J. A., Primerano, D. A., Fenger, T. W., & Denvir, J. (2007). DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(2), 431–437.
- Siriboonpiputtana, T., Rinthachai, T., Shotivaranon, J., Peonim, V., & Rerkamnuaychoke, B. (2018). Forensic genetic analysis of bone remain samples. *Forensic Science International*, 284, 167–175.
- Smith, L. M., & Burgoyne, L. A. (2004). Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. *BMC Ecology*, 4(1), 4.
- Snustad, D. P., & Simmons, M. J. (2015). *Principles of genetics*. John Wiley & Sons.
- Stangegaard, M., Jørgensen, M., Hansen, A. J., & Morling, N. (2009). Automated extraction of DNA from reference samples from various types of biological materials on the Qiagen BioRobot EZ1 workstation. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 69–70.
- Taichman, R. S. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 105(7), 2631–2639.
- Thanakiatkrai, P., Kitpipit, T., Gupta, R., Sharma, S., Babahan, I., Coban, E.

- P., ... Babnik, A. (2013). Current STR-based techniques in forensic science. *Maejo Int J Sci. Technol*, 7(01), 1–15.
- Thiede, C., Florek, M., Bornhäuser, M., Ritter, M., Mohr, B., Brendel, C., ... Neubauer, A. (1999). Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplantation*, 23(10), 1055–1060.
- Topić, E., Primorac, D., Janković, S., & Mario, Š. (2018). *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. 2. izd. Zagreb: Medicinska Naklada.
- Turrina, S., Ferriani, M., Caratti, S., & De Leo, D. (2014). Evaluation of genetic parameters of 22 autosomal STR loci (PowerPlex® Fusion System) in a population sample from Northern Italy. *International Journal of Legal Medicine*, 128(2), 281–283.
- Vanek, D., Hradil, R., & Budowle, B. (2001). Czech population data on 10 short tandem repeat loci of SGM Plus STR system kit using DNA purified in FTA™ cards. *Forensic Science International*, 119(1), 107–108.
- Vernarecci, S., Ottaviani, E., Agostino, A., Mei, E., Calandro, L., & Montagna, P. (2015). Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: a matter of degradation. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 77–85.
- Wang, L., Zhao, X.-C., Ye, J., Liu, J.-J., Chen, T., Bai, X., ... Jiang, B.-W. (2014). Construction of a library of cloned short tandem repeat (STR) alleles as universal templates for allelic ladder preparation. *Forensic Science International: Genetics*, 12, 136–143.
- Wang, Y., Prosen, D. E., Mei, L., Sullivan, J. C., Finney, M., & Vander Horn, P. B. (2004). A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Research*, 32(3), 1197–1207.
- Weatherholt, A. M., Fuchs, R. K., & Warden, S. J. (2012). Specialized connective tissue: bone, the structural framework of the upper extremity. *Journal of Hand Therapy*, 25(2), 123–132.
- Wheeler, A., Czado, N., Gangitano, D., Turnbough, M., & Hughes-Stamm, S. (2017). Comparison of DNA yield and STR success rates from different tissues in embalmed bodies. *International Journal of Legal*

Medicine, 131(1), 61–66.

- White, T. D., Black, M. T., & Folkens, P. A. (2011). Human osteology. Academic press.
- Yang, D. Y., & Speller, C. F. (2006). Co-amplification of cytochrome b and D-loop mtDNA fragments for the identification of degraded DNA samples. *Molecular Ecology Notes*, 6(3), 605–608.
- Yukseloglu, E. H., Dastan, K., Yonar, F. C., Rayimoglu, G., Karatas, O., Islek, D. S., & Dogan, M. B. (2019). The comparison of DNA extraction techniques in human bone and tooth samples exposed to high heat. *Medicine*, 8(3), 489–495.
- Zehner, R. (2007). “Foreign” DNA in tissue adherent to compact bone from tsunami victims. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 218–222.
- Zeng, X., King, J. L., Stoljarova, M., Warshauer, D. H., LaRue, B. L., Sajantila, A., ... & Budowle, B. (2015). High sensitivity multiplex short tandem repeat loci analyses with massively parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 38-47.
- Ziętkiewicz, E., Witt, M., Daca, P., Żebracka-Gala, J., Goniewicz, M., Jarząb, B., & Witt, M. (2012). Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *Journal of Applied Genetics*, 53(1), 41–60.
- Zupanič Pajnič, I., Gornjak Pogorelc, B., Balažic, J., Zupanc, T., & Štefanič, B. (2012). Highly efficient nuclear DNA typing of the World War II skeletal remains using three new autosomal short tandem repeat amplification kits with the extended European Standard Set of loci. *Croatian Medical Journal*, 53(1), 17–23.

Summary

Short Tandem Repeat analysis is currently the most used method for Treatment forensic evidence, such as linking a suspect to a crime scene, solving problems related to biological relationships, and identifying disaster victims. Some non-coded regions of DNA show significant differences in the basic pair sequence between individuals. Essentially DNA checks involve two steps. Obtain DNA profiles from biological samples and interpret evidence provided from these DNA profiles. DNA was extracted from bone and blood samples, and DNA was estimated and evaluated using statistical interpretation such as probability ratio and parenting index to assess biological evidence.

The study included (82) samples, including (50) bone samples, (16) blood samples for fathers, and (16) blood samples for mothers for the purpose of matching. They were distributed in (16) cases and analyzes were performed on the extraction, quantification, DNA amplification, and analysis of data of short tandem repeat data for 24 loci which include Amylogen, D3S1358, D1S1656, D10S1248, D13S317, Penta E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1. Penta D TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, DYS391, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA, D22S1045 in the Forensic Evidence Investigation Directorate of the Iraqi Ministry of Interior, where the study period was (7) Months since the samples were collected.

Through the statistical analyzes in the GenoProof 3 program that we conducted on the genetic features of the DNA of the son, father and mother for 24 Short Tandem Repeat loci and five Short Tandem Repeat loci, we note that in the first case a complete match was obtained for the son's samples with the father and mother samples, which gave results of more than (99.9%),

which are Acceptable for forensic laboratory and International Society for Forensic Genetics. The probabilities obtained in the second case for 5 Short Tandem Repeat locus for most of the samples were statistically less than the recommendation value (99.9%) forensic laboratory and International Society for Forensic Genetics. Therefore, the second method was used by calculating the combined parenting index and the results were as follows (9.99473712%, 99.99990909 % 99.99846156% 99.99750006% ,99.92313605%, 99.99545475% ,99.99841272%, All results using the above paternity index method were acceptable for the forensic laboratory and International Society for Forensic Genetics.

The Republic of Iraq

**Ministry of Higher Education and Scientific
Research**

University of Karbala

**College of Education for Pure Sciences / Department
of Biology**



Study of Autosomal STR in Kerbala Governorate

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Education for Pure
Sciences - University of Kerbala – in a partial fulfillment of the
requirements for the degree of Master in Biology.

Zoology

By:

Hussein Majid Mahmood Alobiedy

Bachelor's of Biology / University of Baghdad / 2007

Supervised by:

Prof. Dr. Yasmin Khudair Khalaf

2020 A.D

1442 A.H