

·技术与应用·

EX16+10Y 试剂盒检测新疆维吾尔族人群的效能

毕 钢¹,张 晨¹,董 研¹,焦海涛²,董 雷³,周怀谷¹

(1.上海市公安局物证鉴定中心 法医物证学现场应用技术公安部重点实验室 上海市现场物证重点实验室,上海 200083; 2.无锡中德美联生物技术有限公司,江苏 无锡 214174; 3.乌鲁木齐市公安局刑事科学技术研究所,新疆 乌鲁木齐 830063)

摘要:目的 检验 EX16+10Y 试剂盒在新疆维吾尔族人群中的法医学检测效能。方法 采集 4620 个新疆地区维吾尔族男性个体血样,用 EX16+10Y 试剂盒进行扩增,用 3130xl 基因分析仪对扩增产物进行分型。结果 获得 4620 个新疆维吾尔族男性个体的 15 个常染色体 STR 基因座和 10 个 Y 染色体 STR 基因座的完整分型图谱。15 个常染色体 STR 基因座分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡,STR 基因座的杂合度为 0.637~0.838,多态信息含量为 0.580~0.860,个体识别率为 0.811~0.978。10 个 Y 染色体 STR 基因座有 766 种单倍型。结论 EX16+10Y 试剂盒检测结果准确可靠,可用于实际工作中同时完成个体识别和男性家系排查。

关键词:法医遗传学;Y 染色体;短串联重复序列;EX16+10Y 试剂盒;新疆;维吾尔族

中图分类号:DF795.2 文献标志码:A doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2018.02.010

文章编号:1004-5619(2018)02-0154-03

Efficiency Analysis of EX16+10Y Kit on Detection of the Uygur Population in Xinjiang Province

BI Gang¹, ZHANG Chen¹, DONG Yan¹, JIAO Hai-tao², DONG Lei³, ZHOU Huai-gu¹

(1. Shanghai Key Laboratory of Crime Scene Evidence, Key Laboratory of Forensic Evidence and Science Technology, Ministry of Public Security, Institute of Forensic Science, Shanghai Public Security Bureau, Shanghai 200083, China; 2. AGCU ScienTech Incorporation, Wuxi 214174, China; 3. Institute of Criminal Science and Technology, Urumqi Public Security Bureau, Urumqi 830063, China)

Abstract: **Objective** To analyse the efficiency of EX16+10Y kit on the forensic detection of the Uygur in Xinjiang province. **Methods** The blood samples were extracted from 4620 male individuals of Uygur in Xinjiang province, and amplified by EX16+10Y kit. The typing of amplification products was performed by 3130xl genetic analyzer. **Results** The genotyping graphs of 15 autosomal STR loci and 10 Y-chromosomal STR loci from 4620 male individuals of Uygur in Xinjiang province were acquired completely. The genotype distribution of 15 autosomal STR loci was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. The heterozygosity, polymorphism information content and discrimination power of STR loci were 0.637~0.838, 0.580~0.860 and 0.811~0.978, respectively. There were 766 haplotypes in 10 Y-chromosomal STR loci. **Conclusion** The test results of EX16+10Y kit is accurate and trustworthy, which can simultaneously be used for the individual identification and the screening of paternal pedigree in practical work.

Keywords: forensic genetics; Y chromosome; short tandem repeat; EX16+10Y kit; Xinjiang; Uygur nationality

目前,法医物证 DNA 个体识别检验主要采用常染色体 STR 分型试剂盒,父系遗传检验主要采用 Y 染色体 STR 分型试剂盒。有些情况下,个体识别和父系遗传检验需同时进行,为解决两种试剂盒分别检验带

来人力物力的浪费,以及物证量微带来的检验困难等难题,本课题组采用 EX16+10Y 试剂盒对 4620 份新疆维吾尔族男性个体血样同时检测 15 个常染色体 STR 基因座和 10 个 Y 染色体 STR(Y-STR)基因座,评估 EX16+10Y 试剂盒的检测效能。

1 材料与方法

1.1 样本

保存在 FTA 卡上的男性血液样本 4620 份,样本

基金项目:上海市科研计划资助项目(13JC0500200)

作者简介:毕钢(1962—),男,博士,副主任法医师,主要从事法医 DNA 分析技术的应用和研究;E-mail:zhongbi2003@qq.com

通信作者:周怀谷,男,博士,主任法医师,主要从事法医 DNA 分析技术的应用和研究;E-mail:hgzhou803@hotmail.com

为随机采集的新疆维吾尔族未知关系个体,血样贡献者均为志愿者,并签署知情同意书。

1.2 主要试剂及仪器

EX16+10Y 试剂盒(无锡中德美联生物技术有限公司)。3130xl 基因分析仪、9700 型 PCR 仪(美国 AB 公司),DB-100A 手动打孔仪(北京达博创新科技开发有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 样本准备

采用 DB-100A 手动打孔仪截取直径 1.2 mm FTA 血样卡滤纸放入 96 孔板,直接采用 EX16+10Y 试剂盒进行 PCR 扩增。同时以 9948A 为阳性对照,以去离子水为阴性对照。

1.3.2 PCR 扩增

1.3.2.1 STR 基因座信息

EX16+10Y 试剂盒中常染色体基因座包括:*D3S1358*、*D13S317*、*D7S820*、*D16S539*、*D19S433*、*TPOX*、*TH01*、*D2S1338*、*CSF1PO*、*vWA*、*D5S818*、*FGA*、*D8S1179*、*D21S11*、*D18S51*;Y 染色体基因座包括:*DYS390*、*DYS391*、*DYS392*、*DYS393*、*DYS438*、*DYS456*、*DYS458*、*DYS635*、*DYS385a/b*。

1.3.2.2 PCR 扩增条件

总反应体积 25 μ L,包括:反应混合物 10 μ L,引物混合物 5 μ L,热启动 *Taq* 酶 1 μ L(5 U),1.2 mm 滤纸片,去离子水 9 μ L。其中反应混合物: Mg^{2+} 终浓度 0.9 mg/L,dNTP 终浓度 0.28 mmol/L,BSA 终浓度 0.9 mg/L,Tris-HCl 10 mmol/L,KCl 50 mmol/L,四甲基氯化胺 10 mmol/L, $NaNO_3$ 0.008%。

PCR 反应程序:95 $^{\circ}C$ 2 min;94 $^{\circ}C$ 30 s,55 $^{\circ}C$ 1 min,72 $^{\circ}C$ 1 min,循环 33 次;70 $^{\circ}C$ 1 h;4 $^{\circ}C$ 持续。

1.3.3 电泳分析

PCR 产物用 3130xl 基因分析仪进行毛细管电泳,用 GeneMapper[®] ID v3.2 软件进行基因型分析。当分型图谱的峰值大于 100 RFU 时,满足检验分析要求。

1.4 统计学处理

采用 PowerMarker V3.25^[1]计算常染色体 STR 基因座观察杂合度(H_o)、多态信息含量(PIC),采用 Powerstate 软件计算个体识别率(DP)、匹配概率(Pm)、三联体非父排除率(PE_{in})。对各基因座等位基因进行 Hardy-Weinberg 平衡分析。

Y-STR 基因座等位基因频率采用直接计数法,基因多样性(GD)计算公式为:

$$GD = n(1 - \sum P_i^2) / (n-1), \quad (1)$$

式中, n 为样本数, P_i 为单倍型频率。

2 结果

2.1 15 个常染色体 STR 基因座分型结果

4620 份血样全部获得清晰的分型图谱,峰值大于 100 RFU,满足检验要求。等位基因的碱基数与 Ladder 相应等位基因的碱基数偏差介于 ± 0.5 bp。阳性参照物 9948 的分型结果正确,均衡性好,阴性参照物无基因峰。

15 个常染色体 STR 基因座的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$), H_o 为 0.637~0.838,PIC 为 0.580~0.860,DP 为 0.811~0.978,累积个体识别率为 0.999 999 999 999 999。三联体累积非父排除率(CPE)达 0.999 998 084,满足亲子鉴定需要。15 个常染色体 STR 基因座的群体遗传学参数见表 1。

表 1 15 个常染色体 STR 基因座的群体遗传学参数
($n=4620$)

基因座	H_o	PIC	DP	PE_{in}	Pm
<i>D13S317</i>	0.792	0.790	0.945	0.609	0.075
<i>D16S539</i>	0.781	0.770	0.926	0.562	0.078
<i>D18S51</i>	0.838	0.860	0.968	0.691	0.045
<i>D19S433</i>	0.814	0.790	0.954	0.638	0.058
<i>CSF1PO</i>	0.734	0.790	0.892	0.472	0.129
<i>D21S11</i>	0.811	0.810	0.953	0.642	0.062
<i>D2S1338</i>	0.824	0.860	0.978	0.731	0.038
<i>D3S1358</i>	0.715	0.690	0.868	0.472	0.132
<i>D5S818</i>	0.783	0.745	0.923	0.536	0.094
<i>D7S820</i>	0.786	0.758	0.924	0.557	0.088
<i>D8S1179</i>	0.817	0.830	0.958	0.671	0.054
<i>FGA</i>	0.807	0.850	0.971	0.712	0.039
<i>TH01</i>	0.720	0.659	0.868	0.385	0.145
<i>TPOX</i>	0.637	0.580	0.811	0.328	0.203
<i>vWA</i>	0.768	0.790	0.935	0.597	0.071

2.2 10 个 Y-STR 基因座的遗传多态性

10 个 Y-STR 基因座在 4620 份新疆维吾尔族男性个体中共观察到 766 种单倍型,具有 8 个、9 个、10 个相同单倍型的分别为 20、10、2 人。*DYS391* 的 GD 值最低(0.453 7),*DYS385a/b* 的 GD 值最高(0.923 2)。Y-STR 基因座的等位基因频率分布和 GD 值见表 2~3。

表2 新疆维吾尔族人群 10 个 Y-STR 基因座的等位基因频率

(n=4 620)

<i>DYS390</i>		<i>DYS392</i>		<i>DYS393</i>		<i>DYS456</i>		<i>DYS385a/b</i>	
等位基因	频率	等位基因	频率	等位基因	频率	等位基因	频率	等位基因	频率
10	0.001 2	7	0.010 8	10	0.001 7	12	0.021 9	8	0.000 5
18	0.000 3	9	0.000 2	11	0.006 7	13	0.017 4	9	0.002 7
19	0.003 3	10	0.030 5	12	0.462 4	14	0.138 2	10	0.010 8
20	0.001 7	11	0.245 5	13	0.331 6	15	0.573 4	11	0.129 6
21	0.013 4	12	0.122 8	14	0.147 5	16	0.195 5	12	0.192 7
22	0.057 6	13	0.270 9	15	0.041 1	17	0.069 4	13	0.184 7
23	0.397 2	14	0.261 8	16	0.000 7	18	0.012 7	14	0.099 2
24	0.301 6	15	0.035 1	<i>DYS635</i>		19	0.001 3	15	0.048 2
25	0.182 5	16	0.007 5	等位基因	频率	<i>DYS458</i>		16	0.068 4
26	0.027 8	17	0.005 7	10	0.000 3	等位基因	频率	17	0.066 2
27	0.003 6	<i>DYS438</i>		11	0.001 9	14	0.023 5	18	0.070 6
28	0.000 4	等位基因	频率	12	0.003 9	15	0.167 2	19	0.067 2
<i>DYS391</i>		8	0.002 9	13	0.002 5	16	0.198 8	20	0.043 1
等位基因	频率	9	0.043 9	14	0.001 4	17	0.249 3	21	0.016 2
6	0.004 8	10	0.630 7	15	0.001 1	18	0.198 6	22	0.006 4
7	0.004 5	11	0.272 1	16	0.001 1	18	0.002 7	23	0.002 8
8	0.001 9	12	0.042 1	18	0.001 7	19	0.093 8	24	0.001 9
9	0.047 3	13	0.007 2	19	0.094 4	20	0.047 9	25	0.002 1
10	0.720 9	14	0.001 1	20	0.208 3	21	0.025 9	26	0.001 9
11	0.220 8	15	0.002 5	21	0.310 1	22	0.014 3		
12	0.006 6	16	0.001 1	22	0.166 8	23	0.004 2		
13	0.002 3	17	0.001 2	23	0.141 1	24	0.001 8		
15	0.001 1			24	0.056 1	25	0.000 3		
16	0.000 3			25	0.014 9				
				26	0.002 8				

表3 新疆维吾尔族人群 10 个 Y-STR 基因座的 GD 值 (n=4 620)

基因座	GD	基因座	GD
<i>DYS390</i>	0.725 4	<i>DYS456</i>	0.615 7
<i>DYS391</i>	0.453 7	<i>DYS458</i>	0.835 1
<i>DYS392</i>	0.754 7	<i>DYS635</i>	0.812 8
<i>DYS393</i>	0.638 8	<i>DYS385a/b</i>	0.923 2
<i>DYS438</i>	0.528 1		

3 讨 论

STR 基因座分型是目前主要的法医检验方法,探索如何增强 STR 基因座分型检验效能有实际意义。一般常染色体 STR 复合扩增用于个体识别,Y-STR 复合扩增用于家系排查,这样分别检验,能满足部分工作的需要,如仅需要个体识别的案件或前科人员库的建立。在某些案件中,需要同时进行个体识别或家系排查,若将常染色体 STR 和 Y-STR 基因座同时扩增,能提高检材利用率,缩短检验时间,为案件快速侦破提供帮助。

EX16+10Y 试剂盒中 15 个常染色体 STR 基因座和 AmpF ℓ STRTM IdentifilerTM Plus PCR 扩增试剂盒(美国 AB 公司)中基因座完全相同,和 DNA 联合索引系

统(CODIS)结合方便,便于实验室数据比对和共享。15 个常染色体 STR 基因座的 DP>0.8、Ho>0.7(除 *TPOX* 外),联合应用可用于同一认定。PE 值高,满足三联体亲子鉴定要求。相关研究董研等^[2-3]已有报道。

EX16+16Y 试剂盒中 10 个 Y-STR 基因座选择了 AmpF ℓ STRTM YfilerTM PCR 扩增试剂盒(美国 AB 公司)中多态性较高的基因座。本研究所有男性样本在 Y-STR 基因座均只检出 1 个等位基因。多态性分析发现,*DYS391* 的 GD 值最低,为 0.453 7,*DYS385a/b* 的 GD 值最高,为 0.923 2。与周卫江等^[4]用 AmpF ℓ STRTM YfilerTM PCR 扩增试剂盒对 288 名新疆维吾尔族群体的多态性研究进行了数据比对,GD 值经 *t* 检验,差异无统计学意义。

为验证检验结果,我们对调查样本进行了实地调查,10 个 Y-STR 基因座不相同者无血缘关系。结果表明,EX16+10Y 试剂盒能满足大批量排查工作。但也有部分 10 个 Y-STR 基因座分型相同者,并未显示有血缘关系,对于这种情况,可通过增加 Y-STR 基因座检测进一步确认他们是否为同一家族。后期我们将开发 EX16+16Y 试剂盒,以提高排查的准确性。

(下转第 160 页)

率存在差异;(2)两研究中联苯胺试验后放置的时间不同(本研究进行联苯胺试验后室温通风放置 1 h 再进行 DNA 提取,其研究采用室温放置 30 min~24 h 在不同时间段进行 DNA 提取),可能导致后续的 DNA 提取及统计数据存在差异;(3)其研究中样本例数偏少(每组仅 6 例),且未考虑联苯胺试验中每种试剂对 DNA 提取效率的影响。但朱传红等^[4]的研究也发现,不同的 DNA 提取方法对联苯胺试验处理的血痕进行 DNA 提取后的 DNA 含量有着显著的影响,本研究结论与其一致。因此,笔者认为血痕联苯胺试验后进行干燥处理,并采用硅珠法提取 DNA,完全可以满足实际案件的需要。

综上所述,联苯胺试验对血痕的后续 DNA 检验有较大的影响,Chelex-100 法不适合联苯胺试验后血痕的 DNA 检验,联苯胺试验后干燥处理及采用硅珠纯化的方法可有效提升联苯胺试验后血痕的 STR 基因座检出数,以达到实际案件的需要。本研究仅对比了联苯胺试验及相关试剂短期(立即检验和室温干燥 1 h)对血痕 DNA 检验的影响,后续将在本研究的基

础上,在更多的时间点对联苯胺试验及相关试剂对血痕 DNA 检验的影响进行研究,并对联苯胺试验影响血痕 DNA 检验的原理进行深入的探讨。

参考文献:

- [1] 罗凯,李明谦,曾途. 隐性血痕在命案现场中的运用[J]. 广西警官高等专科学校学报,2007(S1):61-63.
- [2] 巴华杰,马骏,朱爱华,等. 雨淋外衣上潜在血迹 DNA 检验 1 例[J]. 法医学杂志,2010,26(3):240.
- [3] DE ALMEIDA J P, GLESSE N, BONORINO C. Effect of presumptive tests reagents on human blood confirmatory tests and DNA analysis using real time polymerase chain reaction[J]. Forensic Sci Int,2011,206(1-3):58-61.
- [4] 朱传红,郑道利,倪尧志,等. 联苯胺预试验处理血痕后样本 DNA 定量的研究[J]. 刑事技术,2012(6):13-16.
- [5] 巴华杰,林子清,刘亚楠,等. 5 种免提取试剂盒检验滤纸血痕结果的比较[J]. 中国法医学杂志,2013,28(1):49-51.

(收稿日期:2016-09-04)

(本文编辑:边英男)

(上接第 156 页)

参考文献:

- [1] 刘亚举,张俊涛. 几款遗传学分析软件在法医生物统计中的应用[J]. 河南科技大学学报(医学版),2014,32(1):62-64.
- [2] 董研,林双双,曹禹,等. 15 个常染色体和 10 个 Y-STR 基因座复合扩增试剂盒的研发[J]. 法医学杂志,2015,31(5):373-376,380.

- [3] ZHOU H, BI G, ZHANG C, et al. Developmental validation of forensic DNA-STR kits: Expressmarker 16+10Y and expressmarker 16+18Y[J]. Forensic Sci Int Genet,2016,24:1-17.
- [4] 周卫江,李平. 新疆维吾尔族群体 16 个 Y-STR 基因座遗传多态性[J]. 中国法医学杂志,2011,26(1):61-62.

(收稿日期:2016-11-24)

(本文编辑:张素华)