

生物检材 DNA 快速提取方法比较研究

张 倩 马 妍 聂同钢

天津市公安局物证鉴定中心, 天津 300384

摘要:目的 探讨生物检材 DNA 快速提取仪在日常生物检材中的提取效果。方法 将本实验室日常受理的生物检材, 包括血斑、烟蒂、毛发(带毛囊)、口香糖、肋软骨、精斑、脱落细胞棉签拭子等, 分别使用生物检材 DNA 快速提取仪、PDQeX2400 高速核酸提取仪、QIAcube 小型工作站进行 DNA 提取、定量并检测 21 个常染色体基因座的 STR 分型。并基于 PCR 扩增能力、提取时间、提取成本、污染防范、试剂安全性、程序简便性等方面进行综合评价。结果 对于常量检材, 三种提取方法提取的生物检材均获得较好的 STR 分型结果, 检出率 100%, 三者检测得到的 STR 分型 RFU 值及峰值均衡性无显著差异。对于脱落细胞检材, 利用生物检材 DNA 快速提取仪检出率为 88%, 高于 PDQeX2400 高速核酸提取仪(75%)和 QIAcube 工作站提取(81%)。经综合分析, 生物检材 DNA 快速提取仪具有高效、快速、低成本、安全、简便、防污染等优势。结论 采用生物检材 DNA 快速提取仪提取的生物检材检出率高, STR 分型结果良好, 且提取速度快, 通量高, 操作简便, 成本低、污染可能性小, 可广泛应用于法医物证实际案件检验, 为刑事技术及司法鉴定领域提供参考。

关键词: 法医遗传学; 生物检材 DNA 快速提取仪; PDQeX2400 高速核酸提取仪; QIAcube; 常规生物检材

随着法医遗传学技术的不断发展, 目前市面上各式各样的核酸提取仪^[1-4]层出不穷。生物检材 DNA 快速提取仪是天津市公安局物证鉴定中心研制的用于提取纯化^[5-6]案件中各类检材样本 DNA 的一整套技术体系, 主要包括快速提取仪、直扩体系试剂及直扩体系耗材等。本研究以实验室受理的常规检材为样品, 基于生物检材 DNA 快速提取仪、PDQeX2400 高速核酸提取仪和 QIAcube 工作站 DNA 提取方面的综合表现, 探讨生物检材 DNA 快速提取仪在检验量日趋攀升的背景下如何快速高效地完成生物物证的 DNA 检验。评价其适用性, 指出可能的优化方向, 为法医物证 DNA 快速提取领域提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

随机选取本实验室近期受理的检材, 口香糖、烟蒂、肋软骨、毛发(带毛囊)、棉签血、DNA 存储卡血斑、精斑、棉签拭子各 100 份, 按相关检材的保存方法保存待检。

1.2 研究方法

1.2.1 主要仪器与试剂

生物检材 DNA 快速提取仪(本实验室自主研发), PDQeX2400 高速核酸提取仪(ZyGEM 公司), QIAcube 工作站(QIAGEN 公司), 9700 型 PCR 扩增仪(Life Technologies, 美国), 3500XL 型遗传分析仪(Life Technologies, 美国), GeneMapper®ID-X 分析软件(Life

Technologies, 美国), 快速提取试剂(天津诺维莱博科技有限公司), QIAamp®DNA Investigator Kit 试剂盒(Qiagen, 德国), ZyGEM 试剂盒(ZyGEM 公司), PowerPlex®21 试剂盒(Promega, 美国)。

1.2.2 方法

分别剪取上述检材约 0.3 cm × 0.3 cm 于生物检材 DNA 快速提取仪专用提取管中, 各加入快速提取试剂 100 μL, 利用生物检材 DNA 快速提取仪提取 DNA(按说明书操作程序), 洗脱体积为 100 μL, 得到 DNA 样本。

分别剪取相同体积检材于 PDQeX2400 提取管中, 其中口香糖、烟蒂类检材各加入 10 μL BLUE buffer、2 μL forensicGEM、88 μL DNA-free water, 肋软骨、毛发(带毛囊)、棉签血、DNA 存储卡血斑类检材各加入 10 μL RED buffer、2 μL forensicGEM、88 μL DNA-free water, 精斑类、棉签拭子类检材各加入 10 μL Acrosolv、10 μL ORANGE buffer、2 μL forensicGEM、78 μL DNA-free water, 利用 PDQeX2400 高速核酸提取仪提取 DNA(按说明书操作程序), 洗脱体积为 100 μL, 得到 DNA 样本。

分别剪取相同体积检材于 1.5 mL 离心管中, 各加入 ATL560 μL, 蛋白酶 K20 μL, 置温浴摇匀仪 56℃保温 40 分钟后, 分别转移至 2.0 mL 离心管中, 利用 QIAGEN 公司 QIAcube 核酸自动纯化系统提取 DNA(按说明书操作程序), 设置洗脱体积为 40 μL, 得到 DNA 样本。

采用 PowerPlex®21 试剂盒在 9700 型 PCR 扩增仪上进行复合扩增。扩增体系为 10 μ L, 其中反应液 2 μ L, 引物 2 μ L, 模板量 4 μ L, 超纯水 2 μ L, 热循环参数参照试剂盒说明书。扩增产物经 3500XL 型遗传分析仪检测, GeneMapper®ID-X 软件分析得到分型结果。分型结果判断通过 GeneMapper®ID-X 软件分析, 获得 15 个 STR 基因座以上 (包括 15 个基因分型), RFU 值大于等于 50 的样本判定为检出样本, 15 个基因座以下且 RFU 值小于 50 的则判定为未检出样本。

2 结果

2.1 三种不同方法 STR 分型效果比较

利用生物检材 DNA 快速提取仪、PDQeX2400 高速核酸提取仪与 QIAcube 工作站提取的上述棉签血、口香糖、烟蒂、肋软骨、毛发 (带毛囊)、DNA 存储卡血斑、精斑等常量生物检材均获得较好的 STR 分型结果, 检出率均达到 100%, 三者检测得到的 STR 分型 RFU 值及峰值均衡性无显著差异 (图 1-图 2)。利用生物检材 DNA 快速提取仪、PDQeX2400 高速核酸提取仪与 QIAcube 工作站提取的上述脱落细胞棉签拭子等微量检材, 其中生物检材 DNA 快速提取仪检出率为 88%, PDQeX2400 高速核酸提取仪检出率为 75%, QIAcube 工作站提取检出率为 81%, 三者检测得到的 STR 分型 RFU 值及峰值均衡性有无显著性差异。(见表 1、图 3)

表 1 三种方法提取检材检出率

检材	生物检材 DNA 快速提取仪		PDQeX2400 高速核酸提取仪		QIAcube 工作站	
	检出	成功率	检出	成功率	检出	成功率
棉签血	100	100%	100	100%	100	100%
口香糖	100	100%	100	100%	100	100%
烟蒂	100	100%	100	100%	100	100%
肋软骨	100	100%	100	100%	100	100%
毛发 (带毛囊)	100	100%	100	100%	100	100%
DNA 存储卡血斑	100	100%	100	100%	100	100%
精斑	100	100%	100	100%	100	100%
脱落细胞棉签拭子	88	88%	75	75%	81	81%



图 1 生物检材 DNA 快速提取仪棉签血 STR 图谱



图 2 生物检材 DNA 快速提取仪肋软骨 STR 图谱

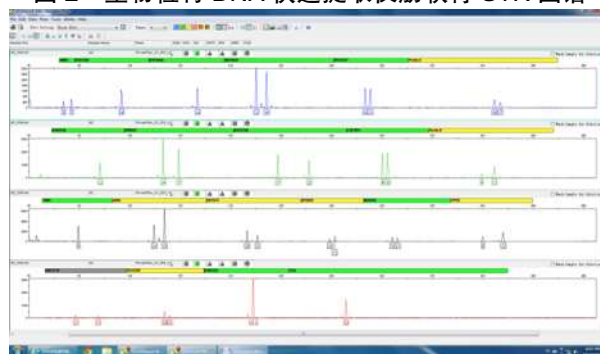


图 3 生物检材 DNA 快速提取仪脱落细胞棉签拭子 STR 图谱

2.2 三种不同方法提取时间比较

生物检材 DNA 快速提取仪提取上述检材用时 15 分钟; PDQeX2400 高速核酸提取仪提取上述检材用时 20 分钟; QIAcube 工作站提取用时 76 分钟; 生物检材 DNA 快速提取仪的提取效率优于后两者。

2.3 三种不同方法提取成本比较

生物检材 DNA 快速提取仪为本课题研发的一整套技术体系, 包括提取仪、专用反应管及试剂, 提取成本大约在每个检材 10 元; PDQeX2400 高速核酸提取仪是新西兰进口设备, 以 ZyGEM 的专利嗜热蛋白酶技术^[7-10]为基础并结合微流控技术^[11-13], 提取成本 50 元/个检材; QIAcube 工作站是德国 QIAGEN 公司离心柱全自动核酸纯化仪, 提取成本 52 元/个检材; 生物检材 DNA 快速提取仪在成

本上明显低于后两者。

2.4 三种不同方法防污染比较

生物检材 DNA 快速提取仪为封闭的系统,且在实验过程中无需更换反应管,这样就避免了检验过程中转移样品或试剂可能造成的污染,抗污染能力强;PDQeX2400 高速核酸提取仪为封闭的系统,一步式提取杜绝了样品污染,抗污染能力强;QIAcube 工作站虽然有自动化的移液枪头精确地实现试液转移但也存在一定样品间的污染的可能;生物检材 DNA 快速提取仪和 PDQeX2400 高速核酸提取仪在防污染上优于 QIAcube 工作站。

2.5 三种不同方法安全性比较

生物检材 DNA 快速提取仪为封闭的系统,有效保护操作人员的安全,且课题研发的裂解液是基于低共熔溶剂^[14-15]原理配制,该溶剂与其他分离技术相结合被广泛用于蛋白质和核酸的纯化,环保且可降解,安全无毒性;PDQeX2400 高速核酸提取仪为封闭的系统,有效保护操作人员的安全;QIAcube 工作站为封闭的实验环境,保护操作人员免受潜在感染性标本的威胁;三者安全性上均能对操作人员进行有效的防护。

2.6 三种不同方法程序简便性比较

生物检材 DNA 快速提取仪可实现一步截留载体,试剂不含抑制剂可与后续 PCR 试剂完全兼容,无需纯化可直接进行后续 PCR 反应;PDQeX2400 高速核酸提取仪使用嗜热酶提取,无抑制剂加入,且专利 buffer 可以去除样品本身抑制剂,无需纯化,可直接进行 PCR 反应;QIAcube 工作站预装有各种应用的纯化程序,步骤为抽提、洗涤和纯化,仍存在震荡、离心、移液等过程,较为复杂;生物检材 DNA 快速提取仪和 PDQeX2400 高速核酸提取仪在程序简便性上优于 QIAcube 工作站。

3 讨论

以初次检出 15 个或以上分型清晰的基因座为检出“成功”,比较实验结果说明,生物检材 DNA 快速提取仪在常量检材的提取上和磁珠法的结果无明显差异,均可广泛用于日常案件的检验,但生物检材 DNA 快速提取仪无需复杂的提取过程,仅通过一步截留载体即可进行直扩、检测获得完整的 STR 分型,可以大大缩短 DNA 检验时间。

在实验过程中采用直扩试剂对接触性微量检材进行检验,并与以常规磁珠法提取后检验结果进行比对,结果显示,生物检材 DNA 快速提取仪成功率高于常规磁珠提取法。其主要原因是生物检材 DNA 快速提取仪剪取适量检材不需再加入其它试剂即直接扩增, DNA 浓度较高;而

常规磁珠法在提取环节中加入试剂使检材 DNA 被稀释,降低了 DNA 模板浓度。

经综合分析,生物检材 DNA 快速提取仪提取的生物检材检出率高,STR 分型结果良好,且提取速度快,通量高,操作简便,成本低、污染可能性小,可广泛应用于法医物证常量及微量检材的检验,为刑事技术及司法鉴定领域的 DNA 快速提取提供参考。

参考文献:

- [1]蔡炜,于雷.两种全自动核酸纯化仪的应用[J].法医学杂志,2020,36(06):797-800.
- [2]杨佳萍,周凯.QIAcube 核酸纯化仪和 AutomateExpress 核酸提取仪联合运用提取混合斑中精子 DNA[A].法医临床学专业理论与实践——中国法医学学会·全国第十九届法医临床学学术研讨会论文集[C].中国法医学学会法医临床学专业委员会,中国法医学学会,2016:3.
- [3]李淑侠,沈金建,曹佩军,李志超.全自动核酸提取仪联合真空浓缩仪在法医学中的应用[J].法医学杂志,2021,37(02):220-224.
- [4]林丹义,张科平,许洁,颜黎栩,骆新兰,刘艳辉.全自动核酸提取仪与手动提取组织 DNA 的效率比较[J].临床与实验病理学杂志,2017,33(12):1398-1399.
- [5]许朋,郑春辉,孙智勇,余兰,冯昆.磁珠法快速提取基因组 DNA 的实验研究[J].生物信息学,2018,16(03):190-195.
- [6]张敏.四种核酸提取磁性纳米颗粒的研制及其应用[D].兰州大学,2019.
- [7]嗜热蛋白酶开发及应用.湖北省,武汉大学,2008-01-01.
- [8]王雅嗣.嗜热蛋白酶 WF146 的 C 端与热稳定性相关性质的研究[D].武汉大学,2017.
- [9]夏靖颖.重组极端嗜热蛋白酶 Pyrolysin 及其突变体的性质和应用研究[D].武汉大学,2021.
- [10]轩小然.嗜热蛋白酶 Tth0724 的枯草杆菌表达及其应用[D].吉林大学,2022.
- [11]韩俊萍,孙敬,欧元,叶健,刘耀,李彩霞.微流控技术在法医 DNA 快速检验方面的应用[J].中国测试,2016,42(01):53-60.
- [12]杜猛,张颖,高珊,徐示,张广峰,徐小玉,聂昊,郭柯利,刘开会.微流控芯片技术应用于精阴混合斑分离的研究进展[J].刑事技术,2023,48(02):138-145.
- [13]韩俊萍,孙敬,欧元,叶健,刘耀,李彩霞.微流控技术在法医 DNA 快速检验方面的应用[J].中国测试,2016,42(01):53-60.

[14]徐凯佳.低共熔溶剂应用于生物大分子的分离分析研究[D].湖南大学,2018.

[15]陈静.低共熔溶剂在复杂样品分离分析及光化学传感

中的研究与应用[D].湖南大学,2021.

作者简介：张倩（1985-），女，工作单位：天津市公安局物证鉴定中心 300384。