

·技术与应用·

尼龙膜套管分离技术对混合斑中精子细胞 DNA 的提取

马 骏¹, 童 奇², 高良弼¹, 朱 川¹, 江志强¹

(1. 长兴县公安司法鉴定中心, 浙江 长兴 313100; 2. 安吉县公安司法鉴定中心, 浙江 安吉 313300)

摘要: 目的 建立新型的混合斑中精子细胞分离的方法, 并评价其应用价值。方法 收集性侵案件中的 40 份混合斑检材, 分别采用常规差异裂解法和尼龙膜套管分离技术进行精子细胞分离, 使用硅膜试剂盒 (Forensic DNA Extraction Kit for Soft Tissues) 提取精子细胞 DNA, AmpFℓSTR® Identifiler® Plus PCR 扩增试剂盒进行 PCR 扩增, 3500xL 基因分析仪进行电泳检测, 并对两种分离方法的结果进行对比。结果 40 份混合斑检材中, 采用尼龙膜套管分离技术的检材仅 3 份有女性成分微弱残留, 余均获得了完整的单一男性分型。而采用常规差异裂解法分离的检材中, 有 25 份完全未检出男性精子细胞 STR 分型, 15 份检出男性精子细胞 STR 分型 (7 份不完整男性精子细胞 STR 分型, 6 份有女性成分残留, 2 份单一的男性精子细胞 STR 分型)。结论 本研究建立的尼龙膜套管分离技术适用于混合斑中精子细胞的分离, 特别是对含有大量女性细胞而精子细胞较少的检材提取效果明显, 整个提取实验成本低廉、快速简便。

关键词: 法医遗传学; 精子细胞; 膜分离技术; 混合斑; 尼龙膜套管; 差异裂解

中图分类号: DF795.2 文献标志码: A doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2018.04.015

文章编号: 1004-5619(2018)04-0417-03

Extraction of DNA from Sperm Cells in Mixed Stain by Nylon Membrane Bushing Separation Technique

MA Jun¹, TONG Qi², GAO Liang-bi¹, ZHU Chuan¹, JIANG Zhi-qiang¹

(1. Forensic Judicial Appraisal Center of Changxing Public Security Bureau, Changxing 313100, China; 2. Forensic Judicial Appraisal Center of Anji Public Security Bureau, Anji 313300, China)

Abstract: **Objective** To establish a novel method for the separation of sperm cells in mixed stain, and to evaluate its application value. **Methods** Totally 40 mixed stain samples were collected from sexual assault cases. Sperm cells were separated by the conventional differential lysis method and the nylon membrane bushing separation technique, respectively. The DNA of sperm cells was extracted with the silicon membrane kit (Forensic DNA Extraction Kit for Soft Tissues). The PCR amplification was performed using AmpFℓSTR® Identifiler® Plus kit, and the products were electrophoresed by 3500xL genetic analyser. The results of two separation methods were then compared. **Results** Complete and single-source male STR genotypes could be obtained from all the 40 mixed stain samples except three samples with minimal residual of female DNA by the nylon membrane bushing separation technique. The STR genotypes of sperm cells could not be detected in 25 samples, which were obtained in 15 samples (seven were of incomplete male STR genotypes, six with residual of female DNA, two were complete and single-source STR genotypes of sperm cells). **Conclusion** The nylon membrane bushing separation technique developed in present study can be used in the separation of sperm cells in mixed stain, especially for the extraction of a small amount of sperm from a large quantity of female cells, which is inexpensive, rapid and simple.

Keywords: forensic genetics; spermatid; membrane separation technology; mixed stain; casing, nylon membrane; differential pyrolysis

法医 DNA 分析技术在刑事司法实践中的作用日益凸显。大多数性侵案件中, 常常遇到混合斑的 DNA 检验, 如何从女性阴道分泌液与男性精液组成的混合

斑中获得精子细胞是检验鉴定的关键, 而精子的个体来源鉴定又是案件侦破和诉讼的关键。一般此类混合斑的检材载体类型较多, 采用常规的差异裂解法^[1]对

精子细胞进行分离,实验时间长,步骤繁琐,特别是在女性阴道上皮细胞大量存在而精子细胞较少时,很难获得完整、单一的精子细胞 DNA 分型,有时即使获得了分型结果,也多为混合分型^[2]。而在实践中面对大量检材时,常要求在短时间内进行精子细胞的提取,但存在消耗时长和提取效率之间的不平衡。基于此,笔者运用尼龙膜套管分离技术,建立一种新型的混合斑中精子细胞分离的方法,以有效解决上述难题。

1 材料与方法

1.1 材料

40 份男女性混合斑检材来源于长兴县公安局所承办的性侵案件,其中阴道拭子 26 份、内裤 8 份、床单 3 份、卫生纸 2 份、卫生棉 1 份。

1.2 主要试剂和仪器

人精液 PSA 检测金标试剂条(德国 MERCK 公司),硅膜试剂盒(Forensic DNA Extraction Kit for Soft Tissues,加拿大 Pulse 公司),AmpF ℓ STR[®] Identifier[®] Plus PCR 扩增试剂盒(美国 AB 公司)。

尼龙膜套管(加拿大 Pulse 公司),9700 型 PCR 仪、3500xL 基因分析仪(美国 AB 公司),5355 型恒温混匀仪(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 精子细胞分离方法

依据 GA 766—2008 人精液 PSA 检测金标试剂条法^[3]对 40 份检材(1~40 号)进行检验,结果均呈阳性,其中 21、29 号(阴道外口拭子)和 36 号(现场床单)检材为弱阳性。对所有样本分别采用常规差异裂解法和尼龙膜套管分离技术对精子细胞进行分离。

1.3.1 常规差异裂解法

通过多波段光源照射,剪取 40 份检材上可疑斑迹适量(约 0.5 cm×0.5 cm),置于 1.5 mL 离心管中,剪碎,加入 TNE 缓冲液 900 μ L、10% SDS 裂解液 100 μ L、10 mg/mL 蛋白酶 K 7 μ L,37 $^{\circ}$ C 下置于 5355 型恒温混匀仪上混匀 4 h。

将 1.5 mL 离心管漩涡振荡 1 min。采用套管离心法(离心半径 7 cm,5 000 r/min,离心 15 min),用 1 mL TNE 缓冲液浸润后,以离心半径 7 cm,5 000 r/min,离心 10 min,弃去上清液。外部 1.5 mL 离心管得沉淀精子及女性 DNA 残留物,加入 1 mL TNE 缓冲液重新悬浮,以离心半径 7 cm,13 000 r/min,离心 5 min,重复 3 次后弃去上清液,得到精子细胞沉淀约 50 μ L。

1.3.2 尼龙膜套管分离技术

通过多波段光源照射,剪取 40 份检材上可疑斑迹适量(约 0.4 cm×0.4 cm),置于 2 mL 离心管中,剪碎,加入 TNE 缓冲液 1.35 mL、10% SDS 裂解液 150 μ L、10 mg/mL 蛋白酶 K 12 μ L,56 $^{\circ}$ C 下置于 5355 型恒温混匀仪上混匀 4 h。

将 2 mL 离心管漩涡振荡 1 min,以离心半径 7 cm,2 500 r/min,离心 2 min^[4],分批次吸取上清液加入尼龙膜内套管中,10 000 \times g 离心 1 min,期间更换外套管。用 600 μ L TNE 缓冲液清洗离心管内检材 1 次,漩涡振荡 1 min,以离心半径 7 cm,2 500 r/min,离心 2 min,吸取上清液至前述尼龙膜内套管中,10 000 \times g 离心 1 min。用 600 μ L TNE 缓冲液清洗内套管分离的精子细胞 3 次,10 000 \times g 离心 1 min,内套管尼龙膜上得分离精子细胞。

为验证精子细胞是否完全被尼龙膜截获,分别收集最后的清洗液,10 000 \times g 离心 5 min,得沉淀约 50 μ L,按照精子细胞 DNA 提取方法提取,检验是否有精子细胞被清洗滤过尼龙膜。

1.4 精子细胞 DNA 的提取、PCR 扩增与分型检测

将分离所得的精子细胞使用硅膜试剂盒进行提取。

经过两种方法提取的精子细胞 DNA 模板采用 AmpF ℓ STR[®] Identifier[®] Plus PCR 扩增试剂盒在 9700 型 PCR 仪上进行复合扩增,扩增体系为 10 μ L,扩增产物使用 3500xL 基因分析仪进行电泳分离和激光扫描分析,采用 GeneMapper[™] ID-X v1.4 软件分析获得检材的 STR 分型结果。

2 结 果

40 份混合斑检材采用两种提取方法的分型结果见表 1。采用尼龙膜套管分离技术分离的检材仅 3 份有女性成分微弱残留,其余均获得了完整的单一男性精子细胞 STR 分型,峰值均在 4 000~30 000 RFU,均衡性较好。采用常规差异裂解法分离的检材中,有 25 份完全未检出男性精子细胞 STR 分型,15 份检出男性精子细胞 STR 分型(7 份为不完整的男性精子细胞 STR 分型,6 份有女性成分残留,2 份为完整的单一男性精子细胞 STR 分型)。

尼龙膜套管最后的清洗液沉淀中未检出男性精子细胞,说明在高速离心清洗时无精子细胞透过尼龙膜,精子细胞无明显损失。

表 1 40 份混合斑检材采用两种提取方法的分型结果

(N=40)

载体	份数	分型结果	
		常规差异裂解法	尼龙膜套管分离技术
阴道拭子(中段擦拭)	16	2 份检出男性分型且有女性成分残留,4 份不完整的单一男性分型,10 份未检出男性分型	2 份有女性成分残留,其余均为完整的单一男性分型
阴道拭子(外口擦拭)	10	2 份检出男性分型且有女性成分残留,2 份不完整的单一男性分型,1 份完整的单一男性分型,5 份未检出男性分型	均得到完整的单一男性分型
床单	3	3 份均未检出男性分型	均得到完整的单一男性分型
内裤(棉质)	3	2 份检出男性分型且有女性成分残留,1 份未检出男性分型	1 份有女性成分残留,其余均为完整的单一男性分型
内裤(丝质)	5	1 份完整的单一男性分型,1 份不完整的单一男性分型,3 份未检出男性分型	均得到完整的单一男性分型
卫生纸	2	2 份均未检出男性分型	均得到完整的单一男性分型
卫生棉	1	未检出男性分型	均得到完整的单一男性分型

3 讨 论

性侵案件中混合斑检材的载体类型较为复杂,一般情况下,阴道拭子、内裤较多。常规差异裂解法对精子细胞进行分离,往往都在体积较小的 1.5 mL 离心管中^[5],振荡分离时空间有限,不利于精子细胞与载体的分离。因此,混合斑中的精子细胞 DNA 能否检验成功,关键在于能否实现精子细胞与载体的分离^[6]。

尼龙膜套管包括柱状内管和 2 mL 离心外管,内管直径约 8 mm、长 2.5 cm(最多可加入 800 μ L 液体),底部为孔径 0.45 μ m 的尼龙膜(经过疏水处理),对 DNA 低吸附,在无离心力的作用下液体无法渗漏。精子细胞膜富含硫醇蛋白^[7],需在二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、 β -巯基乙醇等还原剂的作用下才能打开其中的二硫键,从而破膜释放 DNA^[8]。精子细胞一般头部长 3.0~5.0 μ m、宽 2.0~3.0 μ m,体部长 5.0~7.0 μ m、宽 1.0 μ m,尾部长 40~60 μ m^[9],根据分子筛原理,当消化后的混合液体流经内管后,未被消化的精子细胞经过滤被拦截在尼龙膜内,女性上皮细胞 DNA 成分随溶液穿过尼龙膜进入外套管内,从而达到物理分离精子细胞的目的。

本研究在第一步消化时直接采用 56 $^{\circ}$ C 孵育,能提高蛋白酶 K 的裂解效率(蛋白酶 K 在 56~65 $^{\circ}$ C 时活性较高^[10]),精子在硫醇蛋白的保护下不受影响,而女性上皮细胞则能够基本消化干净,运用低速离心分离去除载体,再利用尼龙膜过滤,高速离心收集精子细胞,从而达到物理分离精子细胞的目的。尼龙膜套管具有疏水、低吸附 DNA 的特性,女性 DNA 成分几乎不会残留在尼龙膜上,清洗精子细胞时也不会因为操作因素导致精子细胞的损失,使得分离较为彻底。

本研究中有部分阴道中段拭子和棉质内裤的检材通过尼龙膜套管分离技术检出女性成分残留,分析其原因是女性上皮细胞含量较多,增加洗涤次数可以

解决该问题。常规差异裂解法中部分载体(如床单、丝质内裤、卫生纸、卫生棉)检出率较低,分析其原因是载体的纤维有较强的吸附力,精子细胞与载体分离不彻底,与尼龙膜套管分离技术相比,常规差异裂解法洗脱能力有限。因此,尼龙膜套管分离技术检出完整的单一男性分型的数量要高于常规差异裂解法,尼龙膜对于精子细胞的分离也较为彻底。

当然,混合斑中精子细胞的分离方法还有很多,如激光捕获显微切割技术、显微操作、流式细胞仪技术、免疫磁珠沉淀等^[8],但是,多数方法对于实验操作者的经验和技术要求较高,基层实验室在相关仪器设备的配备上也有限制,因此,在大量的日常检案中很难发挥作用。

综上所述,本研究建立的尼龙膜套管分离技术适用于混合斑中精子细胞的分离,可以将混合斑中精子细胞和女性细胞的 DNA 彻底分离,减少精子损失,特别是对含有大量女性细胞且精子细胞较少的检材提取效果明显,整个提取实验成本低廉、快速简便,无需特殊设备,在日常检案中具有较高的应用价值。

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,2002:39-40.

[2] 吕德坚,陆惠玲,陈玉川. 混合斑的 DNA 分型解析[J].法医学杂志,2002,18(3):185-188.

[3] 李兆隆,徐秀兰,林涛,等. 检验人精浆特异蛋白 P30 免疫胶体金试剂条的研制[J].法医学杂志,2002,18(4):210-212.

[4] 徐庆文,程莉,周怀谷. 手纸中混合斑的精子 DNA 提取方法探讨[J].法医学杂志,2005,21(4):310-311.

[5] 刘峰,李裁儿,尹路,等. DNA IQTM System 试剂盒在精斑检验中的应用[J].法医学杂志,2011,27(6):460.

[6] 刘琳,陈水琴,胡志敏,等. 混合斑中精子细胞分离方法的应用研究进展[J].生命科学研究,2014,18(1):55-59,89.

(下转第 427 页)

- confidence SNPs covering the majority of known clades[J]. *Mol Biol Evol*,2015,32(3):661-673.
- [64] SHI H, DONG Y L, WEN B, et al. Y-chromosome evidence of southern origin of the East Asian-specific haplogroup O3-M122[J]. *Am J Hum Genet*, 2005,77(3):408-419.
- [65] MIZUNO N, KITAYAMA T, FUJII K, et al. A forensic method for the simultaneous analysis of biallelic markers identifying Y chromosome haplogroups inferred as having originated in Asia and the Japanese archipelago[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2010,4(2):73-79.
- [66] BUS M M, KARAS O, ALLEN M. Multiplex pyrosequencing of InDel markers for forensic DNA analysis[J]. *Electrophoresis*,2016,37(23-24):3039-3045.
- [67] LIU J, WANG J, ZHANG X, et al. A mixture detection method based on separate amplification using primer specific alleles of INDELs-a study based on two person's DNA mixture[J]. *J Forensic Leg Med*, 2017,46:30-36.
- [68] SANTURTUN A, RIANCHO J A, AROZAMENA J, et al. Indel analysis by droplet digital PCR: a sensitive method for DNA mixture detection and chimerism analysis[J]. *Int J Legal Med*,2017,131(1):67-72.
- [69] KIM B Y, PARK J H, JO H Y, et al. Optimized detection of insertions/deletions (INDELs) in whole-exome sequencing data[J]. *PLoS One*,2017,12(8):e182272.
- [70] AU C H, LEUNG A Y, KWONG A, et al. INDELseek: detection of complex insertions and deletions from next-generation sequencing data[J]. *BMC Genomics*,2017,18(1):16.
- [71] 孙宽,张素华,朱如心,等. 新一代遗传标记——InDel 研究进展[J].*法医学杂志*,2013,29(2):134-139,143.
- (收稿日期:2017-10-26)
(本文编辑:张素华)

(上接第 419 页)

- [7] 吴丹,曹禹,许炎,等. 差异提取试剂盒在混合斑 DNA 提取中的作用[J].*法医学杂志*,2009,25(6):440-442.
- [8] 任文彦,张慧,薛大忠. 混合斑精子 DNA 分析的研究进展[J].*辽宁警专学报*,2010(1):86-89.
- [9] 侯一平. 法医物证学[M].2 版.北京:人民卫生出版社, 2004.
- [10] 刘杨柳,武小芳,胡树样,等. 蛋白酶 K 的性质及其在核酸提取中的应用[J].*食品研究与开发*,2017,38(10):196-199.
- (收稿日期:2017-07-31)
(本文编辑:张素华)