

· 综 述 ·

快速 STR 分型在法医 DNA 分析中的应用研究进展

董军磊¹, 欧元^{2,3}, 李彩霞², 刘琳¹, 戈文东⁴,
郭磊¹, 姜伯伟⁵, 赵兴春², 叶健^{1,2*}

(1. 中国人民公安大学, 中国北京 100038; 2. 公安部物证鉴定中心, 中国北京 100038; 3. 北京理工大学, 中国北京 100081;
4. 福建省公安厅刑事技术总队, 中国福建 福州 350003; 5. 中科院上海应用物理研究所, 中国上海 201800)

摘 要: STR 分型是目前世界通用的 DNA 指纹分析方法. 传统的分型方法包括 DNA 提取、DNA 定量、PCR 扩增和对扩增后的 STR 片段进行检测和分析, 耗时较长 (8~10 h). 一些情况下很难满足案件的实际需求. 法医学家在加快 STR 分型的方法研究一直不懈努力. 现从快速提取 DNA、无提取直接 PCR、快速 PCR、微流控芯片技术在 STR 快速分型方面的应用四方面, 对近年来出现的可进行快速 STR 分型的新技术、新方法进行综述.

关键词: 法医遗传学; 快速; DNA 分析; 短串联重复序列 (STR)

中图分类号: Q2-33; R89; DF795.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2013)04-0342-06

Rapid STR Typing Research Progress and Its Application in Forensic DNA Analysis

DONG Jun-lei¹, OU Yuan^{2,3}, LI Cai-xia², LIU Lin¹, GE Wen-dong⁴,
GUO Lei¹, JIANG Bo-wei⁵, ZHAO Xing-chun², YE Jian^{1,2*}

(1. Chinese People's Public Security University, Beijing 100038, China; 2. Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China; 3. Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China; 4. Forensic Science Division, Fujian Provincial Public Security Department, Fuzhou 350003, Fujian, China; 5. Shanghai Institute of Applied Physics of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract: STR genotyping is a universal DNA fingerprinting analysis method. The process of traditional typing methods, which consists of DNA extraction, DNA quantification, PCR amplification and detection and analysis of amplified STR fragments, is time consuming (8~10 h). The turnaround time is not always satisfactory. Therefore, tremendous efforts have been made to speed up the STR typing process. New technologies and methods of rapid STR typing that have been developed in recent years, including rapid DNA extraction, direct PCR, fast PCR, and microfluidic chip technology STR fast typing were reviewed.

Key words: forensic genetics; rapid; DNA analysis; short tandem repeat (STR)

(*Life Science Research*, 2013, 17(4): 342~347)

1985 年, 英国遗传学家 Alec Jeffreys 爵士建立了基于限制性片段多态性的 DNA 指纹技术, 并用它成功地进行第一起移民案涉及的亲子鉴定, 开辟了法医物证 DNA 分析的先河^[1,2]. 随后出

现的以短串联重复序列(short tandem repeat, STR) 基因座为标记的 STR 分型技术, 以其自动程度高、快速、灵敏、准确、稳定、重复性好等特点^[3], 迅速成为法医 DNA 实验室广泛应用的主要技术.

收稿日期: 2013-01-06; 修回日期: 2013-03-11

基金项目: 公安部重点实验室项目(2011GABJC028)

作者简介: 董军磊(1988-), 男, 河南唐河人, 硕士研究生, 主要从事法医遗传学研究; * 通讯作者: 叶健(1961-), 女, 贵州贵阳人, 公安部物证鉴定中心主任医师(法医), 博士, 主要从事法医遗传学方面的研究, Tel: 010-63434093, E-mail: yejian77@126.com.

常规STR分型过程包括DNA提取、DNA定量、PCR扩增和对扩增后的STR片段进行检测和分析,这个过程需要8~10 h甚至几天的时间。然而,对于某些紧急案件,快速得到准确的STR分型结果显得至关重要。此外,随着案件搜集DNA样本量的增大及国家DNA数据库建设的快速推进,待检DNA样本数量激增,这不但是对法医DNA实验室人力和财力的考验,更是对检验技术方法的考验。运用新的技术和方法提高检验通量和缩短检验时间一直是法医DNA工作者所感兴趣的。在近些年中,快速STR分型有了很大的发展,在很大程度上提高的检验效率,缩短了检验时间。现本文对近年来出现的可进行快速STR分型的新技术、新方法进行综述。

1 快速提取DNA

一般来说,DNA提取是用DNA分析进行个人识别鉴定的第一步,也是得到生物样本DNA STR分型的基础。法医DNA分析中最早用到的DNA提取方法是有机提取法,即:苯酚/氯仿提取法。这种方法操作步骤多、耗时长。随后出现的chelex提取法可在单管中完成提取,耗时较有机提取法液有所减少。固相提取(solid phase extraction, SPE)的出现,在一定程度上使得快速提取DNA成为可能,这种方法不仅可以提取到很微量的DNA,还可去除影响后续PCR的抑制剂,操作也更容易实现自动化。目前使用最广泛的自动化提取平台有QIAGEN的EZ1、M48和QIAcube, Promega公司的Maxwell16及AB公司的AutoMate Express^[4]。

虽然基于磁珠的固相提取法可在很大程度上实现自动化,在短时间内进行多样本的提取,节省了大量的时间,但这种方法操作步骤仍然较多,这也无疑会耗费更多的时间。近来发展起来一种基于酶的DNA准备技术,所使用的酶是一种来自南极芽孢杆菌EA1的中性蛋白酶,这种酶可在与PCR反应缓冲液共处的条件下,在75℃下可裂解细胞、降解蛋白质和核酸酶而留下完整的DNA^[5]。这种方法提供一个封闭的环境,没有样本的转移步骤,减低了交叉污染的可能性及样本损耗;另外,省去了离心和固相操作步骤,这样更容易实现自动化。Lounsbury等^[6]对不同提取方法进行比较发现,基于酶的DNA准备技术耗时少,且更易实现自动化,用这种方法对降解和非降解样

本进行PCR前的处理,可得到完整(16位点)的STR分型结果。

不同类型的生物样本需要有与之相适应的提取方法。在性侵案件中,阴道拭子提取到的一般为嫌疑人的精子和受害女性的阴道上皮细胞的混合物。传统处理这类样本的方法是差异裂解法,这种方法操作步骤繁多,耗时在3 h以上,其他可行的方法像免疫磁珠定向捕获^[7]、激光捕获显微切割^[8,9]等也都有操作复杂、耗时长长的缺点。Hudlow等^[10]介绍一种从混合样本中提取精子的DNA的快速碱裂解方法,此方法可在约2 h内处理2~6个样本,约4 h内处理96个样本,得到的STR分型结果与差异法得到的相似。

2 无提取直接PCR

直接PCR(direct PCR)省去了DNA提取和DNA定量步骤,这样既降低了检验成本,也减少了STR分型的时间,在一定程度上加快了分型过程。这种方法把样本直接加到PCR反应缓冲液中,在细胞裂解释放出DNA的同时,血红素和其他杂质也存在于反应体系中,这些物质都会对PCR产生抑制作用,这也是直接PCR需解决的关键问题。为了克服抑制剂的影响,选用新的DNA聚合酶如Phusion高保真DNA聚合酶^[11],配制抗抑制能力强的反应缓冲液^[12,13]和加入PCR增强剂^[14,15]等都是行之有效的方法。

目前已有的直扩STR试剂盒,像Identifiler Direct、PowerPlex 16 HS和Typer 15 Plus,都能够在有血红素和其他PCR抑制剂存在的情况下实现PCR扩增,因此可以不对生物样本进行提取纯化而直接进行扩增^[6]。但这些直扩试剂盒所对的生物样本都是基于FTA™卡的血细胞和口腔上皮细胞,主要用于DNA数据库建设中。而对于案件现场的生物样本(如血斑、人源组织等)无法转移到FTA卡上,一般都要从现场提取带到实验室中才能进行分析,这样无疑会耗费大量时间。Chen等^[17]报道了一种基于铁丝的现场快速样本处理方法,选用直径0.5 mm的不锈钢单股铁丝,使用便携式乙烷气焰枪加热至变红后,插入到凝血块或其他人体组织约5 mm,转动5 s后取出放入异丙醇中固定,随后可直接放入PCR反应液中进行扩增。这种方法可在案件现场简单而快速地处理样本,不仅可以节省提取DNA的时间,还可以达到长期保存样本的目的。

3 快速 PCR

在整个 STR 分型过程(8~10 h)中,按照 STR 分型试剂盒推荐的循环参数,PCR 扩增需要 3 h 左右,是耗时最长的步骤.扩增时间的长短主要取决于热循环仪的升降温速率与热传递效率和 DNA 聚合酶的扩增速率与效率.为了缩短扩增时间,在使用原有 AmpFISTR[®] Identifiler 试剂盒试剂和 9700 型 PCR 仪的基础上,Choung 等^[18]通过改变 PCR 扩增条件实现快速 PCR,由于 Taq 金牌酶扩增速率及 9700 型 PCR 仪性能的限制,完成扩增仍需 60~90 min.然而,选择升降温速率快、温控性能好的快速 PCR 仪(如 Bio-Rad C1000[™]、Eppendorf Mastercycler[®]、Finnzymes Piko[®])和快速酶(如 Takara 公司的 SpeedSTAR[™] HS、Fermentas 公司的 PyroSTART[™]、Finnzymes 公司 Phusion[®] Flash)可以明显减低整个 PCR 时间^[19].此外,通过循环参数的优化调整,像缩短或者合并某些循环阶段,也可以加快扩增速度.目前快速 PCR 已经被应用很多方面,比如样本鉴定^[20]、病原体检测^[21,22]和临床诊断^[23,24]等.在法医 DNA STR 分型方面,已有很多研究者使用快速 PCR 仪和(或)快速酶进行快速 PCR 条件的优化(具体见表 1).然而,得到的 STR 分型结果不同程度存在像加 A 不完全、位点内不平衡和影子带等问题,由此可看出快速 PCR 方法在法医 DNA 分析中潜在的局限性.

一种优化好的快速 PCR 条件是对目前常规 PCR 方法很有价值的改变,结合其他加速步骤,像快速 DNA 提取技术^[4]和直接 PCR 技术^[29],可以更容易地实现快速 STR 分型.基于此方法不仅可以对紧急案件快速提供 DNA 分析,还可以提高样本检验通量和降低处理样本的时间.

4 微流控芯片技术在 STR 快速分型方面的应用

当前的 STR 分型技术从样本 DNA 的提取到最后得到分型结果都需要在实验室中分步完成,而且还要确保样本转移过程中不受污染,这都是耗时费力的工作.为解决这一问题,需要有快速、便携的 DNA 分型装置在现场实时进行样本的分析处理.基于微电机加工技术(micro-electronic mechanical system, MEMS)的微全分析系统(micro total analysis system, μ -TAS)可以在微升至纳升的空间内集多个分析过程于一体,使得可用于现场

实时快分析的装置成为可能. μ -TAS 自 1990 年出现以来^[30],DNA 分析的很多步骤已经微化集成到微芯片上,包括 DNA 提取^[31,32]、PCR 扩增^[33]和毛细管电泳分离^[34].这些技术也已经开始应用到法医中^[35].

1997 年, Schmalzing 等^[36]利用微芯片毛细管电泳在不到 2 min 的时间内对 4 个 STR 位点实现高精度分离. Yeung 等^[37]展示了一种 96 道微毛细管阵列装置,并配置了用于 STR 分型的四色荧光收集器,可在不到 30 min 内完成 96 通道的 16 个 STR 位点分离,分辨率达 1 bp.虽然这些系统严重依赖传统的样本前处理,但足以说明基于芯片的毛细管电泳技术是可以用于法医 DNA 分析的.

集成便携式 PCR-CE 微装置^[38,39]的出现,改变了传统手工加样方式,实现了扩增后直接进样电泳分离,既降低了样本的损耗也节省了操作时间. Liu 等^[40]设计的一种便携式 PCR-CE 装置,在 1.5 h 内实现对釉原蛋白(amelogenin)基因座和 3 个 Y-STR 基因座(DYS390、DYS393、DYS439)的复合扩增及电泳分离,但 PCR 前的样本处理准备仍依靠传统的 DNA 提取纯化.

Bienvenue 等^[41]成功制作了集成样本 DNA 的固相提取和 PCR-STR 位点复合扩增的芯片,实现对复杂生物样本(全血和精斑)DNA 的提取和扩增,但 PCR 扩增使用的是传统的热循环仪,不能充分发挥微流控在减少耗时方面的潜力. Hagan^[42]等设计的集固相提取和 PCR 于一体的无阀 STR 分型装置,选用扩增速度快的 SpeedSTAR[™] HS DNA 聚合酶,结合红外加热方式,在 45 min 内扩增 16 个 STR 位点,得到这些位点的完整分型结果.但这些研究 PCR 扩增后要从微芯片上取样出来在传统分析仪上检测分析,这种微观对宏观操作无疑会耗费不少时间.

要利用微流控技术最大限度地实现快速 STR 分型,就必须在芯片集成 DNA 提取纯化、PCR 和电泳分离检测,实现真正的微全分析. Hopwood 等^[43]介绍可进行从样本收集到 DNA 分型的集成微流控系统,但样本处理过程复杂,完成整个过程需要约 4 h. Liu 等^[44]展示了一种新的集成微流控系统,用特异性探针进行 DNA 序列特异性纯化后,在线注入 PCR-CE 微系统,在 PCR 后对反应腔进行清洗,并用这种系统对来自口腔拭子样本的 DNA 完成了快速 STR 分型,整个过程不到 3 h.

对于性侵案件中的精子-阴道上皮细胞混合斑,一直都是至关重要的生物物证,而两者的分

表 1 快速 PCR 研究
Table 1 Summary of rapid PCR methods

Year(s)	Author(s)	Primer	PCR thermal cycle	Buffer	DNA polymerase	PCR cycle	Time	Problems
2008/2009	Vallone, <i>et al</i> ^[25, 26]	AmpF1STR® identifier	GeneAmp 9700 thermal cycler	PyroSTART™ buffer	SpeedSTAR™ HS DNA polymerase	95 °C, 1 min; 28×(95 °C, 5 s; 58 °C, 10 s; 72 °C, 10 s); 72 °C, 1 min	Less than 36 min	Incomplete adenylation, non-specific artifacts, reduced sensitivity and decreased amplification efficiency for D19S433 and D21S11
2009	Wang, <i>et al</i> ^[27]	AmpF1STR® identifier	GeneAmp 9700 thermal cycler	AmpF1STR® Identifier buffer	Phusion(NEB), AB77, AB95, AB-1, AB-3	98 °C, 7 min; 28×(98 °C, 15 s; 61 °C, 15 s; 72 °C, 15 s)	2 h	Significant increase in non-specific products, nonhuman cross-reactivity and a two-fold increase in stutter artifacts
2009	Giese, <i>et al</i> ^[28]	AmpF1STR® profiler plus	Eppendorf mastercycler® ep thermal cycler	SpeedSTAR™ HS fast buffer I	SpeedSTAR™ HS DNA polymerase	95 °C, 1 min; 28×(98 °C, 4 s; 58 °C, 15 s; 72 °C, 5 s); 72 °C, 1 min	19 min	Incomplete adenylation; increase in stutter ratios
2012	Verheijb, <i>et al</i> ^[11]	AmpF1STR® SGM plus	Piko® thermal cycler	Phusion® Flash buffer	Phusion® Flash DNA polymerase	98 °C, 5 min; proper cycles× (98 °C, 5 s; 59 °C, 30 s; 72 °C, 10 s); 72 °C, 1 min	47 min	Increase in stutter ratios, reproducible artifacts, increased baseline and allele dropout
2012	Laurin, <i>et al</i> ^[29]	AmpF1STR® profiler plus	Bio-Rad C1000™ thermal cycler	SpeedSTAR™ HS fast buffer I	SpeedSTAR™ HS DNA polymerase	95 °C, 1 min; 28×(95 °C, 5 s; 62 °C, 15 s); 72 °C, 1 min	26 min	Increase in stutter ratios

离也一直是法医检验中的难点. 传统的分离方法 (见第 1 部分描述) 虽然能满足案件需求, 但耗费时间较长. 微流控技术的出现使快速高效地分离细胞成为可能^[45]. Horsman 等^[46]在微流控芯片利用上皮细胞沉降速率快于精子的原理, 通过微流体驱动精子而达到分离的目的, 这种方法可快速分离出精子, 但分离效率有待提高. Norris 等^[47]建立一种基于超声差异提取分析的微流控装置, 先对混合液中的上皮细胞进行裂解, 再利用超声截获其中的精子实现分离. 此方法可在 14 min 内完成, 但在实际案件中应用仍需进一步研究.

5 总结与展望

随着国民法律意识不断增强及国家司法制度

的日益完善, 在对犯罪嫌疑人的法定羁押期间, 如果得不到有力的法律证据, 期满后就要立刻放人, 而再次抓捕不一定是件简单的事. 所以在有限的时间内应尽快得到法律证据指认犯罪嫌疑人, 而基于 STR 分型的 DNA 分析就是目前最有力的法律证据. 而传统的分型技术耗费时间较长, 已很难满足实际的需求. 法医学专家们一直不断探索新的方法技术, 使得用于法医 DNA 分析的 STR 分型技术得到了长足的发展. 与传统的分型方法相比, 新的分型方法在很大程度上节省了时间 (见表 2), 但仍有很多问题需要进一步研究解决.

一种新技术、新方法的出现, 往往要经过反复的实验验证才能用于实践中. 对于司法鉴定来说, 这个过程将会更加严格和漫长. 快速 DNA 分

表 2 传统与快速 STR 分型方法时间对比及快速方法的潜在问题

Table 2 Comparison of the time of traditional and rapid STR typing methods and the potential problems of the rapid methods

DNA extraction	Traditional methods	Rapid methods	The potential problems of the rapid method
Direct PCR	22~180 min	2~15 min	Different sample extraction efficiency is quite different.
Rapid PCR	>200 min ⁺	<185 min	The applicable type of samples is limited.
	>180 min	19~120 min	Incomplete adenylation, non-specific artifacts, increase in stutter ratios.
Microfluidic technology for STR typing	8~10 h	≈3 h	The applicable type of samples is limited, immature technology development.

注: 每个实验室的操作规则不同, 这里所列的只为一一般情况下; “+”: 此时间为提取和 PCR 的总时间.

Notes: Protocols vary from laboratory to laboratory, these are general conditions used; “+”: this time is the total time of extraction and PCR.

析是发展的趋势,微流控技术也是发展的趋势,两者的结合必是法医遗传领域研究的前沿热点。目前,微流控技术在法医 DNA 分析中的应用还不成熟,现存的方法还有很多不足之处,但将来基于微流控技术的 DNA 分析设备将会以其体积小、速度快、灵敏度高等优点在犯罪现场的实时分析中发挥重要作用,实现对犯罪分子的及时快速打击。

参考文献(References):

- [1] 郑秀芬. 法医 DNA 分析 [M]. 北京: 中国人民公安大学出版社 (ZHENG Xiu-feng. Forensic DNA Analysis [M]. Beijing: Chinese People's Public Security University Press), 2002. 1-169.
- [2] JEFFREYS A J, WILSON V, THEIN S L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA[J]. *Nature*, 1985, 314 (6006): 67-73.
- [3] 侯一平. 法医物证学[M]. 北京: 人民卫生出版社(HOU Yi-ping. Science of Medico-legal Physical Evidence[M]. Beijing: People's Medical Publishing House), 2009. 127.
- [4] BUTLER J M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing Methodology[M]. Salt Lake City: Academic Press, 2011. 35.
- [5] MOSS D, HARBISON S A, SAUL D J. An easily automated, closed-tube forensic DNA extraction procedure using a thermostable proteinase[J]. *International Journal of Legal Medicine*, 2003, 117(6): 340-349.
- [6] LOUNSBURY J A, COULT N, MIRANIAN D C, *et al.* An enzyme-based DNA preparation method for application to forensic biological samples and degraded stains[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2012, 6(5): 607-615.
- [7] 赵兴春, 姜伯玮. 精子细胞定向捕获与分离技术初步研究[J]. 刑事技术(ZHAO Xing-chun, JIANG Bo-wei. Preliminary study on a high specific method for directional capture and separation of sperm cells from forensic samples[J]. *Forensic Science and Technology*), 2012, 222(1): 14-17.
- [8] VANDEWOESTYNE M, DEFORCE D. Laser capture microdissection in forensic research: a review[J]. *International Journal of Legal Medicine*, 2010, 124(6): 513-521.
- [9] LI C X, HAN J P, REN W Y, *et al.* DNA profiling of spermatozoa by laser capture microdissection and low volume-PCR[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): 1-7.
- [10] HUDLOW W R, BUONCRISTIANI M R. Development of a rapid, 96-well alkaline based differential DNA extraction method for sexual assault evidence[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2012, 6(1): 1-16.
- [11] VERHEIJB S, HARTEVELDA J, SIJEN T. A protocol for direct and rapid multiplex PCR amplification on forensically relevant samples[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2012, 6(2): 167-175.
- [12] YANG Y G, KIMB J Y, SONG Y H, *et al.* A novel buffer system, AnyDirect, can improve polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2007, 380(1-2): 112-117.
- [13] 赵兴春, 姜伯玮, 季安全, 等. 荧光 STR 直接复合扩增试剂缓冲体系的研制[J]. 中国法医学杂志(ZHAO Xing-chun, JIANG Bo-wei, JI An-quan, *et al.* Development and application of a fluorescent STR multiplex assay for the direct amplification of forensic database samples[J]. *Chinese Journal of Forensic Medicine*), 2012, 27(5): 359-363.
- [14] ZHANG Z, KERMEKCHIEV M B, BARNES W M, *et al.* Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq[J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2010, 12(2): 152-161.
- [15] 赵兴春, 姜伯玮, 叶健. FTA 卡直接扩增缓冲增强剂的研制[J]. 刑事技术 (ZHAO Xing-chun, JIANG Bo-wei, YE Jian. Development of PCR enhancer for direct amplification of samples on FTA cards[J]. *Forensic Science and Technology*), 2012, 224(3): 13-15.
- [16] WANG D Y, CHANG C W, OLDROYD N J, *et al.* Direct amplification of STRs from blood or buccal cell samples[J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2009, 2(1): 113-114.
- [17] CHEN T, DAVID E A, STEPHENSON A, *et al.* A rapid wire-based sampling method for DNA profiling[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2012, 57(2): 472-477.
- [18] CHOUNG C M, LEE D S, PARK K W, *et al.* Test of the rapid PCR method using AmpFISTR Identifier kit[J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2011, 3(1): 475-476.
- [19] FOSTER A, LAURIN N. Development of a fast PCR protocol enabling rapid generation of AmpFISTR® Identifier® profiles for genotyping of human DNA [J]. *Investigative Genetics*, 2012, 3(1): 6.
- [20] IVANOVA N V, BORISENKO A V, HEBERT P D. Express barcodes: racing from specimen to identification[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(1): 35-41.
- [21] HE J, BOSE M E, BECK E T, *et al.* Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 79, N1 (human), N1 (animal), N2, and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009 outbreak in Milwaukee, Wisconsin[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(9): 2772-2778.
- [22] CREMONESI P, PISONI G, SEVERGNINI M, *et al.* Pathogen detection in milk samples by ligation detection reaction-mediated universal array method[J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(7): 3027-3039.
- [23] FUJIMOTO T, KONAGAYA M, ENOMOTO M, *et al.* Novel high-speed real-time PCR method (hyper-PCR): results from its application to adenovirus diagnosis[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2010, 63(1): 31-35.
- [24] LAM W Y, YEUNG A C, TANG J W, *et al.* Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(11): 3631-3640.
- [25] VALLONE P M, HILL C R, BUTLER J M. Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2008, 3(1): 42-45.
- [26] VALLONE P M, HILL C R, PODINI D. Rapid amplification of commercial STR typing kits[J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2009, 2(1): 111-112.
- [27] WANG D Y, CHANG C W, HENNESSY L K. Rapid STR analysis of single source DNA samples in 2 h[J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2009, 2(1): 115-116.
- [28] GIESE H, LAM R, SELDEN R, TAN E. Fast multiplexed polymerase chain reaction for conventional and microfluidic short tandem repeat analysis[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2009, 54(6): 1287-1296.
- [29] LAURIN N, FRÉGEAU C. Optimization and validation of a fast amplification protocol for AmpFISTR® Profiler Plus® for

- rapid forensic human identification[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2012, 6(1): 47-57.
- [30] MANZ A, WIDMER H M. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing[J]. *Sensors Actuators B*, 1990, 1(1-6): 244-248.
- [31] WEN J, GUILLO C, FERRANCE J P, *et al.* DNA extraction using a tetramethyl orthosilicate-grafted photopolymerized monolithic solid phase[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(5): 1673-1681.
- [32] KIM J, JOHNSON M, HILL P, *et al.* Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification[J]. *Integrative Biology*, 2009, 10(1): 574-586.
- [33] ROPER M G, EASLEY C J, LANDERS J P. Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(12): 3887-3893.
- [34] JIN L J, FERRANCE J, LANDERS J P. Miniaturized electrophoresis: an evolving role in laboratory medicine[J]. *Biotechniques*, 2001, 31(6): 1332-1342.
- [35] HORSMAN K M, BIENVENUE J M, BLASIER K R, *et al.* Forensic DNA analysis on microfluidic devices: a review[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2007, 52(4): 784-799.
- [36] SCHMALZING D, KOUTNY L, ADOURIAN A. DNA typing in thirty seconds with a microfabricated device[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1997, 94(19): 10273-10278.
- [37] YEUNG S H, GREENSPOON S A, MCGUCKIAN A, *et al.* Rapid and high-throughput forensic short tandem repeat typing using a 96-lane microfabricated capillary array electrophoresis microdevice[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2006, 51(4): 740-747.
- [38] LAGALLY E T, SIMPSON P C, MATHIES R A. Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system[J]. *Sens Actuators B Chemical*, 2000, 63(3): 138-146.
- [39] LAGALLY E T, EMRICH C A, MATHIES R A. Fully integrated PCR-capillary electrophoresis microsystem for DNA analysis[J]. *Lab Chip*, 2001, 1(2): 102-107.
- [40] LIU P, SEO T S, BEYOR N, *et al.* Integrated portable polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microsystem for rapid forensic short tandem repeat typing[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(5): 1881-1889.
- [41] BIENVENUEA J M, LEGENDREA L A, FERRANCEA J P, *et al.* An integrated microfluidic device for DNA purification and PCR amplification of STR fragments[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2010, 4(3): 178-186.
- [42] HAGAN K A, REEDY C R, BIENVENUE J M, *et al.* A valveless microfluidic device for integrated solid phase extraction and polymerase chain reaction for short tandem repeat (STR) analysis[J]. *Analyst*, 2011, 136(9): 1928-1937.
- [43] HOPWOOD A J, HURTH C, YANG J, *et al.* Integrated microfluidic system for rapid forensic DNA analysis: sample collection to DNA profile[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(16): 6991-6999.
- [44] LIU P, LI X J, GREENSPOON S A, *et al.* Integrated DNA purification, PCR, sample cleanup, and capillary electrophoresis microchip for forensic human identification[J]. *Lab Chip*, 2011, 11(6): 1041-1048.
- [45] BHAGAT A A, BOW H, HOU H W, *et al.* Microfluidics for cell separation[J]. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 2010, 48(10): 999-1014.
- [46] HORSMAN K M, BARKER S L, FERRANCE J P, *et al.* Separation of sperm and epithelial cells in a microfabricated device: potential application to forensic analysis of sexual assault evidence[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(3): 742-749.
- [47] NORRIS J V, EVANDER M, HORSMAN-HALL K M, *et al.* Acoustic differential extraction for forensic analysis of sexual assault evidence[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(15): 6089-6095.