

DNA 鉴定技术在法科学中的应用

李生斌^{1,2}, 阎春霞¹, 赖江华¹, 汪建², 杨焕明²

(1. 西安交通大学部级法医学重点实验室, 西安 710061;

2. 中国科学院遗传研究所人类基因组中心暨北京华大基因中心, 北京 100101)

摘要: 人类基因组遗传多态现象研究的深入, 导致了法科学领域个体识别和亲权鉴定发生根本性变化。本文就新的遗传标记和各种 DNA 鉴定技术在法科学中的研究进展、应用前景与亟待解决的问题进行了探讨。

关键词: 遗传标记, DNA 多态性, 个体识别, 亲权鉴定

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 0253-977X(2001)02-0157-04

Studies and Applications of DNA-based Identity Test in Forensic Sciences

LI Sheng-bin^{1,2}, YAN Chun-xia¹, LAI Jiang-hua¹, WANG Jian², YANG Huan-ming²

(1. National Laboratory of Forensic Sciences, Xian Jiaotong University, Xian 710061;

2. Human Genome Center & Beijing Genomics Institute, Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: With the study advances on DNA polymorphism of human genome, radical changes have been taking place in forensic individual identification and paternity tests. In this paper, we introduced research progress of new genetic markers, their applications and problems should be solved urgently in the field of DNA-based identity test in forensic sciences.

Key words: genetic markers, DNA polymorphism, individual identification, paternity test

DNA 多态现象和分析技术的应用研究, 给法科学领域个体识别和亲权鉴定带来革命性变化, 在鉴定生物证据方面显示出巨大生命力。研究结果显示, DNA 多态现象的本质就是由于进化过程中各种原因引起染色体中核苷酸排列顺序发生改变, 即产生的 DNA 片段和 DNA 序列在个体内的差异, 并在个体内保持终生不变; 但是 DNA 分析也存在着潜在出错的可能性。本文就目前 DNA 鉴定技术在法科学中的研究进展、应用前景与亟待解决的问题进行探讨, 并将其归结为自动化、新标记、标准化等主要内容。

1 人类遗传标记

人类遗传标记 (genetic markers, GM) 有多种, 如红细胞血型 (ABO、Ph、MN、Kell、Deffy、P 等)、白细胞血型 (HLA-A、-B、-C、-D、-DP、-DQ、-DR 等)、血清蛋白型 (Hp、Gc、Bf、Tf、a-AT、C2、C4 等)、同工酶型 (PGM、EsD、GLOI、ACP、AK、ADA、6PGD、

GPT 等) 这些标记系统在法医个体识别和亲权鉴定中发挥了相当大的作用。但检测这些遗传标记几乎都基于抗原性或电泳行为的差异进行分辨, 蛋白质分子结构的完整性成为检测能否成功的关键因素, 而在法医现场提取的斑痕检材千差万别, 复杂多样, 制约了这类遗传标记在法科学中的应用; 同时这些遗传标记在染色体 DNA 上的位点少, 不能很好地覆盖整个基因组, 在基因定位中也应用有限。20 世纪 70 年代中后期, 分子遗传学迅速崛起, 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[1,2] 分析技术建立, 推动了遗传病基因定位研究及法医 DNA 鉴定技术的发展。80 年代中期人们利用 PCR 技术, 发现和建立了许多可变量串联重复序列 (variable number of tandem repeats, VNTR) 遗传标记基因座^[3-5], 大规模基因组扫描、分型与连锁分析成为遗传病相关基因定位研究中常用的手段。随着研究的深入, 这一系统的不足逐渐显现, 即 VNTR 等位

收稿日期: 1999-12-30; 修回日期: 2001-02-08

基金项目: 国家自然科学基金 (39670399, 39200141) 资助项目

作者简介: 李生斌 (1958-), 男, 教授, 博士。专业方向: 法医学及分子生物学; 目前在中科院遗传所人类基因组中心从事博士后研究。

Tel (010) 64851564 Fax (010) 64889329 E-mail: shbinlee@hotmail.com

基因数量多,片段大小差异大,实验室自行构建等位基因分型标准物较困难,用分子质量标准物测算样本片段大小确定等位基因常产生误差而出现分型失误。90年代初,微卫星标记物(microsatellite markers)被大量发现和建立,它们表现为2、3或4个核苷酸的串联重复,也称之为短串联重复序列(short tandem repeats, STR)^[6,7]广泛地分布于人类基因组中,数目丰富,符合孟德尔遗传规则,为连锁分析提供足够的遗传信息;利用PCR及电泳检测相对容易,成为目前基因定位和法医个体识别方面应用较多的遗传标记^[7,8],是大规模基因组扫描的基础。随着人类基因组计划研究的进展,又一类新的遗传标记系统——单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)被分离和应用^[9,10]。SNP即基因组中同一基因座单一碱基的变化,是人类基因组分化的主要形式,以SNP为代表的DNA序列多态性,构成了不同个体之间表型的遗传学基础,也是导致功能蛋白质多态性的基本原理之一。

2 DNA多态性分类

每一个个体在遗传上是不同的,其本质不是在基因产物上,而是在DNA水平上的差异。这些差异大多数是由于蛋白质非编码区和没有重要调节功能的区域发生了中立突变,这些中立突变所构成的DNA变异称为DNA多态性或者DNA型,包括DNA指纹、DNA长度多态性和DNA序列多态性。

2.1 DNA指纹

Jeffrey等^[2,12]于1985年发现多位点探针,并报道了用它分析解决非法移民案例和在法科学中的应用。一种探针同时检测多位点(multilocus)的多态性,如果单用33.15小卫星探针,出现误差的可能性为 $0.12 \times 10^{-11} \sim 2.4 \times 10^{-11}$;当联合采用33.15和33.6两种探针,其误差仅为 5×10^{-19} 。多位点探针RFLP分析技术所产生的DNA谱带恰似手指的纹理样复杂,被广泛称之为DNA指纹(DNA fingerprint)。近年报道的随机扩增DNA多态性(randomly amplified polymorphism of DNA, RAPD)也属于这一类,整个基因组的有关基因全部被扩增,产生无数条扩增产物谱带。

理论上讲,多位点探针检测个体高度差异,正是法医鉴定的目的,但实际应用明显受到限制;主要的问题是灵敏度太低,每做一次DNA指纹需要 $1\mu\text{g}$ 没有降解的大分子DNA,血痕一般为 3cm^2 ,精斑为 2.5cm^2 。接着又出现一系列的问题:(1)混合样本分析后结果的解释,例如在强奸案中的混合斑,同时含有精液和阴道成分;(2)DNA谱带强弱差异可能造成谱带的丢失;(3)酶切不全引起不能检测或者难以检测;(4)外源性DNA(如其他样本)交叉污染;(5)如何计算相配DNA谱带碱基(bp)数量。在千变万化、极其复杂的法医鉴定中,常常需要结果单一的DNA谱带,如果为大量的DNA谱带反而对鉴定是障碍,而不是帮助。Jeffreys首先将多位点探针创造性地引入法医界,是本世界人类鉴定的最大贡献。然而,复杂和众多的DNA谱带相继出现了错误判断结果,因此

不可靠的DNA鉴定方法应当停之^[13]。鉴于以上原因,在法医亲权鉴定和个体识别中,单位点探针荧光检测RFLP多态性的方法^[14]终将取代多位点探针的DNA指纹和RAPD方法。

2.2 DNA长度多态性

自从Fowier等(1988)发现在非编码区蕴藏着比较简单的DNA重复序列以后,有许多相似的DNA多态性被报道,这些非编码区的DNA重复序列,典型地重复几十次或者几千次,产生了VNTR或小卫星,在个体间组成长度的高度差异,例如D1S80、APOB、D17S30、D6S9等,每个基因座的等位基因都是由核心序列和侧翼序列构成,而每一个基因座的等位基因核心序列重复的次数不同,形成在不同个体等位基因DNA片段长度上的差别。

法医鉴定选择VNTR多态性的DNA区应具有高度的杂合性^[5,13]。最初认为数目重复巨大的变异是由于奇数变或复制滑移,最近的研究表明,是在减数分裂中重要的结构发生奇数变化。串联重复顺序的功能尚不清楚,它可能是DNA重组的信号。

2.3 DNA序列的多态性

人类基因组DNA核苷酸序列在个体排列上存在巨大差异,这种差异形成DNA片段序列多态性,随着人类基因组计划即将完成,序列多态性的研究成为新兴热点。斑点杂交、DNA自动测序技术和基因芯片即将成为分析序列多态性的主要方法,例如采用斑点杂交技术分析人类白细胞抗原(HLA-DQ α)、低密度脂蛋白受体位点(LDLL)、血型糖蛋白(GTPA)、血红蛋白球蛋白(HBGG)、D7S8和维生素D结合蛋白(Gc)位点,这些基因座所含有等位基因DNA片段长度都是相同的,而不同的是他们的DNA序列,在每个个体都不相同,通常在已知人群中存在多少种等位基因,就需要多少种相应探针来杂交分型。又例如,对两个独立的染色体比较时,双等位遗传标记(biallelic markers)SNP的平均发现率为千分之一,而特定人群中SNP的总发现率为1/300,研究者估算人类基因组30亿对碱基序列中大约有100~300万个SNP,其数量之丰富,超过既往任何遗传标记,并在基因定位、遗传作图、药物筛选等方面拥有巨大的优势和潜力^[15-17]。鉴于SNP多态性基因座数目之丰富,其分型技术主要依赖于DNA自动测序和基因芯片^[18],特别是高密度DNA芯片在每平方厘米的载体上可以制备1000种之多的探针,极大地提高SNP检测工作效率;又可以实现芯片测序。

3 DNA鉴定技术在法科学中的应用

DNA鉴定技术引入法科学领域后,在生物证据识别方面显示出巨大的威力,与以往的物证鉴定存在着本质不同。过去的侦察和审判常因证据不足而受到困扰,DNA分析也潜在着出错的可能性;对于重大案例,法科学家在生物证据鉴定时仅提供检材DNA谱带,不做DNA的谱带分型分析,且仅用

于个别案例。Jefferys 等应用 DNA RFLP 技术成功地对一例移民案件做出肯定的亲子判断,正确无误地认定了孩子同母亲的亲缘关系^[11]。在随后的几年里,利用这一技术从残留在棉布上长达 4 年之久的血痕和精斑中分离出大分子 DNA,酶切后进行个体识别,而且从混合斑中分离出精子 DNA,正确地鉴定出犯罪嫌疑人,同时洗脱了无辜者,给法科学带来革命性发展。

在法科学 DNA 分析中生物检材的提取至关重要。经常是在数以百计的犯罪现场仅有 10% 的痕迹是有效的生物检材,而提取到当事人的痕迹是做 DNA 分型的先决条件。DNA 分析专家需要明确研究方向,正确的做法首先应对犯罪现场进行勘察(scene investigation);在筛选证据的时候,应依次做确证试验和个体识别,包括传统的血清学方法和 DNA 多态性检验。传统个体识别所采用的血清方法如 ABO、Gm、Km 等遗传系统的综合分析,可获得 1/200 的识别力;另外一些实验室补充 HLA、MN、Kil, Deffy 等遗传标记,使传统个体识别力达到最大限度,采用各类电泳技术分析 PGM、EAP、GLOI、GC、HP、TY 等标记,多个系统联合使用可获得接近 DNA 分析的识别力。但是在实际中由于许多生物检材中蛋白质等大分子降解,很难达到其理论上应有的识别力。随着以 RFLP 和 PCR 为基础的各种扩展方法的建立,DNA 鉴定技术变得越来越容易;有关血型、血清型、同工酶的检验几乎已被取代。然而在法科学应用中,依然面临着大量的不同类型的生物检材如陈旧骨^[19]、混合斑、腐败尸体、毛发等生物检材的提取和分析,正确解决这些问题决定着 DNA 分析的成功与失败。因此进行法医 DNA 遗传标记的应用需具有 3 个条件:DNA 分型方法必须具有 100% 的实用性和可靠性;制定严格的质量控制标准;在众多的疑难案件中,鉴定人必须具备鉴定资格和从事法科学工作的丰富经验。

4 DNA 分型技术的发展方向

随着分子生物学技术在人类基因组测序、人类遗传病、癌症分子诊断,以及生物工程、药物筛选、动植物杂交育种、法医个体识别、亲权鉴定等方面的应用,对其自动化的要求越来越高,同时国际标准化也必将成为现实。

4.1 自动化

4.1.1 DNA 提取仪 能在 1 小时内从几十个样品中提取充足的 DNA,仪器通过蛋白酶降解细胞及酚、氯仿除去非核苷酸物质,并用乙醇沉淀、过滤、收集纯化 DNA。其优点是能同时操作几十个样品,极大地减少了因手工操作造成 DNA 链断裂、易受核苷酸酶污染的问题。发展 DNA 提取仪的方向是采用更简单的方法,能在一个工作日内完成数以百计样品的操作。

4.1.2 DNA 合成仪 能合成 200 bp 寡核苷酸,每次循环约需 12 ~ 15min,它采用一种固体支持物结合核苷酸,加入激活的核苷酸衍生物,合成方向为 3' - 5',经修饰的碱基可参与

到合成链中,这种仪器很适合于大规模合成 DNA 探针。

4.1.3 DNA 扩增仪 采用 PCR 技术,可同时操作数以百计的样品,且在十分钟内可将 DNA 扩增到百万倍。方法简单快速,在许多 DNA 诊断中,充分提高了信号对本底的比重。

4.1.4 DNA 自动测序仪 这种仪器把酶促反应序列分析与 4 色荧光检测与计算机结合起来,能译解出电泳谱带并确定出 DNA 序列和基因分型。

4.1.5 DNA 芯片 1996 年美国加州 Aymetrix 公司的 Steven Fodor 等创造出世界上第一块 DNA 芯片,自其诞生至今短短数年,取得惊人的发展,而且技术不断创新,应用领域不断扩展,包括芯片测序、突变检测、药物筛选、肿瘤分型、传染病诊断、多态性扫描、法医鉴定、环境监测、以及军事领域,芯片技术在多基因疾病定位中尤其凸显出巨大的潜力和诱人的前景^[20,21]。

4.2 新标记

随着基因组研究的发展,新的遗传标记系统及新基因座(如 STR、SNP)将会不断被分离和应用。其分析方法应以简便可靠、快速准确、使用检材量少为标准。新的遗传标记按孟德尔规律遗传,并在群体中具有高度多态性和杂合性。

4.3 教育与培训

在高科技领域里,教育与培训的重要性越来越突出。DNA 鉴定技术能否正确应用于法医实践,培养高素质的专门人才是关键。此外,还应制定统一的质控、试剂、技术、结果分析的国家标准。法医鉴定人应具有应用 DNA 技术解决问题的能力,因此有必要对法医鉴定人建立新科技继续教育体系。

参考文献(References):

- [1] Arlene R W, White R. A highly polymorphic locus in human DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77(11): 6754 ~ 6758.
- [2] Jeffreys AJ, et al. Individual-specific fingerprints of human DNA[J]. Nature, 1985, 316(4): 76 ~ 79.
- [3] Budowle B, et al. Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distribution of allelic data from VNTR loci for use in forensic comparisons[J]. Am J Hum Genet, 1991, 8: 841 ~ 855.
- [4] Bruce B. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE[J]. Am J Hum Gene, 1991, 48(2): 137 ~ 141.
- [5] 李小明, 李生斌. 直接同步扩增 5 种基因位点[J]. 法医学杂志, 1996, 12(2): 65 ~ 66.
- [6] Avraham A, et al. Genetic variation of tree tetramer tandem repeats in fore distinct Israeli ethnic groups[J]. J Forensic Sci, 1999, 44(5): 983 ~ 986.
- [7] 李生斌, 赖江华, 杨焕明, 等. 中国 5 个民族 STR 位点遗传多态性[J]. 遗传学报, 2000, 27(12): 1035 ~ 1041.
- [8] Colette D, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellite[J]. Nature, 1996, 380(14): 794 ~ 801.

- [9] Wan DG , Fan JB , Siao CJ , *et al.* Large - scale identification mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome [J]. *Science* , 1998 , 280 : 1071 ~ 1082 .
- [10] Irizarry K , Kustanovich V , Li C , *et al.* Genome - wide analysis of polymorphisms in human expressed sequences [J]. *Nature Genetics* , 2000 , 26 : 233 ~ 236 .
- [11] Adame DE , *et al.* DNA analysis by restriction fragment length polymorphisms of blood and other body fluid stains subjected to contamination and environmental insults [J]. *J Forensic Sci* , 1991 , 36 : 1284 ~ 1298 .
- [12] Jeffery AJ , Gill P , Edman JC , *et al.* Positive identification of an immigration test case using DNA fingerprints [J]. *Nature* , 1985 , 317 : 818 ~ 822 .
- [13] Stolorow AW , *et al.* International laboratory comparison of autoradiographic DNA profiling measurements [J]. *Anal Chem* , 1996 , 68 : 1944 ~ 1947 .
- [14] 李生斌 , 胡海涛 , 李政道 , 等 . 中国汉族群体 DNA *Hae* III 系统遗传多态性 [J]. *遗传学报* , 2000 , 27 (9) : 753 ~ 761 .
- [15] Mullikin JC , Hunt CG , Cole G , *et al.* An SNP map of human chromosome 22 [J]. *Nature* , 2000 , 407 : 516 ~ 520 .
- [16] Kravayak L . Prospect for whole - genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes [J]. *Nature Genet* , 1999 , 22 : 139 ~ 144 .
- [17] McCarthy JJ , Hillier R . The use of single - nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics [J]. *Nature Biotechnol* , 2000 , 18 : 905 ~ 909 .
- [18] Hacia JC , Fan JB , Ryder O , *et al.* Determination of ancestral alleles for human single nucleotide polymorphisms using high - density oligonucleotide arrays [J]. *Nature Genetics* , 1999 , 22 : 164 ~ 167 .
- [19] 李生斌 , 张改英 , 韩宇 , 等 . 人体硬组织 DNA 遗传多态性的研究 [J]. *西安医科大学学报* , 1996 , 17 (2) : 147 ~ 151 .
- [20] Clewley JP . DNA Microarray [J]. *Commun Dis Public Health* , 2000 , 3 (1) : 71 ~ 73 .
- [21] Thompson M , Furtado LM . High density oligonucleotide and DNA probe arrays for the analysis of target DNA [J]. *Analyst* , 1999 , 124 (8) : 1133 ~ 1136 .