

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001476

溺死相关硅藻 *rbcL* 基因检测技术研究彭帆¹, 刘超², 徐曲毅², 刘向东¹, 赵建², 刘宏²,李越², 胡孙林², 宋旭恒³, 李明³, 韩雅莉¹

(1. 广东工业大学轻工化工学院生物工程系, 广州 510006; 2. 广州市刑事科学技术研究所、公安部法医病理学重点实验室, 广州 510000; 3. 南方医科大学法医学院, 广州 510515)

【摘要】目的:筛选硅藻叶绿体核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶大亚基(large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase, *rbcL*)基因的特异性引物,建立溺死尸体组织内硅藻 *rbcL* 基因的聚合酶链式反应-毛细管电泳(polymerase chain reaction-capillary electrophoresis, PCR-CE)检测方法,探讨在溺死诊断中的应用价值。**方法:**采用荧光标记引物扩增硅藻 *rbcL* 基因,对 21 种标准藻株、5 种浮游水生标准菌株、3 种人体共生标准菌株和人类 DNA 扩增产物进行 PCR-CE 检测,验证引物特异性和灵敏度。检测溺死尸体组织样本中硅藻,并对比微波消解-真空抽滤-自动扫描电镜法(microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy, MD-VF-Auto SEM)检测结果。**结果:**使用引物 ND-*rbcL* 对 21 种标准藻株、5 种浮游水生标准菌株、3 种人体共生标准菌株和人类 DNA 进行扩增,其中舟形藻、菱形藻、小环藻、变异直链藻、针杆藻和骨条藻 6 种硅藻的 CE 检测结果为阳性, DNA 片段为 197 bp, 其他为阴性。6 种硅藻 DNA 检测阳性的灵敏度分别为 0.502、0.117、0.029、0.042、0.275 和 0.215 ng (20 μ L 扩增体系)。PCR-CE 方法检测 35 例尸体(3 例陆地正常死亡尸体, 2 例水中发现非溺死尸体, 30 例溺死尸体)的组织样本, 肺脏、肝脏和肾脏硅藻检出率分别为 100%、63.3% 和 53.3%, 检测总阳性率为 83.3%。当溺水死亡尸体脏器组织内硅藻含量 >10 个/10 g 时, 使用 MD-VF-Auto SEM 方法检测, 其检测总阳性率为 100%, PCR-CE 方法检测, 其检测总阳性率为 92.6%, 两者对检测溺死尸体脏器中硅藻阳性率无统计学差异($\chi^2=2.077, P=0.491$); 当硅藻含量 <10 个/10 g 时, PCR-CE 方法检测为阴性, 与 MD-VF-Auto SEM 方法检测溺死尸体各种脏器中硅藻阳性率具有统计学差异($P<0.05$)。**结论:**基于 ND-*rbcL* 引物建立的 PCR-CE 法能快速检测硅藻 *rbcL* 基因, 所需检材量小, 易于推广, 在溺死诊断中有较好地应用前景。

【关键词】法医病理学; 溺死; 硅藻; 聚合酶链式反应-毛细管电泳**【中图分类号】**R89**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-06-14A study on detection of *rbcL* gene for diatoms involved in drowningPeng Fan¹, Liu Chao², Xu Quyi², Liu Xiangdong¹, Zhao Jian², Liu Hong²,Li Yue², Hu Sunlin², Song Xuheng³, Li Ming³, Han Yali¹

(1. Bioengineering Department, College of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology; 2. Guangzhou Forensic Science Institute/Key Laboratory of Forensic Pathology of Ministry of Public Security; 3. School of Forensic Science, Southern Medical University)

【Abstract】Objective: To establish the PCR method with capillary electrophoresis (PCR-CE) for the detection of *rbcL* gene of diatoms involved in drowning based on the specific primers for diatoms *rbcL* gene. **Methods:** With 29 microbes probably involved with drowning, a PCR-CE detection system with the primer for diatom *rbcL* gene labelled with fluorescent was established to verify the specificity and stability. The effectiveness of the PCR-CE method for the diatoms *rbcL* gene detection in corpses samples was evaluated by comparing the results of MD-VF-Auto SEM. **Results:** Positive results (size=197 bp) were achieved with 6 diatoms species (*Navicula sp.*, *Nitzschia sp.*, *Cyclotella sp.*, *Melosira varians*, *Synedra radians*, *Skeletonema*) by the PCR-CE method, by contrast with negative outcomes for other species. The sensitivity of the above 6 species of diatoms DNA were 0.502, 0.117, 0.029, 0.042, 0.275, 0.215 ng, respectively (20 μ L PCR system). 35 cases of corpses (3 corpses land deaths, 2 waterborne corpse cases of non-drowning, 30 drowning cases) were detected, the detection rate of diatoms in the lungs, liver and kidney of the corpses was 100%, 63.3% and 53.3%, respectively. The total positive rate was 83.3%. When the diatom content >10/10 g, the total positive rate was 100% by MD-VF-Auto SEM method. The total positive rate was and 92.6% by PCR-CE, there was no statistical difference ($\chi^2=2.077, P=0.491$), otherwise,

作者介绍: 彭帆, Email: 460230921@qq.com,

研究方向: 溺死相关浮游生物 DNA 检测。

通信作者: 韩雅莉, Email: yllan57@126.com。

基金项目: 公安部科技强警基础工作专项资助项目 (编号: 2017GAB-JC07); 公安部计划研究资助项目 (编号: 2015JSYJA03);

广东省省级科技计划资助项目 (编号: 2015A020217001);

大学生创新训练资助项目 (编号: 21712121302)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180109.0958.018.html>

(2018-01-09)

there was statistical difference ($P<0.05$). **Conclusion:** Because of less sample consumption, the PCR-CE method based on the ND-*rbcL* primer has a good prospect in forensic application for diatom detection, and leads to easy popularization in drowning diagnosis.**【Key words】**forensic pathology; drowning; diatoms; polymerase chain reaction-capillary electrophoresis (PCR-CE)

硅藻检验是法医学实验室诊断溺死的金标准,但传统硅藻检验方法存在检出率低、检材量要求大、检验过程次生产物污染环境、对人体有害等不足^[1]。微波消解-真空抽滤-自动电镜扫描法(*microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy*, MD-VF-Auto SEM)改进提升了脏器硅藻检出率^[2],但该方法对设备及操作者要求较高,不易在基层推广。

采用分子生物学方法检测浮游生物特异性 DNA 片段推断溺死的研究近年已有不少报道。如用蓝细菌和硅藻 DNA 特异性引物 PCR 检测尸体中藻类的灵敏性提高^[3]。采用 PCR-DHPLC 法检测硅藻特异的核糖体小亚基(ribosomal small subunit, SSU)基因,也具有较高的灵敏度和特异性^[4]。PCR-CE 法扩增检测蓝藻、硅藻及绿藻 16S rDNA 基因片段,对生前入水死亡者肺脏中藻类检出率高达 100%^[5]。多重 TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 扩增检测淡水细菌(嗜水气单胞菌及杀鲑气单胞菌),为诊断溺死提供了一种快速、便捷和高通量的方法^[6]。但这些方法目前仍未很好地用于法医实践。

rbcL 基因是植物叶绿体进行光合作用的关键基因片段,长度约 1 400 bp,目前 *rbcL* 基因序列的信息比较清楚,已被广泛用于植物和藻类的分类研究^[7]。本研究基于硅藻 *rbcL* 基因的特异性引物,建立检测溺死尸体组织样本中硅藻 *rbcL* 特异性基因片段的 PCR-CE 方法,扩增已知浮游藻及相关菌,观察其引物特异性,并通过比对 MD-VF-Auto SEM 法检测结果,探讨该方法在溺死诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Veriti™ 96 孔热循环仪、3 130 xl 毛细管电泳仪及 Qubit 荧光定量仪均为 Thermo Fisher Scientific。

PowerSoil™ DNA Isolation Kit 试剂盒(MO BIO),蛋白酶 K (Qiagen),二硫苏糖醇 DTT(Promega),Premix Taq 酶(Takara),甲酰胺(Thermo Fisher Scientific),CC5ILS500(Thermo Fisher Scientific),超纯水,POP4 胶(Thermo Fisher Scientific),EDTA (solarbio),Qubit dsDNA HS Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)。

1.2 样本

1.2.1 标准株 溺死相关的 21 种标准藻株:斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)、镰形纤维藻(*Ankistrodesmus falcatus*)、蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、念珠藻(*Nostoc*)、单歧藻(*Tolypothrix*)、柔细束丝

藻(*Aphanizomenon gracile*)、鱼腥藻(*Anabaena sp.*)、产毒微囊藻(*Toxic microcystis*)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、变异直链藻(*Melosira varians*)、小环藻(*Cyclotella sp.*)、舟形藻(*Navicula sp.*)、菱形藻(*Nitzschia sp.*)和针杆藻(*Synedra radians*)的标准藻株购自中国科学院水生生物研究所;衣藻(*Chlamydomonas*)、土壤藻(*Soil algae*)、四列藻(*Tetraselmis tetrathele*)、骨条藻(*Skeletonema*)、脆杆藻(*Fragilaria sp.*)和假鱼腥藻(*Pseudanabaena sp.*)标准藻株购自暨南大学赤潮研究中心与水生生物研究所。5 种浮游水生标准菌株:嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)和鲑爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)标准菌株购自广东省微生物研究所。3 种人体共生标准菌株:白色念珠菌(*Candida albicans*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)标准菌株购自广东省微生物研究所。

1.2.2 尸体组织样本 选取经 MD-VF-Auto SEM 检测并确认死亡原因的 35 例案件尸体(3 例陆地正常死亡尸体,2 例水中发现非溺死尸体,30 例溺死尸体)肺脏、肝脏和肾脏组织样本作为 PCR-CE 法检测样本。除肺脏外,按至少在尸体的肝脏或肾脏任一组织中硅藻 *rbcL* 基因检测阳性,计算硅藻 *rbcL* 基因检验的总阳性率(%)。尸体组织样本由广州市刑事科学技术研究所提供,尸体背景信息见表 1。

1.3 藻类和细菌 DNA 提取

参照文献^[8]方法,组织样本约 0.5 g 剪碎,加入 600 μ L PowerBead Tubes 裂解液,再添加 10 μ L PK 和 10 μ L DTT,恒温混匀仪参数设置温度 56 $^{\circ}\text{C}$,转速 1 400 r/min,振荡 2 h 后取出再添加 10 μ L PK,10 μ L DTT,继续振荡 1 h;使用 Power Soil™ DNA Isolation Kit 试剂盒提取组织中藻类、21 种标准藻株、5 种浮游水生标准菌株及 3 种人体共生标准菌株 DNA。

1.4 PCR 扩增

正向引物 5'端添加 FAM 荧光,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 扩增总体积为 20 μ L,内含 10 μ L PremixTaq,上下游引物各 0.75 μ L(10 μ mol/L),7.5 μ L 超纯水,1 μ L 模板 DNA。

使用文献^[9]中引物 ND-*rbcL*,正向引物序列为 F:CTCA-ACCATTTCATGCG,反向引物序列为 R:CTGTGTAACCCAT-AAC。PCR 热循环参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$,延伸 7 min。

1.5 引物特异性与灵敏度实验

分别用引物 ND-*rbcL* 扩增样本采集中 21 种标准藻株、5 种浮游水生标准菌株、3 种人体共生标准菌株和人类的 DNA,验证引物特异性。阳性检测结果的标准株 DNA,用 Qubit 荧光定量仪对其进行定量后,以浓度梯度稀释,进行灵敏度实验。

Qubit 荧光定量仪定量方法:用 Qubit dsDNA HS Buffer 将 Qubit dsDNA HS Reagent 稀释 200 倍配成工作液待用,取 10 μ L 标准品加 190 μ L 工作液,取 5 μ L 阳性标准株 DNA 加 195 μ L 工作液,振荡 2~3 s 混匀,室温、避光孵育 2 min,上机检测。

表 1 尸体背景信息

Tab.1 Background information of the corpses

编号	性别	尸体发现地点	发现月份	死亡原因
1	男	室内	3月	自然死亡
2	女	室内	6月	自然死亡
3	男	室内	10月	自然死亡
4	男	渔场	6月	非溺死
5	女	河中	5月	非溺死
6	男	渔场	10月	溺死
7	女	河中	2月	溺死
8	男	河中	10月	溺死
9	女	水库	8月	溺死
10	男	河中	3月	溺死
11	男	黄河	7月	溺死
12	男	江边	2月	溺死
13	女	河道	5月	溺死
14	男	水渠	8月	溺死
15	男	河边	10月	溺死
16	男	水槽	9月	溺死
17	女	码头	5月	溺死
18	男	河中	7月	溺死
19	男	水渠	8月	溺死
20	女	河中	4月	溺死
21	男	水库	6月	溺死
22	女	水库	6月	溺死
23	女	江中	8月	溺死
24	女	水渠	7月	溺死
25	男	河中	6月	溺死
26	女	桥下	5月	溺死
27	男	水井	7月	溺死
28	女	河中	4月	溺死
29	男	河涌	3月	溺死
30	男	鱼塘	5月	溺死
31	女	河涌	3月	溺死
32	男	河中	8月	溺死
33	女	水渠	6月	溺死
34	男	码头	11月	溺死
35	女	河涌	7月	溺死

1.6 PCR 产物检测

取 1 μL PCR 产物, 1 μL CC5LIS500 内标, 10 μL 甲酰胺混合后, 作为上样样品, 进行毛细管电泳片段分析。

1.7 PCR 产物测序

选取 CE 检测为阳性的所有水中尸体肺脏、肝脏和肾脏样本的 PCR 扩增产物, 由上海生工生物工程技术有限公司测序, 结果与 NCBI 数据库比对。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件处理数据, MD-VF-Auto SEM 方法与 PCR-CE 方法比较采用卡方检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 引物扩增标准株的特异性与灵敏度

2.1.1 特异性实验结果 用 ND-*rbcL* 引物分别对样本采集的 21 种标准藻株、5 种浮游水生标准菌株、3 种人体共生标准菌株和人类 DNA 进行扩增, 结果见表 2。

表 2 21 种标准藻株、5 种浮游水生标准菌株、3 种人体共生标准菌株和人类 DNA 扩增产物的毛细管电泳检测结果

Tab.2 PCR products results of 21 standard algal strains, 5 standard aquatic bacteria strains, 3 standard human symbiotic bacteria strains and human genomic DNA detected by PCR-CE

编号	浮游生物标准株及人类 DNA	ND- <i>rbcL</i>	编号	浮游生物标准株及人类 DNA	ND- <i>rbcL</i>
1	斜生栅藻	-	16	衣藻	-
2	念珠藻	-	17	土壤藻	-
3	单歧藻	-	18	四列藻	-
4	镰形纤维藻	-	19	假鱼腥藻	-
5	柔细束丝藻	-	20	骨条藻	+
6	变异直链藻	+	21	脆杆藻	-
7	蛋白核小球藻	-	22	嗜水气单胞菌	-
8	普通小球藻	-	23	白色念珠菌	-
9	鱼腥藻	-	24	杀鲑气单胞菌	-
10	小环藻	+	25	维氏气单胞菌	-
11	舟形藻	+	26	温和气单胞菌	-
12	菱形藻	+	27	鲑爱德华菌	-
13	针杆藻	+	28	大肠杆菌	-
14	微囊藻(产毒)	-	29	长双歧杆菌	-
15	铜绿微囊藻(不产毒)	-	30	9947A	-

注: + 为阳性, - 为阴性; 9947A 为人类 DNA

由结果可见, 引物 ND-*rbcL* 只扩增 21 种标准藻株中的 6 种硅藻(菱形藻、舟形藻、小环藻、变异直链藻、针杆藻、骨条藻)。对其他藻种、5 种浮游水生标准菌株、3 种人体共生标准菌株和人类 DNA 扩增为阴性结果。CE 检测 PCR 扩增产物, 片段长度为 197 bp, 谱图如图 1 所示(以变异直链藻为例)。

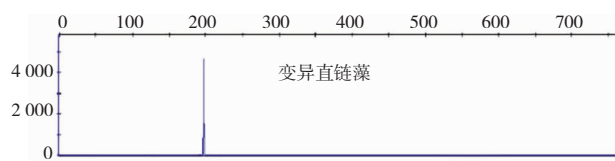


图 1 毛细管电泳检测峰谱图

Fig.1 Results of PCR-CE

2.1.2 引物扩增硅藻的灵敏度结果 舟形藻、菱形藻、小环藻、变异直链藻、针杆藻和骨条藻的藻株 DNA 模板以浓度梯度稀释后扩增, 对 ND-*rbcL* 引物进行灵敏度实验。用 Qubit 荧光定量仪对呈阳性结果模板 DNA 浓度进行定量。在 20 μL

扩增体系中,ND-*rbcL* 引物检测舟形藻、菱形藻、小环藻、变异直链藻、针杆藻和骨条藻呈阳性结果,其最低 DNA 模板量分别为 0.502、0.117、0.029、0.042、0.275 和 0.215 ng。

2.2 MD-VF-Auto SEM 和 PCR-CE 法检测尸体组织结果

MD-VF-Auto SEM 和 PCR-CE 法分别检测 35 例案件尸体肺、肝和肾脏样本,结果见表 3。

表 3 MD-VF-Auto SEM 和 PCR-CE 检测结果
Tab.3 The results of MD-VF-Auto SEM and PCR-CE

编号	MD-VF-Auto SEM 检测硅藻个数			PCR-CE检测阴阳性结果		
	肺脏	肝脏	肾脏	肺脏	肝脏	肾脏
1	0	0	0	-	-	-
2	0	0	0	-	-	-
3	0	0	0	-	-	-
4	5	0	0	-	-	-
5	0	0	0	-	-	-
6	98 541	192	15	+	+	+
7	25 541	215	4	+	+	-
8	60 435	17	12	+	+	-
9	1 166 278	354	118	+	+	+
10	143	8	24	+	-	+
11	8 857	19	24	+	+	+
12	140 981	5	17	+	-	-
13	38 686	4	19	+	-	+
14	634 628	18	26	+	+	+
15	508 433	16	13	+	+	-
16	124	6	43	+	-	+
17	10 652	13	3	+	+	-
18	12 443	19	7	+	+	-
19	28 502	15	4	+	+	-
20	65 687	4	19	+	-	+
21	70 938	37	53	+	+	+
22	35 038	14	17	+	-	+
23	3 892	5	3	+	-	-
24	17 505	79	15	+	+	+
25	1 087 572	298	242	+	+	+
26	19 132	7	13	+	-	+
27	4 012	9	3	+	-	-
28	34 126	42	23	+	+	+
29	16 332	17	15	+	+	+
30	26 094	215	4	+	+	-
31	313 527	263	155	+	+	+
32	12 725	22	13	+	+	-
33	12 654	24	7	+	+	-
34	8 842	3	4	+	-	-
35	7 619	11	5	+	-	-

注:MD-VF-Auto SEM 检测 2 g 肺、10 g 肝和 10 g 肾脏组织,表中为各 10 g 所含有的硅藻个数

编号 1、2 和 3 为陆地正常死亡尸体样本,肺、肝和肾脏中均未检出硅藻;编号 4 和 5 为死后入水尸体样本,编号 4 肺脏能检出硅藻,肝脏和肾脏均未检出硅藻,编号 5 肺、肝和肾脏中均未检测出硅藻;其他 30 例均为溺水死亡尸体样本。

引物 ND-*rbcL* 进行 PCR-CE 检测尸体肺、肝和肾脏硅藻检出率分别为 100%、63.3%和 53.3%,检测总阳性率为 83.3%;引物 ND-*rbcL* 进行 PCR-CE 检测后,30 例溺水死亡脏器样本当硅藻含量在>10 个/10 g 时,使用 MD-VF-Auto SEM 方法检测,其检测总阳性率为 100%,PCR-CE 方法检测,其检测总阳性率为 92.6%。

30 例溺死尸体样本由 MD-VF-Auto SEM 检测确认为溺死。溺水死亡脏器样本硅藻含量>10 个/10 g 有 27 例,其中 PCR-CE 检测阳性的有 25 例(表 4)。2 种方法检出阳性率比较采用交叉制表卡方分析。

表 4 MD-VF-Auto SEM 法和 PCR-CE 法
检测溺死阳性样本比较

Tab.4 Comparison between MD-VF-Auto SEM method and PCR-CE method in detecting drowning samples with

方法	阳性例数	阴性例数	合计
MD-VF-Auto SEM	27	0	27
PCR-CE	25	2	27
合计	52	2	54

基于引物 ND-*rbcL* 建立的 PCR-CE 方法与 MD-VF-Auto SEM 方法检验溺死尸体各种脏器中硅藻阳性率无统计学差异($\chi^2=2.077, P=0.491$),当硅藻含量<10 个/10 g 时,MD-VF-Auto SEM 方法仍能检出,而 PCR-CE 方法检测均为阴性,与 MD-VF-Auto SEM 方法检验溺死尸体各种脏器中硅藻阳性率具有统计学差异($P<0.05$)。

2.3 检测样本 PCR 产物测序结果

随机选取一个 CE 检测结果为阳性的样本(12 号肺脏样本),测序结果为:

ACCTACTACAGCACATTGCTTTAGCATACTCAGCACGT
TTGTATACTTCTCCATAGTAGCAGCTGTGATGTTTAAAGTAT
GAACCTTTAACTTCACCGGTTGCAGCGGATGCACGGTTAAT
ACCTTCTAAACAATTTAAGAAACGTTCTCTCCAACGCATAA
AGAATTGAGA。测序结果经 Blast 比对,与小环藻的叶绿体 *rbcL* 基因匹配度最高,与 Genbank 中 DQ514827.1、JF923132.1 等硅藻 *rbcL* 基因同源性达 96%。

3 讨 论

3.1 ND-*rbcL* 引物的特异性与灵敏度

使用 PCR 技术检测藻类特异性 DNA 片段为诊断溺死提供了快速、灵敏的方法。目前使用的基因中,细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因尽管种间差异明显,但在某些群体中很难获取和测序^[10]。UPA(universal plastid amplicon)基因变异度较低,难以区分亲缘关系较近的物种^[11]。关于硅藻叶绿体诊断溺死研究集中于叶绿素及相关基因,如分光光度计法检测内脏

组织浮游生物叶绿素 a 来鉴定溺死^[12];采用 PCR 法检测广泛分布于各种类型水体的叶绿素相关基因的表达产物 EG(*Euglena gracilis*)1、EG2 和 SK(*Skeletonema costatum*)1、SK2 来鉴定溺死尸体中的浮游生物^[13];有研究^[14]报道叶绿体 *rbcL* 基因可作为藻类的分子分类基因。本文选取叶绿体基因序列 *rbcL* 为目的基因,*rbcL* 基因内 1 297 bp 区域用于物种分析,在 SeqPup 0.6f 分类群中的基因序列容易对齐比较^[9]。

由表 2 可以看出,ND-*rbcL* 引物仅对常见硅藻中的菱形藻、舟形藻、小环藻、变异直链藻、针杆藻和骨条藻具有良好的特异性。引物扩增片段大小为 197 bp,片段长度小,即使是腐败检材,仍适用于硅藻检测。

该引物对常见硅藻的扩增灵敏度最低 DNA 模板量可达 0.029 ng。据 Abe 等^[12]研究,检测获得 10⁵ 个浮游生物可提取 0.7~1.5 μg 基因组 DNA,当浮游生物皆为灵敏度最高的小环藻时,在 5 个以上可检测为阳性结果。

3.2 ND-*rbcL* 引物对溺死鉴定的应用价值

MD-VF-Auto SEM 和 PCR-CE 法对尸体肺、肝和肾脏样本中硅藻的检测结果显示表 3,陆地正常死亡尸体样本未检测出硅藻,符合硅藻作为溺死检验的金标准;死后入水尸体样本,肺脏检出 5 个硅藻,可能由于外界水压使水进入肺中导致 MD-VF-Auto SEM 检测结果出现假阳性,而采用 PCR-CE 法检测为阴性。由于人体在溺水过程中,通过主动呼吸进入体内循环的硅藻等浮游生物会随血液循环到达相关脏器,PCR-CE 法检测的总阳性率为 83.3%。30 例溺水死亡脏器样本当硅藻含量在 >10 个/10 g 时,使用 MD-VF-Auto SEM 方法检测,其检测总阳性率为 100%,PCR-CE 方法检测,其检测总阳性率为 92.6%,两者检测溺死尸体各种脏器中硅藻的阳性率无统计学差异($P>0.05$)。但 MD-VF-Auto SEM 方法耗时 2 d,处理过程较繁琐,而 PCR-CE 法耗时较短,检材用量少,且可同时检测多个样本,目前国内法医物证实验室均有毛细管电泳等设备,易于推广。硅藻含量 <10 个/10 g 时,PCR-CE 方法检测为阴性,与 MD-VF-Auto SEM 方法检验溺死尸体各种脏器中硅藻阳性率具有统计学差异。因此,可在实际应用时,利用 PCR-CE 快速简便的优点,先行检测,短时间内获得检测结果,提高时效,检测为阴性的组织样本,再联用 MD-VF-Auto SEM 方法进行检测

诊断溺死。

综上所述,本研究基于硅藻 *rbcL* 基因的特异性引物所建立的 PCR-CE 法,灵敏度高,耗时较短,检材用量少,且可同时检测多个样本,易于在有毛细管电泳的法医物证实验室开展和推广,结合 MD-VF-Auto SEM 法联用,可增强溺死诊断的证据力,具有较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 胡孙林. 两种微束分析技术在法医学溺死诊断中的应用研究[D]. 广州:中山大学,2009.
- [2] Zhao J, Liu C, Hu SL, et al. Microwave digestion-vacuum filtration-automated scanning electron microscopy as a sensitive method for forensic diatom test[J]. Int J Legal Med, 2013, 127(2):459-463.
- [3] Rácz E, Könczöl F, Tóth D, et al. PCR-based identification of drowning: four case reports[J]. Int J Legal Med, 2016, 130(5):1303-1307.
- [4] 余政梁, 刘超, 胡孙林, 等. PCR-DHPLC 法检测硅藻 SSU 基因在溺死鉴定中的应用[J]. 中国法医学杂志, 2013, 28(6):457-460.
- [5] 李鹏, 徐曲毅, 陈玲, 等. 检测藻类 16S rDNA 特异性片段在溺死诊断中的应用[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(8):1215-1218.
- [6] Rütty GN, Bradley CJ, Biggs MJ, et al. Detection of bacterioplankton using PCR probes as a diagnostic indicator for drowning: the Leicester experience[J]. Leg Med(Tokyo), 2015, 17(5):401-408.
- [7] 茅云翔, 吴菲菲, 杜国英. 红藻 DNA 条形码分析技术研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(8):48-53.
- [8] Mai BS, Xu QY, Liu C, et al. Diagnosis of drowning by detecting *gyrB* and 16S rRNA genes of *Aeromonas hydrophila* using PCR-capillary electrophoresis[J]. Journal of Southern Medical University, 2016, 36(11):1550-1554.
- [9] Evans KM, Wortley AH, Simpson GE, et al. A molecular systematic approach to explore diversity within the Sellaphora pupula species complex(Bacillariophyta)(1)[J]. J Phycol, 2008, 44(1):215-231.
- [10] Rosa T, David GM, Ester C, et al. The use of partial *cox1*, *rbcL* and *LSU rDNA* sequences for phylogenetics and species identification within the *Nitzschia palea* species complex(Bacillariophyceae)[J]. Eur J Phycol, 2010, 45(4):413-425.
- [11] 赵小波, 刘峰, 单体锋, 等. DNA 条码技术在大型海藻系统学中的研究现状[J]. 海洋科学, 2012, 36(12):90-94.
- [12] 刘福其, 于晓军, 赖小平, 等. 叶绿素 A 检验对溺死诊断的实验研究[J]. 江西医学院学报, 2005, 45(5):38-41.
- [13] Abe S, Suto M, Nakamura H, et al. A novel PCR method for identifying plankton in cases of death by drowning[J]. Med Sci Law, 2003, 43(1):23-30.
- [14] Sherwood AJ, Presting GG. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria[J]. J Phycol, 2007, 43(3):605-608.

(责任编辑:冉明会)