

# 犬 17A STR 5 色荧光检测试剂盒在警犬 DNA 鉴定中的应用研究

叶俊华<sup>1</sup>, 杜蔚安<sup>2</sup>, 杨前勇<sup>1</sup>, 唐小玲<sup>2</sup>, 郑卫国<sup>2</sup>, 熊勇华<sup>3</sup>, 赵会安<sup>4</sup>, 付平峰<sup>1</sup>, 兰 康<sup>1</sup>, 王 博<sup>1</sup>, 徐 黎<sup>1</sup>, 马长书<sup>1</sup>, 李 涛<sup>1</sup> (1. 公安部南昌警犬基地 江西, 南昌 330100; 2. 无锡中德美联生物技术有限公司, 江苏 无锡 214174; 3. 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047; 4. 江西省公安厅刑科所, 江西 南昌 330008)

**摘要:** 目的 建立犬 DNA 检测方法。方法 采用自主研发的多重 PCR 扩增体系和五色荧光(FAM、HEX、TAMRA、ROX 和 SIX)自动化检测技术调查了犬 DAmel 和 VWFX 等 16 个 STR 基因座和 1 个性别决定基因座多态性, 并计算该 16 个 STR 基因座的等位基因频率(P)、杂合度(H)、多态信息含量(PIC)和非父排除率(PE)。实验犬为 11 个品种 231 头犬。结果 结果显示该 16 个 STR 位点的非父排除率(PE)和个体识别力(DP)分别为 0.995026 和 0.99999992。结论 显示研发的犬 STR-DNA 荧光检测试剂盒可作为犬 DNA 鉴定常规应用。

**关键词:** 自主研发; STR-DNA; 试剂盒; 警犬; 亲子鉴定

中图分类号: DF795.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-3650(2011)02-0011-03

Application of 17A STR Kit in Police dog DNA identification

YE Junhua, DU Weiran, YANG Qianrong, et al. (*Nanchang Police Dog Base, Ministry of Public Security, Nanchang 330100, China*)

**ABSTRACT:** The polymorphism distributions of seventeen dog gene loci, DAmel, PEZ1, PEZ2, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8, PEZ12, PEZ15, PEZ20, PEZ21, FH2010, FH2054, FH2079, FH2132, FH2611 and VWFX in Chinese police dog population were investigated using multiplex amplification and five color fluorescent technique, expected gene frequency(P), heterozygosity(H), polymorphism information content(PIC) and probability of paternity exclusion(PE) were calculated by testing 231 dogs in 11 breeds. Cumulated DP of sixteen STR loci was 0.99999992 and PE of sixteen STR loci was 0.995026. The parentages of 23 dogs of 5 families in 3 breeds were identified with his method and the result showed that five color kit can be used routinely.

**KEY WORDS:** independent R&D; STR-DNA; police dog; parentage's identification

犬 STR-DNA 多态性的研究在国外比较广泛深入<sup>[1,2]</sup>, 现已定位和测序了的 STR 达 3700 多个, 遍布整个基因组。在欧美等国家, 已广泛利用 STR-DNA 多态性进行犬的亲子鉴定及犬 DNA 数据库的构建。我国从 2000 年开始, 在警犬种犬的血统管理方面采用了这一技术, 并初步建立了全国警犬种犬 DNA 数据库, 对警犬的良种繁育具有重要意义。

目前, 我国开展犬的 STR-DNA 多态性研究、构建数据库及进行犬的亲缘关系鉴定多采用美国 ABI 公司生产的试剂盒<sup>[3,4]</sup>, 胡萌、叶健等<sup>[5]</sup>用建立的犬复合扩增体系进行 PCR 反应, 建立了包含 9 个 STR 基因座的复合扩增体系, 对犬进行个体识别和亲权鉴定

方法进行了研究。为减少对国外试剂盒的依赖性, 提高检验准确性, 很有必要开发研制具有自主知识产权的犬 DNA-STR 检验试剂国产化检测试剂盒。本研究自主研发了犬 17A STR 荧光检测试剂盒, 建立了警犬亲子鉴定方法, 并可应用于 DNA 辅助选配、遗传多样性评价以及犬类法庭科学 DNA 鉴定等, 介绍如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 检测样本

纯种犬 231 头, 包括德国牧羊犬、罗威纳犬、杜伯文犬、史宾格犬、拉布拉多犬、昆明犬、马里努阿犬、荷兰牧羊犬 8 个警用犬品种和藏獒、沙皮犬、苏格兰牧羊犬 3 个非警用犬品种, 共计 11 个品种。进行家系调查的荷兰牧羊犬、德国牧羊犬、罗威纳犬等 3 个品种 5 个家系 23 头犬。

作者简介: 叶俊华(1957—), 男, 汉族, 江西兴国, 研究员, 研究生导师, 研究方向: 警犬繁殖和育种。Tel: 18970052901; E-mail: yjh575757@163.com

1.2 引物设计和组合(见表 1)

表 1 17 个基因座的分布、荧光类型、分子量范围等 PCR 特征

| 基因座    | 染色体 | 核心序列                       | 荧光染料  | 分子量范围    |
|--------|-----|----------------------------|-------|----------|
| PEZ1   | 7   | TACA                       | FAM   | 96~ 140  |
| PEZ2   | —   | CCTT                       | FAM   | 150~ 194 |
| FH2010 | 24  | ATGA                       | FAM   | 206~ 230 |
| PEZ5   | 12  | TTTA                       | FAM   | 253~ 277 |
| PEZ12  | 3   | AAAG                       | FAM   | 300~ 388 |
| PEZ21  | 2   | AAAT                       | HEX   | 95~ 133  |
| DAmel  | —   | gene                       | HEX   | 139~ 150 |
| PEZ3   | 19  | GAA                        | HEX   | 161~ 213 |
| PEZ6   | 27  | AAAT                       | HEX   | 243~ 295 |
| PEZ8   | 17  | AAAT                       | HEX   | 320~ 390 |
| FH2054 | 12  | TAGA                       | TAMRA | 105~ 156 |
| VWFX   | —   | AGGAAT                     | TAMRA | 168~ 210 |
| FH2611 | —   | —                          | TAMRA | 214~ 250 |
| FH2132 | 2   | —                          | TAMRA | 273~ 389 |
| PEZ20  | 22  | AAAT                       | ROX   | 114~ 142 |
| PEZ15  | 16  | AGAA                       | ROX   | 151~ 203 |
| FH2079 | 24  | Mix(GGAT)<br>~ 47scrambled | ROX   | 230~ 290 |

复合扩增体系包括 1 个性别基因座和 16 个多态性基因座,其中 16 个基因座分布在不同染色体上,核心序列大部分为 4 个碱基重复,PEZ3 为 3 个碱基重复,VWFX 为 6 个碱基重复,个别基因座存在混合型的碱基重复(如 FH2132)。

1.3 PCR 条件

初始变性温度 95℃ 11min,热循环两个阶段,第一个阶段循环 10 次,94℃ 1min、62℃ 1min、72℃ 1min,第二个阶段循环 20 次,90℃ 1min、60℃ 1min、72℃ 1min,最后终延伸 60℃,60min,4℃ 保温。

1.4 基因型分析

使用 ABI Prism® 3130 型遗传分析仪(36cm 毛细管、POP-7 胶)进行电泳分析。运行 GeneMapper v3.2.1 软件进行分析和判型。

杂合度(H)、多态信息含量(PIC)、个体鉴别力、父权指数(P)等参数的统计根据有关文献资料<sup>[6-8]</sup>所提供的公式和方法进行。

2 结果和讨论

2.1 STR 基因座多态性

2.1.1 等位基因频率 通过对 231 例样本的检测,16 个 STR 基因座共发现 145 个等位基因(见表 2),平均每个基因座 9 个,最多的等位基因数达 20 个(FH2132),最少的只有 4 个(VWFX),计算得到 16 个 STR 等位基因频率分布,经  $\chi^2$  检验,结果  $P \geq$

0.05,表明 16 个 STR 基因座的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡,性别决定功能基因 DAmel 的检测结果与样本的性别记录一致,表明该基因的检测要求符合预期,能应用到性别检测研究中。

2.1.2 多态性信息含量 根据 16 个 STR 基因座的等位基因频率分布,计算各基因座的无偏倚杂合度(H)、多态信息含量(PIC)、个体识别率(DP)、非父排除率(PE)、16 个 STR 基因座的累积鉴别力(CDP)为 0.999999992、累积非父排除率(CP)为 0.995026(见表 2)。

进行了荷兰牧羊犬、德国牧羊犬、罗威纳犬等 3 个品种 5 个家系 23 头犬的家系调查,经过比对,均符合孟德尔遗传规律。

表 2 16 个 STR 基因座的杂合度、多态信息含量和父权指数

| 基因座         | 杂合度 (H)    | 多态信息含量(PIC) | 父权指数 (PE) | 等位基因数量(N) |
|-------------|------------|-------------|-----------|-----------|
| PEZ1        | .437054    | .416694     | .238210   | 9         |
| PEZ2        | .565735    | .533369     | .315433   | 7         |
| FH2010      | .680324    | .632796     | .369819   | 5         |
| PEZ5        | .576145    | .536277     | .328304   | 8         |
| PEZ12       | .565082    | .539796     | .334487   | 11        |
| PEZ21       | .694899    | .639062     | .371431   | 5         |
| PEZ3        | .761526    | .738750     | .519294   | 10        |
| PEZ6        | .782793    | .754871     | .523364   | 10        |
| PEZ8        | .743382    | .716124     | .486877   | 9         |
| FH2054      | .803688    | .776586     | .541879   | 11        |
| VWFX        | .315214    | .292178     | .161777   | 4         |
| FH2611      | .800565    | .779774     | .564544   | 11        |
| FH2132      | .819973    | .806018     | .618120   | 20        |
| PEZ20       | .571907    | .544660     | .333296   | 10        |
| PEZ15       | .693263    | .651221     | .400486   | 8         |
| FH2079      | .420880    | .392119     | .212606   | 7         |
| 平均数 Average | .639527    | .609393     | .394996   | 9.0625    |
| 累计父权指数 CP   | .995026    |             |           |           |
| 累积鉴别力 CDP   | .999999992 |             |           |           |

2.2 讨论

本项目成功研制出涵盖 17 个基因座,5 色荧光的犬 STR 荧光复合扩增检验试剂盒,建立了有效的犬 STR 检验技术。

本实验建立的方法可对血斑直接 PCR 检测,免去了 DNA 提取步骤,操作更加方便、快捷,大大缩短了检测周期,降低了检测成本。本研究通过 STR 复合扩增反应体系中加入能够稳定 DNA 单链状态的 SSB 和维持 DNA 聚合酶热稳定性的 BSA,并摸索两者最佳的反应终浓度,以削弱或去除 PCR 抑制剂的影响,达到应用犬 17A STR 荧光复合扩增体系对滤

纸血斑直接扩增的目的。

STR 的分型易受到非特异性带、波峰重叠、等位基因漏扩、扩增不平衡、影子峰等很多因素的干扰,有的分形峰虽然有读数也不一定就是真正的等位基因。尤其是存在微变异的情况下,这种干扰就更加明显,如 FH2132,存在多个微变异,其分子量甚至相差 1 个碱基。

因此,本研究迫切需要进一步设置等位基因标准物,建立判型标准,使检测更加标准和规范。

随着我国民间,特别是城市犬只饲养数量急剧上升,犬攻击人的事件常有发生,利用 STR 标记对肇事犬进行个体鉴定,提供法庭证据,也将成为维护受害者个人权益的一种重要方法。同时,在侦查破案中,由于国内饲养名贵宠物犬的家庭和个人越来越多,名贵犬被盗等案件时有发生,此外,随着社会的发展,犯罪手段不断复杂化,涉及到犯罪现场的宠物犬生物检材的鉴定案例也将增多。显而易见,本研究成果将在这一领域发挥应有作用。(致谢:在本研究中,得到公安部昆明警犬基地、公安部南京警犬研究所、公安部沈阳警犬基地及公安部各二级警犬繁育单位的大力支持和帮助,在此,一并表示衷心感谢!)

参考文献:

[1] S DeNise, E Johnston, J Halverson, et al. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers[J]. *Animal Genetics*, 2004, 35: 14-17.

[2] I Cathryn, S M ellersh, J Sampson. Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds [J]. *Mammalian Genome*, 1997, 8: 182-185.

[3] 王海生,王祥,张文平,等. 湖北地区德国牧羊犬 10 个微卫星 DNA 基因座遗传多样性研究[J]. *刑事技术*, 2003 (2): 12-14.

[4] 叶俊华,麻俊武,杨前勇,等. 利用 10 个 STR DNA 的多态性进行警犬亲子鉴定[J]. *江西农业大学学报*, 2005 (1): 110-113.

[5] 胡萌,叶健,姜成涛. 9 个犬 STR 基因座在犬类鉴定中的应用[J]. *刑事技术*, 2006(3): 20-22.

[6] 郭景元,李伯龄. 法医物证学[M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2002: 335-356.

[7] 申成斌,刘海,刘超,等. 应用荧光复合扩增技术对河南汉族群体 9 个 STR 基因座的多态性研究[J]. *河南医药信息*, 2001, 9(7).

[8] 冯明亮,季芸,陆琼,等. 用多重 PCR 检测上海地区汉族人群 9 个 STR 基因座的多态性[J]. *遗传*, 2002, 24: 403-406.

收稿日期: 2010-05-12

## 现场尿斑 STR 检验 1 例

徐志成,刘炜彬,陈新星(浙江湖州市公安局刑侦支队,浙江湖州 313000)

关键词: 法医物证学;尿斑;STR 检验

中图分类号: DF795.2 文献标识码: B

文章编号: 1008-3650(2011)02-0013-01

### 1 案件简介

2010 年某市连续发生 20 余起结伙盗窃工地脚手架夹头的案件,案值 20 余万元。4 月份巡逻人员在某工地发现一正在作案的嫌疑人并驾车逃走。巡逻人员随后发现了案犯刚刚遗留在现场水泥地面上的一滩尿液,在询问了技术员后立即用 10cm × 10cm 滤纸放置尿液中,吸附尿液制成尿液斑,并晾干送检。

### 2 检验过程

DNA 实验室对送检尿斑采用了 Promega 公司的

## • 案例分析 •

DNA IQ™ SYSTEM(磁珠法)进行提取。采用 DNA IQ™ SYSTEM 进行纯化,最后 35μl 洗脱,得到 DNA 模板。提取的 DNA 模板取 2μl 采用 ABI 公司 AmpF1STR Identifier 试剂盒进行 10μl STR 复合扩增,产物采用 ABI 3130XL 型 DNA 序列分析仪电泳分离和激光扫描分析,结果用 GeneMapperID V3.3 软件进行分析,成功得到一男性 STR 分型。与抓获人员进行比对,认定同一。

### 3 讨论

本案中由于尿液遗留在水泥地面上,水泥地面渗透性低,能够取到足够检验的尿液样本,同时尿液发现及时,检材新鲜程度高,尿液中的 DNA 成分得以妥善地保存。另外现场勘查人员在发现尿液后及时采用滤纸对尿液进行了有效地吸附,并进行了晾干和及时送检。滤纸在吸附尿液的同时将尿液中的白细胞、巨噬细胞、上皮细胞等吸附在滤纸上。可以说,现场勘察人员正确的提取方法为尿液斑的成功检验提供了保证。

收稿日期: 2010-06-17