

· 论 著 ·

实验模型下两种全基因组扩增技术对指纹 DNA 检验的效能

邓建强¹, 刘宝琴², 蔡继峰³, 李文慧¹, 龙仁¹, 侯一平^{4*}

摘要:目的 对简并寡核苷酸引物 PCR (Degenerate oligonucleotide-primed PCR, DOP-PCR) 和扩增前引物延伸 PCR (Primer extension pre-amplification PCR, PEP-PCR) 用于指纹检材 DNA 检验的价值进行研究。方法 建立 2 种指纹检材 DNA 模型, 分别用普通 PCR、DOP 技术和 PEP 技术三种方法对指纹 DNA 样本进行 STR 分型, 对三种方法的效能进行比较评价。结果 实验模型 1 条件下, 三种方法均不能获得满意分型结果, 模型 2 条件下, DOP 和 PEP 两种方法可以增加 STR 分型的成功率和信息量。结论 DOP 和 PEP 技术必须结合高效的 DNA 提取技术才能最大程度发挥其检验效能。

关键词: 法医学; 全基因组扩增; 指纹 DNA; 简并寡核苷酸引物; 扩增前引物延伸

中图分类号: R446.7 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)5-524-04

Effects of two whole genome amplification methods for fingerprint samples' genotyping under two experimental model conditions. DENG Jian-qiang¹, LIU Bao-qin², CAI Ji-feng³, LI Wen-hui¹, et al. (1. Department of Forensic Medicine, Hainan Medical University, Haikou, 570102, Hainan P.R.China)

Abstract Objective To estimate the practical value of degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR) and primer extension pre-amplification PCR (PEP-PCR) protocols for fingerprint samples genotyping. Methods DNA samples obtained from fingerprints under two experimental conditions were genotyped by three ways (directly analysis, DOP and PEP protocol). Their effects were compared. Result No satisfied results were received by three methods under model-1 condition, but DOP and PEP protocols improved successful rates and message amounts for fingerprint samples genotyping under experimental model-2 condition. Conclusions In order to perform their powerful capability, DOP and PEP protocol must combine efficient DNA collecting technology.

Key words: Forensic medicine; Whole genome amplification; Fingerprint sample; Degenerate oligonucleotide-primed PCR; Primer extension pre-amplification PCR

指纹遗留在案发现场常见, 虽然以往指纹的价值主要在于对指纹形态和特征进行分析, 以获得与嫌疑人有关的信息, 近年研究发现指纹往往同时伴随局部皮肤脱落细胞的残留, 并有研究从指纹中提取 DNA 以进行法医学检验的报道。全基因组扩增技术 (Whole genome amplification, WGA) 可以从极其微量的生物检材中, 在没序列倾向性的前提下大幅度增加 DNA 的总量, 从而揭示检材所包含的生物学信息^[1], 因此本文对本课题组前期研究所建立的简并寡核苷酸引物 PCR (Degenerate oligonucleotide-primed PCR, DOP-PCR) 和扩增前引物延伸 PCR (Primer extension pre-amplification PCR, PEP-PCR) 两种方案应用于实验模型下的指纹检验, 对其法医学价值进行评价。

1 材料与方法

1.1 样本制备 指纹模型的建立: 收集 10 位志愿者, 该组志愿者均在采集指纹前 3h 内未和其它人员

有皮肤接触及无洗手, 行热身运动至手部有汗, 以中等力量按双手指印于干净玻璃板上 (模型 1) 或干净木板上 (模型 2) 持续 10s, 抬起时轻轻沿玻璃板水平面拖动 2cm 许。

1.2 主要试剂和仪器 Profiler Plus 试剂盒 (美国应用生物系统公司生产, ABI)、PE9600 扩增仪 (美国 PerkinElmer 公司, PE)、高速离心机 (德国艾本德股份公司, Eppendorf)、多功能电泳仪 (Pharmacia, 瑞典)、可调移液器 (德国艾本德股份公司, Eppendorf)、ABI 310 遗传分析仪 (美国应用生物系统公司, ABI)、高压灭菌宫颈刷 (国产) 等。

1.3 方法

1.3.1 样本制备 指纹 DNA 的提取

1.3.1.1 模型 1 1) 剪取适量纱线, 纯水浸湿, 擦取载玻片表面的每组汗潜指印, 再用干纱线反复擦取同一部位, 均置于 0.5ml 离心管内, 加入去离子灭菌水

基金资助 国家自然科学基金资助项目 (No.30271446), 高校博士点专项科研基金资助项目 (No.20020610044)

作者单位: 1. 海南医学院法医鉴定中心, 海南 海口 570102; 2. 西安现代妇产医院, 陕西 西安 721000; 3. 中南大学湘雅医学院法医学系, 湖南 长沙 410078; 4. 四川大学华西基础与法医学院, 四川 成都 610041

作者简介: 邓建强 (1971~), 男, 博士, 副主任法医师, 主要从事法医 DNA 技术与法医学病理学研究, E-mail: forensicpatho@163.com

* 通讯作者 E-mail: rechtsme@wccums.edu.cn.

400 μ l, 振荡混匀后, 以 13 000 转离心 5min 2) 弃上清, 沉渣中加入裂解液 150 μ l 3) PCR 扩增 65 $^{\circ}$ C 30min 95 $^{\circ}$ C 15min 4 $^{\circ}$ C 10min。将上一步骤中的 PCR 试管放入预热好的 PCR 仪中, 运行该程序。4) 吸取上清至另一扩增管中, 敞口置 37 $^{\circ}$ C 烤箱中至液体全部挥发 5) 加入 2 μ l 去离子灭菌水, 置 4 $^{\circ}$ C 待扩增。

1.3.1.2 模型 2 1) 用新拆封的宫颈刷, 用去离子灭菌水 400 μ l 反复冲刷载玻片表面的汗潜指印, 置于 0.5ml 离心管内, 振荡, 13 000 转离心 5min 2) 余步骤与模型 1 的 2~5 步骤相同。

1.3.2 分析策略 指纹提取后随即分别用直接扩增分析、DOP 扩增后以 DOP 产物为模板、PEP 扩增后以 PEP 产物为模板 3 种方法进行 STR 分析。

1.3.3 全基因组扩增

1.3.3.1 DOP-PCR 扩增 扩增体系: 总体系 50 μ l, 1mmol/L dNTP 10 μ l 40mmol/L Primer 5 μ l, 10 \times PCR Buffer 5 μ l 20mmol/L MgCl₂ 4 μ l 2.5mmol/ μ l Taq Plus polymerase 1 μ l 0.1% Gelatin 0.1 μ l, 样本 DNA 2 μ l。DOP 引物采用其通用引物序列 (5' CCGACTCGAGN NNNNNATGTGG3')。

扩增条件: 第一步 94 $^{\circ}$ C 5min; 第二步 94 $^{\circ}$ C 1min 30s 30 $^{\circ}$ C 2min 30 $^{\circ}$ C 以 Ramp 5% 连续升温 55 $^{\circ}$ C 68 $^{\circ}$ C 8min; 循环 5 次; 第三步 94 $^{\circ}$ C 1min 60 $^{\circ}$ C 2min 68 $^{\circ}$ C 8min 循环 30 次; 第四步 68 $^{\circ}$ C 10min。

1.3.3.2 PEP-PCR 扩增 扩增体系: 总体系 50 μ l, 1mmol/L dNTP 10 μ l 40mmol/L Primer 5 μ l, 10 \times PCR Buffer 5 μ l 20mmol/L MgCl₂ 4 μ l 2.5mmol/ μ l Taq Plus polymerase 1 μ l 0.1% Gelatin 0.1 μ l, 样本 DNA 2 μ l。PEP 引物采用其通用引物序列 (即 5' NNNNNNNNN NNNNNN3', N 为相同频率的 A、T、C 或 G, 在理论上 15N 随机引物由 4¹⁵ 种序列组成)。

扩增参数: 第一步 94 $^{\circ}$ C 变性 5min; 第二步: 94 $^{\circ}$ C 1min 37 $^{\circ}$ C 2min 37 $^{\circ}$ C 连续升温到 55 $^{\circ}$ C Ramp 5% 55 $^{\circ}$ C 4min 共循环 50 次; 第三步 72 $^{\circ}$ C 10min。

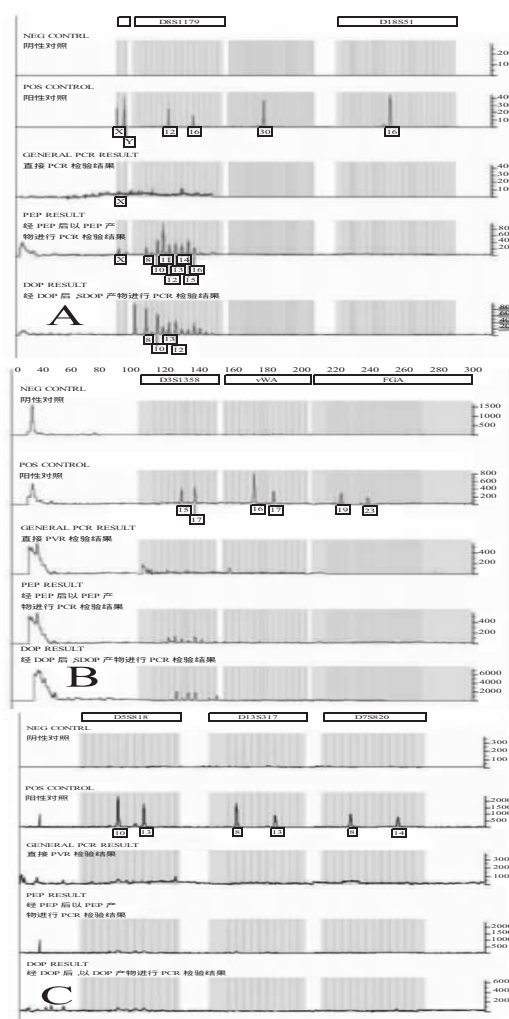
1.3.4 DNA 样品的法医学 STR 分型 用 PROFILER Plus 试剂盒复合扩增 Amelogenin 基因座和 9 个 STR 基因座, PCR 总反应体系为 25 μ l 在含有 2 μ l DOP-PCR 产物作为模板, 扩增管中加入引物混合物 2.5 μ l, PCR 缓冲液 2.5 μ l, 5u/ μ l AmpliTaqGold 0.8 μ l, 去离子水补到 25 μ l PCR 反应条件为: 先 95 $^{\circ}$ C 1min; 然后 94 $^{\circ}$ C 1min 59 $^{\circ}$ C 1min 72 $^{\circ}$ C 1min, 循环 28 次; 最后 60 $^{\circ}$ C 45min。扩增结束后按 ABI 310 分析仪标准操作进行电泳和结果分析。

1.3.5 结果分析 以同一细胞量的 10 次检测, 以 10

个样本的扩增产物均能被检测的最低需要 DNA 量为灵敏度, 即在某个模板量下只要有一个样本不能检出, 即视为非成功模板量。

2 结果

2.1 模型 1 指纹 DNA 的分型结果 用不同方法对模型 1 条件下的指纹 DNA 进行 Amelogenin、D8S1179、D21S11、D8S51、D3S1358、VWA、FGA、D5S818、D13S317、D7S820 9 个 STR 基因座的复合扩增, 三种方法均难以获得满意分型结果。说明遗留在光滑材质表面的指纹含有的 DNA 量极其微量, 后续的分析技术并不能提高其分型成功率, 提高指纹提取技术及 DNA 提取技术是提高成功率的关键技术 (图 1)。



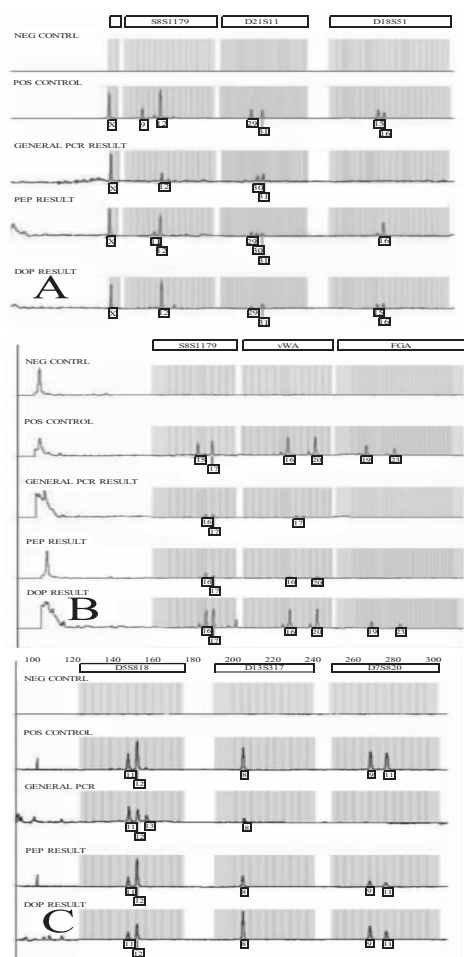
A 为 Amelogenin、D8S1179、D21S11、D18S51 等位基因座检测结果; B 为 D3S1358、VWA、FGA 等位基因座检测结果; C 为 D5S818、D13S317、D7S820 基因座检测结果。

A: genotyping result of loci Amelogenin、D8S1179、D21S11、D18S51; B: genotyping result of loci D3S1358、VWA、FGA; C: genotyping result of loci D5S818、D13S317、D7S820.

图 1 模型 1 条件下三种方法的指纹 DNA 分析结果

Fig 1 Test results of fingerprints with different methods under model-1 condition

2.2 模型 2 指纹 DNA 的分型结果 用不同方法对模型 2 条件下的指纹 DNA 进行大额 Amelogenin、D8S1179、D21S11、D8S51、D3S1358、VWA、FGA、D5S818、D13S317、D7S8209 个 STR 基因座的复合扩增, 直接用 PCR 进行检验会出现位点遗漏或者结果难以判读的情况, 难以获得满意结果, 而 DOP 和 PEP 方法则能获得满意结果或增加检测信息量, 从而提高指纹 DNA 的检验水平, 说明在粗糙的物体表面遗留的指纹通过合适的提取方法, 其 DNA 检验成功的几率明显增加(图 2)。



A 为 Amelogenin、D8S1179、D21S11、D18S51 等位基因座检测结果, B 为 D3S1358、VWA、FGA 等位基因座检测结果, C 为 D5S818、D13S317、D7S820 基因座检测结果。

A: genotyping result of loci Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51; B: genotyping result of loci D3S1358, VWA, FGA; C: genotyping result of loci D5S818, D13S317, D7S820.

图 2 模型 2 条件下三种方法的指纹 DNA 分析结果

Fig 2 Test results of fingerprints with different methods under model-2 condition

3 讨论

以往司法实践中对指纹的分析, 主要是对指纹的形态特征进行比对和分析, 近年来, 由于 DNA 技术的

快速发展, 一些专家学者开始尝试从遗留的指纹中检验 DNA 的研究, 并部分获得成功^[2], 在这些技术方法中, 运用最多的是复合扩增结合毛细管电泳技术。

为了对指纹 DNA 检测的影响因素进行研究, 本研究模拟案发现场指纹的形成过程和环境, 建立了包括指纹形成、收集和 DNA 提取整个环节的实验模型, 对其进行较全面的研究。在研究中, 我们通过建立的模型成功地收集到志愿者的汗潜指纹, 并对其进行 DNA 提取和分析。实验结果显示, 在模型 1 条件下, 无论是直接扩增检测法还是基于 DOP 和 PEP 的两种检测方法均无法获得满意的分型, 三种分析效果之间无明显差别。

但在模型 2 条件下则获得较满意结果, 分析其原因, 两种模型的主要差别是遗留指纹附着物的材质不同。对指纹进行 DNA 检验的主要理论依据, 是在人手出汗并和物品之间有摩擦时, 指纹中一定量的有核上皮细胞会遗留在接触材质的表面, 如果遗留材质表面的 DNA 量达到一定量并被成功提取, 以及后续进行 DNA 检验的分析灵敏度足够高, 那么对这些遗留材质表面的指纹(含皮肤脱落上皮细胞)进行 DNA 检验是可行的。本研究所用的 DOP 和 PEP 方法的灵敏度在我们前期的研究中已经证实, 可以达到对至少 5~6 个细胞都能对全部 Amelogenin 及 9 个 STR 基因座准确分型的水平^[3], 而一般情况下, 汗潜指纹中的细胞数可能大于此数, 故结合本研究的 2 个模型条件进行综合分析, 模型 1 指纹 DNA 检验未获得成功的最大可能原因是在样本处理中 DNA 丢失较大, 说明要获得指纹所含 DNA 的检验成功, 一味提高 DNA 分析技术的灵敏度是远远不够的, 只有和 DNA 提取技术水平的不断提高相结合, 才可能真正实现和满足指纹 DNA 检验的需要^[4]。

也需要指出, 国内有部分指纹检验成功的零星报道, 但从其取材的来源来看, 并不是纯粹的指纹, 而多是指纹和其它生物检材的混合体, 比如有案例报到对嫌疑人两手拿桃核两端部位的指纹 DNA 提取成功并获得分型, 但实际在这里提取到的所谓指纹, 已经是指纹和唾液混合体, 因此并不能称为真正的指纹 DNA 分析成功; 另一例报到对嫌疑人长期使用的、并经多人反复抓握的钥匙进行 DNA 提取, 并获得成功, 实际上所谓的指纹也已经具有混和成分; 还有一例报道对潜血指纹进行 DNA 检验成功, 而我们所说的指纹 DNA 检验均指汗潜指纹, 而潜血指纹应属于血痕, 至少不是纯粹的指纹。因此, 目前国内、(下转第 561 页)

算上交通费、伙食、住宿等费用,则损失的费用更大。按深圳统计局的调查数据 2010、2011 年深圳居民家庭人均可支配收入分别为 32 380、33 299 元(月均 2 736 元),则损失的费用不足家庭月收入的 2 成,对深圳中高收入人群似乎影响不大,但对外来人口占多数的深圳低收入家庭(研究对象自费医疗的占 87.16%)还是构成了一定的经济压力。特别是院内轮状病毒感染增加患儿家人的心理、精神等影响的无形疾病负担更难以用货币衡量。

另外,患儿院内感染轮状病毒症状相对较轻、住院时间短的原因还可能与他们自身的轮状病毒抗体水平有关。由于本辖区的社区健康服务设施完善,有社区健康服务中心 40 多家,计划免疫工作出色,轮状病毒口服疫苗的接种覆盖率高,调查时也发现相当部分病例已接种过轮状病毒疫苗。住院时间短是否与疫苗的接种有关值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis* 2009; 200(Suppl 1): S9-S15.
- [2] Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2): 304-6.
- [3] CDC. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2009; 58(No. RR-2).
- [4] Waisbourd-Zinman O, Ben-Ziony S, Solter E et al. Hospitalizations for nosocomial rotavirus gastroenteritis in a tertiary pediatric center: A 4-year prospective study. *Am J Infect Control* 2009; 37: 465-9.
- [5] Zhao DY, Zou BL, Chen XM et al. Case control Study on Economic Impact of Nosocomial Rotavirus Infection in Children's Hospital [M]. *Chin J Nosocomiol* 2009; 19(18): 2426-28.
- [6] Festini F, Cocchi P, Mambretti D et al. Nosocomial Rotavirus Gastroenteritis in pediatric patients: a multi-center prospective cohort study. *Festini et al. BMC Infectious Diseases* 2010; 10: 235.
- [7] Gleizes O, Desselberger U, Tatchenko V et al. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(Suppl 1): S12-21.
- [8] Chandran A, Heinzen RR, Santosh M et al. Nosocomial rotavirus infections: a systematic review [J]. *J Pediatr* 2006; 149 (4): 441-447.
- [9] Piednoir E, Bessaci K, Bureau Chalot F et al. Economic impact of healthcare associated rotavirus infection in a paediatric hospital [J]. *J Hosp Infect* 2003; 55(3): 190-195.

收稿日期: 2012-02-12 编辑: 崔宜庆

(上接第 526 页)

外对于指纹 DNA 的检验,尚处于技术总结、完善的实验室研究阶段,如用于法医学具体实践应当慎重^[5-7]。

综上所述,指纹检材 DNA 分析成功的途径在于充分运用高效的 DNA 分析技术(如 PEP 和 DOP)、并结合高效的 DNA 检材提取技术,才有可能达到和满足法医学实践的需要。

参考文献:

- [1] Frumkin D, Wasserstrom A, Davidson A et al. Authentication of forensic DNA samples [J]. *Forensic Sci Int Genet* 2010; 4(2): 95-103.
- [2] Kopka J, Leder M, Jaureguierry SM et al. New optimized DNA extraction protocol for fingerprints deposited on a special self-adhesive security seal and other latent samples used for human identification [J]. *J Forensic Sci* 2011; 56(5): 1235-1240.
- [3] Deng JQ, Shi MS, Ying BW et al. DNA samples preparation from single cell and its application in sensitivity test [J]. *Journal of Forensic Medicine* 2005; 21(1): 6-8. (In Chinese)
- (邓建强,石美森,应斌武,等.单个细胞 DNA 样本的制备及其在灵敏度分析中的应用研究[J].法医学杂志,2005,21(1): 6-8.)
- [4] Barbaroa N, Staitib P, Cornacia et al. DNA profiling by different extraction methods [J]. *International Congress Series* 2004; 562-564.
- [5] Wang XJ, Yu JH, Xiang CJ et al. DNA test in three special samples [J]. *Journal of Forensic Medicine* 2009; 25(4): 317-319. (In Chinese)
- (王学静,余建华,向超杰,等.特殊检材的 DNA 检验 3 例[J].法医学杂志,2009,25(4): 317-319.)
- [6] Uzun I, Dargenli O. Identification Procedures as a part of death investigation in Turkey [J]. *Am J Forensic Med Pathol* 2011; 29 (1): 115-119.
- [7] Deng JQ, Hou YP. Practice value of whole genome amplification technology to be used in forensic science and analysis of its result [J]. *Journal of Forensic Medicine* 2005; 21(3): 219-222. (In Chinese)
- (邓建强,侯一平.全基因组扩增技术的法医学应用价值及结果评价[J].法医学杂志,2005,21(3): 219-222.)

收稿日期: 2012-01-20 编辑: 谢永慧