

司法 鉴 定 技 术 规 范

SF/Z JD0105008——2018

法医物证鉴定线粒体 DNA 检验规范

Specification of mitochondrion DNA testing for forensic purpose

2018-11-08 发布

2019-01-01 实施

中华人民共和国司法部公共法律服务管理局 发布

目 次

前言.....	II
引言.....	III
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 基本要求.....	2
5 检验程序.....	2
6 结果比对与解释.....	4
7 鉴定意见.....	5
8 鉴定文书.....	5
9 特别说明.....	5
附录 A（资料性附录） IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).....	7
参考文献.....	8
图 1 线粒体序列比对模式及报告形式（A）样本 Q 和样本 K 的 mtDNA 序列与 rCRS 的比对；（B）简化为仅报告与 rCRS 存在差异的报告形式.....	4

前 言

本技术规范按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本技术规范由司法鉴定科学研究院提出。

本技术规范由司法部公共法律服务管理局归口。

本技术规范起草单位：司法鉴定科学研究院、四川大学华西基础医学与法医学院、北京市公安局、中山大学。

本技术规范主要起草人：李成涛、张素华、侯一平、刘雅诚、边英男、孙宏钰、吕德坚、李莉、刘希玲。

本技术规范附录A为资料性附录。

本技术规范为首次发布。

引 言

本技术规范运用法医物证学、遗传学和统计学等学科的理论和技术，结合法医物证鉴定的实践经验而制订，为法医学线粒体DNA检验提供科学依据和统一标准。

法医物证鉴定线粒体 DNA 检验规范

1 范围

本技术规范规定了法医学DNA实验室进行人类线粒体DNA检验的基本要求、检验程序、结果比对与解释、鉴定意见和鉴定文书。

本技术规范适用于法医学DNA实验室采用线粒体DNA遗传标记对母系亲缘关系如母子（女）、隔代外祖母/外孙（女）、舅甥关系、姨甥关系、同母的全同胞或半同胞进行亲缘关系鉴定。

本技术规范适用于法医学DNA实验室对降解严重的毛干、骨、牙等生物检材，在无法获取核基因组DNA或核基因组DNA量不足而无法完成检测时进行线粒体DNA检测，帮助个体身份信息的确认。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GA/T 383-2014 法庭科学DNA实验室检验规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

线粒体 DNA mitochondrial DNA, mtDNA

人类唯一的细胞核外DNA，呈闭环双链结构，约16.5 Kb；不遵循孟德尔遗传定律，表现为母系遗传，通过卵细胞将其中的遗传信息传递给后代；无有丝分裂和减数分裂的周期变化；遗传物质位于细胞器内，不受核移植的影响；单个细胞中mtDNA拷贝数多；存在异质性现象。

3.2

异质性 heteroplasmy

当两种或两种以上的mtDNA序列存在于同一个细胞、组织或个体时称为异质性，可分为长度异质性和点异质性，常见于以下两种情况：（1）个体在同一组织检出不同的mtDNA序列；（2）个体在不同的组织检出不同的mtDNA序列。

3.3

高变区 hypervariable region, HVR

位于 mtDNA 非编码区的 DNA 区域，突变率可达到单拷贝核基因组的 6-17 倍，且无修复系统、不受选择压力的影响，积累了较多的变异，多态性好。

注：也称为控制区（control region），或者D-环区（D-loop region），可分为高变区I（HVR-I）、高变区II（HVR-II）和高变区III（HVR-III）。

3.4

安德森参考序列 **Anderson reference sequence, ARS**

安德森于 1981 年在英国剑桥 Sanger 实验室首次完成测定的人类线粒体 DNA 序列，GenBank 登录号：M63933。

注1：也被称为剑桥参考序列（cambridge reference sequence, CRS）。

注2：1999 年，安德鲁斯等人对剑桥参考序列所用的样本进行了重新测序，修正了最初公布序列中的 11 个碱基序列。

修订的剑桥参考序列（revised cambridge reference sequence, rCRS）是目前法庭科学公认的标准参考序列（GenBank 登录号：NC_012920.1）。

4 基本要求

4.1 鉴定机构应具有从事法医物证的执业范围，且应满足如下要求：

- a) 定期参加能力验证相关计划并考核合格；
- b) 对所有影响鉴定结果的人员岗位规定相应的能力要求，包括教育、资质、培训、专业知识、技能等，并保留相关记录；制定适宜的培训计划并组织实施；
- c) 依据鉴定方法和要求对鉴定人以及参与鉴定工作的人员进行监督，以评价其鉴定工作的符合性和满意程度；监督的结果应作为培训需求评价的依据之一；
- d) 具有能识别样本的标识系统，并确保样本在鉴定过程期间能得到持续的识别；
- e) 建立样本的运输、接收、处置、保护、存储、保留和/或清理的规定，应对接收、内部传递、处置、保留、返还和清理等过程进行记录，确保记录的完整性和可追溯性。

4.2 鉴定人应具有法医物证鉴定执业资格，熟悉并掌握线粒体 DNA 检验的方法和原理，并能正确评价结果。

4.3 鉴定活动应包括检验（采样、DNA 提取和纯化、DNA 定量分析、mtDNA 测序）、结果比对与解释、鉴定意见判断、鉴定文书撰写等环节。鉴定活动完毕后，应将各个环节的记录进行归档。

5 检验程序

5.1 采样要求

5.1.1 毛根、毛干、指甲、陈旧骨骼、牙、核 DNA 检测失败的血痕、组织等生物检材均可考虑检测 mtDNA。进行同一母系关系比对时，尽量采集同一种类型的生物检材。

5.1.2 样本应分别包装，注明被鉴定人姓名、编号、采样日期等。

5.1.3 样本采集后应冷藏或冷冻保存。

5.1.4 采样单须在案件鉴定完毕后同其他原始技术记录一并存入档案。

5.2 DNA 提取和纯化

按照GA/T 383-2014中附录A的方法执行。

5.3 DNA 定量分析

按照GA/T 383-2014中6.1~6.3的方法执行。

5.4 mtDNA 测序

5.4.1 mtDNA 高变区测序

可选择商品化mtDNA测序试剂盒（或自行针对HVR区域设计的体系）进行PCR扩增和测序。

本规范提供了一个自行针对HVR区域设计的体系示例，操作如下：

a) PCR 扩增

PCR 扩增体系：包含 5 μL 10×PCR Buffer、5 μL 25 mmol/L MgCl₂、2 μL 10 mmol/L dNTP、10 μL 2.5 μmol/L 引物对、0.4 μL Golden Taq 酶及 1-5 ng DNA，去离子水补足至 50 μL。

HVR-I 引物对：

L16047: 5'-CAT GGG GAA GCA GAT TTG-3'

H16464: 5'-TTA GCT ACC CCC AAG TGT-3'

HVR-II 引物对：

L29: 5'-GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C-3'

H408: 5'-CTG TTA AAA CTG CAT ACC GCC A-3'

PCR 扩增条件：94℃，11 min；94℃ 30 s，55℃ 60 s，72℃ 90 s，35 个循环；72℃，7 min。

注：本示例中 HVR-I 区域与 HVR-II 区域采用相同的 PCR 扩增体系及扩增条件。

b) 测序

宜采用商品化纯化试剂盒（或其他方法）对 PCR 扩增产物进行纯化；宜采用商品化测序试剂盒进行测序 PCR 反应及毛细管测序电泳；用测序软件对收集的电泳数据进行结果分析。

5.4.2 mtDNA 全基因组测序

宜选择商品化mtDNA全基因组测序试剂盒（或自行针对mtDNA全基因组设计的体系）进行文库构建、定量、模板制备及测序。操作要求参考相关试剂盒说明书。

5.4.3 质量控制

从事mtDNA测序的实验室至少应该包括以下质量控制措施：

5.4.3.1 对照设置

为保证mtDNA测序结果的准确性，要求每次实验过程中均设置阳性对照和阴性对照。阴性对照包括：（1）提取试剂的空白对照，用于监控从提取到分析环节是否存在污染；（2）PCR试剂的空白对照，用于监控从扩增到分析环节是否存在外源DNA污染。

5.4.3.2 双向测序

为避免潜在的异质性影响和保证结果的可靠性，宜进行正、反链双向测序，并至少重复一次。

5.4.3.3 污染防控

mtDNA测序最关键的环节是防止污染。具体防污染措施如下：

- a) 实验人员着防护服（如穿一次性实验服），勤换手套、帽子等；
- b) 实验工作台在使用前及使用后须彻底清洁，如用漂白剂进行清洁、用紫外线照射实验工作台表面等；有条件的情况下，最好使用超净台进行实验；
- c) 实验用移液器、枪头、试剂管等在使用前应进行紫外线消毒；
- d) 扩增前和扩增后区域应物理隔离；

- e) 每次仅处理单个案子的单个样本，证据样本的检测和扩增应优先对照样本进行处理，或在其它单独隔离的实验室进行处理；
- f) 应建立实验室相关人员 mtDNA 遗传信息的排查数据库。

5.4.3.4 双人操作

序列比对须由两名鉴定人员采用专业比对软件独立完成。

5.4.3.5 线粒体参考人群数据库

实验室宜建立mtDNA参考人群数据库，有助于对数据进行质量控制和解释新出现的单倍型序列数据。在尚未建立mtDNA数据库前，可参考国际法医遗传学会推荐的线粒体DNA数据库EMPOP（www.empop.org）。

6 结果比对与解释

6.1 检测样本与参照样本的测序比对

样本mtDNA序列应与修订的剑桥参考序列rCRS进行比对，结果的表述中需要指明差异位置及比对范围。

原则上，对照样本序列数据用K标示（Known的第一个英文字母），证据样本序列数据用Q标示（Question的第一个英文字母），借助比对软件与rCRS进行序列比对。序列比对模式及报告形式见图1。

A. 线粒体DNA序列与rCRS比对							
	16090	16100	16110	16120	16130	16140	
rCRS	ACCGCTATGT	ATTCGTACA	TTACTGCCAG	CCACCATGAA	TATTGTACGG	TACCATAAAT	
Q	ACCGCTATGT	ATC ⁻ TCGTACA	TTACTGCCAG	CCACCATGAA	TATTGTACAG	TACCATAAAT	
K	ACCGCTATGT	ATC ⁻ TCGTACA	TTACTGCCAG	CCACCATGAA	TATTGTACAG	TACCATAAAT	

B. 仅报告与rCRS差异的报告形式	
样本Q	样本K
16093C	16093C
16129A	16129A

图1 线粒体序列比对模式及报告形式 (A) 样本 Q 和样本 K 的 mtDNA 序列与 rCRS 的比对；(B) 简化为仅报告与 rCRS 存在差异的报告形式

序列比对的基本原则如下：

- a) 运用与参考序列最少数目的差异进行特征分型；
- b) 如果不同分析方法比对的结果不一致，应按以下顺序优先考虑差异方式：插入/缺失，转换，颠换；
- c) 插入和缺失应放在 3'末端（即长度多态性的最末端）。

根据样本和 rCRS 比对进行分型命名，命名基本原则如下：

- a) 与 rCRS 序列相比, 存在单个碱基的差异: 如在 HVR-II 的第 73 位, rCRS 序列为碱基 A, 检测样本为碱基 G, 该位点应记录为 73G;
- b) 与 rCRS 序列相比, 存在碱基插入: 先确定插入位置, 再记录插入碱基个数及插入碱基。如在第 315 位和第 316 位之间存在 1 个碱基 C 的插入, 应记录为 315.1C;
- c) 与 rCRS 序列相比, 存在碱基缺失: 先确定缺失的位置, 再记录缺失碱基信息。如在第 523 位存在 1 个碱基 A 缺失, 应记录为 523 A-del、523del、523DEL 或 523-, 不能表述为 523D 或 523d;
- d) 异质性位点的命名: 应按照国家联盟理论与应用化学代码 (IUPAC) 进行命名, 参见附录 A。IUPAC 命名均采用大写字母, 其中, N 仅代表在该位置检见 A、G、C、T 四种碱基或未检见任何碱基信息。

6.2 异质性的确认

点异质性的确认要求 mtDNA 测序质量合格, 且正反向测序均检测到单个碱基位置上出现了两个碱基。

对于 HVR-I 和 HVR-II 多聚 C 区域出现的长度异质性, 可以采取 2 个独立反应对相同单链测序 2 次, 或者采用不同的引物扩增双链, 以保证数据质量。其中, 在 HVR-I 区域多聚 C 常位于 16184 nt-16193 nt; 在 HVR-II 区域多聚 C 常位于 303 nt-315 nt。

7 鉴定意见

7.1 根据 mtDNA 检验结果进行鉴定意见判断, 一般分为三类: 排除、不排除或不确定。

7.2 鉴定意见判断可参考以下原则:

- a) 证据样本与对照样本的 mtDNA 序列相对比, 存在两个或两个以上碱基差异 (不包括长度异质性), 可以排除两样本来自同一个体或同一母系;
- b) 证据样本与对照样本的 mtDNA 序列相同, 不排除两样本来自同一个体或同一母系;
- c) 证据样本与对照样本的 mtDNA 存在不同异质性位点信息, 不排除两样本来自同一个体或具有母系亲缘关系的两个体;
- d) 证据样本与对照样本的 mtDNA 序列存在一个核苷酸差异, 且均未检测到异质性, 不确定两样本是否来自同一个体或同一母系。

8 鉴定文书

8.1 鉴定人根据检验结果、比对结果和鉴定意见撰写鉴定文书。

8.2 鉴定文书的格式要求宜按照主管部门或司法鉴定标准化委员会颁布的相关规范执行。

9 特别说明

9.1 建议采取全基因组测序方式建立 mtDNA 参考人群数据库。

9.2 mtDNA 呈单倍型遗传, 人类线粒体 DNA 单倍型类群 (human mitochondrial DNA haplogroup) 是遗传学上依据 mtDNA 差异定义出来的单倍群, 可用于追溯母系遗传的人类起源。同时, 通过单倍群信息分析 mtDNA 数据, 有助于对群体样本数据进行质量控制。可参考单倍群网站如 www.phylotree.org。

9.3 在法医学实践中,应充分认识到 mtDNA 能够提供的信息量有限,如果两份检材的 mtDNA 经过比对序列一致,只能说明不排除二者来自同一个体或同一母系。

9.4 在法医学实践中,应充分认识到 mtDNA 的异质性。异质性违背了同一个体 mtDNA 序列必然一致的前提条件,给个体识别增加了变数,在作出排除同一性意见时应十分谨慎。在实际鉴定中,如果遇到 1 个或 2 个碱基差异,需要考虑异质性存在,条件允许时应提取更多类型的检材进行复查,如果多份检材的异质性出现在同一位置,可增加同一个体认定的可能性。如果在多个位置出现序列的差异,要考虑混合样本或样本污染。

9.5 基于 mtDNA 存在潜在的突变,对相隔多代的个体进行母系亲缘关系分析时,应谨慎作出判断意见。

附 录 A
(资料性附录)

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

表A.1给出了国际联盟理论与应用化学代码 (IUPAC)。

表A.1 IUPAC 中代码的英文及中文含义

代码		英文含义	中文含义
G		Guanine	鸟嘌呤
A		Adenine	腺嘌呤
T	U	Thymine (Uracil)	胸腺嘧啶 (尿嘧啶)
C		Cytosine	胞嘧啶
R	A/G	Purine	嘌呤
Y	C/T/U	Pyrimidine	嘧啶
M	A/C	Amino	腺嘌呤或胞嘧啶 (氨基)
K	G/T	Ketone	鸟嘌呤或胸腺嘧啶 (酮基)
S	C/G	Strong interaction	强相互作用碱基
W	A/T	Weak interaction	弱相互作用碱基
H	A/C/T	Not G (H after G)	非鸟嘌呤
B	C/G/T	Not A (B after A)	非腺嘌呤
V	A/C/G	Not T/U (V after U)	非胸腺嘧啶
D	A/G/T	Not C (D after C)	非胞嘧啶

参 考 文 献

- [1] 侯一平. 法医物证学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2016.
- [2] 李成涛, 侯一平等. 英汉法医遗传学词典[M]. 北京:科学出版社, 2012.
- [3] Parson W, Gusmão L, Hares DR, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing.[J]. Forensic Sci Int Genet. , 2014, (13): 134-142
- [4] Carracedo A, Bär W, Lincoln P, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing[J]. Forensic Sci Intl, 2000, (110): 79-85
-