

技术方法

DOI:10.11699/cyxb20130419

高温处置后人体组织 DNA 提取研究

朱 英¹,李永国¹,刘德伟²,胡 军³

(1. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室;2. 重庆法医验伤所,重庆 400016;

3. 重庆市人民检察院第一分院,重庆 401147)

【摘要】目的:研究高温后人体组织 DNA 的提取方法对 DNA-STR 分型的影响。**方法:**用不同浓度 TritonX-100 处理高温后的人体组织样本,采用 Chelex-100 提取 DNA 的方法,经 DNA-STR 复合扩增,用 ABI-3130 序列分析仪电泳分离并运用 Gene mapper ID V3.2 基因分析软件对基因进行分型。**结果:**用 1% TritonX-100+Chelex-100 处理样本后提取 DNA,再经 QIA quick PCR 纯化后可检出全部基因座且基因座能较平衡地扩增。**结论:**该方法简便易行,实验效果好,是法科学领域中一种值得推荐的方法,尤其适合检案。

【关键词】TritonX-100;Chelex-100;QIA quick PCR;DNA-STR;法医学

【中国图书分类法分类号】DF795.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-10-10

Research on extracting DNA of human tissues after high-temperature disposal

ZHU Ying¹,LI Yongguo¹,LIU Dewei²,HU Jun³

(1. Department of Forensic Medicine, Basic Medicine College, Chongqing Medical University; 2. Chongqing Forensic Injury Assessment Institution; 3. the First Branch of the Chongqing Municipal People's Procuratorate)

【Abstract】Objective:To study the effects of DNA extraction methods on deoxyribonucleic acid-short tandem repeats(DNA-STR) typing of human tissue after high-temperature disposal. **Methods:**Human tissue samples after high-temperature disposal were initially handled with different concentrations of TritonX-100. DNA was extracted using the method of Chelex-100 and was amplified by recombination of DNA-STR. Then, ABI-3130 sequence analyzer was used for electrophoresis separation and Gene mapper ID V3.2 gene analysis software was used for gene typing. **Results:**1% TritonX-100+Chelex-100 was used to process the samples before DNA extraction. All loci could be detected after QIA quick PCR purification and the loci could be balancedly amplified. **Conclusions:**This is a simple method with satisfied results, which is recommended in the field of forensic science, especially for the prosecution case.

【Key words】TritonX-100;Chelex-100;QIA quick PCR;deoxyribonucleic acid-short tandem repeats;forensic science

在火灾、交通、爆炸等事故中,尸体的皮肤和肌肉严重地烧毁或缺失,容貌常难以辨认。为了进行尸源的鉴定,DNA 的检测起着十分重要的作用。DNA 的短串联重复序列(short tandem repeats,STR)是由 2~6 个核心序列串联组成的重复区域。作为一种重要的遗传标记,其具有数量多、扩增片段小、灵敏度高特点,因而被广泛地应用于法医学个体的识别以及亲权的鉴定等领域中^[1]。

然而高温对于人体组织中 DNA 的保存有着很大的影响,温度越高,DNA 的完整性就越低^[2]。此外,从高温处置后的人体组织中提取 DNA 的过程十分繁琐且在过程中常伴随着 DNA 的丢失和外源性

DNA 的污染,进而影响 PCR 扩增和 DNA 分型的结果^[3]。因此,对于高温处置后人体组织的 DNA 提取一直是困扰法医工作者的难题之一。目前,常用的提取 DNA 的方法有苯酚-氯仿法、硅化滤膜、硅珠法、NaI 法以及 Chelex-100 法等。

本文通过运用不同浓度的 TritonX-100 处理高温后的人体组织样本,再用 Chelex-100 提取 DNA 的方法,以探讨高温处置后人体组织 DNA 的提取方法对 DNA-STR 分型的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

2011 年重庆医科大学法医学教研室受理的汽车燃烧案件中尸体高度炭化毁损,要求明确尸源的样本。在提取样本

作者介绍:朱 英,Email:267309559@qq.com,

研究方向:法医学证学,法医临床学。

通信作者:李永国,Email:liy6465@163.com。

时,最好是检验者亲自提取,并取远离炭化的组织。

1.2 仪器与主要试剂

9700 型 PCR 扩增仪(ABI 公司)、3130 基因分析仪(ABI 公司)、Chelex-100 树脂(Bio-keed 公司)、TritonX-100(sigma 公司)、QIA quick PCR 纯化试剂盒(QIAGEN 公司)、Gold-ene™20A(基点认知公司)。

1.3 方法

1.3.1 Chelex-100 法 取远离炭化的组织,大小约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm,大约 30 mg,置于 1.5 ml 离心管中,剪、磨碎,室温下用去离子水浸泡 1 h,振荡洗涤,收集沉淀物,反复 2 次。将沉淀物用 5% Chelex-100 200 μl 和蛋白酶 K(10 mg/ml) 10 μl 处理,于 56 °C 下放置 3 h,再于 100 °C 下振荡 8 min,并立即置于冰上冷即,130 000 r/min 离心 3 min,取中层备用。

1.3.2 TritonX-100+Chelex-100 法 分别取材 12 份(方法同 Chelex-100 法),置于不同 1.5 ml 离心管中,分为 2 组,第 1 组分别加入纯水、0.5%、1%、2%、5%、10% TritonX-100 各 100 μl;第 2 组分别加入纯水、0.5%、1%、2%、5%、10% TritonX-100 各 90 μl,再向每支离心管中各加入 10 μl 蛋白酶 K(表1)。56 °C 消化过夜;加入上述 12 支离心管中分别加入 5% Chelex-100 100 μl,再消化 2 h,振荡,100 °C 8 min,立刻置冰上冷即,130 000 r/min 离心 3 min,取中层用 QIA quick PCR 纯化试剂盒中 PBI 溶液与上层水相按体积比(5:1)混匀,过柱,加已配好无水乙醇 PE 洗涤液,洗涤离心 1 次,EB 洗液洗脱,4 °C 保存备用。

1.3.3 PCR 扩增及基因型检测

1.3.3.1 扩增 用 Gene Amp PCR System 9700 扩增仪,Gold-ene™20A 试剂盒检测系统复合扩增,扩增体积 25 μl。

1.3.3.2 扩增条件 95 °C 5 min+(94 °C 30 s+60 °C 1 min+72 °C 1 min) × 28 循环+60 °C 45 min+15 °C 99 min。

1.3.3.3 电泳 取 1 μl PCR 扩增产物(DNA)与 9 μl(8.6 μl 酰胺+0.4 μl ROX)混合后,用 ABI-3130 序列分析仪电泳分离,用 Gene mapper ID V3.2 基因分析软件进行基因分型。

2 结果

尸体样本直接用 5% Chelex-100 法、5% Chelex-100 + 蛋白酶 K 法提取组织 DNA,均不能得到有效的基因分型或不能检出 DNA 图谱(图 1)。

而使用不同浓度的 TritonX-100 混合 5% Chelex-100 提取组织 DNA,发现在 TritonX-100 的浓度为 0.5%、1%及 2% 时有基因分型的产生运用 1%的 TritonX-100 可检出 DNA 全部的基因座且基因座能较平衡的扩增(图 2);运用 0.5%和 2%的 TritonX-100 却只能检出部分 DNA-STR 图谱基因座且有大片段等位基因的缺失及等位基因扩增不平衡的现象发生(图 3)。然而运用 5%、10%的 TritonX-100 却不能得到有效的基因分型。此外,联合运用不同浓度的 TritonX-100 混合 5% Chelex-100 和蛋白酶 K 提取组织 DNA,扩增后也不能得到有效的基因分型(图 1)。

表 1 TritonX-100 提取 DNA 实验设计

Tab.1 Experimental design of DNA extraction with TritonX-100

TritonX-100 浓度	0%	0.5%	1%	2%	5%	10%
1组	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
2组	90 μl+10 μl 蛋白酶 K	90 μl+10 μl 蛋白酶 K	90 μl+10 μl 蛋白酶 K	90 μl+10 μl 蛋白酶 K	90 μl+10 μl 蛋白酶 K	90 μl+10 μl 蛋白酶 K

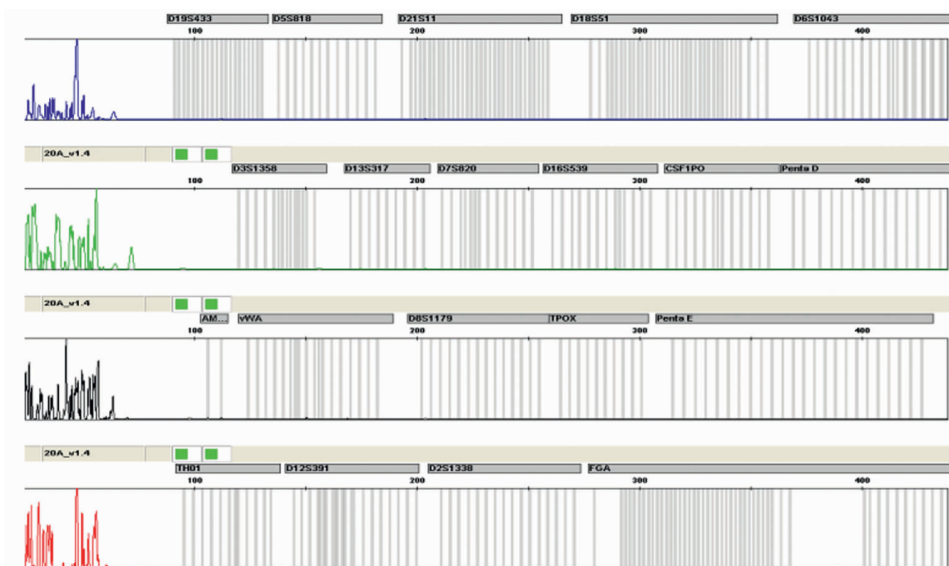


图 1 5% Chelex-100 法提取高温后组织 DNA 的扩增图谱

Fig.1 DNA amplification profile of tissue samples after high-temperature disposal extracted with 5% Chelex-100

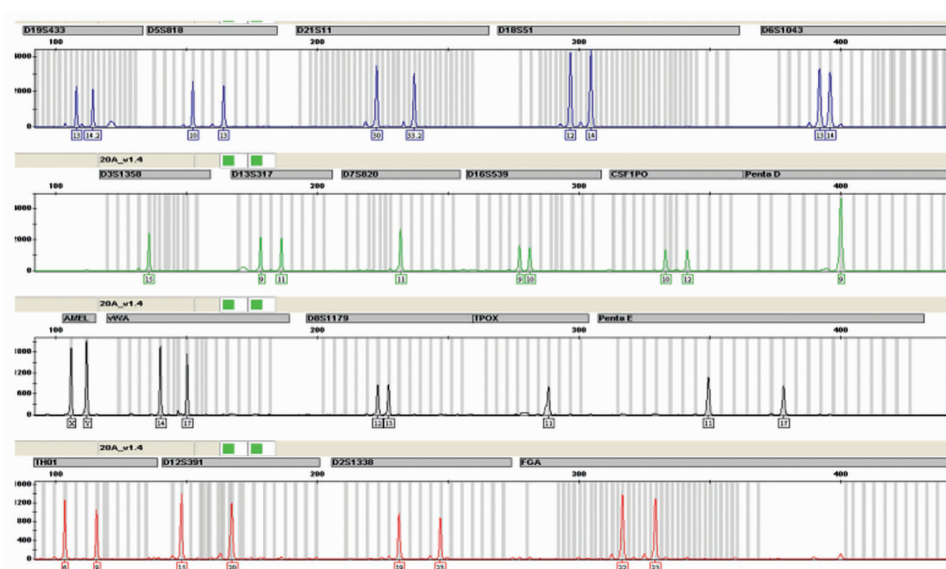


图 2 1%的 TritonX-100 提取高温后组织 DNA 的扩增图谱

Fig.2 DNA amplification profile of tissue samples after high-temperature disposal extracted with 1% TritonX-100

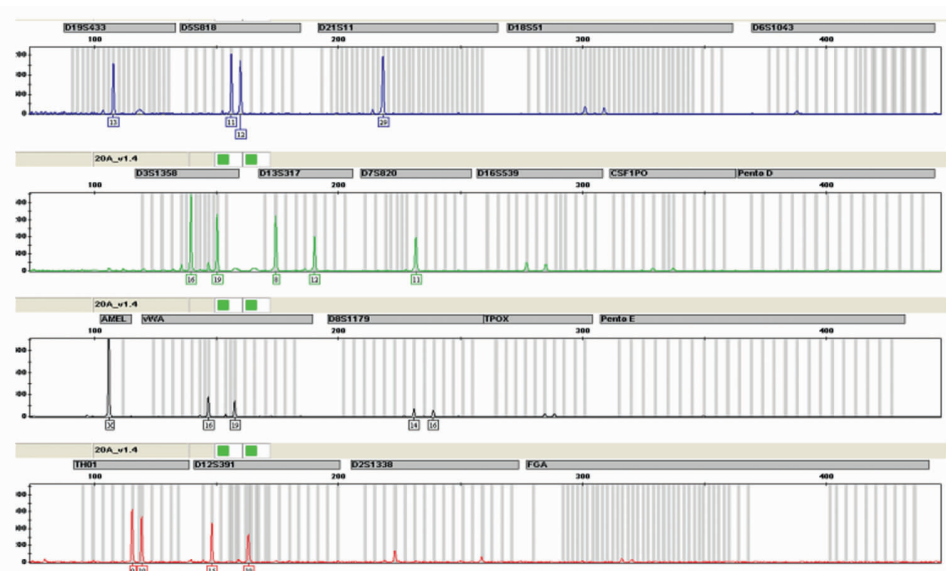


图 3 0.5%和 2%的 TritonX-100 提取高温后组织 DNA 的扩增图谱

Fig.3 DNA amplification profile of tissue samples after high-temperature disposal extracted with 0.5% and 2% TritonX-100

3 讨论

交通事故中汽车撞击后发生燃烧,尤其是汽油引起的燃烧,产生的温度可达数百度,甚至上千度,致使死者的皮肤炭化,凝固,尖端呈黑褐色且脆性增加或被完全烧毁。肌肉遇高热则发生凝固收缩,致使 DNA 变性和降解且汽油的燃烧会产生 PCR 抑制物,以上这些因素均加重了对焚烧尸体的 DNA 进行检验的难度。焚烧程度越重, DNA 降解也越严重,获得基因分型的成功率也就越低。尸体在焚烧过程中,随着水分的蒸发,由于受热作用先后顺序的不

同以及受热作用的时间差等因素的影响, DNA 降解程度也不相同,故本文提出应尽量提取远离炭化处的组织样本。

3.1 TritonX-100 作用机制

TritonX-100 又称为 TX-100,是一种强的非离子表现活性剂,分子量为 646.86,它能溶解脂质,低浓度 TritonX-100 可以增加对细胞膜的通透性,无变性作用,其疏水端能插入到膜脂内,将膜脂和膜蛋白分开来,其亲水端能与膜蛋白结合,从而使膜蛋白发生溶解且不对 PCR 产生抑制作用^[4];国外有学者应用 TritonX-100 进行一步法提取组织内的 DNA,使得操作步骤简单化且同时可以有效地降低

样本 DNA 的损失及外源性污染的产生^[5]。对于高温处置后的人体组织的 DNA 提取,很重要的一步在于如何消化已经严重变性的细胞膜及核膜蛋白,而由于 TritonX-100 可以达到较好地消化细胞体及蛋白质的目的^[6-7],这就为本研究组提供了一种很好的方法。

本文运用不同浓度的 TritonX-100 混合 5% 的 Chelex-100 提取高温处理后组织的 DNA,发现在 TritonX-100 的浓度为 0.5% 和 2% 时,虽然有基因分型的产生且能够获得部分 DNA 分型的结果,但却有大片段等位基因缺失以及等位基因扩增不平衡现象;而运用 1% 的 TritonX-100 则可检出 DNA 全部的基因座且基因座能较平衡的扩增;但当 TritonX-100 的浓度为 5% 和 10% 时,却又基本无法获得 DNA 图谱。由此本研究组可以推测 TritonX-100 在对增加细胞膜的通透性和对 PCR 扩增的抑制作用上可能存在着一个动态平衡。

3.2 提取方法比较

Chelex-100 是一种离子螯合剂,由苯乙烯和苯二乙烯组成。其悬液在碱性环境条件下,可导致细胞核膜的破裂和 DNA 的变性并释放出 DNA。此外, Chelex-100 还能与金属离子结合,阻止其对 DNA 的降解作用, Chelex-100 法常用于提取血液、血痕、唾液棉签、新鲜组织中的 DNA。而该法最大的缺点在于其获得的模板片段的纯度并不高^[8]。蛋白酶 K 是一种高活性蛋白酶,具有降解天然蛋白质的能力,亦常用于新鲜组织的 DNA 提取。

高温处理后的尸体组织,由于水份减少,细胞核发生凝固变性, DNA 的降解十分严重。运用 Chelex-100 法和蛋白酶 K 法提取该类组织的 DNA,所能获得的 DNA 模板片段较小且含有较多的杂质,这对于 STR 基因座的检测具有重要的影响,故不能获得 DNA 的分型结果,如图 1 所示,但其具体机制仍需进一步的研究证实。

而由于 TritonX-100 能够溶解脂质,增加细胞膜的通透性。故其与 Chelex-100 联合运用,能够获得更大且纯度更高的 DNA 模版片段,进而满足法医物证对于高温处理后组织 DNA 分型的鉴定要求。然而将 TritonX-100 与 Chelex-100 以及蛋白酶 K 联合运用提取高温处理后组织的 DNA,却无法获得 DNA 分型的结果。本研究组推测出现这种情况的原因可能是 TritonX-100 与蛋白酶 K 产生了相互作用,从而对 PCR 的扩增具有抑制作用,但其最终原因仍有待于进一步实验研究证实^[9]。

综上所述,本文应用 1% TritonX-100+5% Chelex-100 提取 DNA,再经 QIA quick PCR 纯化试剂盒纯

化,能够得到非常好的 DNA 模板片段,并且操作步骤简单,同时可以有效地降低样本的 DNA 的损失和外源性污染的产生。故该法特别适合于焚烧案件中身源的确认。

参 考 文 献

- [1] Edwards A, Civitello A, Hammond H A, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats[J]. Am J Hum Genet, 1991, 49(4): 746-756.
- [2] 徐国昌, 侯续伟, 任 甫, 等. 不同温度焚烧对成人股骨 16 个基因位点的影响[J]. 解剖学杂志, 2008, 31(3): 406-408.
- Xu G C, Hou X W, Ren F, et al. Diversity of 16 genetic locus in adult femoral bone incinerated at different temperatures[J]. Chinese Journal of Anatomy, 2008, 31(3): 406-408.
- [3] 袁 丽, 赵兴春, 张志强, 等. 用 CTAB+磁珠法提取火烧骨 DNA 的研究[J]. 中国人民公安大学学报(自然科学版), 2003, 4: 28-31.
- Yuan L, Zhao X C, Zhang Z Q, et al. Research on extracting the DNA of burned bone with the combination use of CTAB and beads[J]. Journal of Chinese People's Public Security University(Science and Technology), 2003, 4: 28-31.
- [4] 王克学, 张镜方, 詹秋鹏, 等. 胰蛋白酶法和 Triton-X 100 法去除瓣膜细胞的效果比较[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(1): 22-24.
- Wang K X, Zhang J F, Zhan Q P, et al. Effect of trypsin and Triton-X 100 for decellularization of porcine aortic heart valves[J]. J First Mil Med Univ, 2005, 25(1): 22-24.
- [5] Vock E H, Lutz W K, Holmes P, et al. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100, and gamma-irradiation[J]. Mutat Res, 1998, 413(1): 83-94.
- [6] 李永明, 宋朝君, 张 葵, 等. Triton X-100 洗涤剂对抗原包被效率的影响及其对策[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(3): 308-309.
- Li Y M, Song C J, Zhang K, et al. The effect of Triton X-100 detergent on the antigen-coating efficiency and its countermeasures[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2008, 24(3): 308-309.
- [7] 邓春富, 周 青, 谭学新, 等. 不同浓度曲拉通 X-100 对制备颌下腺脱细胞基质的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(4): 424-425.
- Deng C F, Zhou Q, Tan X X, et al. Effect of TritonX-100 in different density on preparing submandibular gland acellular matrix[J]. Chin J Exp Surg, 2005, 22(4): 424-425.
- [8] 周月琴, 朱 伟, 刘志萍, 等. 用 Chelex-100 快速提取微量血痕中的 DNA[J]. 复旦学报(医学版), 2003, 30(4): 379-380.
- Zhou Y Q, Zhu W, Liu Z P, et al. A quick method of extraction of DNA by Chelex-100 from trace bloodstains[J]. Fudan Univ J Med Sci, 2003, 30(4): 379-380.
- [9] 贾 怡, 周 斌, 吕梅励, 等. Triton X-100 快速提取甲醛固定、石蜡包埋组织内 DNA 的方法[J]. 刑事技术, 2003, 6: 6-8.
- Jia Y, Zhou B, Lv M L, et al. A rapid method of DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues by using Triton X-100[J]. Criminal Technology, 2003, 6: 6-8.

(责任编辑:关蕴良)