

# 生物醫學技術於 刑事體液證物種類鑑定之應用

蘇志文<sup>1,2</sup>、李喬芸<sup>1</sup>、楊雅玲<sup>1</sup>、蔡麗琴<sup>1</sup>、謝幸媚<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中央警察大學鑑識系，桃園，台灣

<sup>2</sup>刑事警察局法醫室，台北，台灣

## 摘要

在生物醫學上體液中之蛋白質或其它組成份之分析，常可用於疾病之偵測，而類似之分析，在刑事鑑識上亦扮演著重要的角色。刑案現場所發現之體液或其斑跡，鑒於案件偵辦之需要，一般會先在現場以初步試驗進行其種類之鑑定，然後再將可疑檢體帶回實驗室進行後續之身分鑑定或親緣鑑定等。血液檢體為現場最常發現的體液之一，刑事鑑識實務上多利用酚酞試驗（phenolphthalein test）來進行其初步之鑑定；在性侵害案件中常見之精液以及唾液檢體，則分別使用酸性磷酸酶（acid phosphatase; ACP）檢測法以及澱粉酶（amylase）偵測來作為此二種體液之初步試驗。此外，亦有針對其他體液，如尿液以及月經血等的檢測方法被發展。而目前實務上所應用於辨識體液之方法，無論是初步試驗或是確定性試驗，皆可能存在有偽陽性或靈敏度不足等問題，因此發展分子生物技術以應用於體液種類之鑑別，遂成為目前研究的一個新趨勢。已有研究利用不同體液中所存在的特異性信息核糖核酸（messenger RNA; mRNA），以毛細管電泳（capillary electrophoresis; CE）或即時聚合酶鏈鎖反應（real-time PCR）技術來鑑定體液種類；而微核糖核酸（micro RNA; miRNA）的存在與基因表現有關，因此許多micro RNA亦具有組織特異性，同樣可作為不同體液的辨識標的。最新的研究方向則是針對不同體液中特定基因甲基化情形的差異，發展出利用甲基化敏感性限制酶PCR法（methylation-specific restriction enzyme PCR; MSRE-PCR）以及甲基化SNaPshot法（methylation SNaPshot）等技術進行不同體液之辨識。這些新技術之發展，期望未來應用在生物醫學上能提升疾病偵測的準確度，而在刑事鑑識上亦能提供給警方更多辦案之利器。（生醫 2013;6(1):42-56）

關鍵字：體液鑑定（body fluid identification）、刑事鑑識（forensic science）

---

通訊作者：謝幸媚 教授

電話：886-3-328-2321 ext 4875

傳真：886-3-327-5907

地址：33304桃園縣龜山鄉大崗村樹人路56號 中央警察大學鑑識系

電子郵件：mei@mail.cpu.edu.tw

## 前言

人類體液中特定蛋白質的表現與否或含量的多寡，在生物醫學上常可作為疾病診斷的指標<sup>1-3</sup>，然而在刑事鑑識上之應用，即為作為體液種類鑑定之依據。刑案現場中嫌犯遺留之體液（如血液、精液、唾液及尿液等）或斑跡種類，對於警方辦案時案情之釐清與辦案之方向，常具有很重要之影響力。例如：自女性受害者所採集之陰道棉棒檢體，若檢測出嫌犯之精液，則可朝性侵害案件之方向偵辦。因此，體液種類之鑑定乃為現今刑事生物鑑定中，除了嫌犯之身分鑑定外，另一個極重要之議題。而「江國慶案件」中對於證物上是否檢測出嫌犯精液檢體，即為一個爭議之焦點。目前實務單位進行刑事相關體液種類之鑑定時，仍以呈色試驗及免疫分析法（immunoassay）為主，而相關研究中亦有利用分子生物技術於體液種類鑑定者，其鑑定標記包括具組織表現特異性之mRNA與微核醣核酸（micro RNA; miRNA），以及進行表附基因分析（epigenetic analysis）以鑑別體液種類之研究等。本文即針對刑案現場中較常見體液或其斑跡鑑別之血清學方法及分子生物學方法進行介紹。

## 體液或其斑跡鑑別之血清學方法

一般刑案現場中所發現之體液檢體其處理流程可包括採集、保存、送驗及實驗室鑑定等（圖一）。實驗室鑑定中關於體液種類鑑別之血清學方法，可分為初步試驗與確定性試驗，而鑑識人員亦常直接於刑案現場中進行體液或其斑跡鑑別之初步試驗，以利初步之犯罪過程還原及後續檢體送驗之選擇研判。

## 血液或血液斑之鑑別

血液檢體是刑案現場中最常見的體液之一，尤其是重大暴力犯罪現場中幾乎都可能發現血液檢體的存在，因此血液的鑑定在刑事鑑識上是相當重要的。傳統上大多利用呈色試驗作為鑑別刑案現場疑似血液或血液斑之初步試驗方法<sup>4</sup>，其基本原理大致上都是利用血紅素（hemoglobin; Hb）的血基質（heme）作為催化劑，在反應中催化過氧化氫與呈色試劑產生氧化還原反應，使呈色試劑變色而能以肉眼觀察到其變化。較常見的呈色試驗有聯苯胺試驗（benzidine test）<sup>5</sup>（圖二A）、酚酞試驗（phenolphthalein test）<sup>6,7</sup>（圖二B、圖三A）及鄰-二甲基聯苯胺試驗（o-tolidine test）<sup>7</sup>（圖二C、圖三B）等，因為這些反應通常相當快速，且顏色變化明顯，故適合用於初步之篩選，然而鄰-二甲基聯苯胺（o-tolidine）因具有致癌性<sup>8</sup>，對於現場勘查人員及實驗室鑑定人員有

現場之證物採集

檢體之保存及送驗

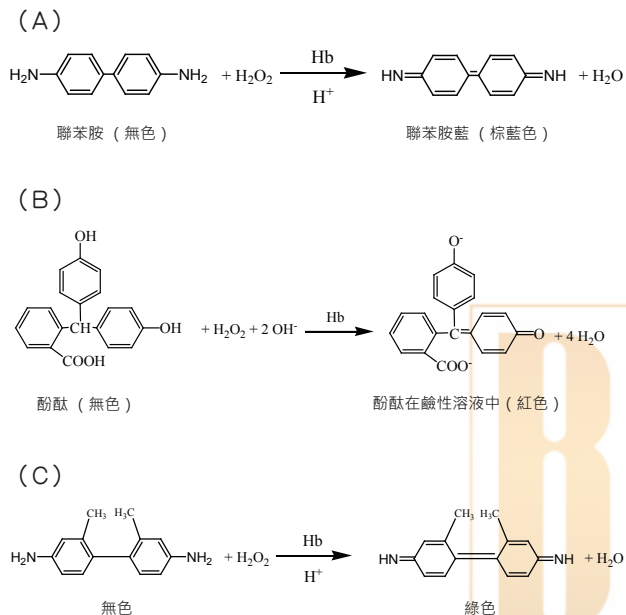
初步試驗

確定性試驗

個化分析

圖一、一般刑案現場之體液檢體處理流程（彩圖詳見本刊網頁）

危害健康之虞，因此現在大多已不採用此類檢測試劑了。



**圖二、(A) 聯苯胺試驗 (benzidine test) 反應原理；(B) 酚酞試驗 (phenolphthalein test) 反應原理；(C) 鄰-二甲基聯苯胺試驗 (o-tolidine test) 反應原理。** (彩圖詳見本刊網頁)

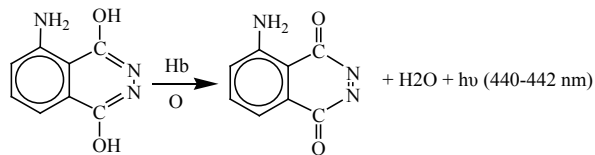
由於初步呈色反應具有上述反應快速及顏色變化明顯等優點，因此在刑事鑑識之實務上仍是相當實用的方法，目前國內最常使用的方法為酚酞試驗，由於此方法為Kestle和Meyer二人所發展成功<sup>9</sup>，因此又名「Kastle-Meyer test (KM test)」。此外，針對大面積刑案現場找尋可能的血跡位置，如果要每一處皆分別進行初步試驗恐怕會曠日廢時，而使用發光反應來偵測的試劑，如Luminol test<sup>6</sup> (圖四)，即為因應此種需求而被發展出之方法，利用該試劑與血跡作用而發光的效果，可以在夜晚或密閉式的犯罪現場以大面積的噴灑方式直接偵測血跡所在位置或顯現可能的血跡噴濺型態，以協助血跡跡證之採取或犯罪現場之犯罪行為為研判。



**圖三、(A) 酚酞試驗結果；(B) 鄰-二甲基聯苯胺試驗結果。** (彩圖詳見本刊網頁)

上述的初步呈色試驗雖然具有優點，但因為這些試劑可能也會與少部份化合物發生氧化還原反應，而造成偽陽性的結果，故無法作為血液的確定性試驗。此外，不同生物的血液大都可產生同樣的反應，因此即使獲得陽性的結果，亦只能作為初步判斷可能是血跡的參考，而無法研判其是否為人血或何種動物之血液。

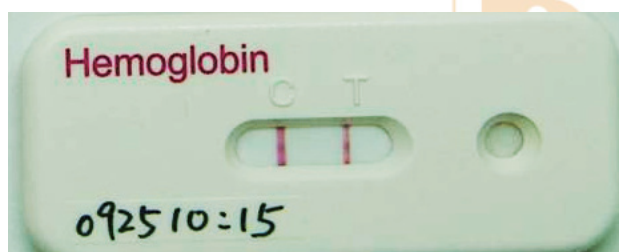
在初步研判可能為血跡後，通常接下來刑事實驗室即是要確定該血液是否為人血。傳統的方式是以抗人抗體與可疑血跡進行雙向免疫擴散 (double immunodiffusion) 反應以進行確認，但如果檢體量少或因檢體在環境中曝露過久而產生腐敗之情形，則可能無法獲得明確的結果。此外也有利用結晶試



**圖四、Luminol test反應原理** (彩圖詳見本刊網頁)

驗<sup>10, 11</sup>、色層分析法、電泳法及光譜分析法等進行分析，而目前已經發展出利用特定抗原作為檢測標的之檢測方法，例如以血紅素為標的之免疫色層分析試驗（immuno-chromatographic test）（圖五）商用鑑定盒（例如：SERATEC® HemDirect Hemoglobin kit）<sup>12</sup>。

當檢體經過初步呈色試驗及確定性試驗確認為血跡後，即可由實驗室人員萃取DNA，經過DNA定



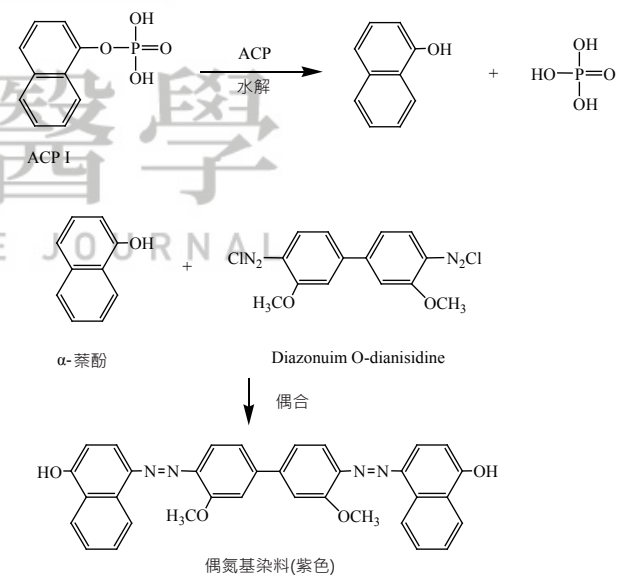
圖五、血液免疫色層分析試驗（immuno-chromatographic test）陽性結果（彩圖詳見本刊網頁）

量後再從中取適量之DNA進行後續聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction; PCR）以複製其短相連重複序列（short tandem repeat; STR）片段，然後利用毛細管電泳（capillary electrophoresis; CE）分析之，其結果可輸入DNA資料庫中加以建檔並比對可能的嫌犯身分。

## 精液或精液斑之鑑別

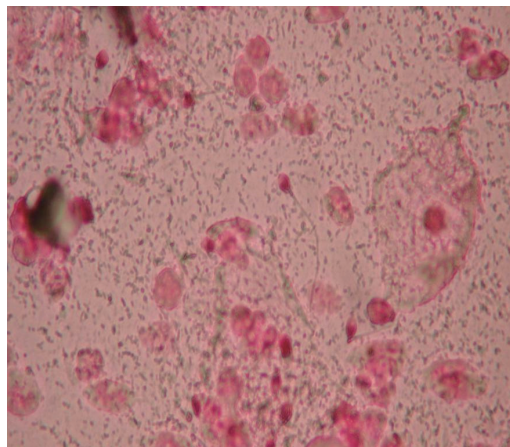
精液因為含有腐胺（putrescine）、精胺（spermine）及亞精胺（spermidine）等成份<sup>13</sup>，因此有特殊氣味，可作為初步檢測之依據，但因為刑案現場可能混有其他氣味，故以氣味作為研判是否為精液並非相當精確。此外，精液在250至365nm的紫

外光下呈現藍色螢光，亦可作為協助找尋精液斑跡的方法，惟因現今大多數之織物都含有或經過螢光劑之處理，因此在使用多波域光源檢測時會產生大量螢光背景，容易干擾精液斑之研判。精液的組成中還包含了由睪丸、附睪、精囊、前列腺等所產生的有機及非有機的成份<sup>14</sup>，可以作為檢測的標的。目前鑑識單位最常用的初步呈色試驗有酸性磷酸酶（acid phosphatase; ACP）檢測法<sup>15</sup>（圖六）。酸性磷酸酶是由前列腺所分泌，其在精液中之濃度遠大於其他體液，因此可作為初步呈色試驗的標的。其檢測試劑分為兩劑，分別為ACP I（如  $\alpha$ -naphthylphosphoric acid）及ACP II（如 diazonium o-dianisidine），精液檢體在滴上ACP I及ACP II試劑後產生肉眼可以觀察的深紫色反應（圖七）。此反應相當迅速，但因為一般性侵害案件之檢體通常並非純精液，而是經過清洗或含有被害人體液之檢體，或因案發與採證時間間隔過長，使得呈色反應速度較慢，因此，一般而言應在一分鐘內持續觀察。



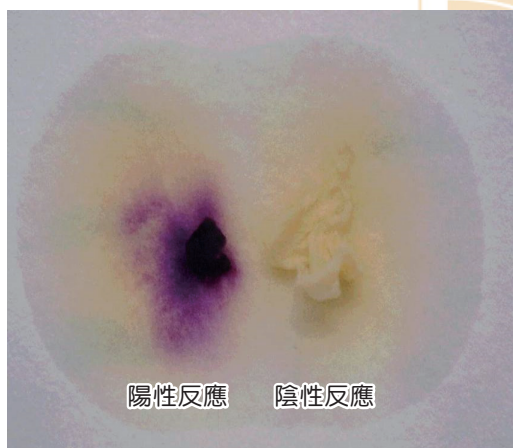
圖六、酸性磷酸酶（acid phosphatase; ACP）檢測法反應原理（彩圖詳見本刊網頁）

至於精液之確定性試驗，最直接的方式就是以顯微鏡觀察，精子細胞的頭部可經由christmas tree stain 染成紅色以利鑑別<sup>16</sup>（圖八）。如果觀察到完整的精子細胞或是精子的頭部，就可以研判為精液或精液斑，惟精子細胞的顯微鏡觀察需要由有經驗之鑑識人員方能加以確認。此外，因為性侵害案件中被害人在遭性侵害後可能自行或被迫進行清洗，而案發與採證亦可能已間隔一段時間，因此，進行被害人外陰道棉棒或陰道抹片檢體的顯微鏡觀察時，往往無法發現完整的精子細胞。此外，精子細胞的顯微鏡觀察只能作為含有精子細胞之精液或精液斑的確定性試驗，但如果在抹片上未找到可資確認之精子細胞，並無法排除檢體來源為精液或精液斑之可能性，因為涉嫌人若已結紮或患有無精症等情況，其精液中即無法檢測到精子細胞。



圖八、精子細胞之顯微鏡觀察（彩圖詳見本刊網頁）

體液及涉嫌人之精液，但此時P30之檢測並不會受被害人體液所干擾。P30可以利用電泳法或免疫分析法（immunoassay）進行分析<sup>17-19</sup>，針對精液檢測亦已經發展出利用以P30抗原做為檢測標的之免疫層析檢測商用鑑定盒（例如：SERATEC® PSA Semiquant kit）<sup>17</sup>（圖九、圖十），惟在使用這些檢測方法時要注意可能會有高濃度勾狀效應（hook effect），亦即因抗原濃度過高而造成抗體量不足以與抗原-抗體複合物結合之情形。為了避免因高濃度之勾狀效應而造成誤判，如果認為檢體量可能太大時，則應稀釋後再以本法檢測一次，以避免偽陰性的情形發生。

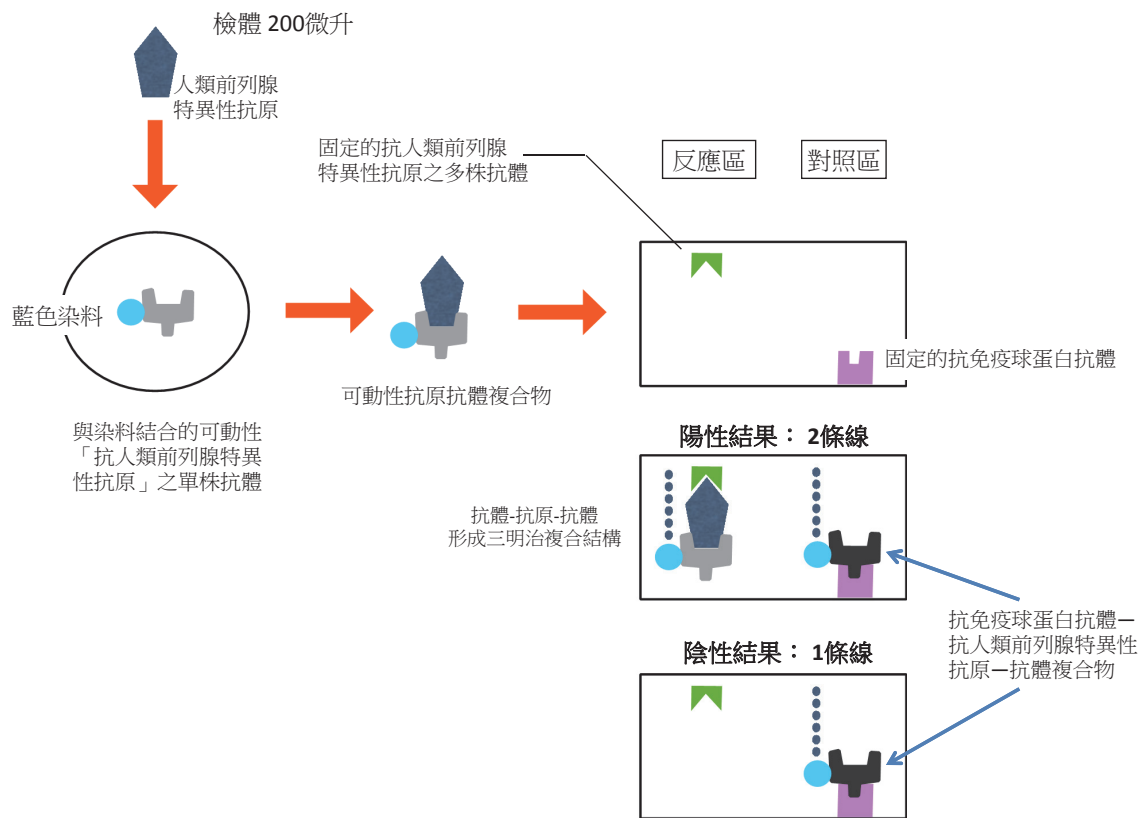


圖七、酸性磷酸酶檢測結果（彩圖詳見本刊網頁）

除了以顯微鏡觀察精子細胞外，亦有針對前列腺特異性抗原（prostate specific antigen; PSA，或稱為P30）進行檢測，以作為精液或精液斑之確定性試驗的方法。P30是前列腺所製造之精液特有蛋白，當應用於性侵害案件之鑑驗時，待測檢體雖含有被害人

## 唾液或唾液斑之鑑別

唾液為大量水份（98%）及電解質、抗菌物質、酵素和上皮細胞等其他物質（共約2%）所組成，人們在進食時，唾液檢體很容易會遺留在食物、餐具或瓶口上，因此唾液證物也常見於刑案現場中。唾液中的唾液澱粉酶（amylase）可協助分解澱粉，在唾液中的含量遠大於其他體液，因此澱粉酶可作為是否含



圖九、精液之免疫層析檢測原理示意圖（彩圖詳見本刊網頁）

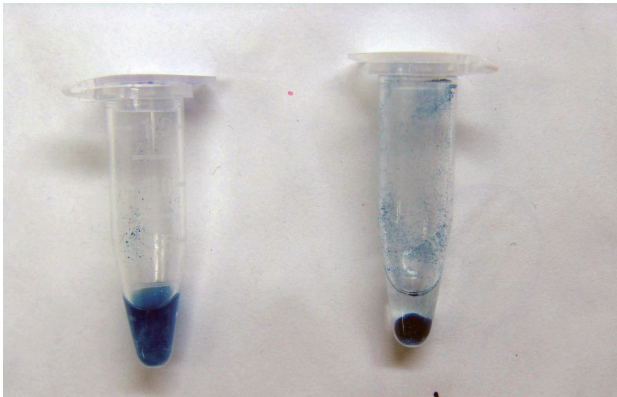
有唾液之偵測標的。目前國內鑑識人員針對唾液澱粉酶的初步檢測方式是採用商用的鑑定錠劑（Phadebas<sup>®</sup> Amylase test），該錠劑含有非水溶性的澱粉及水溶性的藍色染料聚合物，將該錠劑磨成粉狀置於試管中，並加入待測檢體之水溶液，於37°C、15分鐘後以1500g離心5分鐘，若待測檢體未含唾液澱粉酶，則該聚合物無法分解，因此會獲得澄清之上清液及藍色之沈澱；若待測檢體含有唾液澱粉酶，則該聚合物會被分解，藍色的染料被釋放出來，因此觀察到藍色之澄清液<sup>20</sup>（圖十一），本檢驗之結果應與控制組的結果進行比較，以增加結果判讀之正確性。此外，也有藉由偵測抗原抗體反應之商用鑑定盒（SERATEC<sup>®</sup> AmylaseTest kit）<sup>21</sup>（圖十二）供鑑定人員使用。而目前尚無唾液或唾液斑鑑別之確定性試驗被發展成功。

## 其他體液或斑跡之鑑別

除了上述最常見的血液、精液及唾液檢體外，刑案現場偶爾也會發現一些其它的體液檢體，如尿液。對於尿液的初步鑑定，最簡單的方法即為加熱後以聞的方式加以研判，惟每個人的嗅覺能力不同，研判結



圖十、精液之免疫層析檢測結果（彩圖詳見本刊網頁）



陽性反應

陰性反應

圖十一、唾液澱粉酶 (amylase) 檢測結果 (彩圖詳見本刊網頁)

果易過於主觀。此外，刑案現場往往環境惡劣，充斥其他胺類干擾物，而可能造成誤判。除了用嗅覺的方式外，亦可針對尿液中含有的肌酸酐 (creatinine; CR)，以 Jaffe color test 作為初步試驗<sup>22</sup>，而定量尿液中的肌酸酐可用來研判毒品施用涉嫌人是否有藉由攝取大量水份以規避尿中的毒品代謝物被檢出之情形。此外，亦可利用尿素作為尿液鑑定之標的<sup>23</sup>，鑑定的方式為在濾紙上滴上待測可疑體液後再滴上 para-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC)，如果含有尿液，則會呈現粉紅色，反之則無法觀察到顏色之變化。除了上述化學方法，也有利用免疫色層分析法針對 Tamm-Horsfall protein 進行檢測<sup>24</sup>，此外，亦有以 17-酮類固醇 (17-ketosteroid) 為標的之高效液相層析 (high performance liquid chromatography; HPLC) 檢測法作為尿液之確定性試驗，其可區別人類與其它動物之尿液<sup>25</sup>。

而在性侵害案件的鑑定上，有時亦可能需要研判血液檢體之來源為周邊血或月經血，以協助釐清犯罪之過程。月經血組成包含崩落的子宮內膜組

織、脫落的子宮頸細胞及陰道表皮細胞與其分泌液，以及經血中的特殊組成等。傳統的月經血初步鑑定是以顯微鏡檢為主，月經血一般呈暗紅色，檢體經過染色後以顯微鏡直接觀察是否含有子宮內膜細胞或其他女性陰道上皮細胞<sup>26,27</sup>。文獻中亦有針對乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase; LDH) 的同功酶 (isozyme)，在月經血與周邊血組成分佈具有差異之現象，而利用電泳加以鑑定之方法<sup>28</sup>。此外，月經血中包含多種蛋白質水解酵素，例如在月經血中表現高度活性之胞漿素 (plasmin)，其可將纖維蛋白原 (fibrinogen) 水解為纖維蛋白原降解產物 (fibrinogen degradation products; FDP)。而依據此纖維蛋白溶解 (fibrinolysis) 之特性，有多種抗原抗體分析的檢測方法被發展，以鑑別月經血及周邊血，例如以 Fibrin plate method 及血球凝集抑制試驗 (hemagglutination inhibition test; HI) 等方法來檢測檢體中是否具有高度纖維蛋白酵素活性<sup>29-31</sup>。目前亦有利用臨床醫學上偵測纖維蛋白原降解產物之商用試



圖十二、唾液之免疫層析檢測結果 (彩圖詳見本刊網頁)

劑，以檢測月經血中的FDP含量而鑑別其為月經血或周邊血<sup>32,33</sup>。除上述方法外，近年來更有學者致力於發展化學方法，如拉曼光譜法（Raman spectroscopy），以應用於犯罪現場體液或者月經血的檢測<sup>34,35</sup>。

## 體液或其斑跡鑑別之分子生物學方法

傳統上利用化學呈色反應作為初步試驗之方法，雖然快速便利，但存在著背景干擾以及偽陽性的問題，如偵測血液的發光試驗就極容易受到強氧化劑、某些過渡金屬離子以及其他來源的過氧化酶等的影響<sup>36</sup>。此外，即使特定體液的確定性試驗也存在著靈敏度的問題，如血液的結晶試驗，因靈敏度問題而使得其陰性反應無法作為直接排除檢體為血液之依據。而針對精液的確定性試驗，如利用免疫分析法來偵測精液中的前列腺特異性抗原，則有研究指出其於男性尿液中也可被偵測到<sup>37</sup>；而利用顯微鏡直接觀察精蟲的有無來確認是否為精液之方法，卻無法排除為患有無精蟲症男性精液之可能性。因此，為提升體液或其斑跡鑑別之靈敏度與特異性，近年來陸續有利用分子生物學方法進行體液或其斑跡鑑別之方法被發表，而其鑑定標記包括具組織表現特異性之信息核糖核酸（messenger RNA; mRNA）與micro RNA，以及DNA甲基化（DNA methylation）序列等。

## RNA分析應用於體液鑑定之發展

在生物體中細胞要能正常運作，編碼（coding）以及非編碼（non-coding）RNA（如micro RNA）皆扮

演著非常重要的角色。若在基因上產生突變，有可能會破壞這些RNA甚至蛋白質的組成，而產生負面的危害。因此，這些與疾病相關的RNA突變情形，目前在醫學上亦能作為治療的一個指標<sup>38</sup>。雖然RNA分析已應用於醫學上進行疾病之研究及偵測，然而在刑事鑑識上之應用則處於剛起步的階段，利用RNA作為刑事鑑識上體液種類的鑑定，正是發展中的應用之一。

目前已有研究顯示，利用即時聚合酶鏈鎖反應（real-time PCR）針對萃取自15年以上的乾燥檢體進行mRNA之分析仍然是可行的<sup>39</sup>，因此，利用mRNA來辨識不同體液，為近年來刑事鑑識上發展的一個重點，其原理為具有組織表現特異性的基因，其在特定組織中表現mRNA以及蛋白質來維持身體各部位的功能，依此特性，針對不同的體液，即可利用具特異表現之mRNA作為標的來進行分析。目前已有文獻報導以人類β球蛋白（human β-globin; HBB）之mRNA作為血液鑑定之標的，人類β血球蛋白為組成成人血紅素的基本單元，並已經過許多研究證實具有極高之組織特異性<sup>40</sup>。至於精液之鑑定，則可利用作為精子細胞核中DNA結合蛋白的魚精蛋白（protamine）之mRNA來進行分析<sup>41</sup>；角蛋白（keratin）為人類外層表皮的主要組成，有研究指出其中的*KRT13*以及*KRT6A*基因之mRNA，可作為偵測口腔黏膜之標的<sup>42,43</sup>。而由於唾液成份中包含了從口腔剝落的黏膜細胞，因此，此二標的亦可被利用來進行唾液之鑑定分析。至於汗液檢體，目前則有利用其中的抗菌蛋白（如dermcidin）之mRNA來鑑定檢體是否為汗液<sup>44</sup>。不同的mRNA也被應用於女性月經血及女性分泌物之鑑定，例如採用基質金屬蛋白酶（matrix metalloproteinase; MMP）家族中的MMP 7 and MMP



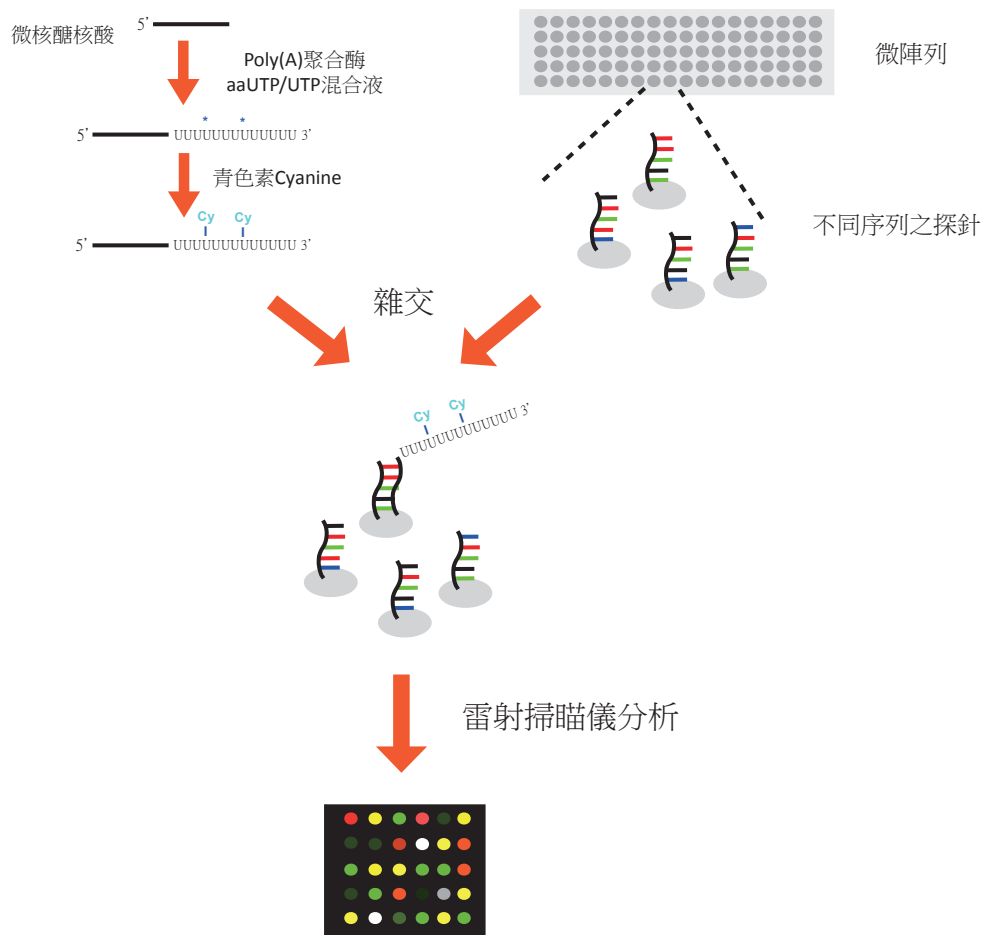
11的 mRNA進行月經血鑑別<sup>45,46</sup>，其可應用於性侵害或強暴案件中區別現場所遺留的血跡為月經血或周邊血，對於案情的釐清具有極重要的意義<sup>47</sup>。

而鑑定的方法基本上皆為先將RNA反轉錄為cDNA後，再針對各mRNA之特異序列使用不同方式，例如以直接電泳法（direct electrophoresis）、限制酶消化法（restriction enzyme digestion）、毛細管電泳法及即時聚合酶連鎖反應等加以分析，其中又以即時聚合酶連鎖反應以及毛細管電泳法的研究最多，更藉由標識不同螢光染料的探針以及針對各種特異性基因設計不同複製長度片段之策略，發展出多重RNA分型系統（multiplex RNA-profiling system），此系統的優點在於即使目標基因於聚合酶連鎖反應中因複製長度相近而無法區分，但只要藉由在探針上標識不同的螢光染料即可克服此問題，因此便可同時分析多個基因位之RNA表現情形<sup>48</sup>。

此外，部份的研究則是利用微陣列（microarray）雜交之方式挑選出具組織表現特異之micro RNA，以進行體液種類之鑑別。micro RNA的基因通常位於DNA之非編碼區域，結構為髮夾形狀的單股RNA，長度約為20到22個核苷酸，其作用為直接分解mRNA，使得其相對應的蛋白質無法被轉譯出，或阻擋mRNA轉譯成蛋白質之過程，因此許多micro RNA的表現是具有組織特異性的。由於刑案現場所發現的檢體為曝露在環境中，其中的紫外線以及熱等因素，會使得mRNA面臨嚴重裂解的問題，但由於micro RNA的片段極短，相對而言其受到裂解的影響較小，因此在體液鑑定上已成為另一個極受重視的研究標的。而微晶片雜交的原理則是在微晶片上的每個孔洞

中合成一特定已知序列之單股DNA作為探針，具螢光標識的micro RNA會黏合至序列互補的探針上，當晶片放入雷射掃描儀之後，藉由螢光的偵測便可得知不同體液中各種micro RNA的表現情形（圖十三）。在2010年Dmitry Zubakov等人就萃取了唾液、精液、陰道分泌物、靜脈血以及月經血的RNA，利用微晶片方式針對人體中718種micro RNA進行篩選，並從中挑選了特定micro RNA基因作為各種體液的特異性標記，以進行即時聚合酶連鎖反應分析。結果顯示雖然這些特定的基因在利用微晶片方式進行反應時可得到特異性表現之情形，但卻只有少數靜脈血液以及精液的基因在進行後續即時聚合酶連鎖反應時有較良好的分析結果，而其他體液則仍需繼續尋找其適合的特異性標記。即使如此，因為micro RNA有著較不易受檢體裂解影響的特性，加上此方法並不需耗費太多RNA，因此在體液鑑定上仍具有發展之潛力<sup>49</sup>。

刑案現場之體液證物，若能同時進行體液種類及檢體遺留者身分之鑑定，則必能提高其鑑定之時效性。因此，在2011年Anna Bowden等人就以Promega DNA IQ™系統為基礎，設計出能夠在單一檢體中同時萃取出DNA以及RNA的技術，達到在進行RNA組織特異性分析的同時，又能利用DNA進行人別個化（individualization）分析之目的<sup>50</sup>。此後，Alexander Lindenbergh等人亦於隔年利用QIAGEN公司的QIAampDNA mini Kit以及Applied Biosystems公司的mirVana miRNA Isolation Kit，同時進行DNA及RNA之萃取，除利用DNA之STR型別分析來進行人別鑑定之外，並成功地利用毛細管電泳發展出能夠同時偵測19個具組織特異性mRNA之分析系統，以同時進行多種體液之鑑定<sup>48</sup>。此方面研究的發展，將得以使刑事



圖十三、micro RNA微陣列雜交技術原理簡圖（彩圖詳見本刊網頁）

實驗室在處理刑案現場的微量檢體時，能夠降低檢體的耗費並得到最有效率的鑑定結果。

## DNA分析應用於體液鑑定之發展

由於DNA的穩定性遠大於RNA，因此在刑事鑑定實務上，仍希望發展以DNA為基礎的體液鑑定方式。近年來針對DNA甲基化在體液鑑定上之應用，便是一個受到注目的焦點。DNA甲基化為表附基因調節（epigenetic regulation）中的一種方式，其不需經由

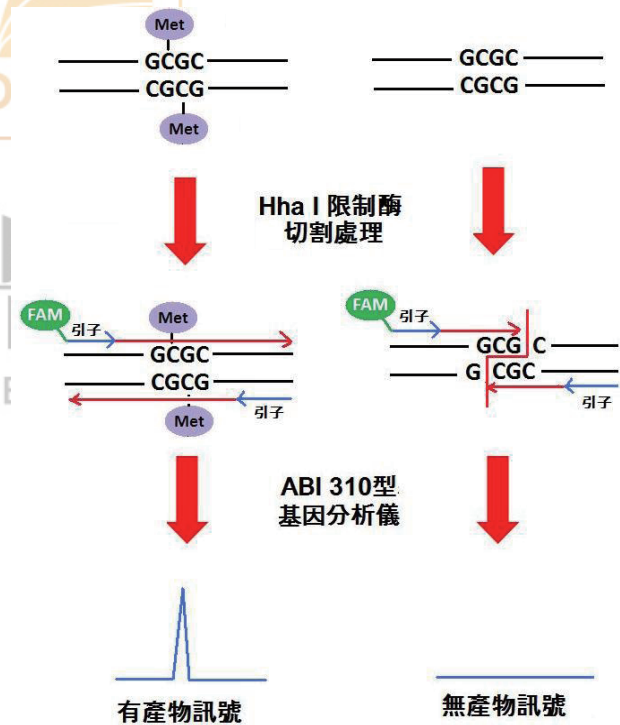
改變基因序列而能改變生物體表現型或調控基因之表現，但目前主要是應用於疾病，尤其是癌症的發生與檢測所進行之研究上，有研究即利用多個基因位甲基化之情形以診斷肝癌，亦有研究針對肺癌病人的檢體，分析其中與癌症有關的幾種基因之DNA甲基化情形<sup>51,52</sup>。許多研究亦顯示，癌症的發生常與抑癌基因啟動子中CpG島（CpG islands）被過度甲基化有關。此外，尚有基因甲基化程度和年齡與發育之相關性研究等被報導<sup>53,54</sup>。

目前用於分析DNA甲基化之方法，如傳統之

PCR複製技術、即時定量之PCR複製技術、重亞硫酸鹽限制分析法(Combined Bisulfite Restriction Analysis; COBRA)、酵素核苷酸併入技術(enzymatic nucleotide incorporation)及焦磷酸測序技術(pyrosequencing)等。而目前應用DNA甲基化分析於刑事相關體液種類鑑別之研究,包括利用對甲基化敏感之限制酶分析技術,以及配合多重引子PCR(multiplex PCR)複製技術及毛細管電泳分析等。此外,亦有利用重亞硫酸鹽(bisulfite)處理DNA,然後進行PCR複製、選殖再定序之方法,成功地用於鑑別包含精蟲細胞的精液檢體和其他體液;其原理為CpG位置上的胞嘧啶(C)若是未經過甲基化,則在重亞硫酸鹽處理過後其會被轉變為尿嘧啶(U),接著在進行PCR複製時,尿嘧啶會被視為胸腺嘧啶(T)而進行複製,相反的被甲基化之胞嘧啶則不會被重亞硫酸鹽轉變而維持原來的序列,經過網路上用來分析DNA甲基化的平台BDPC(Bisulfite sequencing Data Presentation and Compilation)應用程式式分析處理之後,便可得到各個CpG位置的甲基化圖譜,而比較出甲基化程度之差異。

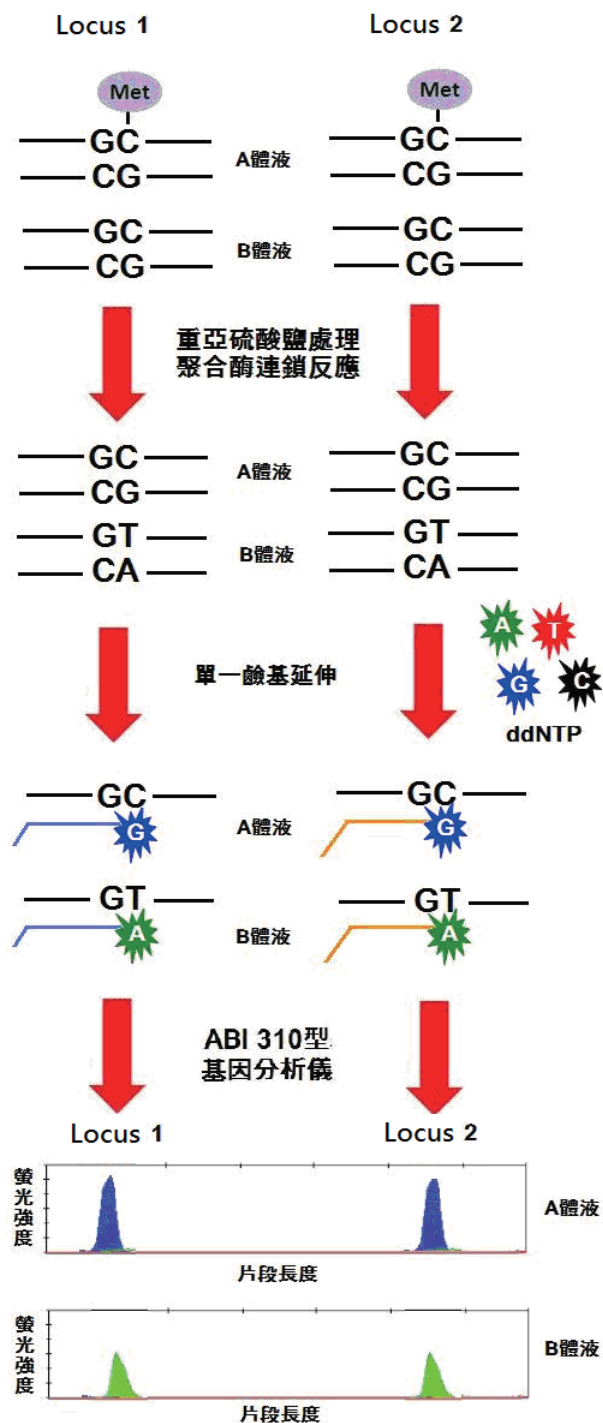
但由於以此種方法分析甲基化的步驟繁瑣且費時,因此2012年Ja Hyun An等人建議可改用較簡便的甲基化敏感性限制酶PCR法(methylation-specific restriction enzyme PCR; MSRE-PCR)(圖十四)以及甲基化SNaPshot法(methylation SNaPshot)來達到相同的鑑別效果<sup>55</sup>。甲基化敏感性限制酶PCR法使用了對甲基化敏感的限制酶Hha I, Hha I會辨識DNA上之GCGC序列,若此序列的胞嘧啶被甲基化,則Hha I便無法對其進行切割,因此,後續進行PCR複製或毛細管電泳分析時,此段序列就可被成功複製而得以偵

測;但若此序列的胞嘧啶未被甲基化則會被Hha I切割,導致進行PCR複製時無法複製出任何的產物。因此,便可利用此差別來辨識出不同體液中特定基因的甲基化情形。甲基化SNaPshot法是以SNaPshot技術為基礎,該技術原本是應用於分析單核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism; SNP)之現象,其之所以能應用於體液辨識甲基化方面的研究上,是因為未被甲基化的胞嘧啶經過重亞硫酸鹽處理後,再經PCR複製會被解讀為胸腺嘧啶,因此在不同體液中同一個CpG位置便產生序列上為胞嘧啶或胸腺嘧啶的差異,而藉由此種單一鹼基延伸的技術便能達到辨識的效果<sup>55-58</sup>(圖十五)。而目前較新的研究更有利用重亞硫酸鹽處理DNA,然後進行二次PCR(nested PCR)複製與焦磷酸測序,以鑑別不同之體液<sup>59</sup>。



圖十四、甲基化敏感性限制酶PCR法(methylation-specific restriction enzyme PCR; MSRE-PCR)原理簡圖(彩圖詳見本刊網頁)

## 結語



圖十五、甲基化SNaPshot原理簡圖（彩圖詳見本刊網頁）

人類體液為刑案現場中常見的生物性跡證，其中包括了血液、唾液、精液及尿液等，體液種類之鑑定對於案情的釐清是非常重要的，以往鑑識單位所使用的體液鑑別試驗，其方法雖然快速便利，但有時易受到環境因子的汙染或影響，而產生偽陽性或靈敏度不足等問題。某些體液如唾液目前更是缺乏確定性試驗，因此近幾年相關鑑識單位亦積極地找尋研發相關技術，以求能夠提升體液種類鑑定之靈敏度與專一性。目前利用特異性RNA分析體液之技術研究已漸趨成熟，可同時分析多個基因位以獲得確定性之結果，但礙於RNA易受到裂解的問題影響，且在實務上之應用不如DNA來得操作方便，因此亦有利用不同基因中CpG島甲基化情形來辨別體液之研究被進行。許多分子生物技術目前已普遍應用於生物醫學上作為疾病之研究或偵測，但尚未應用於刑事鑑識上，若能針對目前實務鑑識單位現有之儀器設備，而引用相關技術於體液種類辨識，並建立一套標準操作流程，則刑案現場所遺留體液檢體之鑑定將更具說服力與證據力，如

此並將能提高警方之破案能力。

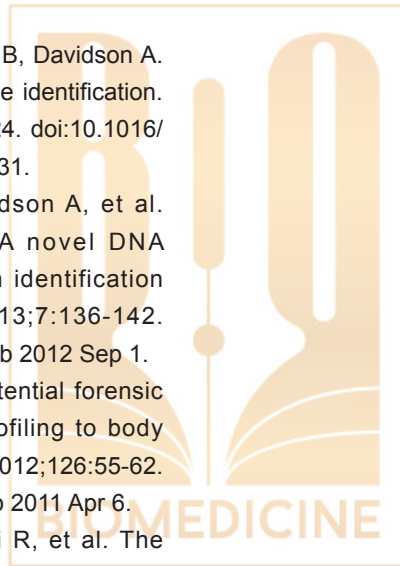
## 引用文獻

1. Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998;43:32-40.
2. Al Kawas S, Rahim ZH, Ferguson DB. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch Oral Biol* 2012 ;57:1-9. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.06.013. Epub 2011 Jul 19.
3. Xiao Z, Prieto D, Conrads TP, Veenstra TD, Issaq HJ. Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;230:95-106.
4. Lee, H.C. Identification and grouping of bloodstains,

- in Forensic Science Handbook I 1982:267-337.
5. CULLIFORD BJ, NICKOLLS LC. THE BENZIDINE TEST: A CRITICAL REVIEW. *J Forensic Sci* 1964;9:175-191.
  6. Webb JL, Creamer JI, Quickenden TI. A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *Luminescence* 2006;21:214-220.
  7. Cox M. A study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood. *J Forensic Sci* 1991;36:1503-1511.
  8. University, t.S.O.i.P.C.a.O. Safety data for benzidine. August 21,2006; Available from AND <http://msds.chem.ox.ac.uk/BE/benzidine.html>.
  9. Gaensslen, R.E. Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry AND Unit II-Identification of Blood 1983:National Institute of Justice.
  10. Takayama, M. A Method for Identifying Blood by Hemochromogen Crystallization, in Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry, R.E. Gaensslen, Editor. 1983, National Institute of Justice:51-57.
  11. Teichmann, L. Concerning the Crystallization of Organic Components of Blood in Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry, R.E. Gaensslen, Editor. 1983, National Institute of Justice:45-49.
  12. Hochmeister MN, Budowle B, Sparkes R, et al. Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. *J Forensic Sci* 1999;44:597-602.
  13. Jänne J, Hölttä E, Haaranen P, Elfving K. Polyamines and polyamine-metabolizing enzyme activities in human semen. *Clin Chim Acta* 1973;48:393-401.
  14. Jequier, A. and J. Crich. Secretions that make up Semen, in *Semen Analysis* 1986:19-25.
  15. Baechtel, F.S. The identification and individualization of semen stains, in *Forensic Science Handbook II* 1988:347-392.
  16. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, et al. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci* 2001;46:349-51.
  17. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin O, et al. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. *J Forensic Sci* 1999;44:1057-1060.
  18. Johnson ED, Kotowski TM. Detection of prostate specific antigen by ELISA. *J Forensic Sci* 1993;38:250-258.
  19. Yokota M, Mitani T, Tsujita H, et al. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test for forensic examination of semen. *Leg Med (Tokyo)* 2001;3:171-176.
  20. Scientific, T.F. Directions for use Phadebas Amylase Test. 2006.
  21. Quarino L, Dang Q, Hartmann J, Moynihan N. An ELISA method for the identification of salivary amylase. *J Forensic Sci* 2005;50:873-876.
  22. Toora BD, Rajagopal G. Measurement of creatinine by Jaffe's reaction--determination of concentration of sodium hydroxide required for maximum color development in standard, urine and protein free filtrate of serum. *Indian J Exp Biol* 2002;40:352-354.
  23. Ong SY, Wain A, Groombridge L, Grimes E. Forensic identification of urine using the DMAC test: a method validation study. *Sci Justice* 2012;52:90-95. doi:10.1016/j.scijus.2011.07.007. Epub 2011 Aug 30.
  24. Akutsu T, Ikegaya H, Watanabe K, et al. Evaluation of Tamm-Horsfall protein and uroplakin III for forensic identification of urine. *J Forensic Sci* 2010;55:742-746.
  25. Nakazono T, Kashimura S, Hayashiba Y, et al. Identification of human urine stains by HPLC analysis of 17-ketosteroid conjugates. *J Forensic Sci* 2002;47:568-572.
  26. Hausmann R, Pregler C, Schellmann B. The value of the Lugol's iodine staining technique for the identification of vaginal epithelial cells. *Int J Legal Med* 1994;106:298-301.
  27. Rothwell TJ, Harvey KJ. The limitations of the Lugol's iodine staining technique for the identification of vaginal epithelial cells. *J Forensic Sci Soc* 1978;18:181-184.
  28. Asano M, Oya M, Hayakawa M. Identification of menstrual blood stains by the electrophoretic pattern of lactate dehydrogenase isozymes. *Forensic Sci* 1972;1:327-332.
  29. Whitehead PH, Divall GB. Assay of "soluble fibrinogen" in bloodstain extracts as an aid to identification of menstrual blood in forensic science: preliminary findings. *Clin Chem* 1973;19:762-765.
  30. SHIRAISHI M. Studies on identification of menstrual

- blood stain by fibrin-plate method. I. A study on the incoagulability of menstrual blood. *Acta Med Okayama* 1962;16:192-200.
31. SHIRAIISHI M. Studies on identification of menstrual blood stain by fibrin-plate method. II. A study on the identification of menstrual blood stain. *Acta Med Okayama* 1962;16:201-204.
  32. Baker DJ, Grimes EA, Hopwood AJ. D-dimer assays for the identification of menstrual blood. *Forensic Sci Int* 2011;212:210-214. doi:10.1016/j.forsciint.2011.06.013. Epub 2011 Jul 7.
  33. Akutsu T, Watanabe K, Motani H, et al. Evaluation of latex agglutination tests for fibrin-fibrinogen degradation products in the forensic identification of menstrual blood. *Leg Med (Tokyo)* 2012;14:51-54. doi:10.1016/j.legalmed.2011.10.003. Epub 2011 Dec 19.
  34. Sikirzhytski V, Virkler K, Lednev IK. Discriminant analysis of Raman spectra for body fluid identification for forensic purposes. *Sensors (Basel)* 2010;10:2869-2884. doi:10.3390/s100402869. Epub 2010 Mar 29.
  35. Sikirzhytskaya A, Sikirzhytski V, Lednev IK. Raman spectroscopy coupled with advanced statistics for differentiating menstrual and peripheral blood. *J Biophotonics* 2012 Nov 23. doi:10.1002/jbio.201200191. [Epub ahead of print]
  36. Kent EJ, Elliot DA, Miskelly GM. Inhibition of bleach-induced luminol chemiluminescence. *J Forensic Sci* 2003;48:64-67.
  37. Fleming RI, Harbison S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Sci Int Genet* 2010;4:244-256. doi:10.1016/j.fsigen.2009.10.006. Epub 2009 Dec 14.
  38. Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell* 2009;136:777-793. doi:10.1016/j.cell.2009.02.011.
  39. Bauer M, Polzin S, Patzelt D. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci Int* 2003;138:94-103.
  40. Levings PP, Bungert J. The human beta-globin locus control region. *Eur J Biochem* 2002;269:1589-1599.
  41. Bauer M, Patzelt D. Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains. *Int J Legal Med* 2003;117:175-179. Epub 2003 Feb 4.
  42. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, et al. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med* 2008;122:135-142. Epub 2007 Jun 20.
  43. Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A, et al. New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med* 2009;123:71-74. doi:10.1007/s00414-008-0249-z. Epub 2008 Jul 2.
  44. Sakurada K, Akutsu T, Fukushima H, et al. Detection of dermcidin for sweat identification by real-time RT-PCR and ELISA. *Forensic Sci Int* 2010;194:80-84. doi:10.1016/j.forsciint.2009.10.015. Epub 2009 Nov 13.
  45. Jakubowska J, Maciejewska A, Pawłowski R, Bielawski KP. mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification. *Forensic Sci Int Genet* 2013;7:272-278. doi:10.1016/j.fsigen.2012.11.005. Epub 2012 Dec 28.
  46. Lindenbergh A, Maaskant P, Sijen T. Implementation of RNA profiling in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet* 2013;7:159-166. doi:10.1016/j.fsigen.2012.09.003. Epub 2012 Oct 1.
  47. Bauer M, Patzelt D. Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *J Forensic Sci* 2002;47:1278-1282.
  48. Lindenbergh A, de Pagter M, Ramdayal G, et al. A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6:565-577. doi:10.1016/j.fsigen.2012.01.009. Epub 2012 Feb 22.
  49. Wang Z, Luo H, Pan X, Liao M, Hou Y. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6:419-423. doi:10.1016/j.fsigen.2011.08.008. Epub 2011 Sep 7.
  50. Bowden A, Fleming R, Harbison S. A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ™ system. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5:64-68. doi:10.1016/j.fsigen.2009.11.007. Epub 2010 Jan 6.
  51. Hua D, Hu Y, Wu YY, et al. Quantitative methylation analysis of multiple genes using methylation-sensitive restriction enzyme-based quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2011;91:455-460. doi:10.1016/j.yexmp.2011.05.001. Epub 2011 May 11.

52. Boks MP, Derks EM, Weisenberger DJ, et al. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One* 2009;4:e6767. doi:10.1371/journal.pone.0006767.
53. Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol* 2006;43:1729-1740. Epub 2006 Feb 28.
54. Ushijima T, Okochi-Takada E. Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from? *Cancer Sci* 2005;96:206-211.
55. An, J.H., et al. DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. *International journal of legal medicine* 2012:1-9.
56. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5:517-524. doi:10.1016/j.fsigen.2010.12.001. Epub 2010 Dec 31.
57. Wasserstrom A, Frumkin D, Davidson A, et al. Demonstration of DSI-semen--A novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic Sci Int Genet* 2013;7:136-142. doi:10.1016/j.fsigen.2012.08.009. Epub 2012 Sep 1.
58. Lee HY, Park MJ, Choi A, et al. Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. *Int J Legal Med* 2012;126:55-62. doi:10.1007/s00414-011-0569-2. Epub 2011 Apr 6.
59. Madi T, Balamurugan K, Bombardi R, et al. The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing. *Electrophoresis* 2012;33:1736-1745. doi:10.1002/elps.201100711.



生物醫學  
BIOMEDICINE JOURNAL