

## · 综 述 ·

## RNA 表达分析在法医学体液斑鉴定中的应用与展望

王守宇<sup>1\*</sup>, 陶瑞阳<sup>2\*</sup>, 侯一平<sup>3</sup>, 李成涛<sup>2</sup>

1. 复旦大学基础医学院法医学系, 上海 200032; 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. 四川大学华西基础医学与法医学院法医研究所, 四川 成都 610041

**摘要:** 在法医物证鉴定中, 准确识别犯罪现场获取的生物样本来源个体及其体液构成对于犯罪性质的明确具有十分关键的作用。近年来, RNA 表达分析已成为国际法医学领域发展最快的体液斑鉴定方法之一。由于具有组织或体液特异性表达的特征, 多种类型的 RNA 在既往研究中被证明为非常具有应用前景的体液斑鉴定候选分子标记。本文简要综述了近年来 RNA 分子标记在体液斑鉴定领域的研究进展, 包括目前研究中已得到有效验证的 RNA 分子标记及其优缺点, 并对 RNA 分子标记在法医学领域的应用前景进行了展望。

**关键词:** 法医遗传学; 体液; 核糖核酸; 毛细管电泳; 实时定量聚合酶链反应; 高通量测序; 综述

**中图分类号:** DF795.2 **文献标志码:** A **doi:** 10.12116/j.issn.1004-5619.2021.510707

**文章编号:** 1004-5619(2022)06-0763-11



### Application and Prospect of RNA Profiling Analysis in Forensic Body Fluid Identification

WANG Shou-yu<sup>1\*</sup>, TAO Rui-yang<sup>2\*</sup>, HOU Yi-ping<sup>3</sup>, LI Cheng-tao<sup>2</sup>

1. Department of Forensic Medicine, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, 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. Institute of Forensic Medicine, West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**Abstract:** In forensic physical evidence identification, the accurate identification of the individual origin and their body fluid composition of the biological samples obtained from the crime scene play a critical role in determining the nature of a crime. In recent years, RNA profiling has become one of the fastest developing methods for body fluids identification. Due to the characteristics of tissue or body fluid specific expression, various types of RNA markers have been proven to be promising candidate markers for body fluids identification in previous studies. This review summarizes the research progress of RNA markers in body fluids identification, including the RNA markers that have been effectively verified in current research and their advantages and disadvantages. Meanwhile, this review prospects the application of RNA markers in forensic medicine.

**Keywords:** forensic genetics; body fluid; ribonucleic acid (RNA); capillary electrophoresis; real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR); high-throughput sequencing; review

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81871532, 82202080, 82101971)

作者简介: 王守宇(1991—), 男, 博士, 博士后, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: shouyu\_wang@163.com

作者简介: 陶瑞阳(1989—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: taoruiyang163@163.com

通信作者: 侯一平, 男, 教授, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: profhou@yahoo.com

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

引用格式: 王守宇, 陶瑞阳, 侯一平, 等. RNA 表达分析在法医学体液斑鉴定中的应用与展望[J]. 法医学杂志, 2022, 38(6): 763-773.

To cite: WANG S Y, TAO R Y, HOU Y P, et al. Application and prospect of RNA profiling analysis in forensic body fluid identification[J]. *Fayixue Zazhi*, 2022, 38(6): 763-773.

\*王守宇和陶瑞阳为共同第一作者

在法医物证学领域,对于犯罪现场遗留的生物样本进行DNA分析已经成为案件侦破过程中不可或缺的一个环节。然而,除确定样本来源个体外,准确识别样本来源于何种组织或体液对于犯罪现场的重建同样具有至关重要的作用。在性侵害等类型的案件中,犯罪性质的确定以及案件的调查和起诉尤其依赖这类证据。得益于各类DNA遗传标记的广泛应用和检测技术的发展,目前以个体识别为目的的法医学检测已能够达到较为理想的效果,然而与之相比,体液类型鉴定在实际应用中仍面临很多挑战<sup>[1]</sup>。

传统的基于理化性质或细胞形态学观察的预实验以及免疫学检测虽然操作简单,但可区分的体液类型有限,并且存在种属特异性低及假阳性率高等问题<sup>[2-4]</sup>。为了提升体液鉴定的实际应用效能,包括DNA甲基化模式分析、拷贝数变异分析、微生物特征分析和RNA表达模式分析在内的一系列新方法在过去数十年的诸多法医相关研究中被提出,并逐渐显现出替代传统方法的趋势<sup>[5-8]</sup>。在这些方法中,RNA表达模式分析在体液斑鉴定领域尤其受到青睐,其相关应用也得到了极大的发展。由于具有组织特异性表达的特征,一些信使RNA(messenger RNA, mRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)、环状RNA(circular RNA, circRNA)和Piwi相互作用RNA(Piwi-interacting RNA, piRNA)被视为十分具有应用前景的体液斑鉴定候选分子标记<sup>[9-11]</sup>。本文旨在对近年来RNA分子标记在体液斑鉴定领域的研究进展进行归纳和总结,对已发表研究中得到有效验证的RNA分子标记及相应的检测技术和数据分析方法进行回顾,以期对相关的法医学鉴定及研究提供借鉴。

## 1 RNA分子标记种类及其在法医学体液斑鉴定领域的研究现状

### 1.1 mRNA分子标记

人体由数十亿个细胞组成,根据其生理功能,各类型细胞内的mRNA表达均在转录水平上受到特定的调控,这种差异也导致了mRNA在特定细胞或组织中独特的表达模式<sup>[12]</sup>。作为基因表达的中间产物,mRNA承担着重要的生理功能,虽然在总量上其仅占总RNA的3%~5%,但是在种类上mRNA却呈现出极大的多样性。

在法医学体液斑鉴定领域,mRNA是最早被提出具有应用潜力并进行了广泛评估的一类分子标记。根据人类转录组学相关研究提供的不同组织转录模式信息,法医学研究者在最初的研究中筛选并检验了一些候选分子标记在各类组织或体液中的表达量<sup>[13-15]</sup>。

随后,针对法医相关检材进行的mRNA表达分析,进一步鉴定了一批在相关体液中稳定表达的分子标记<sup>[16-17]</sup>。附表1展示了在既往研究中被证明具有较好体液鉴定效能的mRNA分子标记及较早将其用于检测体系构建的相关研究<sup>[19,16-30]</sup>。目前,这些mRNA分子标记的特异性和检测系统的灵敏度已在大量研究中得到广泛评估,其中包括欧洲DNA分析组(European DNA Profiling Group, EDNAP)和法医RNA分析组(Forensic RNA Profiling Group, FoRNAP)成员实验室开展的一系列基于毛细管电泳<sup>[27,29,31-33]</sup>和高通量测序检测<sup>[34-35]</sup>的合作研究。一些法医学实验室也基于相关研究结果构建了适用于多种体液类型推断的mRNA复合检测体系,并将其应用于实际案件中。

为了减少样品消耗并简化工作流程,一些研究组也提出了RNA和DNA共同提取的方法<sup>[36-39]</sup>。共提取方法使得对同一份样本进行RNA分析以识别体液类型的同时,也可行DNA分析对检材来源进行个体识别。在检测效果方面,尽管有研究在一些污染或陈旧样本中成功获取了RNA分析结果<sup>[19,40]</sup>,然而在实际案件中,许多法医物证样本的检测结果并不够理想,难以进行有效的mRNA表达分析。这主要是因为生物检材中的mRNA除了面临内源性降解之外,其他一些环境因素如紫外线照射、高湿度与高温环境以及微生物等也会影响其稳定性<sup>[41]</sup>。

### 1.2 miRNA分子标记

miRNA是法医学领域中另一类获得广泛研究的潜在RNA分子标记,其在体液斑鉴定中的应用最早由HANSON等<sup>[10]</sup>提出。miRNA的长度通常为21~25个核苷酸,作为一类参与基因表达调控的非编码小RNA,其主要通过与特定序列mRNA的3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合诱导目标基因在翻译水平上的调控<sup>[42]</sup>。针对miRNA表达谱的相关研究<sup>[43]</sup>表明,人体不同组织和细胞中miRNA的表达情况存在一定差异。此外,目前已有近2000种人类miRNA序列在相关研究中被识别<sup>[44]</sup>。由于丰富的多样性以及较短的长度,miRNA可能特别适合对污染或陈旧样本等降解程度较为严重的检材进行法医学分析<sup>[45-46]</sup>。

在体液斑鉴定方面,目前对于miRNA分子标记最全面的研究是由SAUER等<sup>[47]</sup>完成的。该课题组使用微阵列芯片技术检测了miRBase v18.0中所有人类miRNA在体液中的表达情况。去除表现出高于背景信号强度的miRNA后,在不到20%的样品中剩下的743个miRNA被纳入进一步分析。随后,36个在芯片数据中显示出不同样本间最高表达量差异的候选miRNA分子标记被用于实时定量PCR(real-time

quantitative PCR, RT-qPCR)验证。最终研究者提出了一种仅使用4个 miRNA (hsa-miR-891a-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-203a-3p 和 hsa-miR-124-3p) 的决策算法来识别血液、精液、唾液、阴道分泌物和月经血。此外,该研究还在保存长达36年的陈旧体液斑中检测到了部分 miRNA 分子标记,这一发现也进一步验证了 miRNA 表达分析在降解检材中的应用潜力。

除此之外,其他一些法医学实验室也对常见体液如血液、唾液、精液、阴道分泌物和月经血中具有特异性表达的 miRNA 进行了筛选和评估<sup>[48-53]</sup>,然而从目前的研究结果来看,许多 miRNA 分子标记的特异性表达并非严格意义上的体液特异性,而是在一组不同类型的样本中呈现出的差异表达,这意味着其并非在目标体液之外的样本中不表达,而是在目标体液中表达量更高。尽管许多 miRNA 在筛选实验中看起来很有应用潜力,但在使用 RT-qPCR 等方法进行验证时却无法得到良好的结果。此外,不同研究筛选出的候选 miRNA 分子标记往往并不一致,这可能是由不同的检测方法和引物设计导致的。目前,不同实验室对于最佳 miRNA 分子标记及检测方法的选择,乃至如何根据检测结果解释和预测法医样本的体液类型等问题均未达成共识。

### 1.3 circRNA 分子标记

circRNA 是一类单链共价闭合环状非编码 RNA,最早在关于类病毒、病毒和四膜虫的研究中被发现<sup>[54-56]</sup>,近几年才确定了其在人体细胞中的表达<sup>[57]</sup>。circRNA 与其编码基因在相应位置上转录产生线性 RNA 共享外显子,并且通常由前体 mRNA 的反向剪接形成<sup>[58-59]</sup>。由于 RNA 分子的环形结构在很大程度上可以抵抗核酸外切酶的水解,circRNA 通常被认为具有较高的稳定性,而这一点也被其在细胞中较长的半衰期所证实<sup>[60]</sup>。此外,circRNA 的序列高度保守且具有组织特异性,在生物体各种细胞中大量存在,且部分 circRNA 的表达水平明显超过 mRNA 的表达水平<sup>[61]</sup>,因此,理论上 circRNA 具有成为良好体液斑鉴定分子标记的潜质。

MEMCZAK 等<sup>[62]</sup>在针对血液样本 circRNA 表达情况的研究中发现了数百种容易通过 RT-qPCR 检测到的 circRNA 亚型,但却未发现其相应的线性基因产物,因此认为,对血液中 circRNA 的表达进行分析可能会获得其他类型 RNA 表达情况无法反映的疾病相关信息。而在体液斑鉴定方面,SONG 等<sup>[63]</sup>使用微阵列芯片技术检测了 circRNA 在血液、唾液、精液、阴道分泌物和月经血中的表达谱,分析结果显示,不同体液中 circRNA 的表达模式存在可区分的差异,但该

研究未能够筛选出可用于进一步验证的分子标记;ZHANG 等<sup>[11,64-65]</sup>分别通过毛细管电泳和 RT-qPCR 检测成功鉴定出与 *PRM2*、*TGM4*、*KLK3* 等 14 个体液特异性 mRNA 共享外显子的主要 circRNA,并设计了用于同时检测线性和环状转录产物的引物组,其构建的 F18plex 复合检测体系可在低至 1  $\mu$ L 的血液、精液、唾液,或总 RNA 低至 1 ng 的阴道分泌物、月经血、尿液样本中获得完整的检测结果。以上研究充分说明了将 circRNA 与 mRNA 表达分析相结合,可在不影响体液特异性的前提下,成为一种提升体液斑鉴定检测灵敏度和结果稳定性的有效策略。

### 1.4 piRNA 分子标记

piRNA 是一类非编码小 RNA,其长度通常为 24~32 nt,并在多种类型的细胞及外泌体中表达<sup>[66-68]</sup>。piRNA 的序列多样性较高,目前在人类基因组中鉴定出的 piRNA 已超过 30 000 种<sup>[69]</sup>,并且其中一些的表达具有组织差异性<sup>[70]</sup>。更为重要的是,piRNA 的 3'端核苷酸上具有一个特征性的 2'-O-甲基,有研究<sup>[71]</sup>表明,这种在其他大多数小 RNA 中都不存在的结构有助于提升 RNA 分子的稳定性。基于以上特征,piRNA 也被视为继 miRNA 之后又一类具有良好体液斑鉴定潜力的小 RNA 分子标记。

在法医物证学领域,WANG 等<sup>[72]</sup>首先通过 RT-qPCR 检测对 piRNA 在体液斑鉴定中的潜在用途进行了初步探索,研究结果证实了 piR-55521 的表达具有良好的精液特异性以及较高的检测灵敏度和稳定性。在此基础上,后续研究通过高通量测序揭示了 piRNA 在 6 种类型的法医相关生物样本(静脉血、月经血、唾液、精液、阴道分泌物和皮肤)中的表达模式,并筛选出 37 个在测序数据中显示出相对较高体液区分潜能的候选 piRNA 分子标记。基于候选 piRNA 表达矩阵的偏最小二乘-判别分析(partial least square-discriminant analysis, PLS-DA)结果表明,在选取最佳 PLS 成分数的前提下,数量精简的分子标记足以构建分类效能良好的 PLS-DA 模型<sup>[73]</sup>。该研究不仅提示了 piRNA 分子标记具有区分生殖细胞系相关体液与非生殖细胞系相关体液方面的优势,也充分强调了适当的数据分析方法对于小 RNA 相对表达差异正确解读的重要性。

## 2 法医学常用的 RNA 表达分析方法

### 2.1 毛细管电泳

毛细管电泳是检测 mRNA 分子标记的常用方法之一。在检测过程中,首先需要将 mRNA 逆转录为互补 DNA (complementary DNA, cDNA),然后使用特异

性引物对 cDNA 进行终点 PCR,并对扩增产物进行毛细管电泳以获得体液特异性分子标记的检测结果。毛细管电泳在体液斑鉴定方面的应用最早由 BAUER 等<sup>[13]</sup>提出,随后被广泛应用于多项研究中。毛细管电泳不仅可应用于 mRNA 分子标记的检测,也可用于检测 miRNA 和 circRNA 分子标记<sup>[11,74]</sup>。由于毛细管电泳检测平台被广泛应用于检测与分析法医学常用的 DNA 遗传标记(如 STR 和 SNP),因此,相较于依靠其他平台的 RNA 分子标记检测手段,毛细管电泳更易于普及。此外,通过对不同分子标记设计长度不同的扩增子,毛细管电泳方法可在同一复合扩增体系中同时检测多种分子标记,这些分子标记的目标体液既可以是单一类型,也可以是多种类型<sup>[18,20,24,75-79]</sup>。

虽然毛细管电泳方法具有上述优势,但作为一种半定量的检测手段,其在检测 cDNA 时目的产物峰高与起始模板量并不存在明确的线性相关。在分析一些灵敏度较低的分子标记时,这种二元化检测结果能够提供的信息量十分有限。因此,不同实验室可能会对同样的检测结果做出不同的判读和解释。为了解决这一问题,LINDENBERGH 等<sup>[80]</sup>基于检测结果的可重复性以及观察到的峰( $x$ )与可能存在的峰( $n$ )之间的比例开发了一种简易的结果解读方法。当一类体液特异性分子标记在所有可能存在峰的位置上出现了至少一半的阳性检测结果( $x \geq n/2$ )时,该类型体液将被判定为“观察到”。在这种方法中,每种体液的全部 mRNA 分子标记在结果判断中都具有相同的权重。而 ROEDER 等<sup>[81]</sup>则提出了另一种评分方法,其根据表达特异性为每个 mRNA 分子标记赋予了一个权重值,将样本中检测到的分子标记的权重值相加可得到一个体液得分。在这种方法中,仅当样本的体液得分达到一定阈值时才可对其进行体液类型判定,因此可在很大程度上降低样本类型的误判概率。

EDNAP 在 2011—2015 年开展的 mRNA 分子标记合作研究<sup>[27,29,31-33]</sup>也是在毛细管电泳平台上进行的。该研究集合了多个法医学实验室的检测结果,对用于血液、唾液、精液、阴道分泌物、月经血和皮肤鉴定的多种 mRNA 分子标记的稳定性和可重复性进行了全面评估。研究表明,基于毛细管电泳技术的 mRNA 表达分析可以成功地与 STR 分析相结合并纳入法医学实际案件的常规处理流程中。

## 2.2 RT-qPCR

在涉及基因表达定量的相关研究中,RT-qPCR 通常被视为金标准并广泛应用于候选基因表达量差异的确认<sup>[82-83]</sup>。正是由于 RT-qPCR 定量结果的准确性,该检测方法在体液斑鉴定领域也被广泛应用于

miRNA 分子标记的表达分析。根据实验目的不同,RT-qPCR 可以选择一步测定法或两步测定法进行。一步测定法在单个反应体系中结合了逆转录和 PCR 过程,仅能够使用序列特异性引物。而在两步测定法中,逆转录和 PCR 在不同的步骤进行,因此可选择使用具有通用接头的随机引物。

目前,在法医学研究中常用的 RT-qPCR 主要包括基于荧光染料检测的 SYBR Green RT-qPCR 和基于荧光探针检测的 TaqMan RT-qPCR,虽然在荧光染料结合方式与特异性方面存在一定差异,但两种方法本质上都是在每个循环之后通过对 PCR 产物进行实时定量计算出目标基因与内参基因之间的表达量差异,即  $\Delta Cq$ (或  $\Delta Ct$ )值<sup>[23]</sup>。由于  $\Delta Cq$  值可能会受到不同引物 PCR 扩增效率的影响,WANG 等<sup>[84]</sup>在 2012 年发表的一项研究中,通过建立扩增效率校准模型的方式为体液特异性 miRNA 表达差异数据的分析提供了一种有效的方法。

在使用 RT-qPCR 这类相对定量法检测目标基因的表达量时,内参基因的表达情况也会对最终的检测结果产生影响。既往研究中,普遍存在于所有类型细胞中的管家基因常被作为内参基因用于数据的标准化处理<sup>[9]</sup>。然而,近年来的多项研究<sup>[20,40,76]</sup>表明,不同管家基因在各类体液中的表达水平和稳定性也存在一定差异,因此在选择内参基因时也应考虑样本类型可能产生的影响。针对法医常见类型的体液样本,已有多项研究<sup>[48,85-87]</sup>通过表达水平和稳定性分析对一些小 RNA 内参基因的适用性进行了评估,但纳入比较的内参基因不同导致这些研究之间缺乏横向比对。在最近的一项研究中,WANG 等<sup>[88]</sup>对其进行了汇总,通过检测 18 个已报道的小 RNA 候选内参基因在我国汉族个体五类常见体液斑中的表达情况,最终将 miR-191、miR-423、miR-93、miR-484 和 let-7 确定为比较理想的内参基因。

HAAS 等<sup>[75]</sup>对基于毛细管电泳与 RT-qPCR 检测得到的结果进行了比较,发现与终点 PCR 结合毛细管电泳检测相比,RT-qPCR 法并没有显示出更高的灵敏度。此外,由于受到可检测荧光染料数量的限制,RT-qPCR 在单个反应体系中可进行靶向扩增的分子标记数量有限,这一缺点也使得复合检测体系的构建变得更加困难。

## 2.3 高通量测序

高通量测序是近年来发展十分迅速的一项应用技术。随着测序通量的不断提升以及实验成本的降低,高通量测序在法医学领域相关研究中的使用范围也在扩大,尤其是在 STR 和 SNP 等 DNA 遗传标记的

检测与分析方面显示出了良好的发展势头。迄今为止,已有数个基于高通量测序的商业化STR和SNP试剂盒被开发并投入实际应用<sup>[89-91]</sup>。

在体液斑鉴定领域,高通量测序的应用仍处于起步阶段。LIN等<sup>[92]</sup>最早在其研究中对来自陈旧体液斑样本中的高度降解RNA进行了完整的转录组学分析,实现了高通量测序技术在分析降解RNA中的应用。在随后的一项研究中,ZUBAKOV等<sup>[93]</sup>开发了一种基于平行靶向DNA及RNA测序同时分析STR和mRNA的方法,成功整合了9个STR遗传标记、12个体液特异性mRNA分子标记(可检测血液、唾液、精液、阴道分泌物、月经血和皮肤)以及2个mRNA内参基因。HANSON等<sup>[26]</sup>在2018年发表的一项研究中进一步增加了高通量测序体系中mRNA分子标记的数量,其基于Illumina测序平台开发的包含33个mRNA分子标记的靶向测序体系(MiSeq/FGx 33plex)可用于血液、精液、唾液、阴道分泌物、月经血和皮肤的鉴定。根据其实验结果,这些分子标记在各自的目标体液中均显示出较高的特异性,并且与非目标体液的交叉反应极小(或无)。DØRUM等<sup>[94]</sup>随后在包含模拟案件检材在内的183例体液或组织样本中对MiSeq/FGx 33plex的应用效果进行了更加全面的评估,并在数据分析过程中建立了一个预测样本类型的全新统计学模型。与传统模型相比,该模型的不同之处在于其可将测序数据中的定量信息也作为一个因子纳入分析,而不仅是基于有或无的二元化判定结果,这一提升使体液类型的预测效果得到了很大的改善。而在最近的EDNAP合作研究<sup>[34]</sup>中,17个成员实验室进一步评估了MiSeq/FGx 33plex与另一个基于Ion torrent测序平台构建的包含29个mRNA分子标记的靶向测序体系(PGM/S5 29plex)在体液斑鉴定中的实际使用效果。总体而言,虽然不同实验室由于测序数据量的差异导致各分子标记测序读数存在一定的差异,但是整体所反映的趋势是相同的:各类型分子标记均可在其目标体液中检测到中等或较高的读数值,而在非目标体液中的读数值很少甚至没有。此外,该研究还对数据进行了偏最小二乘(partial least square, PLS)分析,结果显示,血液、月经血、唾液和精液分子标记按样本类型呈现出良好的聚类。这项协作研究的结果再次证实了靶向mRNA测序可作为一种可靠的方法应用到未来的体液类型鉴别相关研究中。

除了mRNA分子标记的检测,高通量测序也被广泛应用于miRNA分子标记的筛选和表达分析中。WANG等<sup>[49]</sup>在2016年发表的研究中使用Ion torrent PGM平台检测了2588个成熟体miRNA在血液和唾液

样本中的表达情况,并分别筛选出了6个在血液中特异性表达、19个在唾液中特异性表达的miRNA分子标记。随后,SEASHOLS-WILLIAMS等<sup>[48]</sup>使用Illumina HiSeq平台检测了miRNA在8种类型的法医相关生物样本(血液、精液、阴道分泌物、月经血、唾液、尿液、粪便和汗液)中的表达量,结果显示,阴道分泌物、唾液和粪便这些含菌量相对较高的体液测序数据在序列匹配与注释后获得的miRNA读数相对较低,这可能是由于内源性细菌中的小RNA过度饱和所导致。此外,该研究也成功鉴定出一系列体液特异性miRNA分子标记与最佳内参基因,为后续研究提供了一定参考。DØRUM等<sup>[50]</sup>在2019年发表的一项针对体液斑的miRNome测序研究中,直接应用PLS和线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)根据miRNA的整体表达模式对体液类型进行了预测。通过调整分子标记筛选阈值,评估了其建立的统计学模型在面对包含不同数量miRNA分子标记的子集时预测准确性的差异,从而确定了足够的预测效能所需的最小分子标记数量。虽然分析结果显示,由100个miRNA分子标记组成的模型预测效果明显优于由9个miRNA分子标记组成的模型,甚至与包含全部1034个miRNA分子标记的模型预测效果相当,但为了减少数据分析中的变量,该研究最终仍选定由9个miRNA分子标记组成的预测模型并计算了其中各分子标记在对6种生物样本(血液、唾液、精液、阴道分泌物、月经血和皮肤)的类型进行预测时的重要性指数。在某种程度上,这项研究为今后分子标记的筛选提供了新的思路,因为其分析结果提示,在体液斑鉴定模型中,能够为多种体液的区分提供有效信息的分子标记可能比仅在一种体液中具有表达特异性的分子标记更加重要。

## 2.4 其他方法

高分辨率熔解(high-resolution melting, HRM)曲线分析是在RT-qPCR的基础上,根据单核苷酸熔解温度不同而形成不同形态熔解曲线的特征对PCR产物进行分析的方法<sup>[95-97]</sup>。在熔解过程中,通过监测目标片段的荧光变化来获得专一的HRM曲线和解链温度(melting temperature,  $T_m$ ),根据HRM图谱的特点来区分特异性序列的差异,具有成本低、速度快及闭管操作可避免污染等优点。基于HRM方法, HANSON等<sup>[98]</sup>构建的mRNA复合体系可在一定程度上区分血液、精液、唾液、阴道分泌物、月经血和皮肤样本。

基因芯片检测通过微阵列(microarray)技术将高密度DNA片段通过高速机器人或原位合成方式以一定的顺序或排列方式使其附着在膜、玻璃片等固相表

面,以同位素或荧光标记的DNA探针,借助碱基互补杂交原理,根据设计芯片时的探针位置和荧光强度分布比对分析得出样本的核酸序列。基因芯片的检测准确性高、通量大,在法医学中常用于DNA、RNA等分子标记的筛选<sup>[99-100]</sup>。

基于颜色编码的NanoString<sup>®</sup>基因定量法针对每个mRNA标记分别设计35~50个碱基的报告探针和捕获探针<sup>[101]</sup>,其多重检测体系可包含20~800个mRNA靶标探针。报告探针携带信号,由与mRNA的5'末端结合的荧光分子条形码组成;捕获探针与mRNA的3'末端结合后,可将整个探针与mRNA的复合体黏附在玻片表面以进行信号检测和数据收集。DANAHER等<sup>[102]</sup>应用NanoString<sup>®</sup>基因定量法对23个mRNA靶标进行探针杂交,用于识别血液、精液、唾液、阴道分泌液和汗液。然而,其中唾液、阴道分泌物和汗液标志物缺乏液体特异性。此外,识别体液需要的样品量较大、杂交时间冗长。

实时逆转录环介导等温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)技术由USHIO等<sup>[103]</sup>开发,广泛用于寄生虫、疾病的快速检测和鉴定等<sup>[104-105]</sup>。RT-LAMP通过DNA聚合酶介导的自循环进行DNA扩增,该酶取代目标链DNA并在扩增时产生新的目标,因此,该过程比传统PCR更具特异性。此外,RT-LAMP反应速度快,仅需加热块保持在单一温度,无需专用设备。在法医学领域,SU等<sup>[106]</sup>及JACKSON等<sup>[107]</sup>将RT-LAMP应用于血液、精液、唾液、阴道分泌液等体液中特异性mRNA标记的检测,尽管研究结果体现出RT-LAMP快速区分单一类型体液的能力与较高的检测灵敏度,但由于该方法对于mRNA分子完整度要求较高,其在降解检材中的实际应用价值仍需要进一步评估。

### 3 展 望

经过多年的探索和发展, RNA表达模式分析在体液斑鉴定领域已获得绝大多数实验室的认可。在实际应用中,根据现有的RNA分子标记检测结果对样本质量较高的单一成分体液进行体液类型鉴定通常可获得较为可靠的结果,然而在面对高度降解的低质量样本或混合样本时,目前仍然没有较好的解决策略。因此,未来的研究重点也将聚焦于如何解决这两个关键问题。

鉴于小RNA在既往针对降解程度较为严重的检材的研究中显示出较高的稳定性,未来法医学研究若能够鉴别出其他类型具有稳定化学结构的小RNA分子标记,并将其与miRNA和piRNA分析相结合,可

能对小RNA表达分析在体液鉴定中的整体应用效果起到很大的提升作用。而在混合样本的鉴定方面, HANSON等<sup>[108]</sup>最早提出了将基因编码区SNP(coding region SNP, cSNP)应用于mRNA分子标记来源个体识别的设想。作为DNA的转录产物, RNA分子不仅具备来自其模板DNA序列的遗传多态性,还具有体液特异性表达的特征,若能够通过cSNP的检测将个体识别相关的多态信息与体液类型相关的表达信息相关联,理论上可以使混合样本的鉴定效能得到质的提升。近年来,国内外一系列研究<sup>[109-114]</sup>已通过高通量测序和SNaPshot检测等手段探索了根据cSNP分析结果将体液类型与具有特定基因型的个体相连锁的可行性。此外,由于一些体液特异性mRNA分子标记在部分外观和细胞成分相似的样本(如唾液和阴道分泌物)中存在交叉表达的特征,在一些案情复杂的情况下,即使对单一类型的体液样本进行溯源也可能出现检测结果的错误解读。cSNP的相关研究亦可能为解决体液鉴定中的交叉反应提供新的实验手段。

综上,无论是新型RNA分子标记的探索还是现有RNA分子标记检测体系与检测方法的优化,在未来研究中均有很大的提升空间。尽管目前RNA表达分析在体液斑鉴定和其他法医学鉴定的实践过程中仍面临一些问题,但随着有效分子标记数量的不断增加以及检测和分析方法的逐渐完善,这些问题均有望通过进一步研究得到解决,而RNA证据也必然在法庭科学领域呈现出更高的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] HARTEVELD J, LINDENBERGH A, SIJEN T. RNA cell typing and DNA profiling of mixed samples: Can cell types and donors be associated?[J]. *Sci Justice*, 2013, 53(3): 261-269. doi: 10.1016/j.scijus.2013.02.001.
- [2] VIRKLER K, LEDNEV I K. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene[J]. *Forensic Sci Int*, 2009, 188(1/2/3): 1-17. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.02.013.
- [3] TOBE S S, WATSON N, DAÉID N N. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA[J]. *J Forensic Sci*, 2007, 52(1): 102-109. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00324.x.
- [4] MYERS J R, ADKINS W K. Comparison of modern techniques for saliva screening[J]. *J Forensic Sci*, 2008, 53(4): 862-867. doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00755.x.
- [5] SIJEN T. Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methyl-

- tion and microbial markers[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, 18: 21-32. doi:10.1016/j.fsigen.2014.11.015.
- [6] ZUBAKOV D, CHAMIER-CIEMIŃSKA J, KOKMEIJER I, et al. Introducing novel type of human DNA markers for forensic tissue identification: DNA copy number variation allows the detection of blood and semen[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2018, 36: 112-118. doi:10.1016/j.fsigen.2018.06.021.
- [7] DOBAY A, HAAS C, FUCILE G, et al. Microbiome-based body fluid identification of samples exposed to indoor conditions[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, 40: 105-113. doi:10.1016/j.fsigen.2019.02.010.
- [8] 邹凯南, 桂程, 曹禹, 等. 人体生物性物质来源鉴定及法医学应用研究进展[J]. *法医学杂志*, 2016, 32(3): 204-210. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2016.03.011.
- ZOU K N, GUI C, CAO Y, et al. Source identification of human biological materials and its prospect in forensic science[J]. *Fayixue Zazhi*, 2016, 32(3): 204-210.
- [9] JUUSOLA J, BALLANTYNE J. Messenger RNA profiling: A prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification[J]. *Forensic Sci Int*, 2003, 135(2): 85-96. doi:10.1016/s0379-0738(03)00197-x.
- [10] HANSON E K, LUBENOW H, BALLANTYNE J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs[J]. *Anal Biochem*, 2009, 387(2): 303-314. doi:10.1016/j.ab.2009.01.037.
- [11] ZHANG Y, LIU B, SHAO C, et al. Evaluation of the inclusion of circular RNAs in mRNA profiling in forensic body fluid identification[J]. *Int J Legal Med*, 2018, 132(1): 43-52. doi:10.1007/s00414-017-1690-7.
- [12] MELÉ M, FERREIRA P G, REVERTER F, et al. Human genomics. The human transcriptome across tissues and individuals[J]. *Science*, 2015, 348(6235): 660-665. doi:10.1126/science.aaa0355.
- [13] BAUER M, KRAUS A, PATZELT D. Detection of epithelial cells in dried blood stains by reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. *J Forensic Sci*, 1999, 44(6): 1232-1236.
- [14] BAUER M, PATZELT D. Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood[J]. *J Forensic Sci*, 2002, 47(6): 1278-1282.
- [15] BAUER M, PATZELT D. Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains[J]. *Int J Legal Med*, 2003, 117(3): 175-179. doi:10.1007/s00414-002-0347-2.
- [16] 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[J]. *Int J Legal Med*, 2008, 122(2): 135-142. doi:10.1007/s00414-007-0182-6.
- [17] HANSON E, HAAS C, JUCKER R, et al. Specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of skin in 'touch DNA' evidence[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, 6(5): 548-558. doi:10.1016/j.fsigen.2012.01.004.
- [18] HAAS C, HANSON E, KRATZER A, et al. Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2011, 5(5): 449-458. doi:10.1016/j.fsigen.2010.09.006.
- [19] 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[J]. *Int J Legal Med*, 2009, 123(1): 71-74. doi:10.1007/s00414-008-0249-z.
- [20] FLEMING R I, HARBISON S A. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2010, 4(4): 244-256. doi:10.1016/j.fsigen.2009.10.006.
- [21] ALBANI P P, FLEMING R. Novel messenger RNAs for body fluid identification[J]. *Sci Justice*, 2018, 58(2): 145-152. doi:10.1016/j.scijus.2017.09.002.
- [22] PARK S M, PARK S Y, KIM J H, et al. Genome-wide mRNA profiling and multiplex quantitative RT-PCR for forensic body fluid identification[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, 7(1): 143-150. doi:10.1016/j.fsigen.2012.09.001.
- [23] NUSSBAUMER C, GHAREHBAGHI-SCHNELL E, KORSCHINECK I. Messenger RNA profiling: A novel method for body fluid identification by Real-Time PCR[J]. *Forensic Sci Int*, 2006, 157(2/3): 181-186. doi:10.1016/j.forsciint.2005.10.009.
- [24] JUUSOLA J, BALLANTYNE J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids[J]. *Forensic Sci Int*, 2005, 152(1): 1-12. doi:10.1016/j.forsciint.2005.02.020.
- [25] SAKURADA K, IKEGAYA H, FUKUSHIMA H, et al. Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen[J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2009, 11(3): 125-128. doi:10.1016/j.legalmed.2008.10.002.
- [26] HANSON E, INGOLD S, HAAS C, et al. Messenger RNA biomarker signatures for forensic body fluid identification revealed by targeted RNA sequencing[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2018, 34: 206-221. doi:10.1016/j.fsigen.2018.02.020.
- [27] HAAS C, HANSON E, ANJOS M J, et al. RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains -- Results of a third collaborative EDNAP exercise[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, 7(2): 230-239. doi:10.1016/j.fsigen.2012.10.011.
- [28] HANSON E K, BALLANTYNE J. Highly specific

- mRNA biomarkers for the identification of vaginal secretions in sexual assault investigations[J]. *Sci Justice*, 2013, 53(1):14-22. doi:10.1016/j.scijus.2012.03.007.
- [29] HAAS C, HANSON E, ANJOS M J, et al. RNA/DNA co-analysis from human menstrual blood and vaginal secretion stains: Results of a fourth and fifth collaborative EDNAP exercise[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2014, 8(1):203-212. doi:10.1016/j.fsigen.2013.09.009.
- [30] VISSER M, ZUBAKOV D, BALLANTYNE K N, et al. mRNA-based skin identification for forensic applications[J]. *Int J Leg Med*, 2011, 125(2):253-263. doi:10.1007/s00414-010-0545-2.
- [31] HAAS C, HANSON E, BÄR W, et al. mRNA profiling for the identification of blood -- Results of a collaborative EDNAP exercise[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2011, 5(1):21-26. doi:10.1016/j.fsigen.2010.01.003.
- [32] HAAS C, HANSON E, ANJOS M J, et al. RNA/DNA co-analysis from blood stains -- Results of a second collaborative EDNAP exercise[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, 6(1):70-80. doi:10.1016/j.fsigen.2011.02.004.
- [33] HAAS C, HANSON E, BANEMANN R, et al. RNA/DNA co-analysis from human skin and contact traces -- Results of a sixth collaborative EDNAP exercise[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, 16:139-147. doi:10.1016/j.fsigen.2015.01.002.
- [34] INGOLD S, DØRUM G, HANSON E, et al. Body fluid identification using a targeted mRNA massively parallel sequencing approach -- Results of a EUROFORGEN/EDNAP collaborative exercise[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2018, 34:105-115. doi:10.1016/j.fsigen.2018.01.002.
- [35] SALZMANN A P, BAMBERG M, COURTS C, et al. mRNA profiling of mock casework samples: Results of a FoRNAP collaborative exercise[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2021, 50:102409. doi:10.1016/j.fsigen.2020.102409.
- [36] BAUER M, PATZELT D. A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains[J]. *Forensic Sci Int*, 2003, 136(1/2/3):76-78. doi:10.1016/S0379-0738(03)00219-6.
- [37] ALVAREZ M, JUUSOLA J, BALLANTYNE J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples[J]. *Anal Biochem*, 2004, 335(2):289-298. doi:10.1016/j.ab.2004.09.002.
- [38] BOWDEN A, FLEMING R, HARBISON S A. A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ™ system[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2011, 5(1):64-68. doi:10.1016/j.fsigen.2009.11.007.
- [39] PARKER C, HANSON E, BALLANTYNE J. Optimization of dried stain co-extraction methods for efficient recovery of high quality DNA and RNA for forensic analysis[J]. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*, 2011, 3(1):e309-e310. doi:10.1016/j.fsigs.2011.09.017.
- [40] SETZER M, JUUSOLA J, BALLANTYNE J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains[J]. *J Forensic Sci*, 2008, 53(2):296-305. doi:10.1111/j.1556-4029.2007.00652.x.
- [41] SIRKER M, SCHNEIDER P M, GOMES I. A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions[J]. *Int J Legal Med*, 2016, 130(6):1431-1438. doi:10.1007/s00414-016-1373-9.
- [42] HE L, HANNON G J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7):522-531. doi:10.1038/nrg1379.
- [43] WEBER J A, BAXTER D H, ZHANG S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(11):1733-1741. doi:10.1373/clinchem.2010.147405.
- [44] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(S1):D152-D157. doi:10.1093/nar/gkq1027.
- [45] COURTS C, MADEA B. Micro-RNA -- A potential for forensic science?[J]. *Forensic Sci Int*, 2010, 203(1/2/3):106-111. doi:10.1016/j.forsciint.2010.07.002.
- [46] 王正, 张霖, 唐丹舟, 等. microRNA 的检测技术及其法医学应用前景[J]. *法医学杂志*, 2014, 30(1):55-59. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2014.01.014.  
WANG Z, ZHANG J, TANG D Z, et al. Detection technologies of microRNA and their prospects for forensic applications[J]. *Fayixue Zazhi*, 2014, 30(1):55-59.
- [47] SAUER E, REINKE A K, COURTS C. Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2016, 22:89-99. doi:10.1016/j.fsigen.2016.01.018.
- [48] SEASHOLS-WILLIAMS S, LEWIS C, CALLOWAY C, et al. High-throughput miRNA sequencing and identification of biomarkers for forensically relevant biological fluids[J]. *Electrophoresis*, 2016, 37(21):2780-2788. doi:10.1002/elps.201600258.
- [49] WANG Z, ZHOU D, CAO Y, et al. Characterization of microRNA expression profiles in blood and saliva using the Ion Personal Genome Machine® System (Ion PGM™ System)[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2016, 20:140-146. doi:10.1016/j.fsigen.2015.10.

- 008.
- [50] DØRUM G, INGOLD S, HANSON E, et al. Predicting the origin of stains from whole miRNome massively parallel sequencing data[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, 40: 131-139. doi:10.1016/j.fsigen.2019.02.015.
- [51] WANG Z, ZHANG J, LUO H, et al. Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, 7(1): 116-123. doi:10.1016/j.fsigen.2012.07.006.
- [52] LI Z, BAI P, PENG D, et al. Screening and confirmation of microRNA markers for distinguishing between menstrual and peripheral blood[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, 30: 24-33. doi:10.1016/j.fsigen.2017.05.012.
- [53] 何红霞, 季安全, 韩娜, 等. 基于microRNA表达量及判别分析的外周血与月经血鉴别[J]. *法医学杂志*, 2020, 36(4): 514-518, 524. doi:10.12116/j.issn.1004-5619.2020.04.016.
- HE H X, JI A Q, HAN N, et al. Identification of peripheral blood and menstrual blood based on the expression level of microRNAs and discriminant analysis[J]. *Fayixue Zazhi*, 2020, 36(4): 514-518, 524.
- [54] SANGER H L, KLOTZ G, RIESNER D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(11): 3852-3856. doi:10.1073/pnas.73.11.3852.
- [55] GRABOWSKI P J, ZAUG A J, CECH T R. The intervening sequence of the ribosomal RNA precursor is converted to a circular RNA in isolated nuclei of *Tetrahymena*[J]. *Cell*, 1981, 23(2): 467-476. doi:10.1016/0092-8674(81)90142-2.
- [56] KOS A, DIJKEMA R, ARNBERG A C, et al. The hepatitis delta ( $\delta$ ) virus possesses a circular RNA[J]. *Nature*, 1986, 323(6088): 558-560. doi:10.1038/323558a0.
- [57] GUO J U, AGARWAL V, GUO H, et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(7): 409. doi:10.1186/s13059-014-0409-z.
- [58] ZHANG X O, WANG H B, ZHANG Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. *Cell*, 2014, 159(1): 134-147. doi:10.1016/j.cell.2014.09.001.
- [59] STARKE S, JOST I, ROSSBACH O, et al. Exon circularization requires canonical splice signals[J]. *Cell Rep*, 2015, 10(1): 103-111. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.002.
- [60] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338. doi:10.1038/nature11928.
- [61] SALZMAN J, GAWAD C, WANG P L, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733. doi:10.1371/journal.pone.0030733.
- [62] MEMCZAK S, PAPAVALASILEIOU P, PETERS O, et al. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0141214. doi:10.1371/journal.pone.0141214.
- [63] SONG F, LUO H, XIE M, et al. Microarray expression profile of circular RNAs in human body fluids[J]. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*, 2017, 6: e55-e56. doi:10.1016/j.fsigs.2017.09.005.
- [64] LIU B, SONG F, YANG Q, et al. Characterization of tissue-specific biomarkers with the expression of circRNAs in forensically relevant body fluids[J]. *Int J Legal Med*, 2019, 133(5): 1321-1331. doi:10.1007/s00414-019-02027-y.
- [65] LIU B, YANG Q, MENG H, et al. Development of a multiplex system for the identification of forensically relevant body fluids[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2020, 47: 102312. doi:10.1016/j.fsigen.2020.102312.
- [66] BAHN J H, ZHANG Q, LI F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 221-230. doi:10.1373/clinchem.2014.230433.
- [67] HONG Y, WANG C, FU Z, et al. Systematic characterization of seminal plasma piRNAs as molecular biomarkers for male infertility[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24229. doi:10.1038/srep24229.
- [68] HUANG X, YUAN T, TSCHANNEN M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 319. doi:10.1186/1471-2164-14-319.
- [69] FU A, JACOBS D I, ZHU Y. Epigenome-wide analysis of piRNAs in gene-specific DNA methylation[J]. *RNA Biol*, 2014, 11(10): 1301-1312. doi:10.1080/15476286.2014.996091.
- [70] MARTINEZ V D, VUCIC E A, THU K L, et al. Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type specific biology[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10423. doi:10.1038/srep10423.
- [71] SIMON B, KIRKPATRICK J P, ECKHARDT S, et al. Recognition of 2'-O-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein[J]. *Structure*, 2011, 19(2): 172-180. doi:10.1016/j.str.2010.11.015.
- [72] WANG S, WANG Z, TAO R, et al. The potential use of Piwi-interacting RNA biomarkers in forensic body fluid identification: A proof-of-principle study[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, 39: 129-135. doi:10.1016/j.fsigen.2019.01.002.

- [73] WANG S, WANG Z, TAO R, et al. Expression profile analysis of Piwi-interacting RNA in forensically relevant biological fluids[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, 42: 171-180. doi:10.1016/j.fsigen.2019.07.015.
- [74] MAYES C, SEASHOLS-WILLIAMS S, HUGHES-STAMM S. A capillary electrophoresis method for identifying forensically relevant body fluids using miRNAs[J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2018, 30: 1-4. doi:10.1016/j.legalmed.2017.10.013.
- [75] HAAS C, KLESSER B, MAAKE C, et al. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2009, 3(2): 80-88. doi:10.1016/j.fsigen.2008.11.003.
- [76] 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[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, 6(5): 565-577. doi:10.1016/j.fsigen.2012.01.009.
- [77] JUUSOLA J, BALLANTYNE J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR[J]. *J Forensic Sci*, 2007, 52(6): 1252-1262. doi:10.1111/j.1556-4029.2007.00550.x.
- [78] HAAS C, MUHEIM C, KRATZER A, et al. mRNA profiling for the identification of sperm and seminal plasma[J]. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*, 2009, 2(1): 534-535. doi:10.1016/j.fsigss.2009.08.109.
- [79] JAKUBOWSKA J, MACIEJEWSKA A, PAWŁOWSKI R. mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1420: 33-42. doi:10.1007/978-1-4939-3597-0\_3.
- [80] LINDENBERGH A, MAASKANT P, SIJEN T. Implementation of RNA profiling in forensic casework[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, 7(1): 159-166. doi:10.1016/j.fsigen.2012.09.003.
- [81] ROEDER A D, HAAS C. mRNA profiling using a minimum of five mRNA markers per body fluid and a novel scoring method for body fluid identification[J]. *Int J Legal Med*, 2013, 127(4): 707-721. doi:10.1007/s00414-012-0794-3.
- [82] HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, et al. Real time quantitative PCR[J]. *Genome Res*, 1996, 6(10): 986-994. doi:10.1101/gr.6.10.986.
- [83] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [84] WANG Z, LUO H, PAN X, et al. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, 6(3): 419-423. doi:10.1016/j.fsigen.2011.08.008.
- [85] SAUER E, MADEA B, COURTS C. An evidence based strategy for normalization of quantitative PCR data from miRNA expression analysis in forensically relevant body fluids[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2014, 11: 174-181. doi:10.1016/j.fsigen.2014.03.011.
- [86] SIRKER M, FIMMERS R, SCHNEIDER P M, et al. Evaluating the forensic application of 19 target microRNAs as biomarkers in body fluid and tissue identification[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, 27: 41-49. doi:10.1016/j.fsigen.2016.11.012.
- [87] FUJIMOTO S, MANABE S, MORIMOTO C, et al. Optimal small-molecular reference RNA for RT-qPCR-based body fluid identification[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2018, 37: 135-142. doi:10.1016/j.fsigen.2018.08.010.
- [88] WANG S, TAO R, MING T, et al. Expression profile analysis and stability evaluation of 18 small RNAs in the Chinese Han population[J]. *Electrophoresis*, 2020, 41(23): 2021-2028. doi:10.1002/elps.202000058.
- [89] JÄGER A C, ALVAREZ M L, DAVIS C P, et al. Developmental validation of the MiSeq FGx forensic genomics system for targeted next generation sequencing in forensic DNA casework and database laboratories[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, 28: 52-70. doi:10.1016/j.fsigen.2017.01.011.
- [90] KIESLER K M, STEFFEN C R, COBLE M D, et al. Initial assessment of the Precision ID Globalfiler Mixture ID panel on the Ion Torrent S5XL DNA sequencer and Converge v2.0 software[J]. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*, 2017, 6: e94-e95. doi:10.1016/j.fsigss.2017.09.044.
- [91] VAN DER GAAG K J, DE LEEUW R H, HOOGENBOOM J, et al. Massively parallel sequencing of short tandem repeats -- Population data and mixture analysis results for the PowerSeq™ system[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2016, 24: 86-96. doi:10.1016/j.fsigen.2016.05.016.
- [92] LIN M H, JONES D F, FLEMING R. Transcriptomic analysis of degraded forensic body fluids[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, 17: 35-42. doi:10.1016/j.fsigen.2015.03.005.
- [93] ZUBAKOV D, KOKMEIJER I, RALF A, et al. Towards simultaneous individual and tissue identification: A proof-of-principle study on parallel sequencing of STRs, amelogenin, and mRNAs with the Ion Torrent PGM[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, 17: 122-128. doi:10.1016/j.fsigen.2015.04.002.
- [94] DØRUM G, INGOLD S, HANSON E, et al. Predicting the origin of stains from next generation sequencing mRNA data[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2018, 34: 37-48. doi:10.1016/j.fsigen.2018.01.001.
- [95] ELKINS K M, PEREZ A C U, SWEETIN K C. Rapid and inexpensive species differentiation using

- a multiplex real-time polymerase chain reaction high-resolution melt assay[J]. *Anal Biochem*, 2016, 500: 15-17. doi:10.1016/j.ab.2016.01.013.
- [96] KIESEL B D, ELKINS K M. Development of a PCR high-resolution melt assay for *Artemisia absinthium* (Wormwood) and a triplex assay with two additional “Unregulated Legal High” species *Datura stramonium* (Jimson Weed) and *Merremia tuberosa* (Hawaiian Woodrose)[J]. *J Forensic Sci*, 2019, 64(6): 1817-1822. doi:10.1111/1556-4029.14093.
- [97] BORNA T, SALAMI S A, SHOKRPOUR M. High resolution melting curve analysis revealed SNPs in major cannabinoid genes associated with drug and non-drug types of cannabis[J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2017, 31(4): 839-845. doi:10.1080/13102818.2017.1333456.
- [98] HANSON E K, BALLANTYNE J. Rapid and inexpensive body fluid identification by RNA profiling-based multiplex high resolution melt (HRM) analysis[J]. *F1000Res*, 2013, 2: 281. doi:10.12688/f1000research.2-281.v2.
- [99] KLING D, WELANDER J, TILLMAR A, et al. DNA microarray as a tool in establishing genetic relatedness -- Current status and future prospects[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, 6(3): 322-329. doi:10.1016/j.fsigen.2011.07.007.
- [100] ZUBAKOV D, LIU F, KOKMEIJER I, et al. Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2016, 24: 33-43. doi:10.1016/j.fsigen.2016.05.014.
- [101] GEISS G K, BUMGARNER R E, BIRDITT B, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(3): 317-325. doi:10.1038/nbt1385.
- [102] DANAHER P, WHITE R L, HANSON E K, et al. Facile semi-automated forensic body fluid identification by multiplex solution hybridization of NanoString® barcode probes to specific mRNA targets[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, 14: 18-30. doi:10.1016/j.fsigen.2014.09.005.
- [103] USHIO M, YUI I, YOSHIDA N, et al. Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. *J Med Virol*, 2005, 77(1): 121-127. doi:10.1002/jmv.20424.
- [104] MAHONY J, CHONG S, BULIR D, et al. Development of a sensitive loop-mediated isothermal amplification assay that provides specimen-to-result diagnosis of respiratory syncytial virus infection in 30 minutes[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(8): 2696-2701. doi:10.1128/JCM.00662-13.
- [105] YAMAZAKI W, MIOULET V, MURRAY L, et al. Development and evaluation of multiplex RT-LAMP assays for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus[J]. *J Virol Methods*, 2013, 192(1/2): 18-24. doi:10.1016/j.jviromet.2013.03.018.
- [106] SU C W, LI C Y, LEE J C, et al. A novel application of real-time RT-LAMP for body fluid identification: Using HBB detection as the model[J]. *Forensic Sci Med Pathol*, 2015, 11(2): 208-215. doi:10.1007/s12024-015-9668-6.
- [107] JACKSON K R, LAYNE T, DENT D A, et al. A novel loop-mediated isothermal amplification method for identification of four body fluids with smartphone detection[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2020, 45: 102195. doi:10.1016/j.fsigen.2019.102195.
- [108] HANSON E, INGOLD S, HAAS C, et al. Targeted multiplexed next generation RNA sequencing assay for tissue source determination of forensic samples[J]. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*, 2015, 5: e441-e443. doi:10.1016/j.fsigss.2015.09.175.
- [109] INGOLD S, HAAS C, DØRUM G, et al. Association of a body fluid with a DNA profile by targeted RNA/DNA deep sequencing[J]. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*, 2017, 6: e112-e113. doi:10.1016/j.fsigss.2017.09.037.
- [110] HANSON E, INGOLD S, DØRUM G, et al. Assigning forensic body fluids to DNA donors in mixed samples by targeted RNA/DNA deep sequencing of coding region SNPs using ion torrent technology[J]. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*, 2019, 7(1): 23-24. doi:10.1016/j.fsigss.2019.09.011.
- [111] INGOLD S, DØRUM G, HANSON E, et al. Assigning forensic body fluids to donors in mixed body fluids by targeted RNA/DNA deep sequencing of coding region SNPs[J]. *Int J Leg Med*, 2020, 134(2): 473-485. doi:10.1007/s00414-020-02252-w.
- [112] WANG S, WANG Z, TAO R, et al. Validating the consistency of cSNPs analysis results between DNA and RNA using SNaPshot method[J]. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*, 2019, 7(1): 76-78. doi:10.1016/j.fsigss.2019.09.030.
- [113] LIU Z, GAO Z, WANG J, et al. A method of identifying the blood contributor in mixture stains through detecting blood-specific mRNA polymorphism[J]. *Electrophoresis*, 2020, 41(15): 1364-1373. doi:10.1002/elps.202000053.
- [114] LIU J, CHENG X, LIU F, et al. Identification of coding region SNPs from specific and sensitive mRNA biomarkers for the deconvolution of the semen donor in a body fluid mixture[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2021, 52: 102483. doi:10.1016/j.fsigen.2021.102483.

(收稿日期:2021-07-28)

(本文编辑:刘希玲)

附表1 既往研究中应用于体液鉴定复合检测体系构建的mRNA分子标记

样本类型	基因	基因全称	染色体位置	参考文献	
静脉血	<i>ALAS2</i>	5'-aminolevulinate synthase 2	Xp11.21	[19]	
	<i>ALOX5AP</i>	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	13q12.3	[17,20]	
	<i>ANK1</i>	ankyrin 1	8p11.21	[19]	
	<i>AQP9</i>	aquaporin 9	15q21.3	[17,20]	
	<i>ARHGAP26</i>	Rho GTPase activating protein 26	5q31.3	[17,20]	
	<i>C5AR1</i>	complement C5a receptor 1	19q13.32	[17,20]	
	<i>CASP1</i>	caspase 1	11q22.3	[17,20]	
	<i>CD3G</i>	CD3 gamma subunit of T-cell receptor complex	11q23.3	[19]	
	<i>CD93(C1QR1)</i>	CD93 molecule	20p11.21	[17,20]	
	<i>GYP A</i>	glycophorin A (MNS blood group)	4q31.21	[21]	
	<i>HBA1</i>	hemoglobin subunit alpha 1	16p13.3	[19]	
	<i>HBB</i>	hemoglobin subunit beta	11p15.4	[19]	
	<i>HBD</i>	hemoglobin subunit delta	11p15.4	[22]	
	<i>HMBS(PBGD)</i>	hydroxymethylbilane synthase	11q23.3	[19]	
	<i>JAML(AMICA1)</i>	junction adhesion molecule like	11q23.3	[20]	
	<i>MNDA</i>	myeloid cell nuclear differentiation antigen	1q23.1	[17,20]	
	<i>NCF2</i>	neutrophil cytosolic factor 2	1q25.3	[17,20]	
	<i>PPBP</i>	pro-platelet basic protein	4q13.3	[23]	
	<i>SLC4A1</i>	solute carrier family 4 member 1 (Diego blood group)	17q21.31	[22]	
	<i>SPTB</i>	spectrin beta, erythrocytic	14q23.3	[19]	
	精液	<i>KLK2</i>	kallikrein related peptidase 2	19q13.33	[22]
		<i>KLK3(PSA)</i>	kallikrein related peptidase 3	19q13.33	[24]
		<i>MSMB</i>	microseminoprotein beta	10q11.22	[23]
		<i>PRM1</i>	protamine 1	16p13.13	[25]
		<i>PRM2</i>	protamine 2	16p13.13	[25]
		<i>SEMG1</i>	semenogelin 1	20q13.12	[26]
<i>SEMG2</i>		semenogelin 2	20q13.12	[27]	
<i>TGM4</i>		transglutaminase 4	3p21.31	[21]	
唾液	<i>FDCSP</i>	follicular dendritic cell secreted protein	4q13.3	[23]	
	<i>HTN3</i>	histatin 3	4q13.3	[9]	
	<i>KRT4</i>	keratin 4	12q13.13	[17,20]	
	<i>KRT6A</i>	keratin 6A	12q13.13	[17,20]	
	<i>KRT13</i>	keratin 13	17q21.2	[17,20]	
	<i>MUC7</i>	mucin 7, secreted	4q13.3	[28]	
	<i>PRB1</i>	proline rich protein BstNI subfamily 1	12p13.2	[9]	
	<i>PRB3</i>	proline rich protein BstNI subfamily 3	12p13.2	[9]	
	<i>PRB4</i>	proline rich protein BstNI subfamily 4	12p13.2	[27]	
	<i>PRH2</i>	proline rich protein Hae III subfamily 2	12p13.2	[27]	
	<i>STATH</i>	statherin	4q13.3	[9]	
阴道分泌物	<i>SPRR1A</i>	small proline rich protein 1A	1q21.3	[17,20]	
	<i>CYP2A6</i>	cytochrome P450 family 2 subfamily A member 6	19q13.2	[27]	
	<i>CYP2B7P</i>	cytochrome P450 family 2 subfamily B member 7, pseudogene	19q13.2	[29]	
	<i>DEFB1(HBD1)</i>	defensin beta 1	8p23.1	[25]	
	<i>DKK4</i>	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 4	8p11.21	[27]	
	<i>FAM83D</i>	family with sequence similarity 83 member D	20q11.23	[27]	
	<i>MSLN</i>	mesothelin	16p13.3	[23]	
	<i>MUC4</i>	mucin 4, cell surface associated	3q29	[25]	
	<i>MYOZ1</i>	myozenin 1	10q22.2	[29]	
	月经血	<i>LEFTY2</i>	left-right determination factor 2	1q42.12	[30]
<i>MMP7</i>		matrix metalloproteinase 7	11q22.2	[25]	

续附表 1

Continued Appendix Tab. 1

样本类型	基因	基因全称	染色体位置	参考文献
月经血	<i>MMP10</i>	matrix metalloproteinase 10	11q22.2	[30]
	<i>MMP11</i>	matrix metalloproteinase 11	22q11.23	[21]
	<i>MSX1</i>	msh homeobox 1	4p16.2	[30]
	<i>SFRP4</i>	secreted frizzled related protein 4	7p14.1	[30]
皮肤	<i>CCL27</i>	C-C motif chemokine ligand 27	9p13.3	[18]
	<i>CDSN</i>	corneodesmosin	6p21.33	[31]
	<i>COL17A1</i>	collagen type XVII alpha 1 chain	10q25.1	[27]
	<i>IL37(IL1F7)</i>	interleukin 37	2q14.1	[18]
	<i>KRT77</i>	keratin 77	12q13.13	[27]
	<i>KRT9</i>	keratin 9	17q21.2	[31]
	<i>LCE1C</i>	late cornified envelope 1C	1q21.3	[18]
	<i>LCE1D</i>	late cornified envelope 1D	1q21.3	[18]
	<i>LCE2D</i>	late cornified envelope 2D	1q21.3	[18]
	<i>LOXL2(LOR)</i>	lysyl oxidase like 2	8p21.3	[31]
	<i>SERPINA12</i>	serpin family A member 12	14q32.13	[27]