



法医基因组学专用的 Illumina 新一代测序系统

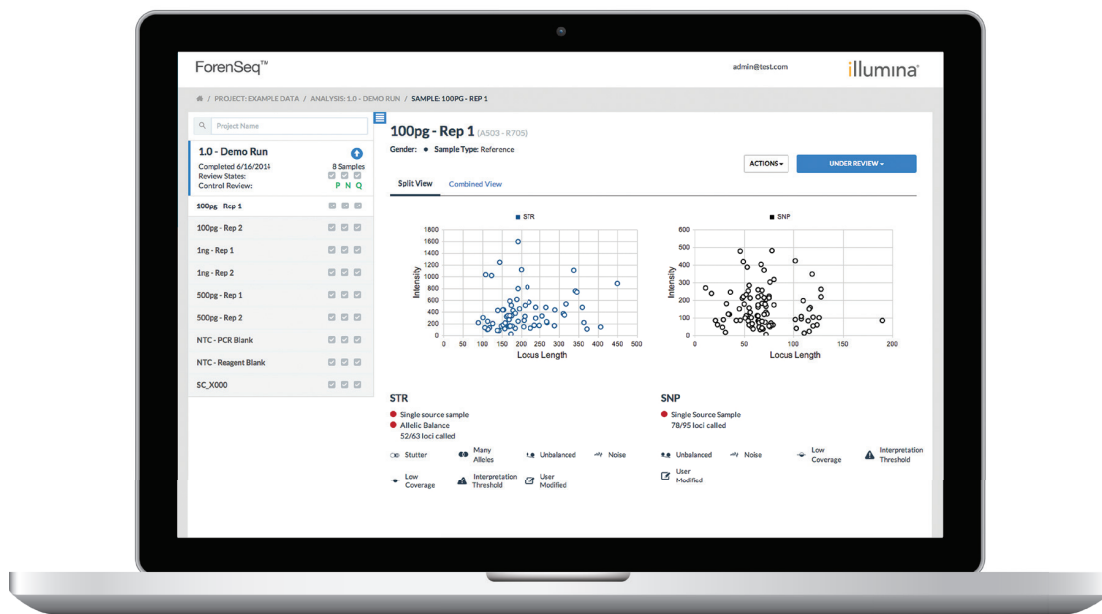
MiSeq FGx™ 法医专用测序仪

ForenSeq™ DNA Signature 样本制备扩增试剂盒

ForenSeq™ UAS 法医分析软件

illumina®

AAAGAAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA
AATCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTAAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA
AACGACGAAAAGAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA
TTAAAGTACCATTAAGAGCTACCGTCAACAGTAAACACACTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA
AAAAGATTGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA
AAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTAAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA
AACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA



第一个也是唯一一个经过验证的包含 STR 和 SNP 的试剂盒



总常染色体
STR



总 Y 染色体
STR



身份
SNP



表型
SNP



先祖
SNP



X-STR

目录

I. 法医基因组学专用的 Illumina 新一代测序系统	5
II. Illumina NGS 扩增子测序的基本流程	5
III. 法医基因组学专用的 Illumina NGS 解决方案	5
a. 通过 STR 和 SNP 进行人类身份鉴定	7
b. 线粒体 DNA 分析	8
IV. 法医基因组学应用 Illumina NGS 测序技术的优势	9
a. STR 内 SNP 的检测	9
b. 多种 DNA 多态性的同时分析	9
c. 数字化数据提供更高的检测灵敏度	11
d. 多重文库制备提供更高的样本通量	11
V. 未来展望	12
VI. 词汇表	13
VII. 参考文献	14
VIII. 订购信息	14

www.illumina.com/applications/forensics.ilmn

AAAGAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA
AATCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTAAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA
AACGACGAAAAGAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCT
TTAAAGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTAAACAGTAAACACACTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAAGGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTAAACGACGAAAAGAATGA
AAAAGATTGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCA
AAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTAAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTAAACGACGAAAAGAATGATAAC
AACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTAAACGACGAAAAGAATGATAAC

III. 法医基因组学专用的 Illumina NGS 解决方案

a. 通过 STR 和 SNP 进行人类身份鉴定

与法庭科学专家团队合作开发，并充分利用 MiSeq® 系统的成熟技术，Illumina 创立了 MiSeq FGx™ Forensic Genomics System——第一个经过全面验证⁷、专门为法医基因组学应用而设计的新一代测序系统。此系统为法庭科学 DNA 样本的分析提供了一个从 DNA 准备到数据分析的完整流程（图 2）。

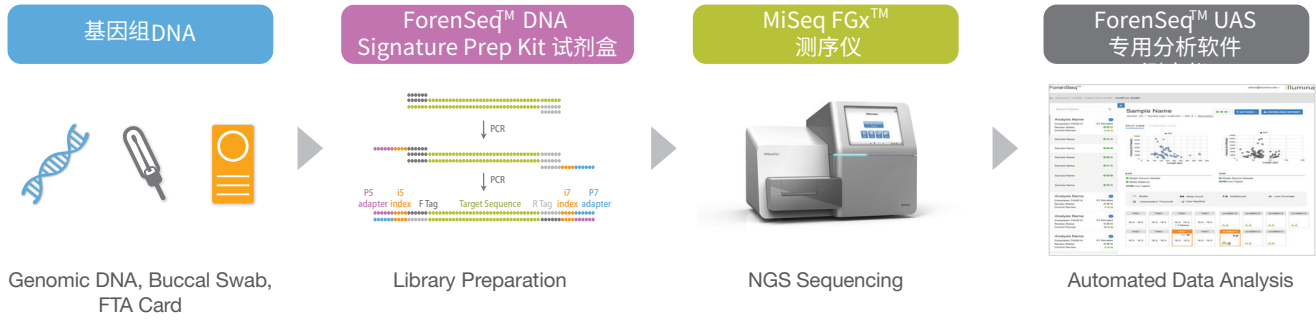


图 2: MiSeq FGx Forensic Genomics System 的检验流程。 MiSeq FGx™ Forensic Genomics System 是一套从 DNA 准备到数据分析的完整解决方案，其中包括文库制备试剂、DNA 测序平台，以及专门为法医基因组学设计的数据分析软件。MiSeq FGx System 提供了目前最完整的一体化检验流程。

此流程从 ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit 开始，盒内包含利用简单的平板形式和常规的试验设备制备 DNA 文库所需的全部试剂。ForenSeq DNA Signature Prep Kit 利用简化的流程一次检测即可获得 200 多个法医相关的遗传标记，而无需多个 STR 试剂盒⁸。此试剂盒不仅囊括了目前全世界在案件和罪犯 DNA 建库中常规使用的常染色体 STR 标记，还包含了传统 CE 方法不常使用的 Y- 和 X-STR 及 SNP 标记。这些标记包括：一组身份识别的 SNP 标记 (iiSNP)^{9,10}，它们提供个体认定的信息，特别适合降解、混合或混有 PCR 抑制物的样本。另外还包括表型 SNP 标记 (piSNP)¹¹，它们预测眼睛颜色（蓝色、中间色、棕色）和头发颜色（棕色、红色、黑色、金色），以及先祖 SNP 标记 (aiSNP)^{12,13}。

表 1. ForenSeq DNA Signature Prep Kit 中包含的法医应用位点

位点	位点数目 ^a	片段长度 (bp)
常染色体 STR	27	61-467
Y-STRs	24	119-390
X-STRs	7	157-462
身份识别 SNPs	94	63-231
表型 SNPs ^b	22	73-227
先祖 SNPs	56	67-200

a. SNP 和 STR 在染色体上的位置可查阅 ForenSeq DNA Signature Prep Kit 使用指南。(http://support.illumina.com/downloads/forenseq-dna-signature-prep-guide-15049528.html)

b. 2 个用于预测头发 / 眼睛颜色的表型 SNP 标记，同时也用于先祖 SNP 标记预测。

AAGAAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAACTTAAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTACCGTAAACGAACGTTCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTATCCACTGATTC
AATCAACGTACCGTAAACAGCTATCATTAAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTACCGTAAACGAACGTTCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTATCCACTGATTC
AACGACGAAAGAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAACTTAAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTACCGTAAACGAACGTTCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTT
TTAAAGTACCTATTAAAGAGCTACCGTGAACAGTAAACACACTTCTGTTAACTTAAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTACCGTAAACGAACGTTCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTGAACAGC
AAAAGAAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAACTTAAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTACCGTAAACGAACGTTCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACTTAAGATTACTTGAATCA
AAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTAAACAGCTTAAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTACCGTAAACGAACGTTCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACTTAAGATTACTTGAATCA
AACGTATCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTCTGTTAACTTAAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTACCGTAAACGAACGTTCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTGAACAGC
AAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTAAACAGCTTAAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTACCGTAAACGAACGTTCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACTTAAGATTACTTGAATCA
AAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTAAACAGCTTAAGATTACTTGAATCAACTGATTCACCGTACCGTAAACGAACGTTCAATTGAGACTAAATATTAAACGTACCATTAAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACTTAAGATTACTTGAATCA

Nextera XT 试剂盒目的在于以最高效率从少量样本中分离出特定的基因组区域。例如，Nextera 试剂盒能够从低至 1 ng 的 gDNA 快速制备 mtDNA 目标区域。利用单个酶学“片段化”反应来片段化并给扩增子加上测序接头，整个 Nextera XT 方案所需的时间不到 90 分钟（其中包括手动操作时间约为 15 分钟）。在单次测序运行中，Nextera XT DNA Library Prep Kit 最多可以进行 384 个文库的多重样本制备，将复杂的 Sanger 测序过程转变成简单的流程。

文库制备完成后，mtDNA 文库可在 MiSeq FGx 系统（RUO 模式）上进行测序。虽然 MiSeq FGx 系统是专为法医分析而设计，但它的 RUO 模式同样支持其他更广泛的测序应用，从 RNA 测序到人类外显子组测序，MiSeq 可实现各种 NGS 应用。

IV. 法医基因组学应用 Illumina NGS 测序技术的优势

全基因组测序（WGS）展示了个体之间在整个基因组上的所有等位基因差异，包括存在于编码区、调控区和内含子区域的所有变异。尽管 WGS 对人类生物学和疾病的研究是极其珍贵的，也带来了最全面的基因组数据，但它同时需要强大的数据管理和数据分析能力。法庭科学家通常只需开展法医相关位点的靶向测序，而不需获得如此庞大的基因组数据。通过对特定区域基因组的测序，案件和数据库分析工作可直接针对那些最能解决法医问题的基因组区域。这种方法既避免了隐私方面的顾虑，又产生了易于管理的数据量，并简化了数据分析——而这些都是目前法庭科学 DNA 检验流程中常见的瓶颈问题。同时这种靶向测序也减少了由于 CE 检测分型是基于片段长度检测所带来的诸多限制。

a. STR 内 SNP 的检测

NGS 应用于法医基因组学的一个明显优势是，能够分辨长度相同、但碱基序列不同的等位基因。STR 内的 SNP 序列、mtDNA 的 SNP 序列，以及意外信号或数据假象的完整序列都能在核苷酸水平上评估，这些为案件和人员身份鉴定应用提供了一种强大而精确的方法。ForenSeq Universal Analysis Software 的用户界面可以方便地查看 STR 内 SNP 的数据，位点详情界面显示了测序强度信息、目标 DNA 碱基片段序列，以及更多详细信息（图 5）。

b. 多种 DNA 多态性的同时分析

在法庭科学实验室，CE 分型技术的最大限制就是，不能同时分析不同种类的多态性，这使得实验室需要同时验证和维护多个 PCR 系统。CE 分型通常需要多轮检测，这对于含量有限或质量不佳的检材而言是不可能的，或是无法产生足够的信息量来得出结论（图 6）。这些所有的程序都需要单独的 QA/QC 和培训流程，这都给实验室的维护工作增添很多负担。而 NGS 技术就克服了这些限制。

NGS 系统可以在单个检测中同时分析大量相关的 STR 标记和密集的 SNP 标记，从而简化了检测流程。此外，由于 ForenSeq DNA Signature Prep Kit 中的 SNP 标记扩增片段长度很短，也增强了对降解样本的分析能力。同时，NGS 系统也实现了可见性状的表型分析，如头发颜色、眼睛颜色，和先祖信息。NGS 系统带来了更大的数据量，而基于 NGS 技术的 STR 分型保留了标准的等位基因命名并与现有数据库兼容——这些都使全球共用的遗传标记组合发挥更大的作用。

AAAGAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGACGAAAAGAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAAAC
AATCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGATTACTTGTATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGACGAAAAGAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAAAC
AACGACGAAAAGAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGACGAAAAGAATGATAAC
TTAAAGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGATAACACACTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGACGAAAAGAATGATAAC
AAAGAATGATAACAGTAAACACACTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGACGAAAAGAATGATAAC
AAGATTACTTGTATCCACTGATTCAACGTAAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTTCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTTACCGTAAACGA
AACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTGTTAAACCTTAAGATTACTTGTATCCACTGATTCAACGTACCGTAAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGACGAAAAGAATGATAAC

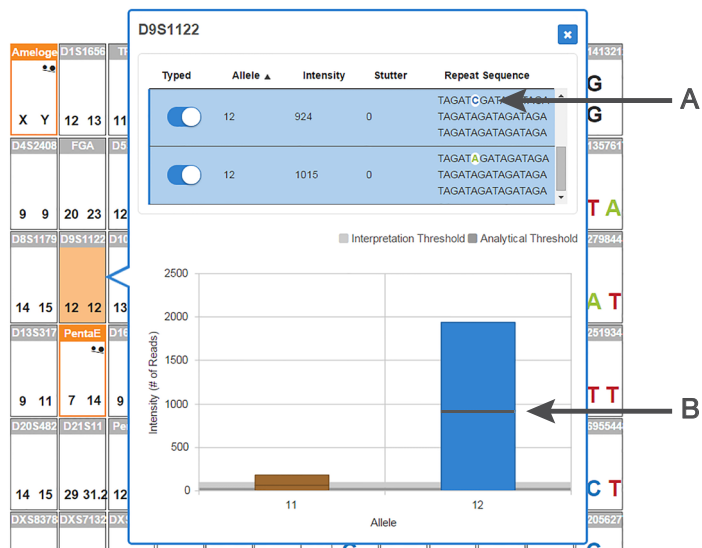
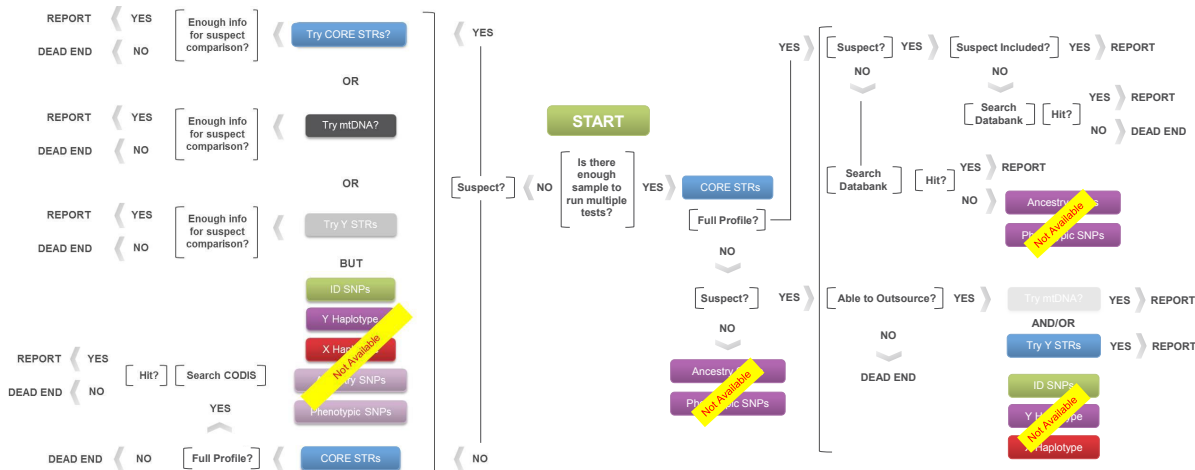


图 5: ForenSeq Universal Analysis Software – 位点详情界面和高分辨率基因分型。点击任何位点的基因型方框,即可在弹出的位点详情界面中进行查看。在这个例子中,位点详情界面显示 D9S1122 上检测到两个相同长度的 12 等位基因,但 DNA 片段内碱基序列不同。STR 序列内的 SNP 变异(等距杂合子)有两个提示指标: A)“重复序列”一列显示了每个 12 等位基因的碱基序列,并强调了 STR 片段内的 SNP 变异; B) 12 等位柱状图表示测序强度,柱状条上的水平线表明了这两个 12 等位基因在基因型图上的大致定量分布。但是,CE 技术是无法识别这些 STR 等位基因内部的差异的,因为它只能根据 STR 扩增片段的长度进行基因分型。

基于CE技术的分析流程系统



基于Illumina NGS 技术的法医基因组学分析流程系统

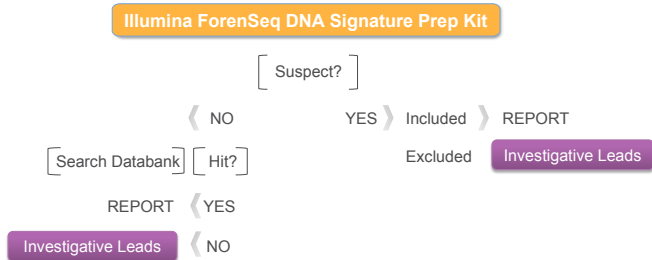


图 6: 单次流程即可检测多于 200 个遗传标记, Illumina 的 ForenSeq DNA Signature Prep Kit 为人类身份鉴定提供了最简单、也是最直接的途径。

c. 数字化数据带来更高的灵敏度

基于 CE 的检测系统产生模拟的指标，如峰的颜色、大小、形状和高度，而 Illumina 所有的 NGS 系统提供精确的数字数据（如，离散的 read 计数）。NGS 系统的数字化属性以及通过提高或降低覆盖度水平而调节灵敏度的功能，支持了无限动态的分析范围。数字化的 read 计数和深度测序，同时又提供了高灵敏度的量化应用，如复杂混合物中极少量的 DNA 成分检测，这些极少量的成分在 CE 系统检测中可能丢失或仅检测到部分数据。例如，在开展 mtDNA 异质性分析时，NGS 深度测序可检测 ~1% 的次要变异频率，相比之下，CE 系统测序只能检测 > 10-20% 的次要变异频率。

d. 多重文库制备带来更高的通量

NGS 通过给测序片段添加独特的条形码（索引序列）而实现了文库多重分析，这使其支持扩展的通量达到了 CE 方法无法实现的水平（图 7）。法庭科学样本文库在严格受控的方式下合并，利用 ForenSeq DNA Signature Prep Kit 可同时测序 96 个样本文库（潜在有望达到 384 个），或利用 Nextera XT DNA Library Prep Kit 可同时测序 384 个样本文库。

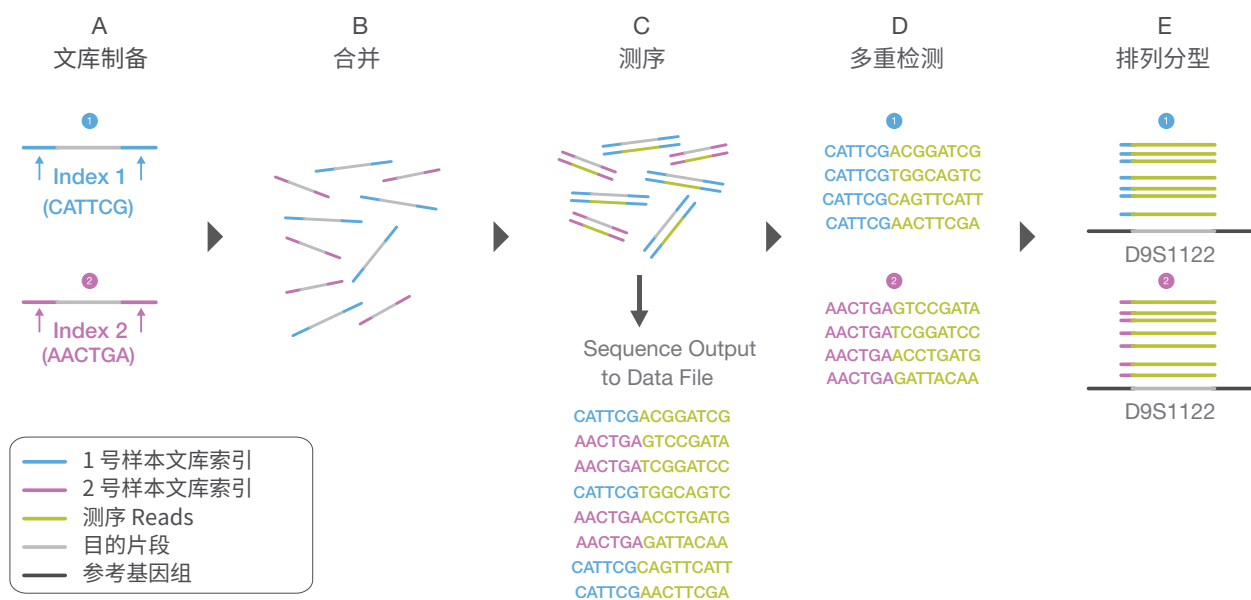


图 7: 多重文库制备概述。

- 在文库制备的过程中，向两个不同的样本添加独特的索引序列。
- 将带索引的文库合并在一起，并上样到 MiSeq FGx 仪器的流动槽 (Flow Cell) 上。
- 合并的样本文库在单次检测过程中测序。序列以整体的输出文件导出。
- 根据索引序列结果将合并的样本分成独立的文件。
- 每组序列与相应的 ForenSeq 目标序列比对。

V. 未来展望

目前的法庭科学检验流程仍使用早期“人类基因组计划”之前的技术，该项技术人为地删减了基因组学的强大功能，并且必需多轮的分析才能产生完整的遗传图谱。使用 NGS 技术，法庭科学家就能获得更大信息量的更多位点，实现降解样本的出色分析，完成更精确分辨率的测序流程，并且能够通过多重文库制备实现更高的检测通量。这些优势都将有助于在更短的时间内解决更多的案件，并将为那些陷入僵局的案件提供调查线索。以 Illumina 的 SBS 技术为核心，MiSeq FGx 系统成为第一套专为法医基因组学应用而设计的 NGS 系统。

DNA 数据库组织正在扩展现有的标记组合，以便与全球和各地的执法部门完成更加高效、更多合作的工作。全世界的科研团队正在利用 NGS 技术继续开发法庭科学案件和人类身份检测的新系统。目前的研究工作正在评估 piSNP 标记，这些标记提供了与鼻、唇、耳的形状、整体面部外形以及身高、卷发等特征关联的信息^{16,17}。随着法医基因组学方法的不断进步，Illumina 将更加致力于支持和推进这些工作。

VII. 参考文献

1. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456(7218):53–9.
2. Nakazato T, Ohta T, Bono H. Experimental design-based functional mining and characterization of high-throughput sequencing data in the sequence read archive. *PLoS One* (2013)22;8(10):e77910.
3. Sebastian J, Fritz JS, Karola P, et al. Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol*. 2013;31:294–296.
4. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. 2012;30:434–439.
5. Quail MA, Smith M, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences, and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13:341.
6. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:251364.
7. The full MiSeq FGx System workflow is validated per the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) guidelines (www.swgdam.org).
8. Illumina (2014) ForenSeq DNA signature prep kit data sheet (www.illumina.com/products/forenseq-dna-signature-kit.ilmn).
9. Kidd KK, Pakstis AJ, Speed WC, et al. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic Sci Int*. 2006;164(1):20–32.
10. Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*. 2006;27(9):1713–1724.
11. Walsh S, Liu F, Wollstein A, et al. The HlrIsPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet*. 2013;7(1):98–115.
12. Kidd KK, Speed WC, Pakstis AJ, et al. Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. *Forensic Sci Int Genet*. 2013;10:23–32.
13. Phillips C, Prieto L, Fondevila M, et al. Ancestry analysis in the 11-M Madrid bomb attack investigation. *PLoS One*. 2009;4(8):e6583.
14. Illumina. Human mtDNA genome protocol (support.illumina.com/downloads/human_mtdna_genome_guide_15037958.ilmn).
15. Illumina. Human mtDNA D-loop Hypervariable region protocol. (support.illumina.com/downloads/human_mtdna_d_loop_hypervariable_region_guide_15034858.ilmn).
16. Illumina (2012) By digging deeper into the genome, next-generation sequencing may yield more forensic clues. Interview. (applications.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/other/interview_budowle.pdf).
17. Claes P, Hill H, and Shriver MD. Toward DNA-based facial composites: preliminary results and validation. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;13:208–16.

VIII. 订购信息

Product	Catalog No.
MiSeq FGx Instrument	SY-411-1001
MiSeq FGx Reagent Kit	TG-143-1001
ForenSeq DNA Signature Prep Kit (384人份)	TG-450-1001
ForenSeq Index Adapter Fixture	FC-451-1001
ForenSeq Universal Analysis Software	SE-550-1001



