

# 新一代测序技术在法医遗传学中的应用

肖皓月

南京康宁司法鉴定中心 江苏 南京 210000

**【摘要】:** 随着分子生物学和基础医学不断发展, 新一代测序技术 (next-generation sequencing, NGS) 得到了开发和应用。新一代测序技术是在第一代测序技术上的完善和改造, 具备速度快、灵敏度高、通量高等优势, 能够有效降低成本。随着新一代测序技术的大力发展, 新的分型检测技术和遗传标记被应用于法医遗传学中, 能够为 DNA 多态性检测提供有效参考依据。新一代测序技术结合 STR、SNP 等法医遗传标记, 能够在微量、讲解、混合生物学检材、复杂的亲缘关系鉴定等案件中, 取得更多有效的遗传学信息, 从而增强遗传学鉴定效果, 并且还能扩大 DNA 鉴定技术检测范围。

**【关键词】:** 新一代测序技术; 法医遗传学; DNA; STR 自动分型技术

## The Application of New Generation Sequencing Technology in Forensic Genetics

Haoyue Xiao

Nanjing Kangning Judicial Appraisal Center Jiangsu Nanjing 210000

**Abstract:** With the continuous development of molecular biology and basic medicine, the new generation of sequencing technology (next-generation sequencing, NGS) has been developed and applied. The next generation sequencing technology is the improvement and transformation of the first generation sequencing technology, with the advantages of fast speed, high sensitivity and high throughput, which can effectively reduce the cost. With the vigorous development of next-generation sequencing technology, new subtyping detection technologies and genetic markers have been applied in forensic genetics, which can provide an effective reference basis for DNA polymorphism detection. The new generation sequencing technology combined with STR, SNP and other forensic genetic markers can obtain more effective genetic information in cases such as trace, explanation, mixed biological material and complex kinship identification, so as to enhance the effect of genetic identification, and expand the detection scope of DNA identification technology.

**Keywords:** Next-generation sequencing technology; Forensic genetics; DNA; STR autotyping technology

### 1 前言

随着社会不断发展, 基因组测序技术已经涉及生命科学的各个领域当中, 在一定程度上促进了生命科学和分子生物学的发展。早在 1977 年, 有学者发明了双脱氧核苷酸链终止法, 代表进入了 DNA 测序阶段<sup>[1]</sup>。第一代经典测序技术具有较高的准确性, 已经成为 DNA 检测常用方法, 直接奠定了基因发展基础。但是在应用过程中发现存在较多问题, 比如: 测序成本过高, 效率过低, 直接阻碍测序应用。随着对测序技术不断研究, 新一代测序技术的出现直接弥补了第一代经典测序技术的不足。新一代测序技术又被称为高通量测序技术, 是在第一代经典测序技术上的改良和创新, 具有通量高、速度快、灵敏度高、可定量和成本低等特点<sup>[2]</sup>。新一代测序技术直接转变了基因研究方法, 促进了生命科学领域的发展。法医遗传学采取 DNA 技术能够弥补传统遗传标记鉴别不足, 极大程度提高了法医遗传学鉴定能力<sup>[3]</sup>。随着新一代测序技术不断成熟, 能够联合检测短串联重复序列, 单核苷酸多态性、线粒体 DNA 等多种类型遗传标记, 能够较好的满足 DNA 多态性检测需求, 在微量、降解、混合生物学检材、复杂亲缘关系鉴定等案件中, 能够取得更加全面的遗传学信息。

### 2 新一代测序技术发展概况

第一代测序技术以“Sanger 法”为代表, 实现了测序技

术从无到有的飞跃, 人们借助其完成了“人类基因组草图”, 以及动植物、微生物等模式生物的基因组测序。一代测序经发展实现了自动化, 但总体而言通量低、流程长、成本高, 难以商业化。新测序技术以不可抵挡的势头发展起来。新一代测序技术的起点是 2005 年以来 Roche 454、Illumina GA/HiSeq、Life SOLiD/Ion Torrent、PacBio RS 技术的发明, 新技术使测序通量快速增加, 测序成本极大降低。近年来, 新一代高通量测序在精准医疗领域发挥的作用越来越明显, 在临床领域的研究应用也越来越广泛, 尤其在肿瘤基因测序、遗传病等细分领域尤为明显。随着新一代测序技术包括第二代测序、第三代测序、第四代测序。其中第二代测序技术改变了以往电泳方法, 样本准备、文库建设后, 在大规模平行测序平台上, 利用高效平行方法能够对 DNA 模板进行测序。核心思想一边合成一边测序, 单次运行数据量大, 能够对上百万个 DNA 分子进行测序, 分析。在 2005 年, Roche454 基因测序开始应用, 实现了大规模、实时 DNA 测序。之后较多测序仪开始在市场出现, 提高了测序效果<sup>[4]</sup>。第三代测序技术和第二代不同, 测序前不需要进行 PCR 扩增, 能够直接检测单个原始 DNA 和 RNA 分子, 并且此方法不受扩增不均匀, 碱基错配和缺失等因素影响, 能够有效增强序列测定准确度。和第二代测序平台相比较, 单分子测序通量较高, 准确性也更高, 速度更快, 成本更低。第四代测序技术是在第三代测序基础上的完善, 不依靠荧

光标记系统、化学试剂和生物酶,能够较快的对DNA进行测序。纳米孔测序采取DNA分子经过嵌入直接在脂质双层或者合成聚合物中纳米孔传输。结合不同碱基生产的电信号差异进行测序。由于构建的文库片较短,能够更深层次获取内部碱基序列,从根本上增强对降解、混合检材的分析。

### 3 新一代测序技术在法医遗传学中的应用

自2003年人类基因组计划完成之后,测序技术发展迅猛,多种测序原理产品在市场上出现,接受市场的检验。测序读长不断加长、通量不断提升、时间不断缩短,促进测序成本快速下降,大量基因组序列被破译,测序物种数量和物种多样性与日俱增。新一代测序技术能够快速对全基因组进行测序,对目标区域进行测序深度,利用RNA测序(RNA-Seq)来发现全新的RNA变异和剪接部位,或者在基因表达分析中定量mRNA,分析表观遗传学因素,例如全基因组DNA甲基化和蛋白质-DNA相互作用等。在法医遗传学实践中,传统的测序技术已经较难适应当前鉴定工作需要。和传统测序技术相比较,新一代测序技术具备较多优势:(1)能够实现STR、SNP、mtDNA等多种遗传标记的同时测定,能够获得有效的价值遗传信息。(2)文库建设时能够依靠PCR技术不需要电泳和荧光标记,缩短引物的涉及,提高降解、检材分型成功率。(3)新序列等位基因发现能够增强系统效果,促使更快,更准确的发现线索,得到鉴定结果,为法医案件提供更多思路。

#### 3.1 STR分型

STR为人类基因组中一种长度多态性的DNA序列,是在法医学中个体识别和亲权鉴定应用频率较高的遗传标记,分型技术也是法医物证鉴定的常规技术。目前,国内外较多DNA数据库都建立在STR基因座基础上,选择了高多态性基因座建设美国联合DNA检索系统等<sup>[5]</sup>。目前,STR分型主要利用聚合酶链反应联合毛细管电泳管技术。传统的电泳技术存在局限,比如:只能比较等位基因的片段长度、长度一样序列不同的等位基因无法被识别。核苷酸数量一样的等位基因才能认为同一个等位基因。同样的荧光标记基因座必须要按照扩增片段大小来区别,并未扩增基因座位点很少。STR扩增过程中极易发生骨质滑脱,出现影子峰,直接影响混合样本分型结果。新一代测序技术直接弥补了传统方法的不足,能够显示在相同或者相似长度等位基因中包含的序列信息,主要有重复单位、侧翼序列、序列变异。STR基因座序列分析检测能够观察到更多的等位基因分型,部分基因座等位基因数目会不断增高。除外新一代测序技术检测位点不会受到荧光染料种类的限制。各种基因座片段长度短并且不会受到干扰,能够有效提高降解、腐败生物学检测<sup>[6]</sup>。新一代测序技术应用能够有效分辨个体间等位基因微小差异,获取更加真实序列结构补充STR长度多态性信息,能够直接解决DNA混合样本情况。遗传标记检验将混合样本分型的灵敏度有效提高。

#### 3.2 SNP检测

SNP为基因组中单核苷酸变异导致的DNA序列多态性,一般表现为二等位基因遗传标记。和STR对比,SNP片段扩增产物更短,更加容易扩增,并且还不会出现漏扩情况。采取靶向富集探针能够获取更加全面,准确的信息,能够解决PCR抑制,高度降解导致样本分析困难。

SNP突变率较低,有高度分布密度和遗传稳定能力,相关基因编码的SNP为族源推断的理想遗传标记,能够应用被十分复杂的身份识别、外貌特征识别、复杂亲缘关系鉴定。由于新一代测序技术能够获取更加全面遗传信息,在案件调查中,没有线索,还是能够通过DNA序列数据推测犯罪嫌疑人皮肤、眼睛和毛发颜色等外貌特征,进行个体特征刻画,从而有效判断嫌疑人。有学者发现,微单倍型能够作为替代遗传标记,可以在小于70个核苷酸基因组片段中包含4个或者更多的SNP<sup>[7]</sup>。

#### 3.3 mtDNA检测

mtDNA为细胞核外的DNA,携带编码蛋白质、RNA基因,为基因组人类基因组重要构成部分。mtDNA非编码区中高变序列有个体序列差异,为当前法医DNA序列分析中最集中的区域,应用在DNA检测中能够发挥较明显作用。和细胞核DNA对比分析发现,mtDNA存在拷贝数高、灵敏度高、环状结构稳定等特点。在高度降解、微量骨骼、毛发、指甲等生物检材鉴定中、灾难事故中遇难人员身体的确定和母系亲缘关系鉴定中能够提供参考路线。但是Sanger测序线粒体基因组技术通量更低、成本更高,为确定扩增片段是否符合测试需求,所以在检材质量方面要求格外高<sup>[8]</sup>。对异质性和插入或缺失特殊区域的测序效果不佳。随着NGS技术发展,通量不断增大,直接降低成本,实现了高通量mtDNA全序列快速测序。NGS技术能够有效检测全线粒体基因组,包括高变区HV I和HV II在机体内变异位点。全线粒体基因组测序能够在最大程度上获得线粒体基因组有关信息,从而直接提高mtDNA鉴别能力。mtDNA表现为母系遗传,一般4代之内所有的母系亲属的线粒体基因序列都是一样的<sup>[9]</sup>。采取mtDNA独特的母系遗传方法,结合NGC技术监测犯罪嫌疑人,能够有效缩小案件排查范围,提高办案效率。NGS技术优化直接改进了线粒体基因组的定量分析,能够鉴定不同比例混合样品的mtDNA拷贝数。采取探针获取方法,对全线粒体基因组和426个SNP进行大规模平行测序,能够证明在微量的DNA和降解、腐败的生物检材中,比其他方法优势更大。

### 4 新一代测序技术的展望

新一代测序技术不断发展,在法医遗传学中,不仅可以提高各类遗传标记的鉴别能力,还能扩大检测范围。但是目前新一代检测技术还是存在不足,比如:新一代检测技术在法医学实践中是研究阶段,各种测序平台和法医鉴定检测试剂盒需要进一步验证。新一代测序技术成本虽然已经降低,但是其试剂、设备较贵,也在一定程度上限制了新一代测序技术的发展。目前还没有建立完善的检测技术,也没有行业认定标准。序列测定产生的大量遗传学数据,数据储存、解毒、分析软件和方法并不成熟。新一代测试技术不断发展,还需要更加深入研究,解决当前存在的问题。新一代测序技术的DNA鉴定分析技术势必会不断往更加标准化、自动化、高效化、精确化方向发展。

### 5 结语

综上所述,新一代测序技术在法医遗传学中的应用效果较佳,能够为DNA多态性检测提供有效参考依据。

### 参考文献

- [1] Y Y ,Y R T ,M L , et al. Forensic Application of Next Generation Sequencing Technology in the Typing of Y Chromosome Genetic Markers.[J]. Fa yi xue za zhi,2021,37(1).
- [2] JingBo P ,Min R ,QingFeng C , et al. A 124-plex Microhaplotype Panel Based on Next-generation Sequencing Developed for Forensic Applications.[J]. Scientific reports,2020,10(1).
- [3] 明天悦, 蒋礼蓉, 刘京等. Y 染色体遗传标记的法医学应用及展望 [J]. 刑事技术, 2022,47(04):411-418.
- [4] 张昊, 胡锡阶, 余丽梅. 新一代测序技术在法医遗传学中的应用与研究进展 [J]. 国际遗传学杂志, 2021,44(06):424-430.
- [5] Min K K ,Ri A A ,Tae Y H , et al. Primary small cell thyroid carcinoma combined with poorly differentiated thyroid carcinoma, evidence for a common origin: A case report.[J]. Oncology letters,2023,25(6).
- [6] 陶瑞旸, 董新宇, 陈安琪等. 大规模平行测序技术在 STR 遗传标记检测中的应用进展 [J]. 法医学杂志, 2022,38(02):267-279.
- [7] 杨越, 陶瑞旸, 李敏等. 二代测序技术在 Y 染色体遗传标记分型中的法医学应用 [J]. 法医学杂志, 2021,37(01):91-98.
- [8] Yili C ,Hengxin C ,Hao H , et al. Application of next-generation sequencing on diagnosis of bloodstream infection caused by Mycoplasma hominis in a patient with ANCA-associated vasculitis[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,2023,22(1).
- [9] H Z . [Several issues in interpreting the results of metagenomic next generation sequencing of lower respiratory tract infection].[J]. Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases,2023,46(4).