

Identifiler™ 和 GlobalFiler™ 试剂盒的比较研究

马沁雅¹, 康贵荣²

(1.长治市公安局 刑事技术支队, 山西 长治 046000; 2.朔州市公安局, 山西 朔州 036002)

摘要: 目的 比较 Identifiler™ 和 GlobalFiler™ 试剂盒的各项性能指标。方法 从灵敏度、耐受性、一致性、种属特异性、遗传多态性共五个方面对 Identifiler™ 和 GlobalFiler™ 试剂盒进行检测。结果 GlobalFiler™ 试剂盒在灵敏度、耐受性、遗传多态性方面优于 Identifiler™ 试剂盒, 在一致性、种属特异性方面性能没有明显差异。结论 GlobalFiler™ 试剂盒在陈旧、污染、基因变异的检材进行个体识别、亲缘鉴定中有更为广泛的应用价值。

关键词: 法医物证学; STR 分型; Identifiler™ 试剂盒; GlobalFiler™ 试剂盒

中图分类号: DF795.4 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-2072.2017.04.008

文章编号: 1671-2072-(2017)04-0043-05

Comparative Study of Identifiler™ and GlobalFiler™ Kit

MA Qin-ya¹, KANG Gui-rong²

(1. Institute of Forensic Science, Changzhi Public Security Bureau, Changzhi 046000, China; 2. Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

Abstract: **Objective** To compare the capability of Identifiler™ and GlobalFiler™ kits. **Method** Parallel control study on the sensitivity, survivability, consistency, species specificity, and genetic polymorphism of the two kits were carried out. **Results** The GlobalFiler™ system exhibited better robustness than the Identifiler™ kit in sensitivity, survivability and genetic polymorphism. There was no significant difference in consistency and species specificity of the two kits at each mass of DNA amplified. **Conclusion** GlobalFiler™ kit has a wider application than Identifiler™ kit in the identification and paternity test for old, polluted or genetic mutated samples.

Keywords: forensic biology; STR genotyping; Identifiler™ kit; GlobalFiler™ kit

近年来,STR 分型技术已成为法庭科学的主要技术手段之一。目前,国内实验室常用 Identifiler™ 试剂盒进行个体识别,单次 PCR 反应可扩增 15 个常染色体 STR 基因座和 1 个性染色体基因座,在法医物证学的各种生物检材提取中得到了广泛应用,但实际检案中的某些污染、陈旧、微量检材,该试剂盒的检测效果不太理想。GlobalFiler™ 试剂盒是美国 Life Technologies 公司研发的六色荧光标记的 STR 复合扩增试剂盒,比其上一代 Identifiler™ 试剂盒增加了 2 个 Y 染色体 STR 基因座 *Y indel*、*DYS391* 及 6 个常染色 STR 基因座 *D22S1045*、*D2S441*、*SE33*、

DIS1656、*D10S1248*、*D12S391*, 单次扩增可同时检测 24 个 STR 基因座,从而提高了非父排除率和个体识别率^[1]。笔者对山西汉族 1 500 名无关个体分别用这两种试剂盒进行检测,为法医学检案中针对不同特点的检材进行试剂盒的选择提供指导。

1 材料与方法

1.1 样品来源

1 500 名无关个体均来自于籍贯为山西汉族无亲缘关系的志愿者,标准品 9947A、9948(美国 AB 公司)。常见动物血采自小鼠、猪、犬、牛、羊、马、猫、鸡、鸭、兔、鱼。常见检材血痕、精斑、唾液斑(烟蒂)、脱落细胞(指纹、衣领拭子等)、肌肉组织、骨骼、毛发(带毛囊)DNA 来源于日常检案积累。

收稿日期: 2015-12-10

作者简介: 马沁雅(1982—),女,主检法医师,硕士,主要从事法医物证、伤情鉴定工作。E-mail: maqinya1982@sohu.com。

1.2 PCR 扩增

根据 Identifiler™ 和 GlobalFiler™ 试剂盒说明书对样品进行扩增。PCR 扩增参数:96℃ 60s;95℃ 10s, 60℃ 80s,共 30 个循环;62℃ 10min;4℃ 恒温保存。扩增产物经 3500XL 型分析仪进行检测, GeneMapperID-X 软件对数据进行分析。

1.3 性能指标验证

1.3.1 灵敏度测试

取 1000、250、125、62.5 pg 的 DNA 模板量,分别用两种试剂盒进行平行 PCR 扩增 9947A,并重复 1 次。

1.3.2 耐受性测试

取 1 ng 模板量的 9947A 分别加入血红素,使其终浓度达到 5、10、20、40 μmol/L,分别用两种试剂盒进行 PCR 扩增检测,并平行重复 3 次。

1.3.3 STR 分型结果一致性测试

取同一个体的血痕、精斑、唾液斑(烟蒂)、脱落细胞(指纹、衣领拭子等)、肌肉组织、骨骼、毛发(带毛囊)DNA,用两种试剂盒在两台 9700 型 PCR 扩增仪平行扩增检测。

1.3.4 种属特异性测试

常见动物马、犬、猪、牛、羊、猫、鸡、鸭、鼠、兔、鱼

DNA 和大肠杆菌 DNA,各取 1 μL 进行检测。

1.3.5 遗传多态性调查

1 500 名无关个体血样采用 9700 型 PCR 扩增仪和 3500XL 遗传分析仪进行检测,分析 GlobalFiler™ 试剂盒 21 个常染色体 STR 基因座遗传学参数,并进行统计分析。

2 结果

2.1 灵敏度

两种试剂盒在 125 pg 的模板量都得到了完整的 STR 分型结果,当 62.5 pg 模板量时,Identifiler™ 试剂盒等位基因检出率为 89%,GlobalFiler™ 试剂盒等位基因检出率为 92%,说明 GlobalFiler™ 试剂盒灵敏度高于 Identifiler™ 试剂盒^[2](图 1)。

2.2 耐受性

GlobalFiler™ 试剂盒在抑制剂血红素含量在 5、10、20、40 μmol/L 时均能得到完整的 DNA 分型结果;Identifiler™ 试剂盒在抑制剂血红素的加入量为 20 μmol/L 时扩增图谱中 FGA 等 4 个大片段基因座等位基因分型结果均出现缺失或部分缺失,加入量为 40 μmol/L 时,只检出 6~9 个小片段 STR 基因座,该试剂盒的扩增受到抑制(图 2)。

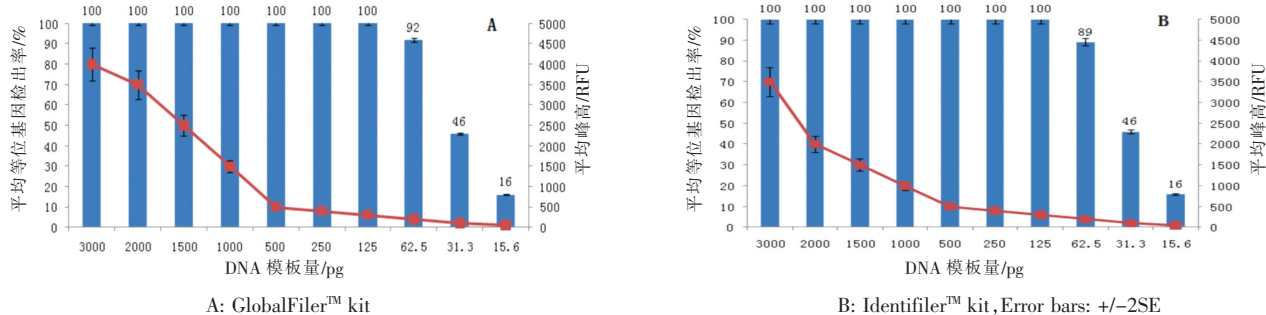


图 1 两种试剂盒的灵敏度检测结果

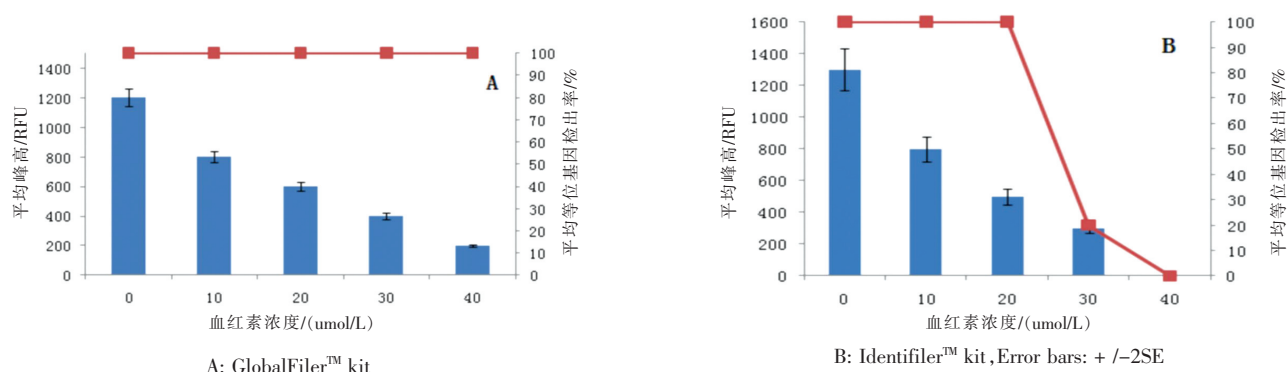


图 2 不同浓度血红素对两种试剂盒的影响

2.3 一致性

1 500 例无关个体 DNA 分别用两种试剂盒进行 PCR 反应,STR 分型检验结果一致,Identifiler™ 试剂盒的检验结果均未见非特异性扩增条带,Global-Filer™ 试剂盒有 160 例在某些基因座出现非特异性扩增条带。

2.4 种属特异性

对常见动物小鼠、猪、犬、牛、羊、马、猫、鸡、鸭、兔、鱼的 DNA 样本进行扩增检测,两种试剂盒 STR 分型检验均无扩增产物,说明这两种试剂盒均有较好的种属特异性。

2.5 遗传多态性

1 500 名无关个体 21 个 STR 基因座共检测出

255 个等位基因,889 种基因型。经 χ^2 检验,所有基因座基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。山西汉族人群 STR 基因座等位基因及其频率分布见表 1(本文仅列出该试剂盒特有的 6 个常染色体 STR 基因座的等位基因频率),21 个常染色体 STR 基因座遗传学参数见表 2。山西汉族人群 21 个 STR 基因座 H_o 值分布在 0.569~0.925,DP 值在 0.774~0.984,PE 值在 0.254~0.866,PIC 值在 0.527~0.952,CDP 为 0.999 999 999 999 999 999 999 657,CPE 为 0.999 999 998 366,说明 GlobalFiler™ 试剂盒比 Identifiler™ 试剂盒具有更强的个体识别能力和家系鉴定能力^[3]。

表 1 山西汉族人群 6 个 STR 基因座等位基因频率分布 (n=1 500)

D2S441		SE33				D12S391		DIS1656	
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
9	0.027	13	0.003	23.2	0.030	15	0.012	8	0.001
9.1	0.002	14	0.008	24	0.001	16	0.012	10	0.002
10	0.252	14.3	0.002	24.2	0.058	17	0.093	11	0.064
11	0.324	15	0.014	25.2	0.067	17.3	0.001	12	0.033
11.3	0.035	16	0.018	26.2	0.071	18	0.224	13	0.086
12	0.190	17	0.029	27.2	0.063	19	0.208	14	0.074
13	0.020	18	0.062	28	0.002	20	0.164	14.3	0.004
14	0.132	18.2	0.002	28.2	0.075	21	0.122	15	0.286
15	0.013	19	0.094	29.2	0.075	22	0.067	16	0.260
16	0.002	19.2	0.002	30	0.002	23	0.055	16.3	0.007
24	0.004	20	0.065	30.2	0.051	24	0.028	17	0.086
D22S1045		20.2	0.014	31.2	0.044	25	0.004	17.3	0.051
等位基因	频率	21	0.049	32.2	0.018	26	0.006	18	0.017
11	0.251	21.2	0.021	33.2	0.005			18.3	0.021
12	0.002	22	0.011	34.2	0.002			19.3	0.006
13	0.005	22.2	0.035	35.2	0.002			20.3	0.001
14	0.006	23	0.003						
15	0.268	D10S1248							
16	0.254	等位基因	频率	等位基因	频率				
17	0.185	10	0.004	14	0.232				
18	0.023	11	0.005	15	0.197				
19	0.004	12	0.069	16	0.097				
		13	0.386	17	0.011				

表 2 山西汉族人群 21 个 STR 基因座群体遗传学参数 (n=1 500)

基因座	DP	PE	PIC	Ho	He	P
<i>D3S1358</i>	0.862	0.483	0.667	0.741	0.717	0.501
<i>vWA</i>	0.931	0.598	0.769	0.792	0.797	0.996
<i>D16S539</i>	0.921	0.557	0.755	0.781	0.786	0.552
<i>CSF1PO</i>	0.884	0.463	0.681	0.726	0.734	0.648
<i>TPOX</i>	0.774	0.254	0.527	0.569	0.604	0.103
<i>D8S1179</i>	0.952	0.712	0.821	0.859	0.841	0.378
<i>D21S11</i>	0.937	0.657	0.787	0.815	0.807	0.360
<i>D18S51</i>	0.968	0.710	0.853	0.861	0.866	0.528
<i>D2S441</i>	0.912	0.593	0.743	0.783	0.774	0.397
<i>D19S433</i>	0.934	0.621	0.777	0.803	0.804	0.671
<i>TH01</i>	0.822	0.342	0.595	0.652	0.644	0.960
<i>FGA</i>	0.965	0.758	0.851	0.877	0.862	0.389
<i>D22S1045</i>	0.901	0.593	0.725	0.859	0.766	0.162
<i>D5S818</i>	0.918	0.526	0.745	0.754	0.779	0.358
<i>D13S317</i>	0.920	0.625	0.763	0.805	0.795	0.359
<i>D7S820</i>	0.909	0.579	0.738	0.780	0.772	0.457
<i>SE33</i>	0.984	0.866	0.952	0.925	0.945	0.647
<i>D10S1248</i>	0.897	0.466	0.701	0.725	0.741	0.271
<i>D1S1656</i>	0.948	0.643	0.802	0.817	0.824	0.988
<i>D12S391</i>	0.953	0.751	0.826	0.869	0.842	0.085
<i>D2S1338</i>	0.962	0.703	0.845	0.853	0.867	0.622

3 讨论

当前 DNA 检验试剂盒的研发技术在近年来取得了突飞猛进的发展,可以根据检验需要选取不同特点的试剂盒^[4]。本研究结果显示,Identifiler™ 和 GlobalFiler™ 试剂盒对于常规检材的检验结果并无差异,GlobalFiler™ 试剂盒扩增时偶见非特异性扩增条带,在 1 500 名无关个体中 GlobalFiler™ 试剂盒有 160 例在某些基因座出现非特异性扩增条带,给后期的数据分析处理带来了不便,在日常检案中的应用受到了一定限制,但在降解、含有抑制剂或基因变异的检材分析处理中优于 Identifiler™ 试剂盒,PCR 反应液经过优化,抗抑制能力强,当 62.5 pg 模板量时 GlobalFiler™ 试剂盒等位基因检出率高于 Identifiler™ 试剂盒等位基因检出率 2%,在抑制剂血红素含量在 40 μmol/L 时均能得到完整的 DNA 分型结

果,具有较高的灵敏性、耐受性,且遗传多态性程度高于 Identifiler™ 试剂盒,该试剂盒针对男性个体新增的 *Y indel* 和 *DYS391* 基因座可避免 Y 片段缺失引起的性别误判,扩增速度快,可结合高通量测序仪及时获取大量数据。

综上,这两种试剂盒在相同基因座分型结果一致,均有较好的种属特异性。Identifiler™ 试剂盒扩增结果非特异性产物较少,结果易于分析,在常规检材的日常检案中应用更为广泛。但在灵敏性、耐受性方面,GlobalFiler™ 试剂盒优于 Identifiler™ 试剂盒,单次检验可得到 21 个常染色体、3 个 Y 染色体 STR 分型结果,提高了 DNA 数据库的兼容性,实现更有效的国际数据共享。且 PCR 反应液经过优化,对于降解、含有抑制剂或基因变异的检材等疑难检材具有更高的应用价值^[5]。在日常检案中,不同试剂盒的应用应根据检材情况的特点进行选择,以获取更为

科学、准确的 DNA 数据,从而在侦查破案中更好地发挥 DNA 检验技术无可替代的特殊作用。

参考文献:

- [1] 朱传红,周翔,邵毅,等.湖北地区汉族人群 24 个 Y-STR 基因座遗传多态性研究[J]. 刑事技术,2014,(1):16-22.
- [2] 吴微微,郝宏蕾,林锦锋,等.3 种国产化试剂盒与 Identifiler™ 试剂盒检验结果比较[J]. 中国法医学杂志,2011,(1):45-47.
- [3] 焦伟,刘斐,黎海澜,等.16 个 Y-STR 基因座在广西苗族、瑶族、侗族人群中的遗传多态性[J]. 法医学杂志,2012,28(5): 355-358.
- [4] Ambrosio B, Novelletto A, Hernandez C, *et al.* Y-STR Genetic Diversity in Autochthonous Andalusians from Huelva and Granada Provines (Spain)[J]. Forensic Sci Int Genet, 2012,6(2):66-71.
- [5] Laouina A, El Houate B, Yahia H, *et al.* Allele Frequencies and Population Data for 17 Y-STR Loci (The AmpFISTR® Y-filer™) in Casablanca Resident Population[J]. Forensic Sci Int Genet, 2011,5(1):1-3.

(本文编辑:李成涛)