

临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000649

改良酚-氯仿法提取及不同试剂盒扩增 检测陈旧性人骨 DNA

张 玥¹,徐国昌²,徐 凯³,王友政¹,任 甫⁴,李红卫¹(1. 重庆市公安局刑警总队,重庆 400021;2. 南阳理工学院生物人类学研究所,南阳 473004;
3. 河南省检察院,郑州 452000;4. 辽宁医学院生物人类学研究所,锦州 121000)

【摘要】目的:探讨改良酚-氯仿法提取及不同试剂盒扩增对陈旧性人骨 DNA 检测的效果。**方法:**用传统和改良的酚-氯仿法对 30 例陈旧性人骨进行 DNA 提取,用 Identifiler-plus 试剂盒、Minifiler 试剂盒和 Godeneye™ 20A 试剂盒行荧光标记和复合扩增,Genetic Analyzer 软件对基因位点进行检测和分析。**结果:**改良酚-氯仿法提取及 3 种试剂盒对陈旧性人骨 DNA 基因位点检出 469、262、588 个,高于传统法的 307、175、436 个。**结论:**改良酚-氯仿法、3 种试剂盒 PCR 复合扩增能对陈旧性人骨 DNA 进行有效提取和检测。

【关键词】DNA 检验;酚-氯仿法;复合扩增;陈旧性骨**【中图分类号】**R89;DF795.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-10-18

Modified phenol-chloroform method and amplification with different kits in human obsolete bone

Zhang Yue¹, Xu Guochang², Xu Kai³, Wang Youzheng¹, Ren Fu⁴, Li Hongwei¹

(1. Chongqing Public Security Bureau Interpol Corps; 2. Institute of Anthropology, Nanyang Institute of Technology; 3. Henan Provincial Procuratorate; 4. Institute of Anthropology, Liaoning Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the detection results of DNA in human obsolete bone extracted by modified phenol-chloroform method and amplified with different kits. **Methods:** DNA in 30 femoral bones were extracted by modified phenol-chloroform method, fluorescent label and multiplex amplification with identifiler-plus kit, minifiler kit and godeneye™ 20A kit, while the gene loci was detected and analyzed by genetic analyzer software. **Results:** The DNA gene loci in human obsolete bone were 469, 262, 588 respectively, which were higher than those of 307, 175, 436 by traditional method. **Conclusion:** DNA in human obsolete bone might be extracted and detected effectively by modified phenol chloroform method and multiplex amplification with 3 kits.

【Key words】DNA detection; phenol-chloroform method; multiplex amplification; obsolete bone

用于混合、微量、降解等疑难生物样本的检验技术是近年来法医遗传学领域研究热点^[1-2]。陈旧性骨骼是一类特殊的生物检材,由于有硬组织的支撑与保护,相对于其他组织脏器腐败降解的慢。但陈旧尸骨骨组织中 DNA 含量少且高度降解,且周围环

境的温度的高低、湿度的湿润与干燥、酸碱度的强弱及微生物的各种代谢活动的影响,陈旧骨 DNA 的检出率受多种因素的影响,时间越长、污染越重、湿度越大, DNA 检出成功率越低,组织 DNA 片断大部分降解破坏,使原有的 STR 基因座应用现有大片试剂盒无法检出,失去了陈旧骨检材的应用价值。给提取 DNA 带来很大难度。在近年来的法医实践研究中,对于陈旧性人骨 DNA 的检验,学者们一直没有停止过^[3-5]。由于陈旧性骨骼的高度钙化等特殊组织结构及环境因素的影响,使得对骨骼的酶解消化也相当困难,致使提取纯化的骨骼 DNA 的难度加大,检验较困难。本文运用改良的酚-氯仿法,用 3

作者介绍:张 玥, Email: 510199721@qq.com,

研究方向:法医物证学研究。

通信作者:徐国昌, Email: xuguoch@163.com。

基金项目:河南省科技厅基础与前沿技术研究资助项目(编号:132300410088);辽宁省百千万人才工程培养经费资助项目(编号:2010921042)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150519.2159.018.html>
(2015-05-19)

种不同的试剂盒提取陈旧性人骨骼 DNA,取得了满意的效果。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料、仪器、试剂(盒)、分析软件

陈旧性人骨骼样本。生物冷冻研磨器。Amp FISTR I-identifiler-plus 试剂盒、Minifiler 试剂盒、Godeneye™ 20A 试剂盒、Gene Amp PCR System 9700、3130xl Genetic Analyzer、Data Collection IDv 2.0 软件、Gene Mapper IDv 3.2 软件,试剂(盒)及软件均来自 ABI 公司。

1.2 样本采集及处理

陈旧性人骨 30 份,来源于日常检案中,其中自然地理环境中浸泡尸骨 10 例,自然地理环境土埋尸骨 20 例。时间为 1~10 年,均选取遗留股骨为样本。

清除表面污垢,紫外光照射 2 h,用电钻分别低速钻取每块骨骨密质分装标记,机械粉碎后置于生物冷冻研磨机内,液氮下预冷 10 min,磁性振荡研磨 2 次,每次 8 min。

1.3 样品 DNA 的提取、纯化

传统的酚-氯仿法进行 DNA 提取步骤见文献^[6],改良的酚-氯仿法进行 DNA 提取步骤如下:(1)分析天平取骨粉 2.00 g 置于试管中,EDTA 12 ml 室温或水浴脱钙,每 8h 离心换脱钙液,换脱钙液 4 次,11 000 r/min 离心 5 min,留取沉淀物。(2)饱和酚液中加入三氯甲烷与异戊醇的混液,两者体积比为 4.5:1,三氯甲烷与异戊醇的体积比为 24:1。上述沉淀物加入混液后离心。(3)正丁醇 600 μ l,混匀,离心后弃上液。乙醚 600 μ l,混匀,离心后弃上液,置于 50 $^{\circ}$ C 水浴 15 min。(4)Buffer PB 5 ml,RNA 1 μ l,冷冻离心后取上液,通过硅膜管,每次约 700 μ l,离心 4 次,每次均弃下液。PB 700 μ l 再洗 1 次;PE 洗液 700 μ l,混匀,离心 3 次,离心 8 000 r/min,8 min;52 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。EB30 μ l,加入管底中央区,52 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,冷冻离心 13 000 r/min,8 min。

1.4 PCR 复合扩增

1.4.1 Identifiler-plus 试剂盒 反应体系 10 μ l,引物 2 μ l,Buffer 4 μ l,模板 1 μ l,加 H₂O 至总体积为 10 μ l。反应参数:95 $^{\circ}$ C,11 min;94 $^{\circ}$ C,20 s;59 $^{\circ}$ C,3 min;60 $^{\circ}$ C 10 min;变性、退火、延伸共 28 个循环。

1.4.2 Minifiler 试剂盒 反应体系 10 μ l,引物 2 μ l,Buffer 4 μ l,Taq 酶 0.2 μ l,模板 1 μ l,加 H₂O 至总体积为 10 μ l。反应参数:95 $^{\circ}$ C 11 min,94 $^{\circ}$ C 20 s,59 $^{\circ}$ C 2 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,28 个循环,60 $^{\circ}$ C 45 min。

1.4.3 Godeneye™ 20A 试剂盒 反应体系 10 μ l,引物 2 μ l,Buffer 5 μ l,Taq 酶 0.2 μ l,模板 1 μ l,加 H₂O 至总体积为 10 μ l。反应参数:95 $^{\circ}$ C 11 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,70 $^{\circ}$ C 1 min,28 个循环,60 $^{\circ}$ C 45 min。

1.5 扩增产物的检测

PCR 扩增产物用 ABI 3130xl 基因分析仪进行毛细管电泳,用 Gene Mapper ID v3.2 软件分析 STR 基因型。同一样本均设 Allelic Ladder、空白阴性和阳性对照。

2 结果

样本经 Data collection 3.0、Gene Mapper 3.2^[7]软件进行数据提取和分析,结果显示,用改良的酚-氯仿法对陈旧性人骨进行提取相比传统的酚-氯仿法提取率显著提高。

2.1 不同试剂盒检出位点检测结果

各样本经 Data collection v3.0、Gene Mapper IDv 3.2 软件进行数据提取和分析,相对荧光单位(RFU)值在 200 以上为检出,低于 75 为未检出,75~200 为可疑检出;出现纯合子或杂合子均归为检出。改良法及传统法提取后,分别用 3 种试剂盒扩增后各基因位点检出情况见表 1。由表 1 可见,改良法 Identifiler-plus、Minifiler、Goldeneye 位点检出率分别为 97.71%、97.01%、98.00%,高于传统法的 63.96%、64.81%、72.67%,两者差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 2 种方法及 3 种试剂盒扩增检测陈旧性人骨基因位点(个)

Tab.1 Gene loci in human obsolete bone extracted by two methods and amplified with different kits(cases)

基因位点	传统酚-氯仿法	改良的酚-氯仿法	传统酚-氯仿法	改良的酚-氯仿法	传统酚-氯仿法	改良的酚-氯仿法
FGA	20	30	25	30	23	30
D7S820	18	30	20	29	26	30
CSF1PO	15	28	18	29	22	29
D13S317	16	29	15	29	20	29
D16S539	18	29	18	30	24	30
D2S1338	20	30	19	28	22	29
D18S51	18	28	25	28	19	28
AMEL	18	30	20	30	22	30
D21S11	20	29	15	29	20	29
D19S433	20	30			23	30
D5S818	24	29			24	30
vWA	20	30			25	30
TPOX	18	29			19	29
D3S1358	22	30			20	30
TH01	20	28			22	28
D8S1179	20	30			23	30
D6S1043					21	29
Penta D					22	30
Penta E					19	30
D12S391					20	28
总例数	307	469	175	262	436	588
检出率(%)	63.96	97.71	64.81	97.01	72.67	98.00

2.2 2 种酚-氯仿法提取及 Identifiler-plus 试剂盒、Minifiler 试剂盒、Godeneye™ 20A 试剂盒扩增

用 3 种不同试剂盒扩增后基因位点检测陈旧性人骨结果见图 1~6。

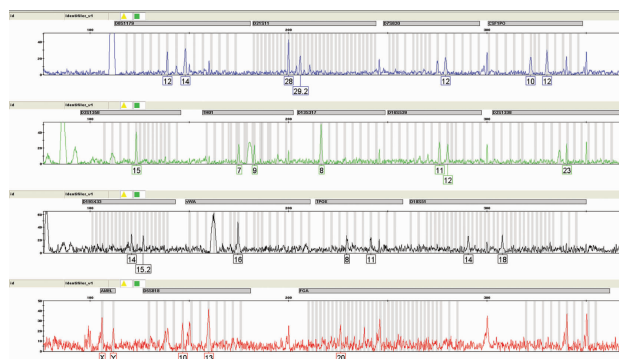


图 1 传统酚-氯仿法提取及 Identifiler-plus 试剂盒基因位点检测陈旧骨

Fig.1 DNA genetic locus of obsolete bone using traditional phenol-chloroform and identifiler-plus kit

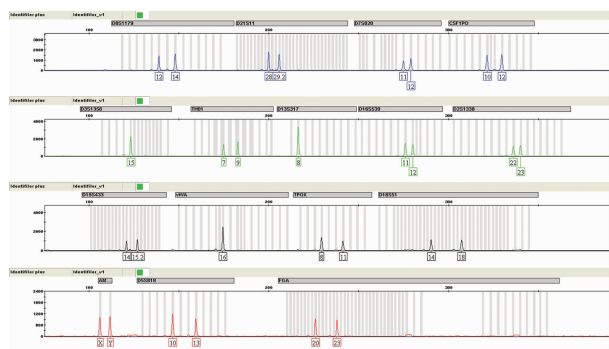


图 2 改良酚-氯仿法提取及 Identifiler-plus 试剂盒基因位点检测陈旧骨

Fig.2 DNA genetic locus of obsolete bone using improved phenol-chloroform and identifiler-plus kit

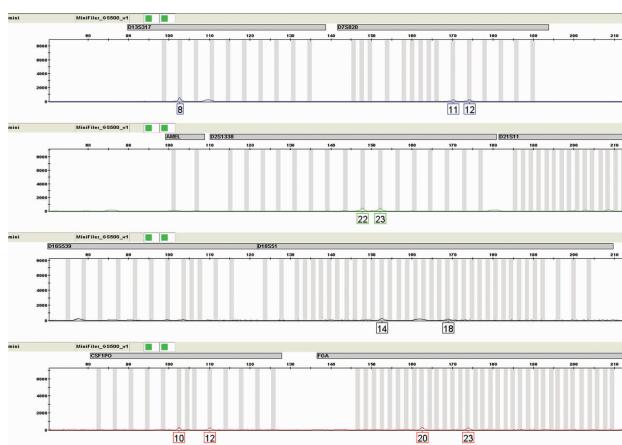


图 3 传统酚-氯仿法提取及 Minifiler 试剂盒基因位点检测陈旧骨

Fig.3 DNA genetic locus of obsolete bone using traditional phenol-chloroform and minifiler kit

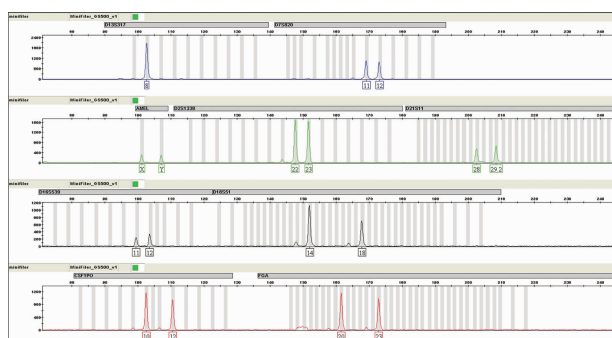


图 4 改良酚-氯仿法提取及 Minifiler 试剂盒基因位点检测陈旧骨

Fig.4 DNA genetic locus of obsolete bone using improved phenol-chloroform and minifiler kit

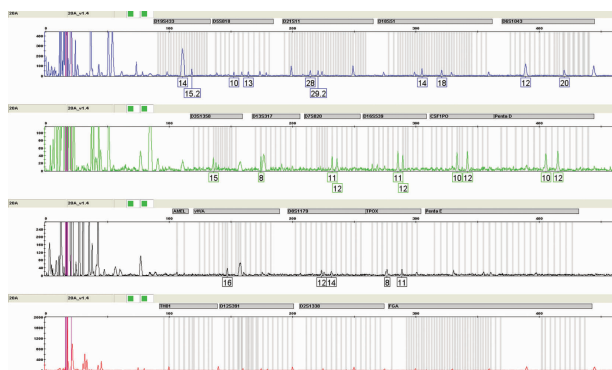


图 5 传统酚-氯仿法提取及 Godeneye™ 20A 试剂盒基因位点检测陈旧骨

Fig.5 DNA genetic locus of obsolete bone using traditional phenol-chloroform and Godeneye™ 20A kit

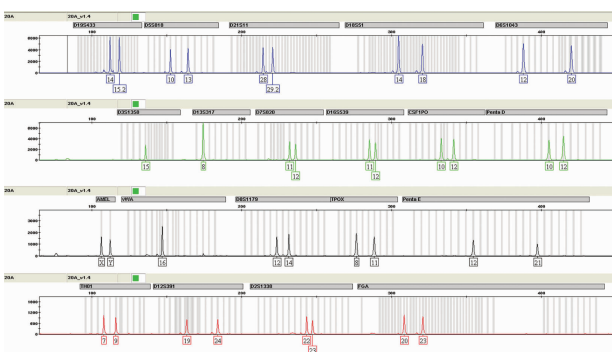


图 6 改良酚-氯仿法提取及 Godeneye™ 20A 试剂盒基因位点检测陈旧骨

Fig.6 DNA genetic locus of obsolete bone using improved phenol-chloroform and Godeneye™ 20A kit

3 讨论

骨骼 DNA 主要来源于骨细胞、成骨细胞和破骨细胞 3 种细胞。骨骼属于硬组织,其自身组织结构具有良好的抗腐败作用,能够保护内部 DNA 结构,减缓 DNA 降解和污染,即使软组织检材完全腐败后,骨组织仍能够作为 DNA 检验的重要材料,因而

成为诸多案件的首选检材。

陈旧性骨骼 DNA 中,PCR 抑制物较多,且不可能除尽,PCR 结果主要取决于提取的 DNA 的质量^[9],而与提取到的 DNA 数量无相关,有时 DNA 含量大的样品,PCR 反而不成功。本研究采用改良的酚-氯仿法不仅在低温下极好地维护了 DNA 分子结构,而且优化了纯化 DNA 的步骤,得到了满意的结果。

Craintic 等^[9]等研究认为,脱钙的好坏对骨骼 DNA 分析影响很大,不脱钙,直接消化效果不好。严重降解的 DNA 碎片,影响模板 DNA 的质量,不利于 STR 分型。建立在前期对烧骨 DNA 检验工作基础^[10]之上,本研究中应用低温液氮下研磨及 EDTA 多次恒温震荡脱钙,效果优于传统提取法。由于 EDTA 的物理化学性质较为稳定,更大量的溶液能充分接触样本,12 ml 的量远高于传统法的 5 ml。在纯化步骤,Microcon100 DNA 纯化柱的核苷酸截留值,单链 DNA 为 300 bp 双链 DNA 为 125 bp,也是探索出的有益经验。

表 1 结果显示,提取后的 DNA 模板,分别用 Identifiler-plus 试剂盒、Minifiler 试剂盒和 Godeneye™ 20A 试剂盒进行荧光标记和复合扩增,对前期提取 DNA 进行检验,得到的结果均提示改良的酚-氯仿法优于传统酚-氯仿法。

Identifiler-plus 试剂盒中进行复合扩增的四核苷酸位点包括 CODIS 所必需的 13 个核心 STR 位点,即 CSF1PO、D5S818、D3S1358、D7S820、D8S1179、D13S317、D16S539、D18S51、D21S11、FGA、TH01、TPOX、和 vWA。

Minifiler 试剂盒采用 miniSTR 引物,选择 AmpF/STR Identifiler PCR 扩增试剂盒中 8 个大片段的基因座(D13S317、D7S820、D2S1338、D21S11、D16S539、D18S51、CSF1PO 和 FGA),以及性别基因 Amelogenin 进行扩增。该试剂盒使用专门的缓冲体系和经过优化的热循环参数,并采用成熟的五色荧光技术,能最大限度的克服法医样本中常见的抑制物。另外具有分辨率高,能够补充使用 AmpF STR Identifiler、Profiler Plus、Profiler Plus ID、Cofiler、Sefiler 和 SGM Plus PCR 试剂盒扩增所丢失的信息。本实验结果也提示,该试剂盒作为一个完整法医检测体系的一部分,结合使用可信赖的仪器、试剂及软件,可为疑难样本的 STR 扩增提供最佳结果。一般情况下,仅利用组织形态学观察进行骨骼的种属、年龄与性别判定是不准确的,而利用分子生物学技术,对现场检材与比对样本的基因型比对,则可使个人识别率大大增加。尽可能地利用基因位点来判定已成为个人识别的主流发展方向,尤其是应用 miniSTR 基

因座进行陈旧骨个体识别将是未来的发展趋势。miniSTR 技术设计的引物更靠近核心重复序列,产生的 STR 等位基因片段长度更短,分型成功率获得很大提高。miniSTR 技术被证明是一种从微量以及降解检材中获得遗传信息的有效方法,在提高降解检材分型成功率方面具有明显优势,Hill 等^[11]选择 D3S3053 等 5 个 miniSTR 基因座研究其多态性,为陈旧骨等降解检材的个体识别提供一种新的方法。

Godeneye™ 20A 试剂盒为先前工作基础之上另加的试剂盒,此试剂盒在 Identifiler-plus 16 个位点基础之上又增加了 D6S1043、Penta D、D12S391、Penta E 四个位点。本研究在对 DNA 位点读取操作时,光谱校正时用 Q 值 > 0.97,16 根毛细管通过 13 根以上,如果未能达到此标准,则调整电泳参数,重新电泳,用 ABI 3130xl Genetic Analyzer 软件对 DNA 基因位点进行检测和分析。

以上 3 种试剂盒扩增、电泳结果显示,用改良的酚-氯仿法成功地对陈旧性人骨 DNA 进行了提取,对在以后的日常检案工作中,提供了强有力的理论依据。除了综合考虑湿度、微生物、pH 值等因素对骨骼的影响,还要依法医实践中实验条件及实验操作技术而定。

参 考 文 献

- [1] 党华伟,毛 炯,王 惠,等.疑难生物检材法医 DNA 检验的现状与进展[J].法医学杂志,2012,28(1):52-54.
- [2] 李彩霞,胡 兰.法医遗传学研究新进展[J].中国法医学杂志,2013,28(2):126-129.
- [3] 贾东涛,韩海军,张玉红,等.陈旧骨骼 DNA 提取方法的应用研究[J].中国法医学杂志,2007,22(4):260-261.
- [4] 吴元明,王国霞,李雪娇,等.46 年陈旧骨骼 DNA 检验 1 例[J].中国法医学杂志,2013,28(2):162-163.
- [5] 徐 凯,徐国昌,张 玥,等.改良酚/氯仿法结合 miniSTR 分型技术检验陈旧骨痕量 DNA[J].河南科技大学学报(医学版),2014,32(1):57-60.
- [6] 张 林.法医物证学实验指导[M].北京:人民卫生出版社,2008:103-104.
- [7] Gene Mapper ID v3.2 user's manual. Applied Biosystem, 2005.
- [8] Alvarez-Cubero MJ, Saiz M, Martinez-Gonzalez LJ, et al. Genetic identification of missing persons: DNA analysis of human remains and compromised samples[J]. Pathobiology, 2012, 79(5): 228-238.
- [9] Craintic K, Paraire F, Leterreus M, et al. Skeletal remains presumed submerged in water for three years identified using PCR STR analysis[J]. J Forensic Sci, 2002, 47(5): 1-3.
- [10] 徐国昌,任 甫,刘海东.烧骨 DNA 提取与检测技术的实验研究[J].中国临床解剖学杂志,2012,30(1):91-95.
- [11] Hiller JC, Thompson TJ, Evison MP, et al. Bone mineral change during experimental heating: an X-ray scattering investigation[J]. Biomaterials, 2003, 24(28): 5091-5097.

(责任编辑:冉明会)