

三种常用抗凝剂处理血液样本后DNA提取方法探讨

周倩^{1*}, 黄仁武^{1,2}, 曾逸飞¹, 刘林林^{1,2}, 聂胜洁^{1,2}, 胡利平^{1,2#}

¹昆明医科大学法学院, 云南 昆明

²昆明医科大学司法鉴定中心, 云南 昆明

收稿日期: 2024年2月5日; 录用日期: 2024年5月2日; 发布日期: 2024年5月15日

摘要

目的: 探究血液样本在经过三种常见抗凝剂以不同浓度处理后, 适宜的DNA提取方法。方法: 使用肝素钠、柠檬酸钠、EDTA-Na₂三种抗凝剂以1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml四种浓度剂量对血液样本进行抗凝处理, 分别采用直接扩增法、Chelex-100法和硅珠法三种不同的DNA提取方法提取血液样本中的DNA, 随后进行荧光复合扩增及STR自动分型, 使用直接计数法对STR分型结果进行评价, 并进行统计学分析和结果比较。结果: 采用三种提取方法均能提取3种抗凝剂处理的血样中的DNA, 并得到不同效果的STR分型。直接扩增法处理抗凝剂浓度为1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml的血样时, STR分型结果无显著性差异($P > 0.05$), 抗凝剂浓度为8 mg/ml时, 结果有显著性差异($P < 0.05$)。Chelex-100法及硅珠法处理抗凝剂浓度为1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml的样本时, 结果均无显著性差异($P > 0.05$)。结论: 在研究的范围内, Chelex-100法和硅珠法提取的血液样本DNA质量不受三种抗凝剂的影响。血液样本经高浓度(≥ 8 mg/ml)抗凝剂处理后的DNA提取方法, 不宜选用直接扩增法。

关键词

法医学物证学, 抗凝剂, DNA提取

Discussion on the Extraction Method of DNA from Blood Samples Treated with Three Common Anticoagulants

Qian Zhou^{1*}, Renwu Huang^{1,2}, Yifei Zeng¹, Linlin Liu^{1,2}, Shengjie Nie^{1,2}, Lipin Hu^{1,2#}

¹School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming Yunnan

²Judicial Identification Center of Kunming Medical University, Kunming Yunnan

Received: Feb. 5th, 2024; accepted: May. 2nd, 2024; published: May. 15th, 2024

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 周倩, 黄仁武, 曾逸飞, 刘林林, 聂胜洁, 胡利平. 三种常用抗凝剂处理血液样本后 DNA 提取方法探讨[J]. 自然科学, 2024, 12(3): 490-497. DOI: 10.12677/ojns.2024.123056

Abstract

Objective: To explore the appropriate method of DNA extraction from blood samples treated with different concentrations of three common anticoagulants. **Methods:** Heparin sodium, sodium citrate, and EDTA- Na_2 were used to anticoagulant the blood samples at four concentrations of 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, and 8 mg/ml. DNA was extracted from blood samples by three different DNA extraction methods, including direct amplification method, Chelex-100 method and silicon bead method, respectively. Then fluorescence multiplex amplification and automatic STR typing were performed. STR typing results were evaluated by direct counting method, and the results were statistically analyzed and compared. **Results:** The three extraction methods can be employed for isolating DNA from blood samples treated with different anticoagulants, resulting in the acquisition of distinct STR profiles. No significant differences were observed in STR typing results using the direct amplification method when the anticoagulant concentrations were 1 mg/ml, 2 mg/ml, and 4 mg/ml ($P > 0.05$). However, a significant difference was observed at an anticoagulant concentration of 8 mg/ml ($P < 0.05$). There were no notable distinctions between the Chelex-100 method and silica bead method when the anticoagulant concentrations ranged from 1 to 8 mg/ml ($P > 0.05$). **Conclusion:** Within the scope of the study, the DNA quality of blood samples extracted by Chelex-100 method and silica bead method was not affected by the three anticoagulants. Direct amplification is not suitable for DNA extraction from blood samples treated with high concentration of anticoagulant (≥ 8 mg/ml).

Keywords

Forensic Genetics, Anticoagulant, DNA Extraction

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

血液是法医物证检验中重要的生物检材。在法医学实践中,向血液检材中添加抗凝剂,抑制血液凝集,有利于离心后血液中各成分的有效分离,保证检测结果的准确性,为法医物证检验的结果提供有力支撑[1]。抗凝剂应用广泛,但抗凝剂对离体的血液标本是外源性物质,在血液样品中添加不同浓度的抗凝剂会对后续的检测产生不同程度的影响,实验室常用的抗凝剂有肝素(Heparin sodium)、EDTA盐(Sodium citrate)、枸橼酸钠等[2][3]。目前,国内外医学各个领域对抗凝剂的应用研究均有报道,国内学者的研究发现抗凝剂可应用于人工肝治疗肝衰竭、口服抗凝药物可以降低心房颤动患者的血栓栓塞风险[4][5],Kino 等人的研究表明,服用抗凝药物可以作为房颤消融患者的最佳围手术期抗凝策略[6],但使用不同的抗凝剂处理血样对 DNA 质量的影响鲜有报道,而法医物证检验中 DNA 的质量对案件的侦查方向、证据链完整性及后续的审判至关重要。为此,本文旨在探索实验室常用的抗凝剂(肝素钠、柠檬酸钠以及 EDTA- Na_2)以不同浓度处理血液样本后,更适宜的 DNA 处理的方法,以确保 DNA 质量,提高 STR 分型结果的准确性,为法医学的实际应用提供参考。

2. 材料

征得四名健康志愿者知情同意后,采其静脉血 5 ml/人,分别以三种不同抗凝剂(肝素钠、柠檬酸钠以及 EDTA- Na_2)配置成的 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml 四种浓度剂量组进行处理,并设置添加与

实验组等量的生理盐水的血液样本作为空白对照。取 40 张空白血卡，填写好相关信息并编号，具体见表 1。将制备好的样本同时均匀的涂抹在空白血卡上，自然晾干，保存备用。

Table 1. Dose groups with different concentrations of the three anticoagulants

表 1. 三种抗凝剂的不同浓度剂量组分列表

组别	G1	G2	G3	G4	M1	M2	M3	M4	E1	E2	E3	E4
A	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
B	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
C	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
D	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
对照组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注:单位为 mg/ml;G 表示肝素钠,M 表示柠檬酸钠,E 表示 EDTA- Na_2 ;G1-G4、M1-M4、E1-E4 分别表示配置 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml 四种浓度剂量组;A、B、C、D 分别代表按照四位志愿者血液样本所分的组。

3. 方法

3.1. DNA 的提取

3.1.1. 直接扩增法提取血液 DNA

打孔器在血卡上取大小为 0.2 cm^2 的血样放于 2 ml EP 管中,按设置好的浓度梯度直接进行 PCR 扩增。

3.1.2. Chelex-100 法提取血液 DNA

在样本血液中加入 200 ul 5% Chelex-100 溶液及 10 ul 蛋白酶 K,在振荡器上反复振荡,放入 56°C 水浴 60 分钟。取出后振荡, 95°C 孵育 10 分钟,振荡摇匀 10 s;使用高速离心机 12,000 r/min,离心 3 min,上清 DNA 模板备用。

3.1.3. 硅珠法试剂盒提取血液 DNA

打孔器同样在血卡上取大小为 0.2 cm^2 的血样放于 2 ml EP 管中,按照硅珠法试剂盒说明书提取样本 DNA (流程如图 1 所示)。

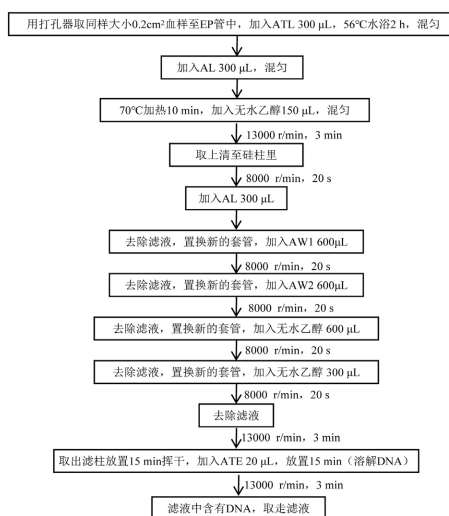


Figure 1. Flowchart for the extraction of sample DNA using the silicon bead method kit

图 1. 硅珠法试剂盒提取样本 DNA 流程图

3.2. PCR 扩增

用 PowerPlex® 21 试剂盒对 D3S1358、D1S1656、D6S1043、D13S317、Penta E、D16S539、D18S51、D2S1338、CSF1PO、Penta D、TH01、vWA、D21S11、D7S820、D5S818、TPOX、D8S1179、D12S391、D19S433、FGA 和 Amelogenin 共二十一个基因座进行 PCR 复合扩增,同时设立灭菌纯水为阴性对照样本,2800M 为阳性对照样本。

反应体系 10 ul: ddH₂O 5 ul, Mix1 2 ul, Mix2 2 ul, DNA 模板 1 ul;

反应条件: 96℃ 1 min, 94℃ 10 s, 59℃ 1 min, 72℃ 30 s, 共进行 28 个循环,总耗时 1.5 小时。

3.3. 毛细管电泳分型检测

分别取扩增产物 1 ul、Marker 1ul、HIDI 9 ul,运用自动混匀机、高速离心机 8000 r/min 离心后采用 AB 3130XL 全自动荧光分析仪进行电泳。运用 Gene Mapper ID-X 对电泳数据进行 STR 数据分析。

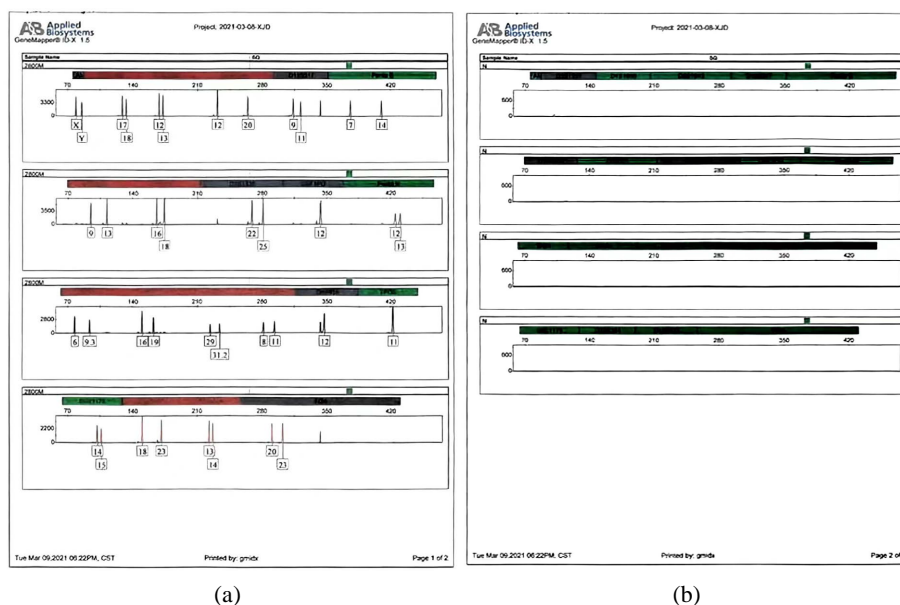
3.4. STR 分型结果评价及统计学分析

对 STR 分型图谱通过直接打分计数法进行评价:每个基因座分型正确,没有脱落与错误分型计 1 分;分型不完整或脱落计 0 分。每份样本检测 21 个 STR 基因座,最高分为 21 分,最低分为 0 分。采用 Kruskal-Wallis 检验和 Games-Howell 法对直接打分计数法所得数据进行统计学分析。

4. 结果

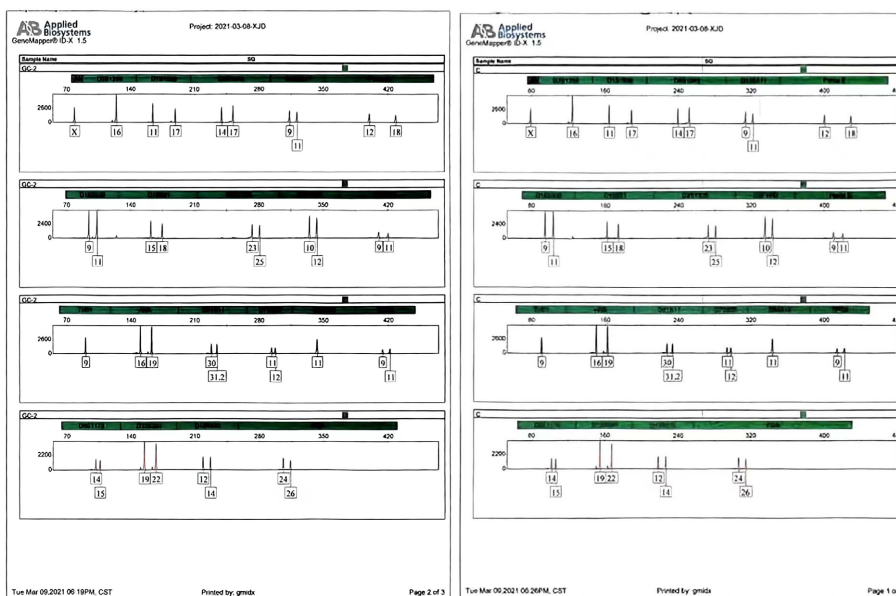
4.1. STR 分型结果图谱

为了保证实验结果的准确性,分别使用 2800M 和灭菌纯水进行阳性对照实验和阴性对照实验,结果显示正确,如图 2 所示。使用三种提取方法提取三种抗凝剂保存的血液样本 DNA,在一定抗凝剂浓度范围内能得到完整的 STR 分型结果,如图 3 所示。但是随着抗凝剂浓度的增加(8 mg/ml),直接扩增法提取的血液 DNA 的出现 STR 分型不全,如图 4 所示。



注: (a) 为加入 2800 M 的阳性对照样本; (b) 为加入灭菌纯水的阴性对照样本。

Figure 2. The STR genotyping maps of the quality control samples
图 2. 质量控制样本的 STR 分型图谱

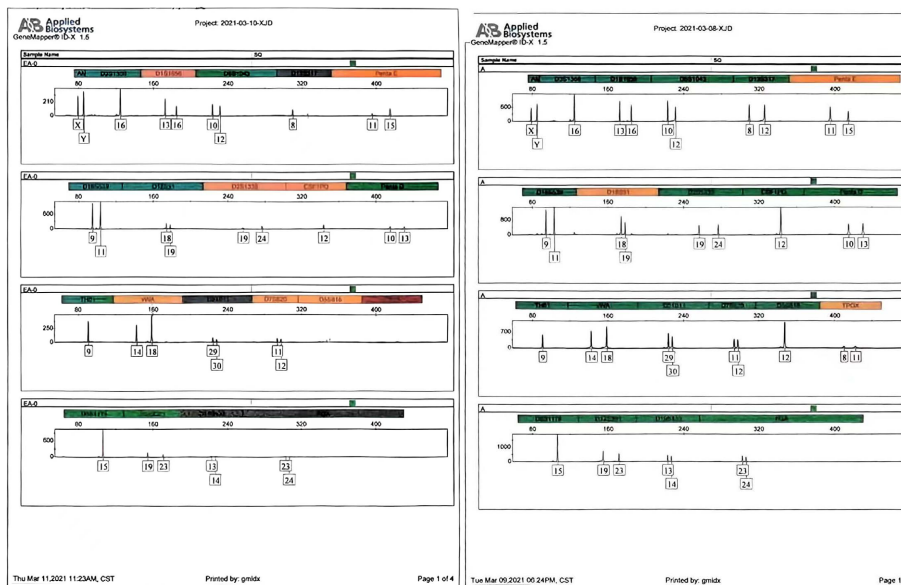


(a)

(b)

注：(a) 为完整 STR 分型图谱；(b) 为空白对照(未加抗凝剂)。

Figure 3. The complete STR genotyping maps
图 3. 完整 STR 分型图谱



(a)

(b)

注：(a) 为采用直接扩增法提取浓度为 8 mg/ml 的 EDTA-Na₂ 处理的血样所得的非完整分型图谱；(b) 为空白对照(未加抗凝剂)。

Figure 4. The incomplete STR genotyping maps
图 4. 非完整 STR 分型图谱

4.2. 直接扩增法

直接扩增法提取三种抗凝剂处理后的血液样本 DNA，在抗凝剂浓度为 1 mg/ml，2 mg/ml，4 mg/ml

均能得到完整的 STR 分型结果,而在抗凝剂浓度为 8 mg/ml,直接扩增法提取的血液 DNA 的检出率会降低,部分个体出现 STR 分型不全,甚至出现等位基因脱漏。评分如表 2 所示。实验组与对照组统计学结果对比:抗凝剂浓度为 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml 时,STR 分型结果无显著性差异($P > 0.05$);当抗凝剂浓度为 8 mg/ml 时,结果有显著性差异($P < 0.05$)。

Table 2. Scores of STR typing results of DNA extracted by direct amplification

表 2. 直接扩增法提取 DNA 的 STR 分型结果评分表

组别	G1	G2	G3	G4	M1	M2	M3	M4	E1	E2	E3	E4
A	21	21	21	11*	21	21	21	14*	21	21	21	10*
B	21	21	21	14*	21	21	21	13*	21	21	21	14*
C	21	21	21	12*	21	21	21	15*	21	21	21	12*
D	21	21	21	15*	21	21	21	14*	21	21	21	12*
对照组	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21

注:单位为分;G 表示肝素钠, M 表示柠檬酸钠, E 表示 EDTA- Na_2 ; G1-G4、M1-M4、E1-E4 分别表示配置 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml 四种浓度剂量组;“*”表示该组中出现 STR 分型不全或等位基因脱漏;A、B、C、D 分别代表按照四位志愿者血液样本所分的组。

4.3. Chelex-100 法及硅珠法

采用 Chelex-100 法及硅珠法试剂盒提取三种抗凝剂处理后的血液样本 DNA,在抗凝剂浓度 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml 以及 8 mg/ml 均能得到完整的 STR 分型结果,即得到的 STR 分型结果与对照组一致,并且无明显差异。评分如表 3 所示。实验组与对照组统计学结果对比:抗凝剂浓度为 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml 时,结果均无显著性差异($P > 0.05$)。

Table 3. Scores of STR typing results of DNA extracted by Chelex-100 method and silica beads method

表 3. Chelex-100 法及硅珠法提取 DNA 的 STR 分型结果评分表

	组别	G1	G2	G3	G4	M1	M2	M3	M4	E1	E2	E3	E4
Chelex-100 法	A	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	B	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	C	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	D	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	对照组	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
硅珠法	A	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	B	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	C	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	D	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21

注:单位为分;1~4 分别表示配置 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml 四种浓度剂量组;G 表示肝素钠, M 表示柠檬酸钠, E 表示 EDTA- Na_2 ;A、B、C、D 分别代表按四位志愿者血样分的组。

5. 讨论

5.1. 抗凝剂

临床上有一些关于抗凝剂种类影响血常规等生化指标检测结果的报道[7] [8] [9],但是本实验使用三

种常用抗凝剂(肝素钠、EDTA- Na_2 以及柠檬酸钠)进行抗凝处理,对组间数据进行分析,未发现抗凝剂种类影响DNA分型结果的现象($P > 0.05$)。肝素钠是一种广泛应用于临床以及法医学实践中的抗凝剂,在体内、外均有抗凝作用,其作用机制是通过与抗凝血酶 III (AT-III)结合,阻止凝血酶形成,从而发挥抗凝作用[10][11]。EDTA- Na_2 、柠檬酸钠两者作为实验室常用的抗凝剂,其发挥抗凝作用的作用机制是通过与血液中的钙离子形成配位化合物,阻止血液凝固[12][13]。在本实验中,直接扩增法对添加三种抗凝剂的血液样本进行处理后得到的STR分型结果显示抗凝剂浓度仅在8 mg/ml时,检出率降低,而使用Chelex-100法、硅珠法处理得到的STR分型结果均完整,提示DNA分型结果的完整性可能与样本处理方法以及抗凝剂浓度有关。

5.2. 直接扩增法

直接扩增法是一种无需对样本进行任何处理的方法,在对肝素钠、EDTA- Na_2 、柠檬酸钠抗凝的血液样本进行直接扩增时,未在处理过程中添加任何除抗凝剂以外会影响毛细管电泳分型结果的物质,但是采用直接扩增法对添加抗凝剂浓度为8 mg/ml的血样进行提取,DNA的检出率会降低,造成DNA的检出率会降低原因可能是:肝素钠中的大量负电荷粘多糖硫酸酯物质与细胞膜表面带正电荷的蛋白质结合,改变了细胞膜的通透性,并与DNA聚合酶结合,抑制了酶的活性,杨平岭等人报道过高剂量肝素钠会影响聚合酶链式反应,影响STR分型结果[14],沈克锋等人综合分析了肝素抑制PCR反应的可能与其会抑制聚合酶链反应中DNA聚合酶(Taq酶)的活性以及其可以与PCR反应体系中镁离子结合有关[15];有学者曾指出EDTA对所提取的样品DNA片段有降解作用[16];上述原因都能影响STR分型结果,出现等位基因位点丢失,甚至无法检出STR分型的情况。

5.3. Chelex-100法、硅珠法

Chelex-100法和硅珠法提取三种抗凝剂处理后的血液样本DNA,两者均得到完整的STR分型结果。两种提取方法不同,使用Chelex-100法和硅珠法提取的DNA作为模板进行PCR扩增,在本实验设置的四种不同抗凝剂浓度组中均得到完整STR分型结果,可见Chelex-100法和硅珠法提取DNA的纯度较高,对STR分型结果影响较小。对于血样中添加的抗凝剂及其添加浓度的不同可能造成的影响,两种提取方法均有一定耐受性。

使用Chelex-100法提取DNA具有污染小、易操作的特点[17][18][19]。使用Chelex-100法对加入抗凝剂的待测样本进行实验时,因为Chelex-100为一种螯合树脂,能螯合以二价金属离子为代表的多价金属离子,因此能够去除血液样本中的金属离子污染物,同时也能螯合肝素钠、EDTA- Na_2 、柠檬酸钠抗凝剂中能抑制PCR反应的金属离子,抑制核酸酶对DNA的酶解作用,提升DNA模板纯度,因此经过Chelex-100法处理的血液样本STR分型不会受到抗凝剂影响,从而成功得到完整的STR分型结果[17][20]。

使用硅珠法提取DNA具有简单高效、纯度高的特点[20],在采用硅珠法对加入肝素钠、EDTA- Na_2 、柠檬酸钠抗凝剂的待测样本进行实验时,在低pH、高盐条件下,硅珠颗粒利用其自身的硅羟基与血液中的DNA相互结合,并在高pH、低盐条件下释放DNA[21],从而达到分离及提取DNA的目的。因此,经过硅珠法处理的血液样本PCR扩增不会受到肝素钠、EDTA- Na_2 、柠檬酸钠抗凝剂影响,成功得到完整的STR分型结果。

6. 结论

在一定的研究范围内,Chelex-100法和硅珠法提取的血液样本DNA质量不受三种抗凝剂的影响。在法医学实践中,对于使用浓度 ≥ 8 mg/ml的抗凝剂处理后的血液样本,其血样的DNA提取方法不建议采用直接扩增法,可以选择其它DNA提取方法。

参考文献

- [1] 闵成军, 朱志盈, 李小勇, 等. 牛血液前处理方式对 ELISA 法检测克仑特罗结果的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 312-316.
- [2] 周雪艳. 抗凝剂及稳定剂在实验室的应用[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2001, 22(5): 267-268.
- [3] 薛俊太, 邓翠华, 袁向东, 等. 实验室检验中抗凝剂的选择和使用[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(8): 633, 640.
- [4] 马元吉, 杜凌遥, 白浪, 唐红. 人工肝治疗的抗凝剂应用进展及选择策略[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(10): 2396-2401.
- [5] 江骏荣, 薛玉梅. 心房颤动抗凝治疗[J]. 中国实用内科杂志, 2023, 43(2): 106-109.
- [6] Kino, T., Kagimoto, M., Yamada, T., *et al.* (2022) Optimal Anticoagulant Strategy for Periprocedural Management of Atrial Fibrillation Ablation: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*, **11**, Article 1872. <https://doi.org/10.3390/jcm11071872>
- [7] 刘永春, 李彦会, 张晋霞. 抗凝剂种类对部分凝血因子测定的影响[J]. 河北医科大学学报, 2005, 26(2): 137-138.
- [8] 杨勇, 冯艳华, 秦陈浩, 等. 不同抗凝剂种类、操作和保存方法对血浆微粒检测影响[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 356-358.
- [9] 李健. 血常规检查结果的影响因素及保证准确性分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(36): 140-141.
- [10] 詹彤, 万学兴. 三种抗凝剂对全血血小板计数的影响[J]. 临床输血与检验, 2001, 3(3): 38-39.
- [11] 贾祥斌, 李强. 不同抗凝剂对新疆卡拉库尔羊外周血液中总 DNA 提取的影响[J]. 新疆畜牧业, 2011(9): 22-24.
- [12] 齐玉凯, 孙钰, 刘丽英, 李显耀. 抗凝剂 EDTA-Na₂ 对家禽血液指标及基因组 DNA 的影响[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(3): 378-381.
- [13] 郑宝亮, 庄军辉, 栾敏, 等. 柠檬酸钠对鸡血抗凝效果及其抗凝条件的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(23): 64-70, 76.
- [14] 杨平岭, 李金叶. ABI-7000 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 影响因素的探讨[J]. 齐鲁医学检验, 2005, 16(6): 73.
- [15] 沈克锋, 杨默, 江千里. 血液和骨髓标本中常见 PCR 反应抑制物的探究与分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(3): 842-846.
- [16] 鲁云凤, 文祯中, 原国辉, 陶爱丽. 3 种血液抗凝剂的抗凝效果及对 RAPD 反应影响的研究[J]. 南阳师范学院学报(自然科学版), 2004, 3(12): 55-57.
- [17] 杨电. 接触 DNA 检材提取纯化方法的比较及法医学应用[D]: [硕士学位论文]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [18] 吴俊蓉, 李宗壮. 法医 DNA 常量检材 Chelex-100 提取法探究[J]. 科技与企业, 2015(7): 241.
- [19] 栗冬梅, 梁艳林, 宋秀平, 等. Chelex100 树脂快速提取动物组织基因组 DNA 方法的评估[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2019, 30(3): 286-291.
- [20] 陈雨, 臧悦含. 接触 DNA 常规提取纯化方法的比较探讨[J]. 生物技术世界, 2016(5): 154.
- [21] 赵凯, 林大钧, 卢俊, 等. 硅珠法提取 DNA 的灵敏度及抗抑制能力探究[J]. 警察技术, 2020(5): 67-69.