

· 论 著 ·

Identifiler 体系在 276 例单亲亲权鉴定中的应用分析

胡锡阶^{1,2}, 万卫红^{1,2}, 陈代雄^{1,2}, 余丽梅^{1,2}, 刘金伟^{1,2}

(遵义医学院附属医院; 1. 贵州省细胞工程重点实验室; 2. 法医学鉴定中心法医物证鉴定技术室, 贵州遵义 563003)

摘要:目的 探讨 Identifiler 体系在单亲亲权鉴定案例中的应用价值。方法 采用荧光标记 STR-PCR 复合扩增、毛细管电泳基因分型技术, 应用 3100 Avant 遗传分析仪对 276 例单亲亲权鉴定的个体进行 15 个短串联重复序列 (STR) 基因座的基因分型。结果 在 276 例的单亲亲权鉴定中, 认定亲权关系 199 例, 占 72.10%, 其中亲权指数 (CPI) ≥ 2000 , 父权相对机会 (RCP) $\geq 99.95\%$ 有 183 例, 13 例 CPI < 2000 , 3 例出现一个基因座单步突变; 排除亲权关系 77 例, 占 27.90%, 其中 2 例只出现 1~2 个不符合遗传规律基因座, 通过加测母亲样本, 排除指标均大于 3 个。结论 应用 Identifiler 体系的 15 个 STR 基因座对常规单亲亲权案例能成功地开展鉴定分析工作, 但当 CPI < 2000 或有 1~2 不符合遗传规律基因座时, 须增加检测基因座和加测母亲样本, 以提高亲权指数或增加排除指标, 规避可能的错误鉴定结论。

关键词: Identifiler; 短串联重复序列; 单亲亲权鉴定; 突变

中图分类号: R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)09-1063-03

Usefulness of Identifiler system in 276 cases of duo paternity testing

HU Xi-jie^{1,2}, WAN Wei-hong^{1,2}, CHEN Dai-xiong^{1,2}, et al.

(1. Key Laboratory of Cell Engineering in Guizhou Province; 2. Department of Forensic Biological Evidence Center of Medicolegal Expertise, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To analyze the application value of Identifiler kit in duo paternity testing. **Methods** The technique of fluorescent dye labeling multiplex STR-PCR and capillary electrophoresis and DNA sequencer GeneScan, Genotyping of 15 short tandem repeat (STR) were adopted in genotyping a sample of individuals in 276 cases parentage testing by using 3100 Avant. **Results** Among 276 cases of duo parentage testing, 199 cases of determined paternal relation were 72.10% in all cases, and cumulative paternity index (CPI) was 2000 or more than 2000. In 183 cases, the relative chance of paternity (RCP) was 99.95% or more than 99.95%. And CPI of 13 case was small than 2000, 3 cases had a step mutation of a gene locus. 77 cases were excluded paternity relationship. The percentage was 27.9% in all cases. 2 cases had one to two loci incoordinated genetic law in these exclusive cases, then exclusive indexes were more than three items by additional detecting mother's sample. **Conclusion** Using Identifiler system of 15 STR loci can successfully analyze duo paternity testing. But worth of watching, when CPI is small than 2000 or having 1-2 incoordinate gene loci, we must add to determine more loci or sample of mother for improving CPI or exclusive index, and then avoiding error identification conclusion.

Key words: Identifiler; STR; duo parentage testing; mutation

短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 是目前亲权鉴定和个体识别中应用最广泛的多态性遗传标志, 其多重 PCR 扩增与荧光检测技术所具有的高灵敏度、高精度是其他方法所无法比拟的, 因而在医学和法医学领域被广泛应用^[1]。本鉴定中心使用美国 ABI 公司 Identifiler 体系的 15 个 STR 基因座对 276 例单亲亲权鉴定案例进行了鉴定, 现总结分析如下。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 Mastercycler 梯度 PCR 仪 (Eppendorf, Germany), 3100 Avant 型遗传分析仪 (ABI, USA); DNA 提取试剂 Generation Capture Column 购自 Qiagen 公司; 扩增试剂使用美国 ABI 公司的产品 AmpFISTR[®] Identifiler[™] PCR Amplification kit, 内标为 500LIZ[™]。

1.2 标本来源 受检样品来自遵义医学院附属医院法医学鉴定中心 2005~2008 年受理承办的亲子鉴定案件, 于遵义医学院附属医院中心注射室现场采取静脉血 1 mL, EDTA-K₂ 抗凝, 除提取 DNA 模板和制作血卡留样外, 剩余检样按生物安全要求处理。

1.3 方法 模板 DNA 的提取及 PCR 扩增按试剂盒说明书严

格进行操作。取 5 μ L 提取液稀释 200 倍的 DNA 模板 (浓度约 0.05 ng/ μ L), 对 15 个 STR 基因座 (D8S1179、D21S11、D7S820、CSF1PO、D3S1358、TH01、D13S317、D16S539D、2S1338、D19S433、VWA、TPOX、D18S51、D5S818、FGA) 和 1 个性别基因座 Amelogenin 按 Identifiler 技术手册所给条件进行 PCR 复合扩增, PCR 反应总体积 25 μ L: Re-mix 液 10 μ L, Primerset 液 5 μ L, GoldTaq 酶 0.5 μ L, 模板 DNA 10 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 11 min; (94 $^{\circ}$ C, 1 min, 59 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min) \times 28 个循环; 60 $^{\circ}$ C, 60 min, 4 $^{\circ}$ C, ∞ 。取扩增产物 1.0 μ L 加入 Hi-D 加酰胺 8.7 μ L 和 GeneScan-500LIZ 0.3 μ L, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 随即冰浴 3 min; 扩增产物在 3100 Avant 遗传分析仪上进行电泳, 电泳信息由 Data Collection 数据收集软件自动收集, 并通过 GeneScan3.7 软件处理成数据信息, 根据 500LIZ 内标计算 DNA 扩增片段碱基长度, 采用 Genotyper 3.7 软件进行基因分型。

1.4 数据处理 根据 15 个 STR 基因座的基因频率, 参照文献^[1]的方法计算各案例的累积亲子关系指数 (cumulative of paternity index, CPI) 和父权相对机会 (relative chance of paternity, RCP)。以 CPI 和 RCP 作为判断依据^[2]: 若 CPI ≥ 2000 ,

RCP \geq 99.95%,则认定两者之间存在亲生血缘关系;若 CPI $<$ 0.000 1,且排除指标(不符合遗传规律基因座)大于或等于 3,则排除存在亲生血缘关系。当 15 个 STR 基因座均符合遗传规律,但 CPI $<$ 2 000,或出现 1~2 个排除指标时,应增加生母样本或增加检测基因座,综合判定鉴定结果。

2 结 果

2.1 单亲亲子鉴定结果分析 276 例单亲鉴定案中,肯定亲子关系 199 例,排除亲子关系 77 例,分析见表 1。在肯定亲子关系的 199 个案例中,应用 Identifiler 体系的 15 个 STR 基因座检测时,其平均 CPI 值为 3 593 087.365,平均 RCP 为 99.999 972 2%,有 16 例不能直接得出肯定的结论,通过加测基因座和加测母亲样本,CPI \geq 2 000 后,做出肯定亲权关系的结论,其中 3 例,按文献[3]的方法判断为基因的单步突变(增加或减少一个重复单位),其突变率为 1.09%。在排除亲子关系的 77 个案例中,直接得出排除结论有 75 例,2 例分别存在 1~2 个不符合遗传规律的基因座,通过加测基因座和母亲样本,排除指标大于或等于 3 个基因座后,作出排除结论。

表 1 应用 Identifiler 体系进行 276 例单亲鉴定的结果分析

检测结果	肯定亲子		排除亲子	
	关系例数	/总例数(%)	关系例数	/总例数(%)
CPI \geq 2 000	183	66.30	—	—
CPI $<$ 2 000	13	4.71	—	—
排除指标 \geq 3	—	—	75	27.17
排除指标 $<$ 3	3	1.09	2	0.73
共计	199	72.10	77	27.90

—:表示无数据。

表 2 Identifiler 体系的 15 个 STR 基因座在排除案例中的结果分析

基因座名称	非父检测次数	实际排除次数	观察排除率	理论排除率(PE)*	
				二联体	三联体
D8S1179	77	37	0.480	0.528	0.695
D21S11	77	40	0.520	0.446	0.622
D7S820	77	26	0.312	0.416	0.594
CSF1PO	77	23	0.286	0.332	0.508
D3S1358	77	25	0.325	0.319	0.492
TH01	77	19	0.247	0.267	0.440
D13S317	77	30	0.390	0.419	0.598
D16S539	77	28	0.364	0.389	0.568
D2S1338	77	49	0.636	0.578	0.734
D19S433	77	36	0.486	0.462	0.637
VWA	77	33	0.429	0.416	0.594
TPOX	77	11	0.143	0.203	0.353
D18S51	77	55	0.714	0.546	0.708
D5S818	77	23	0.299	0.400	0.578
FGA	77	48	0.675	0.563	0.722
共计		484			

*:PE 理论值由本实验室等位基因频率(个体数:308)计算而得,二联体累积非父排除率为 0.999 773;三联体累积非父排除率为 0.999 999。

2.2 Identifiler 体系中 STR 基因座的排除率 在 276 例单亲鉴定案中,排除亲子关系的 77 例,占 27.9%,排除指标 3~10 个,其中 3 个基因座排除 3 例,4 个基因座排除 9 例,5 个基因

座排除 16 例,6 个基因座排除 17 例,7 个基因座排除 13 例,8 个基因座排除 8 例,9 个基因座排除 8 例,10 个基因座排除 3 例,共有 484 个基因座排除,平均排除指标为 6.29。15 个 STR 基因座在 77 例排除亲权案例的结果分析见表 2。

STR 基因座的观察排除率为 0.714~0.143,从大到小依次是:FGA、D18S51、D2S1338、D21S11、D8S1179、D19S433、VWA、D13S317、D16S539、D7S820、D3S1358、D5S818、CSF1PO、TH01、TPOX,大多数基因座的排除能力与二联体理论值相近,但都低于三联体理论值,表明在二联体亲子鉴定中,由于缺少双亲一方的遗传信息,非父排除率明显低于三联体,使系统效能有所降低。本文观察到排除能力最高的基因座是 D18S51 和 FGA 基因座,与理论排除率最高是 D2S1338 和 FGA 基因座稍有不同;最低则是 TH01 和 TPOX,与理论排除率相同,但与黄霞等[4]报道最低是 TPOX 和 CSF1PO 有所差异。

2.3 基因座突变分析结果 276 例单亲鉴定案中,肯定的 199 例中有 3 例出现 FGA、D18S51 和 D13S317 一个位点不符合遗传规律的基因座,通过加测基因座和加测母亲样本,仍有一个基因座不符合遗传规律,且计算其 CPI \geq 2 000, RCP $>$ 99.95%,故判断为基因的单步突变,分析见表 3。

表 3 3 例突变亲子鉴定情况

案例编号	突变基因座	父	子	母(补测样本)	突变等位基因
002	FGA	23.2/25	22.0/24.5	22.0/22	25.0 \rightarrow 24.5
058	D18S51	13.0/26	21.0/25	15.0/21	26.0 \rightarrow 25
073	D13S317	9.0/9	10.0/10	8.0/10	9.0 \rightarrow 10

3 讨 论

美国 ABI 公司 AmpFlSTR[®] Identifiler[™] 试剂盒,是国际通用的商品化试剂盒,有其标准化操作规程、良好的质量控制和保证体系,重复性好,检测灵敏度高,可对 0.5~1 ng 范围的 DNA 样品进行 STR 检验,能为结果的稳定可靠提供一定的保障。该试剂盒除涵盖 13 个 CODIS 核心 STR 基因座外,还包括 2 个四核苷酸重复基因座 D2S1338 和 D19S433,且引入了五色荧光检测和非核苷酸连接物修正迁移率两项新技术,不但使 STR 分型效果更好,而且使遗传标记增加到 15 个,其 CPE 已达到 0.999 9,系统效能可满足常规亲子鉴定三联体和二联体需求[3]。本文所涉及的 276 例单亲鉴定案件也进一步证实,在肯定的 199 个鉴定案例中,有 183 例 CPI \geq 2 000,可得到明确的肯定结论,占认定案例的 91.96%;在排除的 77 个鉴定案例中,有 75 例排除指标大于或等于 3,可得到明确的排除结论,占排除案例的 97.40%。

对于中国这样一个人口众多的群体,在应用 Identifiler 体系的 15 个 STR 基因座进行亲权鉴定时,有一定的局限性,单亲亲权鉴定显得尤为突出。276 例单亲鉴定案件中,就有 13 例 CPI $<$ 2 000,达不到认定标准,有 5 例存在 1~2 个不符合遗传规律基因座,无法作出肯定或排除的结论,通过加测母亲样本和加测基因座,当 CPI \geq 2 000 或排除指标大于或等于 3 个基因座时,最终作出肯定或排除的结论。作者用美国 Promega 公司的 PowerPlex16 体系来作进一步检测,使 STR 分型基因座达到 17 个,不但增加了遗传标记 Penta D 和 Penta E,还可以验证与 Identifiler 体系相同基因座 STR 分型的准确性。通过 Identifiler 体系中 15 个 STR 基因座的排除率的分析可以观察到,TH01、TPOX 基因座的实际排除能力和理论排除率都较

低,其多态性在整个试剂盒中起的作用有限。目前 ABI 公司已推出新的 Sinofiler 商品化试剂盒, Identifiler 体系中的 TH01、TPOX 基因座被新试剂盒中的 D12S91、D6S1043 基因座所替换,林源等^[5]的研究显示,对不排除的二联体案例,使用 Sinofiler 检测的数据结果可得到较高的 CPI 值,对中国汉族人群的亲权鉴定具有极高的使用价值。另外,亲权指数 CPI 值不仅与遗传标记数有关,还与不同人群等位基因频率的计算有关,且在部分亲权鉴定案中有很大的差异^[6],本地区群体的等位基因频率是否会影响 CPI 值的高低,也有待对 STR 分型数据的进一步积累、整理和分析。总之,对于单亲亲子鉴定,应比三联体要求更为严格,检测不能少于 15 个 STR 基因座,从而增加鉴定的准确性,减少可能的错误鉴定结论。

突变在遗传学上是一个较常见的现象,一般突变率较高的 STR 基因座都具有高度的多态性,而片段长的等位基因更易发生突变。有资料显示,个别较长的等位基因突变率可高达 11.7%^[7],这在亲权鉴定中是一个不容忽视的风险因素,所以在结果的解释和结论的判断上必须持以慎重和科学的态度。一般认为,STR 产生突变的机制是复制时的模板滑动,突变时产生 1 个重复单位的变化占突变总数的 90% 以上,如超过 1 个重复单位时,则更倾向于排除他们之间有亲生关系^[8]。在作者所检测的案例中,还未遇到 2 个基因座突变和多步突变的案例,虽然有 1 个案例在应用 15 个 STR 基因座进行检测时存在 2 个不符遗传规律基因座,但通过加测基因座和加测母亲样本,排除指标大于 3 个基因座,为此作者作出排除亲子关系的鉴定结论。在所分析的检案中,3 个突变案例都为基因的单步突变,FGA、D18S51 为突变率最高的几个基因座之一,与文献

报道一致^[9],但突变率 1.09% 高于文献资料^[7],这是否与不同地区人群分布有关还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 李莉,柳燕,李成涛,等. 亲权鉴定实验室规范及技术标准建议[J]. 中国司法鉴定,2006,2:30.
- [2] 侯一平. 法医学证学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2004:233.
- [3] 吕德坚,陆惠玲. DNA 亲权鉴定[M]. 广州:暨南大学出版社,2005:234.
- [4] 黄霞,王跃华,王蓉,等. Identifiler 体系在亲子鉴定中的应用分析[J]. 重庆医学,2007,36(21):2138.
- [5] 林源,郭宏,赵珍敏,等. Identifiler 和 Sinofiler 试剂盒在亲权鉴定中的应用与评估[J]. 中国司法鉴定,2008,1:49.
- [6] 吕德坚,刘秋玲,陆惠玲,等. STR 等位基因频率对父权指数的影响[J]. 法医学杂志,2005,21(3):197.
- [7] John MB. 法医 DNA 分型[M]. 侯一平,刘雅诚译. 北京:科学出版社,2007:104.
- [8] 朱运良,黄艳梅,伍新尧. 单亲案亲权鉴定结果判定策略[J]. 法医学杂志,2006,22(4):281.
- [9] 李成涛,郭宏,赵珍敏,等. 亲权鉴定中常用 STR 基因座的基因组学和遗传学分析[J]. 法医学杂志,2008,24(3):214.

(收稿日期:2009-08-12 修回日期:2009-10-20)

(上接第 1062 页)

早而清晰^[7],MRI 和 SPECT 是诊断应力骨折较为敏感的方法,但 MRI 的敏感性和特异性均比 SPECT 高,是检查应力骨折更好的方法^[2]。MRI 的基本序列包括常规 T1WI、T2WI、T2WI 脂肪抑制序列,T1WI 可提供良好的解剖细节,T2WI、T2WI 脂肪抑制对判断骨髓水肿和软组织损伤尤为重要;应力骨折的 MRI 征象主要有:(1)骨髓水肿,最常见征象表现为骨髓腔内斑片状长 T1、长 T2 信号影(图 2、3),范围远超过平片和临床压痛区域,代表骨小梁微骨折;(2)骨膜水肿(图 4),表现为围绕骨皮质周围环形或半环形长 T1、长 T2 信号,厚薄均匀,代表早期骨膜下出血或骨膜反应;(3)骨折线,对于应力骨折有特异性诊断价值,表现为局部骨皮质中断,T1WI 在高信号的骨髓腔内可见线样低信号,T2WI 可见低信号骨皮质断裂呈稍高信号(图 5、6);(4)修复期骨膜反应和骨痂形成,外骨痂表现为局部增厚低信号骨皮质,髓腔明显变窄,内骨痂表现为冠状、矢状位 T2WI 上可见高信号水肿的髓腔内与骨皮质相连的横形低信号带(图 7、8);(5)软组织肿胀表现为骨质周围弥漫性长 T1、长 T2 信号(图 3、6)。上述 MRI 表现中,骨髓水肿、骨膜水肿及软组织肿胀代表应力骨折早期表现;局部骨皮质断裂和内外层骨膜增生代表应力骨折后期表现,这种辨别早期和后期应力骨折能力对临床治疗指导非常重要;另外,MRI 在应力骨折复查、随访及愈合期监测亦有重要意义。虽然平片能显示骨痂形成多少与骨折愈合有关,但作者发现骨痂形成多少与骨髓水肿范全不完全一致,通常 MRI 发现病变范围明显大于平片所见,MRI 见髓腔水肿信号减轻、范围减小或消失预示病情好转或愈合。虽然 MRI 提高了应力性骨折敏感性,但应力骨折的 MRI 表现缺乏特异性,易误诊为急性化脓性骨髓

炎、慢性硬化性骨髓炎、骨肉瘤和骨样骨瘤,需进一步结合临床病史及职业史才能做出诊断。

总之,MRI 能够发现早期平片无阳性表现的应力性骨折,对早期诊断有很大价值,对临床治疗和预后判断有很大帮助,应作为应力性骨折的首选检查方法。

参考文献:

- [1] 刘峰,徐龙江,杨海涛,等. 疲劳骨折 68 例临床调查分析[J]. 实用骨科杂志,1999,5(2):127
- [2] Gaeta M, Minutoli F, Scribano E, et al. CT and MRI findings in athletes with early Tibial stress injuries: comparison with bone scintigraphy and emphasis on cortical abnormalities[J]. Radiology, 2005, 235:553.
- [3] Silverberg SG. Principles and practice of surgical pathology[M]. New York: John Wiley Sons, 1983:383.
- [4] 李勇刚,王仁法,张景锋,等. 应力性骨折的影像学诊断[J]. 中华放射学杂志,2005,39(1):72.
- [5] 刘进海,刘保和. 疲劳骨折的生物力学机制浅析[J]. 中国骨科杂志,1996,16(12):794.
- [6] 赵岩,赵奇峰. 10 例股骨下端疲劳骨折的生物力学探讨[J]. 天津医科大学学报,2000,6(1):118.
- [7] Feydy A, Drape J, Beret E, et al. Longitudinal stress fractures of the tibia: comparative study of CT and MR imaging[J]. Eur Radiol, 1998, 8:598.

(收稿日期:2009-08-25 修回日期:2009-09-28)