

· 论 著 ·

ForenSeq™ DNA Signature Prep试剂盒在浙江畲族人群中的法医学应用

屈轶龄^{1*}, 林源^{2*}, 杨子豪^{2,3}, 陶瑞旸², 夏若成², 曹正军⁴, 高瑞祥⁴, 于欢^{1,2}, 王紫薇^{1,2}, 杨琪^{1,2}, 张晓春^{1,2}, 张素华², 李成涛^{1,2}

1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123; 2. 司法鉴定科学研究院 上海市法医学重点实验室 司法部司法鉴定重点实验室 上海市司法鉴定专业技术服务平台, 上海 200063; 3. 华东政法大学, 上海 200042; 4. 盐城市公安局刑警支队, 江苏 盐城 224000

摘要: 目的 评估ForenSeq™ DNA Signature Prep试剂盒(以下简称ForenSeq试剂盒)对浙江畲族人群STR序列的解读能力及法医学应用效能。方法 应用MiSeq FGx法医基因组学系统和ForenSeq试剂盒对50例浙江畲族人群样本进行大规模平行测序(massively parallel sequencing, MPS)检测, 采用ForenSeq™通用分析软件分析测序数据, 获取58个STR基因座的分型结果及序列结构信息。将MPS与PCR-CE技术的分型结果进行一致性比对, 并计算等位基因频率和群体遗传学参数。结果 在50例浙江畲族人群样本中, 共观察到448种序列多态性等位基因, 与PCR-CE技术检测的片段长度多态性结果相比, 基于ForenSeq试剂盒的MPS检测增加了82个等位基因, 在6个基因座的侧翼区共发现7个SNP变异。22例男性的24个Y染色体STR基因座中共检测到19种单倍型。27个常染色体STR基因座的累积个体识别率为 $1-8.87 \times 10^{-30}$, 累积二联体非父排除率为0.999 999 962 640 657, 累积三联体非父排除率为0.999 999 999 999 633。结论 基于MiSeq FGx法医基因组学系统使用ForenSeq试剂盒进行MPS检测, 极大提高了检测效能。58个STR基因座在所调查的浙江畲族人群中具有良好的遗传多态性, 可应用于法医学个体识别和亲权鉴定。

关键词: 法医遗传学; 大规模平行测序; 短串联重复; 多态现象; 遗传; ForenSeq™ DNA Signature Prep试剂盒; 畲族; 浙江

中图分类号: DF795.2 文献标志码: A doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2021.510404
文章编号: 1004-5619(2021)06-0817-08



Forensic Application of ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit in Zhengjiang She Ethnic Group

QU Yi-ling^{1*}, LIN Yuan^{2*}, YANG Zi-hao^{2,3}, TAO Rui-yang², XIA Ruo-cheng², CAO Zheng-jun⁴, GAO Rui-xiang⁴, YU Huan^{1,2}, WANG Zi-wei^{1,2}, YANG Qi^{1,2}, ZHANG Xiao-chun^{1,2}, ZHANG Su-hua², LI Cheng-tao^{1,2}

1. School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu Province, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine, Key Laboratory of Forensic Science, Ministry of Justice, Shanghai Forensic Service Platform, Academy of Forensic Science, Shanghai 200063, China; 3. East China University of Political Science and Law, Shanghai 200042, China; 4. Criminal Police Detachment of Yancheng Public Security Bureau, Yancheng 224000, Jiangsu Province, China

Abstract: **Objective** To evaluate the ability of the ForenSeq™ DNA Signature Prep kit (ForenSeq kit) in analyzing the sequence information of STRs in Zhejiang She ethnic group and its forensic application efficacy. **Methods** A total of 50 Zhejiang She ethnic group samples were sequenced with the ForenSeq kit on the MiSeq FGx platform. The data was analyzed using ForenSeq™ universal analysis software to obtain the motif structure and flank regions of the 58 STRs, then compared with PCR-CE typing results to test the consistency. At last, the allele frequency and population genetic parameters were calculated. **Results** A total of 448 sequence polymorphic alleles were detected in 50 samples of Zhejiang She ethnic group. Compared with fragment length polymorphism detected by PCR-CE, 82 alleles were increased by MPS detection based on ForenSeq kit, and 7 SNPs variation were detected in the flanking regions of 6 loci. The 22 male individuals were genotyped, and total 19 haplotypes were detected in 24 Y chromosome STRs of these 22 males. The cumulative discrimination power of the 27 autosomal STRs was $1-8.87 \times 10^{-30}$, the cumulative probability of exclusion of duo-testing was 0.999 999 962 640 657, the cumulative probability of exclusion of trios-testing was 0.999 999 999 999 633. **Conclusion** Based on MPS typing technology, using the ForenSeq kit greatly improves the detection efficiency. In addition, the 58 STRs have good genetic polymorphisms in Zhejiang She ethnic group, which are suitable for individual identification and paternity identification in forensic application.

Keywords: forensic genetics; massively parallel sequencing; short tandem repeat (STR); polymorphism, genetic; ForenSeq™ DNA Signature Prep kit; She ethnic group; Zhejiang

基金项目: 万人计划青年拔尖人才项目(WRQB2019); 中青年科技创新领军人才项目(2018RA2102); 司法部司法鉴定重点实验室资助项目; 上海市法医学重点实验室资助项目(21DZ2270800); 上海市司法鉴定专业技术服务平台资助项目(19DZ2292700)

作者简介: 屈轶龄(1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: moeqyl77@163.com

作者简介: 林源(1967—), 男, 主任法医师, 主要从事法医物证学研究; E-mail: liny@ssfjd.cn

通信作者: 张素华, 女, 副研究员, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: zhangsh@ssfjd.cn

通信作者: 李成涛, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: lichengtaohla@163.com

*屈轶龄和林源为共同第一作者

短串联重复(short tandem repeat, STR)序列由2~6个核心重复碱基构成,是法医遗传学中应用最为广泛的DNA遗传标记^[1]。大规模平行测序(massively parallel sequencing, MPS)技术也被称为下一代测序(next generation sequencing, NGS),近年来在法医学领域中的应用逐渐增多。相较于传统的聚合酶链反应-毛细管电泳(polymerase chain reaction-capillary electrophoresis, PCR-CE)分型技术, MPS技术不仅能区分等位基因片段长度大小,还可以区分等位基因的序列差异,并且能够同时对多个样本的多个遗传标记进行高覆盖度的测序分析,极大提高了法医遗传学实验室对DNA序列的识别能力和对大批量样本的处理能力^[2]。

美国Illumina公司基于MiSeq FGx法医基因组学系统针对法医遗传学开发了商业化MPS检测试剂盒——ForenSeq™ DNA Signature Prep试剂盒(以下简称ForenSeq试剂盒)。该试剂盒简化了测序流程,提供了从DNA样本到数据分析的一体化解决方案,单次检测可获得59个STR和172个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)遗传标记的信息,克服了PCR-CE技术需要多个试剂盒才能检测相同数目遗传标记的难题,展现出良好的应用前景^[3-5]。

畲族是我国主要的少数民族之一,起源于中国东南沿海地区,主要分布在浙江省内的广大山区,经过与多个民族的不断融合以及历经不同历史、文化、地理变迁,逐渐发展为具有独特遗传结构的少数民族^[6]。本研究基于MiSeq FGx法医基因组学系统,采用ForenSeq试剂盒对浙江畲族人群中58个STR基因座的遗传多态性进行法医遗传学分析,拟探究MPS技术对STR基因座的检测能力。

1 材料与方法

1.1 样本

采集浙江省丽水市50例畲族无关个体的外周血样本,其中女性28例,男性22例。所有研究对象在采样前均签署知情同意书,并明确个体在三代内无亲缘关系。以上样本的采集和使用均已获得司法鉴定科学研究院伦理委员会批准(编号为STY2020-W024)。

本研究采用3个阳性对照品,包括男性标准品DNA 2800M和9948(美国Promega公司),女性标准品DNA 9947A(美国Promega公司)。

1.2 DNA提取与定量

使用QIAamp DNA Blood Mini试剂盒(德国Qiagen公司)对外周血进行DNA提取,具体操作参照试剂盒说明书。使用Qubit® dsDNA HS Assay试剂盒和Qubit®

2.0荧光定量仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)对DNA进行定量,并依据梯度稀释的原则,使用无核酸酶水将DNA稀释至0.2 ng/μL。MPS及CE实验中稀释DNA使用量均为5 μL,即1 ng DNA。

1.3 文库构建与DNA测序

基于ForenSeq试剂盒对50例畲族个体血样及3个阳性对照品的DNA进行文库构建,并设置去离子水为阴性对照。首先利用ForenSeq寡核苷酸引物混合液以及STR上下游DNA序列的特定区域扩增DNA,通过添加特异性标签组合标记DNA并实现靶点富集,经两轮DNA分选磁珠对文库进行纯化和标准化,最后将文库混合到一个微量离心管中。混合文库经变性和稀释后,采用MiSeq FGx Reagent试剂盒(美国Illumina公司)在MiSeq FGx法医基因组学系统(美国Illumina公司)上进行DNA测序。

1.4 STR基因座的PCR-CE分型

采用PCR-CE技术对ForenSeq试剂盒中包含的58个STR基因座和Amelogenin进行检测,使用的商业化试剂盒包括Sifa STR™ 23 plex DNA身份鉴定系统[基点认知技术(北京)有限公司]^[7]、21+1 STR荧光检测试剂盒(无锡中德美联生物技术有限公司)^[8]、Investigator® Argus X-12 QS试剂盒(德国Qiagen公司)^[9]和Goldeneye® DNA身份鉴定系统Y-Plus试剂盒[基点认知技术(北京)有限公司]^[10],均按照试剂盒说明书的指导进行PCR扩增和毛细管电泳。使用GeneMapper™ ID-X v1.5软件(美国Thermo Fisher Scientific公司)对电泳数据进行分析,最终得到STR基因座的等位基因分型结果,用于与MPS测序结果的一致性验证。基于CE平台对上述试剂盒未覆盖到的DYS505和DYS612基因座单独设计引物(表1),对各样本进行单点扩增和检测。

1.5 数据分析

通过下机数据中的Q30值初步判断数据质量,利用ForenSeq™通用分析软件按照默认分析阈值和解释阈值处理原始测序数据,同时使用STRait Razor v2软件^[11]对测序的FASTQ文件进一步分析。从以下三方面对测序质量进行评估:(1)测序序列信息构成比,指27个常染色体STR基因座(以下简称A-STR)、7个X染色体STR基因座(以下简称X-STR)和24个Y染色体STR基因座(以下简称Y-STR)中等位基因、stutter峰和信号噪声分别占总reads的百分比;(2)测序深度;(3)等位基因覆盖率(allele coverage ratio, ACR),计算方法为用杂合子等位基因中较小的reads数除以较大的reads数。采用Arlequin v3.5软件^[12]进行各基因座的Hardy-Weinberg平衡检验及基因座间的连锁不

平衡检验。另外,通过与hg19(GRCh37)参考基因组进行比较,对STR基因座侧翼序列信息展开分析。最后,采用Cervus 3.0软件^[13]计算各基因座的多态信息含量(polymorphic information content, PIC)、非父排除率(probability of paternity excluding, PE)、二联体非父排除率(probability of exclusion of duo-testing, PE_{duo})、三联体非父排除率(probability of exclusion of trios-testing, PE_{trio})、平均非父排除率(mean probability of exclusion)等,运用群体遗传分析软件^[13]计算各基因座的个体识别率(discrimination power, DP),依据

《常染色体STR基因座的法医学参数计算规范》(SF/Z JD0105010—2018)计算累积个体识别率(cumulative discrimination power, CDP)、累积非父排除率(cumulative probability of exclusion, CPE)和累积平均非父排除率(cumulative mean probability of exclusion),依据《法医物证鉴定Y-STR检验规范》(SF/Z JD0105007—2018)计算基因多样性(gene diversity, GD)、单倍型多样性(haplotype diversity, HD)、单倍型的分辨能力(discrimination capacity, DC)和单倍型匹配概率(haplotype match probability, HMP)。

表1 DYS505和DYS612基因座的引物信息
Tab. 1 Primer information of DYS505 and DYS612

基因座	引物序列(5'→3')	Tm/℃	GC/%	染料	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
DYS505	F:TCTGGCGAAGTAACCCAAAC	58.11	50.00	FAM	2
	R:TCGAGTCAGTTCACCAGAAGG	59.39	52.38		
DYS612	F:CTTGTTGAGATGGTGCAGAAAGG	60.06	47.83	FAM	2
	R:TCTAGAGCCAAAAAGGGAAGTGA	59.35	43.38		

注:F表示正向,R表示反向;Tm表示溶解温度;GC表示鸟嘌呤和胞嘧啶在DNA碱基中所占的比例。

2 结 果

2.1 测序质量评估

50例样本测序共产生4.9 G的数据,每个样本的总reads均大于14 Mb, $Q30\geq 90\%$ 。每个样本在A-STR、X-STR及Y-STR基因座中的平均等位基因、stutter峰和信号噪声占比如图1所示,结果显示,所有样本的等位基因均可与信号噪声区分开,平均等位基因占比为90.90%,最低为DYS612(61.31%),最高为Penta D(98.93%)。对50例样本在58个STR基因座的MPS测序信息进行测序深度分析,结果如图2所示。50例

样本的测序覆盖深度在 $6463\times\sim 376837\times$,平均覆盖深度为 $(2339\pm 1652)\times$;在A-STR、X-STR及Y-STR基因座上显示测序深度不均衡,但整体满足等位基因判读要求。

对50例样本在34个STR基因座(包括27个A-STR和7个X-STR基因座)检见的1235个杂合等位基因进行均衡性分析,结果如图3所示。ACR值最低的基因座是D22S1045(0.3476),最高的是D17S1301(0.8685);除D22S1045外,其余基因座的平均ACR值均高于0.6000,标准差范围为0.0800~0.1800。阳性对照品的STR分型结果与试剂盒标准分型结果一致。

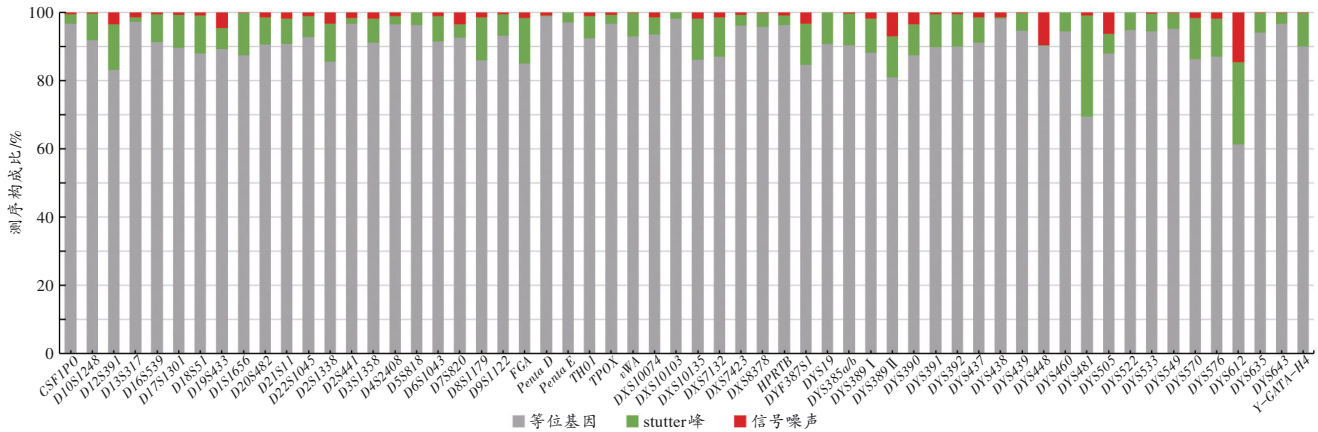


图1 58个STR基因座(27个A-STR、7个X-STR和24个Y-STR)的等位基因、stutter峰和信号噪声构成比
Fig. 1 The ratios of allele, stutter and signal noise of 58 STR loci (27 A-STR, 7 X-STR and 24 Y-STR)

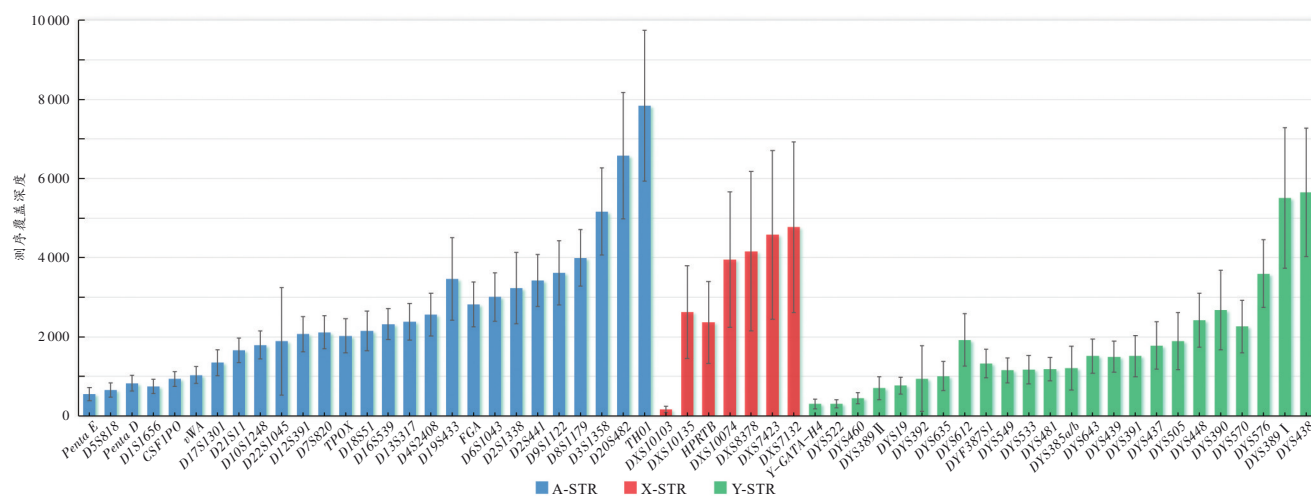


图2 58个STR基因座(27个A-STR、7个X-STR和24个Y-STR)的平均覆盖深度及标准差

Fig. 2 Average coverage depth and standard deviation of 58 STR loci (27 A-STR, 7 X-STR and 24 Y-STR)

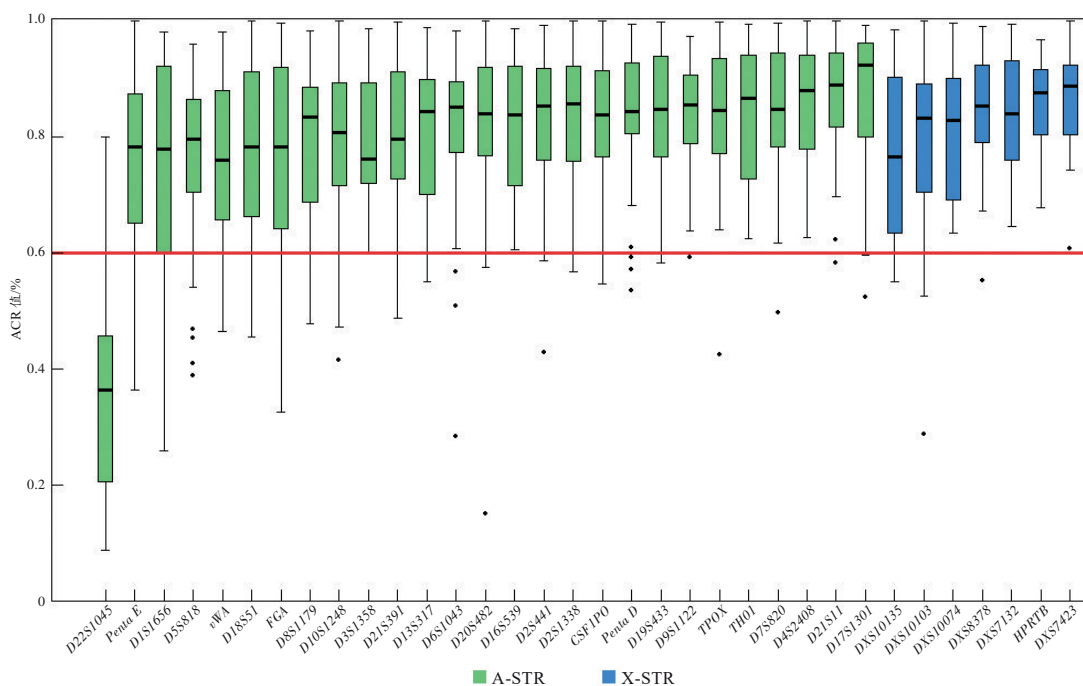


图3 34个STR基因座(27个A-STR和7个X-STR)的ACR值及标准差

Fig. 3 ACR values and standard deviation of 34 STR loci (27 A-STR and 7 X-STR)

2.2 STR基因座核心序列信息

在50例畲族个体血样的58个STR基因座中共检出448种序列多态性等位基因,每个基因座检出2~26种等位基因。其中,A-STR、X-STR、Y-STR分别检出279、62、107种序列多态性等位基因,相较于PCR-CE技术所得的片段长度多态性等位基因分别增加了59、9、14种等位基因,增加的等位基因主要来源于长

度一致但序列结构有差异的等位基因,具体信息见表2。结果显示,*D21S11*、*DXS10135*和*DYF387S1*分别为27个A-STR、7个X-STR和24个Y-STR中由于序列差异而等位基因增加最多的基因座,其中,部分同一长度等位基因的基序结构多达4种,而在*CSF1PO*、*DXS8378*和*Y-GATA-H4*等38个基因座中未发现长度一致但序列结构不同的等位基因。

表2 PCR-CE技术和MPS技术在50名畲族无关个体中检出的等位基因个数及提升率

Tab. 2 The number of alleles detected by PCR-CE and MPS and the growth rate in 50 She samples

基因座	等位基因数		提升率/%	基因座	等位基因数		提升率/%
	PCR-CE	MPS			PCR-CE	MPS	
A-STR				X-STR			
CSF1PO	7	7	0	DXS10103	6	7	16.67
D10S1248	7	7	0	DXS8378	4	4	0
D13S317	7	7	0	DXS10074	8	8	0
D16S539	6	6	0	DXS7132	6	6	0
D17S1301	7	7	0	DXS10135	18	26	44.44
D18S51	14	14	0	DXS7423	5	5	0
D5S818	7	7	0	HPRTB	6	6	0
D6S1043	12	12	0	Y-STR			
FGA	13	13	0	Y-GATA-H4	4	4	0
Penta D	7	7	0	DYS505	5	5	0
Penta E	15	15	0	DYS481	6	6	0
TH01	6	6	0	DYS460	3	3	0
TPOX	5	5	0	DYS448	4	4	0
D19S433	10	11	10.00	DYS439	3	3	0
D20S482	7	8	14.29	DYS438	2	2	0
D7S820	7	8	14.29	DYS437	2	2	0
vWA	7	8	14.29	DYS392	2	2	0
D22S1045	6	7	16.67	DYS391	2	2	0
D1S1656	10	12	20.00	DYS390	3	5	66.67
D4S2408	5	6	20.00	DYS389 II	4	7	75.00
D2S441	7	10	42.86	DYS389 I	3	3	0
D8S1179	8	13	62.50	DYS385a/b	5	5	0
D3S1358	6	10	66.67	DYS19	4	4	0
D9S1122	6	10	66.67	DYF387S1	7	14	100.00
D2S1338	10	21	110.00	DYS522	4	4	0
D12S391	9	20	122.22	DYS533	3	3	0
D21S11	9	22	144.44	DYS549	3	3	0
				DYS570	5	5	0
				DYS576	4	4	0
				DYS643	4	4	0
				DYS635	5	7	40.00
				DYS612	6	6	0

注:提升率为MPS与PCR-CE两种技术检测所得等位基因数的差值与PCR-CE所得等位基因数的比值。

2.3 STR基因座侧翼序列信息

通过参考hg19(GRCh37)基因组对58个STR基因座核心序列上下游各延伸50 bp的核苷酸序列信息进行解读,共在6个STR基因座上观察到7个SNP位点,分别位于*D2S441*(1个)、*D5S818*(1个)、*D7S820*(2个)、*D13S317*(1个)、*D16S539*(1个)和*vWA*(1个),这些侧翼序列变异信息增加了STR基因座的等位基因个数,提升了其多态信息含量及杂合度。

2.4 一致性分析

基于PCR-CE技术对50例畲族个体血样的58个STR基因座进行检测,分型结果与MPS检测结果一致。此外,在MPS数据分析过程中发现,ForenSeq试剂盒所

提供的部分STR基因座核心序列信息与国际法医遗传学会(International Society for Forensic Genetics,ISFG)对MPS-STR的命名建议^[14]存在出入,其中*DIS1656*、*D2S1338*、*D5S818*、*CSF1PO*、*D6S1043*、*D7S820*、*Penta E*、*D19S433*、*FGA*、*HPRTB*、*DXS8378*、*DXS7423*、*DYS19*、*DYS389 I*、*DYS389 II*、*DYS390*、*DYS392*与*DYS460*基因座的核心序列结构信息与ISFG建议不一致。

2.5 MPS-STR分型的法医学应用

经计算,58个STR基因座在本次调查的50名畲族个体中的分布均符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$),且各基因座间均不存在连锁不平衡现象。根据实验数据,分别基于重复序列多态性等位基因和片段长度

多态性等位基因进行群体遗传学参数的计算,无论是 A-STR、Y-STR 还是 X-STR,基于重复序列多态性进行计算得到的各项群体遗传学参数均高于基于片段长度多态性所得结果(表 3)。

表 3 基于重复序列多态性和片段长度多态性获得的 STR 分型系统效能比较
Tab. 3 Comparisons of forensic efficiency of STR typing based on repeat sequence polymorphism and fragment length polymorphism

群体遗传学参数	基于重复序列多态性	基于片段长度多态性
27 个 A-STR($n=50$)		
多态信息含量(PIC)	0.756 7(0.556 7~0.911 3)	0.732 4(0.556 7~0.872 8)
个体识别率(DP)	0.905 1(0.791 2~0.968 0)	0.892 7(0.791 2~0.956 8)
累积个体识别率(CDP)	$1-8.87\times 10^{-30}$	$1-4.14\times 10^{-28}$
二联体非父排除率(PE_{duo})	0.451 4(0.240 1~0.714 3)	0.395 6(0.201 3~0.621 1)
三联体非父排除率(PE_{trio})	0.634 5(0.432 5~0.838 2)	0.585 6(0.385 5~0.774 7)
累积二联体非父排除率(CPE_{duo})	0.999 999 962 640 657	0.999 999 289 201 538
累积三联体非父排除率(CPE_{trio})	0.999 999 999 999 633	0.999 999 999 983 129
7 个 X-STR($n=50$)		
多态信息含量(PIC)	0.701 9(0.476 0~0.928 3)	0.686 3(0.451 8~0.898 3)
女性个体识别率(DP_f)	0.879 9(0.722 6~0.991 5)	0.869 7(0.700 6~0.983 7)
男性个体识别率(DP_m)	0.743 2(0.558 4~0.932 1)	0.728 9(0.534 2~0.905 8)
累积女性个体识别率(CPD_f)	0.999 970 057 036 496	0.999 999 929 094 268
累积男性个体识别率(CPD_m)	0.999 999 972 797 382	0.999 949 621 034 335
二联体平均非父排除率	0.576 7(0.410 6~0.870 7)	0.558 7(0.313 2~0.822 5)
三联体平均非父排除率	0.701 9(0.476 0~0.928 3)	0.686 3(0.451 8~0.898 3)
累积二联体平均非父排除率	0.998 776 019 866 265	0.998 078 374 414 182
累积三联体平均非父排除率	0.999 922 179 142 742	0.999 868 063 580 329
24 个 Y-STR($n=22$)		
单倍型总数	19	19
唯一单倍型数目	17	17
出现 2 次单倍型数目	1	1
出现 3 次单倍型数目	1	1
单倍型多样性(HD)	0.982 683 983	0.982 683 983
基因多样性(GD)	0.173 2~0.925 8	0.173 2~0.887 4
单倍型分辨能力(DC)	0.863 636 364	0.863 636 364
单倍型匹配概率(HMP)	0.061 983 471	0.061 983 471

注:括号前数据为各基因座平均值,括号内数据为最低值和最高值。duo 表示二联体,trio 表示三联体,f 表示女性,m 表示男性。

3 讨 论

MPS 技术的出现打破了以 PCR-CE 技术为主的常规法医实验室检测手段,MPS 技术中可组合的 STR 基因座个数不受荧光种类和核酸片段大小的限制,极大地增加了同一体系中检测 STR 等遗传标记的数目。尽管 PCR-CE 技术能够满足法医学检验中的大部分需求,但 MPS 技术与其相比具有更高的通量,可以详细提供关于等位基因、stutter 峰以及信号噪声的比例,也可为混合样本的结果分析及复杂亲缘关系的鉴定提供更好的解决策略^[15]。

本研究基于 MiSeq FGx 法医基因组学系统采用 ForenSeq 试剂盒对 50 例浙江畲族个体血样中 58 个 STR 基因座进行 MPS 检测,获得了 58 个 STR 基因座的完整等位基因分型及序列信息(包括核心序列信息

和侧翼序列信息),结果显示,所有样本的等位基因均可与信号噪声区分开,均衡性良好,可满足判读要求。此外,阳性对照品的 STR 分型结果与试剂盒标准分型结果一致,确保了检测的准确性和稳定性。MPS 检测结果与 CE 分型结果一致,与 PCR-CE 技术相比,MPS 技术能获取 STR 基因座上长度相同但序列结构不同的等位基因信息,提高了 STR 序列多态性的检测效能,使序列信息得到更充分的利用。比较基于片段长度多态性与重复序列多态性获得的等位基因分型,基于重复序列的等位基因数目增长了 22.40%,等位基因数目增加最多的 3 个基因座为 *D21S11*、*D12S391* 和 *D2S1338*,分别增加了 144.44%、122.22% 和 110.00%。当等位基因长度相同时,仍可能存在序列结构的差异,在 PCR-CE 技术检测中为纯合子的基因座可能拥有不同的序列结构。由于等位基因数目的增加,基

于重复序列多态性分析结果中的STR基因座的PIC、CDP、累积非父排除率等群体遗传学参数均大于基于片段长度多态性的分析结果。因此,MPS技术对于STR基因座序列结构的深度解读可提高其应用于法医学个体识别和亲权鉴定的检测效能,对于复杂亲缘关系鉴定案件的侦破等法医学实践具有很好的应用价值和重要意义。

侧翼序列上的SNP变异可能对整个STR基因座的扩增造成影响,因为该SNP可能位于引物结合区域,从而降低特定等位基因成功扩增的概率。与此同时,侧翼序列的变异信息对STR基因座的多样性也具有重要价值,MPS技术可利用这些侧翼序列的多态性变异信息,提高STR基因座的识别能力。其中,尤其需要注意*D13S317*基因座侧翼区的SNP,其核心重复序列为[TATC],3'侧翼区以8个核苷酸(AATCAATC)开始,而在本研究及其他国内外相关研究^[5]中观察到多个等位基因在3'侧翼序列第一个碱基上表现出A/T变异(从AATC变为TATC),这种突变可能会造成基于片段长度多态性和序列多态性的基因分型结果不一致。本研究发现的侧翼序列变异信息仅限于ForenSeq试剂盒中使用引物的指定区域,如果使用其他引物则可能无法检测到本研究中的变异,也可能检出其他变异。

值得注意的是,本研究中*DIS1656*、*D5S818*、*Penta E*、*DXS10103*、*DYS522*、*DYS19*、*DYS389 II*、*Y-GATA-H4*、*DYS460*基因座的测序覆盖深度小于整体的平均值,在今后的实验中可尝试重新设计引物或提高引物的浓度。另一方面,*D22S1045*基因座的平均ACR值为 0.3476 ± 0.1698 ,而其余基因座的平均ACR值均高于0.6,在CHURCHILL等^[16]的研究中也发现了相同现象,这提示*D22S1045*基因座的杂合子等位基因不稳定程度高于其他基因座,检测中需要额外注意。

此外,本研究发现,ForenSeq试剂盒中所提供的部分STR基因座核心序列信息与ISFG对MPS-STR的命名建议^[14]存在出入,可能是由于采用正链或者反链进行MPS数据分析时引起序列方向不一致,或是因为分析结果在核心序列结构命名上(如核心序列起始位置与终止位置、重复结构、侧翼序列变异信息等)与之前数据库或文献报道存在差异所致,在今后的工作中应注意。

综上,本研究基于MPS技术系统地探究了STR遗传标记的详细信息,为ForenSeq试剂盒的法医学应用提供了参考。本研究采用ForenSeq试剂盒对58个STR基因座的遗传信息进行解读有助于补充关于浙江畲族人群STR基因座的MPS数据报道,尤其是对长度一

致但序列信息不同的等位基因的解读,对提升浙江畲族人群族源分析能力及浙江各民族间鉴别能力具有重要价值。此外,基于ForenSeq试剂盒进行MPS-STR检测,得到的STR等位基因与目前的数据库格式差异较小,能够实现CE与MPS数据的对接。因此,该试剂盒在法医遗传学领域具有重要的研究价值和应用潜力。本研究基于MPS技术的分型结果计算得到的部分群体遗传学参数较PCR-CE技术无明显提高,可能与检测的人群样本量不足有关^[3-4]。试剂盒引物A中还包含94个常染色体SNP位点,相关信息仍有待分析,预期将进一步提高试剂盒的个体识别和亲权鉴定的系统效能。

参考文献:

- [1] 侯一平. 法医物证学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2016:53.
HOU Y P. Forensic genetics[M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House,2016:53.
- [2] 张素华,边英男,赵琪,等. 二代测序技术在法医学中的应用进展[J]. 法医学杂志,2016,32(4):282-289,295. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2016.04.012.
ZHANG S H, BIAN Y N, ZHAO Q, et al. Review of second generation sequencing and its application in forensic genetics[J]. Fayixue Zazhi,2016,32(4):282-289,295.
- [3] NOVROSKI N M M, KING J L, CHURCHILL J D, et al. Characterization of genetic sequence variation of 58 STR loci in four major population groups[J]. Forensic Sci Int Genet,2016,25:214-226. doi:10.1016/j.fsigen.2016.09.007.
- [4] CHURCHILL J D, SCHMEDES S E, KING J L, et al. Evaluation of the Illumina® Beta Version ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit for use in genetic profiling[J]. Forensic Sci Int Genet,2016,20:20-29. doi:10.1016/j.fsigen.2015.09.009.
- [5] GUO F, YU J, ZHANG L, et al. Massively parallel sequencing of forensic STRs and SNPs using the Illumina® ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit on the MiSeq FGx™ Forensic Genomics System[J]. Forensic Sci Int Genet,2017,31:135-148. doi:10.1016/j.fsigen.2017.09.003.
- [6] 金荣. 浙江的少数民族[J]. 中国民族,1990(2):20.
JIN R. Minorities in Zhejiang Province[J]. Zhongguo Minzu,1990(2):20.
- [7] 巩五虎,薛少华,张岩,等. SiFa™ 23 Plex试剂盒(提取测试版)在汉族人群中的法医学调查[J]. 法医学杂志,2017,33(5):516-521. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2017.05.015.
GONG W H, XUE S H, ZHANG Y, et al. Forensic investigation in Han population by SiFa™ 23 Plex Kit (beta version)[J]. Fayixue Zazhi,2017,

- 33(5):516-521.
- [8] ZHU B F, ZHANG Y D, SHEN C M, et al. Developmental validation of the AGCU 21+1 STR kit: A novel multiplex assay for forensic application[J]. Electrophoresis, 2015, 36(2): 271-276. doi: 10.1002/elps.201400333.
- [9] CRNJAC J, OZRETIĆ P, MERKAŠ S, et al. Investigator Argus X-12 study on the population of northern Croatia[J]. Genet Mol Biol, 2017, 40(1): 80-83. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2015-0261.
- [10] LUO Y, WU Y, QIAN E, et al. Population genetic analysis of 36 Y-chromosomal STRs yields comprehensive insights into the forensic features and phylogenetic relationship of Chinese Tai-Kadai-speaking Bouyei[J]. PLoS One, 2019, 14(11): e224601. doi: 10.1371/journal.pone.0224601.
- [11] WARSHAUER D H, LIN D, HARI K, et al. STRait Razor: A length-based forensic STR allele-calling tool for use with second generation sequencing data[J]. Forensic Sci Int Genet, 2013, 7(4): 409-417. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.04.005.
- [12] EXCOFFIER L, LISCHER H E L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Mol Ecol Resour, 2010, 10(3): 564-567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- [13] 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.
- LIU Y J, ZHANG J T. Application of several genetic analysis softwares to forensic biological statistics[J]. Henan Keji Daxue Xuebao (Medical science), 2014, 32(1): 62-64.
- [14] PARSON W, BALLARD D, BUDOWLE B, et al. Massively parallel sequencing of forensic STRs: Considerations of the DNA commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) on minimal nomenclature requirements[J]. Forensic Sci Int Genet, 2016, 22: 54-63. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.01.009.
- [15] 刘宝年, 张雅琪, 邵诚臣, 等. 二代测序技术在法医遗传学中的应用研究进展(2011~2016)[J]. 中国法医学杂志, 2017, 32(5): 480-483, 487. doi: 10.03618/J.ISSN.1001-5728.2017.05.010.
- LIU B N, ZHANG Y Q, SHAO C C, et al. Research progress in the application of next-generation sequencing in forensic genetics[J]. Zhongguo Fayixue Zazhi, 2017, 32(5): 480-483, 487.
- [16] CHURCHILL J D, CHANG J, GE J, et al. Blind study evaluation illustrates utility of the Ion PGM™ system for use in human identity DNA typing[J]. Croat Med J, 2015, 56(3): 218-229. doi: 10.3325/cmj.2015.56.218.
- (收稿日期: 2021-04-27)
(本文编辑: 刘希玲)

(上接第 816 页)

- [7] 李兴启, 于红, 曹效平, 等. 如何认识多频稳态反应(ASSR)在临床应用中存在的问题[J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2006(3): 10-12.
- LI X Q, YU H, CAO X P, et al. Problems of ASSR in clinical application[J]. Zhongguo Tingli Yuyan Kangfu Kexue Zazhi, 2006(3): 10-12.
- [8] 侯金程, 孙树阳, 杨丽辉, 等. 儿童多频听性稳态诱发反应阈值与纯音测听阈值的相关性[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2008, 8(6): 362-363.
- HOU J C, SUN S Y, YANG L H, et al. Correlation between multi-channel auditory steady-state response and pure tone threshold in children[J]. Zhongguo Yan Er Bi Hou Ke Zazhi, 2008, 8(6): 362-363.
- [9] GORGA M P, NEELY S T, HOOVER B M, et al. Determining the upper limits of stimulation for auditory steady-state response measurements[J]. Ear Hear, 2004, 25(3): 302-307. doi: 10.1097/01.aud.0000130801.96611.6b.
- [10] 鄢慧琴, 王海涛, 黄利芬, 等. 清醒和睡眠状态对听性稳态反应阈值测试的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 25(1): 11-13.
- YAN H Q, WANG H T, HUANG L F, et al. The influence of in awake and sleeping to the thresholds of ASSR[J]. Linchuang Er Bi Yanhou Toujing Waike Zazhi, 2011, 25(1): 11-13.
- [11] 陶征, 张文, 刘树燕, 等. 多频稳态诱发电位测试[J]. 耳鼻咽喉头颈外科, 2002, 9(3): 131-133.
- TAO Z, ZHANG W, LIU S Y, et al. Multi-frequency steady evoked potential test[J]. Er Bi Yanhou Toujing Waike, 2002, 9(3): 131-133.
- [12] PICTON T W, DIMITRIJEVIC A, PEREZ-ABALO M C, et al. Estimating audiometric thresholds using auditory steady-state responses[J]. J Am Acad Audiol, 2005, 16(3): 140-156. doi: 10.3766/jaaa.16.3.3.
- (收稿日期: 2020-09-25)
(本文编辑: 陈捷敏)