



基于国产微滴数字PCR的SNP快速检测技术研究*

林培双¹⁾ 王 寒²⁾ 祝令香³⁾ 贝 蕾³⁾ 黄 江¹⁾ 赵雯婷^{2)**} 李彩霞^{1,2)**}

(¹⁾ 贵州医科大学法医学院, 贵阳 550004;

(²⁾ 公安部物证鉴定中心, 法医遗传学公安部重点实验室, 现场物证溯源技术国家工程实验室, 北京 100038;

(³⁾ 新羿制造科技(北京)有限公司, 北京 100038)

摘要 目的 在法医学领域, 现有的SNP检测主要依赖进口, 检测工作量大、耗时长且成本较高。微滴数字PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 作为新一代的PCR技术, 可以快速检测低浓度样本DNA, 且有较强的抗干扰能力。本研究旨在国产ddPCR平台建立SNP分型检测体系并对其性能进行评估, 以探讨ddPCR技术在法医学检验领域的应用价值。方法 在ddPCR平台建立高原适应性EPAS1单倍型(rs115321619、rs73926263、rs73926264、rs73926265和rs55981512)检测体系, 测试各位点引物探针特异性, 对体系的准确性、稳定性、灵敏度、检材适应性进行评估, 并比较了ddPCR和SNaPshot微测序检测体系的抗抑制性, 最后对样本地区来源进行测试。结果 ddPCR在2.5 h内即可快速获取检测结果, 体系准确性和稳定性好, 检测灵敏度为0.312 5 ng, 且抗抑制性能力突出。70份测试样本检测结果与背景信息一致。结论 基于ddPCR的SNP检测体系具有准确可靠、简便快速、抗抑制能力强等优势, 在法医学快速检验领域有较强的应用潜力, 适合法医现场检验需求。

关键词 微滴数字PCR, 法医学检验, SNP分型

中图分类号 R89, D919.2

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0336

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是继短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 之后的第三代法医遗传标记, 指由单个核苷酸变异所形成的DNA序列多态性^[1]。与STR相比, SNP在人类基因组中数量多、分布广、遗传稳定^[2], 不仅可用于个体识别和亲子鉴定, 还能用于刻画生物检材来源人的族群地域、外貌特征等表型^[3-5], 从而快速锁定犯罪嫌疑人范围, 辅助案件侦查。

法医现场生物检材的DNA存在微量、降解、污染等问题, 因此对检验方法的灵敏度、稳定性、抗抑制性要求较高。目前法医SNP检验平台包括毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE)、质谱、二代测序、芯片检测等, 其中微测序结合毛细管电泳检测 (SNaPshot)^[6] 或飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS)^[7] 是当前法医DNA实验室常用的检验方法, 但这两种方法检测时间长达7~10 h,

操作步骤繁琐, 对抑制剂不耐受, 而二代测序和芯片检测对样本DNA质和量要求高, 耗时更长 (> 24 h), 操作复杂且成本更高, 很难在法医DNA基层实验室大范围推广^[8]。数字PCR (digital polymerase chain reaction, dPCR) 在生物医学领域已经展现出灵敏度高、特异性强、操作简便快捷的优势^[9-11], 但在法医DNA检验领域的应用研究较少。

dPCR主要分微滴式和芯片式两种, 其中微滴数字PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 的应用更广泛^[12]。ddPCR的工作原理为: 首先在PCR扩增反应前将包含模板的常规PCR体系通过“油包水”

* 国家自然科学基金 (81772027) 资助项目。

** 通讯联系人。

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

赵雯婷 Tel: 010-83752706, E-mail: wtzhao@sibs.ac.cn

收稿日期: 2021-11-03, 接受日期: 2022-02-18

形式微滴化处理, 以实现数万个微反应体系的平行扩增, 然后通过探针法检测各微滴终点荧光信号值, 最后根据阴阳性统计结果和荧光类型判断 SNP 分型^[13]。这种微滴化处理技术有效地降低了非目标物质干扰, 提高目标物质的检测。

国内外研究发现, EPAS1 基因上的 5-SNP 单倍型在高原与平原人群中的分布有显著差异^[14]。本实验室前期构建了 5-SNP 单倍型的 SNaPshot 检测体系^[15-16], 体系的灵敏度和特异性符合法医学检验需求, 但检测周期长, 对陈旧、接触及含抑制剂类(环境污染)检材的检出率较低。本研究在国产新羿 TD-1 ddPCR 平台上, 利用 TaqMan 双探针法, 建立了 5-SNP 单倍型的 ddPCR 检测体系, 从准确性、稳定性、灵敏度、检材适应性及抗抑制性等方面对其性能进行了评估, 分析了 ddPCR 在法医学检验领域的应用效果和价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象

本研究检测 70 份无关个体 DNA 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)。采集实验室人员(编号 SY)的 8 种不同类型检材: 血卡、血纱布、唾液、口腔拭子、带毛囊头发、烟头和两种接触性检材(瓶口和手机屏幕擦拭物)。9948 标准品 DNA 购自苏州新海生物科技股份有限公司。本研究已通过公安部物证鉴定中心伦理委员会审查(编号: 2017-001), 所有参与者均签署了书面知情同意书。

1.1.2 主要仪器和设备

微滴数字 PCR 仪(中国新羿制造科技(北京)

有限公司, TD-1); PCR 扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司, A300); 微量紫外分光光度计(美国 Nano Drop 公司, ND-2000c); 旋涡振荡器(中国其林贝尔公司, QL-866); 高速离心机(德国 Eppendorf 公司, Centrifuge 5804 R)。

1.1.3 样本 DNA 提取

采用 QIAamp® DNA Mini M48 试剂盒(德国, QIAGEN 公司)提取检材 DNA, ND-2000c 分光光度计定量, 并稀释至 0.5 µg/L。

1.1.4 SNP 位点信息

选取前期已发表文献^[16]中 EPAS1 基因上 5 个 SNP 位点, 各位点名称、位置、等位基因信息见表 1。

Table 1 The information of 5-SNP haplotype of the EPAS1 gene

rs number	Chromosome	Position/bp	Alleles
rs115321619	2	46 567 916	G/A
rs73926263	2	46 568 680	A/G
rs73926264	2	46 569 017	A/G
rs73926265	2	46 569 770	G/A
rs55981512	2	46 570 342	G/A

1.2 方法

1.2.1 引物探针设计与合成

从 Ensemble dbSNP 数据库下载各位点基因组序列, 分别用 Primer Premier 5.0 和 Primer Express 3.0 软件设计引物和探针。各 SNP 位点设计两条位点特异性 TaqMan 探针, 分别用 FAM 和 VIC 荧光标记修饰。引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物和探针序列信息见表 2。

Table 2 The primer and probe information for 5-SNP used in ddPCR

rs number	Primer sequences (5'-3')	Probe sequences (5'-3')	Product size/bp
rs115321619	Forward: CTTTTTGTGTTTGTCTTTGA	FAM-CTGAGCTGAAGTGCAGTGCAG-BHQ1	99
	Reverse: CCTTGACCTGGGAGC	VIC-CGTAGCTGGAGTGCAGTGACG-BHQ1	
rs73926263	Forward: CTATTTACATGTCTCATTATTTT	FAM-CATCTCCCTCTTCCTGTTA-BHQ1	64
	Reverse: CACTGTACCAGATGCTATG	VIC-CTGTCTTATTAGCCATACAG-BHQ1	
rs73926264	Forward: TTAAGTGAGGATCAAATGAGACCA	FAM-CCCCGGTGCTCAATAA-MGB	112
	Reverse: GATGCAAACAGCTATGTCAC	VIC-CCCCAGTGCTCAATAA-MGB	
rs73926265	Forward: CAACCCCTCTGTGTTACTG	FAM-ACAGACATCTTGAG-BHQ1	54
	Reverse: CACAGCCTGGAGTGAG	VIC-ACAGACATCTTGGG-BHQ1	
rs55981512	Forward: TAAGGCCACAGCACTTAG	FAM-TTCCCCCGCCAACC-MGB	64
	Reverse: GAACCAGCATCAGAGTTACG	VIC-TTCTTCCCCCGCCGAC-MGB	

1.2.2 ddPCR体系和程序

ddPCR 反应体系：2×ddPCR SuperMix（含UNG）15 μl，10 μmol/L 上下游引物各 1.5 μl，10 μmol/L 的 FAM 和 VIC 标记探针各 0.9 μl，DNA 模板（基因组 DNA）1 μl，蒸馏水补足至终体积 30 μl；配置体系加至微滴生成芯片水相孔，180 μl 微滴生成油加入油相孔进行微滴生成，然后进行 ddPCR 扩增。反应程序设置：95℃ 10 min；94℃ 30 s，58℃ 1 min，40 个循环；12℃ 5 min。扩增结束后，使用微滴分析仪进行数据读取。采用 Chip Reader 软件分析数据，根据生成数据提取检测位点 FAM 和 VIC 通道对应阳性和阴性荧光信号均值，计算位点 FAM 和 VIC 两通道对应 AMSI（absolute mean signal intensities）值，即检测位点对应阳性荧光信号均值减去阴性荧光信号均值^[17]。

FAM 和 VIC 通道判断阳性标准：a. 信噪比，检测位点 AMSI 值与该位点空白对照背景荧光信号均值比值（ratio 值）>1，排除假阳性信号；b. AMSI>1 000；c. 阳性微滴数≥4。同时满足上面 3 个条件时，该位点对应通道可判断为阳性。

分型标准：a. 杂合子，FAM 和 VIC 两通道均满足阳性判断标准；b. 纯合子，当仅有一个通道满足阳性判断标准。

1.2.3 SNaPshot检测流程

基于 SNaPshot 技术的 5-SNP 分型检测流程、体系和 PCR 扩增程序均参照文献 [15]。

1.2.4 引物探针特异性

测试 5 个位点均为纯合子的样本 9948 标准品和 102T，5 个位点均为杂合子的样本 NY20，各位点均设立空白对照。

1.2.5 体系性能评估

a. 准确性。ddPCR 检测 26 份样本和 9948 标准品 DNA，同时委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行 Sanger 测序，比较分型结果的一致性。

b. 稳定性。选取杂合样本（编号 NY20）对各位点重复检验 3 次，荧光信号检测在两张芯片内完成，评估在同一芯片和不同芯片检测分析中分型一致性和荧光信号波动情况，荧光值稳定性以变异系数（coefficient of variation, CV）≤25%衡量^[18]。

c. 灵敏度。将 9948 标准品 DNA 梯度稀释为 0.5、0.25、0.125、0.062 5 和 0.031 25 ng，各浓度重复检测 3 次，评估 5 个 SNP 位点均准确分型时的最低模板用量。

d. 法医检材适应性。为验证平台是否适应法医各类型案件检材，采用实验室人员（编号 SY）模拟的 8 种不同类型检材 DNA，含血卡、血纱布、唾液、口腔拭子、带毛囊头发、烟头以及两种接触性检材。其中接触性检材 1 是瓶口擦拭物，接触性检材 2 是手机屏幕擦拭物，均采用干棉签擦拭获取。各类型检材设置 3 次重复实验。

e. 抗抑制能力。为适应法医现场检材的特殊性^[19-20]，选取常见抑制剂血红素（hematin）、腐植酸（humic acid）和靛蓝（indigo），按 1.2.2 和 1.2.3 实验流程分别进行检验。血红素浓度稀释至 350、700、1 050、1 400 μmol/L；腐植酸浓度稀释至 150、200、250、300 μg/L；靛蓝浓度稀释至 150、200、250、300 mmol/L；各浓度取 1 μl 替代原体系蒸馏水。实验样本选取 9948 标准品 DNA（0.5 μg/L），每次实验将不加抑制剂体系作为标准阳性对照，并设立空白对照，每个浓度重复检测 1 次。

f. 样本测试。检测 70 份具有明确海拔信息的样本（表 3），使用 PHASE v2.1.1 软件（10 000 interactions，10-step thinning interval，和 10 000 burn-ins）分析样本所有组合单倍型^[14]，评估样本高原适应性。

Table 3 Information of test population samples

Population	Sample Size (n)	Altitude/m
Sichuan, China	42	3 650
Henan, China	28	73

1.2.6 统计学分析

应用 SPSS 软件对数据进行统计分析，使用 Shapiro-Wilk 检验数据正态性，利用 *t* 检验分析数据；当 *P*<0.05 时，表示数据差异具有统计学意义。应用 GraphPad Prism 和 Origin 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 引物探针特异性

采用 5 个 SNP 位点对应的 3 种基因分型样本和空白对照验证引物探针特异性。各位点引物探针组合仅对其正确分型样本产生阳性扩增信号：9948 标准品每个位点仅 VIC 通道检测阳性信号，102T 样本每个位点仅 FAM 通道检测阳性信号，NY20 样本 FAM 和 VIC 两通道均显现阳性信号（图 1）。图

2显示,各样本检测阳性微滴簇聚集紧凑,与背景信号区分明显;空白对照(no template control,

NTC)未检出非特异阳性扩增信号,表明引物探针可以特异的区分5个SNP位点的两种等位基因。

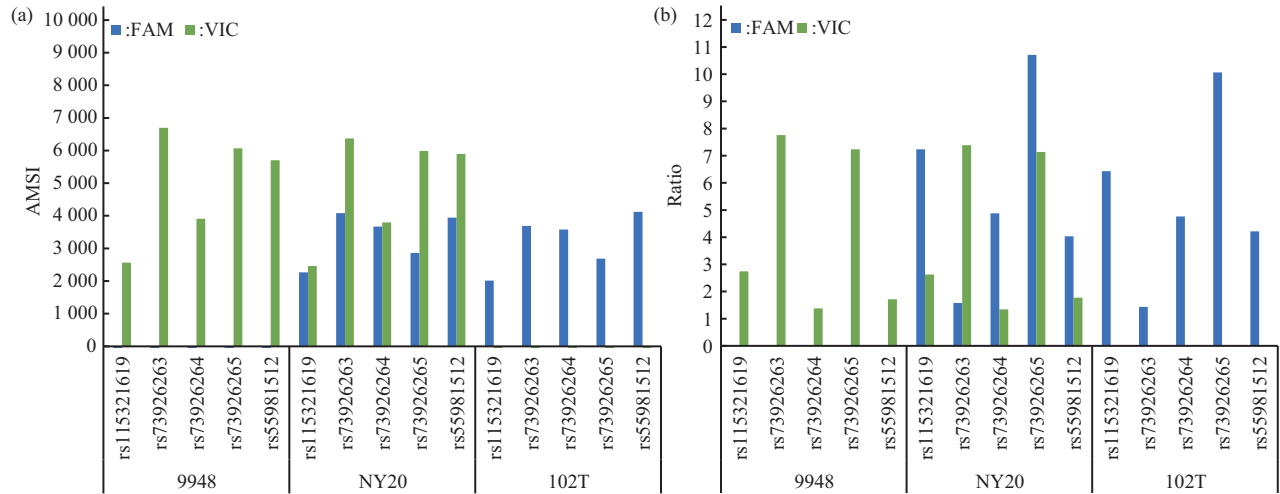


Fig. 1 AMSI and ratio data of the specificity verification for each SNP

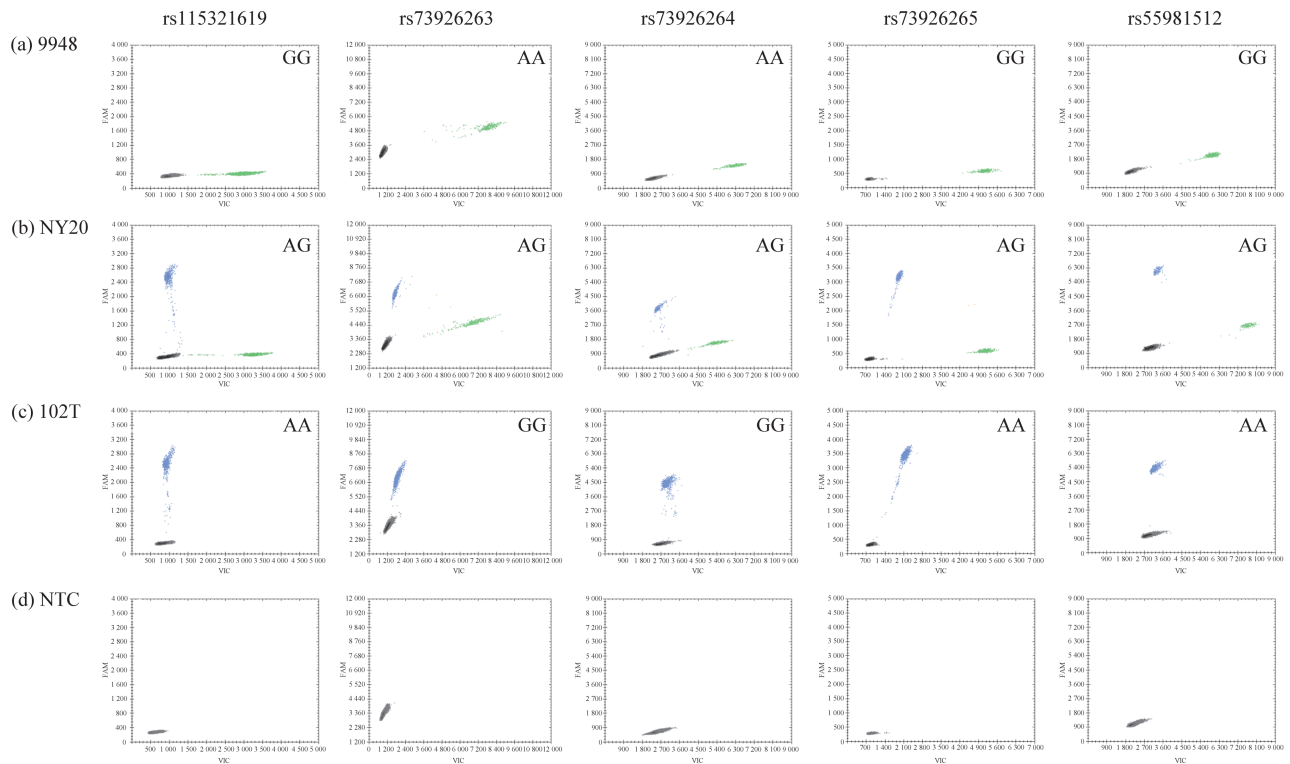


Fig. 2 2D ddPCR fluorescence signal map of the specificity verification for each SNP

The Y-axis presents FAM signal (blue) and X-axis presents VIC signal (green); the gray dots present double-negative droplets; the orange dots present double-positive droplets; NTC presents no template control.

2.2 体系性能评估

2.2.1 准确性

ddPCR 体系共计测试 27 份样本 DNA 获得 135

个基因型,所有位点分型均满足阳性判读标准,检出率 100%,与 Sanger 测序结果一致率为 100%。

2.2.2 稳定性

杂合样本(编号NY20)各位点3次重复实验检测总微滴数处于33 389~51 450之间(>30 000个微滴), 保证ddPCR实验结果分析的准确性。表4数据分析显示, FAM和VIC通道阳性荧光信号值

相对稳定, 两通道荧光信号均值的变异系数均≤10%; 各位点检测分型结果一致, 均判读为杂合子。所以平台微滴生成稳定, 构建的体系稳定性及重复性良好。

Table 4 Repeatability detection of sample NY20 to each SNP

Channel	rs number	Mean fluorescence signal value of positive droplets			Average	SD	CV/%
		1st	2nd	3rd			
FAM	rs115321619	2 508	2 632	2 475	2 538	82.78	3.26
	rs73926263	7 175	7 588	7 188	7 317	234.78	3.21
	rs73926264	4 241	4 107	4 439	4 262	167.03	3.92
	rs73926265	3 342	3 168	3 044	3 185	149.70	4.70
	rs55981512	4 326	4 860	5 084	4 757	389.42	8.19
VIC	rs115321619	3 449	3 218	2 920	3 196	265.21	8.30
	rs73926263	8 369	8 085	8 086	8 180	163.68	2.00
	rs73926264	6 246	6 112	5 996	6 118	125.11	2.04
	rs73926265	6 075	5 998	6 066	6 046	42.10	0.70
	rs55981512	8 403	7 447	8 496	8 115	580.66	7.16

The 1st and 2nd were tested in the same chip, while the 3rd test was on another chip.

2.2.3 灵敏度

对0.5、0.25、0.125、0.062 5和0.031 25 ng共5个梯度9948标准品DNA进行ddPCR检测。如图3所示, 当DNA模板量≥0.062 5 ng时, 各位点检测信号均达阳性标准, 且不同DNA模板量间的检测信号值无显著差异性($P>0.05$)。但当DNA模板量为0.031 25 ng时, 个别位点检测信号与0.5 ng比较明显降低($P<0.05$), 且rs73926264、rs55981512两位点信号未达阳性标准。附件表S1显示, 阳性微滴数目随着DNA模板量的降低而减少: 当DNA模板量为0.031 25 ng时, rs73926264位点有1次未检

出阳性微滴, 信号丢失, 无法判型。因此, ddPCR体系的最低DNA检出量为0.312 5 ng (0.062 5 ng×5个SNP位点)。

2.2.4 法医检材适应性

检测编号SY的8种类型检材是血卡、血纱布、唾液、口腔拭子、带毛囊头发、烟头、瓶口和手机屏幕擦拭物(脱落细胞)。由图4可见, 不同检材位点检测信号强度可能存在差异($P<0.05$), 但这种信号差异未影响位点分型判读, 所有检材仍均检出分型, 不同检材各位点分型一致, 表明构建ddPCR体系适合多类型法医检材的检测。

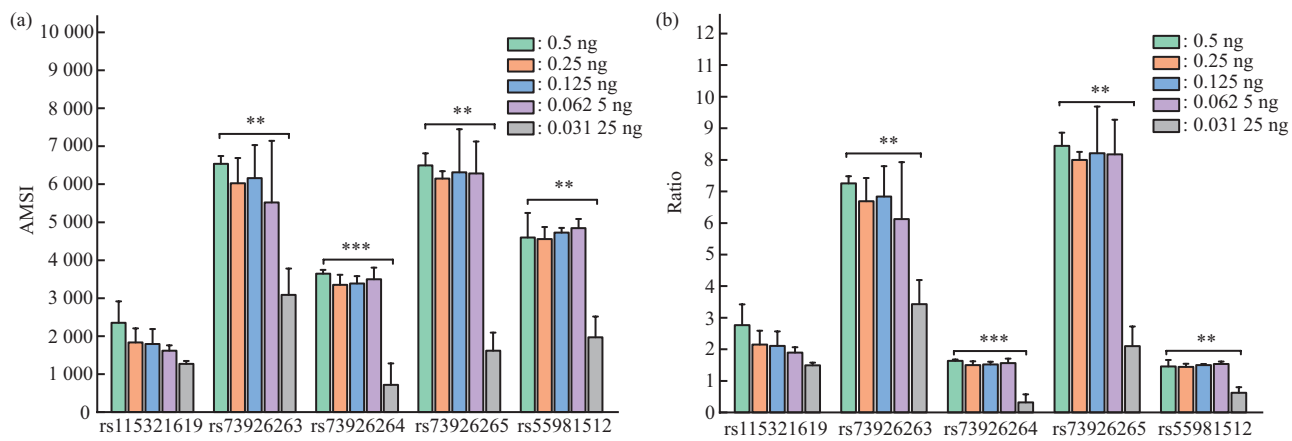


Fig. 3 AMSI and ratio data for each SNP at different input of reference DNA 9948 in VIC channel

Asterisks in each chart denote significantly different measurements compared to the 0.5 ng reference DNA 9948 (** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

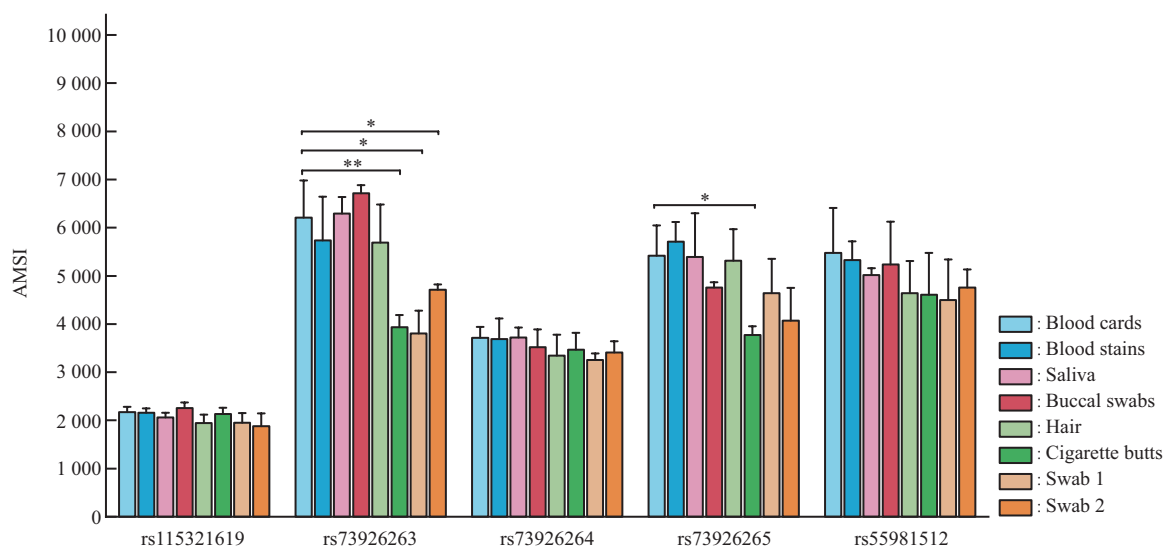


Fig. 4 AMSI data for each SNP of sample SY in VIC channel

Swab 1 presents bottle mouth swab; Swab 2 presents mobile phone screen swab; asterisks in each chart denote significantly different measurements compared to blood cards (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

2.2.5 抗抑制能力

基于 SNaPshot 和 ddPCR 技术分析 3 种常见抑制剂对 9948 标准品 DNA 检测的干扰情况。SNaPshot 检验中, 仅 rs55981512 位点, 在加入 150 $\mu\text{g/L}$ 腐植酸时, 检出 1 次有效峰型; 其他浓度抑制剂检测时, 所有位点均未检测信号峰 (附件图 S1)。ddPCR 检测结果如图 5 所示, 加入血红素 (350~1 400 $\mu\text{mol/L}$)、腐植酸 (150~300 $\mu\text{g/L}$) 和靛蓝 (150~300 mmol/L) 时, 随着抑制剂浓度不断

增加, 个别位点检测信号与不含抑制剂比较可能出现波动或降低, 但各位点阴阳性微滴仍能进行明显区分; 对图 6 数据分析表明, 添加与不添加抑制剂的 9948 标准品 DNA 的 ddPCR 检测中, 个别位点由于抑制剂浓度升高, 虽然生成总微滴数有下降可能, 但阳性微滴数目变化无显著差异 ($P > 0.05$), 表明模板扩增未受抑制剂干扰。所以 ddPCR 体系对抑制剂具有较强的耐受性。

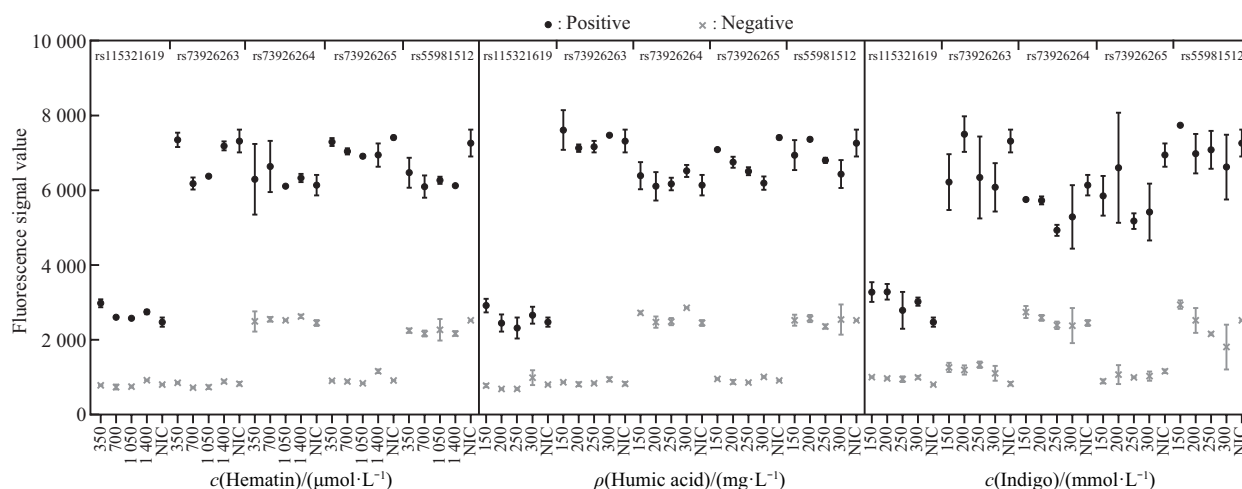


Fig. 5 Mean fluorescence signal of the positive and negative droplets in VIC channel for reference DNA 9948 spiked with serial dilutions of the inhibitors for ddPCR detection

NIC presents detecting reference DNA 9948 with no inhibitors control.

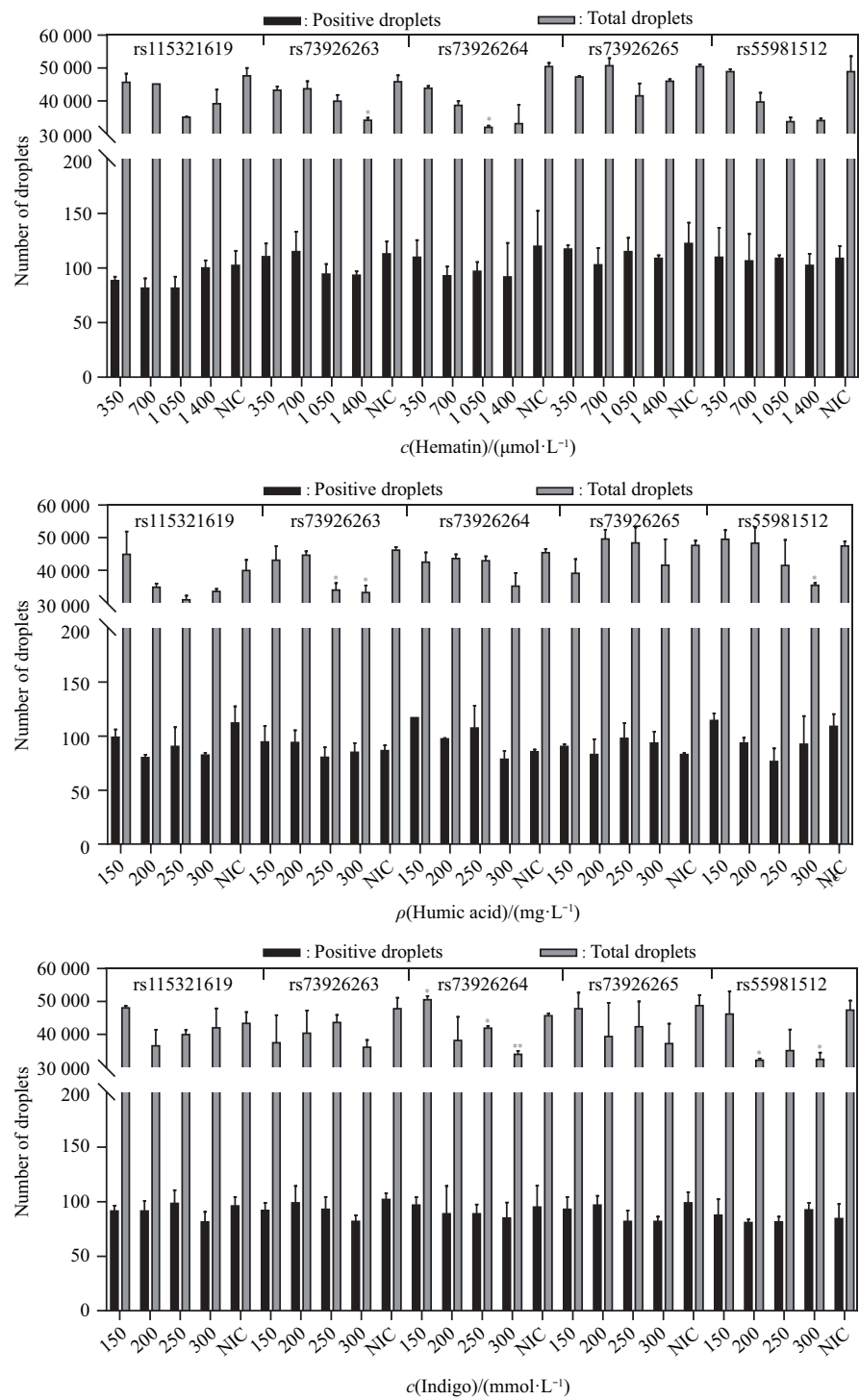


Fig. 6 The number of positive droplets in VIC channel and total droplets for reference DNA 9948 spiked with serial dilutions of the inhibitors for ddPCR detection

NIC presents detecting reference DNA 9948 with no inhibitors control; asterisks in each chart denote significantly different measurements compared to no inhibition control (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

2.2.6 样本测试

表6数据统计显示: 5-SNP单倍型AGGAA在42份高海拔地区样本中频率为75%, 在28份低海

拔地区频率仅为1.8%; 单倍型GAAGG在高海拔地区频率为25%, 在低海拔地区频率为98.2%。所以, EPAS1基因上的5-SNP高原适应单倍型

AGGAA 高频分布于高海拔区域,而在低海拔地区分布频率较低。

Table 6 Haplotype frequencies of 5-SNP in test samples

Population/ <i>n</i>	AGGAA		GAAGG	
	<i>n</i>	Frequency	<i>n</i>	Frequency
Sichuan, China/42	63	75%	21	25%
Henan, China/28	1	1.8%	55	98.2%

3 讨 论

SNP 遗传标记在法医学领域常用于个体识别、表型特征刻画等。迄今,可供选择的 SNP 检测方法众多,法医实验室主要检测方法有基于 CE 的 SNaPshot、飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 和二代测序。这些方法虽然具有较高的灵敏度和检测通量,但仍存在一定的局限性,例如实验周期长且工作量较大,对陈旧、含抑制剂类 (环境污染) 样本的检测效果不佳。同时,检测的设备和试剂昂贵,并需要专业人员分析,仅适宜实验室检测,难以满足基层现场快速检测需求。近年来,ddPCR 作为一种新兴检测技术,具备快速、单分子检测和强抗干扰能力,在痕量和混杂背景样本检测中展现了极大的优势,被广泛应用于环境、植物和病毒等领域^[21-23],但目前其在法医学研究少^[24-25]。因此,本研究在国产 ddPCR 平台构建了 5-SNP 分型检测体系,并对其性能测试结果进行初步探讨。

本研究中,ddPCR 在 SNP 分型检测的优势主要体现在:a. 实验操作简便,检测速度快。仅需 3 个步骤,微滴生成 (5 min)、PCR 扩增 (<2 h) 和荧光信号检测 (25 min),在 2.5 h 内即可获取检测结果。相比如 CE、质谱和二代测序平台,检测效率明显提高。b. 体系构建便捷,结果易判读。ddPCR 主要依据微滴荧光信号强度、数目及荧光类型进行 SNP 判型,无需涉及繁琐的体系优化调试;同时在构建体系时设计了较短的 PCR 产物 (<150 bp),可提高体系对降解检材的检测能力。c. 抗抑制能力突出。在较高浓度抑制剂检测时,ddPCR 可弱化抑制剂对 PCR 扩增效率的影响,保证检测结果的准确性和稳定性。本研究实验结果表明,5-SNP 分型检测体系重复性好、结果准确可靠,最低检测限 0.312 5 ng 基因组 DNA,符合法医现场检测要求^[19]。

当前,含抑制剂类样本检测仍旧是法医实践应用中的一大难点。尽管通过纯化可以去除部分抑制剂,但其易损耗样本 DNA (回收率 10%~80%) 并增加污染的风险,因此不适用微量样本分析^[26]。目前,法医实验室主流的 SNaPshot 和质谱检测对样本纯度要求较高,其中在 SNaPshot 检测中,随着抑制剂含量增加,位点检测峰值降低,并伴有异常或杂峰出现,易于扰位点判型^[27-28]。质谱检测对样本质量和量要求更高 (>10 ng),因而极少应用于现场样本检测^[19]。二代测序在法医实际工作中,对 DNA 的质和量要求较高^[29],抗抑制剂能力也在一定程度上限制其发展,商用法医试剂盒 (Illumina Beta® Version ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit) 在 MiSeq FGx 法医专用测序仪检测时,200 mg/L 腐植酸或 800 μmol/L 血红素会导致体系扩增完全抑制^[30]。同时,在法医学常规检测应用中,也需考虑该平台与检材类型 (如血液和土壤类样本) 的适用性^[31]。

ddPCR “微滴式” 技术不易受抑制剂干扰^[32-34]。本研究测试了法医学检材中 3 类常见的抑制剂: 血红素、腐植酸和靛蓝,结果显示 ddPCR 相比 SNaPshot 检测对抑制物展现更高的耐受性。但值得注意的是,实验中使用的血红素、腐植酸和靛蓝均较难溶于水,随着抑制物含量增多,难溶性颗粒物可能会堵塞微滴生成芯片上的微流控通道造成微滴生成失败或微滴破裂^[35]。因此虽然 ddPCR 抗抑制能力强,仍建议样本处理时按照常规 DNA 提取纯化步骤进行操作,以降低颗粒物浓度。

此外,在 ddPCR 检测中设立空白对照很重要,ddPCR 依据微滴终点荧光信号强度差异,进行阴阳性微滴判定,所以空白对照是阴阳性阈值线设置的重要依据,并可监测体系有无污染情况^[36]。尽管不同类型检材个别位点检测信号可能存在差异,尤其是在分析 DNA 纯度较差样本时检测信号有降低趋势,但这种信号差异并不会影响微滴阴阳性状态判断,仍可正确获取分型。因此,ddPCR 技术这一优势为法医学陈旧、降解或含抑制剂类 (环境污染) 等疑难检材的检测提供潜在的应用价值。但是目前 (表 7), ddPCR 相比法医常用检测技术,仍存在一定的局限性,即检测通量低,在较多位点检测时,灵敏度也将有所降低。因此,在实际应用中位点检测数量是该方法需结合考虑的要点。

Table 7 Characteristics of commonly forensic used methods for SNP genotyping					
Methods	Number of SNPs	Operation complexity	Detection period	Sensitivity	Inhibitors tolerance
Sanger sequencing ^[37]	1	Low	12–24 h	Low	Low
ddPCR	1	Low	2–3 h	Moderate	High
HRM ^[38]	<10	Low	2–4 h	High	Low
SNaPshot ^[39]	<20	Moderate	7–8 h	High	Moderate
PSQ ^[40]	<50	Moderate	6–10 h	Moderate	Low
MALDI-TOF MS ^[19]	<60	Moderate	5–6 h	Moderate	Low
NGS ^[40]	>50	High	>24 h	High	Moderate

HRM, high resolution melt; PSQ, pyrosequencing; NGS, next generation sequencing.

4 结 论

基于 ddPCR 的 SNP 检测体系具有准确可靠、简便快速、抗抑制能力强等优势，适合法医现场生物检材检测。此外，本研究使用的检测仪器、耗材和试剂均为国产，检测成本低、数据安全性高，易于在法医实验室普及。下一步我们将继续探索构建多色荧光通道 ddPCR 检测体系，提高 SNP 位点单管检测数量，并探索其在 RNA、DNA 甲基化等遗传标记检测方面的潜力。

附件 PIBB_20210336_Doc_S1.pdf 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn> 或 <http://www.cnki.net>)。

参 考 文 献

[1]

Børsting C, Fordyce S L, Olofsson J, *et al.* Evaluation of the Ion Torrent™ HID SNP 169-plex: a SNP typing assay developed for human identification by second generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet*, 2014, **12**: 144-154

[2]

Wang D G, Fan J B, Siao C J, *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998, **280**(5366): 1077-1082

[3]

Kidd K K, Pakstis A J, Speed W C, *et al.* Current sequencing technology makes microhaplotypes a powerful new type of genetic marker for forensics. *Forensic Sci Int Genet*, 2014, **12**: 215-224

[4]

Jia J, Wei Y L, Qin C J, *et al.* Developing a novel panel of genome-wide ancestry informative markers for bio-geographical ancestry estimates. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;**8**(1):187-194

[5]

Li Y I, Zhao W, Li D, *et al.* EDAR, LYPLAL1, PRDM16, PAX3, DKK1, TNFSF12, CACNA2D3, and SUPT3H gene variants influence facial morphology in a Eurasian population. *Hum Genet*, 2021, **140**(10): 1499

[6]

Pati N, Schowinsky V, Kokanovic O, *et al.* A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and biplex invader SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, **60**(1):1-12

[7]

Sauer S, Gut I G. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, **782**(1-2): 73-87

[8]

余韬,吕飒丽,李岩. 二代测序技术分析 SNP 在法医学上的应用. *南京医科大学学报*, **2019**(11):1686-1691
Yu T, Lv S L, Li Y. *Journal of Nanjing Medical University*, **2019**(11):1686-1691

[9]

Huggett J F, Cowen S, Foy C A. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem*, 2015, **61**(1): 79-88

[10]

Jennings L J, George D, Czech J, *et al.* Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR. *J Mol Diagn*, 2014, **16**(2): 174-179

[11]

Taly V, Pekin D, Benhaim L, *et al.* Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem*, 2013, **59**(12): 1722-1731

[12]

姜浩,吕雪飞,赵可心. 基于微流控芯片的核酸适配体筛选技术研究进展. *分析化学*, 2020, **48**(5):590-600
Jiang H, Lv X F, Zhao K X. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, **48**(5):590-600

[13]

Sanders R, Huggett J F, Bushell C A, *et al.* Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem*, 2011, **83**(17): 6474-6484

[14]

Huerta-Sánchez E, Jin X, Bianba Z, *et al.* Altitude adaptation in Tibetans caused by introgression of Denisovan-like DNA. *Nature*, 2014, **512**(7513): 194-197

[15]

黄美莎. 藏族祖先信息 SNPs 位点筛选与法医 DNA 族群地域推断[D]. 太原:山西医科大学, 2018
Huang M S. The Selection of Tibetan Ancestry Informative SNPs and Forensic DNA Geographical Ancestry Inference[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2018

[16]

王小娟,钱恩芳,李悦,等. 中国西南地区藏族人群遗传亚结构研究. *遗传*, 2020, **42**(6):565-576
Wang X J, Qian E F, L Y, *et al.* *Hereditas (Beijing)*, 2020, **42**(6): 565-576

[17]

Li C X, Pan Q, Guo Y G, *et al.* Construction of a multiplex allele-specific PCR-based universal array (ASPUA) and its application to hearing loss screening. *Hum Mutat*, 2008, **29**(2): 306-314

- [18] Ren J, Deng T, Huang W, *et al.* A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food. *PLoS One*, 2017, **12**(3): e0173567
- [19] Johansen P, Andersen J D, Børsting C, *et al.* Evaluation of the iPLEX® Sample ID Plus Panel designed for the Sequenom MassARRAY® system. A SNP typing assay developed for human identification and sample tracking based on the SNP for ID panel. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, **7**(5): 482-487
- [20] Gill P, Whitaker J, Flaxman C, *et al.* An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int*, 2000, **112**(1): 17-40
- [21] Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, *et al.* Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*, 2012, **84**(2): 1003-1011
- [22] Arvia R, Sollai M, Pierucci F, *et al.* Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *J Virol Methods*, 2017, **246**: 15-20
- [23] Cavé L, Brothier E, Abrouk D, *et al.* Efficiency and sensitivity of the digital droplet PCR for the quantification of antibiotic resistance genes in soils and organic residues. *Appl Microbiol and Biotechnol*, 2016, **100**(24): 10597-10608
- [24] 胡伟,陈荣华,张晨,等. 微滴式数字PCR技术用于生物样品种属鉴定和绝对定量. *法医学杂志*, 2014, **30**(5):342-345
Hu W, Chen R H, Zhang C, *et al.* *Journal of Forensic Medicine*, 2014, **30**(5):342-345
- [25] 冯秀晶,易红梅,任星旭,等. 数字PCR技术及其在检测领域的应用. *遗传*, 2020, **42**(4):363-373
Feng X J, Yi H M, Ren X X, *et al.* *Hereditas (Beijing)*, 2020, **42**(4): 363-373
- [26] Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*, 2020, **412**(9): 2009-2023
- [27] 王一航. 拮抗法医检材四种抑制剂的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2021
Wang Y H. Research on Antagonism of Four Inhibitors in Forensic Materials[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2021
- [28] Zhang C, Li H, Zhao X, *et al.* Validation of expressmarker mtDNA-SNP60: a mitochondrial SNP kit for forensic application. *Electrophoresis*, 2016, **37**(21): 2848-2861
- [29] Murray D C, Coghlan M L, Bunce M. From benchtop to desktop: important considerations when designing amplicon sequencing workflows. *PLoS One*, 2015, **10**(4): e0124671
- [30] Guo F, Yu J, Zhang L, *et al.* Massively parallel sequencing of forensic STRs and SNPs using the Illumina® ForenSeq™ DNA signature prep kit on the MiSeq FGx™ forensic genomics system. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, **31**: 135-148
- [31] Goldberg C S, Turner C R, Deiner K, *et al.* Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Eco Evol*, 2016, **7**(11): 1299-1307
- [32] Dingle T C, Sedlak R H, Cook L, *et al.* Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin Chem*, 2013, **59**(11): 1670-1672
- [33] Rački N, Dreó T, Gutierrez-Aguirre I, *et al.* Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods*, 2014, **10**(1): 42
- [34] Sidstedt M, Romsos E L, Hedell R, *et al.* Accurate digital polymerase chain reaction quantification of challenging samples applying inhibitor-tolerant DNA polymerases. *Anal Chem*, 2017, **89**(3): 1642-1649
- [35] Zhao Y, Xia Q, Yin Y, *et al.* Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR assays for quantitative detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *PLoS One*, 2016, **11**(7): e0159004
- [36] Gerdes L, Iwobi A, Busch U, *et al.* Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms. *Biomol Detect Quantif*, 2016, **7**: 9-20
- [37] Zhang L, Cui G, Li Z, *et al.* Comparison of high-resolution melting analysis, TaqMan allelic discrimination assay, and Sanger sequencing for clopidogrel efficacy genotyping in routine molecular diagnostics. *J Mol Diagn*, 2013, **15**(5): 600-606
- [38] Mehta B, Daniel R, McNevin D. HRM and SNaPshot as alternative forensic SNP genotyping methods. *Forensic Sci Med Pathol*, 2017, **13**(3): 293-301
- [39] Jiang H H, Li B, Ma Y, *et al.* Forensic validation of a panel of 12 SNPs for identification of Mongolian wolf and dog. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 13249
- [40] 布蕾楠. 法医个体识别多等位基因SNP的筛选及NGS-SNP分型体系的建立[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021
Bu L N. Genome-wide Screening of Multi-allelic SNPs for Forensic Individual Identification and Development of NGS-SNP Panel[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2021

Rapid Genotyping of SNP Based on Domestic Droplet Digital PCR*

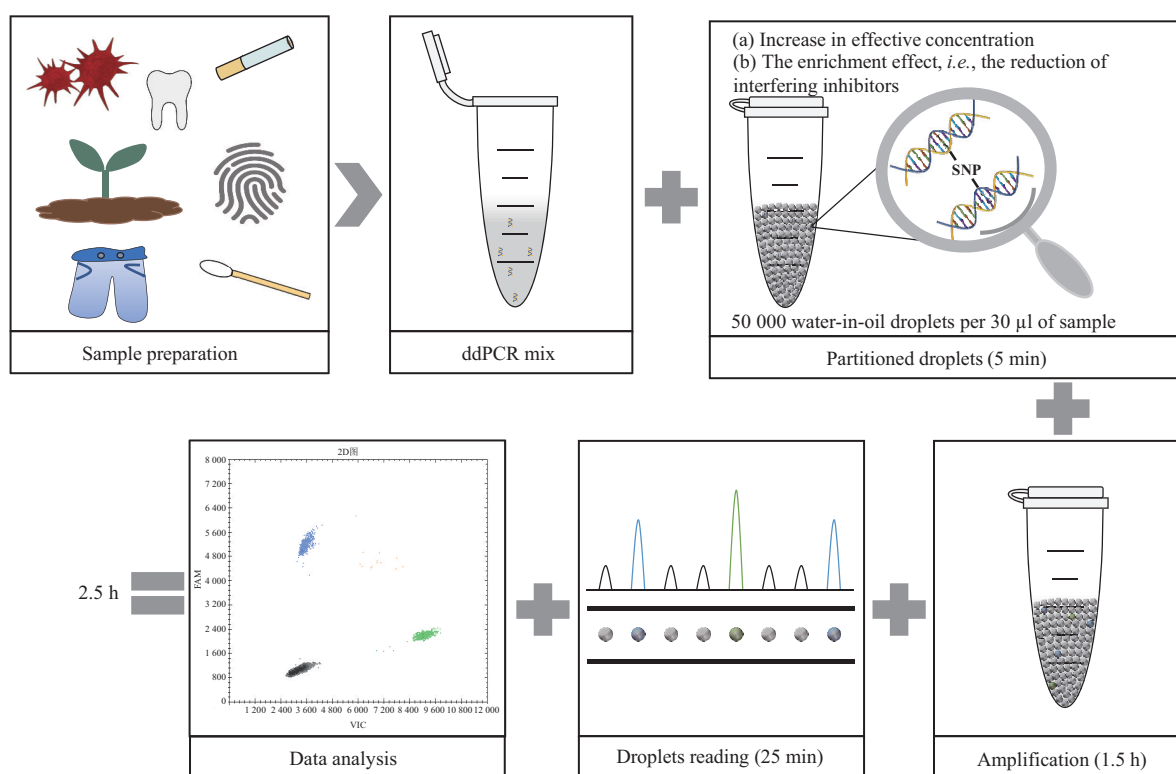
LIN Pei-Shuang¹⁾, WANG Han²⁾, ZHU Ling-Xiang³⁾, BEI Lei³⁾, HUANG Jiang¹⁾,
ZHAO Wen-Ting^{2)**}, LI Cai-Xia^{1,2)**}

¹⁾Institute of Forensic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

²⁾Key Laboratory of Forensic Genetics, Beijing Engineering Research Center of Crime Scene Evidence Examination,
National Engineering Laboratory for Forensic Science, Institute of Forensic Science, Beijing 100038, China;

³⁾TargetingOne (Beijing) Corporation, Beijing 100038, China)

Graphical Abstract



* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81772027).

** Corresponding author.

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

ZHAO Wen-Ting. Tel: 86-10-83752706, E-mail: wtzhao@sibs.ac.cn

Received: November 3, 2021 Accepted: February 18, 2022

Abstract Objective Current forensic SNP genotyping methods often require imported platforms and are labor-intensive, time-consuming and costly. Droplet digital PCR (ddPCR) is a new generation of PCR technology that allows rapid qualification of rare target DNA sequence, and is less susceptible to PCR inhibitors. This study is intended to establish a SNP genotyping method on domestic ddPCR platform and explore the applicability of ddPCR in forensics. **Methods** Genotyping system of the high altitude adaptive EPAS1 haplotype (rs115321619, rs73926263, rs73926264, rs73926265 and rs55981512) was established by ddPCR. Then we tested the specificity of primers and probes, evaluated its accuracy, stability, sensitivity and adaptability separately. Meanwhile, ddPCR and SNaPshot minisequencing technology were compared in terms of inhibitor resistance ability. Finally, preliminary application in 70 samples were conducted. **Results** The ddPCR assay only required a total run time within 2.5 h, and showed high accuracy and repeatability in SNP genotyping. The detection sensitivity was 0.312 5 ng. DdPCR assays also exhibited better tolerance to inhibitors than SNaPshot. The tested individuals showed good consistence with their background information. **Conclusion** The SNP genotyping assay based on ddPCR is accurate, rapid, easily-used and shows great resistance to perturbations by inhibitors, which has strong application potential in the field of rapid forensic detection, and is suitable for forensic analysis.

Key words droplet digital PCR, forensic detection, SNP genotyping

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0336