

Study on DNA Extraction Methods for Minute Touch Biological Samples

Yirun Huang¹, Xin Meng², Xiaojiang Yang¹, Chenxi Cao¹, Li Huang^{1*}

¹Jiangsu Police Institute, Nanjing Jiangsu

²The Xuanwu Police Security, Nanjing Municipal Public Security Bureau, Nanjing Jiangsu

Email: *363342320@qq.com

Received: Apr. 25th, 2016; accepted: May 9th, 2016; published: May 13th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

Abstract

“TES solution two-step extraction method”, “NaCl solution two-step extraction method” and “Double-sided adhesive paste method” are three methods we used to detach and transfer cells. Our goal is to examine and compare the test results among three detaching methods above so that we are able to provide references for optimizing the extraction method in the future. Method: After applying three cell extraction methods above to 168 sweat samples located on glasses, aluminum, plastic and wood, we can use Chelex method or silicon bead test to extract the DNA from these samples. Furthermore, after applying PCR amplification, routine STR testing, we are able to validate the test result using fingerprints. Result: “NaCl solution two-step extraction method” combined with silicon bead test is the best biomaterial extraction method and it is capable for public security practice.

Keywords

Microscale, Contact (Touch), Biomaterial (Biological Samples), The Transfer of Cell Detach, DNA Extractions

微量接触性生物检材提取方法研究

皇甫一润¹, 孟昕², 杨晓蒋¹, 曹晨曦¹, 黄莉^{1*}

¹江苏警官学院, 江苏 南京

*通讯作者。

²南京市公安局玄武分局刑大, 江苏 南京
Email: *363342320@qq.com

收稿日期: 2016年4月25日; 录用日期: 2016年5月9日; 发布日期: 2016年5月13日

摘要

目的: 对TES溶液二步提取法、NaCl溶液二步提取法以及双面胶粘贴法三种脱落细胞转移方法和Chelex法、硅珠法两种DNA提取方法的检验效果进行比较, 为优化提取方法提供参考。方法: 168例汗斑样本在玻璃、铝板、塑料、木板四种客体上, 分别用上述3种脱落细胞转移方法后, 采用硅珠法和Chelex法提取后, PCR扩增, 常规STR检测, 并采用手指印进行验证实验。结果: NaCl溶液二步提取法结合硅珠法DNA提取方法能获得最佳的生物检材的提取效果, 并可应用于公安办案实践。

关键词

微量, 接触性, 生物检材, 脱落细胞转移, DNA提取

1. 引言

接触性生物检材是指含有人体皮肤粘膜脱落细胞的生物检材。越来越多的案件表明, 随着犯罪嫌疑人的反侦察意识的增强, 案件现场所遗留的明显的生物物证(如精斑、血迹、毛发、人体组织等)常常被有意识的破坏, 于是, 一些容易被犯罪嫌疑人忽视的微量接触性生物物证常常成为案件侦破的关键线索。根据笔者统计的南京市2014年全年7589个微量接触性生物检材样本来看, 口腔脱落上皮细胞样本(包括烟头、杯瓶口、餐具、吸管、牙刷、食物等)2881例, 检出率达80.22%; 而皮肤脱落上皮细胞样本(所在客体为塑料、金属、玻璃、木材等非渗透性客体)4708例, 检出率仅为8.73%。从以上数据可以看出, 含有口腔脱落上皮细胞的检材检出率较高, 而含有皮肤脱落上皮细胞的检材检出率很低, 因此本文主要探讨含有在非渗透性载体上的皮肤脱落上皮细胞的检材的提取方法及其提取效率。

微量接触性生物检材含有的DNA往往是微量的, 属于低拷贝数目模板[1]。微量DNA即低拷贝数量模板检测通常是指起始DNA少于100 pg, 或者低于15个二倍体细胞的分析实验[2]。本课题组采用PCR扩增技术和STR检测分析对不同变量的属于低拷贝数目模板的微量接触性生物检材中DNA的质和量进行了比较研究。变量分别是4种不同客体, 3种不同的脱落细胞转移方法, 2种DNA提取方法提取。找出了最佳的微量生物检材提取方法和DNA提取方法, 并加以实验验证。

2. 实验材料及仪器

2.1. 实验材料及试剂

无漆光滑铝板, 光滑塑料板, 光滑玻璃板, 漆面实木地板, 0.9%氯化钠注射液(安徽丰原药业股份有限公司), 明庭双面胶(深圳市奇富特包装材料有限公司)。

三羟甲基氨基甲烷, (Tris base 美国SIGMA公司, >99%), 浓盐酸(分析纯, 成都市科龙化工试剂厂, 36.0%~38.0%), EDTA.Na₂·2H₂O(美国Promega公司, >99%), 氯化钠(美国SIGMA公司, >99%), 十二烷基硫酸钠(SLS, 美国BIOSHARP公司, >94%), 二硫苏糖醇(DTT, 美国SIGMA公司, >99%), Chelex—100(美国SIGMA公司, >99%), 蛋白酶K溶液(PK, 美国SIGMA公司), 异硫氰酸胍(GuSCN, 美国SIGMA

公司, >94%), 硅珠(美国 SIGMA 公司, >99%), 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100, 美国 SIGMA 公司), 75%乙醇溶液(分析纯, 无锡市亚盛化工有限公司, >99%), Identifiler Plus 试剂盒(美国 AB 公司), LIZ-500(美国 AB 公司), 去离子甲酰胺溶液(美国 AB 公司), 超纯水。

2.2. 溶液的配制

以下溶液均由 2.1 中试剂配置。

1	1 mol·L ⁻¹ Tris.Cl 缓冲液 (pH8.0和pH6.4)	取Tris base 60.5 g溶解在400 mL水中, 用浓盐酸将pH值调节到适当的值, 室温保存。
2	3 mol·L ⁻¹ NaCl溶液	取NaCl 58.44 g溶于水, 定容到333 mL。室温保存。
3	pH8.0的0.5 mol·L ⁻¹ EDTA溶液	取EDTA.Na2·2H2O 93 g加入400 mL水中, 边剧烈搅拌边加入片状NaOH晶体约8 g, 调节pH到8.0后定容, 室温保存。
4	10% SLS溶液	取SLS 10 g加入100 mL水中, 室温保存。
5	1 mol·L ⁻¹ DTT溶液	取DTT 771.25 mg溶于5 mL水中, -20℃保存。
6	TES溶液	取pH8.0的1 mol·L ⁻¹ Tris.Cl缓冲液10 mL、3 mol·L ⁻¹ NaCl溶液33.3 mL、0.5 mol·L ⁻¹ EDTA溶液20 mL和950 mL水混匀, 室温保存。
7	Chelex-100悬浊液	取Chelex—100 0.4 g、18 mg/mL PK溶液444 μL和4 mL水混匀。即配即用。
8	消化液	取pH8.0的0.1 mol·L ⁻¹ Tris.Cl缓冲液5 mL, 10% SLS溶液1 mL和18 mg/mL PK溶液0.2 mL混匀, 室温保存。
9	硅珠悬浊液	取硅珠6 g加入100 mL水中, 室温保存, 使用前振荡。
10	吸附液	取GuSCN 600g溶于500 mL pH 6.4的0.1 mol·L ⁻¹ Tris.Cl缓冲液, 加入0.5 mol·L ⁻¹ EDTA 40 mL和Triton X—100 25 mL。
11	检测液	取LIZ-500 11.5 uL加入500 uL去离子甲酰胺溶液中, 混匀, -20℃保存。

2.3. 实验仪器

ETC-811PCR 扩增仪(东胜业兴科学仪器有限公司), GeneAmp PCR System 9700 扩增仪(美国 AB 公司), 3500XL 基因测序仪(美国 AB 公司), PICO17 台式高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司), Labofuge400 平板离心机(美国 Thermo Scientific 公司), P 系列单道移液器(法国 GILSON 公司), HTLS121 八道移液器(波兰 HTL 公司), EPED-Z1-20T 实验室级纯水器(南京益普达科技发展有限公司), Milli-Q Reference 纯水仪(美国 MERCK MILLIPORE 公司)。

3. 实验内容

3.1. DNA 的提取

3.1.1. 实验样本的制备

汗斑样本均来自同一人, 通过自然滴落的方式收集汗液。汗液收集后 4℃保存。

将无漆光滑铝板, 光滑塑料板, 光滑玻璃板, 漆面实木地板这四种实验客体用 84 消毒液清洗后, 再用水洗净晾干。将上述汗液滴各取 20 μL 滴落在上述四种客体上, 用吹风机吹干成为汗斑, 每种客体上制作 42 个汗斑样本, 每 7 个样本为一组。每种客体上每两组汗斑样本分别用 TES 溶液二步提取法、0.9%NaCl 溶液(下简称 NaCl 溶液)二步提取法和双面胶粘贴法转移检材, 之后将使用同一种转移方法的两组样本分别用 Chelex 法和硅珠法提取 DNA。

3.1.2. 脱离细胞的转移

(1) TES 溶液二步提取法

用蘸有 15 μL TES 溶液的医用棉签擦拭汗斑, 然后再用干医用棉签擦拭汗斑所在部位, 剪下干、湿两支棉签擦拭部位的棉签头, 放入试管中。

(2) NaCl 溶液二步提取法

用蘸有 15 μL NaCl 溶液的医用棉签擦拭汗斑, 然后再用干医用棉签擦拭汗斑所在部位, 剪下干、湿两支棉签擦拭部位的棉签头, 放入试管中。

(3) 双面胶粘贴法

用剪成 10 mm \times 6 mm 的双面胶接触汗斑, 然后将双面胶放入试管时避免含有脱落细胞的一面与其他地方粘在一处, 造成脱落细胞损失。

3.1.3. 样本 DNA 的提取

(1) Chelex 法

将 Chelex-100 悬浊液振荡后加入 50 μL 至玻璃试管中。将试管先以 56 $^{\circ}\text{C}$ 恒温加热 1 h, 再以 99 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min。将试管以 12,000 rpm 的转速离心 2 min, 取上层清液, 转移到新反应板中, 等待 PCR 扩增。

(2) 硅珠法

将 60 μL 的消化液加入玻璃试管中, 先在 56 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温加热 1 h, 再以 99 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min。再加 150 μL 吸附液至试管中, 涡旋振荡, 以 12,000 rpm 的转速离心 2 min, 将上层清液转移入新管, 并加入 15 μL 硅珠悬浊液, 涡旋振荡后静置 15 min。将试管或反应板 12,000 rpm 离心 2 min, 然后弃上清液。再加入 200 μL 75% 冰冷乙醇溶液, 以 12,000 rpm 的转速离心 2 min 后弃上清液, 并重复两次。将反应板烘干, 加 50 μL 超纯水, 振荡混匀, 在 56 $^{\circ}\text{C}$ 下脱浴 20 min, 等待 PCR 扩增。

3.2. DNA 的扩增与检测

3.2.1. PCR 扩增

将待扩增样品以 12,000 rpm 的转速离心 2 min, 取上层清液 6 μL 于反应板, 再加入 9 μL Identifiler Plus 扩增试剂中, 混匀后离心, 并放入 9700 扩增仪中按照 Identifiler Plus 试剂盒推荐的程序进行 28 次循环 PCR 扩增。

3.2.2. 结果检测

取扩增产物 1 μL 加入到 10 μL 检测液中, 在其余的 10 μL 检测液中加入 1 μL ladder, 放入基因测序仪, 最后通过 GeneMapper ID-X 软件将检测结果进行数据分析。

3.3. 验证

在用 84 消毒液洗净、晾干的光滑铝板划分出 7 个面积相同的区域, 每次用一根手指在一个区域中按住并滚动达 10 秒钟, 以此做出 10 个样本, 用 NaCl 溶液二步提取法转移脱落细胞, 然后使用硅珠法提取 10 个样本中的 DNA, 之后分别对各组提取待用的 DNA 模板进行扩增后进行结果检测, 并通过 GeneMapper ID-X 软件进行数据分析。

4. 结果与讨论

4.1. 168 个样本检测结果

对无漆光滑铝板, 光滑塑料板, 光滑玻璃板, 漆面实木地板这四种客体上的各 42 个汗斑样本分别用 TES 溶液二步提取法、NaCl 溶液二步提取法和双面胶粘贴法转移脱落细胞, 之后将使用同一种转移方法的两组样本分别用 Chelex 法和硅珠法提取 DNA。经 PCR 扩增, 得到的检测结果, 笔者得到了各种变量

相同的每组中 7 个(每个样本 16 组等位基因的)平均峰面积:

$$N_{\text{平均峰面积}} = \frac{A+B}{n}$$

式中 A 为 13 个杂合子的 26 个峰面积之和, B 为 3 个纯合子峰面积之和, $n = 16$; 以及基因型数:

$$N_{\text{基因型}} = C + D$$

式中 C 为检测出的杂合子数, D 为检测出的纯合子数。

将上述两者进行统计, 得到每组的组平均峰面积(每组的 7 个平均峰面积的平均值)、组峰面积相对标准差(每组的 7 个平均峰面积的相对标准差)及组平均基因型数(每组的 7 个基因型数的平均值)。使用 Chelex 法的 84 个样本结果见表 1, 使用硅珠法的 84 个样本结果见表 2。

4.2. 验证结果

根据表 1、表 2 中 168 个样本的数据得出的结论, 在客体为铝板时, 使用 NaCl 溶液二步提取法和硅珠法 DNA 提取效果最佳。遂选用铝板, 使用 NaCl 溶液二步提取法和硅珠法进行验证实验。笔者将得到的该组 10 个样本的 16 个位点的平均峰面积(同前)及基因型数(同前)进行统计, 得到该组的基因型检出率:

$$Det = \frac{\sum_{i=1}^{10} N_{\text{基因型}}}{32 \times 10}$$

分析结果见表 3。

4.3. 讨论

4.3.1. 在同一客体表面不同脱落细胞转移方法比较

根据表 1 和表 2 可以得到: 在玻璃表面, TES 溶液二步提取法效果最佳, 总平均峰面积(在该客体上和转移方法时, Chelex 法中组平均峰面积值与硅珠法中组平均峰面积的平均值, 下同)为 2147.785, 总平

Table 1. Each sample group's group average peak area, relative standard deviation and group average number of Genotype by using Chelex method

表 1. 使用 Chelex 法的各组样本组平均峰面积、相对标准差及组平均基因型数

客体	转移方法	组平均峰面积	相对标准偏差(%)	组平均基因型数
玻璃	TES 溶液二步提取法	1569.86	33.15%	28.43
	NaCl 溶液二步提取法	1043.00	41.03%	18.14
	双面胶粘贴法	1478.86	69.80%	22.43
铝板	TES 溶液二步提取法	1066.71	46.25%	22.00
	NaCl 溶液二步提取法	907.71	40.47%	23.29
	双面胶粘贴法	1630.57	48.89%	26.14
塑料	TES 溶液二步提取法	800.71	32.53%	21.86
	NaCl 溶液二步提取法	774.57	15.36%	22.71
	双面胶粘贴法	1293.71	16.11%	28.57
木板	TES 溶液二步提取法	403.71	50.17%	15.43
	NaCl 溶液二步提取法	434.00	59.00%	16.71
	双面胶粘贴法	1268.86	29.94%	27.14

Table 2. Each sample group's group average peak area, relative standard deviation and group average number of Genotype by using silicon bead test**表 2.** 使用硅珠法的各组样本组平均峰面积、相对标准差及组平均基因型数

客体	转移方法	组平均峰面积	相对标准偏差(%)	组平均基因型数
玻璃	TES 溶液二步提取法	2725.71	27.77%	31.71
	NaCl 溶液二步提取法	3025.86	27.65%	31.29
	双面胶粘贴法	587.45	63.91%	18.57
铝板	TES 溶液二步提取法	3223.43	34.34%	32.00
	NaCl 溶液二步提取法	4049.29	16.78%	32.00
	双面胶粘贴法	1234.14	42.07%	27.43
塑料	TES 溶液二步提取法	3036.43	42.85%	31.14
	NaCl 溶液二步提取法	3989.14	11.52%	32.00
	双面胶粘贴法	972.00	53.15%	25.43
木板	TES 溶液二步提取法	2278.43	44.63%	31.29
	NaCl 溶液二步提取法	3426.57	33.77%	32.00
	双面胶粘贴法	742.00	39.92%	23.29

Table 3. The validation group's average peak area, number of Genotype and detection rate**表 3.** 验证组的平均峰面积、基因型数及检出率

样本	平均峰面积	基因型数
1	928.81	21
2	1096.75	28
3	1753.31	30
4	2156.00	30
5	4253.69	32
6	2164.50	29
7	2719.38	32
8	5142.69	32
9	4725.44	32
10	2508.19	31
检出率(%)		92.81%

均基因型数(在该客体上和转移方法时, Chelex 法中组平均基因型数与硅珠法中组平均基因型数的平均值,下同)为 30.07, 其两个组峰面积相对标准偏差数据与其他转移方法的相比最小。在铝板、塑料以及木板表面, NaCl 溶液二步提取法效果最佳, 总平均峰面积分别为 2478.500、2381.855、1930.285, 总平均基因型数分别为 27.65、27.36、24.36, 其两个组峰面积相对标准偏差数据与其他转移方法的相比较小。总体而言, 使用 NaCl 溶液二步提取法的效果相对较好, 平均峰面积数值较大, 多组的数值也较为稳定(组相对标准偏差较小), 等位基因所检出的位点较为完整。

4.3.2. 在同一客体表面不同 DNA 提取方法比较

根据表 1 和表 2 可以得到：在玻璃、铝板、塑料以及木板表面，硅珠法效果最佳，总平均峰面积(在该客体上和提取方法时，TES 溶液二步提取法中组平均峰面积、NaCl 溶液二步提取法中组平均峰面积和双面胶粘贴法中组平均峰面积的平均值)分别为 2113.007、2835.620、2665.857、2149.000，总平均基因型数(在该客体上和提取方法时，TES 溶液二步提取法中组平均基因型数、NaCl 溶液二步提取法中组平均基因型数和双面胶粘贴法中组平均基因型数的平均值)分别为 27.19、30.48、29.52、28.86，其三个组峰面积相对标准偏差数据与另一个提取方法的相比相对较小。总体而言，使用硅珠法的效果相对较好，平均峰面积数值较大，多组的数值也较为稳定(组相对标准偏差较小)，等位基因所检出的位点较为完整。

4.3.3. 不同脱离细胞转移方法和 DNA 提取方法的探讨

由表 1 和表 2 的数据表明，使用 Chelex 法的 84 个样本总体的平均峰面积小于使用硅珠法的平均峰面积，与杨电的结论相吻合[3]：Chelex 法的缺点是提取的 DNA 纯度不高，容易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。但是使用双面胶粘贴法的 Chelex 法的样本检测效果优于使用双面胶粘贴法的硅珠法，原因可能是 Chelex 法提取到的双面胶上脱落细胞的 DNA 量较多，而硅珠法由于提取步骤较多，DNA 损失较大。

在使用 Chelex 法时，使用双面胶粘贴法的样本与使用另外两种转移方法的样本相比，整体而言，平均峰面积值较大，等位基因位点较为完整。在使用硅珠法时，使用双面胶粘贴法效果最差，等位基因位点缺失较为严重；使用 NaCl 溶液二步提取法与 TES 溶液二步提取法，效果均较好，而 NaCl 溶液二步提取法效果更胜一筹，原因可能是生理盐水模拟了人体环境，能够更好的保存脱落细胞。

4.3.4. 验证结果的探讨

由表 3 的数据我们可以看到，验证实验中，等位基因位点较为完整，十个样本总体的基因型检出率较高，达到了预期效果，适合公安机关的办案实践。由于在验证实验中，采用的是指纹中的脱落细胞，无法定量，也无法保证其细胞数达到汗斑中的数量。

5. 结论

通过大量的实验比较，最后通过模拟现场的试验验证，DNA 检测结果以 NaCl 溶液二步提取法和硅珠法最佳，不仅平均峰面积数值较大，检测的稳定性也较高，等位基因所检出的位点较为完整，缺失很少，比较适合应用于公安机关犯罪现场微量生物性接触检材的转移和提取。

致 谢

感谢南京市公安局玄武分局 DNA 实验室提供的帮助和支持。

基金项目

江苏省高等学校大学生实践创新训练计划一般项目，项目编号：20150329033Y；江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)；江苏省“十二五”一级学科省重点建设学科资助项目。

参考文献 (References)

- [1] 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.
- [2] Butler, J.M. 法医 DNA 分型专论: 方法学[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 263.
- [3] 杨电, 张丽萍, 刘超, 徐曲毅. Chelex 法和两种磁珠法提取接触 DNA 效果的比较[J]. 刑事技术, 2012(1): 11-13.