

直接扩增技术在接触性检材 DNA 检验中的应用

李长征¹ 刘海东¹ 崔文^{2△} 寻超群¹ 孙贤学¹ 姜铭章¹

(¹ 济宁市公安局刑侦支队, 山东 济宁 272000; ² 济宁医学院法医学与检验医学学院, 济宁 272067)

摘要 目的 将 DNA 直接扩增技术引入案件现场不同的接触性检材的检验中, 构建有效的接触性 DNA 的生物检材的检验方法。**方法** 采用剪取、擦拭等方法对手套、烟蒂、衣服、饮料瓶、吸管及残缺指纹等检材进行取样, 采用 DNA 直接扩增技术获得短串联重复序列(short tandem repeat, STR)分型。**结果** DNA 直接扩增技术在 5 种不同检材中检出的基因型均为单一个体来源, 其对手套、烟蒂、衣服、饮料瓶和吸管、残缺指纹检材的成功率分别为 90%、100%、70%、90% 和 60%, 平均成功率在 70% 以上。分别对 5 种检材多处取点样品进行平行扩增, 手套、烟蒂检材 3 个点位成功率均在 90% 以上; 饮料瓶、吸管 3 个点位的成功率达 80%~90%; 衣服 3 个点位的成功率在 60%~70%; 残缺指纹 3 个点位的成功率在 50%~60%。**结论** DNA 直接扩增技术对接触性 DNA 检材检验具有较高的有效效应, 其结果可靠, 重复性强。

关键词 法医物证; 接触性 DNA; 直接扩增

中图分类号: DF795.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2014)10-347-03

Application of direct amplification of DNA in different contact materials

LI Chang-zheng, LIU Hai-dong, CUI Wen, et al

(Public Security Bureau Criminal Investigation detachment of Jining, 272000 Jining, China)

Abstract: Objective The effective protocol was constructed for DNA of different contact biological materials at the crime scene using direct amplification of DNA. **Methods** The samples were selected from contact materials such as gloves, cigarette end, clothes, beverage bottle, suction pipe and incomplete fingerprint by scissors and wiping. Then STR type was obtained using direct PCR. **Results** Genotype derived from five contact materials was the origin of a single individual by direct amplification of DNA. The successful rates were 90%, 100%, 70%, 90% and 60% in gloves, cigarette end, clothes, beverage bottle, suction pipe and incomplete fingerprint, respectively. And the average successful rate was more than 70%. Parallel amplification was used for five contact materials by multidraw. The successful rate was more than 90% from 3 points in gloves and cigarette end, 80%~90% in beverage bottle and suction pipe, 60%~70% in clothes, and 50%~60% in incomplete fingerprint. **Conclusion** The direct amplification of DNA is efficient for DNA of contact materials. The results are reliable and good repeatability.

Key words: Forensic evidence; Contact DNA; Direct amplification

案件现场接触性检材 DNA 的检验一直是难题, 传统的 DNA 提取方法无论是 chelex-100 提取法、磁珠法还是硅珠法对目标载体的选择都为大载体, 虽然可以保证获取到足够的 DNA 模板, 但大体系的提取方法也降低了目标 DNA 的单位浓度, 从而造成扩增结果的失败。极微量的接触性 DNA 检材如果选取大载体进行提取更容易获得混合

DNA 分型。直接扩增技术是使扩增直接从检材开始, 对接触性 DNA 检材的检验较传统提取方法有着明显优势^[1], 其对目标载体的选择更有针对性, 在保证获得足够模板 DNA 的同时, 更容易得到单一个体来源的 DNA 分型。本文采用 DNA 直接扩增技术对案件现场中的不同生物检材 DNA 进行直接扩增, 以探讨该技术的有效性, 为保证结果的可靠性和可重复性, 我们采取了在载体的一定面积内选取多个点进行平行扩增的方法。

△ [通信作者] 崔文, E-mail: cuiwenmd@163.com

1 材料与方法

1.1 检材

120 份检材全部来自本实验室日常受理案件中的现场生物检材。包括手套 20 只,烟蒂 20 枚,上衣 20 件,饮料瓶、吸管 20 个,残缺指纹 40 枚。分别剪取 3 处 $2\text{mm} \times 2\text{mm}$ 手套拇指虎口或手背浮出的纤维、3 处 $2\text{mm} \times 2\text{mm}$ 烟蒂与嘴唇接触处外面纸片、3 处 $3\text{mm} \times 3\text{mm}$ 上衣袖口或衣领处 $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ 面积内布片、3 处 $2\text{mm} \times 2\text{mm}$ 擦拭饮料瓶口和吸管的擦拭棉签、3 处大小为 $2\text{mm} \times 2\text{mm}$ 残缺指纹擦拭湿棉签。

1.2 仪器与试剂

ABI 9700 PCR 仪和 ABI 3500xL 测序仪(美国 ABI 公司);Identifiler Direct 试剂盒(美国 ABI 公司); Identifiler 扩增试剂盒(美国 ABI 公司); 5% chelex-100 饱和溶液; 10mg/ml, 蛋白酶 K (proteinase K, PK); QIAGEN 硅膜试剂盒。

1.3 PCR 扩增及产物检测

将上述样品采用 Identifiler Direct PCR 试剂盒进行直接扩增,操作按试剂盒说明进行,扩增体系 $12.5\mu\text{l}$ 。将扩增产物在 ABI 3500xL 遗传分析仪上进行电泳,电泳结果采用 GeneMapper ID-X 基因分析软件分析。

另取上述相同样品,分别采用 QIAGEN 硅膜和 chelex-100 提取法提取 DNA,采用 Identifiler 试剂盒进行扩增,操作按推荐参数进行,扩增体系 $10\mu\text{l}$ 。电泳及分析方法与上述相同。

2 结果

2.1 直接扩增法与 QIAGEN 硅膜和 chelex-100 提取法比较

50 份检材分别采用直接扩增、chelex-100 法和 QIAGEN 硅膜法提取 DNA 后扩增并进行分型检验,以 15 个 STR 基因座及 Amelogenin 全部检出为检验成功,检出 9 个以上的 STR 基因座及 Amelogenin 为有效。

检验结果显示,同一检材用 3 种方法检测,分型结果并不相同,如在手套检材的检测中,直接扩增法检出的基因型均为单一个体来源,而 QIAGEN 硅膜及 chelex-100 法提取到 2 个获取混合型。因此从图 1-3 可以看出,相对于常规提取方法,直接扩增法更易于获得单一个体来源的 DNA 分型,其检验结果具有更高的有效性。见图 1~3。

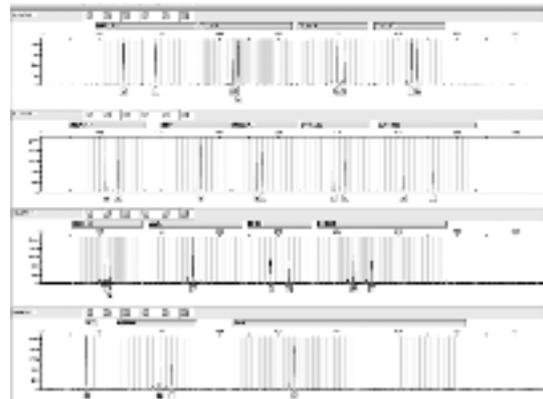


图 1 直接扩增法检测手套 DNA 分型图谱

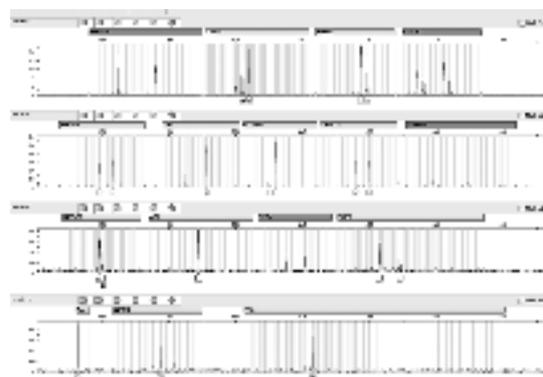


图 2 QIAGEN 硅膜提取手套检材 DNA 分型图谱

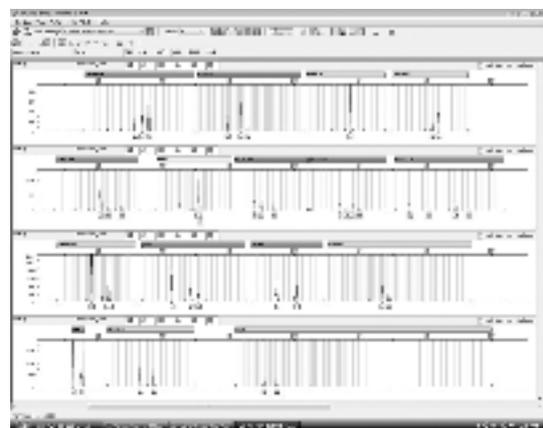


图 3 chelex-100 法提取手套检材 DNA 分型图谱

2.2 各种生物检材成功率

直接扩增法对手套检材的成功率为 90%,对烟蒂、衣服、饮料瓶和吸管、残缺指纹的成功率分别为 100%、70%、90% 和 60%,平均成功率达到 70% 以上。而相应检材 QIAGEN 硅膜成功率分别为 50%、80%、60%、70%、30%;chelex-100 成功率为 50%、70%、40%、60%、10%。从表 1 中可以看出,直接扩增技术对不同接触性生物检材 DNA 检验成功率也高于常规提取方法。见表 1。

表 1 各种检材的检验成功率(n,%)

检材	n	直接扩增	QIAGEN 硅膜	chelex-100 法
			提取后扩增	提取后扩增
手套	10	9(90)	5(50)	5(50)
烟蒂	10	10(100)	8(80)	7(70)
衣服	10	7(70)	5(50)	4(40)
饮料瓶、吸管	10	9(90)	7(70)	6(60)
残缺指纹	10	6(60)	3(30)	1(10)

2.3 直接扩增法平行检验检材接触性 DNA 的可重复性

对 5 种检材一定面积内多处取点,采用直接扩增法平行扩增,结果表明,虽然不同类别的接触性生物检材在成功率上略有不同,但有效分型的结果相同,说明检材不同位置取点均可保证实验结果的可靠性和可重复性。每个检材不同部位检出有效率基本相同,其成功率可能与 DNA 在各个取点上存在的量有差异有关。除 1 例手套检材的 3 个点位出现了 2 种不同分型外(可能与日常生活中混戴手套有关),其余检材的多部位取点扩增结果均为同一分型。见表 2。

表 2 直接扩增法平行扩增各种检材结果(n,%)

检材	n	成功			有效		
		点位 1	点位 2	点位 3	点位 1	点位 2	点位 3
手套	10	9(90)	9(90)	9(90)	10(100)	9(90)	9(90)
烟蒂	10	10(100)	9(90)	9(90)	10(100)	10(100)	10(100)
衣服	10	7(70)	6(60)	7(70)	8(80)	8(80)	6(60)
饮料瓶、吸管	10	9(90)	9(90)	8(80)	9(90)	10(100)	9(90)
残缺指纹	10	5(50)	6(60)	6(60)	5(50)	7(70)	6(60)

3 讨论

直接扩增试剂盒自研发投入实验室应用以来,一直用于违法人员数据库的建设。检材均为单一个体来源,FTA 卡或滤纸提取,检验中省略了提取过程,大大节省了建库的成本,提高了检验效率。一直以来,由于受到常规 DNA 检验观念的影响,认为这种免提取的直接扩增试剂盒只能应用于 FTA 卡提取的血液检材,而未将其作用进一步的开发。本实验室在日常检案中,最先将直接扩增试剂盒和直接扩增方法应用到除血卡、血滤纸以外的其他单一个体来源的 DNA 检材,如口腔拭子、毛

发、肋软骨、肌肉组织等,发现效果十分理想。这一应用在很大程度上解决了提取过程中繁琐的操作步骤,大大减轻了工作的强度。

本文将直接扩增试剂盒应用到案件现场接触性检材的 DNA 分析,发现直接扩增法检验接触性 DNA 成功率明显高于 QIAGEN 硅膜和 chelex-100 法。其主要原因是由于直接扩增法对剪取的适量接触性检材不需要再加入其它试剂即可直接扩增,单位体系 DNA 浓度较高;而采用常规 QIAGEN 硅膜、chelex-100 法提取 DNA,在提取环节中加入了各种提取试剂使本来就微量的检材 DNA 被进一步被稀释,降低了 DNA 模板浓度。对于常量 DNA 检材不影响检验结果,而对于接触性微量检材,稀释环节就有可能使 DNA 模板浓度达不到检出的阈值,从而降低了检出率^[2]。

本文结果显示,直接扩增法相对于 QIAGEN 硅膜和 chelex-100 法提取法更易于获得单一个体来源的 DNA 分型,使检验结果具有更高的有效性。分析原因因为直接扩增法剪取检材面积较小,有利于获得单一个体的脱落细胞;QIAGEN 硅膜和 chelex-100 提取法,由于需要检材量较大,大面积的取材则较容易提取到多人遗留的脱落细胞。

本文将案件现场接触性检材采用一定面积内多处取点进行平行扩增,可以保证实验结果的可靠性和可重复性。对检材进行小面积的取点,更容易获得单一的 DNA 分型,同时也容易“取不到”目标 DNA,或者恰好取到“无关 DNA”,造成结果的失败或偏差。多处取点,平行扩增可以有效地保证结果的可靠性和可重复性,从而取得较高的成功率。

综上所述,将直接扩增技术应用到现场案件不同接触性生物检材,创新了一套针对接触性 DNA 检材的直扩方法,多点取材、平行扩增、分类提取等直接扩增技术,为疑难生物检材的检验应用提供了可靠的解决方案。

参考文献:

- [1] 张艳霞,李爱强,赵丽.直接扩增法用于现场检材 DNA 检验[J].中国法医学杂志,2012,27(1):62-63.
- [2] 李林,刘静,王敏.直接扩增法在血痕、肋软骨和唾液检材中的应用[J].中国法医学杂志,2013,28(2):148-149.

(收稿日期 2014-08-11)