昆明医科大学学报 2012,(12):36~40
Journal of Kunming Medical University
CN 53 - 1221/R

3 种提取接触性检材脱落表皮细胞 DNA 方法的实验研究

刘海渤[1)]，冯保强[1)]，黄 颖[2)]，许冰莹[2)]
（1）兵团公安局物证鉴定中心，新疆 乌鲁木齐 830002；2）昆明医科大学法医学院，云南 昆明 650500）

［摘要］**目的** 对 3 种提取接触性检材脱落表皮细胞 DNA 的方法进行实验研究和比较，以获得最佳的方法. **方法** 分别采用 Chelex-100 小体系法、磁珠法、改良磁珠法法对脱落表皮细胞的 DNA 进行提取，并对检测结果进行分析比较，探讨提取接触性检材脱落表皮细胞 DNA 的方法. **结果** 磁珠法和改良磁珠法均能获得较高质量的细胞核 DNA STR 基因座分型，且后者的分型效果更好. Chelex-100 小体系法的 STR 基因座分型效果不佳. **结论** 磁珠法和改良磁珠法均能有效检测接触性检材脱落细胞 DNA，故在法医检案中遇到接触性检材时考虑选择改良磁珠法.

［关键词］接触性检材；脱落表皮细胞；改良磁珠法；STR 基因座
［中图分类号］R919.2［文献标识码］A［文章编号］1003 - 4706（2012）12 - 0036 - 05

Comparison of Three Methods for Extracting DNA from Shedding of Epidermal Cells in Contact Material

LIU Hai - bo[1)]，FENG Bao - qiang[1)]，HUANG Ying[2)]，XU Bing - ying[2)]
（1）Institution of Forensic Science of Bingtuan Public Security Bureau，Wulumuqi Xingjiang 830002；2）School of Forensic Medicine，Kunming Medical University，Kunming Yunnan 650500，China）

［**Abstract**］Objective To discuss the most effective DNA extracting methods from shedding epidermal cells in contact materials three by comparing methods. Method DNA was extracted from samples by the small volume of Chelex-100， Bead method and Improved Bead method. Results The STR loci genotyping result was most effective by using Improved Bead method to extract DNA. The small volume of Chelex-100 can not obtain the satisfied results of STR loci genotyping. Conclusions Bead method and Improved Bead method can have a satisfied STR loci genotyping. Improved Bead method is the first choice in the actual detection of trace biological evidence.

［**Key words**］Contact materials；Shedding epidermal cells；Improved bead method；STR

在法医物证实际检案工作中，分析接触性检材脱落表皮细胞的 DNA 具有非常重要的意义. 在日常生活中，只要人体表皮组织与物体紧密、频繁接触，就容易留下脱落表皮细胞[1]，如经常使用的工具、赤脚穿过的鞋子、戴过的手套等[2,3]. 但是由于多数脱落表皮细胞属角化的上皮细胞，不像血迹、精斑等法医生物检材容易用肉眼观察，并且脱落表皮细胞数量有限，所以它一直是法医物证 DNA 检验的难点. 但是在一些没有找到血迹、精斑等常见法医生物物证的现场，发现附有脱落表皮细胞的载体检材并成功获得 STR 分型尤为重要[4]. 如指纹是犯罪现场最常出现的痕迹物证，近年来对指纹 DNA 的提取和分析也有了新的进展，尤其对残缺不全、特征点少或模糊不清的指纹，通过 DNA 分析，对个人识别提供方向[5]. 对于发生交通事故时在安全气囊上没有发现血渍的案件，也可

［基金项目］公安部应用创新计划项目（2012YYCXXJQT108）
［作者简介］刘海渤（1976～），男，山东荣成市人，医学学士，主检法医师，主要从事法医物证检验工作. 冯保强和刘海渤对本文有同等贡献.
［通讯作者］许冰莹. E-mail：bingying_xu@126.com

以通过提取安全气囊上的脱落表皮细胞，对驾驶员进行认定[6].

随着 DNA 分析技术的发展，新的 DNA 提取方法不断出现，使很多原本不能被有效提取的检材 DNA 都被成功提取和分析. 特别是近年来，出现的短片段扩增试剂盒（Mini-STR）、全基因组扩增技术（whole gemome amplification，WGA）和激光显微切割捕获技术（lcm laser capture microdissection，LCM）等技术[7]，使含量少于 10 个细胞（< 60 pg）的微量生物检材的 DNA 分析成为可能.

在刑事案件中，如能成功地对关键法医物证上粘附的脱落表皮细胞的 DNA 进行分析，获得个体的 STR 基因座的基因分型，便可为案件的侦查提供线索，为审判提供证据. 本文立足实际检案工作，采用 3 种方法对案件中遇到的接触性检材脱落表皮细胞的 DNA 进行提取和 STR 基因座分型，并对 3 种方法进行分析和比较，探讨提取接触性检材脱落表皮细胞 DNA 的最佳方法.

1　材料与方法

1.1　材料

脱落表皮细胞（非黏膜上皮细胞来源）类检材 45 份，来自本实验室 2007 年 1 月至 2012 年 9 月间受理的各类刑事案件.

1.2　仪器与试剂

试剂：MagAttract ® DNA Mini M48 试剂盒（Qiagen 公司，德国）、Identifiler Plus 试剂盒（AB 公司，美国）、蛋白酶 K（Qiagen 公司，德国）、QIAamp DNA Micro Kit 试剂盒（Qiagen 公司，德国）.

仪器：脱落细胞采集仪（公安部物证鉴定中心）、3130XL 遗传分析仪（AB 公司，美国）、9700 型扩增仪（AB 公司，美国）、MixMate 混匀仪（Eppendorf 公司，德国）

1.3　方法

针对不同的检材使用胶带纸粘取和脱落细胞采集仪负压吸附[7]方法采集脱落表皮细胞.

1.3.1　Chelex-100 小体系法　剪取检材载体适量，置于 0.6 mL 离心管中，加入 60 μL 5% Chelex-100 和 2 μL(20 mg/mL) 蛋白酶 K. 在 56℃ 孵育 1 h，取出震荡 5 ~ 10 s，然后 100 ℃孵育 10 min，震荡 5 ~ 10 s 后，13 000 r/min 离心 3 min，取上清液备用.

1.3.2　磁珠法（MagAttract ® DNA Mini M48 法）　按照 MagAttract ® DNA Mini M48 Kit 操作手册说明对检材进行 PCR 前处理. 在裂解过程中需高速漩涡震荡 2 ~ 3 次，以保证检材中的 DNA 尽可能多地溶解到裂解液中.

1.3.3　改良磁珠法［(MagAttract ® DNA Mini M48+Carrier RNA（cRNA）法］　按照 MagAttract ® DNA Mini M48 Kit 操作手册说明对检材进行 PCR 前处理，G2 裂解液加蛋白酶 K 裂解后，吸出上清液，加入 3 倍于上清液的 MTL 裂解液，在 MTL 裂解液中加入 1 μg/uL 溶解的 Carrier RNA，静置 30 min. 其余步骤按操作手册说明操作.

1.3.4　STR 基因座复合扩增及电泳检测　用 Identifiler Plus 试剂盒对 STR 基因座进行 PCR 复合扩增，扩增体系为 10 μL，其中 Mix 4 μL，Primer 2 μL，模板 DNA 3 μL，去离子水 1 μL，扩增循环数为 29 个循环，使用 Identifiler Plus 试剂盒推荐扩增程序，9 700 扩增仪，扩增产物用 AB3130XL 遗传分析仪进行 STR 基因座分型.

2　结果

45 份检材均分 3 份，分别用 Chelex 小体系法、磁珠法及改良磁珠法提取 DNA. 3 种方法提取的表皮脱落细胞 STR 基因座分型结果见表 1. 分型成功的标准是获得个体性别基因座和 9 个 STR 基因座的明确基因型.

结果显示，Chelex-100 小体系法提取的 DNA 获得成功分型 10 份，其中 6 份检材分型结果出现等位基因扩增不平衡，甚至小片段优势扩增导致大片段等位基因缺失现象. 使用 M48 磁珠法提取的 DNA 扩增不平衡现象不明显，峰高均衡. 加入 Carrier RNA 后提取 DNA 的 STR 基因分型，得到稳定一致的结果，峰高比较均衡，没有小片段优势扩增现象，分型质量明显高于 M48 法. 1 例对匕首柄部分别采用 Chelex-100 小体系法、磁珠法和改良磁珠法 3 种提取方法提取的 DNA 的 STR 基因座分型图谱，见图 1 ~ 4. 其中在用 Chelex-100 小体系法提取的 DNA 获得的 STR 基因座分型图谱中，D21S11、D7S820、CS1PO、D2S1338、FGA 基因座出现等位基因峰值过低甚至缺失现象.

3　讨论

对于附着有表皮脱落细胞检材，采用 Chelex-100 小体系法提取，取 l ~ 2 μL 模板量扩增往往是日常检案常用的方法. 但 Chelex-100 小体

表1 3种方法提取表皮脱落细胞STR基因座分型结果比较

Tab. 1 Comparison of STR gene typing results among three methods

组 别	n	方法		
		Chelex-100小体系法	M48法	M48+cRNA法
工具类	25	10	18	23
衣物类	20	14	20	20

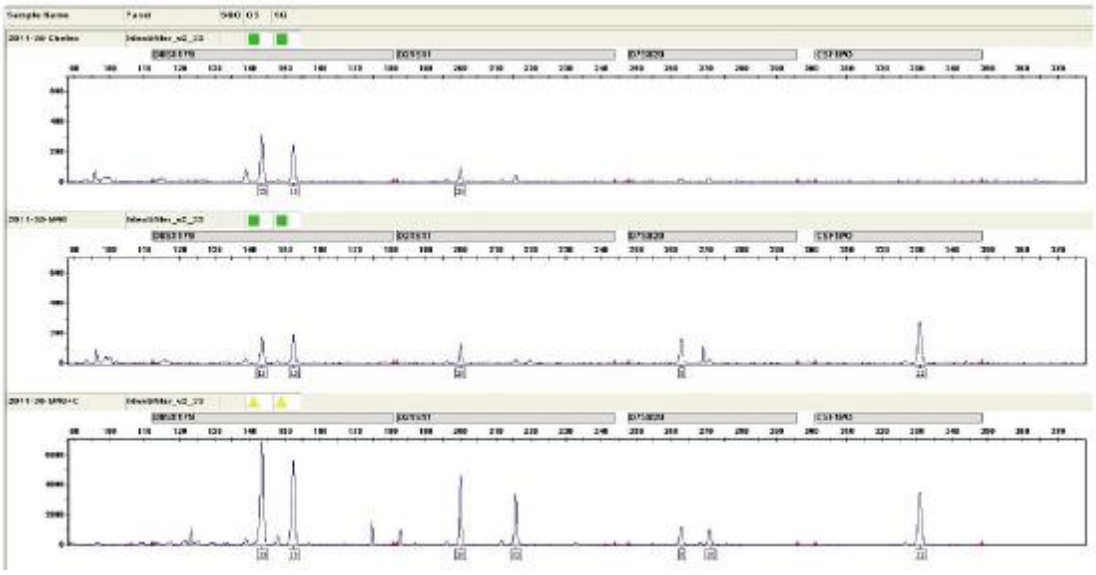

图1 Chelex-100小体系法（上图）、磁珠法（中图）、改良磁珠法（下图）D8S1179、D21S11、D7S820、CSF1PO基因座分型图谱比较

Fig. 1 The D8S1179,D21S11,D7S820 and CSF1PO loci genotyping result of chelex mini system(upper),M48(middle) and M48+cRNA(below)

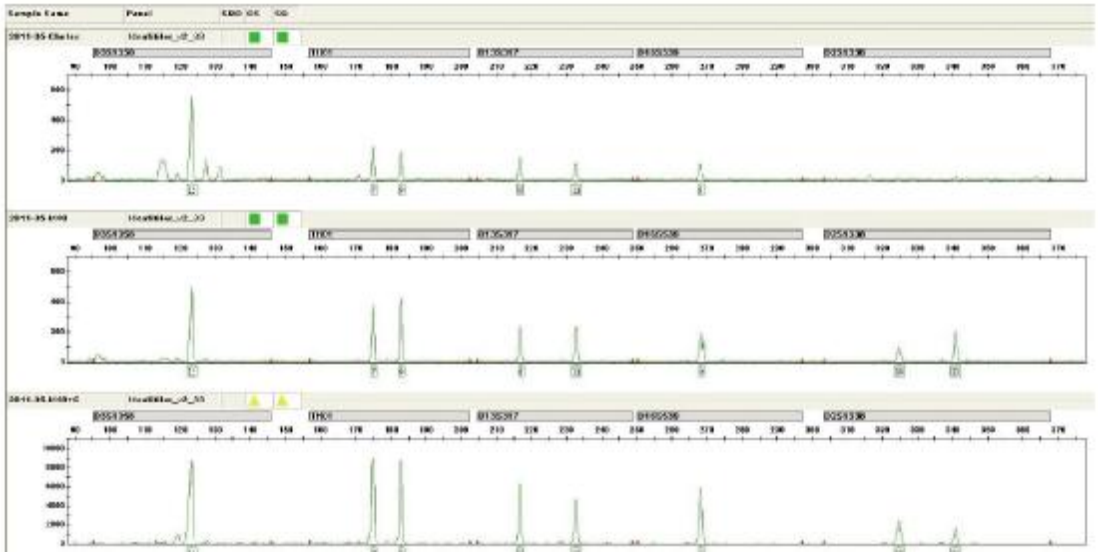

图2 Chelex-100小体系法（上图）、M48法（中图）、M48+cRNA法（下图）D3S1358、TH01、D13S317、D16S539、D2S1338基因座分型图谱比较

Fig. 2 The D3S1358,TH01,D13S317,D16S539 and D2S1338 loci genotyping result of chelex mini system(upper), M48(middle) and M48+cRNA(below)

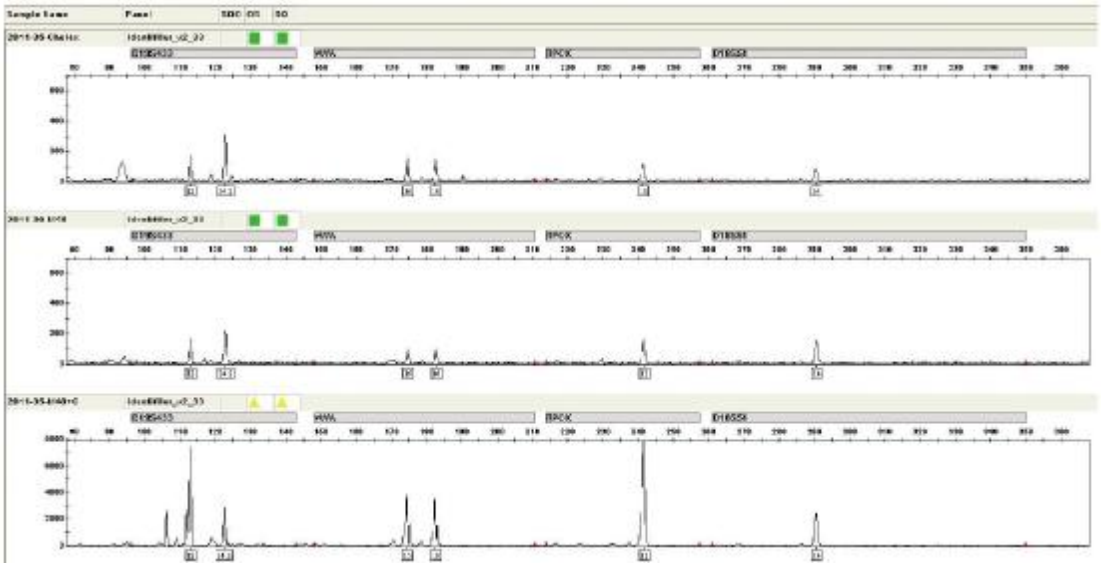

图 3　Chelex-100 小体系法（上图）、M48 法（中图）、M48+cRNA 法（下图）D19S433、vWA、TPOX、D18S51 基因座分型图谱比较

Fig. 3　The D19S433,vWA,TPOX and D18S51 loci genotyping result of chelex mini system(upper),M48(middle) and M48+cRNA(below)

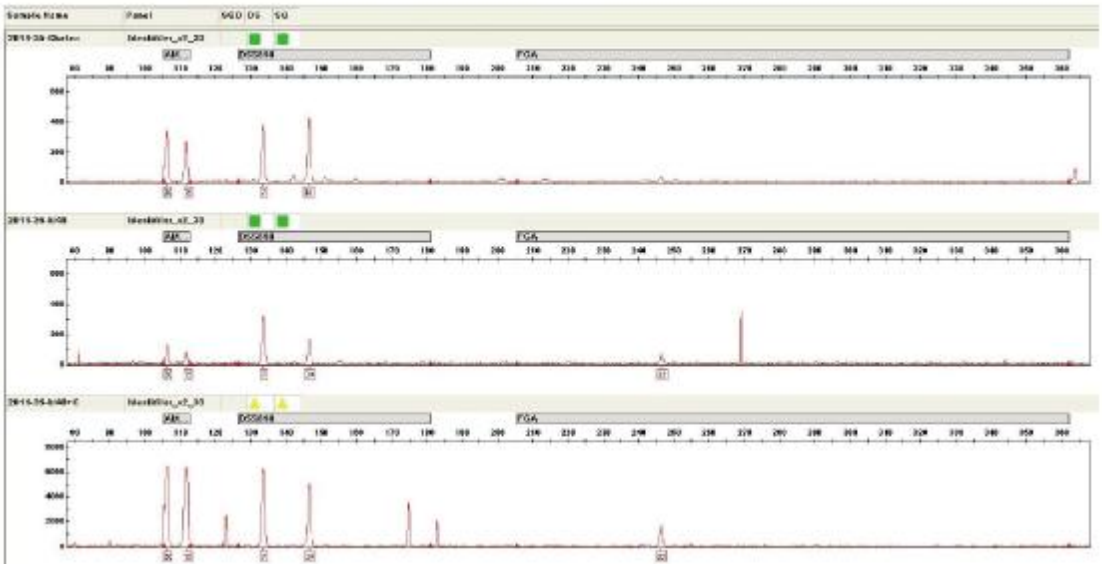

图 4　Chelex-100 小体系法（上）、磁珠法（中）、改良磁珠法（下）D5S818、FGA 基因座分型图谱比较

Fig. 4　The D5S818 and FGA loci genotyping result of chelex mini system(upper),M48(middle) and M48+cRNA(below)

系法不能去除提取液中的杂质、小片段 DNA 碎片、色素及载体上的 PCR 抑制物，因此对于一些微量、降解检材，使用 Chelex-100 小体系法提取的 DNA 进行 STR 基因座扩增时，容易出现等位基因扩增不平衡，小片段等位基因优势扩增导致大片段等位基因缺失的现象.

在脱落表皮细胞检材 DNA 提取过程中，通常会遇到检材含有很多杂质，且有各种干扰检测的成分存在，如在提取指纹 DNA 时会受到指纹显现剂的影响. 磁珠法与 Chelex-100 小体系法相比，能有效去除 100 bp 以下的 DNA 小片段和样品中的色素、蛋白质等杂质，并可通过调整洗脱液的量对

DNA 进行浓缩，获得高纯度的 DNA 模板. 因此进行 STR 基因座扩增时峰高比较均衡，小片段优势扩增现象不明显. 在本实验中，磁珠法提取的 DNA 的成功率明显高于 Chelex-100 小体系法，而且从 STR 基因座图谱上看，应用磁珠法提取的 DNA 所得产物峰高比较均衡，丢失等位基因的现象明显少于 Chelex-100 小体系法.

DNA 在提取和储存的过程中，会有部分吸附在塑料材质的离心管壁上，从而造成 DNA 的损耗. 有研究表明，长度在 30 ~ 500 bp 范围的 DNA 片段最容易被吸附，由于接触性检材的脱落表皮细胞数量有限，得到 DNA 量少，而且多半出现 DNA 降解，使得小片段的 DNA 附着在离心管壁的可能性更大. Carrier RNA 是多聚腺嘌呤核糖核苷酸，被认为可以吸附在离心管壁上，从而减少了离心管壁对 DNA 的吸附，提高 DNA 的回收率[8]. Carrier RNA 的效果优于吐温 20，因为吐温 20 等去污剂虽可以减少 DNA 在管壁上的附着，但对于已经附着的 DNA 没有作用. 本实验观察到在 DNA 提取中加入 Carrier RNA 能明显增加 M48 磁珠法提取 DNA 的量，能有效地增加 PCR 扩增产物. 故在实际检案中，如果遇到检材量少或者检材降解的情况下，应考虑加入 Carrier RNA 以提高 DNA 的提取效率. Carrier RNA 也可与 EZ1 ® DNA Investigator Kit、DNA IQ™ System 等磁珠试剂盒配套使用.

[参考文献]

[1] 郑秀芬. 法医DNA分析[M]. 北京:中国人民公安大学出版社,2002:31.

[2] 杨帆,梅善宗,李永宏,等. 签字笔上附着的脱落上皮细胞STR 分型[J]. 法医学杂志,2008,24(1):34 - 37.

[3] 吕云平. DNA技术在侵财型案件侦破中的应用研究[J].《公安学刊》浙江警察学院学报,2009,(5):85 - 90.

[4] 董研,张晨,顾丽华,等. 汗潜指印的STR 分型检测在案件中的应用[J]. 法医学杂志,2006,22(1):74 - 75.

[5] 董雪梅,郭 刚,陈立方,等. 汽车安全气囊上微量检材 DNA 检测方法的探讨[J]. 昆明医学院学报,2011,32(6):49 - 52.

[6] 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(2):52 - 54.

[7] 彭建雄,周毅,陈松,等. 一种收集衣服上脱落细胞的新方法[J]. 刑事技术,2006,(5):768 - 768.

[8] KISHORE R,REEF H W,ANDERSON VJ,et al. Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the bio robot EZ1 and bio robot M48 [J]. J Forensic Sci,2006,51(5):1 055 - 1 061.

(2012 - 10 - 14 收稿)