

# 法医线粒体全长测序在二代测序平台的建立

王伟涛

(云南现代司法鉴定所, 云南 昆明 650000)

**摘要:**线粒体 DNA 分型技术现在法医鉴定学中的地位非常重要,在降解检材检验、母系亲缘关系鉴定等法医学工作上能够起到补充作用,但是通过实践发现线粒体 DNA 的识别力比较低,要想充分发挥出线粒体 DNA 的作用就必须要做好评估建设线粒体全基因组测序的工作。本文通过分析线粒体 DNA 的相关内容深入了解建立法医线粒体全长测序在二代测序平台中的情况,希望能够给以后的工作者提供一些参考。

**关键词:**法医;线粒体;二代测序平台

**中图分类号:**D919

**文献标识码:**A

**文章编号:**1004-7344(2021)08-0270-03

## 0 引言

线粒体 DNA 主要指在真核细胞胞质的细胞器结构呈双链闭合环状,一共有 16569 个核苷酸,线粒体 DNA 最大的特点就是变异率高,所以能够在法医遗传学中发挥巨大的作用。通过实际应用能够了解到线粒体 DNA 分型工作在正在进行的过程中主要以一代测序为主进行检测,在测序的过程中能够直接把嫌疑人分型和现场存在的物证进行对比。

## 1 线粒体 DNA

### 1.1 线粒体 DNA 的基本特征

在细胞质中主要的双层膜性细胞器就是线粒体,线粒体的主要功能就是负责为细胞提供需要的能量,线粒体中的 DNA 不需要任何染色体的帮助就可以独立进行复制和转录,在 1981 年的时候研究工作者在研究的过程中首次对线粒体的全部序列进行了检测,然后在 1999 年的时候对该序列进行了修正,此后一直沿用至今。

线粒体 DNA 根据功能能够分为编码区和控制区两个区域,其中控制区的突变率要高于编码区。因为线粒体 DNA 的排列结构比较紧凑,所以相邻的基因会出现相互重叠的情况发生,如果在这个时候线粒体序列发生了变异,就会引发相关病变发生。

和常规染色体 DNA 比较之后发现线粒体 DNA 主要有以下几大特点:首先能够根据需氧量的不同拷贝出上万个不同的数量;其次因为线粒体 DNA 的遗传方法为母系遗传,所以不能进行遗传重组;最后线粒体 DNA 的突变率比较高,所以纠错能力比较弱。

### 1.2 线粒体 DNA 的单倍群

单倍群主要指一群高度相似并且具有共同祖先的单倍型集合,又被叫作诊断位点。单倍型在使用的过程中能够推算出人群

的迁徙历史和分布情况,在法医学应用的过程中单倍群能够评估出无关相同单倍型出现的概率,最终完成整个测序工作。

在对 DNA 进行单倍群划分工作的时候可以划分为以下两个类型:①诊断位点;②独特变异位点。在使用的过程中能够通过判断位点变异的情况来分析问题,最终达到质量控制的目的。

### 1.3 线粒体异质性

异质性主要指同一来源的线粒体中同一核酸位置出现的分子类型,因为 DNA 在细胞内的拷贝数存在不同情况发生,所以即使是在同一细胞内也有可能出现不同的碱基。异质性主要由长度异质和点异质两种类型组成,当异质性存在于比较高的氧化环境中的时候就容易发生基因变异情况。

有的异质性位点有一定的遗传性,所以在分裂卵细胞的过程中有时会因为年龄的变化而发生一定的改变。虽然有人在研究的过程中认为异质性位点可能和遗传重组有关,但是该理论并没有相关的证据作为支持。

因为不同的检测方法异质性的灵敏度不同,所以在进行自动测序的过程中观察到的发生率会有一定偏差,导致异质性的调查会受到一定的限制。

在实际应用的过程中如果参与对比的样本中出现了相同的异质位点说明样本中的测序内容完全相同,这种认证提高了一致性认定的准确率。

### 1.4 常染色体共同扩增

核线粒体 DNA 主要指在线粒体 DNA 中因为某段序列和常染色体序列高度相同引起的高度同源,最终在 DNA 扩增的过程中出现的同源常染色体共同扩增。对于法医学应用来说因为线粒体自身存在的特点,所以可以直接忽略掉常染色体对共同扩增分型结果的影响。

## 2 线粒体 DNA 的法医学应用

### 2.1 线粒体 DNA 的法医学概述

线粒体 DNA 的分型主要有以下两个优势：首先是线粒体的高拷贝数；其次是线粒体 DNA 遵循的母系遗传。在实际应用的过程中线粒体 DNA 主要应用于：①缺乏传统参考样本的大型灾难事故现场；②用于母系亲缘关系鉴定；③适用于无法通过 STR 遗传标记识别的检材（毛干）与高度降解的检材（骨骼、牙齿等）。常染色标记物扩增失败的骨骼或者是毛发。为了更好地提高线粒体的识别能力，相关的法医遗传学家也做出了一系列的努力，但是因为受到测序方法的限制导致无法提高线粒体全基因组测序的分辨率。

### 2.2 线粒体相关的法医内容

根据国际法医学 DNA 委员会提出的文件内容能够发现在对比现场和嫌疑人线粒体 DNA 的时候会出现以下三种情况，分别是：排除、无法确定、无法排除。如果出现无法排除的情况就需要对相关证据进行进一步的评估，总而言之在进行线粒体对比的过程中需要注意首先不能进行个人识别，其次在应用的过程中不能通过单个核苷酸的动态性位点来得出单倍型的概率。

## 3 新一代测序技术

### 3.1 新一代测序技术的相关介绍

新一代测序技术就是以 DNA 合成为基础对 DNA 序列进行高通量测序的一种方法，和传统的测序方法相比二代测序方法能够缩短检测的时间，并且降低单个检测样本的成本。现在市场上更新的二代测序品牌主要以 Illumina 公司为主生产的新一代测序平台，这种测序平台在使用的过程中能够测量未知基因组的内容。因为该平台应用的测序原理主要以不同剪辑荧光发射光谱来进行研究，所以整个过程的错误率会比较低。

### 3.2 数据处理

在测序的过程中常用的名词包括以下内容：①文库。文库主要指把测序的片段制备成符合测序实验的片段为平行测序工作做好相应的准备；②接头。接头主要指用来连接目标序列的一种连接酶，以此来提高测序工作的准确性；③序列。二代测序的结果和序列有着密不可分的关系，在测序工作进行的过程中测序平台不同会直接影响到整个序列的长度；④测序深度。测序深度主要指平均测序深度就是测序总的碱基数除以样本长度的结果，测序深度能够充分反映出测序的质量；⑤覆盖率。覆盖率主要指已经测序的片段占据总基因组的百分比；⑥质量分数。质量分数主要指评价碱基测序质量的指标，如果整个实验步骤都能按照正确的程序进行，碱基测序的准确率能够达到 99% 以上；⑦条码标记。条码标记是一段固定的短序列，能够直接连接所有的目标片段。

### 3.3 数据的分类

①SAM 文件。SAM 文件主要用来储存核算数据，属于二代平台通用文件。在使用的过程中能够对比前后的序列内容；②BAM 文件。BAM 文件的目录文件是 BAI，能够对相关软件进行可视化；③FASTq 文件。FASTq 文件和 FASTA 文件有很多相似的地方，都是能够通过文件了解到每个碱基的质量分数；④VCF 文

件。VCF 文件是一种通用的文件格式，主要负责概括该变异在参考基因组的位置。

## 4 实验方法

### 4.1 实验的流程

实验在进行的时候主要包括以下内容：提取 DNA、扩增长片段、扩增子片段化、加接头、建立文库、PGM 测序、验证结果和分析结果。

### 4.2 器材与试剂

#### 4.2.1 DNA 处理部分

主要包括的试剂与设备内容有：琼脂糖、EB 染色试剂盒、离心机、恒温水浴锅。

#### 4.2.2 测序部分

主要包括的试剂与设备内容有：NaOH 溶液、1.5mL LoBIND-tubes 等。

#### 4.2.3 使用软件及在线工具

使用软件及在线工具的内容包括：IGV、DNAsp 等。

### 4.3 实验过程

#### 4.3.1 实验样本的采集

首先经过知情人同意的情况下采集某地区 47 名汉族个体母系 3 代的静脉血，然后放在 -20℃ 的环境中进行保存。

#### 4.3.2 测序策略

为了提高整个测序的质量在进行的过程中严格按照实验室的操作流程进行实验：

(1) 提取 DNA。在提取 DNA 的过程中具体步骤如下：首先在样本中加入适量的乙醇、蛋白酶然后加入静脉抗凝血进行均匀震荡然后在加入 BufferAL 溶液然后再次进行震荡，震荡之后放入水浴箱中 10min 之后等待细胞彻底裂解，然后取出离心管中的溶液再次加入乙醇后进行震荡，震荡之后把液体均匀的涂在离心柱中，离心 1min 之后在放入到收集管中，然后进行 3 次离心操作。操作完成之后回收 DNA，最后把回收的样本放在零上四摄氏度环境中进行保存。在实验进行的过程中 PCR 扩增体系情况如表 1 所示。

表 1 PCR 扩增体系情况

试剂	体积 (μL)	终浓度
10X 反应缓冲液	2	1
DMSO	0.4	
10X 增强剂 B	1	0.5
长聚合酶	0.36	1.8U
水	14.24	
引物 1 或引物 2	1	500nM
DNA	1	10ng

震荡完成之后进行离心去泡处理，离心去泡处理之后长序列会逐渐扩增，扩增结束之后在加入适当的琼脂糖凝胶电泳，然后进行观察，最终得到需要的样本<sup>[1]</sup>。

(2) 验证方法：①不同参考的序列对比。因为在计算的过程中使用的算法不同最终出现的结果也会不同，所以在计算的过程中可以通过对比两种参考序列来提高验证结果的准确性；②系

(下转第 274 页)

表9 各元素检出定限及定量限 单位:mg/kg

序号	元素名称	元素符号	检出限	定量限
1	钙	Ca	5	20
2	铁	Fe	1	3
3	锌	Zn	0.2	0.5
4	镁	Mg	5	20
5	硒	Se	0.001	0.002

源”,钙元素在人体的免疫系统、神经传递、内分泌调节及骨骼健康中等起着非常重要的作用。通过对36个红糖结果分析,红糖的钙含量的数值处于300~2500mg/kg之间,在植物食品中还是比较高的。

(2)铁作为人体必需的矿物质及微量元素,具有强烈刺激机体造血的功能,同时也具有提高人体免疫力,增强人身体素质的作用。红糖具有“东方巧克力”之称,就是因为其中含有大量的铁元素及其他元素,而且红糖中的铁元素是天然存在的,更容易被人体给吸收。通过对36个红糖结果分析,红糖的铁含量的数值处于3.0~25mg/kg之间,有一定的补铁造血功能。

(3)锌是人体必需的微量元素之一,在人体的生长发育、生殖遗传、免疫等重要的生理过程中起着极其重要的作用,被人们称为“生命之花”。锌可以促进人体的生长发育,维持人体正常的食欲,同时可以增强人体的免疫力,可以促进伤口和创伤的愈合,也能影响维生素A的代谢和正常的视觉,对眼睛的恢复有一定的作用,能促进维生素A的吸收作用。通过对36个红糖结果分析,红糖的锌含量的数值处于0.5~4.5mg/kg之间,对人体的正常生长发育起促进作用。

(4)镁是人身体内300多种酶的重要组成部分,镁帮助维持神经和肌肉活动,是人体骨骼的另一组成成份,镁参与身体所需

能量的活动,防止钙沉淀在组织和血管壁。另外,镁还具有降血压、降低胆固醇、降血糖等功效。通过对36个红糖结果分析,红糖的镁含量的数值处于50~1000mg/kg之间,这个含量在植物食品中还是比较高的。

(5)硒是人体中必不可少的微量元素之一,它对人体健康的作用是广泛的,有多种免疫与生物学功能。硒是多种酶的活动中心,在生命活动中起到抵御疾病,防止衰老,增强免疫功能的作用。通过对36个红糖结果分析,红糖的硒含量的数值处于0.01~0.16mg/kg之间,可以作为人体补硒的理想食品。

## 4 结论

采用电感耦合等离子体发射光谱法首次测定红糖中的五种人体必需的营养元素,从得出的数据可以看出红糖产品保留了甘蔗中大部分的营养成分,这一点是食糖同类产品中无法比拟的,这将为进一步探究红糖中的营养价值起先驱作用,并引导消费者选择营养价值较高的红糖产品。

## 参考文献

- [1] 刘志.食品营养学[M].北京:中国轻工业出版社,1996:48-49.
- [2] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会:GB 5009268—2016 食品安全国家标准食品中多元素的测定[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [3] 李善吉.微量元素与人体健康[J].广东微量元素科学,2001,8(7):4-8.

收稿日期:2021-01-06

作者简介:李翠萍(1982—),女,壮族,广西崇左人,工程师,研究生,主要从事食品检测的工作。

(上接第271页)

统发生学验证。在记载相关线粒体DNA文献中能够发现系统发生学的验证对整个实验来说都非常的重要,所以不能进行忽视。系统发生学验证的过程中不仅能够了解单碱基可能出现的错误,还能检验出样本是否发生混合。

一代测序为了提高对比数据的准确性可以对相同的样本进行不同方法的检测,最常用的方法就是一代测序方法。

## 5 实验的结果

通过实验能够发现所有样本的平均序列长度都在177.9说明酶切的时间正好合适,从分析测量质量数据还能够发现所有的样本数据都比较的准确。

在对比之后发现因为每个位点都能提取出一个频率比较高的碱基,所以在实验的过程中会筛除掉一些可能出现错误的碱基然后对共有的序列进行评价和分析,在分析的过程中可以通过假阴性位点检查来筛选出变异的位点,最终得出的结果就是

需要的数据结果,这个数据结果的准确性非常高。

## 6 结束语

综上所述能够发现在二次测序平台中建立法医线粒体全长测序能够提高整个测序的结果,并且在对比的过程中也能得出人们需要的相关信息,为法医学工作者的工作带来了非常大的帮助,也能让案件快速水落石出。

## 参考文献

- [1] 姚岚.法医线粒体全测序在二代测序平台的建立及亚人群效应的评估[D].重庆:重庆医科大学,2018.

收稿日期:2021-01-15

作者简介:王伟涛(1990—),男,汉族,云南楚雄人,法医师,本科,主要从事法医物证鉴定等相关工作。