

Analysis of Trisallelic Genotypes in Forensic DNA Identification

Shan Peng

Criminal Investigation Team, Futian Branch of Shenzhen Public Security Bureau, Shenzhen, Guangdong, 518000, China

Abstract

Objective: To investigate the typological characteristics of trisallelic genotypes in forensic DNA identification, providing reference for forensic practitioners to accurately verify trisallelic phenomena. **Methods:** This study selected 32 trisallelic genotype samples detected in forensic DNA identification. DNA extraction was performed using the Chelex-100 method and magnetic bead method. PCR amplification and STR typing were conducted using two fluorescent STR amplification kits, combined with genetic feature analysis based on sample background. Sanger sequencing technology was employed to validate the authenticity of trisallelic genotypes. **Results:** A total of 38 trisallelic positive loci were identified across 32 samples, involving 11 autosomal STR loci. D21S11, Penta D, and D18S51 were the most frequently detected loci, accounting for 68.42% of total detection frequencies. Among the 32 samples, balanced trisallelic genotypes accounted for 65.63%, while unbalanced trisallelic genotypes accounted for 34.37%. In kinship identification samples, balanced trisallelic genotypes predominantly exhibited clear genetic sources, whereas unbalanced trisallelic genotypes were partially associated with chromosomal mosaicism. Repeat amplification and sequencing validation confirmed 28 true trisallelic genotypes and 2 pseudotrisallelic genotypes. **Study:** The detection of three alleles in forensic DNA identification exhibits significant locus specificity. Combined amplification using multiple reagent kits, repeated testing, and Sanger sequencing validation can effectively distinguish true from false alleles, thereby avoiding misclassification of genotypes. This approach provides support for improving the accuracy of three-allele genotyping in forensic DNA identification.

Keywords

forensic DNA identification; three alleles; genetic characteristics; gene sequencing validation

法医 DNA 鉴定中三等位基因的检测分析

彭珊

深圳市公安局福田分局刑事侦查大队, 中国·广东 深圳 518000

摘要

目的: 探讨法医DNA鉴定中三等位基因的类型特征, 为法医鉴定人员精准验证三等位基因现象提供参考。 **方法:** 本研究选取法医DNA鉴定中检出的32例三等位基因样本, 采用 Chelex-100 法与磁珠法进行 DNA 提取, 通过两种荧光 STR 扩增试剂盒开展 PCR 扩增与 STR 分型, 结合样本背景开展遗传特征分析, 并采用 Sanger 测序技术对三等位基因进行真实性验证。 **结果:** 32例样本共检出38个三等位基因阳性基因座, 涉及11个常染色体 STR 基因座, D21S11、Penta D、D18S51为高频检出基因座, 累计占总检出频次的68.42%; 32例样本中均衡型三等位基因占65.63%, 失衡型占34.37%, 亲缘鉴定样本中均衡型多存在明确遗传来源, 失衡型部分伴染色体嵌合现象; 经重复扩增与测序验证, 真性三等位基因28例, 伪三等位基因2例。 **研究:** 法医DNA鉴定中检出三等位基因, 具有明显基因座特异性, 多试剂盒联合扩增、重复检测结合 Sanger 测序验证, 可有效区分真性与伪三等位基因, 避免分型误判, 该提升法医DNA鉴定中三等位基因分型的准确性提供支撑。

关键词

法医DNA鉴定; 三等位基因; 遗传特征; 基因测序验证

1 引言

法医 DNA 鉴定中 STR 分型技术, 作为用于个体识别与亲缘鉴定的关键技术手段, 常染色体 STR 基因座常规分型, 通常呈现二等位基因这一典型特征, 三等位基因作为异常分型现象, 在实际检测中发生率较低, 却易引发分型误判, 对法医学鉴定结论的准确性与可靠性产生直接影响^[1]。有研

究表示, 出现三等位基因检测结果, 通常与染色体拷贝数异常、基因扩增特性、检材质量及实验操作等多种因素相关, 部分 STR 基因座更是三等位基因的高频检出区域, 分型表现为三个等位基因峰的特异性呈现, 峰高与峰面积比例存在明显差异^[2]。在法医学检案实际工作开展中, 三等位基因易被误判为样本外源性污染或混合斑迹, 需要精准的检测验证与特征分析。基于此, 本研究选取法医 DNA 鉴定中三等位基因样本, 进行检测验证与遗传特点分析, 为法医 DNA 鉴定工作中规范化处理三等位基因提供参考。

【作者简介】 彭珊 (1989—), 女, 中国湖南娄底人, 硕士, 警务技术一级主管, 从事法医物证方向 (DNA 鉴定) 研究。

2 材料与方法

2.1 样本来源

选取32例法医DNA鉴定中检出三等位基因的样本，均来自法医学检案，其中个体识别样本18例，亲缘鉴定样本14例；检材类型涵盖外周血样20例、口腔拭子5例、血迹4例、脱落细胞3例。所有样本均经初步检测排除外源性污染，排除样本供体近期输血、骨髓移植等可能干扰分型结果的因素。

2.2 方法

2.2.1 样本处理与DNA提取

外周血样、口腔拭子采用Chelex-100法提取DNA，血迹、脱落细胞采用磁珠法提取，提取流程严格遵循对应试剂盒说明书操作。采用Qubit 4.0荧光定量仪对测定提取的DNA浓度与纯度，将所有样本DNA浓度，统一调整为1.0~2.0 ng/ μ L，置于-20℃低温冰箱保存备用，避免DNA降解影响后续检测。

2.2.2 PCR扩增与STR基因座检测

采PowerPlex®21荧光STR扩增试剂盒、AGCU Ex22荧光STR扩增试剂盒，完成双重PCR扩增，扩增体系为10 μ L，严格按照试剂盒说明书，设置扩增参数：95℃预变性10 min，94℃变性30 s，59℃退火45 s，72℃延伸45 s，循环30次，最后60℃延伸30 min。扩增产物采用3500xL遗传分析仪检测毛细管电泳，运用Collection软件收集电泳数据，GeneMapper ID-X软件分析STR基因座分型数据，初筛三等位基因阳性样本。

2.2.3 三等位基因遗传特征分析

对初筛检出的三等位基因样本，结合样本背景信息，开展遗传分析，亲缘鉴定样本追溯家属STR分型结果，分析三等位基因的遗传传递规律；个体识别样本结合基因座等位基因频率分布，分析三等位基因的分型特征，统计均衡型与失衡型的分布情况，探讨遗传因素对三等位基因形成的影响。

2.2.4 三等位基因测序验证

对初筛的三等位基因样本，重复三次扩增检测，排除实验操作与设备误差；选取重复扩增后仍为三等位基因的样本，采用Sanger测序技术，进行基因座测序验证，设计特异性引物，对目标基因座PCR扩增与测序，分析测序结果，确定等位基因的核苷酸序列特征，验证三等位基因的真实性，排除伪三等位基因干扰。

2.3 统计学处理

对本研究数据均采用统计学软件进行描述性分析。

3 结果

3.1 三等位基因座检测结果

32例三等位基因样本，经双重试剂盒PCR扩增与STR分型检测，共检出38个三等位基因阳性基因座，涉及11个

常染色体STR基因座，不同基因座的三等位基因，检出频次与检出率存在显著统计学差异($P < 0.05$)。D21S11、Penta D、D18S51为三等位基因高频检出基因座，检出频次分别为10、8、4次，三者累计检出频次占总检出频次的68.42%；FGA、TH01为低频检出基因座，各检出1次，占总检出频次的2.63%。外周血样检材在各高频基因座中，检出率均高于口腔拭子、血迹等检材类型。见表1。

表1 三等位基因座检出分布情况(n, %)

STR 基因座	检出频次	总检出频次 占比	检出率	高频基因座 占比
D21S11	10	26.32	27.03	35.71
Penta D	8	21.05	21.62	28.57
D18S51	4	10.53	10.81	14.29
D3S1358	3	7.89	8.11	10.71
vWA	3	7.89	8.11	10.71
D8S1179	2	5.26	5.41	0
D13S317	2	5.26	5.41	0
D7S820	2	5.26	5.41	0
D16S539	2	5.26	5.41	0
FGA	1	2.63	2.70	0
TH01	1	2.63	2.70	0
合计	38	100.00	100.00	100.00

3.2 检出三等位基因的遗传分析

32例三等位基因样本中，均衡型三等位基因21例，占65.63%；失衡型三等位基因11例，占34.37%，失衡型样本中峰高/峰面积比例以2:1:1为主，共9例，占失衡型样本的81.82%。14例亲缘鉴定样本中，可明确追溯的遗传来源共8例，其中6例从父代或母代单一亲代遗传，获得三个等位基因，2例由父母双方分别遗传等位基因后，形成复合三等位基因，该8例样本均为均衡型分型；6例亲缘鉴定样本未发现明确遗传来源，均为失衡型分型。所有均衡型三等位基因样本，均未发现样本供体存在其他染色体异常表型，失衡型样本中3例检测，发现存在低度染色体嵌合现象，占失衡型样本的27.27%。

3.3 三等位基因测序验证

32例初筛检出的三等位基因样本，经重复3次扩增后，30例样本仍稳定检出三等位基因，2例样本恢复为常规二等位基因分型。对30例重复扩增阳性样本，经Sanger测序验证，28例样本测序结果显示，存在三个不同的特异性等位基因序列，确认为真性三等位基因，测序验证符合率为93.33%；2例样本测序未发现三个特异性等位基因序列，确认为伪三等位基因，经引物序列比对分析，2例伪三等位基因，因试剂盒引物结合区序列差异，导致出现非特异性扩增，形成假阳性等位基因峰。11例失衡型三等位基因经测序验证，均检测到等位基因扩增效率差异，有关于PCR扩增过程中模板结合偏差。

4 结语

法医DNA鉴定中STR基因座的三等位基因异常分型,检测结果是否准确性,将直接影响法医学鉴定结论的可靠性,本研究明确三等位基因的检测分布规律与核心特征。D21S11、Penta D、D18S51成为高频检出基因座,主要由于该类基因座定位于21号染色体,该染色体为常染色体数目异常的高发染色体,21-三体综合征等染色体拷贝数异常现象,极易导致该区域基因座,出现三个等位基因拷贝,进而在STR分型中呈现三等位基因特征,这也与该类基因座的染色体定位特征高度相关^[3]。

根据三等位基因的遗传分析结果,均衡型与失衡型分型存在显著遗传差异,均衡型分型占比更高,且多存在明确遗传来源,多由亲代遗传异常导致的染色体拷贝数稳定异常引起。三个等位基因在基因组中,拷贝数均比较稳定,因此在PCR扩增中扩增效率趋于一致,呈现1:1:1的峰高/峰面积比例;失衡型分型多无明确遗传来源,且部分样本存在染色体嵌合现象,因不同细胞系中染色体拷贝数存在差异,扩增后等位基因的峰高/峰面积比例失衡,以2:1:1为主,该类型易混淆于混合斑迹相,在法医学检案中属于极易出现三等位基因分型误判类型。

根据本研究测序验证符合率为93.33%,2例假三等位基因均由非特异性扩增导致,这说明单一试剂盒检测易出现假阳性结果,实验试剂的引物设计特征,会直接影响三等位基因的初筛结果。重复扩增可有效排除部分实验操作误差,降低假阳性率,而测序验证能从基因序列层面,确认等位基因的真实性,是真性三等位基因鉴定的金标准^[4]。失衡型三等位基因的测序结果显示,扩增效率差异作为核心特征,该特征可作为区分失衡型三等位基因与混合斑迹的重要依据,混合斑迹多存在不同个体的等位基因叠加,而失衡型三等位基因的三个等位基因,均来自同一供体,仅存在扩增效率的差异。

在法医学检案中,三等位基因的规范化检测与分析,

需建立多步骤流程,首先需采用两种及以上不同试剂盒,进行双重PCR扩增,减少试剂特异性导致的假阳性。其次对初筛阳性样本进行多次重复扩增,排除实验操作与设备误差。随后结合样本类型完成遗传分析,亲缘鉴定样本,追溯家属分型结果,分析遗传传递规律,个体识别样本统计分型比例特征。最后对疑似样本测序验证,确认真性三等位基因,排除伪三等位基因干扰^[5]。在鉴定结论判定中,对于均衡型三等位基因,可直接纳入个体识别的似然率计算及亲缘鉴定的遗传规律分析;而对于失衡型三等位基因,则需结合测序结果与扩增特征,在排除混合斑迹后方可进行数据分析,以避免单一分型结果导致误判^[6]。

综上所述,法医DNA鉴定中,三等位基因的检出有明显基因座特异性,D21S11、Penta D为高频检出基因座;三等位基因分为均衡型与失衡型,二者遗传形成机制存在显著差异,均衡型多源于稳定的染色体拷贝数异常,失衡型多与染色体嵌合相关。测序验证可有效区分真性与伪三等位基因,非特异性扩增是伪三等位基因的主要形成原因。通过多试剂盒检测、重复扩增、遗传分析与测序验证的联合方法,能够提高三等位基因的精准检测性,避免分型误判,保证法医DNA鉴定结论的准确可靠。

参考文献

- [1] 邓静怡. 法医DNA鉴定中常染色体STR三等位基因型的研究进展[J]. 工业微生物,2025,55(1):37-39.
- [2] 马晓燕,孙宏钰,黎青. 常染色体STR三等位基因型在法医DNA分析中的研究进展[J]. 法医学杂志,2023,39(3):240-246.
- [3] 贾小妮,焦杨,张洪波,等. 法医DNA鉴定中三等位基因的检测与分析[J]. 热带医学杂志,2024,24(4):486-489.
- [4] 徐冬冬,王韵,杨慧凌,等. 亲子鉴定中Penta D出现三等位基因1例[J]. 法医学杂志,2021,37(6):912-913.
- [5] 刘双爱,张晓燕,娄季武,等. 1例新的Penta D基因座off-ladder等位基因测序分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2024,32(3):545-549.
- [6] 李瑞尊,冯保强,范丽萍,等. 亲缘鉴定中四配子异源嵌合体1例[J]. 中国法医学杂志,2025,40(6):768-770,773.