

## · 论 著 ·

## 猫STR基因座复合扩增体系的构建及其法医学应用

席世涵<sup>1,2</sup>, 屈轶龄<sup>2,3</sup>, 夏若成<sup>2</sup>, 熊磊<sup>2,4</sup>, 柴思雨<sup>2,5</sup>, 佟春兰<sup>1</sup>, 陶瑞旸<sup>2</sup>, 李成涛<sup>1,2</sup>

1. 内蒙古民族大学临床医学院, 内蒙古 通辽 028000; 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. 苏州大学医学部法医学系, 江苏 苏州 215123; 4. 内蒙古医科大学基础医学院法医学系, 内蒙古 呼和浩特 010030; 5. 遵义医科大学基础医学院, 贵州 遵义 563000

**摘要:** 目的 构建一个猫STR基因座复合扩增体系并对其技术性能进行测试, 评估其应用价值。方法 整理和分析猫STR基因座文献数据资料, 筛选可用于猫个体识别和亲缘关系鉴定的STR基因座和性别鉴定位点, 设计荧光标记引物, 构建复合扩增体系。对构建的复合扩增体系进行灵敏度、准确性、均衡性、稳定性、种属特异性、组织同一性和混合样本等验证, 并对145例猫无关个体进行群体遗传学调查。结果 成功筛选到16个猫常染色体STR基因座和1个Y染色体性别决定区, 并构建了包含上述基因座的复合扩增体系。DNA模板量低至0.25 ng时仍可得到完整分型, 检测其他常见动物样本时未见特异性扩增峰。群体遗传学调查结果显示, 16个猫STR基因座累积个体识别率为 $1-3.57 \times 10^{-20}$ , 累积非父排除率为 $1-6.35 \times 10^{-5}$ , 累积匹配概率为 $3.61 \times 10^{-20}$ 。结论 本研究构建的猫STR基因座复合扩增体系灵敏度高、种属特异性好、分型结果准确, 能够为司法鉴定领域中涉及猫的种属鉴定、个体识别及亲缘关系鉴定等案件提供有效的解决方法。

**关键词:** 法医遗传学; 短串联重复序列; Y染色体性别决定区; 复合扩增体系; 个体识别; 猫

**中图分类号:** DF795.2 **文献标志码:** A **doi:** 10.12116/j.issn.1004-5619.2021.511104

**文章编号:** 1004-5619(2022)02-0231-08



## Establishment of Multiplex Amplification System of STR Loci in *Felis Catus* and Its Forensic Application

XI Shi-han<sup>1,2</sup>, QU Yi-ling<sup>2,3</sup>, XIA Ruo-cheng<sup>2</sup>, XIONG Lei<sup>2,4</sup>, CHAI Si-yu<sup>2,5</sup>, TONG Chun-lan<sup>1</sup>, TAO Rui-yang<sup>2</sup>, LI Cheng-tao<sup>1,2</sup>

1. Clinical Medical School of Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, 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. Department of Forensic Medicine, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu Province, China; 4. Department of Forensic Medicine, School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China; 5. School of Preclinical Medicine of Zunyi Medical University, Guizhou 563000, Zunyi Province, China

**Abstract:** **Objective** To construct a *Felis catus* STR loci multiplex amplification system and to evaluate its application value by testing the technical performance. **Methods** The published *Felis catus* STR loci data were reviewed and analyzed to select the STR loci and sex identification loci that could be used for *Felis catus* individual identification and genetic identification. The fluorescent labeling primers were designed to construct the multiplex amplification system. The system was validated for sensitivity, accuracy, balance, stability, species specificity, tissue identity and mixture analysis, and investigated the genetic polymorphisms in 145 unrelated *Felis catus* samples. **Results** Sixteen *Felis catus* autosomal STR loci and one sex determining region of Y (SRY) were successfully selected, and constructed a multiplex amplification system containing the above loci. The complete profile of all alleles could still be obtained when the amount of DNA template was as low as 0.25 ng. There was no specific amplification peak in other common animal samples. Population genetic surveys showed that total discrimination power (TDP) of the 16 STR loci was  $1-3.57 \times 10^{-20}$ , the cumulative probability of exclusion (CPE) was  $1-6.35 \times 10^{-5}$  and the cumulative probability of matching was  $3.61 \times 10^{-20}$ . **Conclusion** The *Felis catus* STR multiplex amplification system constructed in this study is highly sensitive, species-specific, and accurate in typing results, which can provide an effective solution for *Felis catus* species identification, individual identification and kinship identification in the field of forensic science.

**Keywords:** forensic genetics; short tandem repeat; sex determining region of Y (SRY); multiplex amplification system; individual identification; *Felis catus*

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(81930056); 中青年科技创新领军人才项目(2018RA2102); 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); 司法部司法鉴定重点实验室资助项目

**作者简介:** 席世涵(1995—), 男, 蒙古族, 硕士研究生, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: xishihan2020@163.com

**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

**通信作者:** 陶瑞旸, 女, 助理研究员, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: taoruiyang163@163.com

**引用格式:** 席世涵, 屈轶龄, 夏若成, 等. 猫STR基因座复合扩增体系的构建及其法医学应用[J]. 法医学杂志, 2022, 38(2): 231-238, 245.

**To cite:** XI S H, QU Y L, XIA R C, et al. Establishment of multiplex amplification system of STR loci in *Felis catus* and its forensic application[J]. *Fayixue Zazhi*, 2022, 38(2): 231-238, 245.

随着居民生活水平的提高,宠物逐渐成为家庭中的重要组成部分,随之而来的涉及宠物的盗窃案件、宠物伤人案件、流浪动物管理和非法饲养野生动物等社会问题也层出不穷。根据《2020年中国宠物行业白皮书》(www.pethadoop.com),2020年我国城镇犬猫总数已突破1亿只,其中城镇宠物猫数量已达4 862万只,同比2019年增长了10.2%。因此,建立准确有效的方法对猫进行种属鉴定、个体识别和亲缘关系鉴定已然成为司法鉴定行业的迫切需求。

以往针对猫的个体识别主要基于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)、苹果酸酶(malic enzyme, ME)和酯酶D(esterase D, ESD)等生物化学标记的多态性<sup>[1-3]</sup>,但受个体发育状况和实验条件等限制,应用十分有限。短串联重复序列(short tandem repeat, STR)是以2~6个碱基对为核心单位串联重复形成的一类具有长度多态性的DNA序列,是目前法庭科学领域应用最广泛的遗传标记<sup>[4]</sup>。司法鉴定中主要应用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)技术检测STR遗传标记进行人类个体识别和亲缘关系鉴定,此方法在非人源DNA鉴定案件中也有广泛的研究和应用,展现出良好的应用前景<sup>[5-7]</sup>。

MENOTTI-RAYMOND等<sup>[8]</sup>于2005年初步构建了包含11个STR基因座和1个Y染色体性别决定区(sex determining region of Y, SRY)的猫复合扩增体系,随后COOMBER等<sup>[9]</sup>对该体系的种属特异性、灵敏度及组织同一性进行了验证,证实了STR基因座在猫的种属鉴定中的可行性。但由于当时尚未建立司法鉴定行业标准体系,位点筛选和方法建立均缺乏科学指导,因此,该体系包含的基因座数目较少,且在法医群体遗传学调查中仅计算了匹配概率(probability of matching, Pm)、期望杂合度(expected heterozygosity, He)和等位基因频率(allele frequency, AF),缺少累积个体识别率(total discrimination power, TDP)和累积非父排除率(cumulative probability of exclusion, CPE),未对体系的整体系统效能作出评价。

综上,本研究以MENOTTI-RAYMOND等<sup>[8]</sup>的研究为基础,根据《司法鉴定行业标准体系》(SF/T 0061—2020)的指导,筛选16个四碱基重复的猫常染色体STR基因座和1个SRY,尝试构建适用于猫的STR基因座复合扩增体系,并根据DNA分析方法科学工作组(Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, SWGDAM)的要求<sup>[10]</sup>对该体系进行种属特异性、灵敏度、稳定性、准确性、组织同一性和均衡性等方面的法医学验证,拟对其涉及猫的个体识别和亲缘关系鉴定

的检测效能和应用价值进行评估。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本收集与处理

本研究共采集145例猫无关个体的样本(包含口腔拭子和静脉血),其中67例猫口腔拭子采自内蒙古通辽农村,77例猫静脉血样本采自上海和深圳两地的宠物医院,1例猫口腔拭子、静脉血以及毛发样本采自上海的宠物医院。其中雄性80只,雌性65只。对上述口腔拭子、静脉血和毛发检材分别使用口腔拭子基因组DNA提取试剂盒(上海凡济生物科技有限公司)、血液基因组DNA提取试剂盒(上海凡济生物科技有限公司)和QIAamp<sup>®</sup> DNA Investigator试剂盒(德国Qiagen公司)抽提DNA,具体操作参照试剂盒说明书。使用Qubit<sup>™</sup> dsDNA HS Assay试剂盒和Qubit<sup>™</sup> 2.0荧光定量仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)对DNA进行定量,并将DNA稀释至1 ng/μL备用。

本研究所用的人、猴、犬、猪、牛、羊、鸡、鸭、鼠、兔、驴、蛇12种常见动物种属DNA为实验室现存样本。本研究已通过司法鉴定科学研究院伦理委员会批准。

### 1.2 基因座筛选及引物设计

对文献<sup>[8-9,11-15]</sup>中已发表的猫STR基因座数据资料进行整理和分析,筛选可用于猫个体识别和亲缘关系鉴定的STR基因座。筛选条件:(1)等位基因长度在500 bp以下;(2)重复单位为四核苷酸;(3)等位基因数大于6个;(4)基因座杂合度大于0.5;(5)位于不同染色体上,互不存在连锁关系。

使用Primer Premier 5.0软件(加拿大Premier公司)对筛选出的基因座进行引物设计,要求所有引物的退火温度尽可能接近,且目标片段的大小呈梯度排列,使用引物设计和特异性检验工具(Primer-BLAST)检查引物与其他物种基因组序列是否存在非特异性杂交。经琼脂糖凝胶电泳确认引物可扩增出特异性条带后,采用FAM、HEX、TAMAR、ROX作为荧光标签对引物进行荧光标记。本研究所涉及引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.3 PCR反应条件

采用Multiplex PCR试剂盒(德国Qiagen公司)进行复合扩增,并对复合扩增体系的引物浓度、循环参数、DNA模板量、退火温度、扩增体积等PCR反应条件进行优化,使各基因座扩增产物基本达到平衡、特异的要求。具体操作:(1)反复调试各基因座引物浓度,以优化该复合扩增体系;(2)测试该复合扩增体系在53、55、57、59℃这4个退火温度下的扩增情况,以

优化该复合扩增体系的退火温度;(3)测试该复合扩增体系在26、28、30这3个循环数下的扩增情况,以优化该复合扩增体系的循环数;(4)测试该复合扩增体系在10、15、20  $\mu\text{L}$ 这3个扩增体积下的扩增情况,以优化该复合扩增体系的扩增体积。

#### 1.4 电泳及STR分型

取1  $\mu\text{L}$  PCR产物与9  $\mu\text{L}$ 高度去离子甲酰胺(美国Thermo Fisher Scientific公司)、0.4  $\mu\text{L}$  ORG-500分子量内标[基点认知技术(北京)有限公司]混匀,使用3130xl基因分析仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)对扩增产物进行毛细管电泳,应用GeneMapper™ ID v3.2软件(美国Thermo Fisher Scientific公司)对电泳结果进行分析。

#### 1.5 复合扩增体系的法医学验证

##### 1.5.1 种属特异性检验

取1 ng人类DNA标准品(9947A、9948)和11种常见动物种属(猴、犬、猪、牛、羊、鸡、鸭、鼠、兔、驴、蛇)的DNA样本,应用该体系进行复合扩增和电泳分离,验证其种属特异性,每个样本重复检测3次。

##### 1.5.2 灵敏度检验

使用Qubit™ 2.0荧光定量仪对猫DNA样本进行定量后,以2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 ng的DNA模板量进行灵敏度验证,每个样本重复检测3次。

##### 1.5.3 稳定性检验

在含有1 ng DNA样本的反应体系中分别加入1  $\mu\text{L}$ 不同浓度的4种常见PCR抑制剂(血红素、腐殖酸、靛蓝、黑色素)。血红素浓度为100、200、300、500、700、800  $\mu\text{mol/L}$ ,腐殖酸质量浓度为50、100、150、200、250、300 ng/ $\mu\text{L}$ ,靛蓝质量浓度为4 000、5 000、6 000、7 000、8 000、9 000 ng/ $\mu\text{L}$ ,黑色素质量浓度为300、400、500、600、700、1 000 ng/ $\mu\text{L}$ 。每个浓度重复检测3次。

##### 1.5.4 准确性检验

随机选取12例猫无关个体DNA样本,经该体系扩增后,进行16次平行电泳检测,对其所有等位基因的电泳片段长度进行统计,计算各等位基因片段长度的平均值与标准差。

##### 1.5.5 可重复性检验

随机选取10例猫无关个体DNA样本,由不同实验人员在两个实验室分别应用该扩增体系在不同的PCR仪和基因分析仪上进行扩增和电泳分离,对比两次实验的分型结果。

##### 1.5.6 组织同一性检验

取同一只猫的静脉血、口腔拭子以及毛发DNA

样本进行PCR扩增及电泳分离,通过对比同一个体不同组织的分型结果来验证该复合扩增体系的组织同一性。

##### 1.5.7 均衡性检验

随机选取20例猫无关个体DNA样本,采用ZHANG等<sup>[16]</sup>描述的方法计算各基因座的杂合子等位基因均衡性、同一荧光标记下各基因座间的均衡性及不同荧光间的均衡性。杂合子等位基因均衡性:基因型为杂合子的基因座,用低峰峰值除以高峰峰值。同一荧光标记下各基因座间的均衡性:将同一荧光标记下各基因座中纯合子峰值除以2,杂合子峰值取平均数,用最小值除以最大值。不同荧光标记间的均衡性:分别计算同一荧光标记下所有基因座峰值的平均数,用最小值除以最大值。

##### 1.5.8 混合样本检验

选取雄、雌性猫DNA样本各1例,使用Qubit™ 2.0荧光定量仪对DNA进行定量后,将DNA样本均稀释至1 ng/ $\mu\text{L}$ ,将两者以1:19、1:9、1:3、1:1、3:1、9:1、19:1的体积比配制混合样本,每份混合样本取1  $\mu\text{L}$ ,每个样本重复检测3次,记录混合样本中次要贡献者的等位基因检出率。

#### 1.6 群体遗传学调查

对145例猫无关个体样本进行群体遗传学调查,应用Power Stats v1.2软件(美国Promega公司)计算16个常染色体STR基因座的等位基因频率、观察杂合度(observed heterozygosity,  $H_o$ )、个体识别率(discrimination power, DP)、非父排除率(probability of exclusion, PE)、Pm、多态信息含量(polymorphism information content, PIC)、CPE、TDP和累积匹配概率(cumulative probability of matching, CPm)。CPE、TDP、CPm的计算公式<sup>[4]</sup>如下:  $CPE=1-(1-PE_1)(1-PE_2)\cdots(1-PE_n)$ ,  $TDP=1-(1-DP_1)(1-DP_2)\cdots(1-DP_n)$ ,  $CPm=Pm_1\times Pm_2\cdots Pm_n$ 。

## 2 结 果

### 2.1 复合扩增体系的建立

本研究共筛选出16个猫常染色体STR基因座(*FCA733*、*FCA391*、*FCA740*、*F27*、*FCA453*、*FCA734*、*F85*、*F124*、*FCA742*、*FCA736*、*FCA730*、*FCA749*、*FCA559*、*FCA723*、*FCA441*、*FCA732*)和1个SRY。

经反复调试各基因座的引物浓度,使各基因座扩增产物达到平衡、特异的要求,各基因座详细信息见表1。



表1 猫复合扩增体系中16个STR基因座和1个SRY的基本信息

Tab. 1 The basic information of 16 STRs and a SRY in the *Felis catus* multiplex amplification system

基因座	染色体 位置	引物序列(5'→3')	核心序列	扩增产物 长度/bp	荧光 标记	引物终浓度/ (μmol·L <sup>-1</sup> )
<i>FCA733</i>	B2	F:GAAGATGTGGGATAGATACACCAA; R:CTGAGTAATATTCCACTGTCTCTC	[GATA] <sub>a</sub>	94~190	FAM	1.6
<i>FCA391</i>	B3	F:GCCTTCTAACTTCCTTGCAGA; R:TTTAGGTAGCCCATTTTCATCA	[AGAT] <sub>a</sub>	219~256	FAM	2.7
<i>FCA740</i>	C1	F:CCAAGGAGCTCTGTGATGCAAA; R:ATTTCCACAGGTAAACATCAACCAA	[GATA] <sub>a</sub>	304~332	FAM	1.6
<i>F27</i>	B1	F:AGGGGTGAGGCTAACTGAGAACA; R:ATCCTCTATGGCAGGACTTTGAT	[GAAA] <sub>a</sub>	357~423	FAM	1.1
<i>FCA453</i>	A1	F:GGAACCATTTTGACAATAAATG; R:ATTTTGGGGAGACAGTTCAGCC	[AGAT] <sub>a</sub>	65~86	HEX	4.4
<i>FCA734</i>	B3	F:CTATCTTTCTGTATTGCTAGCTTCC; R:ATTTTGGGGAGACAGTTCAGCC	[GAAA] <sub>a</sub>	137~159	HEX	1.6
<i>F85</i>	B1	F:TAAATCTGGTCCTCACGTTTTTC; R:ACCTGAAAATGTATCCATCACTTCAGAT	[CTTT] <sub>a</sub> [CT] <sub>b</sub> [T] <sub>c</sub> [CTTT] <sub>d</sub>	183~293	HEX	4.4
<i>F124</i>	E1	F:TTGCCTCAACTACCTAGGCC; R:ATACTTAATGCCACTGAACTACACT	[GAAA] <sub>a</sub>	332~391	HEX	2.7
<i>FCA742</i>	D4	F:TGACAACGCATAAGAACCTTTC; R:AGGAACACCATGTTGGGCTA	[GTTT] <sub>a</sub>	96~136	TAMAR	3.3
<i>FCA736</i>	B4	F:CCGAGCTCTGTTCTGGGTATGAA; R:TTTCTAGTTGGTCGGTCTGTCTATCTG	[ATAC] <sub>a</sub> [CA] <sub>b</sub> [ATAG] <sub>c</sub>	163~197	TAMAR	3.3
<i>FCA730</i>	B1	F:AGCCTTCCAACATCACACACACT; R:GGCACTACTTGCTCAAGAAACTCAC	[GATA] <sub>a</sub>	222~245	TAMAR	1.6
<i>FCA749</i>	F2	F:GAGGAGCTTACTTAAGAGCATGCGTT; R:CAGCTAAAACCTATATTCCGATTGTGCCT	[GATA] <sub>a</sub>	279~446	TAMAR	4.4
<i>FCA559</i>	B1	F:GCCAAAATGTTCAAGAGTGG; R:TTTTGGCTTGATGAGCATCA	[GAAA] <sub>a</sub>	104~184	ROX	2.2
<i>FCA723</i>	A1	F:TGAAGGCTAAGGCACGATAGATAGTC; R:CACCCAGGTGTCCTGCTTC	[GGAA] <sub>a</sub> G[GAAA] <sub>b</sub>	242~292	ROX	4.4
<i>FCA441</i>	D3	F:AGCCTTGAAGCAAACATCATTTATCT; R:TGTCATCCTGGAAAGTAGCTCTGT	[GATA] <sub>a</sub>	314~332	ROX	6.6
<i>FCA732</i>	B2	F:ATGTTGAGTTGCCATTTCCCTTG; R:TGTGGGTGGAGTGGACTGTAATG	[ATCT] <sub>a</sub>	373~401	ROX	1.6
SRY	Y	F:TCTGAGTTTTGCGTTTGGGGATT; R:AGCGATGAGCACCGTGAGGC	—	224~225	ROX	0.4

注:a、b、c、d表示重复单位的不同重复次数;“—”表示无数据。

将该复合扩增体系在53、55、57、59℃这4个退火温度下的扩增产物分别进行毛细管电泳。当退火温度为53℃时,在基因座*FCA740*、*FCA730*、*FCA559*和*FCA441*出现非特异性扩增峰;当退火温度为55℃时,DNA图谱整体均衡,无非特异性扩增峰;当退火温度为57℃时,基因座*FCA734*、*F85*扩增效率较55℃低;当退火温度为59℃时,基因座*FCA740*扩增图谱有渗透峰产生,*FCA733*、*FCA391*扩增效率低。根据上述结果,本研究选择的最佳退火温度为55℃。

将该复合扩增体系在26、28、30个循环数下的扩增产物分别进行毛细管电泳。当循环数为26时,基因座*FCA734*扩增效率低;当循环数为28时,各基因座间峰值均衡,无非特异性扩增产物;当循环数为30

时,基因座*FCA734*、*FCA441*扩增效率较低,*FCA740*出现渗透峰现象。根据上述结果,本研究选择的最佳循环数为28。

将该复合扩增体系在10、15、20μL这3个扩增体积下的扩增产物分别进行毛细管电泳。当扩增体积为10μL时,基因座*FCA559*、*FCA723*、*FCA441*扩增效率低;当扩增体积为15μL时,各基因座间峰值均衡,无非特异性扩增产物;当扩增体积为20μL时,基因座*FCA740*出现渗透峰现象。根据上述结果,本研究选择的最佳扩增体积为15μL。

通过优化实验确定PCR反应最佳的复合扩增体积为15μL,包含7.5μL Master Mix、1.5μL Q-Solution、1μL荧光引物混合物和5μL模板DNA及去离子水。

PCR反应的最佳退火温度为55℃,PCR最佳循环数为28。PCR循环条件为:95℃ 15 min;94℃ 30 s,55℃ 90 s,72℃ 90 s,28个循环;60℃ 60 min;4℃保温。最终获得毛细管电泳分型结果(图1),可见峰型良好,无杂峰,各基因座峰高基本平衡。

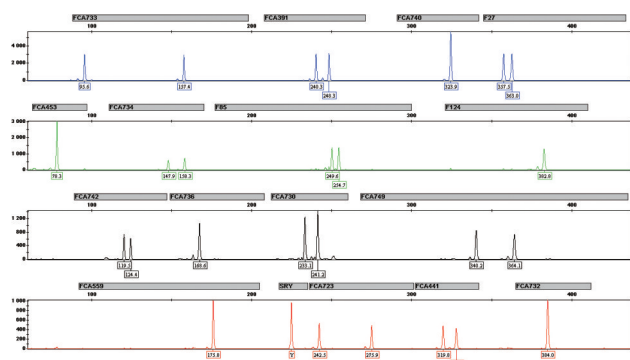


图1 猫STR基因座复合扩增体系的毛细管电泳图谱  
Fig. 1 Capillary electrophoretogram of the multiplex amplification system of STR loci in *Felis catus*

## 2.2 种属特异性检验结果

采用该复合扩增体系对人类 DNA 标准品 9947A、9948 以及猴、犬、猪、牛、羊、鸡、鸭、鼠、兔、驴、蛇 11 种其他常见动物种属的 DNA 样本进行扩增和电泳分离,结果显示,除鸡 DNA 样本在 TAMRA 荧光 116 bp 处出现非特异性峰外,其他动物样本均未检出扩增产物。

### 2.3 灵敏度检验结果

对不同模板量的 DNA 样本进行扩增与电泳分离,结果显示,随着 DNA 模板量的减少,等位基因峰高逐渐降低(图 2)。当 DNA 模板量为 0.25~2 ng 时,16 个常染色体 STR 基因座均可得到完整分型,平均峰高为 173~4 449 RFU。当 DNA 模板量低至 0.125 ng 时,开始出现等位基因丢失现象,平均等位基因检出率为 80.39%。当 DNA 模板量高至 2 ng 时,虽然所有等位基因均获得完整分型,但出现渗透峰现象。因此推荐的 DNA 模板量为 0.25~1 ng。

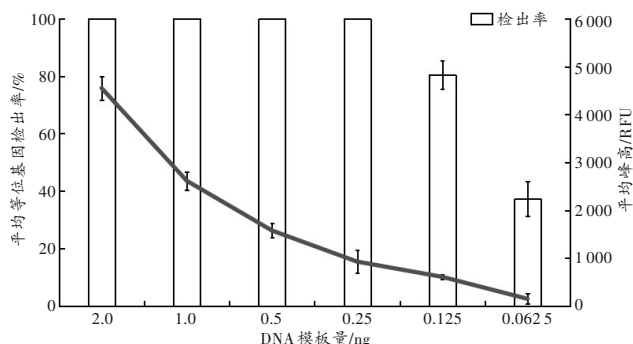


图2 灵敏度检验结果  
Fig. 2 Sensitivity test results

## 2.4 稳定性检验结果

本研究构建的复合扩增体系对不同种类及不同浓度的PCR抑制物均有一定的耐受性。当体系中血红素浓度 $\leq 200 \mu\text{mol/L}$ 、腐殖酸质量浓度 $\leq 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、靛蓝质量浓度 $\leq 6\,000 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、黑色素质量浓度 $\leq 400 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 时,均可得到准确分型且图谱清晰可靠。

### 2.5 准确性检验结果

12例猫无关个体DNA样本各等位基因片段长度在不同泳道中的标准差见图3,大部分等位基因在16次平行检测中偏移不超过0.2 bp。随着片段长度的增加,片段迁移率有增大的趋势,但仍在0.3 bp范围内。

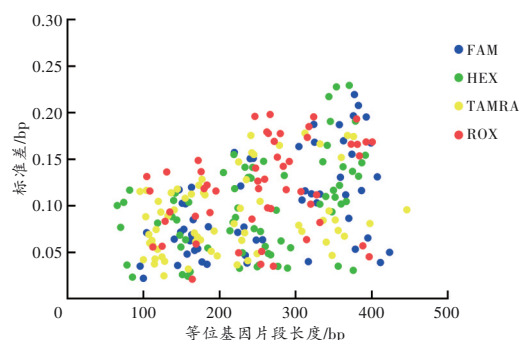


图3 等位基因片段准确性检验

Fig. 3 Accuracy test of the allele fragments

## 2.6 可重复性与组织同一性检验结果

不同实验人员在不同实验室对同一样本进行扩增及电泳分离,获得的分型结果完全相同,峰高和产物长度基本一致。

同一只猫的静脉血、口腔拭子、毛发 DNA 样本经扩增及电泳分离,获得的分型结果完全一致。

## 2.7 均衡性检验结果

随机选取的 20 例猫无关个体样本的检测结果显示,该复合扩增体系的杂合子等位基因均衡性 $\geq 0.83$ ,同一荧光标记的各基因座间峰高均衡性 $\geq 0.59$ ,不同荧光标记间的峰高均衡性 $\geq 0.31$ 。

## 2.8 混合样本检验结果

随着混合比例的不断增大,次要贡献者的检出率逐渐降低。雄、雌性猫样本在3:1、1:1、1:3的混合比例下均可获得完整的等位基因分型结果;当混合样本比例为1:9、9:1时,次要贡献者的部分等位基因丢失,等位基因检出率均可达到81.4%;当混合比例进一步提高至1:19和19:1时,次要贡献者的等位基因检出率为59.2%、51.8%。

## 2.9 群体遗传学调查结果

本研究对 145 例猫无关个体样本在 16 个常染色体 STR 基因座的等位基因频率和等位基因分布进行

了调查。其中,138例在16个STR基因座上均表现出完整的等位基因分型,有7例在FCA736基因座未获得基因分型结果,等位基因频率见表2。在145例猫无关个体样本中共观察到259个等位基因,等位基因频率分布在0.003~0.397,其中多态性最高的基因座为F85,共有45个等位基因。

各基因座的群体遗传学参数见表3,  $H_o$  分布在

0.531(FCA391、FCA732)至0.876(F85),平均为0.687; PIC分布在0.664(FCA441)至0.952(F85),平均为0.790;  $P_m$ 分布在0.012(F85)至0.133(FCA732),平均为0.034。16个基因座的  $DP \geq 0.867$  (FCA732),  $PE \geq 0.216$  (FCA391、FCA732),均显示出良好的法医学应用潜能。该复合扩增体系的TDP为  $1-3.57 \times 10^{-20}$ , CPE为  $1-6.35 \times 10^{-5}$ , CP<sub>m</sub>为  $3.61 \times 10^{-20}$ 。

表2 猫16个常染色体STR基因座的等位基因分布  
Tab. 2 Alleles distribution of 16 autosomal STR loci in *Felis catus* (n=145)

FCA733		F27		FCA391		FCA742		FCA749	
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
95.6	0.028	357.5	0.221	219.5	0.003	95.5	0.024	278.7	0.003
99.9	0.021	358.8	0.010	223.9	0.010	99.8	0.248	304.2	0.003
104.1	0.003	363.0	0.307	227.9	0.021	102.9	0.031	308.2	0.014
140.4	0.093	365.9	0.031	232.1	0.024	104.0	0.083	312.3	0.007
144.9	0.034	369.9	0.114	233.9	0.193	107.1	0.010	332.1	0.003
146.9	0.007	374.1	0.217	236.2	0.331	108.1	0.052	336.2	0.003
148.9	0.162	376.0	0.003	240.3	0.255	111.2	0.014	340.2	0.072
151.0	0.003	377.4	0.010	244.3	0.138	112.3	0.031	344.0	0.183
153.1	0.114	378.5	0.007	248.3	0.021	114.4	0.014	348.0	0.238
155.2	0.021	382.5	0.003	256.5	0.003	115.3	0.007	352.0	0.162
157.4	0.248	386.7	0.021	F85		116.5	0.003	356.0	0.186
159.3	0.055	392.9	0.007	等位基因	频率	118.5	0.121	360.1	0.034
161.1	0.007	394.9	0.003	184.6	0.003	119.5	0.093	364.1	0.069
163.3	0.010	399.1	0.014	205.1	0.003	122.7	0.041	368.2	0.007
165.3	0.010	407.4	0.024	213.6	0.007	124.4	0.103	376.1	0.003
167.3	0.031	411.5	0.003	217.7	0.003	126.9	0.031	397.6	0.007
169.3	0.076	423.6	0.003	218.9	0.007	127.9	0.024	446.2	0.003
171.4	0.003	F124		219.8	0.003	132.1	0.014	FCA559	
177.0	0.031	等位基因	频率	221.0	0.007	136.3	0.048	等位基因	频率
183.5	0.038	331.8	0.003	222.1	0.014	140.5	0.003	104.4	0.059
185.3	0.003	335.8	0.007	223.1	0.003	144.6	0.003	108.4	0.038
FCA740		339.7	0.003	224.2	0.014	FCA736		112.3	0.007
等位基因	频率	341.6	0.010	226.2	0.028	等位基因	频率	124.5	0.028
304.3	0.003	343.8	0.021	230.2	0.079	154.9	0.011	128.5	0.048
308.4	0.048	345.7	0.014	231.4	0.010	158.9	0.051	130.5	0.017
312.5	0.331	347.8	0.076	233.5	0.083	162.9	0.094	134.6	0.003
316.7	0.303	349.7	0.021	234.4	0.010	166.9	0.341	164.1	0.093
320.8	0.172	351.8	0.034	235.4	0.014	168.6	0.018	168.2	0.262
323.9	0.024	353.7	0.086	237.6	0.031	171.0	0.272	169.2	0.007
324.9	0.052	355.9	0.017	239.5	0.003	172.9	0.014	172.0	0.145
327.9	0.062	357.7	0.234	241.5	0.017	175.0	0.123	175.8	0.166
331.9	0.003	359.9	0.003	242.6	0.010	176.9	0.011	179.7	0.093
FCA453		362.3	0.162	243.5	0.003	179.0	0.029	183.5	0.028
等位基因	频率	366.6	0.062	244.5	0.010	180.9	0.018	187.5	0.003
65.6	0.003	370.6	0.076	245.5	0.003	188.9	0.004	195.2	0.003
69.9	0.279	374.7	0.055	246.5	0.014	192.9	0.004	FCA723	
74.0	0.017	375.7	0.010	249.6	0.007	197.0	0.011	等位基因	频率
78.3	0.231	378.6	0.066	251.7	0.024	FCA441		242.5	0.024
81.8	0.355	382.8	0.031	252.7	0.010	等位基因	频率	246.4	0.083
85.6	0.114	387.0	0.003	253.8	0.010	307.0	0.003	247.4	0.021

续表 2  
Continued Tab. 2

<i>FCA734</i>		<i>F124</i>		<i>F85</i>		<i>FCA441</i>		<i>FCA723</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
118.5	0.010	391.6	0.003	254.7	0.014	314.4	0.048	250.3	0.031
137.6	0.179	<i>FCA730</i>		257.9	0.021	315.4	0.017	251.4	0.107
139.6	0.048	等位基因	频率	258.9	0.017	317.5	0.007	254.3	0.007
141.8	0.100	219.0	0.017	260.0	0.072	319.8	0.376	255.3	0.234
143.8	0.007	223.1	0.079	262.1	0.021	323.7	0.341	259.3	0.145
147.9	0.421	225.1	0.045	264.1	0.041	327.7	0.159	262.1	0.003
149.2	0.055	227.3	0.007	266.2	0.003	331.8	0.048	263.2	0.107
151.2	0.079	229.1	0.021	267.2	0.003	<i>FCA732</i>		264.2	0.007
155.4	0.031	233.1	0.169	268.3	0.086	等位基因	频率	266.4	0.003
158.3	0.031	235.2	0.007	271.3	0.003	373.1	0.007	267.5	0.028
159.5	0.034	237.2	0.234	272.5	0.066	380.3	0.397	270.8	0.031
161.5	0.003	241.2	0.345	274.7	0.003	381.1	0.003	271.8	0.045
		242.3	0.003	276.7	0.072	384.0	0.231	275.9	0.045
		245.1	0.066	280.9	0.055	388.4	0.007	279.9	0.017
		249.3	0.003	285.1	0.034	392.6	0.183	283.7	0.031
		253.3	0.003	289.3	0.014	396.7	0.134	287.7	0.024
				293.4	0.038	400.9	0.038	291.7	0.007

表 3 猫 16 个常染色体 STR 基因座的群体遗传学参数  
Tab. 3 The population genetic parameters of  
16 autosomal STR loci in *Felis catus*  
(*n*=145)

基因座	Ho	DP	PE	PIC	Pm
<i>FCA733</i>	0.731	0.957	0.478	0.858	0.043
<i>FCA391</i>	0.531	0.899	0.216	0.732	0.101
<i>FCA740</i>	0.614	0.907	0.308	0.721	0.093
<i>F27</i>	0.683	0.928	0.402	0.769	0.072
<i>FCA453</i>	0.614	0.872	0.308	0.678	0.128
<i>FCA734</i>	0.634	0.895	0.334	0.743	0.105
<i>F85</i>	0.876	0.988	0.746	0.952	0.012
<i>F124</i>	0.848	0.972	0.691	0.882	0.028
<i>FCA742</i>	0.807	0.973	0.612	0.883	0.027
<i>FCA736</i>	0.616	0.911	0.310	0.749	0.089
<i>FCA730</i>	0.669	0.924	0.382	0.759	0.076
<i>FCA749</i>	0.759	0.944	0.525	0.824	0.056
<i>FCA559</i>	0.745	0.961	0.501	0.837	0.039
<i>FCA723</i>	0.772	0.960	0.549	0.886	0.040
<i>FCA441</i>	0.566	0.872	0.252	0.664	0.128
<i>FCA732</i>	0.531	0.867	0.216	0.702	0.133

注:Ho 为观察杂合度(observed heterozygosity),DP 为个体识别率(discrimination power),PE 为非父排除率(probability of exclusion),Pm 为匹配概率(probability of matching),PIC 为多态信息含量(polymorphism information content)。

3 讨 论

构建猫 STR 基因座复合扩增体系对日益增多的涉及猫类的司法鉴定案件具有举足轻重的作用。STR 基因座的选择在亲缘关系鉴定中尤为重要,其 PIC、Ho、DP 和 PE 等群体遗传学参数与复合扩增体系的整

体效能密不可分,因此,在筛选 STR 基因座时应选择等位基因数目较多、基因座广泛分布在各个染色体上、片段大小及间隔合理、扩增效能大致相同且互相不发生连锁反应的基因座。本研究在 MENOTTI-RAYMOND 等<sup>[8]</sup>构建的猫 STR 基因座复合扩增体系的基础上增加了 7 个多态性较高的位点,经反复实验和优化后,为满足各基因座在不同荧光间的均衡排布,剔除了 2 个引物与整体体系不兼容且无法进一步优化的基因座,成功建立了一个包含 16 个猫常染色体 STR 基因座和 1 个 SRY 的复合扩增体系。该体系相较于 MENOTTI-RAYMOND 等<sup>[8]</sup>构建的复合扩增体系,基因座个数由 12 个增加至 17 个,等位基因数目由 172 个增加至 259 个,均得到显著提高,其不同荧光标记间各基因座分布、片段大小及间隔控制、PCR 反应条件等均得到有效优化。此外,除 SRY 外,本研究选用的基因座均为四核苷酸重复,有效减少了 stutter 峰对分型结果的影响。

根据 SWGDAM 制定的验证指南<sup>[10]</sup>,本研究对该复合扩增体系进行了灵敏度、种属特异性、稳定性、准确性、均衡性和混合样本分析等验证实验。经检验,DNA 模板量太高或太低均会对 DNA 分型结果造成不良影响,当 DNA 模板量为 0.125 ng 时,部分基因座出现等位基因丢失现象,无法得到完整分型;当 DNA 模板量为 2 ng 时,虽然 16 个基因座均可得到完整正确的分型结果,但在部分基因座中出现了易导致误判的渗透峰。因此,该复合扩增体系的推荐 DNA 模板量



为0.25~1 ng。12种常见动物种属DNA样本均未出现特异性分型,表明该体系种属特异性良好,应用该体系进行法医物证检验时不会受到其他种属DNA对分型结果造成的影响。遗留在现场的物证检材经常会混有不同的物质,这类物质往往会抑制后续的PCR扩增过程,为获得完整的STR分型结果带来困难,稳定性检验结果显示,该体系可耐受一定浓度的PCR抑制剂,当体系中血红素浓度 $\leq 200 \mu\text{mol/L}$ 、腐殖酸质量浓度 $\leq 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、靛蓝质量浓度 $\leq 6\,000 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、黑色素质量浓度 $\leq 400 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 时,均可得到准确分型且图谱清晰可靠。准确性检验结果表明,各等位基因在不同泳道中的电泳迁移率较小,均在0.3 bp范围内,检测结果准确有效。在不同实验室应用该体系对猫的不同检材进行实验均可得到一致的分型结果,表明本研究构建的复合扩增体系具有良好的组织同一性和可重复性,满足不同案件的需求,可推广应用于日常的检验工作中。为保证杂合子基因分型的准确性,且便于从低模板或降解样本中获得完整的DNA分型,根据《法庭科学人类荧光标记STR复合扩增检测试剂质量基本要求》(GB/T 37226—2018),各基因座内杂合子等位基因均衡性应大于0.7,同一荧光标记的各基因座间峰高均衡性应大于0.5,不同荧光标记间的峰高均衡性应大于0.3,本研究构建的复合扩增体系在20例猫无关个体样本中的均衡性检验结果符合上述要求,表明该体系均衡性良好。此外,混合样本的检验及结果的解读一直是法医物证学检验中的难点,该体系所选用的STR基因座均为四核苷酸重复,受stutter峰的影响较小,在1:1、1:3的混合比例下,混合样本的两个贡献者均可获得完整的等位基因分型结果,当混合比例进一步增大时,虽不能获得全部分型,但对结果解读仍具有一定的参考意义。以往构建猫复合扩增体系的研究中未对体系系统效能进行评价,无法判断其构建的体系是否满足鉴定实践的要求。本研究对145例猫无关个体样本进行了群体遗传学调查,计算了各基因座的DP和PE等影响体系系统效能的遗传学参数。结果表明,该体系选用的16个猫STR基因座平均PIC为0.790,TDP为 $1-3.57 \times 10^{-20}$ ,CPE为 $1-6.35 \times 10^{-5}$ ,可满足鉴定实践要求<sup>[17-18]</sup>。

综上所述,本研究构建的复合扩增体系具有较高的灵敏度和均衡性以及良好的耐受性和稳定性,能对不同类型检材的猫DNA样本进行检测分析,系统效能可满足鉴定实践要求。因此,该体系可以用于猫的种属鉴定、个体识别和亲缘关系鉴定,能够为涉及猫类检材的司法案件提供有效的解决方法,具有良好的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] THULINE H C, MORROW A C, NORBY D E, et al. Autosomal phosphogluconic dehydrogenase polymorphism in the cat (*Felis catus* L.) [J]. Science, 1967, 157(3787): 431-432. doi: 10.1126/science.157.3787.431.
- [2] O'BRIEN S J, GAIL M H, LEVIN D L. Correlative genetic variation in natural populations of cats, mice and men [J]. Nature, 1980, 288(5791): 580-583. doi: 10.1038/288580a0.
- [3] VAN DE WEGHE A, BOUQUET Y, MATTHEEUWS D, et al. Polymorphism in blood substances of the cat [J]. Comp Biochem Physiol B Comp Biochem, 1981, 69(2): 223-230. doi: 10.1016/0305-0491(81)90233-9.
- [4] 侯一平. 法医物证学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 14.  
HOU Y P. Forensic genetics[M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016: 14.
- [5] 叶俊华, 杜蔚安, 杨前勇, 等. 犬17A STR 5色荧光检测试剂盒在警犬DNA鉴定中的应用研究[J]. 刑事技术, 2011(2): 11-13. doi: 10.16467/j.1008-3650.2011.02.025.  
YE J H, DU W A, YANG Q Y, et al. Application of 17A STR kit in police dog DNA identification [J]. Xingshi Jishu, 2011(2): 11-13.
- [6] 凌凤俊, 郑秀芬, 叶健, 等. 牛多态性DNA遗传标记系统的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(9): 14-16, 48. doi: 10.3969/j.issn.1006-9534.2005.09.006.  
LING F J, ZHENG X F, YE J, et al. The study of polymorphic DNA genetic marker systems for cattle [J]. Zhongguo Yousheng Yu Yichuan Zazhi, 2005, 13(9): 14-16, 48.
- [7] BERGER B, BERGER C, HECHT W, et al. Validation of two canine STR multiplex-assays following the ISFG recommendations for non-human DNA analysis [J]. Forensic Sci Int Genet, 2014, 8(1): 90-100. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.07.002.
- [8] MENOTTI-RAYMOND M A, DAVID V A, WACHTER L L, et al. An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples [J]. J Forensic Sci, 2005, 50(5): 1061-1070.
- [9] COOMBER N, DAVID V A, O'BRIEN S J, et al. Validation of a short tandem repeat multiplex typing system for genetic individualization of domestic cat samples [J]. Croat Med J, 2007, 48(4): 547-555.
- [10] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). Validation guidelines for DNA analysis methods [EB/OL]. (2016-05-12)[2021-10-20]. [https://www.swgdam.org/\\_files/ugd/4344b0\\_813b241e8944497e99b9c45b163b76bd.pdf](https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_813b241e8944497e99b9c45b163b76bd.pdf). (下转第245页)