



Y 染色体短串联重复序列微流控芯片 复合扩增检测体系研究*

王道宇¹⁾ 万 群²⁾ 庄 斌³⁾ 赵丽健³⁾ 韩俊萍^{4)**} 李彩霞^{5)**}

(¹⁾ 中国人民公安大学侦查学院, 北京 100038; (²⁾ 山东第一医科大学基础医学院, 济南 250000;

(³⁾ 北京博奥晶典生物技术有限公司, 北京 101111; (⁴⁾ 北京市公安局朝阳分局刑事侦查支队, 北京 100025;

(⁵⁾ 公安部鉴定中心, 现场物证溯源技术国家工程实验室, 北京市现场物证检验工程技术研究中心, 北京 100038)

摘要 目的 构建 Y 染色体短串联重复序列 (Y-STR) 微流控芯片扩增检测试剂, 并进行性能验证, 实现 Y-STR 基因座的快速全集成检测。方法 使用 Y-STR 微流控芯片检测体系, 对其灵敏度、成功率和分型准确率、峰平衡性、精准性和准确性、检材适应性、混合物检测能力和抗抑制性进行验证评估。结果 DNA 标准品 9948 的模板量 ≥ 8 ng, 血卡片数 ≥ 3 片以及口腔拭子刮擦次数 ≥ 7 次时可获得 Y-STR 完整分型; 165 份样本的全集成检测成功率为 91.52%, 分型准确率为 99.74%; 不同荧光通道之间的峰高比值为 89.81%; 10 次运行的等位基因分型标准品的片段大小标准差均在 0.5 bp 以内, 20 份样本全集成检测的等位基因片段和相应的等位基因标准品之间的片段准确性均在 0.5 bp 以内; 能够对口腔拭子、血卡、唾液卡、烟蒂、血棉签、布片精斑等检材进行准确分型; 混合样本中较小贡献者与较大贡献者在 1:3 的比例时可获得完整基因分型; 在不同浓度的腐殖酸 (50~400 mg/L)、靛蓝 (20~100 nmol/L)、血红蛋白 (100~500 μ mol/L) 等抑制物的干扰下, 该体系可获得完整基因分型。结论 该体系可应用于国产 Quick TargSeq 法医 DNA 现场快速检测系统使用, 可在法医学实践中选用。

关键词 法医物证学, 微流控芯片, Y 染色体短串联重复序列

中图分类号 D9192, R89

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0222

Y 染色体作为男性所特有的染色体, 其 95% 的区域为非重组区 (non-recombining, NRY), 该区域在减数分裂时不能与 X 染色体发生交换重组^[1]。除发生突变外, 该区域可完整从父亲遗传至儿子。由于 Y 染色体遗传特殊性, 其在与男性相关的法医鉴定中具有重要作用, 如性侵案件中男女混合斑鉴定^[2-3]、父系亲缘关系鉴定^[4]、大规模灾难受害者身份识别^[5]、家系排查^[6]、族源推断^[7] 等法医学应用。法医学常用的 Y 染色体遗传标记为 Y 染色体短串联重复序列 (Y-chromosomal short tandem repeat, Y-STR), 但是目前其检测方法主要依赖传统实验室 DNA 检测技术, 包括 DNA 提取-定量、PCR 扩增、毛细管电泳检测, 整个过程耗时耗力, 且需要专业人员在专业实验室操作。近年来, 基于微流控芯片技术^[8-10] 的 DNA 快速检测仪因具有全自动、高度集成、车载便捷的性能而快速发展并相继上市销售, 如 RapidHIT™ 200、RapidHIT® ID、

ANDE™ 6C 等, 学界对上述仪器及配套试剂开展了大量验证评估^[11-14]。上述国外 DNA 快检仪配套试剂均为常染色体短串联重复序列 (STR) 个体识别试剂^[15-18], 尚未出现集成 Y-STR 试剂的芯片卡盒。本项目组前期研发出国产 Quick TargSeq 法医 DNA 快速检测仪, 配套了常染色体 STR 个体识别^[19] 和插入缺失多态性 (insertion/deletion polymorphism, DIP)^[20-21] 族群推断两类试剂。Y-STR 父系家系排查是目前案件侦查常用手段, 为实现 Y-STR 的快速全集成检测, 本研究构建了 Y-STR 微

* 2021 年北京市现场物证检验工程技术研究中心开放课题 (2021CSEKFKT06) 和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2022JB020) 资助项目。

** 通讯联系人。

韩俊萍 Tel: 010-65733778, E-mail: pgww19861025@163.com

李彩霞 Tel: 010-83752706, E-mail: licaixia@tsinghua.org.cn

收稿日期: 2023-06-06, 接受日期: 2023-08-10

流控芯片检测试剂, 并根据DNA分析方法科学工作组 (SWGDM) [22] 指南对其灵敏度、抗抑制性、成功率和分型准确率、峰高平衡性、精准度和准确度、混合物检测、检材适应性等性能进行验证评估, 以期为实践应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验样本

本研究实验样本包括血卡、口腔拭子、唾液卡、烟蒂、血棉签和布片精斑等样本。131份血卡样本来源于国家科技资源共享服务平台计划项目 (YCZYPT [2017] 01-3), 已通过公安部物证鉴定中心伦理委员会的伦理审查 (编号: 2017-005); 54份口腔拭子样本、1份唾液卡、2份烟蒂、1份血棉签和1份布片精斑取自实验室人员; 人类基因组DNA标准品9948购自苏州新海生物科技股份有限公司, 人类基因组DNA标准品2800M购自Promega公司。

1.2 样本采集

54份口腔拭子样本采集时, 实验人员漱口后使用采样拭子在口腔内壁左右刮擦, 阴干备用; 1份唾液卡样本采集时, 取实验人员两颊黏膜擦拭物转移至唾液卡上, 阴干备用 [21]。

1.3 DNA提取与定量

使用QIAamp®DNA Mini M48试剂盒 (QIAGEN公司, 德国) 提取烟蒂DNA, 用于检材适应性研究。将人类基因组DNA标准品9948 (初始浓度10 mg/L) 进行梯度稀释, 使用Quantifiler™人类DNA定量试剂盒 (Life Technologies公司, 美国) 进行定量, 用于灵敏度验证。

1.4 Quick TargSeq法医DNA快速检测系统检测

Quick TargSeq法医DNA快速检测系统的全集成芯片卡盒由DNA提取-扩增芯片和毛细管电泳芯片组成。冻干试剂、电泳缓冲液和电泳凝胶均已预置于芯片卡盒内。全集成检测时, 在1.5 ml EP管中加入200 μ l直扩处理液 (含80 μ l直扩处理液I和120 μ l直扩处理液II, 苏州新海生物科技股份有限公司), 放入1根口腔拭子或血卡/唾液卡3片 ($\phi=2$ mm), 然后取60 μ l上述混合液 (提取的DNA样本或DNA标准品加去离子水定容至60 μ l) 加样至芯片样本处理池, 全集成芯片卡盒放入快检系统进样仓, 点击运行键, 仪器自动完成样本裂解、PCR扩增、电泳分离全过程。详细操作步骤参见文献 [21]。

1.5 灵敏度研究

利用人类基因组DNA标准品9948, 口腔拭子和血卡三种样本类型进行灵敏度测试。使用去离子水将DNA标准品9948进行如下稀释: 50、30、16、8、5、2.5、1.5 ng; 采集3名实验室人员口腔拭子, 使用取样拭子在测试人员口腔内壁左右刮取1、2、3、4、5、6、7、8、9、10次, 不同次数采集时间间隔3 h; 选取3份血卡, 利用直径2 mm打孔器在待测血卡上采集1、2、3、4、5、6、7、8片。使用全集成芯片卡盒测试, 上述每种DNA含量、取样方式均重复测试3次。

1.6 成功率和分型准确率研究

对115份血卡和50份口腔拭子进行全集成检测, 统计成功率和分型准确率。以常规PCR-CE平台分型结果作为参考样本分型。成功率是指基因座全部检出的样本占全部测试样本的比率; 分型准确率是指分型成功的结果, 软件准确分型的等位基因占全部等位基因的比率 [23]。

1.7 平衡性研究

选取1.5中全集成检测成功的结果, 统计每个基因座的等位基因峰高值, 评估同一荧光通道和不同荧光通道之间的平衡性, 计算方法参照文献 [24-25]。

1.8 精准性和准确性研究

将RTyper Y27的等位基因分型标准品 (allelic ladder) 在Quick TargSeq快检仪上重复电泳10次, 计算各等位基因片段大小的平均值和标准差, 以验证体系的精准度 (以碱基为单位)。随机选取1.5中全集成检测成功的20份血卡样本, 计算各样本的等位基因片段大小与相应的等位基因分型标准物的差异。选取使用同一批次冻干扩增试剂在同一仪器上检测的6份同一人员口腔拭子样本, 计算各样本的等位基因片段大小均值、标准差和变异系数 (CV) 值 [26], 以验证体系的批内精密度。选取使用不同批次 (3个批次, 每个批次2份样本) 冻干扩增试剂在同一仪器上检测的6份同一人员口腔拭子样本, 计算各样本的等位基因片段大小均值、标准差和CV值, 以验证体系的批间精密度。

1.9 检材适应性研究

选取口腔拭子、血卡、唾液卡、烟蒂、血棉签和布片精斑 (其中烟蒂样本采取先提取DNA后检测和直接扩增检测两种方式, 其余检材采取直接扩增检测方式) 等法医常见检材进行全集成检测, 验证该体系的检材适应性。

1.10 混合物检测研究

采用DNA标准品9948和2800M,按照19:1、9:1、3:1、1:1、1:3、1:9、1:19比例进行全集成检测,以验证该体系对混合物的检测性能。

1.11 抗抑制性研究

选取3种常见的PCR抑制剂(腐殖酸、靛蓝和血红蛋白)验证该体系的抗抑制能力。配置不同浓度的抑制剂,使腐殖酸的终浓度为400、300、200、100、50 mg/L,靛蓝的终浓度为100、80、60、40、20 nmol/L,血红蛋白的终浓度为500、400、300、200、100 μ mol/L,分别进行全集成检测。

2 结 果

2.1 Y-STR基因座选择和微流控芯片扩增体系构建

本研究选取27个Y-STRs基因座,其中包含《全国刑侦信息专业应用系统Y-STR DNA数据库建设与管理指南》规定的20个核心基因座(GB/T41009-2021),DYS19、DYS385a、DYS385b、

DYS389I、DYS389II、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393、DYS437、DYS438、DYS439、DYS448、DYS456、DYS458、DYS481、DYS533、DYS576、DYS635、Y-GATA-H4,和该指南推荐的15个优选基因座中选取7个单倍型多态性好、个体识别能力强的Y-STR基因座,DYF387S1a、DYF387S1b、DYS449、DYS460、DYS518、DYS627、DYS570。上述基因座与进口Y-STR试剂盒兼容。

通过对引物浓度配比、辅料配比、冻干条件等优化,确定了2.5 $\times$ PCR Mix和5 $\times$ Primer Mix分别与冻干辅料按照1:1体积比混合,按照每12 μ l点样冻干,采用-50 $^{\circ}$ C 5 min、-45 $^{\circ}$ C 240 min、-35 $^{\circ}$ C 360 min、-25 $^{\circ}$ C 240 min、20 $^{\circ}$ C 360 min冻干程序获得的冻干小球状态最佳。通过PCR热循环参数优化确定的最佳PCR扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 1 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,59 $^{\circ}$ C 1 min,2 $^{\circ}$ C 20 s,共28个循环;60 $^{\circ}$ C 10 min。综上,最终构建了一套RTyper Y27微流控芯片检测体系,能够获得完整而准确Y-STR分型结果(图1),全集成检测时间约为83 min。

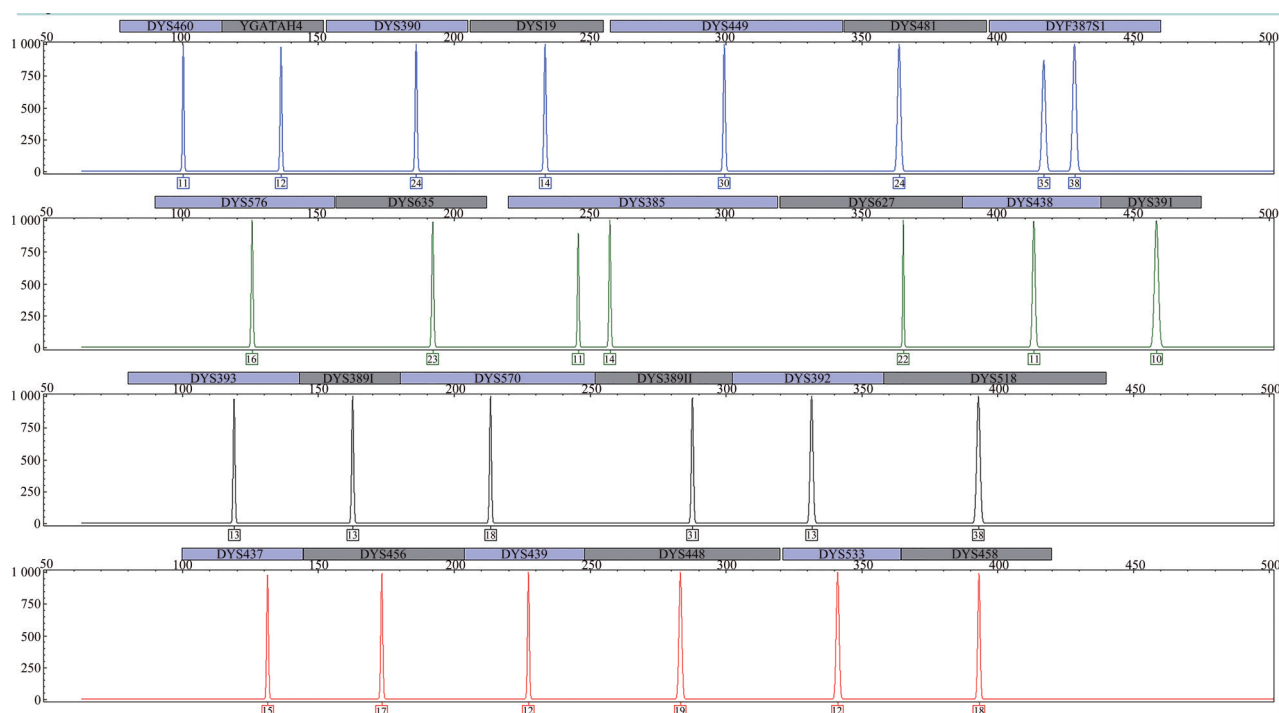


Fig. 1 DNA standard 9948 profile obtained from the RTyper Y27 microfluidic chip rapid detection system

2.2 灵敏度

使用1.5~50 ng DNA标准品9948进行灵敏度测试,统计不同DNA模板量全集成检测结果的等位

基因峰高值和等位基因检出率^[21](图2)。结果显示,等位基因峰高值随着DNA模板量增加而增大。当DNA模板量为1.5、2.5、5 ng时,出现不同程度

等位基因丢失; 当模板量 ≥ 8 ng时, 可以获得完整Y-STR分型结果, 等位基因检出率达到100%。因此, 本体系对于DNA标准品9948的最低检测限为8 ng。

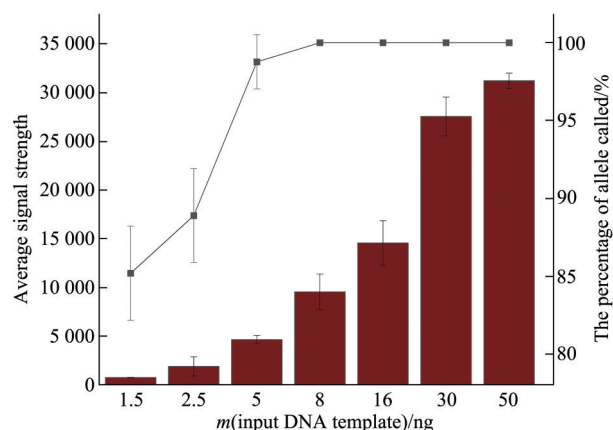


Fig. 2 Sensitivity study for different input DNA template

使用1~10次擦拭的口腔拭子进行全集成测试, 统计不同擦拭次数口腔拭子的等位基因峰高值和等位基因检出率 (图3)。结果显示, 随着擦拭次数的增加, 等位基因峰高值和检出率均逐渐增加。擦拭次数为1~7次时, 等位基因峰高值较低, 等位基因检出率从63.42%增加到100%, 擦拭次数 ≥ 7 次时, 等位基因检出率均为100%。故口腔拭子的最低擦拭次数为7次。

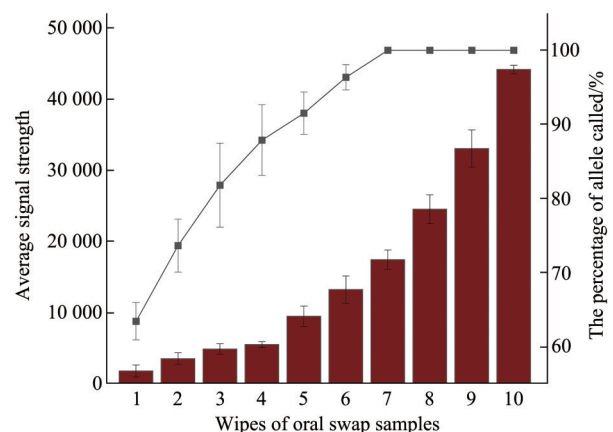


Fig. 3 Sensitivity study for different wipes of buccal swabs

使用1~8片血卡进行灵敏度测试, 统计不同血卡片数全集成结果的等位基因峰高值和等位基因检出率 (图4)。结果显示, 等位基因峰高值随着血卡片数的增加而增加, 血卡片数为1和2片时, 均

出现不同程度等位基因丢失, 等位基因检出率分别为86.83%和90.94%。血卡片数 ≥ 3 片时, 等位基因检出率可达100%。故本体系对血卡的最低检测片数为3片。

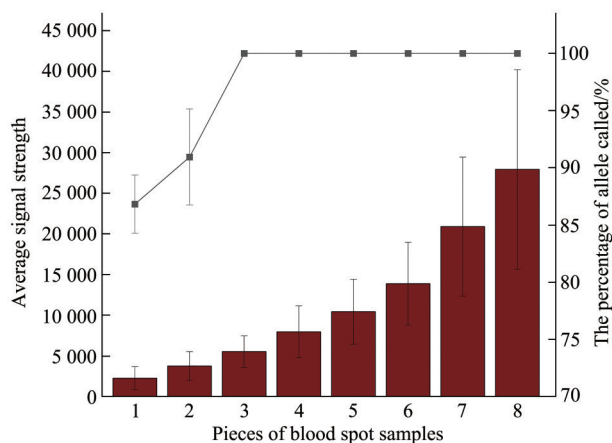


Fig. 4 Sensitivity study for different pieces of dried blood spot samples

2.3 成功率和分型准确率

对115份血卡和50份口腔拭子进行全集成检测, 统计成功率和分型准确率 (表1)。165份样本中6份样本未获得成功分型, 151份样本分型成功。其中104份血卡分型成功, 成功率达90.43%, 分型准确率为99.65%, 47份口腔拭子分型成功, 成功率为94.00%, 分型准确率为99.92%。利用独立样本 t 检验对血卡和口腔拭子两种类型样本的分型准确率之间是否存在差异性。结果表明, 两者之间未出现显著性差异 ($P > 0.05$) (表2)。

Table 1 The result of success rate and concordance rate

Sample type	Number	Success rate	Concordance rate
Dried blood spot	115	90.43% (104/115)	99.65% (2 867/2 877)
Buccal swab	50	94.00% (47/50)	99.92% (1 277/1 278)
Total	165	91.52% (151/165)	99.74% (4 144/4 155)

Table 2 The effect of different sample types (blood card / oral swab) on concordance rate

Item	Concordance rate (mean $\pm$ SD)		t	P
	Dried blood spot	Buccal swab		
Dried blood spot/ Buccal swab	99.64 $\pm$ 1.32	99.92 $\pm$ 0.54	-1.833	0.07

2.4 平衡性

利用2.2中分型成功的70份样本进行荧光通道平衡性分析 (表3)。红色荧光通道 (ROX染料标

记) 峰高比值最高, 为 91.15%, 黄色荧光通道 (TAMRA 染料标记) 次之, 为 86.25%, 其余两个荧光通道峰高比值分别为 74.85%、70.81%, 不同荧光通道之间的峰高比值为 89.81%。以上结果表

Table 3 Balance within one dye and among different dyes for 151 testing samples

	Mean/%	Median/%	SD/%	Min/%	Max/%
Intra-color (FAM)	70.81	78.63	23.79	7.35	99.64
Intra-color (HEX)	74.85	80.83	18.40	21.68	100.00
Intra-color (TAMRA)	86.25	100.00	24.83	5.31	100.00
Intra-color (ROX)	91.15	100.00	20.10	13.94	100.00
Inter-color	89.81	90.59	8.81	43.68	99.40

明该体系有较好的平衡性。

2.5 精准度和准确度

对等位基因分型标准品进行 10 次全集成检测, 统计其各等位基因片段大小的平均值和标准差 (图 5)。结果表明, 各等位基因片段大小的标准差均在 0.5 bp 以内。随机选取 2.2 中分型成功的 20 份血卡全集成结果 (图 6)。计算所有等位基因片段与等位基因标准品对应的片段大小差异均不超过 0.5 bp。批内精密度和批间精密度实验结果表明 (表 4), 批内和批间精密度实验中等位基因 DYS460 的 *CV* 值最大, 分别为 0.48% 和 0.68%, 均小于 15%。以上结果表明, 该体系有较高的精准度和准确度。

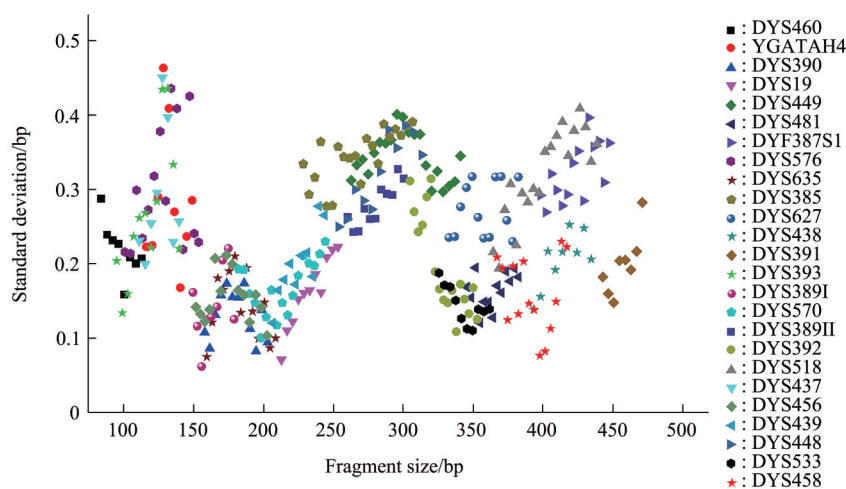


Fig. 5 Standard deviation of sizing precision for each locus in the allelic ladder calculated for 10 runs on Quick TargSeq systems

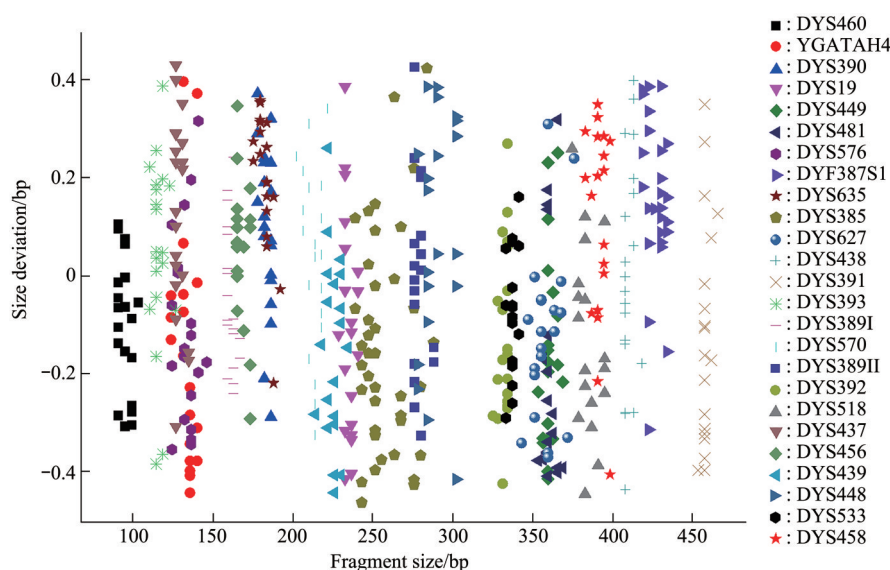


Fig. 6 Size differences between allele and corresponding allele in allelic ladder for 20 testing samples on Quick TargSeq systems

Table 4 The precision of intra and inter batch

Locus	Intra-batch			Inter-batch		
	Mean of fragements	SD	CV/%	Mean of fragements	SD	CV/%
DYS460	85.56	0.41	0.48	86.00	0.58	0.68
YGATAH4	132.65	0.21	0.16	132.83	0.35	0.26
DYS390	184.42	0.04	0.02	184.38	0.13	0.07
DYS19	229.87	0.16	0.07	230.03	0.15	0.06
DYS449	304.43	0.67	0.22	305.11	0.82	0.27
DYS481	358.84	0.38	0.11	359.28	0.41	0.11
DYF387S1	419.13	0.47	0.11	418.66	0.53	0.13
DYF387S1	427.06	0.48	0.11	426.63	0.56	0.13
DYS576	132.06	0.55	0.41	132.52	0.73	0.55
DYS635	177.69	0.05	0.03	177.72	0.07	0.04
DYS385	246.69	0.60	0.25	247.32	0.80	0.32
DYS385	267.14	0.66	0.25	267.75	0.84	0.31
DYS627	342.02	0.53	0.16	342.55	0.71	0.21
DYS438	410.87	0.05	0.01	410.92	0.16	0.04
DYS391	458.12	0.32	0.07	458.37	0.35	0.08
DYS393	110.86	0.26	0.24	111.04	0.30	0.27
DYS389I	157.42	0.10	0.07	157.46	0.06	0.04
DYS570	216.64	0.17	0.08	216.47	0.17	0.08
DYS389II	275.13	0.04	0.01	275.10	0.08	0.03
DYS392	332.27	0.15	0.05	332.48	0.24	0.07
DYS518	369.84	0.58	0.16	370.47	0.74	0.20
DYS437	132.01	0.17	0.13	132.15	0.25	0.19
DYS456	163.53	0.11	0.07	163.55	0.11	0.07
DYS439	222.56	0.35	0.16	222.89	0.45	0.20
DYS448	290.76	0.28	0.10	290.60	0.37	0.13
DYS533	335.98	0.05	0.01	336.05	0.12	0.04
DYS458	386.43	0.26	0.07	386.22	0.23	0.06

2.6 检材适应性

对口腔拭子、血卡、唾液卡、烟蒂（包括使用提取DNA检测和直接样本检测两种方式）、血棉签和布片精斑等法医常见检材进行全集成检测（图7）。结果表明，除直接扩增的烟蒂检材DYS481基因座出现等位基因丢失（图中红框所示），其余检材均获得完整Y-STR分型，说明该体系检材适应性良好。

2.7 混合样本检测性能

将DNA标准品9948和2800M按照19：1、9：1、3：1、1：1、1：3、1：9、1：19比例进行

全集成检测，统计次要贡献者的等位基因峰高值和等位基因检出率，以验证该体系对混合样本的检测性能（图8）。当9948：2800M为19：1和1：19时，出现不同程度等位基因丢失，次要贡献者的等位基因检出率分别为66.67%和67.61%，且等位基因峰值较低，9948：2800M为9：1和1：9时，次要贡献者的等位基因检出率为97.53%和98.76%，而当9948和2800M的比例为3：1、1：1和1：3时，能够检测出所有次要贡献者的等位基因（检出率均为100%）。

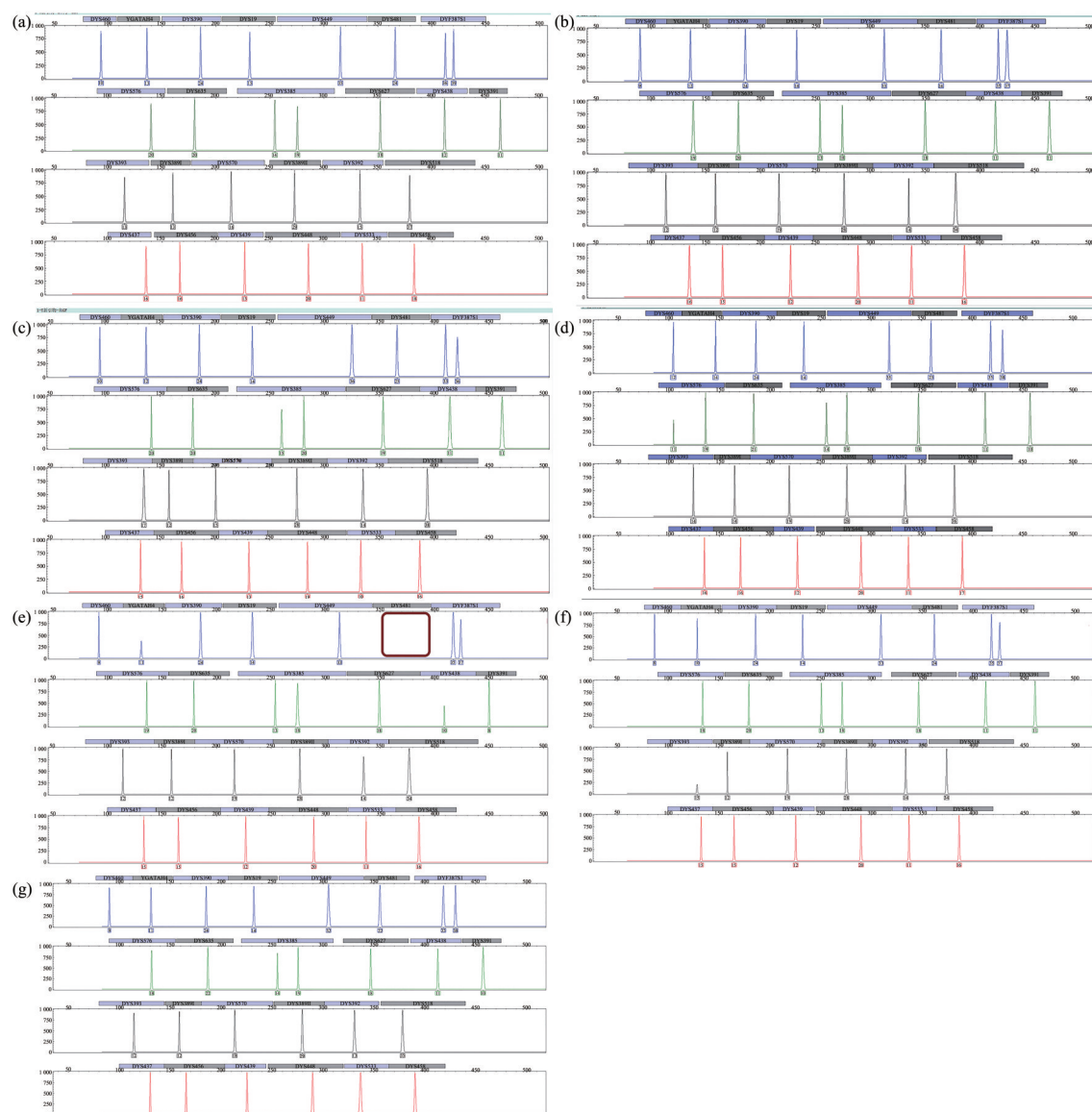


Fig. 7 The Y-STR profiles of mock case samples

(a) Buccal swab; (b) dried saliva spot; (c) dried blood spot; (d) dried blood swab; (e) cigarette butt—direct amplification; (f) cigarette butt—DNA extraction; (g) seminal stain.

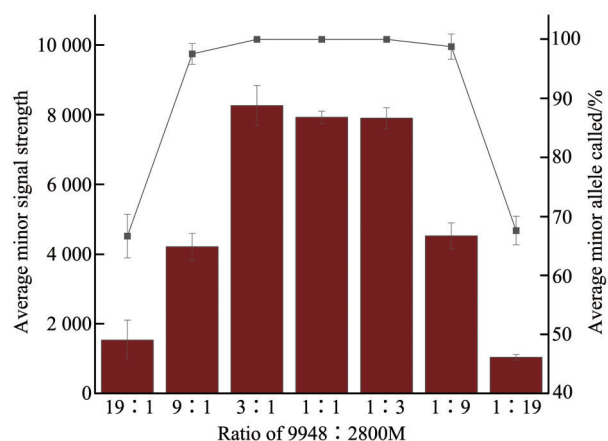


Fig. 8 Mixture study for different ratio of 9948 : 2800M

2.8 抗抑制性

对3种常见的PCR抑制剂(腐殖酸、靛蓝和血红蛋白)进行全集成检测,以验证该体系的抗抑制性(表5)。结果表明,该反应体系中分别添加浓度为50~400 mg/L的腐殖酸、20~100 nmol/L的靛蓝、100~500 μ mol/L的血红蛋白时,仍能获得完整分型结果,未出现等位基因丢失。

Table 5 The detection results of samples with different inhibitor concentrations		
Inhibitor	Concentration	Call rate/%
Humic acid	400 mg/L	100
	300 mg/L	100
	200 mg/L	100
	100 mg/L	100
	50 mg/L	100
Indigo	100 nmol/L	100
	80 nmol/L	100
	60 nmol/L	100
	40 nmol/L	100
	20 nmol/L	100
Hemoglobin	500 μmol/L	100
	400 μmol/L	100
	300 μmol/L	100
	200 μmol/L	100
	100 μmol/L	100

3 讨 论

Y-STR 遗传标记在与男性相关的法医学检验中作用独特^[27], 传统 Y-STR 检测流程复杂, 耗时耗力, 目前尚未见有报道将 Y-STR 基因座应用于 DNA 快速检验系统, 本研究率先构建了 Y-STR 微流控芯片检测试剂体系, 经过反复优化验证实现了法医 DNA 快检仪的集成应用。本研究参考 SWGDAM 指南, 对构建的 RTyper Y27 微流控芯片检测体系进行了性能验证研究。

灵敏度研究中, DNA 标准品 9948 达到 8 ng 时能检测出完整 Y-STR 分型, 对比 PowerPlex®Y23、Yfiler® Plus PCR 等 Y-STR 试剂盒^[25, 28] 常规 PCR-CE 检测平台略有不足, 但满足大多数现场生物检材检测限的需求^[12]。口腔拭子刮擦次数为 7 次和血卡片数 3 片时 ($\phi=2$ mm), 等位基因检出率为 100%, 与 Quick TargSeq 快检仪 DIP 族群推断体系的检测灵敏度相当^[21], 同时口腔拭子擦拭次数灵敏度与 RapidHIT®ID 快检仪 (擦拭次数 8 次时, 等位基因检出率为 100%) 相近^[29]。在 165 份样本的成功率和分型准确率研究中: 成功率达到 91.52%, 低于 ANDE™6C (99.2%^[30]) 的成功率、高于 RapidHIT™ 200 (85.45%^[31]) 快检仪的首次成功率, 与 RapidHIT®ID (92%^[29]) 相近; 分型准确率可达 99.74%, 与 ANDE™ 6C (99.98%^[30]) 和 RapidHIT™ 200 (100%^[31]) 的分型准确率相当,

可以实现对血卡和口腔拭子准确分型。准确度和精准确度的等位基因片段大小误差均在 0.5 bp 以内, 批内批间精密度 CV 最大值分别为 0.48% 和 0.68%, 均小于 15%^[32], 表明体系能够精确并准确的对样本进行分型。混合样本检测中较小贡献者在 1 : 3 比例下能获得完整等位基因分型, 与 RapidHIT® ID 快检仪对混合物检测能力相近^[29], 与常规 PCR-CE 平台使用的 DNATyper™ Y26 (1 : 3)^[33]、Microreader 40Y ID (1 : 3)^[34] 等 Y-STR 试剂盒对混合样本检测能力亦相当。该体系可对常见口腔拭子、血卡、唾液卡、精斑等检材完整分型, 但直接处理烟蒂样本出现等位基因丢失, 推测原因可能是剪取的烟蒂过滤嘴处含有口腔上皮细胞少^[35], DNA 含量低, 导致全集成检测结果分型不完整。同时该体系对腐殖酸、靛蓝和血红蛋白等常见 PCR 抑制剂耐受性较好, 与 PowerPlex® Y23 等试剂盒常规 PCR-CE 平台的耐受力相当^[28, 36]。

4 结 论

本研究将 RTyper Y27 微流控芯片快速检测体系与国产 Quick TargSeq 快检仪结合, 2 h 左右可获得样本 Y-STR 准确分型, 一系列验证实验结果表明, 该体系重复性、准确性、稳定性良好, 能满足现场 Y-STR 检测要求, 可供法医学实践选择使用。

参 考 文 献

[1] Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx P J, *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 2003, **423**(6942): 825-837

[2] Kayser M. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Hum Genet*, 2017, **136**(5): 621-635

[3] Prinz M, Boll K, Baum H, *et al.* Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Sci Int*, 1997, **85**(3): 209-218

[4] Ballantyne K N, Keerl V, Wollstein A, *et al.* A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, **6**(2): 208-218

[5] Bertoglio B, Grignani P, Di Simone P, *et al.* Disaster victim identification by kinship analysis: the Lampedusa October 3rd, 2013 shipwreck. *Forensic Sci Int Genet*, 2020, **44**: 102156

[6] Yao H, Wen S, Tong X, *et al.* Y chromosomal clue successfully facilitated the arrest of Baiyin serial killer. *Sci Bull*, 2016, **61**: 1715-1717

[7] Karafet T M, Zegura S L, Posukh O, *et al.* Ancestral Asian source (s) of New World Y-chromosome founder haplotypes. *Am J Hum Genet*, 1999, **64**(3): 817-831

- [8] Njoroge S K, Chen H W, Witek M A, *et al.* Integrated microfluidic systems for DNA analysis. *Top Curr Chem*, 2011: 203-260
- [9] Ragab M A, El-Kimary E I. Recent advances and applications of microfluidic capillary electrophoresis: a comprehensive review (2017-Mid 2019). *Crit Rev Anal Chem*, 2021, **51**(8): 709-741
- [10] Yang B, Wang P, Li Z, *et al.* Simultaneous amplification of DNA in a multiplex circular array shaped continuous flow PCR microfluidic chip for on-site detection of bacterial. *Lab Chip*, 2023, **23**(11): 2633-2639
- [11] Jovanovich S, Bogdan G, Belcinski R, *et al.* Developmental validation of a fully integrated sample-to-profile rapid human identification system for processing single-source reference buccal samples. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, **16**: 181-194
- [12] Shackleton D, Pagram J, Andrews N, *et al.* Development of enhanced sensitivity protocols on the RapidHIT™ 200 with a view to processing casework material. *Sci Justice*, 2019, **59**(4): 411-417
- [13] Date-Chong M, Hudlow W R, Buoncristiani M R. Evaluation of the RapidHIT™ 200 and RapidHIT GlobalFiler® Express kit for fully automated STR genotyping. *Forensic Sci Int Genet*, 2016, **23**: 1-8
- [14] Murakami C, Irie W, Sasaki C, *et al.* Individual identification using the RapidHIT™ ID system for forensic samples. *Leg Med*, 2020, **47**: 101776
- [15] Green R L, Lagacé R E, Oldroyd N J, *et al.* Developmental validation of the AmpFℓ STR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit: a next-generation STR multiplex with the SE33 locus. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, **7**(1): 41-51
- [16] Wang D Y, Gopinath S, Lagacé R E, *et al.* Developmental validation of the GlobalFiler® Express PCR Amplification Kit: a 6-dye multiplex assay for the direct amplification of reference samples. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, **19**: 148-155
- [17] Grover R, Jiang H, Turingan R S, *et al.* FlexPlex27—highly multiplexed rapid DNA identification for law enforcement, kinship, and military applications. *Int J Legal Med*, 2017, **131**(6): 1489-1501
- [18] Ensenberger M G, Thompson J, Hill B, *et al.* Developmental validation of the PowerPlex® 16 HS system: an improved 16-locus fluorescent STR multiplex. *Forensic Sci Int Genet*, 2010, **4**(4): 257-264
- [19] Han J, Gan W, Zhuang B, *et al.* A fully integrated microchip system for automated forensic short tandem repeat analysis. *Analyst*, 2017, **142**(11): 2004-2012
- [20] 韩俊萍, 赵蕾, 王庆国, 等. 单管直扩 38 重祖先信息 InDels 体系的构建及其在微流控芯片系统的应用. *生物化学与生物物理进展*, 2020, **47**(9): 968-981
Han J P, Zhao L, Wang Q G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2020, **47**(9): 968-981
- [21] 张博源, 王颖希, 赵蕾, 等. 基于微流控芯片的 InDel 快速族群推断体系研究. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(8): 1564-1572
Zhang B Y, Wang Y X, Zhao L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(8): 1564-1572
- [22] Ozyer S, Uslu Z S, Sapan T U, *et al.* The development of the novel 22 X-indel multiplex system for forensic genetics. *Leg Med*, 2023: 102224
- [23] Shackleton D, Gray N, Ives L, *et al.* Development of RapidHIT® ID using NGMSElect™ Express chemistry for the processing of reference samples within the UK criminal justice system. *Forensic Sci Int*, 2019, **295**: 179-188
- [24] Jiang X, He J, Jia F, *et al.* An integrated system of ABO typing and multiplex STR testing for forensic DNA analysis. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, **6**(6): 785-797
- [25] Gopinath S, Zhong C, Nguyen V, *et al.* Developmental validation of the Yfiler® Plus PCR amplification kit: an enhanced Y-STR multiplex for casework and database applications. *Forensic Sci Int Genet*, 2016, **24**: 164-175
- [26] Reed G F, Lynn F, Meade B D. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clin Vaccine Immunol*, 2002, **9**(6): 1235-1239
- [27] Wang F, Song F, Wang X, *et al.* Mutation analysis for newly suggested 30 Y-STR loci with high mutation rates in Chinese father-son pairs. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 15680
- [28] Thompson J M, Ewing M M, Frank W E, *et al.* Developmental validation of the PowerPlex® Y23 system: a single multiplex Y-STR analysis system for casework and database samples. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, **7**(2): 240-250
- [29] Cihlar J C, Kapema K B, Budowle B. Validation of the applied biosystems RapidHIT ID instrument and ACE GlobalFiler express sample cartridge. *Int J Legal Med*, 2022, **136**(1): 13-41
- [30] Turingan R S, Tan E, Jiang H, *et al.* Developmental validation of the ANDE 6C system for rapid DNA analysis of forensic casework and DVI samples. *J Forensic Sci*, 2020, **65**(4): 1056-1071
- [31] Larue B L, Moore A, King J L, *et al.* An evaluation of the RapidHIT® system for reliably genotyping reference samples. *Forensic Sci Int Genet*, 2014, **13**: 104-111
- [32] Kollipara S, Bende G, Agarwal N, *et al.* International guidelines for bioanalytical method validation: a comparison and discussion on current scenario. *Chromatographia*, 2011, **73**: 201-217
- [33] Mo X-T, Zhang J, Ma W H, *et al.* Developmental validation of the DNATyper™ Y26 PCR amplification kit: an enhanced Y-STR multiplex for familial searching. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, **38**: 113-120
- [34] Liu Y, Lü M, Bai P, *et al.* Validation of the Microreader 40Y ID System: a Y-STR multiplex for casework and database samples. *Int J Legal Med*, 2021, **135**: 23-41
- [35] 李林, 刘静, 王敏, 等. 直接扩增法在血痕、肋软骨和唾液检材中的应用. *中国法医学杂志*, 2013, **28**(2): 148-150
Li L, Liu J, Wang M, *et al.* *Chin J Forensic Med*, 2013, **28**(2): 148-150
- [36] Zeng Y, Chen L, Wang M, *et al.* The validation of a single multiplex typing system with 45 Y-STR markers for familial searching and database construction. *Front Genet*, 2022, **13**: 51

Study of The Y-STR Multiplex Microfluidic Chip Rapid Amplification System*

WANG Dao-Yu¹⁾, WAN Qun²⁾, ZHUANG Bin³⁾, ZHAO Li-Jian³⁾, HAN Jun-Ping^{4)**}, LI Cai-Xia^{5)**}

¹⁾School of Investigation, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China;

²⁾School of Basic Medicine, Shandong First Medical University, Jinan 250000, China;

³⁾Beijing Capital Bio Technology Ltd. Co., Beijing 101111, China;

⁴⁾Technology Department of Chaoyang Sub-bureau, Beijing Public Security Bureau, Beijing 100025, China;

⁵⁾National Engineering Laboratory of On-site Material Evidence Traceability Technology,

Identification Center of the Ministry of Public Security, Beijing Engineering Research Center of Crime Scene Evidence Examination, Beijing 100038, China)

Abstract Objective At present, the matching reagents of commercially available rapid DNA instruments based on microfluidics chip technology are autosome short tandem repeat (STR) individual identification reagents. The non-recombining part of the human Y chromosome is widely used in forensic DNA analysis, particularly in cases where standard autosomal DNA profile is uninformative. Y-STR loci are useful markers to identify males and male lineages in forensic practice. In order to achieve rapid and fully integrated detection of Y-STR loci, this study constructed the RTyper Y27 microfluidic chip rapid detection system and validated the performance of this system. **Methods** The system was verified and evaluated by sensitivity, success rate, typing accuracy, peak height balance, sizing precision and accuracy, mock case sample tests, mixture detection ability, and inhibition tolerance. **Results** Complete Y-STR profiles can be obtained when the template amount of DNA standard 9948 was ≥ 8 ng, the number of blood cards was ≥ 3 pieces, and the number of oral swab scrapings was ≥ 7 times. The success rate of fully integrated detection was 91.52%, and the concordance rates was 99.74% for 165 testing samples. The success rate of 115 blood spots in these samples was 90.43%, with a typing accuracy of 99.65%, the success rate of 50 buccal swabs was 94%, with a typing accuracy of 99.92%. There was no significant difference in typing accuracy between blood spots and buccal swab samples. The peak height ratio between different fluorescence channels was 89.81%. The standard deviation of allelic ladder for 10 runs was within 0.5 bp. The size differences between allele and corresponding allele in allelic ladder was within 0.5 bp. The maximum precision *CV* values within and between batches were 0.48% and 0.68%, respectively, which were lower than 15%. These data indicate that the system has good accuracy and precision. The system was capable of accurately typing oral swabs, blood cards, saliva cards, cigarette butts, blood swabs and seminal stains. Complete Y-STR profiles can be obtained and distinguish at the 1 : 3 ratio of minor and major contributors in artificial male DNA mixtures. Complete Y-STR genotyping can be obtained under the interference of inhibitors, such as different concentrations of humic acid (50–400 mg/L), indigotin (20–100 nmol/L) and hemoglobin (100–500 μ mol/L). **Conclusion** In this study, the RTyper Y27 microfluidic chip rapid amplification system is combined with the Quick TargSeq 1.0 integrated system, and the Y-STR profile can be obtained in approximately 2 h. Through a series of verification experiments, the results show that the system has good repeatability, accuracy and stability, can meet the on-site Y-STR detection requirements, and can be used in forensic practice.

Key words forensic biological evidence, microfluidic chip, Y-chromosomal short tandem repeat

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0222

* This work was supported by grants from The Basic Research Project (2022JB020) and the Open Subject of Beijing Engineering Research Center of Crime Scene Evidence Examination (2021CSEKFKT06).

** Corresponding author.

HAN Jun-Ping. Tel: 86-10-65733778, E-mail: pgww19861025@163.com

LI Cai-Xia. Tel: 86-10-83752706, E-mail: licaixia@tsinghua.org.cn

Received: June 6, 2023 Accepted: August 10, 2023