

· 经验交流 ·

HID-Ion AmpliSeq™ SNP-124 个体识别试剂盒在降解检材中的应用

刘 浩,郑洁莹

(岳阳市公安局刑侦支队 刑事科学技术研究所,湖南 岳阳 414000)

关键词: 法医遗传学;多态性,单核苷酸;个体识别;降解检材

中图分类号: DF795.2 文献标志码: B doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2018.06.022

文章编号: 1004-5619(2018)06-0682-03

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为第三代遗传标记,在人类基因组中分布广泛,突变率低,广泛应用于遗传学、药理学、人类进化及法医学等研究^[1]。相对于STR基因座的高突变率及片段检测要求,学者预测在未来SNP将替代STR基因座成为法医学研究及应用的主要遗传标记^[1]。目前,法医学常用的SNP检测技术如SNPlex、SNaPShot、Massarray等,最多只能对几十个SNP位点同时进行检测^[1-3],从而限制了SNP位点的广泛使用。本研究中,HID-Ion AmpliSeq™ SNP-124个体识别试剂盒作为基于二代测序Ion Torrent PGM平台开发的第一个商业化SNP检测试剂盒,包含90个已验证的全球通用常染色体SNP位点和34个Y染色体系统发育树上最大单倍型SNP位点。目前,该试剂盒在中国人群中的数据验证已完成,结果显示该试剂盒中所含有的大部分SNP位点多态性丰富^[4]。本研究尝试采用该试剂盒对日常检案中无法获取完整DNA分型的降解检材进行检测。

1 材料与方法

20例降解检材均来自于岳阳市公安局刑侦支队刑事科学技术研究所,采用QIAamp血液样本抽提试剂盒(德国Qiagen公司)提取DNA,用Quantifiler™ Human DNA定量试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司)进行DNA定量。阳性标准品采用9948。

毛细管电泳检测:对提取的DNA采用Huaxia™ Platinum PCR扩增试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司)进行23个常染色体STR基因座的检测,具体操作详见试剂盒说明书。PCR产物在3500xL基因分析仪(美国AB公司)上进行基因分型检测。检测成

功基因座要求等位基因相对荧光单位(relative fluorescence unit, RFU)大于50,若为杂合子,其均衡性大于60%^[4]。

二代测序检测:采用HID-Ion AmpliSeq™ SNP-124个体识别试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司)对上述20份检材进行检测分析。具体操作为DNA文库构建、文库定量、乳液PCR反应、文库富集、测序及结果分析。其中,DNA文库构建采用Ampliseq技术及相应的Ion AmpliSeq™ 2.0-96LV文库制备试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司),最终文库构建PCR体系为20 μL,含4 μL 5× Ion AmpliSeq HiFi反应混合液,10 μL 2× HID-Ion AmpliSeq™ Identity Panel SNP-124引物混合物,DNA含量为10 ng以内,其余体积用去离子水补齐。文库构建的PCR条件:99℃ 2 min;99℃ 15 s,60℃ 4 min,23个循环;产物10℃保存。扩增产物采用2 μL FuPa对引物进行部分消化,并进行磷酸化。处理条件:50℃ 10 min,55℃ 10 min,60℃ 20 min,10℃保存,保存时间不宜超过1 h。之后,加入2 μL已提前稀释的Barcode、4 μL Switch Solution以及2 μL DNA连接酶,总反应体积为30 μL。处理条件:22℃ 30 min,72℃ 10 min,10℃保存。产物在1 h内进行纯化处理或者于-20℃冷冻保存,采用实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)对文库进行精确定量。乳液PCR扩增体系见表1。

按照表1将PCR体系准备好后,再加入100 μL充分振荡混匀的Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles(美国Thermo Fisher Scientific公司),15 min内在Ion OneTouch™ 2乳液PCR仪上选择“Ion PGM™ Template OT2 200 Kit”选项进行乳液PCR,时间约

8 h。产物取出时间不超过 16 h(从反应开始计时)。之后在 Ion OneTouch™ ES 仪器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)上进行 ISP 磁珠富集。富集后的文库在 Ion Torrent PGM 仪器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)上采用“Ion PGM™ Sequencing 200 v2”程序进行测序检测。Flow 数为 500。采用 HID_SNP_Genotyper.42(v4.2)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)对测序数据进行分析。检测成功位点要求测序 reads 数大于 100,杂合子均衡性大于 60%^[4]。

表 1 乳液 PCR 体系配置

PCR 组分	体积/ μ L
Ion PGM™ Template OT2 200 反应混合物	500
Ion PGM™ Template OT2 200 PCR 反应液 B	300
Ion PGM™ Template OT2 200 酶混合物	50
稀释后文库(20 pmol/L)	15
去离子水	35
总体积	900

2 结果与讨论

阳性标准品 9948 采用常规毛细管电泳检测和二代测序技术检测均可以获得完整的分型结果。其中,

9948 在 23 个 STR 基因座的分型结果与试剂盒说明书中所提供的一致,9948 在 124 个 SNP 位点的分型结果与文献^[4]中提供的结果一致,表明上述方法的准确性和重复性可满足实际工作需要。

20 例降解样本的检测结果见表 2。其中,采用毛细管电泳检测均不能获得完整的分型结果,检测成功的基因座数目为 5~20 个,即基因座检测成功率为 21.7%~87.0%,平均检测成功率为 45.8%。对于杂合子分型,采用等位基因峰值较低与等位基因峰值较高的峰高比值进行均衡性评估,单个样本的杂合子均衡性范围分布为 60.8%~75.6%,20 个样本的平均杂合子均衡性为 66.1%。对于上述 20 份样本采用二代测序的结果表明:7 份样本可以获取完整分型,即在 124 个 SNP 位点上均有测序信号峰,且 reads 数大于 100;对于检测到两个等位基因信号值的分型,采用测序信号低的等位基因 reads 数与测序信号高的 reads 数的比值进行均衡性评估,均高于 60%。最低的测序成功率为 1 号样本(42.0%),杂合子均衡性为 78.6%,检测到的测序数据均真实可信。20 份样本的平均检测成功率为 82.7%,平均杂合子均衡性为 74.8%,相较于毛细管电泳差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 20 例降解样本采用毛细管电泳和二代测序检测的结果

样本 编号	毛细管电泳检测				二代测序检测			
	检测成功 基因座/个	检测成功率/ %	杂合子个数	平均均衡性/ %	检测成功 基因座/个	检测成功率/ %	杂合子个数	平均均衡性/ %
1	5	21.7	2	62.3	52	41.9	25	78.6
2	8	34.8	4	65.7	88	71.0	54	75.4
3	10	43.5	5	64.3	96	77.4	60	69.8
4	12	52.2	9	60.8	124	100.0	82	78.4
5	11	47.8	6	61.5	102	82.3	71	69.3
6	10	43.5	5	62.7	96	77.4	41	69.8
7	14	60.9	8	61.9	124	100.0	76	72.5
8	8	34.8	3	62.4	89	71.8	39	72.8
9	7	30.4	4	61.6	94	75.8	43	79.8
10	7	30.4	3	70.2	96	77.4	38	80.2
11	6	26.1	2	68.1	105	84.7	62	81.3
12	12	52.2	6	62.4	124	100.0	63	78.9
13	15	65.2	6	65.9	124	100.0	74	82.1
14	14	60.9	8	72.9	124	100.0	76	80.2
15	18	78.3	10	75.6	124	100.0	54	65.9
16	10	43.5	4	70.2	106	85.5	52	74.5
17	20	87.0	9	68.9	124	100.0	58	72.4
18	6	26.1	5	64.2	78	62.9	30	71.5
19	7	30.4	3	65.7	92	74.2	52	63.9
20	7	30.4	4	65.9	88	71.0	41	73.6

研究表明,当DNA发生降解时,采用常规毛细管电泳进行检测,常发生基因座检测不完全的现象,主要原因在于:毛细管电泳检测主要依靠对片段的大小进行判别分析,在体系设计时需根据可选荧光素数量及片段的大小差异进行排列分布。当DNA发生降解时,大片段常常无法获取有效扩增片段。本研究中HID-Ion AmpliSeq™ SNP-124个体识别试剂盒中含有的SNP位点对于片段的大小无要求,可以将其设计得尽量短,其中常染色体SNP位点的平均文库大小为132 bp, Y-SNP位点的平均文库大小为141 bp,对其中7个降解检材可获取完整分型。上述结果均提示,采用二代测序及SNP位点对于降解检材可以获取更为丰富的遗传信息,用于法医学身份识别。

参考文献:

- [1] SOBRINO B, BRION M, CARRACEDO A. SNPs in forensic genetics: A review on SNP typing methodologies[J]. Forensic Sci Int, 2005, 154(2-3):181-194.
- [2] BØRSTING C, FORDYCE S L, OLOFSSON J, et al. Evaluation of the Ion Torrent HID SNP 169-plex: A SNP typing assay developed for human identification by second generation sequencing[J]. Forensic Sci Int Genet, 2014, 12:144-154.
- [3] EDUARDOFF M, SANTOS C, de la PUENTE M, et al. Inter-laboratory evaluation of SNP-based forensic identification by massively parallel sequencing using the Ion PGM[J]. Forensic Sci Int Genet, 2015, 17:110-121.
- [4] ZHANG S, BIAN Y, ZHANG Z, et al. Parallel Analysis of 124 universal SNPs for human identification by targeted semiconductor sequencing[J]. Sci Rep, 2015, 5:18683.

(收稿日期:2017-04-26)

(本文编辑:张素华)