

司法鉴定技术规范

SF/Z JD0105001-2010

亲权鉴定技术规范

2010-04-07 发布

2010-04-07 生效

中华人民共和国司法部
司法鉴定管理局

发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 检验程序	2

前 言

本标准(草案)运用法医学、生物学和遗传学的理论和技术,结合法医学鉴定的实践经验而制定,为三联体、二联体和祖孙亲权鉴定提供科学依据和统一标准。

本标准由司法部司法鉴定科学技术研究所提出。

本标准由司法部司法鉴定科学技术研究所负责起草。

本标准主要起草人:李莉、李成涛、柳燕、林源、赵书民、阙庭志、赵珍敏。

亲权鉴定技术规范

1 范围

本标准规定了我国法医 DNA 实验室进行亲权鉴定所必须遵循的技术要求。

本标准适用于从事亲权鉴定的DNA实验室，不适用于高通量数据库的比对。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本部分的条款。凡是注明日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可适用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

CNAS-CL01:2006 检测和校准实验室认可准则

GA/T382—2002 法庭科学DNA实验室规范

GA/T383—2002 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标准。

3.1 亲权鉴定 Parentage Testing

亲权鉴定是通过对人类遗传标记的检测，根据遗传规律分析，对个体之间血缘关系的鉴定。

3.2 三联体亲子鉴定 Parentage Testing of Trios

被检测男子、孩子生母与孩子的亲子鉴定。

3.3 二联体亲子鉴定 Parentage Testing of Duos

被检测男子与孩子的亲子关系鉴定。

注：被检测女子与孩子的亲子关系鉴定也属于二联体亲子鉴定，但本标准界定的是被检测男子与孩子的亲子关系鉴定。

3.4 祖孙亲缘关系鉴定 Kinship Analysis of Grandparents and Grandchildren

祖孙亲缘关系鉴定是通过对人类遗传标记的检测，根据遗传规律分析，对有争议的祖父母与孙子女血缘关系的鉴定。

3.5 遗传标记 Genetic Marker

具有多态性的基因座。用于亲子鉴定的遗传分析系统由一定数量的遗传标记组成，常用的有常染色体短串联重复序列（STR）、Y染色体短串联重复序列（Y-STR）、X染色体短串联重复序列（X-STR）。

3.6 排除概率 Power of Exclusion, PE

对于不是孩子生父的随机男子，遗传分析系统具有的排除能力。它是遗传分析系统效能的评估指标。

3.7 亲权指数 Paternity Index, PI

亲权指数是亲权关系鉴定中判断遗传证据强度的指标。它是两个条件概率的似然比率：

$$PI = \frac{\text{概率}\langle\text{检测到当事人的遗传表型}|\text{假设被检测男子是孩子的生物学父亲}\rangle}{\text{概率}\langle\text{检测到当事人的遗传表型}|\text{假设一个随机男子是孩子的生物学父亲}\rangle}$$

4 检验程序

4.1 采样要求

对于三联体，采集被检测男子、孩子生母与孩子的样本用于检验；对于二联体，采集被检测男子与孩子的样本用于检验；对于祖父母与孙的鉴定案例，则采集被检测祖父、祖母、孩子生母与孩子的样本用于检验。样本一般是血液（斑）或口腔拭子（唾液斑），其它人体生物学材料如带毛囊毛发、羊水、组织块、精液（斑）等亦可作为亲权鉴定的样本。样本必须分别包装，注明被采样人姓名、编号、采样人、采样日期等，置于冰箱冷藏或冻存。

采样时，需要填写采样单，写明委托方名称、采样日期、采样类型、被采样人姓名、性别、称谓、出生日期、证件号码等，并拍摄被采样人照片，由被采样人在采样单上留下右手拇指或食指指纹（婴儿可留右脚拇趾印），并签名确认（婴幼儿的姓名由其监护人代签）。

对于接受了外周血干细胞移植的当事人，应避免采集其血样作为检验材料，宜取其口腔拭子（唾液斑）或毛发进行检验。

4.2 DNA 提取

采用 Chelex-100 法（见如下步骤）或其它经过了验证的方法抽提 DNA。若不经 DNA 抽提而直接将检材用于 PCR，方法必须经过验证。

4.2.1 从血样中提取 DNA：

- a) 在 1.5 mL 离心管中加 1 mL 纯水，然后加入血样（不少于 3 μL 血液或 9 mm^2 血斑），小心混匀；放置 30 min，间歇振荡；
- b) 10,000-15,000 r/min 离心 2-3 min；小心移去上清液。若样品为血斑，则保留载体；
- c) 沉淀中加入 5% Chelex 100（100-200 目）200 μL ，56 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min；
- d) 高速振荡 5-10 s；沸水浴 8 min；
- e) 高速振荡 5-10 s；10,000-15,000 r/min 离心 2-3 min，取上清液用于扩增反应；2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存或冻存剩余 DNA。

4.2.2 从口腔刮拭物样本中提取 DNA：

- a) 用牙签刮拭口腔粘膜，将其放入 1.5 mL 离心管内，加入 200 μL 5% Chelex（100-200 目）；搅动，使细胞脱落；
- b) 56 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15-30 min；

- c) 高速振荡 5-10 s, 沸水煮 8 min;
- d) 高速振荡 5-10 s, 10,000-15,000 r/min 离心 2-3 min;
- e) 取上清液用于扩增反应; 2-8℃保存或冻存剩余 DNA。

4.2.3 从毛发中提取 DNA:

- a) 用纯水清洗毛发; 剪取毛根部分, 放入 1.5 mL Eppendorf 管中;
- b) 加入 200 μ L 5% Chelex 100 (100-200 目) 及 2 μ L 10 mg/mL PK (蛋白酶 K), 56℃保温 6-8 hr 或过夜;
- c) 高速振荡 5-10 s; 沸水煮 8 min (注意毛发应浸没于 Chelex 液中);
- d) 高速振荡 5-10 s; 10,000-15,000 r/min 离心 2-3 min; 取上清液用于扩增反应, 2-8℃保存或冻存剩余 DNA。

4.2.4 从精液中提取 DNA:

- a) 取精液 (不少于 3 μ L) 放入 1.5 mL 离心管内, 加入 200 μ L 5% Chelex 100 (100-200 目);
- b) 加入 2 μ L 10 mg/mL 蛋白酶 K 和 7 μ L 1 mol/L DTT, 轻轻混匀;
- c) 56℃保温 30-60 min, 高速振荡 5-10 s;
- d) 10,000-15,000 r/min 离心 10-20 s;
- e) 沸水煮 8 min;
- f) 高速振荡 5-10 s;
- g) 10,000-15,000 r/min 离心 3 min;
- h) 取上清液用于扩增反应;
- i) 2-8℃保存或冻存剩余 DNA, 再次使用时重复步骤 f)-h)。

4.2.5 从精斑样品中提取 DNA:

- a) 适量精斑检材, 剪碎后放到 1.5 mL 离心管中;
- b) 加入 1 mL 纯水, 室温保温 30 min;
- c) 高速振荡 1 min, 用牙签去除载体;
- d) 10,000-15,000 r/min 离心 2 min;
- e) 去上清仅留 50 μ L, 用无菌吸头吹打沉淀;
- f) 加入 5% Chelex 100(100-200 目)至 200 μ L, 加入 2 μ L 10mg/mL 蛋白酶 K 和 7 μ L 1 mol/L DTT, 轻轻混匀;
- g) 56℃保温 60 min;
- h) 高速振荡 5-10 s, 10,000-15,000 r/min 离心 10-20 s;
- i) 沸水煮 8 min;
- j) 高速振荡 5-10 s, 10,000-15,000 r/min 离心 3 min;
- k) 取上清液用于扩增反应;
- l) 2-8℃保存或冻存剩余 DNA, 再次使用时重复步骤 i)-k)。

4.2.6 从人体组织块中提取 DNA:

- a) 取适量组织块, 用纯水冲洗;
- b) 剪碎(或研磨成碎块), 加入 1 mL STE 提取液(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0), 混匀后加入 20% SDS 75 μ L, 10 mg/mL 蛋白酶 K 40 μ L, 于 56 $^{\circ}$ C 酶解至清;
- c) 于 1.5 mL 离心管中加入 200 μ L 10% Chelex 100 (100-200 目), 加入上述酶解后溶液 20 μ L, 混匀;
- d) 56 $^{\circ}$ C 保温 30 min;
- e) 剧烈振荡 5-10 s;
- f) 沸水煮 8 min;
- g) 剧烈振荡 5-10 s; 10,000-15,000 r/min 离心 3 min; 取上清液用于扩增反应;
- h) 2-8 $^{\circ}$ C 保存或冻存剩余 DNA, 再次使用时重复步骤 g)。

4.2.7 从羊水中提取 DNA:

- a) 取羊水约 1.5 mL, 10,000~15,000 r/min 离心 5 min, 弃上清;
- b) 在沉淀中加入 200 μ L 5% Chelex (100-200 目) 溶液和 20 μ L 10 mg/mL PK, 56 $^{\circ}$ C 保温 3 hr;
- c) 高速振荡 5-10 s, 沸水浴 8 min;
- d) 高速振荡 5-10 s, 10,000~15,000 r/min 离心 5 min, 取上清液用于扩增反应;
- e) 2-8 $^{\circ}$ C 保存剩余 DNA, 再次使用时重复步骤 d)。

4.3 DNA 定量分析

按照中华人民共和国公共安全行业标准 GA/T382-2002 和 GA/T383-2002 的要求进行。

4.4 PCR 扩增与分型

4.4.1 基因座

选用多态性基因座(如 STR、SNP 等类型)进行 PCR 扩增, 其中, 常染色体 STR 基因座宜符合如下要求: (1) 经过群体遗传学调查, 多态性高, 非父排除率在 0.7 以上。(2) 经过 500 次以上减数分裂的家系调查, 基因座的突变率在 0.002 以下。目前, 建议采用商品化试剂盒进行检验, 检测系统的累计非父排除率应达到 99.99% 以上。除常染色体基因座外, 建议在需要时增加 Y-STR、X-STR 的检验。其中, Y-STR 系统可选择 DYS456、DYS389I、DYS390、DYS389II、DYS458、DYS19、DYS385 a/b、DYS393、DYS391、DYS439、DYS635、DYS392、Y GATA H4、DYS437、DYS438、DYS448 等基因座进行单倍型检验; X-STR 系统可选用 GATA172D05、HPRTB、DXS6789、DXS6795、DXS6803、DXS6809、DXS7132、DXS7133、DXS7423、DXS8377、DXS8378、DXS9895、DXS9898、DXS10101、DXS10134、DXS10135、DXS10074 等。

4.4.2 扩增试剂

建议选用商品化试剂盒(带荧光标记的 PCR 体系)。若选用其它来源的扩增体系, 须经验证、认可后方可用于日常检案。每批检验均应用标准样品(已知浓度和基因型的 Control DNA)和(或)以前检验过的、已知基因型的样本作为阳性对照, 以不含 DNA 的样本作为阴性对照。

4.4.3 PCR 体系与温度循环参数

按试剂盒的操作说明书进行。

4.4.4 扩增产物的检测与结果的判读

使用荧光分析仪，对 PCR 产物进行毛细管电泳分析，使用等位基因阶梯（Ladder）作为参照品来判别样本的基因型，步骤方法按照仪器操作手册。

4.5 鉴定意见

鉴定意见是依据 DNA 分型结果对是否存在亲权关系作出的判断。鉴定意见一般分“排除存在亲权关系”和“支持存在亲权关系”两种情形。

4.5.1 排除存在亲权关系

经过累计非父排除率大于 99.99% 的多个基因座的检测，发现有 3 个以上的基因座不符合遗传规律，可以排除亲权关系的存在。

4.5.2 支持存在亲权关系

经过累计非父排除率大于 99.99% 的多个基因座的检测，发现基因座均符合遗传规律，此时必须计算亲权指数 PI（即似然率 LR），若 $CPI \geq 10000$ ，则支持亲权关系的存在。

4.5.2.1 累积亲权指数计算：

$CPI = PI_1 \times PI_2 \times PI_3 \times \dots \times PI_n$ (1、2、3、n 代表第 1、2、3、n 个基因座的 PI 值)

4.5.2.2 常染色体 STR 体系各种遗传组合 PI 值计算方法：

见表 1~3，表中 p 、 q 、 r 分别表示等位基因 P、Q、R 的分布频率。

表 1 三联体常染色体 STR 基因座亲权指数计算公式

生 母 基因型	孩 子 基因型	生父基因 (推断)	被 检 父 基因型	PI 值计算 公式
PP	PP	P	PP	$1/p$
PP	PQ	Q	QQ	$1/q$
PP	PP	P	PQ	$1/(2p)$
PP	PQ	Q	QR	$1/(2q)$
PP	PQ	Q	PQ	$1/(2q)$
PQ	QQ	Q	QQ	$1/q$
PQ	QR	R	RR	$1/r$
PQ	QR	R	RS	$1/(2r)$
PQ	PR	R	PR	$1/(2r)$
PQ	QQ	Q	QR	$1/(2q)$
PQ	PQ	P 或 Q	PP	$1/(p+q)$
PQ	PQ	P 或 Q	QQ	$1/(p+q)$
PQ	PQ	P 或 Q	PQ	$1/(p+q)$
PQ	PQ	P 或 Q	PR	$1/[2(p+q)]$

表 2 二联体常染色体 STR 基因座亲权指数计算公式

孩 子 基因型	被 检 父 基因型	PI 值计算 公式
PP	PP	$1/p$
PP	PQ	$1/(2p)$
PQ	PP	$1/(2p)$
PQ	PQ	$(p+q)/(4pq)$
PQ	PR	$1/(4p)$

表 3 祖孙常染色体 STR 基因座亲权指数计算公式

祖父母	孩子	孩子生母	孩子生父基因	亲权指数 计算公式
PR × QS	PQ	PQ	P 或 Q	$1/[2(p+q)]$
PQ × PR	PQ	PQ	P 或 Q	$3/[4(p+q)]$
PQ × PQ	PQ	PQ	P 或 Q	$1/(p+q)$
PP × PQ	PQ	PQ	P 或 Q	$1/(p+q)$
PP × PQ	PQ	QS	P	$3/(4p)$
PR × RS	PP	PQ	P	$1/(4p)$
PR × QS	PP	PQ	P	$1/(4p)$
PQ × PR	PP	PQ	P	$1/(2p)$
PQ × PQ	PP	PQ	P	$1/(2p)$
PR × RS	PP	PP	P	$1/(4p)$
PR × QS	PP	PP	P	$1/(4p)$
PQ × PR	PP	PP	P	$1/(2p)$
PQ × PQ	PP	PP	P	$1/(2p)$

4.5.2.3 Y-STR 检测系统的 PI 值计算

$PI=1/f$ (f 指单倍型在群体中的频率)

4.5.2.4 X-STR 检测系统的 PI 值计算 (见表 4、表 5)

表 4 三联体 X 染色体 STR 基因座亲权指数计算公式

孩子生母基 因分型结果	女孩基因 分型结果	被检父基因 分型结果	PI 值计算 公式
PP	PP	P	$1/p$
PQ	PP	P	$1/p$
PP	PQ	Q	$1/q$
PQ	PQ	P	$1/(p+q)$
PQ	PR	R	$1/r$

表5 二联体 X 染色体 STR 基因座亲权指数计算公式

女孩样本 分型结果	被检父样本 分型结果	PI 值计算 公式
PP	P	$1/p$
PQ	P	$1/(2p)$

4.6 检验过程中特殊情况的处理

a) 经 DNA 检测（系统的累计非父排除率在 99.99% 以上），发现各基因座符合相应的遗传定律， $2000 < CPI < 10000$ ，增加检测其它的具有高度多态性且遗传稳定的 DNA 遗传标记亦未发现不符合遗传规律的基因座，可据此支持亲权关系的存在。

b) 经常染色体 DNA 检测（系统的累计非父排除率在 99.99% 以上），发现 1~2 个基因座不符合相应的遗传定律（考虑存在突变），这种情形下，应增加检测其它的高度多态性且遗传稳定的 STR 基因座；若被检验的孩子为女孩，应尽可能对被检父母与女孩增加检测 X-STR；若被检验的孩子为男孩，且被检父与孩子可能的生父不属同一父系，应尽可能对被检父与男孩增加 Y-STR 的检验。将突变基因座写入报告书中，并按突变基因座 PI 值的计算方法（见备注）计算 PI 和 CPI 值。计算后若发现 $CPI \leq 0.0001$ ，则据此排除亲权关系；若 $0.0001 < CPI < 10000$ ，则不排除亲权关系。

备注 1：若三联体中存在不符合遗传规律的常染色体遗传标记，如孩子的表型为 PQ，被检测男子表型为 PR，其中 P' 比 P 小或大 1 个或 2 个重复单位（ $s=1$ 或 2 ）， μ 为该基因座平均突变率， p 为等位基因 P 的频率，亲权指数计算方法为：

突变为 1 步 ($s=1$)，则： $PI = X/Y = \mu/(4p)$

突变为 2 步 ($s=2$)，则： $PI = X/Y = \mu/(40p)$

突变为 3 步 ($s=3$)，则： $PI = X/Y = \mu/(400p)$

余此类推（见表6）

表6 三联体中存在不符合遗传规律的遗传标记时亲权指数计算实例

（以 D7S820 为例，平均突变率 μ 为 0.002）

基因座	孩子生母	孩子	被检测父亲	亲权指数
D7S820	7	7-8	9-11	$\mu/(4P_8)$
D7S820	7	7-8	10-11	$\mu/(40P_8)$
D7S820	7	7-8	11-12	$\mu/(400P_8)$
D7S820	7	7-8	9	$\mu/(2P_8)$
D7S820	7-8	8	9	$\mu/(2P_8)$
D7S820	7-8	8	7-9	$2\mu/(4P_8)$
D7S820	7-8	8	9-11	$\mu/(4P_8)$
D7S820	7-9	7-9	10-11	$\mu/[4(P_7 + P_9)]$
D7S820	7-9	7-9	10	$\mu/[2(P_7 + P_9)]$
D7S820	7-9	7-9	8-10	$3\mu/[4(P_7 + P_9)]$
D7S820	7-8	7-9	7-8	$\mu(1+1/3.5)/(4P_9)$
D7S820	9	7-8	7	$\mu/(2 \times 3.5 \times P_8)$

注：表中 P_7 、 P_8 、 P_9 为相应等位基因7、8、9的频率

备注2：若二联体中存在不符合遗传规律的常染色体遗传标记，如孩子的表型为 PQ ，被检测男子表型为 $P'R$ ，其中 P' 比 P 小或大1个或2个重复单位（ $s=1$ 或 2 ）， μ 为该基因座平均突变率， p 为等位基因 P 的频率，则亲权指数计算方法为：

突变为1步（ $s=1$ ），则： $PI = X/Y = \mu/(8p)$

突变为2步（ $s=2$ ），则： $PI = X/Y = \mu/(80p)$

突变为3步（ $s=3$ ），则： $PI = X/Y = \mu/(800p)$

余此类推（见表7）

表7 二联体中存在不符合遗传规律的遗传标记时亲权指数计算实例

(以D7S820为例，平均突变率 μ 为0.002)

基因座	孩子	被检测男子	亲权指数
D7S820	7-8	9-11	$\mu/(8P_8)$
D7S820	7-8	10-11	$\mu/(80P_8)$
D7S820	7-8	11-12	$\mu/(800P_8)$
D7S820	7-8	9	$\mu/(4P_8)$
D7S820	8	9	$\mu/(2P_8)$
D7S820	8	7-9	$2\mu/(4P_8)$
D7S820	8	9-11	$\mu/(4P_8)$
D7S820	7-9	8-10	$\mu(2P_7+P_9)/(8P_7P_9)$
D7S820	7-9	8	$\mu(P_7+P_9)/(4P_7P_9)$

注：表中 P_7 、 P_8 、 P_9 为相应等位基因7、8、9的频率

- c) 若被检父与可能的生父存在特殊的血缘关系（如父子关系、叔侄关系、同胞兄弟关系等），在可能的情况下，应同时提取孩子生母和其他的可疑父亲的样本进行检验。
- d) 在祖孙关系鉴定中，经常染色体DNA检测（系统的累计非父排除率在99.99%以上），若发现1~2个基因座不符合相应的遗传定律（考虑存在突变），应增加检测其它的高度多态性且遗传稳定的STR基因座；若被检验的孩子为女孩，应尽可能对被检祖母与孙女增加X-STR的检验；若被检验的孩子为男孩，应尽可能对被检祖父与孙子增加Y-STR的检验。若仍然只有原来的基因座不符合遗传规律，则将这些基因座当作突变基因座处理，写入报告书中，出具“不排除存在生物学祖孙关系”的鉴定意见。