



法医学DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记的集成检验技术*

易娜^{1,2)} 赵光斌²⁾ 康克莱²⁾ 姚伊人²⁾ 郭柯利²⁾ 赵杰²⁾ 张驰²⁾

缪磊^{1,2)} 王乐^{1,2)**} 季安全^{1,2)**}

(¹⁾ 昆明医科大学医学院, 昆明 650500; ²⁾ 公安部鉴定中心, 法医遗传学公安部重点实验室, 北京 100038)

摘要 DNA遗传标记在法医学领域的个体识别、亲缘关系鉴定、始祖推断和表型特征刻画等方面具有重要作用。DNA甲基化分子标记在法医学领域的生物年龄推断、组织体液鉴定和表型预测等方面具有独特优势。目前的研究多是在不同的检验流程中对DNA甲基化分子标记和DNA遗传标记独立地进行检验,通过不同的分析流程分别解读这两种标记所蕴含的生物信息。用一份生物检材通过一次检测同时得到DNA遗传信息和表观遗传信息的集成检验方法,能够在获得丰富遗传数据的基础上有效关联这两种标记的生物信息,节省检验时间,降低检验成本和简化实验流程。本文分别介绍了基于毛细管电泳平台、焦磷酸测序平台和二代测序平台进行DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记集成检验的多种方案,分析了各方案在不同平台的技术特点,归纳了各方案的集成化程度和实际应用能力,重点分析了在其他领域中基于二代测序技术进行集成检验的技术路线,以期挖掘其在法医学生物检材中的应用潜力,探讨了位点间相互作用和甲基化预处理方法对DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记集成检验的影响,提出了在法医学生物检材中应用集成检验技术所面临的挑战,期望为法医学研究实践提供参考。

关键词 法医遗传学, DNA, 甲基化, 集成检验方法, 二代测序

中图分类号 R89, DF795.2, D919.2

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0467

法庭科学领域常用的DNA遗传标记包括短串联重复序列(short tandem repeat, STR)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、插入/缺失多态性(insertion or deletion polymorphism, InDel)、微单倍型等^[1],在个体识别、亲缘关系分析、始祖推断、表型特征刻画等方面发挥重要的作用^[2-4]。

DNA甲基化是一种表观调控机制,其发挥功能不依赖于DNA的一级结构。在人类基因组中,绝大多数DNA甲基化修饰发生在胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)中胞嘧啶的5号碳原子上,形成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)^[5]。人类基因组的甲基化水平是一个动态的过程,生命的不同时期及所处不同的环境都有着不同的DNA甲基化模式,这使其在解决法庭科学领域中生物年龄推断^[6-8]、生物组织属性推断^[9-11]和同卵双生子鉴别^[12-14]等问题方面具有独特优势。有研究表明,DNA甲基化还可用于推断环境影响的表型特征和

生活习惯^[15-16]。

现有的研究中DNA甲基化分子标记和DNA遗传标记的检验多是在不同的实验流程中单独进行。法医DNA检验技术主要对DNA中特定区域的长度多态性和序列多态性进行检验。目前国内外均已建立了较为系统和成熟的检测体系^[17-18],研制了适用于多种检测平台的商品化DNA检验试剂盒^[19-20]。DNA甲基化在法医学领域可作为经典DNA遗传标记的有效补充。DNA甲基化的检验不同于DNA遗传标记的检验,对基因组DNA的直接扩增会抹去碱基的甲基化修饰。因此,在DNA甲基化的检验中常需要通过不同的预处理方式将甲基化修饰转换

* 国家重点研发计划(2022YFC3341001)和公安部科技强警基础工作专项(2022JC10)资助。

** 通讯联系人。

王乐 Tel: 010-83752707, E-mail: wangle_02@163.com

季安全 Tel: 010-83752706, E-mail: aqjdna@163.com

收稿日期: 2023-11-24, 接受日期: 2024-04-15

为可检测的核酸形式, 再通过DNA检验的方法对DNA甲基化状态进行测定^[21]。目前基于不同检测平台也已经建立了一系列甲基化检测方法。当需要联合使用一份样本中的遗传信息和DNA甲基化信息时, 通常需要对有限的样本进行至少一次DNA检验和一次DNA甲基化检验, 存在操作费时费力、样本消耗较大、实验成本较高等问题^[22-23]。集成检验技术通过对一份检材进行一次检验可以实现多种生物标记信息的同时获取, 能有效简化实验步骤, 降低实验成本和样本消耗, 在生物医学相关研究和实践中具有良好的应用前景^[24]。

碱基的甲基化修饰不会影响DNA遗传标记信息的获取, 这是DNA甲基化分子标记和DNA遗传标记集成检验的基础。目前, 基于毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)平台的多种检验方案已经可以实现部分DNA甲基化分子标记和DNA遗传标记的集成检验。基于焦磷酸测序平台对SNP和甲基化标记检验的兼容, 也可以实现这两种标记的集成检验。近年来, 随着二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术的不断发展, 其高通量、集成化的技术特点也为甲基化分子标记和DNA遗传标记的集成检验提供了新思路^[25]。本文将梳理基于不同平台的DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记的集成检验方法, 着重分析各集成检验方法的技术特点, 以探索更适用于法医学领域的DNA甲基化分子标记和DNA遗传标记集成检验方法。

1 法医DNA遗传标记的检验技术

基于CE的DNA片段长度分析技术是当今法医DNA检验的主流技术, 主要用于检测STR的长度多态性。与荧光标记复合扩增技术配合, CE技术可以实现高效、快速和灵敏的法医学DNA分析。但由于其荧光数量有限, 仅能获得少量遗传标记信息且无法获得STR的序列信息。除CE技术之外, 还有基于测序技术、杂交技术、质谱技术和PCR技术的多种DNA检验方法^[26-29]。在法医学实践中, 常需要检验几十甚至上百个DNA遗传标记以进行个体识别和亲缘关系鉴定。因此, 能够进行多位点复合分型的技术显然更适用于法医学应用。新一代测序技术凭借高通量、高速度和低成本的优势, 可以同时测序多个样本中的大量遗传标记, 从而在一次检验中充分获取样本的生物信息, 在法医学样本尤其是降解样本的检验中具有显著优势^[28]。近几

年, 单分子测序技术逐渐兴起, 其技术特点是测序读长更长, 无需在模板制备环节进行PCR扩增, 有效避免了PCR扩增过程中对错配碱基的引入, 但目前该技术存在测序错误率偏高等问题^[30-32]。

2 DNA甲基化标记的检验技术

DNA甲基化的检验需要对基因组DNA中碱基的甲基化修饰进行预处理。目前基于甲基化敏感的限制性内切酶(methylation-sensitive restriction endonuclease, MSRE)酶切^[33]、亲和富集^[34]、重亚硫酸盐转化^[35]三大类预处理方法已经建立了多种DNA甲基化检测方法, 以满足不同的应用需求。近年来, 随着对DNA甲基化的深入研究, 基于酶促转化^[36]和三代测序的检测方法^[37-38]也被提出。

MSRE法利用MSRE识别和切割非甲基化胞嘧啶位点, 通过PCR、电泳、DNA杂交和测序等技术对酶切产物的片段大小进行分析获取甲基化水平^[39-41]。该处理方法条件温和, 操作简单且特异性强, 但由于DNA消化不完全而可能出现假阳性, 且甲基化敏感的内切酶种类较少, 只能识别有限的甲基化位点, 使得该方法的应用受到一定局限。

亲和富集法利用能够特异识别甲基化修饰的物质, 从样本中分离和富集甲基化DNA。依据结合物质的不同, 可分为两种: 一种是甲基化DNA免疫沉淀^[34], 另一种是甲基化CpG结合蛋白亲和纯化法^[42]。亲和富集法处理后通过甲基化芯片杂交和测序技术可以在全基因组范围内对甲基化位点进行检测。但由于该方法对DNA序列的富集效率受CpG位点密度影响, 主要富集CpG位点密度较高的区域, 存在对CpG位点密度较低区域的富集能力较弱的问题^[43]。

重亚硫酸盐转化的基本原理是将DNA序列中碱基甲基化修饰的差异转换成序列水平的差异。该方法利用重亚硫酸盐处理DNA, 以诱导未甲基化的胞嘧啶脱氨基形成尿嘧啶, 同时保持甲基化胞嘧啶的完整, 然后在PCR过程中将尿嘧啶扩增为胸腺嘧啶, 最后得到未甲基化胞嘧啶至胸腺嘧啶的转变^[44]。DNA经重亚硫酸盐处理后, 可通过电泳、PCR、杂交、测序和质谱检测等多种技术对DNA甲基化进行定性或定量分析^[45-48]。基于重亚硫酸盐处理的甲基化检验方法被广泛应用于各个领域^[49]。但该方法存在两个主要的缺点, 首先, 重亚硫酸盐处理条件苛刻, 会导致DNA双链分离和断裂, 使大部分DNA降解^[50], 严重限制了重亚硫酸盐处理

方法在DNA量较低的样本中的效用。其次,未经修饰的胞嘧啶约占人类基因组总胞嘧啶的95%^[36],将所有这些位置转化为胸腺嘧啶会严重降低DNA序列的复杂性,不仅增加靶向扩增引物设计难度,限制在同一体系对多个标记进行复合扩增的能力,而且在结合测序的甲基化分析方法中还会导致测序质量差、定位率低、基因组覆盖率不均匀和测序成本增加^[36]。

近年研究发现,另一类基于酶促反应的转化方法同样可以将碱基的甲基化修饰水平的差异转化为DNA序列的差异。2019年Liu等^[36]基于10-11转位酶对甲基化胞嘧啶的氧化作用开发了10-11转位酶辅助的吡啶硼烷测序方法。这种基于酶-化学的转化方法可以直接对5mC和5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)进行转化和检测。2021年,New England Biolabs (NEB)公司开发了一种完全基于酶促反应进行转化的酶学甲基化测序方法^[51]。该方法通过3种酶对DNA样本进行处理,最后的转化结果与重亚硫酸盐转化类似,都是使未经甲基化修饰的胞嘧啶转化为尿嘧啶。此外,还有耦合载脂蛋白B mRNA编辑酶的表观遗传测序法^[52]和直接甲基化测序法^[53],这两种方法可以分别特异性地检测5hmC和5mC,实现对单种甲基化修饰信息的获取。这类基于酶促反应的转化方法相较于重亚硫酸盐转化的反应条件更温和,能保留更完整的DNA,在DNA量较低和DNA受损样本的检验中更具优势^[36]。部分方法中对甲基化修饰位点的直接转化和检测,很大程度保留了序列的复杂

性^[36, 53]。值得注意的是,该类方法中酶的转化能力是检测结果准确的关键,在检测时应注意设置对照,避免特异位点的不完全转化和非特异位点的部分转化。

采用三代测序技术检验DNA甲基化分子标记不需要对DNA进行预处理^[37, 54]。根据测序原理的差异,主要分为Oxford Nanopore Technologies的纳米孔测序技术和Pacific Biosciences公司的单分子实时测序技术。纳米孔测序技术通过修饰碱基和未修饰碱基在通过纳米孔时产生的电流强度差异实现对DNA甲基化的检验^[37]。在单分子实时测序技术中,DNA聚合酶在遇到被修饰的核苷酸停顿的时间较普通核苷酸停顿的时间长,通过聚合酶动力学的改变可以实现对甲基化修饰位点的直接检测^[38]。但这两种技术对甲基化修饰的检测都依赖于较复杂的生物信息学分析流程,且都存在原始错误率较高的问题,有待通过对检测平台的升级和分析流程的优化进一步规避可能的错误^[55-56]。

3 DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记的集成检验

不同领域的研究中,在同一平台上对同一份检材的DNA信息和DNA甲基化信息分别进行检测,说明了对两类标记进行共同分析的可行性和适用性^[57]。基于不同检测平台已经可以实现DNA甲基化分子标记和不同类型DNA遗传标记的集成检验(表1)。

Table 1 Comparison of integrated detection methods for DNA genetic markers and epigenetic molecular markers

表1 DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记集成检验方法的比较

标记类型及数量	位点分布	DNA投入量	甲基化预处理方式	检测技术	参考文献
3个CpG+1个SNP	CpG-SNP ¹⁾	10 ng	重亚硫酸盐转化	CE	[58]
6个CpG+6个SNP	CpG-SNP ¹⁾	0.5~5 ng ³⁾	重亚硫酸盐转化	SNaPshot	[59]
12个CpG+16个SNP	CpG-SNP ¹⁾	10~40 ng	MSRE	SNaPshot	[48]
20个CpG+22个InDel/STR	CpG-InDel/STR ¹⁾	50~200 ng	重亚硫酸盐转化	CE	[60]
2个CpG+23个Y-STR +1个Y染色体标记	CpG、STR ²⁾	0.1~1 ng	MSRE	CE	[61]
5个CpG+3个SNP	CpG-SNP ¹⁾	20 ng	重亚硫酸盐转化	焦磷酸测序	[62]
7个CpG+6个SNP	CpG-SNP ¹⁾	3~100 ng	重亚硫酸盐转化	NGS	[63]
10个甲基化基因+79个突变位点	CpG、SNV、InDel ²⁾	5~100 ng	MSRE	NGS	[41]
全基因组	基因组	1 µg	重亚硫酸盐转化	NGS	[64]
全基因组	基因组	4 µg	重亚硫酸盐转化	NGS	[65]
全基因组	基因组	2~80 ng	酶转化	NGS	[66]

¹⁾ DNA遗传标记位于DNA甲基化标记上下游,经扩增后,相邻的两种标记位于同一扩增子。²⁾ DNA甲基化标记和DNA遗传标记经扩增后分别位于不同的扩增子。³⁾ 甲基化预处理后的DNA。

3.1 基于CE平台的集成检验

基于CE技术在法医学遗传实验室的广泛应用,探索基于CE平台的多遗传标记集成检验方法对法医学研究实践具有重要意义。2016年, Watanabe等^[58]采用重亚硫酸盐处理后PCR联合克隆测序的方法,对基因组DNA进行重亚硫酸盐处理将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,再通过靶向扩增一个同时包含3个CpG位点和1个SNP位点的目标区域,将两种位点的信息整合到了同一扩增子上,最后对PCR扩增产物进行克隆并在CE平台上测序,初步实现了甲基化标记与DNA遗传标记的共检测(图1a)。

2020年四川大学的Xie等^[59]通过重亚硫酸盐处理后PCR联合SNaPshot的方法,在重亚硫酸盐转化后,以同时包括CpG位点及其附近SNP位点的序列为目的片段设计引物,通过甲基化特异性PCR对特定CpG位点的甲基化状态进行定性检测,随后对明确甲基化的PCR产物通过SNaPshot进行SNP分型检测,先后完成了6个CpG位点及其附近的6个SNP位点的检测。根据灵敏性实验,该方法可以用于低至0.5 ng重亚硫酸盐转化DNA的检测。SNaPshot方法可以进行DNA甲基化的定量分析,该方法完成了SNP和CpG位点的共扩增,但未能实现在检测步骤的集成(图1b中①),集成检验的实现流程有待进一步优化。2021年, Li等^[48]采用SNaPshot联合MSRE进行检验。在酶切消化后,同样先通过对同时包含CpG位点和SNP位点区域的靶向扩增进行组织特异性甲基化位点的验证,随后设计两种标记的单碱基延伸引物通过SNaPshot方法对扩增产物上的两种位点同时进行了检测,最后得到了12个CpG及其上下游400 bp范围内共16个SNP的位点信息(图1b中②)。利用该方法成功通过对混合斑迹的一次检验,同时实现了生物组织属性推断和个体识别,验证得到联合标记中的16个SNP位点在中国南方汉族人群中的累计个体识别能力达到了0.999 8。

由于SNP位点的多态性较低,少量SNP位点不能满足个体识别的需求。为此,有研究者考虑将多态性更高的STR纳入集成检验体系研究。2022年, Li等^[60]建立了一个包含17个精液特异性CpG-InDel/STR复合标记(包括17个CpG和21个InDel/STR)、3个体液阳性对照CpG位点和1个性别识别位点的精液特异性分型系统(图1b中③)。该方法基于扩增阻滞突变系统-聚合酶链反应通过

精液特异性CpG-InDel/STR复合标记实现对混合物中精液成分的特异性扩增,对扩增产物在CE平台上进行分型。通过最后的电泳图谱可同时得到CpG位点的甲基化状态和InDel/STR的分型结果,实现对体液组织类型进行鉴别的同时对样本供体的InDel/STR进行分型。验证得到联合标记中21个InDel/STR标记在山西人群中的累计个体识别能力达到了0.999 999 85。但该方法的灵敏性验证结果显示,当DNA投入量为25 ng时,大于320 bp的复合标记在电泳图中的峰高低于分析阈值。分析是重亚硫酸盐处理造成DNA降解以及PCR扩增偏好性影响,使得CpG-InDel/STR复合标记中较长的片段扩增失败。同年, Lin等^[61]建立了一个包含23个Y-STR基因座和他们之前研究^[67]的3个序列(1个含HhaI酶切位点且为精液特异性甲基化位点的序列“SP”、1个含HhaI酶切位点的未甲基化消化对照序列“DC”和1个识别Y染色体的特异性序列“SPY”)的共扩增体系用于Y-STR和DNA甲基化的同时检验。该方法在PowerPlex®Y23试剂盒的基础上向扩增体系中加入HhaI酶和另外3个位点的引物,在扩增初始增加37℃孵育30 min的步骤,用于HhaI酶对特定甲基化位点的酶切,随后在CE平台上对扩增产物进行检测。最后,研究者成功在低至0.1 ng的精液DNA样本中同时得到23个Y-STR基因座的分型和图谱上对应位置的SP及SPY检测信号,实现了Y-STR和甲基化标记的共检测,能够在识别精液成分的同时,对男性成分的Y-STR进行分型。

利用CE平台进行集成检验的方案在原始检测方法的基础上增加了对基因组DNA进行甲基化预处理的步骤,将甲基化转化为可检测的形式,再通过引物设计将甲基化分子标记和DNA遗传标记整合到同一体系进行扩增,实现两种标记的集成(图1b)。但有限的荧光数量和扩增子长度局限了同一体系中可集成的标记种类和数量,限制了CE平台的集成检验能力。

3.2 基于焦磷酸测序平台的集成检验

焦磷酸测序技术可以实现对DNA序列和甲基化水平的测定,在甲基化分析和DNA序列分析中被广泛应用。在重亚硫酸盐转化联合焦磷酸测序的方法中,除了在甲基化分析模式下直接对甲基化状态进行检测和定量分析外,由于重亚硫酸盐处理后未甲基化位点C到T的转化,也可以在等位基因定量分析模式下利用C和T的百分比得到CpG位点的

甲基化水平。2018年, Watanabe等^[62]利用该原理在重亚硫酸盐转化后通过对同时包含 CpG 位点和 SNP 位点区域的靶向扩增和焦磷酸测序同时得到了供体的5个精液特异性甲基化位点信息和3个 SNP 位点的分型信息(图1b中④)。基于该分析模式, 焦磷酸测序图谱同时包括DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记的定量分析结果, 无需额外的分析流程即可得到相应位点的甲基化水平和SNP分型, 实现了更高层次的集成。但由于重亚硫酸盐处理造成的DNA降解及法医学检材的特殊性, 该方法对CpG-STR复合标记的检测存在一定的局限性。

3.3 基于NGS平台的集成检验

NGS技术可以对样本中的多种标记进行集成检验^[25]。2022年, Watanabe等^[63]在靶向重亚硫酸盐测序的基础上采用与之前研究^[58, 62]同样的靶向扩增方法将CpG位点和SNP位点整合到同一扩增体系的同一扩增产子上, 随后对扩增产物再进行一步PCR反应以添加测序接头形成测序文库, 最后在MiSeq FGx上实现了对混合样本中6个SNP位点和7个甲基化位点的靶向高分辨率检测, 可以用于法医学实践中个体特异性的唾液识别和唾液特异性的SNP分型。该方法操作简便, 只需设计一组引物和一次建库即可实现较高度度的集成检验(图1b中⑤)。但在法医学领域, 基于NGS平台对DNA甲基化分子标记和DNA遗传标记的集成检验研究仍然较少, 可以通过对其他领域研究的分析为法医学研究实践提供一定参考。

2022年, 中国医学科学院国家肿瘤中心Wang等^[41]使用MSRE对细胞游离DNA进行酶切处理后, 将甲基化修饰转化成高通量测序可检测到的形式。然后对其进行末端修复和接头连接, 通过扩增形成了一个包含全基因组信息的文库, 再以该文库的DNA为模板在同一体系中通过多重基因特异性引物对不同目的区域的79个突变位点和10个甲基化基因进行扩增并构建测序文库, 在NovaSeq 6000上对肿瘤游离DNA的突变情况和甲基化状态进行了共检测。证明了利用NGS平台检测多种变异的能力, 同时保证了在DNA投入量低至5 ng的情况下仍能得到较高的检测灵敏度。该方法得到的测序数据同时包括遗传和表观遗传信息, 通过不同的生物信息分析流程可以分别得到突变情况和甲基化状态。

在DNA和DNA甲基化的全基因组检验中引入发夹接头的方法, 可以用于遗传和表观遗传基因组

的同时检验^[68]。2021年, 中国科学院北京生命科学研究所的Liang等^[64]开发了双链重亚硫酸盐测序方法, 用于在一次检验流程中同时对单核苷酸拷贝数变异和DNA甲基化进行准确地全基因组单碱基分辨率识别。该方法通过发夹接头将Waston链和Crick链锁定在一起, 然后进行重亚硫酸盐处理和大规模平行测序。最后, 使用研究者开发的生物信息分析流程能够在输出文件中同时得到单核苷酸拷贝数变异的基因组位置和DNA甲基化水平(图1b中⑥)。与之类似还有2022年NEB公司的Yan等^[65]开发的一种甲基化-SNP测序方法, 该方法的检验步骤包括基因组DNA片段化、发卡结构的连接、完全甲基化修饰的拷贝链合成、测序接头连接、重亚硫酸盐转化、上机测序。最后得到的测序结果只包括四种碱基(A、T、C、G), 利用研究者设计的解析规则对测序数据进行处理后分析可以分别得到甲基化水平和单核苷酸拷贝数变异的信息(图1b中⑦)。但上述两个方案中初始DNA投入量均为微克级, 考虑是甲基化预处理方法为重亚硫酸盐转化所致。2023年, 英国Cambridge Epigenetix公司Füllgrabe等^[66]开发了一种能够在单一工作流程中提供准确的6种碱基(A、T、C、G、5mC、5hmC)读出的全基因组测序方法(图1b中⑧)。研究者在全基因组酶学甲基化测序的接头连接步骤前先对片段化的基因组DNA进行了发夹结构的连接、双链的分离和不含甲基化修饰拷贝链的合成步骤, 在接头连接后的3种酶处理步骤前增加了5hmC糖基化和拷贝链甲基化的过程, 随后再对得到的双链DNA进行酶学转化并建库测序。该方法采用酶促转化的方法进行甲基化预处理, 可以在低至2 ng的基因组DNA中得到准确的基因组测序数据。该类方法使用发夹结构将Waston链和Crick链连接在一起, 在后续可能造成DNA变性的步骤中维持互补链的连接^[68]。分析时基于DNA分子双链之间碱基的互补关系和甲基化的对称关系对read1和read2对应的碱基进行解码, 可以识别PCR和测序过程中的错误, 提升集成检验的准确性^[64-66]。第三代测序技术直接读取表观遗传修饰要求较高的DNA投入量, 而该方法可与PCR结合, 从低输入量DNA获得深度测序数据, 但复杂的实验流程和生物信息分析流程可能会限制该方法的实际应用。

基于NGS平台的DNA和DNA甲基化的集成检验既可以通过靶向测序完成, 也可以通过基因组测序完成(图1b)。基于靶向测序的集成检验需要

在甲基化预处理后通过共扩增将DNA 遗传标记和DNA 甲基化分子标记整合到同一体系, 随后对这两种标记进行共建库和共检测, 实现这两种标记的集成检验。上述研究中对近百个突变和甲基化位点的集成检验, 仍然可以得到准确的检测结果^[41], 揭示了NGS平台对大量标记的集成能力以及准确

检测投入量较低的DNA 的潜力。本文阐述的3种基于全基因组测序的集成检验方法同样包括甲基化预处理和建库步骤, 通过测序和专门的解析规则可以实现在基因组水平上对遗传和表观遗传信息的同时获取。

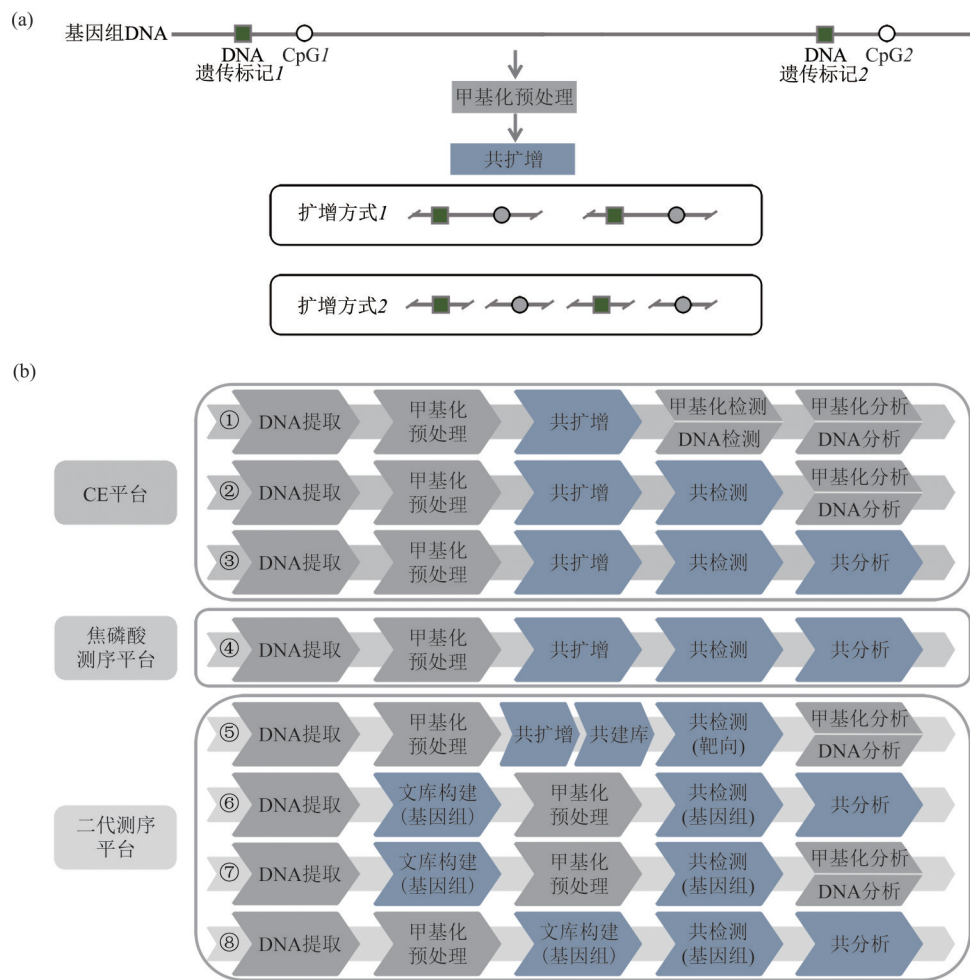


Fig. 1 Integrated detection flow of DNA and DNA methylation markers

图1 DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记的集成检验技术流程

(a) DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记在甲基化处理后靶向扩增中的不同组合方式。绿色方格表示STR、SNP、插入缺失、微单倍型等常见的DNA遗传标记, 白色圆形表示基因组DNA中的CpG位点, 灰色圆形表示经过甲基化预处理及扩增后位于扩增子上的CpG位点(根据实际甲基化状态该位点可能存在碱基的改变)。CpG1和DNA遗传标记1以及CpG2和DNA遗传标记2的物理距离很近, CpG1和DNA遗传标记2的物理距离较远。扩增方式1表示物理距离很近的DNA遗传标记和DNA甲基化标记在同一个体系中被扩增到同一扩增子, 扩增方式2表示不同的DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记在同一个体系中被扩增到不同的扩增子。(b) 不同平台上的集成检验技术流程。蓝色表示实现了DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记集成化的步骤。

4 展望及挑战

集成检验DNA 甲基化和DNA 标记能够从微量的、不可重现的案发现场生物检材中获取更多生物信息, 增强DNA 与DNA 甲基化证据间的关联性,

简化法医物证检验流程, 并降低检验成本。但
要实现高准确性和高集成化的共检测, 除了需要解决前文提到的联合标记的扩增片段较长、检测平台
通量有限等问题外, 仍有一些难点需要突破。

目前对DNA 遗传标记和DNA 甲基化分子标记

进行共同检验的研究多是在PCR过程将两种标记的位点整合到同一体系中进行检测。在不同的集成检验方案中,两种标记在扩增后可以位于不同或相同的扩增子上,其中同时分析同一分子上两种标记的方法对于法医学实践中混合样本的个体特异性体液识别和体液特异性DNA遗传标记分型有独特优势^[63]。但这种方案中DNA遗传标记位点通常位于CpG位点附近,不可避免地会对两种位点的选择有所限制,导致对DNA遗传信息和表观遗传信息的获取受限^[60]。

DNA甲基化检测结果不同于经典DNA遗传标记的“检出”或“未检出”,目前对DNA甲基化水平只能进行概率性的推断。研究表明,基于不同平台和不同方法检测得到的DNA甲基化水平往往存在较显著的差异^[69-70],导致对不同研究中同一CpG位点的甲基化水平进行比较时,很难评估是技术差异还是样本间真正的差异导致了甲基化检测结果的不同^[71]。因此,DNA甲基化标记和DNA遗传标记集成检验标准化实验流程的构建,对保证检测结果的准确性和可靠性有重要作用。

DNA甲基化分子标记和DNA遗传标记的集成检验需要尤其关注这两类标记位点间的关系。研究表明,有42种单碱基替换的情况可能导致CpG位点的获得或丢失^[72],其中C>T的SNP在dbSNP数据库中占有所有SNP的65%,且通常发生在CpG背景下,影响CpG位点的存在^[73-75]。除了序列变化外,DNA甲基化修饰过程还可能因为关键调控基序的顺势效应,被基因组邻近区域内的其他序列影响^[76-78]。因此,充分理解其他基因组现象与DNA甲基化的关系,如SNP和DNA甲基化之间的关系,对于优化位点的选择、理解异常值的发生有重要意义^[79]。

在基于重亚硫酸盐处理及类似的转化方法中,C>T的SNP可能无法与未甲基化的胞嘧啶到胸腺嘧啶的转换区分开,导致被误认为是未甲基化的胞嘧啶,影响对甲基化水平的准确定量^[73, 80]。同时,由于未经甲基化修饰的胞嘧啶在人类基因组总胞嘧啶中的高占比^[36],这种转化会导致基因组DNA序列的改变,影响集成检验中DNA遗传标记的准确分型。此外,转化后的DNA序列复杂性严重降低,增加了靶向扩增引物设计难度,限制了集成检验位点的选择。基于酶学的方法可以仅转化基因组DNA中被甲基化修饰的胞嘧啶^[36, 53]。这种转化方法对基因组序列影响较小,不会导致大量DNA遗

传标记序列的改变,在更温和的转化条件下保证了序列的完整性和复杂性。因此,在DNA甲基化标记和DNA遗传标记的集成检验中,选择合适的甲基化预处理方式对降低实验复杂性,提升结果准确性具有重要意义。

三代测序技术能够同时检测DNA序列和甲基化修饰^[81]。基于长读长和无需PCR的特点,利用该技术进行DNA遗传标记和DNA甲基化分子标记的集成检验可能不需要考虑检测平台通量和扩增片段长度的限制,能够在一次检验中获得更全面的遗传和表观遗传信息,相较于其他检测平台有着明显的优势。由于法医学存在微量和降解检材,如何在长读长的基础上兼容对短DNA片段的检测,如何无需PCR过程从低DNA投入量的检验中获得足够的测序深度和检测准确性是三代测序在法医学应用中必须要解决的问题^[82]。

参 考 文 献

- [1] 侯一平.法医学物证学.第4版.北京:人民卫生出版社,2016
Hou Y P. Forensic Biological Evidence. 4th Ed. Beijing: People Health Press, 2016
- [2] Kayser M. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. Hum Genet, 2017, **136**(5): 621-635
- [3] 孙宽,侯一平.法医族源推断的分子生物学进展.法医学杂志, 2018, **34**(3): 286-293
Sun K, Hou Y P. J Forensic Med, 2018, **34**(3): 286-293
- [4] Oldoni F, Podini D. Forensic molecular biomarkers for mixture analysis. Forensic Sci Int Genet, 2019, **41**: 107-119
- [5] Miranda T B, Jones P A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. J Cell Physiol, 2007, **213**(2): 384-390
- [6] Heidegger A, Xavier C, Niederstätter H, et al. Development and optimization of the VISAGE basic prototype tool for forensic age estimation. Forensic Sci Int Genet, 2020, **48**: 102322
- [7] Guan X, Ohuchi T, Hashiyada M, et al. Age-related DNA methylation analysis for forensic age estimation using post-mortem blood samples from Japanese individuals. Leg Med, 2021, **53**: 101917
- [8] Lee J E, Lee J M, Naue J, et al. A collaborative exercise on DNA methylation-based age prediction and body fluid typing. Forensic Sci Int Genet, 2022, **57**: 102656
- [9] Lee H Y, Jung S E, Lee E H, et al. DNA methylation profiling for a confirmatory test for blood, saliva, semen, vaginal fluid and menstrual blood. Forensic Sci Int Genet, 2016, **24**: 75-82
- [10] Gauthier Q T, Cho S, Carmel J H, et al. Development of a body fluid identification multiplex via DNA methylation analysis. Electrophoresis, 2019, **40**(18-19): 2565-2574
- [11] Choung C M, Lee J W, Park J H, et al. A forensic case study for body fluid identification using DNA methylation analysis. Leg Med, 2021, **51**: 101872

- [12] Planterose Jiménez B, Liu F, Caliebe A, *et al.* Equivalent DNA methylation variation between monozygotic co-twins and unrelated individuals reveals universal epigenetic inter-individual dissimilarity. *Genome Biol*, 2021, **22**(1): 18
- [13] Wang W, Li W, Wu Y, *et al.* Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses in monozygotic twins identify potential biomarkers of depression. *Transl Psychiatry*, 2021, **11**(1): 416
- [14] Wu Y, Tian H, Wang W, *et al.* DNA methylation and waist-to-hip ratio: an epigenome-wide association study in Chinese monozygotic twins. *J Endocrinol Invest*, 2022, **45**(12): 2365-2376
- [15] Vidaki A, Ballard D, Aliferi A, *et al.* DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, **28**: 225-236
- [16] Vidaki A, Kayser M. From forensic epigenetics to forensic epigenomics: broadening DNA investigative intelligence. *Genome Biol*, 2017, **18**(1): 238
- [17] Claerhout S, Verstraete P, Warnez L, *et al.* CSYseq: the first Y-chromosome sequencing tool typing a large number of Y-SNPs and Y-STRs to unravel worldwide human population genetics. *PLoS Genet*, 2021, **17**(9): e1009758
- [18] He G, Wang M, Miao L, *et al.* Multiple founding paternal lineages inferred from the newly-developed 639-plex Y-SNP panel suggested the complex admixture and migration history of Chinese people. *Hum Genomics*, 2023, **17**(1): 29
- [19] Ralf A, van Oven M, Montiel González D, *et al.* Forensic Y-SNP analysis beyond SNaPshot: high-resolution Y-chromosomal haplogrouping from low quality and quantity DNA using Ion AmpliSeq and targeted massively parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, **41**: 93-106
- [20] Feng Y S, Zhang C, Chen Q F, *et al.* Evaluation of the MHSeqTyper47 kit for forensically challenging DNA samples. *Forensic Sci Int Genet*, 2022, **61**: 102763
- [21] Laird P W. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*, 2010, **11**: 191-203
- [22] Giunco S, Padovan M, Angelini C, *et al.* Prognostic role and interaction of TERT promoter status, telomere length and MGMT promoter methylation in newly diagnosed IDH wild-type glioblastoma patients. *ESMO Open*, 2023, **8**(3): 101570
- [23] Zhang J, Xu R, Lu Q, *et al.* A novel methylation marker NRN1 plus TERT and FGFR3 mutation using urine sediment enables the detection of urothelial bladder carcinoma. *Cancers*, 2023, **15**(3): 615
- [24] Miao L, Yuan J H, Kang K L, *et al.* Research progress on the integrated detection technology for forensic deoxyribonucleic acid genetic markers and ribonucleic acid molecular markers. *J Forensic Sci Med*, 2023, **9**(1): 64-69
- [25] 王乐, 叶健, 白雪, 等. 二代测序技术及其在法医遗传学中的应用. *刑事技术*, 2015, **40**(5): 353-358
Wang L, Ye J, Bai X, *et al.* *Forensic Sci Technol*, 2015, **40**(5): 353-358
- [26] Wang J. From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(16): 3011-3016
- [27] Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*, 2001, **11**(1): 3-11
- [28] Mardis E R. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2008, **9**: 387-402
- [29] Adamczyk S, Chojak-Koźniewska J, Poimala A, *et al.* Fast and reliable method to estimate global DNA methylation in plants and fungi with high-pressure liquid chromatography (HPLC) - ultraviolet detection and even more sensitive one with HPLC-mass spectrometry. *J Biotechnol*, 2023, **374**: 1-4
- [30] Schadt E E, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet*, 2010, **19**(R2): R227-R240
- [31] Logsdon G A, Vollger M R, Eichler E E. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet*, 2020, **21**(10): 597-614
- [32] Ni P, Huang N, Nie F, *et al.* Genome-wide detection of cytosine methylations in plant from Nanopore data using deep learning. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 5976
- [33] Waalwijk C, Flavell R A. DNA methylation at a CCGG sequence in the large intron of the rabbit beta-globin gene: tissue-specific variations. *Nucleic Acids Res*, 1978, **5**(12): 4631-4634
- [34] Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, Leal-Rojas P, *et al.* Clinical and public health research using methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP): a comparison of commercially available kits to examine differential DNA methylation across the genome. *Epigenetics*, 2012, **7**(1): 106-112
- [35] Frommer M, McDonald L E, Millar D S, *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(5): 1827-1831
- [36] Liu Y, Siejka-Zielińska P, Velikova G, *et al.* Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(4): 424-429
- [37] Simpson J T, Workman R E, Zuzarte P C, *et al.* Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nat Methods*, 2017, **14**(4): 407-410
- [38] Olivia Tse O Y O, Jiang P, Cheng S H, *et al.* Genome-wide detection of cytosine methylation by single molecule real-time sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(5): e2019768118
- [39] Kaput J, Sneider T W. Methylation of somatic vs germ cell DNAs analyzed by restriction endonuclease digestions. *Nucleic Acids Res*, 1979, **7**(8): 2303-2322
- [40] Sun Y, Sun Y, Tian W, *et al.* A novel restriction endonuclease Glal for rapid and highly sensitive detection of DNA methylation coupled with isothermal exponential amplification reaction. *Chem Sci*, 2017, **9**(5): 1344-1351
- [41] Wang P, Song Q, Ren J, *et al.* Simultaneous analysis of mutations and methylations in circulating cell-free DNA for hepatocellular carcinoma detection. *Sci Transl Med*, 2022, **14**(672): eabp8704
- [42] Serre D, Lee B H, Ting A H. MBD-isolated genome sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(2): 391-399

- [43] Robinson M D, Stirzaker C, Statham A L, *et al.* Evaluation of affinity-based genome-wide DNA methylation data: effects of CpG density, amplification bias, and copy number variation. *Genome Res*, 2010, **20**(12): 1719-1729
- [44] Clark S J, Harrison J, Paul C L, *et al.* High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(15): 2990-2997
- [45] Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 1998, **281**(5375): 363, 365
- [46] Suchiman H E, Sliker R C, Kremer D, *et al.* Design, measurement and processing of region-specific DNA methylation assays: the mass spectrometry-based method EpiTYPER. *Front Genet*, 2015, **6**: 287
- [47] Wu Z, Bai Y, Cheng Z, *et al.* Absolute quantification of DNA methylation using microfluidic chip-based digital PCR. *Biosens Bioelectron*, 2017, **96**: 339-344
- [48] Li Z, Li J, Li Y, *et al.* Development of a multiplex methylation-sensitive restriction enzyme-based SNP typing system for deconvolution of semen-containing mixtures. *Int J Legal Med*, 2021, **135**(4): 1281-1294
- [49] Morselli M, Farrell C, Rubbi L, *et al.* Targeted bisulfite sequencing for biomarker discovery. *Methods*, 2021, **187**: 13-27
- [50] Tanaka K, Okamoto A. Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, **17**(7): 1912-1915
- [51] Vaisvila R, Chaithanya Ponnaluri V K, Sun Z, *et al.* Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA. *Genome Res*, 2021, **31**(7): 1280-1289
- [52] Schutsky E K, DeNizio J E, Hu P, *et al.* Nondestructive, base-resolution sequencing of 5-hydroxymethylcytosine using a DNA deaminase. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**(11): 1083-1090
- [53] Wang T, Fowler J M, Liu L, *et al.* Direct enzymatic sequencing of 5-methylcytosine at single-base resolution. *Nat Chem Biol*, 2023, **19**(8): 1004-1012
- [54] Gouil Q, Keniry A. Latest techniques to study DNA methylation. *Essays Biochem*, 2019, **63**(6): 639-648
- [55] Goodwin S, McPherson J D, McCombie W R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 2016, **17**(6): 333-351
- [56] Clark T A, Lu X, Luong K, *et al.* Enhanced 5-methylcytosine detection in single-molecule, real-time sequencing *via* Tet1 oxidation. *BMC Biol*, 2013, **11**: 4
- [57] Li R, Song J, Zhao A, *et al.* Association of *APP* gene polymorphisms and promoter methylation with essential hypertension in Guizhou: a case-control study. *Hum Genomics*, 2023, **17**(1): 25
- [58] Watanabe K, Akutsu T, Takamura A, *et al.* Evaluation of a blood-specific DNA methylated region and trial for allele-specific blood identification from mixed body fluid DNA. *Leg Med*, 2016, **22**: 49-53
- [59] Xie B, Song F, Wang S, *et al.* Exploring a multiplex DNA methylation-based SNP typing method for body fluids identification: as a preliminary report. *Forensic Sci Int*, 2020, **313**: 110329
- [60] Li Z, Li Y, Liu N, *et al.* Typing of semen-containing mixtures using ARMS-based semen-specific CpG-InDel/STR markers. *Int J Legal Med*, 2022, **136**(4): 1163-1176
- [61] Lin Y C, Tsai L C, Liu K L, *et al.* A novel co-amplification system for simultaneous amplification of 23 Y-STR and identification of spermatozoa. *Int J Legal Med*, 2022, **136**(1): 73-84
- [62] Watanabe K, Taniguchi K, Akutsu T. Development of a DNA methylation-based semen-specific SNP typing method: a new approach for genotyping from a mixture of body fluids. *Forensic Sci Int Genet*, 2018, **37**: 227-234
- [63] Watanabe K, Taniguchi K, Toyomane K, *et al.* A new approach for forensic analysis of saliva-containing body fluid mixtures based on SNPs and methylation patterns of nearby CpGs. *Forensic Sci Int Genet*, 2022, **56**: 102624
- [64] Liang J, Zhang K, Yang J, *et al.* A new approach to decode DNA methylome and genomic variants simultaneously from double strand bisulfite sequencing. *Brief Bioinform*, 2021, **22**(6): bbab201
- [65] Yan B, Wang D, Vaisvila R, *et al.* Methyl-SNP-seq reveals dual readouts of methylome and variome at molecule resolution while enabling target enrichment. *Genome Res*, 2022, **32**(11/12): 2079-2091
- [66] Füllgrabe J, Gosal W S, Creed P, *et al.* Simultaneous sequencing of genetic and epigenetic bases in DNA. *Nat Biotechnol*, 2023, **41**(10): 1457-1464
- [67] Liu K L, Tsai L C, Lin Y C, *et al.* Identification of spermatozoa using a novel 3-plex MSRE-PCR assay for forensic examination of sexual assaults. *Int J Legal Med*, 2020, **134**(6): 1991-2004
- [68] Laird C D, Pleasant N D, Clark A D, *et al.* Hairpin-bisulfite PCR: assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(1): 204-209
- [69] Bergsma T, Rogaeva E. DNA methylation clocks and their predictive capacity for aging phenotypes and healthspan. *Neurosci Insights*, 2020, **15**: 2633105520942221
- [70] Freire-Aradas A, Pośpiech E, Aliferi A, *et al.* A comparison of forensic age prediction models using data from four DNA methylation technologies. *Front Genet*, 2020, **11**: 932
- [71] Fleckhaus J, Bugert P, Al-Rashedi N A M, *et al.* Investigation of the impact of biogeographic ancestry on DNA methylation based age predictions comparing a Middle East and a Central European population. *Forensic Sci Int Genet*, 2023, **67**: 102923
- [72] Liu Y, Siegmund K D, Laird P W, *et al.* Bis-SNP: combined DNA methylation and SNP calling for Bisulfite-seq data. *Genome Biol*, 2012, **13**(7): R61
- [73] Zhao Z, Boerwinkle E. Neighboring-nucleotide effects on single nucleotide polymorphisms: a study of 2.6 million polymorphisms across the human genome. *Genome Res*, 2002, **12**(11): 1679-1686
- [74] Bani-Fatemi A, Gonçalves V F, Zai C, *et al.* Analysis of CpG SNPs in 34 genes: association test with suicide attempt in schizophrenia.

- Schizophr Res, 2013, **147**(2/3): 262-268
- [75] Naue J, Winkelmann J, Schmidt U, *et al.* Analysis of age-dependent DNA methylation changes in plucked hair samples using massive parallel sequencing. *Rechtsmedizin*, 2021, **31**(3): 226-233
- [76] Bell J T, Pai A A, Pickrell J K, *et al.* DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol*, 2011, **12**(1): R10
- [77] Lienert F, Wirbelauer C, Som I, *et al.* Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nat Genet*, 2011, **43**(11): 1091-1097
- [78] Zhou D, Li Z, Yu D, *et al.* Polymorphisms involving gain or loss of CpG sites are significantly enriched in trait-associated SNPs. *Oncotarget*, 2015, **6**(37): 39995-40004
- [79] Naue J, Hoefsloot H C J, Mook O R F, *et al.* Chronological age prediction based on DNA methylation: massive parallel sequencing and random forest regression. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, **31**: 19-28
- [80] Chen Y A, Lemire M, Choufani S, *et al.* Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics*, 2013, **8**(2): 203-209
- [81] Stevanovski I, Chintalaphani S R, Gamaarachchi H, *et al.* Comprehensive genetic diagnosis of tandem repeat expansion disorders with programmable targeted nanopore sequencing. *Sci Adv*, 2022, **8**(9): eabm5386
- [82] Katsman E, Orlanski S, Martignano F, *et al.* Detecting cell-of-origin and cancer-specific methylation features of cell-free DNA from Nanopore sequencing. *Genome Biol*, 2022, **23**(1): 158

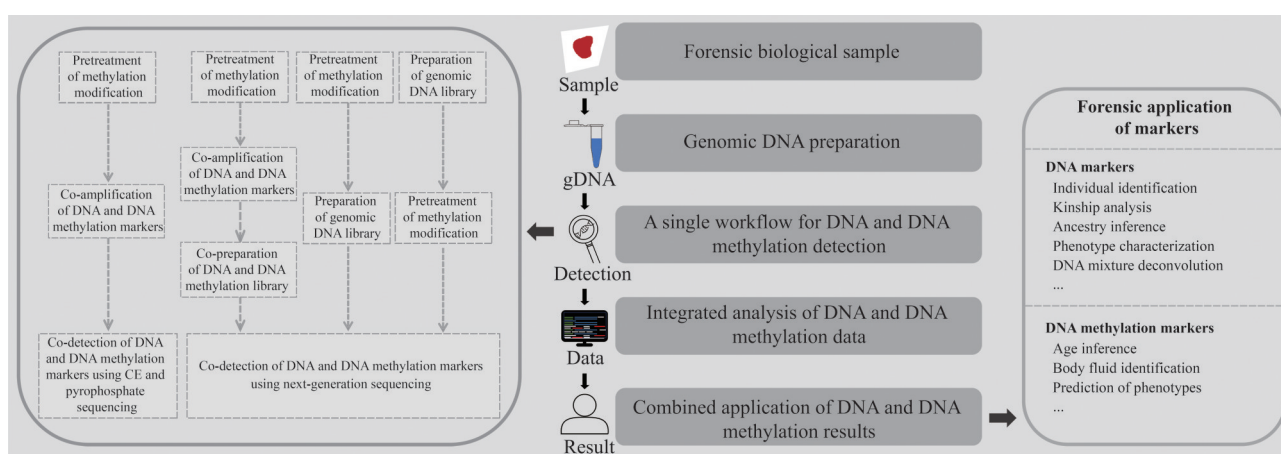
Integrated Detection Techniques for Forensic DNA and DNA Methylation Markers*

YI Na^{1,2)}, ZHAO Guang-Bin²⁾, KANG Ke-Lai²⁾, YAO Yi-Ren²⁾, GUO Ke-Li²⁾, ZHAO Jie²⁾,
ZHANG Chi²⁾, MIAO Lei^{1,2)}, WANG Le^{1,2)**}, JI An-Quan^{1,2)**}

(¹⁾School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

²⁾Key Laboratory of Forensic Genetics of Ministry of Public Security, Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China)

Graphical abstract



Abstract DNA genetic markers have always played important roles in individual identification, kinship analysis, ancestry inference and phenotype characterization in the field of forensic medicine. DNA methylation has unique advantages in biological age inference, body fluid identification and prediction of phenotypes. The majority of current studies independently examine DNA and DNA methylation markers using various workflows, and they use various analytical procedures to interpret the biological information these two markers present. Integrated methods detect DNA and DNA methylation markers simultaneously through a single experimental workflow using the same preparation of sample. Therefore, they can effectively reduce consumption of time and cost, streamline experimental procedures, and preserve valuable DNA samples taken from crime scenes. In this paper, the integrated detection approaches of DNA and DNA methylation markers on different detection platforms were reviewed. In order to convert methylation modifications to detectable forms, several options were available for pretreatment of genomic DNA, including digestion with methylation-sensitive restriction enzyme, affinity enrichment of methylated fragments, conversion of methylated or unmethylated cytosine. Multiplexed primers

* This work was supported by grants from the National Key R&D Program of China (2022YFC3341001) and the Ministry of Public Security of China (2022JC10).

** Corresponding author.

WANG Le. Tel: 86-10-83752707, E-mail: wangle_02@163.com

JI An-Quan. Tel: 86-10-83752706, E-mail: aqjdna@163.com

Received: November 24, 2023 Accepted: April 15, 2024

can be designed for DNA markers and converted DNA methylation markers for co-amplification. The schemes of using capillary electrophoresis platform for integrated detection add the pretreatment of genomic DNA on the basis of detecting DNA genetic markers. DNA and DNA methylation markers are then integrated by co-amplification. But the limited number of fluorescent options available and the length of amplicons restrict the type and quantity of markers that can be integrated into a panel. Pyrophosphate sequencing also supports integrated detection of DNA and DNA methylation markers. On this platform, due to the conversion of unmethylated cytosine to thymine after treatment with bisulfite, the methylation level of CpG site can be directly calculated using the peak height ratio of cytosine bases and thymine bases. Therefore, the methylation levels and SNP typing can be simultaneously obtained. However, due to the limited read length of sequencing, the detection of markers with longer amplicons is restricted. It is not conducive to fully interpret the complete information of the target sequence. Next-generation sequencing also supports integrated detection of DNA and DNA methylation markers. A preliminary experimental process including DNA extraction, pretreatment of genomic DNA, co-preparation of DNA and DNA methylation library and co-sequencing, has been formed based on the next-generation sequencing platform. It confirmed the feasibility of next-generation sequencing technology for integrated detection of DNA and DNA methylation markers. In field of biomedicine, various integrated detection schemes and corresponding data analysis approaches of DNA and DNA genetic markers developed based on the above detection process. Co-analysis can simultaneously obtain the genomic genetic and epigenetic information through a single analytic process. These schemes suggest that next-generation sequencing may be an effective method for achieving more accurate and highly integrated detection, helping to explore the potential for application in forensic biological samples. We finally explore the impact of interactions between sites and different pretreatment methods on the integrated detection of DNA and DNA methylation markers, and also propose the challenge of applying third-generation sequencing for integrated detection in forensic samples.

Key words forensic genetics, DNA, methylation, integrated detection method, next-generation sequencing

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0467