

# 醫學鑑識的利器—粒線體DNA

曾崧元（社團法人台灣分子醫學會理事長、警政署刑事警察局諮詢委員）

一位忿怒的病人要控告醫院誤診，因為他不久前被切掉的胃，經過仔細的病理檢驗後發現根本沒有胃癌。外科醫師兩手一攤地說：「可是內視鏡的切片報告是腺癌呀！」。病理醫師說：「切片給同儕複閱，診斷沒錯，還是腺癌呀！」。然而病人認為切片檢體搞錯了，是別的病人有胃癌，不是他有胃癌。到底這是烏龍一場，還是在切片的過程中就已經把微小的胃癌切除了？

類似這種各說各話的場面，過去時有所聞，怎麼現在還有此爭議？難道憑著近幾年來的科技進步，我們還沒有方法來分辨的嗎？檢體泡過福馬林，還能作DNA鑑定嗎？幾年前的懸案，現在還能解決嗎？如果您還不知道這是可以利用粒線體DNA來解答的問題，那麼您需要趁著在還沒碰到此難題前，先閱讀李俊億教授等人所撰寫「DNA分析於刑事鑑定之應用」，免得您誤以為這是死無對證的錯誤。以下就粒線體DNA運用於醫學鑑識應用，以演化的角度來補充說明。

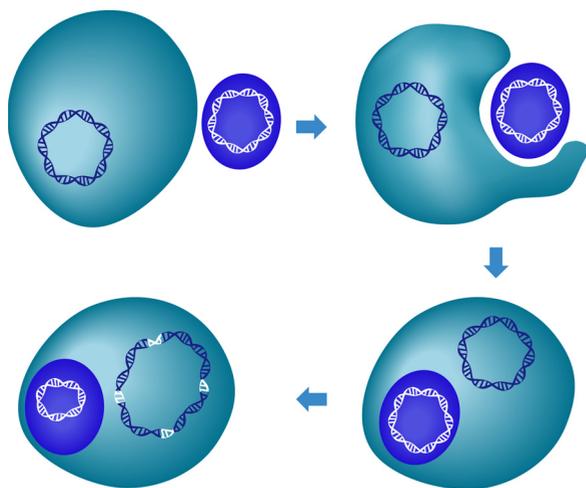
## 粒線體的來源

目前已知最古老的化石是出現於35億年前的疊層石（stromatolite）。它有岩石狀的結構，由藍綠菌（cyanobacteria）和沈積物所構成。如果這種細菌的群落在35億年前就可發展出來的話，那麼生命的起源一定更早，或許39億年前就有了。這些早期的生物即為原核生物（prokaryote）。它們主宰地球的時期為25到38億年前，亦即所謂的太古代（Archean）。這些原核生物有環狀的染色體，無核膜且無胞器，當然也沒有粒線體。以現代的分類學來看，原核生物可分為兩大類：細菌—其實應稱為真細菌類

（eubacteria）—和古微生物（archaea）。細菌包括藍綠菌、蛋白細菌（proteobacteria）、披衣菌（chlamydias）、螺旋菌（spirochetes）、和格蘭氏陽性菌（Gram-positive bacteria）等。古微生物為生長在極端環境中的生物，因此又稱為嗜極端環境微生物（extremeophile）。古微生物和細菌不同之處是：古微生物的細胞壁沒有肽聚糖（peptidoglycan），它以甲硫氨酸（methionine）而非以甲醯甲硫氨酸（formylmethionine）為蛋白質合成的第一個氨基酸，此外它的DNA有組織蛋白（histone）包著。以此角度來看，古微生物比較像真核生物（eukaryote）—有細胞核的生物。

根據化石紀錄，最早的真核生物於21億年前出現。真核生物因為有細胞骨架（cytoskeleton）而能改變形狀，並且能包圍和吞噬其他的細胞。以演化的角度來看，粒線體很可能在地球生命起源的初期，是一種原核生物。然而因緣際會，原真核生物（protoeukaryote）吞噬了原始原核生物，由於後者能提供能量而與前者互利共生（圖一）。在漫長的演化中，這些與宿主共生之原始原核生物逐漸失去部份的DNA。這些基因體逐漸變小的原核生物即變成今日之粒線體。這就是為什麼，除了少數物種如腸梨形蟲（*Giardia intestinalis*）和陰道滴蟲（*Trichomonas vaginalis*）外，幾乎每種真核生物的粒線體都有DNA（圖二）。科學家於1960年代首次發現粒線體有DNA。根據其中的rRNA序列分析顯示，粒線體類似阿爾發蛋白細菌（ $\alpha$ -proteobacteria）。這支持了「粒線體在遠古時期是一種原核生物」的說法。

## 人類粒線體DNA的特徵



**圖一、粒線體來源的合理推測。**

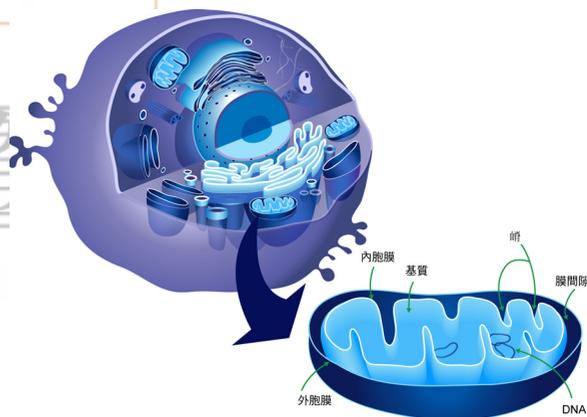
原始原核生物進入另一生物後，兩者進入互利共生狀態。在演化中，前者之DNA逐漸流失進入後者之基因體，而變小成為今日之粒線體DNA。（彩圖詳見本刊網頁）

人類之粒線體DNA（簡稱mtDNA）只佔細胞整體DNA的0.5-1%。人類的mtDNA於1980年代定序完畢。長度為16,569鹼基對（base pair; bp），內含多段編碼的DNA。mtDNA可製造粒線體本身所需的22條tRNA和2條rRNA，還可建碼（encode）13條結構蛋白質（structural proteins）。其中7個蛋白質屬於呼吸鏈第一複合體中的次單元（subunit）；1個蛋白質為第三複合體中的次單元；3個蛋白質為第四複合體中的次單元；還有2個蛋白質為第五複合體中的次單元。此外，mtDNA有一段約一千鹼基對長度的區域，它不建碼任何產物，但含有許多小片段區域，可控制mtDNA的複製和轉錄。此區域即為控制區（control region）或稱為替代環區（displacement loop; D-loop）。

正如同細胞核內染色體中的DNA（簡稱nDNA）一般，mtDNA也有單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism; SNP），簡稱mtSNP。甚至因為mtDNA易突變，而比nDNA有密度更高的SNP，尤其是在D-loop。這些mtSNP

大多集中在三段DNA序列中，謂之高度變異區（hypervariable regions; HVR）：HVR-1、HVR-II、HVR-III（圖三）。

細胞有多套的（polyploid）mtDNA。大部份的哺乳類細胞含有數百個粒線體，而每個粒線體裡有數個（大概2-10個）拷貝的mtDNA。就同一人的某個特定基因座（locus）而言，若其序列在所有的mtDNA都是相同的，則謂之同質型（homoplasmy）。然而，mtDNA在16,569 bp長的序列中任何一點都可能發生突變而被細胞保留下來，甚至有突變的拷貝，其數目還可增加到超過野生型的程度。此突變型mtDNA與野生型mtDNA共存的情況謂之異質型（heteroplasmy）。mtDNA的點突變（point mutation）會隨著年紀增加而逐漸累積。有些突變的mtDNA會影響其基因產物的功能。然而，mtDNA是多套的，因此突變的拷貝很可能被數百到數千套正常的拷貝稀釋，而不會對細胞的生理產生不良的影響。有研究指出，不良突變的mtDNA常要佔細胞全部mtDNA的60-80%，才會造成病理現象。可想而知，致命性



**圖二、粒線體DNA（mtDNA）。**

一個細胞內有多個粒線體，而每一個粒線體內又有多條mtDNA，因此mtDNA為多套的。mtDNA透過蛋白質鈕（protein knob）而與粒線體之內膜接合。mtDNA為雙股之閉環性（closed-circular）DNA，沒有蛋白質覆蓋。由於是裸露的，所以易受損傷而突變。（彩圖詳見本刊網頁）

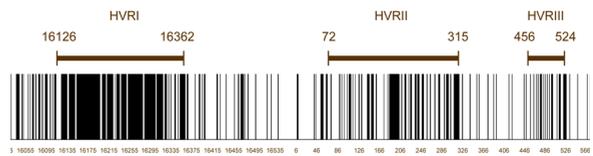
的突變型mtDNA是不可能成為同質型的。

既然mtDNA是多套的而且SNP是隨機發生的，那麼mtSNP經過一代傳一代累積下來，在理論上來，mtDNA是不可能為同質型的。但實際上，當我們用定序法（sequencing）來檢視一個人之mtDNA時，絕大多數基因座卻是同質型的。這最主要的原因就是所謂的「瓶頸現象（bottleneck phenomenon）」。亦即在卵子生成過程中，只有一少部分母系的mtDNA傳給子代。因此，不管是突變或是野生的mtDNA，遺傳到子代時它幾乎都是唯一的。因而mtSNP可以在少數幾代，甚至在一代中，就成為同質型。

## 粒線體DNA在法醫鑑定上的使用

大家耳熟能詳的DNA指紋（DNA fingerprinting）指的是Jeffreys博士於1985年所發明的。那是以多基因座探針（multilocus probe）為基礎的人別鑑識。至於之後其他學者所研發之人別鑑識的DNA檢測，則統稱為DNA特徵分析（DNA profiling）。後者常用的方法包括nDNA之短相連重複序列（short tandem repeat; STR）和mtSNP之HVR定序分析。

多個STR之組合可產生極大的變異，因此可達到「納入（inclusion）」的程度—亦即兩檢體之DNA檢測結果若相符，表示兩者屬於同一來源。與此相反的是，mtDNA之變異沒有STR之組合者大，因此只能用在「排除（exclusion）」的情況—亦即兩檢體之mtDNA檢測結果若不相符，表示兩者不屬於同一母系來源。既然mtDNA之變異性沒有STR之組合這麼大，為什麼mtDNA在鑑識科學上還有發揮的空間？最主要的原因有兩個：第一，有些檢體（像是髮桿、牙齒、骨頭、甚至埋在土裡的殘骸）的DNA含量很低，nDNA是無法從這類檢體取得的。由於mtDNA是多套的，一個細



圖三、單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism; SNP）密度分佈圖。

在替代環區（displacement loop; D-loop）序列上，以直線表示某位點（以數字標示）出現SNP。由直線之密集程度可看出SNP集中於三段高變異區（hypervariable regions; HVR），稱之為HVR-I，HVR-II，和HVR-III。（彩圖詳見本刊網頁）

胞之mtDNA拷貝數有數千到上萬個，因此，較容易從這些檢體中取得mtDNA。第二，除非檢體保存良好才有可能萃取出DNA序列長度超過500 bp者；然而細胞死亡後DNA即開始受到破壞。尤其是被微生物分解之檢體，更是破壞得嚴重。最極端的是考古學樣本，其DNA長度一般都在150 bp以下。由於DNA的損壞是隨機的，因此只要標的序列（target sequences）之拷貝數很多的話，就有機會保留到一份較長的標的序列。所以DNA降解所產生的問題，一部份可以靠拷貝數來克服，這正好是mtDNA的特性。這就是為什麼研究不良檢體，一定會使用mtDNA來分析的原因了。

然而，太短的DNA能提供足夠的變異性來作人別鑑識嗎？最近有文獻（Mitochondrion 2008;8:146-154）指出，短至154-bp長度的sHVR-I（nts 16209-16362）也能提供足夠的mtSNP來產生基因歧異度（genetic diversity; h）。根據該研究報告，華人之sHVR-I的h值在漢族華人為0.9853，在非漢族華人為0.9793；蒙古人為0.9867，印度人為0.9767。以此四族群為例，sHVR-I和長度為237-bp（nts 16126-16362）之HVR-I比起來，其h值相差不大，竟然分別只有0.015，0.0122，0.0057和0.0154而已。顯然，mtNSP在保存不良的檢體中，是極有使用價值的。舉例來說，在醫院的例行病理檢驗中，如果懷疑某病人的檢體被搞

錯而誤換了他人的檢體，我們或取可以重取檢體再驗。但經常碰到的情況是，有些檢體是無法重取的，譬如已被摘除的器官或腫瘤。在這種情況下，為避免誤診我們可以作mtSNP的人別鑑識。即便檢體泡了福馬林或貯存不良，以mtSNP為基礎的DNA特徵分析，還是可以讓我們得到改錯的機會。

然而mtSNP在人別鑑識上，還是有它的限制。除了它只能用於「排除」情況下，mtSNP還不能用於區別兄弟姐妹。這是因為在受精過程中，即便有少量來自精子的mtDNA進入卵子，也會被泛酶依賴機轉（ubiquitin-dependent mechanism）所消除。雖然文獻指出有案例發現父系的mtDNA出現在子代組織中，但這是罕見例外。因此，學界咸信粒線體之基因體為母系遺傳。再加上mtDNA為無重組現象，所以子女與母親之mtDNA相同。

## 粒線體DNA在物種鑑識上的使用

相對於D-loop之HVR在單一物種中可有極大的序列差異以致可用於個體間之鑑識，某些mtDNA片段在單一物種中則沒有序列上的太大差異，但在不同物種間序列卻是經常不一樣的，因而可作為物種鑑識使用。我們可以從演化上來思考這個問題。

大約在寒武紀大爆發（Cambrian explosion）時動植物開始在陸地群聚。離開多水的環境勢必造成很大的生理衝擊。此外，生物上了陸地後，還面臨一個大問題—陸地像條船，亦即大陸板塊漂移（continental drift）。大約在2億5千萬年前，也就是古生代的末期，板塊移動把之前散佈在地球各處的陸地，聚集在一起形成泛古大陸（Pangaea）。因此，許多原先在海邊生存的生物，變成住在乾燥且寒冷的內陸。因此，生物又

必須改變生理來適應劇變的環境。

環境的變遷，蘊育了物種的誕生。由於粒線體攸關能量的來源。可想而知，mtDNA一定有明顯的改變，以便新物種能適應新環境所要求的能量變化。由於物種間不能交配，突變了的mtDNA序列因而被母系遺傳而保留在該物種。這個概念構成了物種鑑定的理論基礎。目前最常用來作物種鑑識的mtDNA片段即是cyt b基因（見李俊億等人之論文圖四）。想想看下列情況，您就明白物種鑑定在醫學上的重要性。而這些問題目前都是可以解答的。

- 欲知病人身上已死而未知名稱的寄生蟲、昆蟲。
- 鑑定誤食之食物。

## 結語

除了少數例外，絕大多數生物皆以DNA為其遺傳物質。粒線體在遠古時代為類似阿爾發蛋白細菌的生物。此生物被原真核生物吞噬後，因互利共生而成了宿主細胞的胞器。因此，粒線體是唯一有自己DNA的胞器。也因此，粒線體可用來作DNA特徵分析。mtDNA編碼區之序列在同一物種間有相當程度的不變性；但非編碼區之序列則在同一物種間變異頗大。因此，前者可用於鑑別不同的物種；而後者可用於人別的鑑識。但mtDNA之HVR變異性不如nDNA之STR變異性，因此STR之變異性可以大到讓我們得到「納入」的結論；而mtDNA之變異性只能讓我們得到「排除」的結論。然而，粒線體DNA有其無可取代的優點，它可使用於微量且保存不良的檢體。因此在醫療檢體辨識上，mtDNA特徵分析可提供我們一項利器。