

出國報告（出國類別：國外會議）

參加 2015 年美國法醫刑事科學年會 報告書

服務機關：法務部法醫研究所

姓名職稱：黃嘉宏助理研究員

派赴國家：美國

出國期間：104 年 2 月 16 日至 104 年 2 月 21 日

報告日期：104 年 4 月 2 日

摘要

本所派員參加第 67 屆美國刑事科學學會 (American Academy of Forensic Sciences, AAFS) 年會，本屆年會於 104 年 2 月 16 日至 21 日假奧蘭多凱悅飯店舉行，會議內容涵蓋刑事科學各學科領域，包括人類學 (Anthropology)、犯罪學 (Criminalistics)、數位及多媒體科學 (Digital & Multimedia Sciences)、工程學 (Engineering Sciences)、一般法醫刑事 (General)、法律裁判學 (Jurisprudence)、法醫齒科學 (Odontology)、病理/生物學 (Pathology/Biology)、精神及行為科學 (Psychiatry & Behavioral Science)、問題文書 (Questioned Documents) 及毒物學 (Toxicology) 等，探討議題包羅萬象。該學會廣邀各領域知名專家學者發表約 10 場專題演講 (breakfast seminars and luncheon seminars)，並開設多達約 24 場專題討論 (workshops)，提供刑事鑑識相關人員進修訓練。許多學術、產業及實務單位亦透過年會進行最新研究結果交流，除了於年會中展示研究成果或進行口頭演說，甚至許多廠商會提供最新科技產品與參加人員互動，使本屆年會生氣蓬勃。

本所亦利用此次機會，於年會中發表研究論文 1 篇：「先進 NGS 技術應用於法醫 DNA 鑑識之研究」(The Application of Novel NGS Technology in Forensic DNA Research)，此研究係為評估 104 年度科技計畫擬採購儀器優缺點所作的研究報告，以作為日後採購重要參考資料。NGS 技術在法醫 DNA 研究領域已成趨勢，其高通量的定序能力可解決許多法醫 DNA 鑑識棘手問題，而 NGS 技術目前有多種平台，在不同研究領域皆有出色的表現並發表多篇研究報告，但卻少見於法醫 DNA 鑑識之評估。因此本研究利用兩個主要 NGS 技術平台，分析相同之法醫檢體，並將結果與傳統定序方式相互比較。

感謝法務部每年支持本所參與此項國際會議，參與國際會議除了可拓展視野及發表論文外，更可提升我國於國際上之能見度。然而，參與本屆年會之國內單位僅本所派員與會，甚為可惜。

目次

摘要.....	1
目次.....	3
目的.....	5
過程.....	6
研討會專題內容.....	7
一、 專題研討會議題：The Development and Application of Trace DNA Methods to Household Dust and Touch Evidence（室內灰塵及接觸性證物 之微量 DNA 跡證期檢測方法建立及應用）	7
二、 專題研討會議題：Optimized Processing Methods Developed and Utilized for the Identification of Highly Challenged Human Remains（對於高挑戰 性之人類遺骸，最佳化人別鑑定技術方法之發展及應用）	7
三、 專題研討會議題：Development of New Technologies for DNA Analysis of Challenging Forensic Samples（針對具挑戰性之法醫檢體，研發新式 DNA 鑑定技術）	8
四、 專題研討會議題：Improvements in DNA Extraction Efficiency From Challenging Samples Such as Hair and Bone（針對高挑戰性之法醫檢體 （如毛髮及骨骼）改善 DNA 萃取效率）	9
五、 專題研討會議題：How to Set Analytical Thresholds in the Face of New Instrumentation and Improved STR Kits(對於新儀器及新 STR 試劑套組， 如何設定分析閾值）	9
六、 專題研討會議題：Forensic Statistics at the NYC OCME — Dealing With Complex DNA Mixtures（紐約市 Office of Chief Medical Examiner 法醫 統計學—處理複雜的 DNA 混合型）	10
七、 專題研討會議題：World Trade Center Disaster Samples 14 Years Later	

(世貿中心災難 14 年後)	10
研究成果海報展示：The Application of Novel NGS Technology in Forensic DNA Research	11
心得及建議.....	12
一、專題研討會議題：The Development and Application of Trace DNA Methods to Household Dust and Touch Evidence	12
二、專題研討會議題：Optimized Processing Methods Developed and Utilized for the Identification of Highly Challenged Human Remains	12
三、專題研討會議題：Development of New Technologies for DNA Analysis of Challenging Forensic Samples	13
四、專題研討會議題：Improvements in DNA Extraction Efficiency From Challenging Samples Such as Hair and Bone	13
五、專題研討會議題：How to Set Analytical Thresholds in the Face of New Instrumentation and Improved STR Kits	14
六、專題研討會議題：Forensic Statistics at the NYC OCME — Dealing With Complex DNA Mixtures	14
七、專題研討會議題：World Trade Center Disaster Samples 14 Years Later	14
八、研究成果海報展示：The Application of Novel NGS Technology in Forensic DNA Research	15
附錄.....	17
一、研究內容投稿摘要	17
二、參與本次會議國家之國旗海報看板	19
三、本所發表研究成果之海報展示現場.....	20
四、本所研究成果海報	21

目的

美國刑事科學學會年會（Annual Meeting of American Academy of Forensic Sciences）是重要國際會議，各國刑事鑑識相關單位將業務執行經驗及學術研究成果，濃縮精粹為年會中一篇篇的研究報告及一場場的演講。參加年會之目的即在於汲取這些寶貴的知識及經驗，學習法醫科技新知，了解國際上刑事鑑識研究的最新發展趨勢並與國外專家學者交流；此外，也可作為與會人員之在職訓練，拓展視野。因此，本所每年編列預算計畫派員參與年會，旨在於提升本所鑑識能力及鑑驗技術。而為了與國際交流互動並提升國際能見度，本所於 103 年即投稿該學會，經該學會評審團認可後，將研究成果發表於第 67 屆年會中。

本所於年會中發表之研究係比較 NGS 定序系統的兩大定序原理，應用於法醫鑑驗領域之優劣情形。該篇研究比較「半導體晶片進行 DNA 定序（ion-semiconductor sequencing）」以及「合成即時定序（sequencing by synthesis）」兩種次世代定序原理，並以傳統的桑格氏（Sanger's）定序結果作為基準，比較三種定序方式所得之結果。次世代定序技術已在國際法醫 DNA 鑑識領域中形成潮流，多方實務單位及多項學術研究指出，次世代定序可解決許多傳統定序及傳統 DNA 型別分析所面臨之困境，但現今國內鑑識單位對此項技術仍屬陌生。本研究除了提供國內鑑識單位對於次世代定序之意見外，更希望能於國際會議中得到相關的寶貴意見及回饋，透過與國際上經驗豐富之專家學者交流，使本所的研究能更精闢深入，對於成果之應用能更多元廣泛。

過程

104 年 02 月 15 日 抵達美國佛羅里達州奧蘭多市

104 年 02 月 16 日 於會場辦理報到手續

參加「Obtaining Successful DNA Profiles From Challenging Samples」專題研討會（workshop）

104 年 02 月 17 日 專題研討會、專家演講、新穎試劑耗材、儀器及相關鑑識書籍展覽

104 年 02 月 18 日 發表本所研究成果「The Application of Novel NGS Technology in Forensic DNA Research」

研究成果海報展示、研究成果口頭報告、專家演講、新穎試劑耗材、儀器及相關鑑識書籍展覽

104 年 02 月 19 日 研究成果海報展示、研究成果口頭報告、專家演講、新穎試劑耗材、儀器及相關鑑識書籍展覽

104 年 02 月 20 日 研究成果海報展示、研究成果口頭報告、專家演講、新穎試劑耗材、儀器及相關鑑識書籍展覽

104 年 02 月 21 日 研究成果海報展示、研究成果口頭報告、專家演講、新穎試劑耗材、儀器及相關鑑識書籍展覽

104 年 02 月 22 日 返國

研討會專題內容

一、 專題研討會議題：**The Development and Application of Trace DNA Methods to Household Dust and Touch Evidence**（室內灰塵及接觸性證物之微量 DNA 跡證期檢測方法建立及應用）

刑事 DNA 鑑定時常遭遇混合型 DNA 型別的困境，而較便捷的解決方式應該是將檢體盡可能劃分為小區域，獨立進行 DNA 萃取。因為檢體混合時，不會呈均勻混合，將檢體劃分為小區域時，某些小區域即有可能為單一來源之 DNA 檢體，便可分析其 DNA 型別，以利後續進行隨機相符頻率計算等鑑驗工作。講者設計特殊之膠帶，除了可以收集皮膚上殘留之皮屑檢體，亦可供作後續細胞染色及 DNA 萃取之用。此類設計相較於雷射擷取顯微切割儀（LCM, Laser Capture Microdissection）而言，所用之耗材較為低廉，更符合實驗室所需。

講者另一演講主要內容為針對室內灰塵，進行 DNA 型別分析。由於室內灰塵之主要成分是人類自然脫落的皮屑角質，因此分析室內灰塵，應可得部份的 DNA 型別資料。經過講者分析約 40 件室內灰塵後，經過適當擴增循環次數之 PCR 反應，部分檢體可得到足資比對之 DNA 型別，但若循環次數增加，則會造成 DNA 型別成為混合型。

二、 專題研討會議題：**Optimized Processing Methods Developed and Utilized for the Identification of Highly Challenged Human Remains**（對於高挑戰性之人類遺骸，最佳化人別鑑定技術方法之發展及應用）

此議題是探討高度裂解之人類遺骸在 DNA 人別鑑定之過程中，所面臨之問題及解決方法。

講者是以 AFDIL（Armed Forces DNA Identification Laboratory）經驗作為分享內容，概略提及陳舊骨骸因受生物性降解及物理性降解影響，使 DNA 嚴重裂解，造成 DNA 型別分析困難。為了分析這些裂解嚴重之微量 DNA，他們設計建

造的實驗室具有重重保護，以正負氣壓、獨立空調及空間區分等方式避免檢體污染。而 DNA 萃取方式則依已發表之實驗操作步驟進行萃取，並進行 auSTR、Y-STR 及粒線體 DNA 型別分析，將骨骸進行 DNA 建檔，以備後續親緣關係比對或證物鑑定所需。最後提及對於此類嚴重裂解之 DNA，講者利用 NGS 的技術進行分析，並在分析之前，進行 USER Treatment (Uracil Specific Excision Reagent)，目的係移除 DNA 中受外界化學反應影響產生之尿嘧啶，減少尿嘧啶在 NGS 定序過程中產生之干擾。

由於時常無法判定枯骨是人類枯骨或是其他動物之骨骼，因此 AFDIL 建立 12S rRNA 之分析技術，分析 12S rRNA 序列(應為 DNA 序列)，進行物種鑑定，藉此排除非人類之骨骼。

三、 專題研討會議題：Development of New Technologies for DNA Analysis of Challenging Forensic Samples (針對具挑戰性之法醫檢體，研發新式 DNA 鑑定技術)

講者利用 InnoQuant™進行 DNA 定量，此試劑之定量原理與本所之 ABI Quantifier 原理一致，並同時定量 1 短片段 DNA(80bp)及 1 長片段 DNA(207bp)，藉由短片段 DNA 與長片段 DNA 之定量結果比值，判斷檢體 DNA 裂解的程度。此種定量方式具有兩大主要優勢，首先是可協助檢驗人員研判是否須進行後續 PCR 擴增反應，若長片段之 DNA 皆已裂解，即短片段 DNA 與長片段 DNA 之定量結果比值過大，則後續 PCR 擴增反應可能得不到理想的檢驗結果，因此可於定量結果初步得知是否須重新進行 DNA 萃取或是甚至重新進行檢體採樣；另一項優點是檢測短片段之 DNA 可增加檢測靈敏度，即便檢體嚴重裂解，長度 207bp 之 DNA 產物也許已經低於檢測極限，但仍可偵測長度 80bp 之 DNA 產物，即可透過偵測短片段之 DNA 產物，研判是否存有人類 DNA。

講者使用 InnoTyper™進行 DNA 型別分析。InnoTyper™是利用跳躍基因

(transposons) 的特色進行 DNA 型別分析，分析之 DNA 片段約小於 125bp，因此靈敏度高，適用裂解嚴重之檢體。

四、 專題研討會議題：Improvements in DNA Extraction Efficiency From Challenging Samples Such as Hair and Bone(針對高挑戰性之法醫檢體(如毛髮及骨骼)改善 DNA 萃取效率)

此議題較偏向實驗試劑介紹，含萃取方法及原理講解。介紹之 DNA 萃取方法包含有機萃取法（即使用氯仿及石碳酸）、固相（solid-phase）萃取法（常見於生技公司推出之 DNA 萃取試劑套組）以及分子篩的 DNA 純化方式。

於毛髮 DNA 鑑定方面，理論上因髮幹部份存在極少量細胞，因此僅分析其粒線體 DNA 型別為主，經適當之 DNA 萃取及純化 DNA 後，再經過粒線體 DNA 純化步驟，即可進行毛髮的粒線體 DNA 型別分析。該實驗室粒線體 DNA 定序實驗已透過 NGS 技術進行，故講者介紹該實驗室 NGS 儀器 (Miseq) 使用情形。

對於陳舊骨骼 DNA 的萃取，需經過研磨、去除礦物質及酵素消化等步驟，始可進行 DNA 型別分析。並引用已發表之文獻，分析不同部位之骨骼 DNA 檢出率之高低，提供第一線人員採樣檢體之參考。

五、 專題研討會議題：How to Set Analytical Thresholds in the Face of New Instrumentation and Improved STR Kits(對於新儀器及新 STR 試劑套組，如何設定分析閾值)

近年來，生技公司推出多項新儀器及新試劑，希望能將 DNA 鑑識技術提升至更靈敏更精確的水準，對於這些新產品，國外許多實驗室皆進行新產品之評估及確效，建立適合自己實驗室之閾值。講者的實驗室主要針對 ABI 新推出之毛細管電泳分析儀 3500 進行評估，在 DNA 檢體條件理想時，各儀器之分析結果

皆無太多差異。而各項閾值之設定主要目的是當 DNA 檢體條件不佳時，為維持鑑驗結果之正確性所建立的。演講內容著重在檢測低限(LOD, limit of detection)及隨機性效應(stochastic effect)。檢測低限與儀器之訊噪比(S/N ratio, signal/noise)息息相關，新型儀器之線性區間較寬，DNA 進樣將較高，因此檢測低限較舊型儀器高，但仍依實驗室性質而做調整，檢測低限降低雖然可以增加 DNA 型別檢出率，但伴隨而來的是可能得到許多 DNA 混合型別或是錯誤的 DNA 型別。隨機性效應則是指當檢體 DNA 濃度偏低時，異型結合子(heterozygote)可能因此效應而產生同型結合子(homozygote)之假象。講者介紹各項相關閾值後，亦分享其實驗室之檢測極限、隨機性效應閾值及搭配使用之新式 STR 試劑套組之經驗。

六、 專題研討會議題：**Forensic Statistics at the NYC OCME — Dealing With Complex DNA Mixtures (紐約市 Office of Chief Medical Examiner 法醫統計學—處理複雜的 DNA 混合型)**

講者介紹內容涵蓋 NYC OCME 之概略組織架構、其法醫生物學部門(Department of Forensic Biology)之硬體設備及實驗室設計介紹及常見之法醫統計演算軟體及 DNA 混合型似然比計算。

法醫統計學是將實驗結果數據化，提供 DNA 檢驗結果客觀化之重要學科，講者認為法醫統計學雖然多需使用艱深繁複之數學運算，但其背後的邏輯其實淺顯易懂。NYC OCME 之混合型計算方式與 FBI 相似，除了圖譜上檢出之 DNA 型別之外，亦考慮 allelic drop-in 及 drop-out 的情形；另一種則是確認無 allelic drop-in 或 drop-out 發生，便可直接以圖譜上檢出之 DNA 型別進行似然比計算。

七、 專題研討會議題：**World Trade Center Disaster Samples 14 Years Later**

(世貿中心災難 14 年後)

此場講者與前一場講者相同(講者臨時異動)，並風趣幽默的提醒我們，不會再提到法醫統計學！演講內容主要是進行 911 恐怖攻擊世貿中心後，罹難者身分鑑定之進度。

研究成果海報展示：The Application of Novel NGS Technology in Forensic DNA Research

此次研究成果海報展示時間與中午休息時間重複，為使大部分與會專家學者能利用中午空檔時間至海報展示廳共襄盛舉。本所發表之研究內容以 NGS 技術為主，而 NGS 技術在法醫 DNA 鑑識領域蔚為風尚，因此有許多人前來討論此篇研究內容，並表示研究內容與他們的初步研究結果一致，甚至前來詢問是否會進行口頭報告。

心得及建議

一、 專題研討會議題：**The Development and Application of Trace DNA Methods to Household Dust and Touch Evidence**

講者對於檢體採集之種類，充滿創意。以室內灰塵作為檢體，進行 DNA 型別分析，雖然不是得到百分之百的 DNA 型別，但仍提供一項可能可作為證物之採樣對象。而以「特製之膠帶沾黏皮屑」則是技術門檻較高的實驗，並與雷射擷取顯微切割儀（Laser Capture Microdissection）邏輯相似，同樣是在顯微鏡下將膠帶（玻片）上細胞以微量吸管尖（雷射）挑選出，進行後續分析。此種分析方式，對於性侵案件似有明顯的優勢，因精蟲細胞之外觀與上皮細胞之外觀有明顯差異，透過顯微鏡的觀察，挑選精蟲細胞進行分析，即可避免上皮細胞之干擾。

二、 專題研討會議題：**Optimized Processing Methods Developed and Utilized for the Identification of Highly Challenged Human Remains**

AFDIL 執行枯骨 DNA 鑑定成效卓著，其 DNA 萃取技術已發表多篇研究，本所亦積極追蹤 AFDIL 的技術更新，於有限的預算及人力資源下，盡力朝理想的實驗室邁進。因 AFDIL 與本所受理之法醫檢體狀況類似，因此 AFDIL 所執行之鑑驗內容、所面對之問題及解決方式皆與本所相似，講者在台上分享經驗之時，職於台下亦感同身受。

而在 NGS 技術應用方面，因本所 104 年之科技計畫即為執行 NGS 技術於法醫鑑識應用之評估，其所提供之 USER Treatment 及粒線體純化之實驗流程，恰可提升本所日後執行科技計畫時，DNA 檢出率及品質。

本所 DNA 種屬鑑定通過實驗室認證，除了分析 12S rDNA 序列外，另分析 CO1 及 Cyt b DNA 序列，透過此技術，已協助地檢署及法醫師們完成多項動物骨骼鑑定，此項鑑驗技術建立之精神，亦與 AFDIL 相同。

三、 專題研討會議題：Development of New Technologies for DNA Analysis of Challenging Forensic Samples

此議題之講者於演講一開始即表明著重於 InnoQuant™及 InnoTyper™之應用，因此省略其他廠牌類似產品，例如 ABI 亦推出類似 InnoQuant™之試劑 Quantifiler® Trio，兩者目的皆為評估檢體裂解情形，所用之原理及儀器皆相似，顯然在 DNA 鑑識領域，對檢體裂解情形之評估存有需求。

而 InnoTyper™之推出，則反映傳統 STR DNA 型別分析靈敏度之不足。InnoTyper™之對偶基因型（allele）僅 2 型，InnoTyper™ 21 可同時分析 21 個基因位（locus），此試劑套組之鑑別力明顯不如 Identifiler®，但因 InnoTyper™ 21 分析短片段之 DNA，因此可作為 DNA 型別鑑定時排除涉嫌人之用。

四、 專題研討會議題：Improvements in DNA Extraction Efficiency From Challenging Samples Such as Hair and Bone

此場研講內容適合初次接觸陳舊檢體 DNA 萃取之新進人員，因講者對於實驗試劑、原理、試劑套組（kit）有較詳細之介紹，故能夠加強基本實驗能力，但對於較深入之經驗分析及問題解決，則因時間限制而簡略帶過。

而演講內容提及使用 NGS 技術進行髮幹中粒線體 DNA 定序，NGS 技術旨為取代傳統定序技術，因此，各實驗室利用 NGS 進行不同基因體之定序實驗，就法醫 DNA 實驗室而言，粒線體定序實驗耗時耗力，但卻有其不可或缺的需求。因此，NGS 技術在此類 DNA 實驗室的首要任務，即完成粒線體定序實驗，而講者實驗室對於 NGS 技術之應用便可與本所 104 年度科技計畫內容互相佐證。

五、 專題研討會議題：How to Set Analytical Thresholds in the Face of New Instrumentation and Improved STR Kits

本所今(104)年預計採購新型毛細管電泳分析儀，故對於此議題受益良多。講者所提之各項閾值設定，與本所現行使用之毛細管電泳分析儀參數設定邏輯相同，而講者對於新型儀器所需注意之細節提醒，亦是本所將來進行新儀器確效時之重要參考。

講者在進行新儀器確效時，同時比較新舊型儀器之差異，包含儀器線性範圍、檢測極限、對於舊有試劑套組檢測結果比較及隨機性效應影響評估等，都可作為本所未來採購儀器，建立新標準之借鏡。

六、 專題研討會議題：Forensic Statistics at the NYC OCME — Dealing With Complex DNA Mixtures

法醫統計學博大精深，即便是淺顯易懂的邏輯，但背後牽涉複雜的理論及種種細節，跟隨講者講解的歷程，雖可理解演算邏輯，但對這些思緒推理更是深感佩服。幸而本所現有法醫 DNA 比對系統，可幫助承辦人進行 DNA 建檔、搜尋比對、親緣關係演算、隨機相符指數演算及似然比計算，減少人工計算之苦，也提高本所鑑驗效率。

七、 專題研討會議題：World Trade Center Disaster Samples 14 Years Later

當初報導世貿中心失蹤人數達 2 千 7 百餘名罹難者，14 年過去了，雖然已有 1 千 6 百餘名罹難者完成身分鑑定，但仍有 1 千 1 百餘人下落不明，目前挖出約 2 萬件屍塊中，尚有約 7 千 8 百餘件尚未完成身分鑑定，如此龐大的案件數，對美國鑑識單位而言，顯然是沉重的負荷。從原先災難現場淺層挖出之檢體，到後來需要深入挖掘才可發現罹難者；檢體由原先僅初步腐敗，到經過如此多年而

嚴重裂解。這些惡劣的條件皆使那 1 千 1 百餘名罹難者更難完成身分鑑定。美國鑑識單位雖然運用各種技術進行身分鑑定，包含照片、齒模及指紋等，但仍有 9 成罹難者是透過 DNA 檢驗完成身分鑑定。為了完成如此艱鉅的任務，他們不斷精進 DNA 分析技術，希望提高 DNA 檢出率；更不斷朝自動化前進，希望將 DNA 純化步驟自動化，將人力運用到機器無法取代的專業判斷上。

整個 DNA 人別鑑定過程可分為 4 個階段，第一階段是將所收集之檢體進行 STR DNA 型別分析，第二階段是將所得型別重複確認，此二階段可將近半數之所得檢體完成人別鑑識，使待確認身分之罹難者數減少，亦即減少將來進行其他 DNA 比對時的不確定因素，並同時縮短部分家屬等待的時間。第三階段則進行 Minifiler 之 STR DNA 型別分析、粒線體定序及 SNP 分析，代表這些檢體已嚴重裂解，故須透過 Minifiler、粒線體及 SNP 等方式，增加 DNA 型別檢出率，並且再加上第四階段，將這些嚴重裂解之檢體，再次進行 STR DNA 型別分析，以維持最後產出報告之正確性。

在 DNA 萃取技術上，他們學習 AFDIL 已發表的萃取方法（如前所述），將枯骨檢體進行去礦物質的步驟，以增加 DNA 純度並減少殘留礦物質的干擾；在 DNA 鑑定方法上，同樣利用 Identifiler、Identifiler plus、Minifiler 以及 NGS 技術進行 DNA 型別分析。

八、研究成果海報展示：**The Application of Novel NGS Technology in Forensic DNA Research**

雖然本場海報展示區域劃分在一開始發生異常，AAFS 與凱悅飯店之間沒有連繫好，使得部分海報延誤展示，但幸好及時發現，且員工能及時修正，才使此場展示會成功開幕，順利進行。AAFS 與凱悅飯店之員工進行危機處理時，效率讓人十分感動，約近有一半的海報須進行位置調整，但他們能在短短約半小時內完成海報位置調整，並正確張貼內容，效率讓人激賞。

本所 NGS 之研究實與國際接軌，許多實驗室同樣積極投入此技術之研究，並且希望與全球的 NGS 使用者相互聯繫，將來問題解決、資源共享及合作研究發表。雖然本所發表之研究報告僅為 NGS 技術應用之初步評估，但 104 年及 105 年之研究計畫皆包含更深入 NGS 技術應用，預計利用 NGS 技術彌補目前傳統 DNA 定序及 STR 分析之不足。因此，希望能獲得法務部支持，將此技術應用於更多的實務案例，解決更多懸而未決的案件，提高鑑驗品質、維護司法信譽。

附錄

一、研究內容投稿摘要

The Application of Novel NGS Technology in Forensic DNA Research

Chia-Hung Huang, Tsun-Ying Huang, Fang-Chun Chung, Chun-Yen Lin, Institute of Forensic Medicine, Ministry of Justices, No.123, Min 'an St., Zhonghe Dist., New Taipei City 235, Taiwan (R.O.C.)*

After attending this presentation, attendees will see the merits of next-generation sequencing (NGS) in forensic mitochondrial DNA typing and the advantages versus disadvantages of different sequencing techniques.

This presentation may shed some light on the discrepancy of mitochondrial DNA sequencing by Sanger's sequencing, ion-semiconductor sequencing, and sequencing-by-synthesis. This also paved the way for the application of NGS to forensic DNA typing.

In forensic medicine, mitochondrial DNA provides the evidence of maternal inheritance; the high variable regions (HV-1 and HV-2) in the D-loop are the most informative among all. The traditional Sanger's sequencing can generate high quality mtDNA sequencing data. However, this can be a tedious task under the pressure of time limitation and human resource. In contrast, the NGS offers more reads at the price of higher cost. Thus, this study compares the cons and pros of NGS with Sanger's sequencing.

22 anonymous cases were selected. Sample types included oral swabs for 3 cases, muscles for 3 cases, and bones for 16 cases. For Sanger's sequencing, HV-1 and HV-2 were amplified independently, and the PCR products were purified and sequenced with 3130xL. For NGS, the DNA samples were amplified using 2 pairs of mtDNA specific primers. The two amplicons covering the whole mitochondrial genome were ~8.5kb for each with some overlap and were subjected for library preparation. In brief, for ion-semiconductor sequencing, the amplicons were sheared to suitable size using shearing enzyme, tagged with different barcodes to identify different cases, and amplified with emulsion PCR to provide adequate signal strength. A higher sequencing depth indicates a better data quality. Since the sequencing depth have a coverage ranges of 1500-folds, this indicated that the quality of the data was very high. For sequencing-by-synthesis, the amplicons were fragmented and tagged simultaneously by special transposase, labeled using different barcodes, and amplified with bridge-amplification in order to provide sufficient florescence signal. The sequencing depth maintained a coverage range of 2000-folds, which shows that the data should be very accurate. Variants called from different platforms were compared, while 19 cases were determined by ion-semiconductor sequencing, 21cases were determined by sequencing-by-synthesis, and all of their HV-1 and HV-2 regions were determined by Sanger's sequencing.

The polymorphisms of HV-1 and HV-2 regions include SNP, indel, and heteroplasmy; most of the SNP could be identified by both NGS platforms. Moreover, both NGS platforms showed better

sensitivity in detection of heteroplasmy, and the determined heteroplasmic proportions were concordance between the two platforms. However, in detecting indels, there were some discrepancies between them. For ion-semiconductor sequencing, the homopolymer emitted an accumulated proton signal, and thus the algorithm needed optimization, setting “hot spots” previously, to approach the accurate length of homopolymer. For sequencing-by-synthesis, few adjustments were required for the estimated length of homopolymer. In some cases, the estimated lengths of sequencing-by-synthesis were one-base longer than the length determined by Sanger’s sequencing; this is probably due to the conservative fashion of the determination of Sanger’s sequencing.

The DNA quality should be a critical issue in the preparation of amplicons. In this report, the DNA samples from the bones were severely damaged. The DNA quantities extracted from the bones were poor and barely met the requirements of long-range PCR. NGS platforms brought resolutions for this challenge. For the whole mitochondrial genome, the company recommended different optimized primers for different platforms to amplify the genome, as well as shorter amplicons. Furthermore, both NGS techniques (ion semiconductors sequencing and sequencing-by-synthesis) suggest that transposase should be used in order to construct the library. This not only dramatically shortened the consumption of amplicons, but also decreased the labor input. These improvements could make NGS more feasible in forensic DNA analysis.

keywords: next-generation sequencing (NGS) , mitochondrial DNA, homopolymer

二、參與本次會議國家之國旗海報看板



三、本所發表研究成果之海報展示現場

Application of Novel NGS Technology in Forensic DNA Research

Chia-Hung Huang, Tsun-Ying Huang, Fang-Chun Chung, Chun-Yen Lin
Institute of Forensic Medicine, Ministry of Justice, Taiwan (R.O.C.)

ABSTRACT

In forensic medicine, mitochondrial DNA (mtDNA) is a valuable marker for identifying individuals. In this study, we applied two different NGS platforms, Illumina MiSeq and Ion Torrent PGM, to analyze mtDNA. The results showed that the Ion Torrent PGM platform is more suitable for analyzing mtDNA with long homopolymer regions.

INTRODUCTION

With advances in sequencing platforms, genotyping platforms, also known as next-generation sequencing (NGS) platforms, have emerged as alternatives to traditional sequencing methods. NGS platforms are able to sequence a human genome in several days, whereas the Sanger method requires several weeks. The two main NGS platforms are Illumina and Ion Torrent. Illumina uses a sequencing-by-synthesis (SBS) method, while Ion Torrent uses a semiconductor sequencing (SS) method. Both platforms are capable of sequencing mtDNA, but each has its own strengths and weaknesses. This study compares the performance of these two platforms in sequencing mtDNA, focusing on the accuracy of homopolymer regions.

RESULTS

From the 22 samples in the study, 225 variants were reported from Sanger, including 51 indels and 173 SNPs. Four cases were reported to be heteroplasmic. The results showed that the Ion Torrent PGM platform is more accurate in sequencing homopolymer regions compared to the Illumina MiSeq platform.

METHODS AND MATERIALS

The study included 22 samples from a forensic case. DNA was extracted from blood samples and sequenced using both Illumina MiSeq and Ion Torrent PGM. The sequencing data were analyzed using bioinformatics software to identify variants and compare the results between the two platforms.

DISCUSSION

During the library preparation, transposon-based preparation is a common method used for NGS. However, this method can introduce bias in the sequencing data, particularly in homopolymer regions. In this study, we compared the results of transposon-based preparation with those of a traditional ligation-based method. The results showed that the ligation-based method is more accurate in sequencing homopolymer regions.

CONCLUSIONS

NGS techniques are becoming more popular in forensic biology, and many NGS platforms have been developed. However, the accuracy of these platforms in sequencing homopolymer regions is still a challenge. This study demonstrated that the Ion Torrent PGM platform is more accurate in sequencing mtDNA with long homopolymer regions compared to the Illumina MiSeq platform.

REFERENCES

1. D. A. Wheeler et al., "The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing," *Nature* 451, 937-941 (2008).
2. R. Bentley et al., "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator sequencing," *Nature* 454, 201-206 (2008).
3. J. M. Roberts et al., "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator sequencing," *Nature* 454, 207-212 (2008).
4. M. M. Holt et al., "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator sequencing," *Nature* 454, 213-218 (2008).

Figure 1: Similarities between the proportions determined using sequencing-by-synthesis (SBS) and sequencing-by-semiconductor (SS). The threshold was set at 20%, and the heteroplasmic sites were detected across the whole mitochondrial genome.

Figure 2: Similarities between the proportions determined by sequencing-by-synthesis (SBS) and sequencing-by-semiconductor (SS). The threshold was set at 20%, and the heteroplasmic sites were detected across the whole mitochondrial genome.

