

## 二联体亲子鉴定罕见案例分析及应对策略

郭侃<sup>1</sup>, 付杰文<sup>1</sup>, 宋炳辉<sup>1</sup>, 钱捷<sup>1</sup>, 罗章<sup>1</sup>, 成竞梁<sup>1,2</sup>, 何涛<sup>1,2</sup>, 傅俊江<sup>1,2</sup>

西南医科大学:1.医学基础研究中心 表观遗传与肿瘤四川省高校重点实验室;2.司法鉴定中心 DNA法医物证实验室(泸州 646000)

**【摘要】目的** 对亲子鉴定中二联体罕见案例分析并给出应对策略。**方法** 对罕见案例样本进行DNA提取,使用AGCU EX-22试剂盒进行二联体和三联体检测;使用阅微基因36A试剂盒进行二联体检测。通过遗传测序仪进行电泳分析, GeneMapper ID-X软件进行数据分析得到短串联重复序列(short tandem repeats, STR)图谱和相应的基因座数据,并计算其累积亲权指数。**结果** 采用AGCU EX-22试剂盒进行被检父和孩子二联体鉴定,获得累积亲权指数为 $7.0516 \times 10^2$ ,这个值既大于0.0001又小于10 000。根据《亲权鉴定技术规范》(GB/T 37223-2018),其结果是既不支持、又不能排除被检父为孩子的生物学父亲,不能出具明确的鉴定意见;增加孩子母亲样本,改为三联体鉴定后,使用相同的试剂盒进行鉴定,获得的累积亲权指数为 $2.6327 \times 10^8$ ,大于10 000,支持被检父为孩子的生物学父亲。与此同时,增加STR基因座位点,使用阅微基因36A试剂盒进行被检父和孩子的二联体鉴定,获得累积亲权指数为 $1.0378 \times 10^9$ ,同样大于10 000,亦能出具明确的鉴定意见。**结论** 在二联体亲子鉴定中,通过增加孩子生母做三联体亲子鉴定或者是增加STR位点进行检测,都能提高累积亲权指数,帮助罕见疑难亲子鉴定案例出具明确的鉴定意见。

**【关键词】** 短串联重复序列;二联体亲权鉴定;三联体亲权鉴定;累积亲权指数

**【中图分类号】** D919.2

**文献标志码** A

**DOI:** 10.3969/j.issn.2096-3351.2024.03.010

## Analysis and solution of a rare case of parentage testing of duos

GUO Kan<sup>1</sup>, FU Jiewen<sup>1</sup>, SONG Binghui<sup>1</sup>, QIAN Jie<sup>1</sup>, LUO Zhang<sup>1</sup>, CHEN Jingliang<sup>1,2</sup>, HE Tao<sup>1,2</sup>, FU Junjiang<sup>1,2</sup>

1.Key Laboratory of Epigenetics and Oncology, the Research Center for Preclinical Medicine; 2.Laboratory of Forensic DNA, Judicial Authentication Center, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

**【Abstract】Objective** This study aimed to explore an efficient method in a rare case of parentage testing of duos. **Method** DNA extraction was performed on rare case samples, and parentage testing of duos and trios was performed using AGCU EX-22 Kit, and parentage testing of duos was also performed using Microreader 36A Kit. The electrophoretic analysis was conducted in the genetic analyzer. Then the data were analyzed with GeneMapper ID-X to get STR profiling and corresponding locus data, and the combined parentage index (CPI) was calculated. **Results** Father-child parentage testing of duos was conducted using AGCU EX-22 Kit. The CPI result was  $7.0516 \times 10^2$ , greater than 0.0001 yet less than 10 000. According to the "Specification of Parentage Testing" (GB/T 37223-2018), the CPI result neither supported the conclusion that the tested father was the biological father of the tested child, nor did it eliminate this possibility. Therefore, it was not possible to express a clear opinion on this parentage testing of duos. In this case, the DNA sample of the tested child's mother was added in the parentage testing of duos which was changed into a parentage testing of trios using the same testing kits. The CPI of the revised test was  $2.6327 \times 10^8$ , greater than 10 000. This result was positive that the tested father was the biological father of the tested child and a definite opinion of parentage testing could be issued. At the same time, the number of STR loci was increased and the father-child parentage testing of duos was conducted using the Microreader 36A Test Kit. The CPI value was  $1.0378 \times 10^9$ , greater than 10 000. Thus, a definite parentage opinion could be issued. **Conclusion** In parentage testing of duos, either by adding the child's biological mother for a parentage testing of trios or by adding the STR loci for testing, could improve the CPI and help to produce a definitive identification opinion in rare and difficult parentage testing.

**【Key words】** Short tandem repeats; Parentage testing of duos; Parentage testing of trios; Combined parentage index

短串联重复序列(short tandem repeats, STR)是一类广泛存在于人类基因组中的DNA多态性基因座,又被称为微卫星DNA<sup>[1]</sup>。STR一般是由2~6个碱基对构成的核心序列,呈串联重复排列,基因座位点长度一般在100~300 bp之间<sup>[2]</sup>。因个体间DNA片段长度、重复

序列变异或DNA序列差异,STR呈高度的多态性<sup>[3]</sup>,并在基因传递过程中遵循孟德尔共显性方式遗传给下一代<sup>[4]</sup>。因其基因片段短、扩增效率高、判型准确等,STR已被广泛应用于DNA法医物证的亲子鉴定和犯罪案件的实践中<sup>[5-7]</sup>。

**基金项目:**国家自然科学基金(82073263);泸州市科技计划项目(2021-SYF-37);四川省自然科学基金(2022NSFSC0737)

**通信作者:**傅俊江, E-mail: fujunjiang@swmu.edu.cn

**引用本文:**郭侃,付杰文,宋炳辉.二联体亲子鉴定罕见案例分析及应对策略[J].西南医科大学学报.2024,47(3):231-235.DOI:10.3969/j.issn.2096-3351.2024.03.010.

父亲提供生父基因成为孩子生父的可能性和随机男人提供生父基因成为孩子生父的可能性的比值称为亲权指数(parentage index, PI)。在所检测的各位点之间没有遗传连锁关系的条件下,多个位点的累积PI值即为累积亲权指数(combined parentage index, CPI),等于各个位点PI值的乘积<sup>[8]</sup>。我国《亲权鉴定技术规范》(GB/T 37223-2018)规定,累积亲权指数大于10 000则可肯定亲子关系,小于0.0001则可排除亲子关系;而大于0.0001又小于10 000,则既不能肯定又不能排除亲子关系<sup>[9]</sup>。

近年来,随着我国亲子鉴定的案件数量日趋增多,也遇到了多种多样的疑难<sup>[10]</sup>或罕见问题<sup>[11]</sup>。例如,父女或父子在进行二联体亲权鉴定时,虽然被检父在每一个基因座上都能传递给孩子必须的等位基因,符合孟德尔遗传定律,但是又计算出其累积亲权指数既大于0.0001又小于10 000,根据《亲权鉴定技术规范》(GB/T 37223-2018)既不能排除被检父为孩子的生物学父亲,又不能支持被检父为孩子的生物学父亲,导致无法出具明确的鉴定意见书。针对这一类情况,我们需要选择合适的判断标准和应对策略<sup>[12-13]</sup>。本文对一例典型的二联体亲子鉴定的罕见案例进行了深入的分析并提出应对策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、设备和试剂盒

FTA血卡(成武荣华生物科技有限公司,山东),一次性末梢采血器(施莱医疗器械有限公司,苏州),chelex-100(伯乐公司,美国),HIDI<sup>TM</sup>Formamide(ABI赛默飞世尔科技公司,美国),台式离心机(Thermo Scientific,美国),法医用直径1 mm打孔器(浩源科技有限公司,广州),Veriti<sup>®</sup>热循环仪PCR仪器(ABI赛默飞世尔科技公司,美国),3500 DX基因分析仪(ABI赛默飞世尔科技公司,美国)<sup>[14]</sup>。

AGCU Expressmarker 22试剂盒(AGCU EX-22)(中德美联生物有限技术公司,无锡),该试剂盒包含21个常染色体STR和1个性染色体STR基因座;Microreader<sup>TM</sup> 36A Direct ID System试剂盒(阅微基因36 A)(阅微基因技术股份有限公司,北京),该试剂盒包含36个常染色体STR和3个性染色体STR基因座。上述2个试剂盒均包含13个CODIS(Combined DNA Index System)核心STR基因座。

本研究获得西南医科大学伦理委员会审核批准(批号:KY2021237),所有研究对象签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 血液采取** 酒精棉球对被鉴定人的指尖常规消毒处理后,用FTA血卡采集2~4滴黄豆大小的血迹,自然阴凉干燥,室温运输和保存,或者直接用于下一步

的实验。

**1.2.2 DNA提取** 用打孔器对FTA血卡上的血斑打下两个纸片到EP管中后,加入400  $\mu$ L的灭菌水,静置15 min。然后用离心机12 000 rpm高速离心1 min,去掉上清液,保留纸片。再加入35  $\mu$ L 5% chelex-100,56  $^{\circ}$ C水浴30 min,100  $^{\circ}$ C沸水中煮沸8 min后,用涡旋振荡器剧烈震荡一下,再离心后转移至新的EP管中,用于下一步实验<sup>[15]</sup>。

**1.2.3 PCR扩增** 使用AGCU EX-22试剂盒根据本实验室和试剂公司介绍的方法进行PCR扩增<sup>[15-16]</sup>。使用阅微基因36 A试剂盒进行PCR扩增的反应体系为10  $\mu$ L,其中Microreader TM2.5  $\times$  Master Mix III 4  $\mu$ L, MicroreaderTM36AD 5  $\times$  Primer Mix 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 0.6  $\mu$ L, DNA模板3  $\mu$ L。PCR程序:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性20 s,59  $^{\circ}$ C退火90 s,共28个循环;60  $^{\circ}$ C终延伸60 s;4  $^{\circ}$ C维持保温。

**1.2.4 电泳测序及STR分型分析** 取扩增产物与电泳液混合、变性、冰浴后再至常温,使用ABI 3500 DX基因分析仪行电泳分析,使用GeneMapper ID-X软件行STR分析<sup>[17]</sup>。最后参照《亲权鉴定技术规范》(GB/T 37223-2018)进行结果判定。

## 2 结果

### 2.1 二联体AGCU EX-22检测结果

被检父和孩子使用AGCU EX-22进行二联体亲子鉴定,获得STR分型(图1A、1B)和STR基因座数据(表1)。从图1A、1B和表1中可以看出,被检父在21个基因座位点上都能提供给孩子必须的等位基因,符合孟德尔遗传定律。根据《亲权鉴定技术规范》(GB/T 37223-2018)中二联体亲权鉴定公式,计算出累积亲权指数为 $7.0516 \times 10^2$ ,大于0.0001但又小于10 000,既不能支持被检父为孩子的生物学父亲,也不能排除被检父为孩子的生物学父亲。

### 2.2 三联体AGCU EX-22检测结果

根据二联体亲子鉴定结果,增加孩子母亲样本,使用AGCU EX-22进行三联体亲子鉴定。PCR扩增、电泳测序后进行结果分析,得到孩子母亲STR分型(图1C)和STR基因座数据(表1)。根据表1可计算出三联体累积亲权指数为 $2.6327 \times 10^8$ ,大于10 000。根据《亲权鉴定技术规范》(GB/T 37223-2018)规定,所得结果除了支持孩子母亲为孩子的生物学母亲外,也支持被检父为孩子的生物学父亲。

### 2.3 二联体阅微基因36A检测结果

为了进一步验证被检父和孩子之间的关系,我们还使用阅微基因36A试剂盒进行检测,其包含33个常染色体STR和3个性染色体STR,可增加STR基因座位点信息<sup>[18]</sup>。阅微基因36A拥有AGCU EX-22所有的

STR 基因座,同时增加了 15 个常染色体 STR 基因座,故还可对 AGCU EX-22 取得的结果进行验证。结果显示,两种试剂盒相同基因座中的等位基因结果一致。被检父和孩子使用阅微基因 36A 进行二联体鉴定,分

析后获得 STR 分型图 2(图 2A、2B)和 STR 基因座数据(见表 2),计算得出累积亲权指数为  $1.0378 \times 10^9$ ,大于 10 000。根据上述技术规范,支持被检父为孩子的生物学父亲。

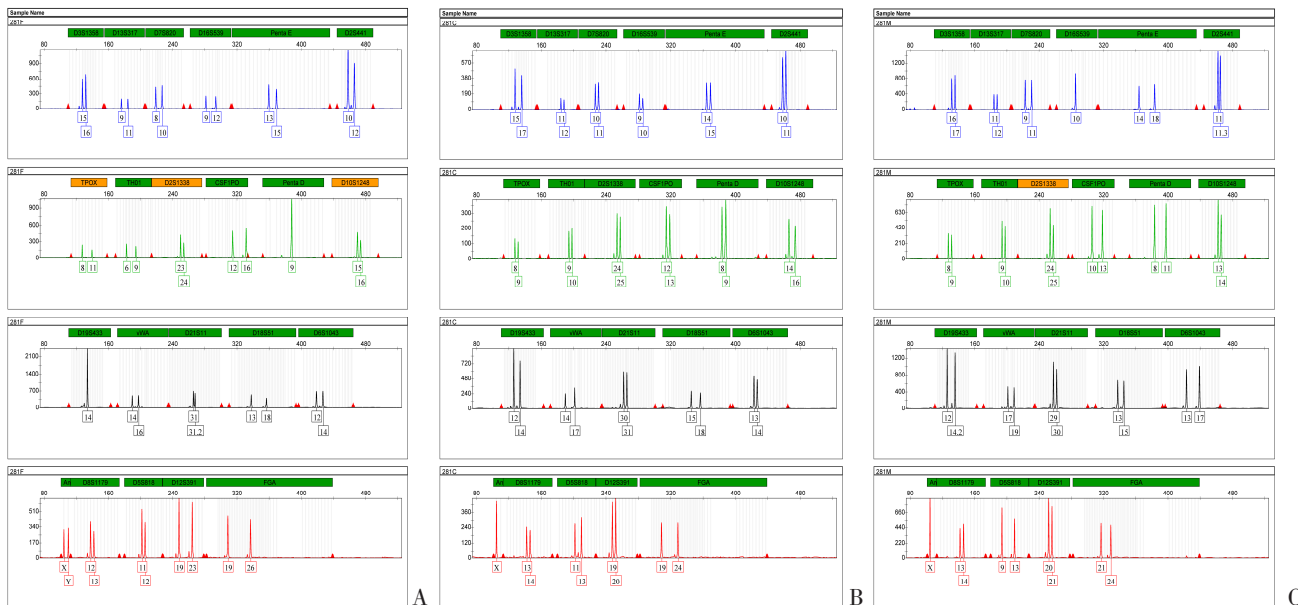


图 1 AGCU EX-22 STR 分型结果

Figure 1 AGCU EX-22 STR typing result

注:A. 被检父的 STR 分型图谱;B. 孩子的 STR 分型图谱;C. 孩子母亲的 STR 分型图谱。

表 1 AGCU EX-22 STR 基因座数据

Table 1 AGCU EX-22 STR data

STR 基因座	281F	281C	281M
Amel	X/Y	X	X
D3S1358	15/16	15/17	16/17
D13S317	9/11	11/12	11/12
D7S820	8/10	10/11	9/11
D16S539	9/12	9/10	10
Penta E	13/15	14/15	14/18
D2S441	10/12	10/11	11/11.3
TPOX	8/11	8/9	8/9
TH01	6/9	9/10	9/10
D2S1338	23/24	24/25	24/25
CSF1PO	12/16	12/13	10/13
Penta D	9	8/9	8/11
D10S1248	15/16	14/16	13/14
D19S433	14	12/14	12/14.2
vWA	14/16	14/17	17/19
D21S11	31/31.2	30/31	29/30
D18S51	13/18	15/18	13/15
D6S1043	12/14	13/14	13/17
D8S1179	12/13	13/14	13/14
D5S818	11/12	11/13	9/13
D12S391	19/23	19/20	20/21
FGA	19/26	19/24	21/24

表 2 阅微基因 36A STR 基因座数据

Table 2 Microreader™ 36A STR data

STR 基因座	281F	281C	STR 基因座	281F	281C
Amel	X/Y	X	TPOX	8/9	8/11
TH01	9/10	6/9	PentaE	14/15	13/15
D5S818	11/13	11/12	D14S608	6/9	9/9
D21S11	30/31	31/31.2	D4S2366	10/12	11/12
D18S51	15/18	13/18	D3S3045	9/13	9/13
D6S1043	13/14	12/14	D19S433	12/14	14/14
D15S659	12/16	12/16	D22S1045	15/16	11/16
D6S477	15/16	15/16	D2S1338	24/25	23/24
Rs2032678	1	0	FGA	19/24	19/26
D3S1358	15/17	15/16	D5S2500	11/16	12/16
D13S317	11/12	9/11	D10S1435	10/13	13/13
D7S820	10/11	8/10	D18S535	14/15	13/14
D16S539	9/10	9/12	DYS391	10	0
CSF1PO	12/13	12/16	D1S1656	11/15	11/16
PentaD	8/9	9/9	D12S391	19/20	19/23
D8S1132	18/22	18/20	D10S1248	14/16	15/16
D7S3048	23/24	23/24	SE33	18/29.2	18/29.2
D2S441	10/11	10/12	D19S253	12/12	10/12
vWA	14/17	14/16	D11S2368	21/22	18/22
D8S1179	13/14	12/13			

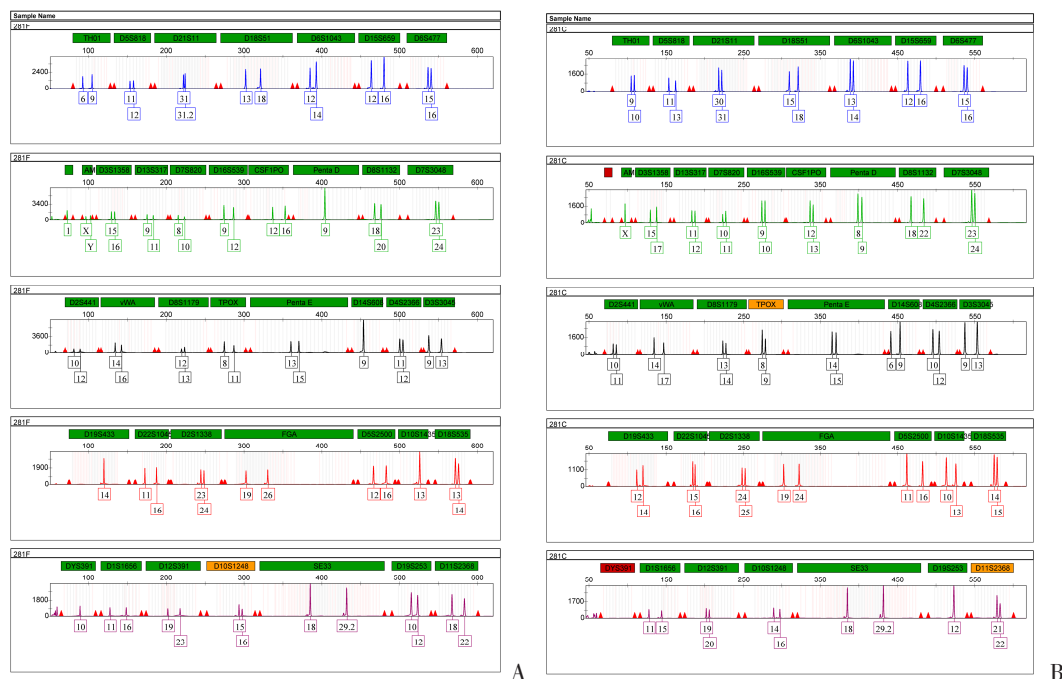


图2 阅微基因36A STR分型结果

Figure 2 Microreader™ 36A STR typing results

注:A. 被检父的STR分型图谱;B. 孩子的STR分型图谱。

### 3 讨论

为了快速完成检测,得到准确且可靠的STR图谱和数据结果,本研究使用Chelex-100法提取DNA进行PCR扩增<sup>[19]</sup>。当前亲子鉴定广泛使用STR基因座进行判断,对于这些案例一般只要认真计算好累积亲权指数就能确认是否有血缘关系,但有时候会有突变的STR基因座出现<sup>[20]</sup>,如D12S391、SE33、D2S1338、D21S11、vWA、D3S1358、D8S1179、D2S441和D1S1656。上述9个基因座的突变在当前文献报道中最常见<sup>[21]</sup>,此外其它基因座如D5S818、D7S820和D13S317也可发生显著变异<sup>[22]</sup>。以往二联体亲子鉴定疑难案中<sup>[23]</sup>,有的因一到两个基因座突变导致累积亲权指数既大于0.0001又小于10 000,不能出具明确的鉴定意见,然后通过增加STR基因座检测的方法来增加累积亲权指数并验证第一个试剂盒的结果,最后都能得出明确的鉴定意见<sup>[24-25]</sup>。

本文介绍的是更为罕见的案例,被检父在每个基因座上都能提供给孩子必须的等位基因,符合孟德尔遗传定律,但其累积亲权指数计算的结果却是既大于0.0001又小于10 000。这种情况的出现是由于该试剂盒里面STR基因座的大部分等位基因恰好都是高频率,导致不能得出明确鉴定的结果。根据《亲权鉴定技术规范》(GB/T 37223-2018)规定,结果既不能支持,也不能排除被检父为孩子的生物学父亲。无法出具明确的鉴定意见。这对被鉴定人来说是很难接受的<sup>[26]</sup>。

本文针对此类罕见案例提出了相应的解决策略,即增加孩子母亲作为被鉴定人进行三联体亲权鉴定。从我们的结果可以看出,三联体亲权鉴定的累积亲权指数都大于10 000,能出具明确的鉴定意见书,但会增加检测费用,成本较高;而单独增加STR位点后,所得的累积亲权指数也大于10 000,也能出具明确的鉴定意见书,成本较低,同时也能解决孩子母亲因为某些原因和理由无法到达鉴定中心来采集样本的困境<sup>[27]</sup>。此外,阅微基因36A拥有AGCU EX-22所有的STR基因座,能对AGCU EX-22所取得的结果进行验证。上述结果显示,两种试剂盒相同基因座中的等位基因结果一致,证明了AGCU EX-22结果的准确性。因此,从这一例罕见二联体疑难案来说,增加被鉴定人做三联体亲权鉴定或者是增加STR基因座位点检测,都能提高累积亲权指数,达到鉴定需求,出具明确的意见书,满足委托人的需要。事实上,《亲权鉴定技术规范》(GB/T 37223-2018)也给出了应增加遗传标记的建议。此外,如果出现突变的STR位点,可以采取不同部位的检材以排除嵌合体的情况。

### 4 结论

针对亲子鉴定中的罕见案例,通过增加孩子母亲为被鉴定人,使用AGCU EX-22试剂盒进行三联体鉴定,能出具明确的鉴定意见;或者是使用阅微基因36A试剂盒来增加检测的STR基因座位点,亦能对被检父和孩子二联体鉴定出具明确的鉴定意见。该研究可为

今后的亲子鉴定提供典型案例参考。

## 5 参考文献

- [1] FU JW, CHENG JL, LIU XY, *et al.* Evaluation genotypes of cancer cell lines HCC1954 and SiHa by short tandem repeat (STR) analysis and DNA sequencing[J]. *Mol Biol Rep*, 2018, 45 (6) : 2689-2695.
- [2] HADDRILL PR. Developments in forensic DNA analysis[J]. *Emerg Top Life Sci*, 2021, 5(3) : 381-393.
- [3] 张娜, 颜梅珍, 王元白, 等. 高龄孕妇羊水染色体核型分析及拷贝数变异分析[J]. *西南医科大学学报*, 2021, 44(2) : 144-149.
- [4] KORETH J, O'LEARY JJ, MCGEE JO. Microsatellites and PCR genomic analysis[J]. *J Pathol*, 1996, 178(3) : 239-248.
- [5] CHENG JL, SONG BH, FU JW, *et al.* Genetic polymorphism of 19 autosomal STR loci in the Yi ethnic minority of Liangshan Yi autonomous prefecture from Sichuan Province in China[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1) : 16327.
- [6] DABAS P, JAIN S, KHAJURIA H, *et al.* Forensic DNA phenotyping: Inferring phenotypic traits from crime scene DNA[J]. *J Forensic Leg Med*, 2022, 88 : 102351.
- [7] ZHOU J, WANG Y, XU EP. Research progress on application of microhaplotype in forensic genetics[J]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2021, 50(6) : 777-782.
- [8] ZHANG XR, MENG HT, SHI JF, *et al.* Efficiency evaluation of common forensic genetic markers for parentage identification involving close relatives[J]. *Forensic Sci Int*, 2023, 345 : 111594.
- [9] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 亲权鉴定技术规范: GB/T 37223—2018[S]. 北京: 中国标准出版社.
- [10] 苏丽娟, 王忆霄, 单鑫, 等. 306例亲子鉴定案件基因突变的观察与分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(8) : 3511-3514.
- [11] JIA YS, ZHANG L, QI LY, *et al.* Multistep microsatellite mutation leading to father-child mismatch of FGA locus in a case of non-exclusion parentage[J]. *Leg Med*, 2015, 17(5) : 364-365.
- [12] 伍新尧, 童大跃, 朱运良, 等. 用STR分型技术作亲权鉴定时判断标准的研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2010, 31(1) : 1-6.
- [13] 夏邦勇, 汤增秋. 部分疑难二联体亲子鉴定浅析[J]. *实验与检验医学*, 2014, 32(6) : 697-699, 718.
- [14] FU JW, FU SY, YIN SQ, *et al.* Technical note: multi-alleles at the DYS385ab locus with high frequency in a Han Chinese population from southwestern China[J]. *Int J Legal Med*, 2021, 135 (5) : 1737-1741.
- [15] 付杰文, 成竞梁, 邵麟鲂, 等. STR分析中两种采血方法的比较[J]. *西南医科大学学报*, 2018, 41(6) : 494-497.
- [16] ZOU X, LI YG, WEI ZH, *et al.* Population data and forensic efficiency of 21 autosomal STR loci included in AGCU EX22 amplification system in the Wanzhou Han population[J]. *Int J Legal Med*, 2018, 132(1) : 153-155.
- [17] CHATTERJI S, PACHTER L. Reference based annotation with GeneMapper[J]. *Genome Biol*, 2006, 7(4) : R29.
- [18] TILLMAR AO, MOSTAD P. Choosing supplementary markers in forensic casework[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2014, 13 : 128-133.
- [19] WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. *BioTechniques*, 1991, 10(4) : 506-513.
- [20] FU JJ, LI LY, LU GX. Relationship between microdeletion on Y chromosome and patients with idiopathic azoospermia and severe oligozoospermia in the Chinese[J]. *Chin Med J*, 2002, 115 (1) : 72-75.
- [21] GETTINGS KB, APONTE RA, VALLONE PM, *et al.* STR allele sequence variation: current knowledge and future issues[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, 18 : 118-130.
- [22] 李海霞, 陈延冰. 母系突变的亲子鉴定1例[J]. *广东公安科技*, 2021, 29(4) : 69-71.
- [23] 王琳, 王毅, 王晓梅, 等. 亲子鉴定中二联体鉴定结果判定标准的探讨[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(3) : 172-175.
- [24] 陈芳, 章红星, 陈建红, 等. 疑难单亲亲子鉴定1例[J]. *中国司法鉴定*, 2015(5) : 121-123.
- [25] LIU QL, CHEN YF, ZANG Y, *et al.* Two loci concurrent mutations in non-exclusion parentage cases using 19 STR profiles[J]. *Leg Med*, 2018, 35 : 73-76.
- [26] 宋炳辉, 成竞梁, 李伦, 等. 亲子鉴定的法律与伦理问题新探[J]. *医学与法学*, 2023, 15(2) : 99-104.
- [27] 史瑞红, 张平, 王建, 等. 寻亲单亲亲子鉴定误判纠错1例[J]. *中国法医学杂志*, 2019, 34(4) : 416, 415.

(利益冲突: 无)

(收稿日期: 2023-10-09; 修回日期: 2024-03-14)