

·论 著·

唾液菌群的直接PCR扩增-高分辨率熔解曲线分析及其法医学应用

杨瑞, 陈炯, 赵贵森

河南科技大学法医学院, 河南 洛阳 471023

摘要: 目的 建立一种基于直接PCR(direct PCR, dPCR)扩增和高分辨率熔解(high resolution melting, HRM)曲线分析的唾液菌群快速检测技术, 评估其法医学应用价值。方法 离心收集唾液中的细菌后重悬于Tris-EDTA(TE)缓冲液, 直接作为模板用于16S rDNA V4区的扩增和HRM曲线分析, 即dPCR-HRM, 计算样本HRM图谱相对于参考图谱的判型置信度(genotype confidence percentage, GCP)。以传统的试剂盒(kit)提取模板DNA后再行PCR-HRM(即kPCR-HRM)为参考, 验证dPCR-HRM的可行性。用dPCR-HRM法分析梯度稀释模板、群体样本和模拟唾液斑样本, 评估其灵敏度、分型能力和检材适应性。结果 dPCR-HRM法可在90 min内得到唾液菌群的HRM图谱, 与kPCR-HRM法之间的GCP>95.85%。应用dPCR-HRM法, 一般个体0.29 nL的唾液即可测得菌群HRM型。61例唾液样本可分为10种型, 8h之内的唾液斑与新鲜唾液分型相同(GCP>90.83%)。结论 dPCR-HRM技术可用于唾液菌群的快速分型, 且具有成本低、操作简单等优点。**关键词:** 法医遗传学; 高分辨率熔解; 聚合酶链反应; 唾液; 菌群结构

中图分类号: DF795.2 文献标志码: A doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2021.511006

文章编号: 1004-5619(2022)06-0709-10



Analysis of Salivary Bacterial Community by Direct PCR and High Resolution Melting Curve and Its Forensic Applications

YANG Rui, CHEN Jiong, ZHAO Gui-sen

School of Forensic Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan Province, China

Abstract: **Objective** To develop a rapid test for salivary bacterial community based on direct PCR (dPCR) and high resolution melting (HRM) curve analysis, to evaluate its application value in forensic medicine. **Methods** The salivary bacteria were collected by centrifugation and then resuspended in Tris-EDTA (TE) buffer, and directly used as the template for amplification and HRM curve analysis (dPCR-HRM) of the 16S rDNA V4 region. The genotype confidence percentage (GCP) of the HRM profiles compared with the reference profile was calculated. The template DNA was extracted by traditional kit and then PCR-HRM (namely kPCR-HRM) was used as reference to validate the feasibility of dPCR-HRM. The gradient dilution templates, population samples and simulated salivary stains were analyzed by dPCR-HRM to evaluate its sensitivity, typing ability and adaptability. **Results** Using dPCR-HRM method, the HRM profiles of salivary bacterial community were obtained within 90 minutes. The GCP between dPCR-HRM and kPCR-HRM was greater than 95.85%. For general individuals, the HRM type of bacterial community could be determined with 0.29 nL saliva by dPCR-HRM. The 61 saliva samples could be divided into 10 types. The typing of salivary stains deposited within 8 h was the same as those of fresh saliva (GCP>90.83%). **Conclusion** dPCR-HRM technology can be used for rapid typing of salivary bacterial community, and has the advantage of low cost and simple operation.

Keywords: forensic genetics; high resolution melting; polymerase chain reaction (PCR); saliva; bacterial community

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81501634)

作者简介: 杨瑞(1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事法医物证学研究; E-mail: 464549844@qq.com

通信作者: 赵贵森, 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事法医物证学研究; E-mail: lyfy@haust.edu.cn

引用格式: 杨瑞, 陈炯, 赵贵森. 唾液菌群的直接PCR扩增-高分辨率熔解曲线分析及其法医学应用[J]. 法医学杂志, 2022, 38(6): 709-718.

To cite: YANG R, CHEN J, ZHAO G S. Analysis of salivary bacterial community by direct PCR and high resolution melting curve and its forensic applications[J]. Fayixue Zazhi, 2022, 38(6): 709-718.

细菌是人体的重要组成部分,在人体各部位形成复杂多样的微生态系统^[1-2]。由于性别、年龄、生活环境、饮食习惯、健康状况等的不同,人体菌群具有个体特异性,同一个体不同部位的菌群也不相同^[3]。人体菌群很容易转移到现场物品上,或随分泌物、排泄物遗留在现场,甚至比人体细胞的数量还多,且能在一定时间内保持菌群原有的特性^[4]。人死后,尸体各处的菌群随腐败进展而发生有规律的变化^[5-6]。现场检材或尸体的菌群特征可提供斑痕类型、来源个体及死亡时间等信息^[7-8],菌群分析作为解决法医学问题的新途径日益受到关注。

菌群可用形态、生物化学和遗传学等方法进行分析,但受检材条件等限制,目前法医学菌群分析主要指菌群的DNA分析,常用的标记基因是以序列变异为主的16S rDNA,分析过程一般包括检材处理、DNA提取、扩增、PCR产物检测和分析等多个环节^[4-10]。在DNA提取环节,又有裂解、纯化等步骤,耗时长,检材用量大。PCR产物则须用杂交、测序或梯度凝胶电泳等特殊的技术进行分离、检测,操作繁琐,成本高,污染风险大。此外,菌群PCR是一种以群体特征为研究对象的多模板PCR^[11],不同于法医学常用的多重PCR,不能按照传统的PCR来优化和评价。现有的菌群分析技术均来自其他领域,不符合法医学工作特点,也未经改造和验证,难以满足法医学检验的要求。

熔解曲线分析法利用解链温度差异来鉴别DNA,在荧光定量PCR仪上扩增的DNA可直接进行熔解曲线分析^[12]。使用EvaGreen等饱和荧光染料和高精度的PCR仪,可以提高熔解曲线的分辨率,即高分辨率熔解(high resolution melting, HRM)。HRM过程简单、快速,灵敏度和信息含量高,已应用于变异或突变筛查、病原体快速检测、法医DNA分型等^[13-16]。关于HRM在菌群分析中的应用,EVERMAN等^[17]已有初步探索,WANG等^[18]也已将其用于人类唾液菌群的比较,但都要先提取菌群的宏基因组DNA。直接PCR(direct PCR, dPCR)扩增已是成熟的法医DNA分型技术,在菌落筛选、病原体诊断中也有应用^[19],可以简化操作、缩短时间,是菌群DNA分析快速化的另一潜在途径。16S rDNA是菌群分析中最常用的标记基因,其V4高变区在进化关系上更接近16S rDNA全长,通用性和分辨率均较高,且在法医学领域已有报道^[18,20]。

本研究拟结合dPCR和HRM技术,以16S rDNA V4区为例,建立一种免提取、免电泳的唾液菌群快速检测技术,即dPCR-HRM技术,并评估其法医学应用价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

热启动Taq酶、dNTPs、Ex Taq Buffer(Mg²⁺ free)和MgCl₂均购自日本TaKaRa公司,20×EvaGreen荧光染料购自美国Biotium公司,多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)A01菌株的基因组DNA由河南科技大学基因工程疫苗课题组赠送,细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,Tris-EDTA(TE)缓冲液(pH=8.0)购自北京索莱宝科技有限公司。细菌16S rDNA V4区的通用引物^[18]由北京博迈德基因技术有限公司合成,序列为:518F(5'-CCAGCAGCCGCGTAAT-3')和806R(5'-GGACTACCA GGGTATCTAATCCTGTT-3')。

Rotor-Gene Q实时荧光定量PCR仪(德国Qiagen公司),FLA6000微量紫外可见分光光度计(杭州晶飞科技有限公司),TGL-16B高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 样本采集

按照知情同意原则,采集本校79名志愿者的非刺激性唾液^[21]共84份。采集前至少禁食禁水1h,采集时志愿者身体前倾,收集自然流出的唾液约1 mL于1.5 mL微量离心管中并编号,于采样后30 min内进行后续处理或置于-80℃保存备用。其中,1~5号志愿者为本课题组成员(年龄20~60岁;男性3名,女性2名;吸烟者2名,不吸烟者3名),在初次采样3个月后重复采样1次,初次采样样本编号为1~5号,第二次采样样本编号为T1~T5。1号、2号志愿者在第二次采集唾液的同时无菌采集外周静脉血,常规Chelex法提取基因组DNA。其他样本来自本校学生,编号6~79号。

本研究已获得河南科技大学第一附属医院医学伦理委员会批准(审批文号:20180306)。

1.3 实验方法

1.3.1 样本预处理

唾液:新鲜或快速解冻平衡至室温的唾液,涡旋振荡30 s,常温下以离心半径4 cm,3 000 r/min,离心30 s,将上清液移至另一1.5 mL微量离心管中,以离心半径4 cm,12 000 r/min,离心10 min,弃去上清液,加入等体积TE缓冲液重悬。

唾液斑:10号、11号唾液样本在采集后立即制成两组唾液斑,每组20份,每份均取10 μL滴加到载玻片上,室温放置形成唾液斑,分别沉积0、0.5、2、4、8 h后用TE缓冲液润湿的纱线擦拭转移至加有50 μL TE缓冲液的微量离心管中,室温浸泡30 min,涡旋振

荡 30 s, 以离心半径 4 cm, 3 000 r/min, 离心 30 s, 取上清液作为 PCR 模板。

混检样本: 分别取编号为 T1~T5 的唾液样本各 50 μL 等体积混合, 制成可以代表一般个体唾液细菌含量和菌群结构的混检样本^[22], 采取与唾液样本相同方法处理后, 分为 2 份: 1 份从 3.5 倍至 3.5×10^5 倍行 10 倍梯度稀释; 另 1 份用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取, 紫外分光光度法定量后, 从 250 ng/ μL 至 2.5×10^{-3} ng/ μL 行 10 倍梯度稀释。

1.3.2 菌群宏基因组 DNA 提取

取 T1~T5 号唾液样本按 1.3.1 节方法制成 TE 悬液各 50 μL , 分别用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 具体操作参照试剂盒说明书。用微量紫外可见分光光度计测定 DNA 浓度, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.3 PCR-HRM 检测

PCR 体系为 20 μL , 包括: 10 $\mu\text{mol/L}$ 的正、反向引物各 0.4 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μL , 10 \times PCR 缓冲液 2 μL , 25 mmol/L MgCl_2 2.4 μL , 20 \times EvaGreen 1 μL , 5 U/ μL 热启动 *Taq* 酶 0.2 μL , 以 1.3.1 节制备的细菌悬液或 1.3.2 节提取的菌群 DNA 为模板, 补纯水至 20 μL 。循环参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 预变性; 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 40 个循环, 采用降落 PCR, 前 25 个循环每次退火温度降低 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 。HRM 条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 降温至 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 min, 再以最高速度升温至 75 $^{\circ}\text{C}$ 后开始以每步 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 逐步升温、采集荧光信号, 直至 95 $^{\circ}\text{C}$ 。上述过程即为 PCR-HRM。其中, 直接以 1.3.1 节制备的细菌悬液为模板时, 称为 dPCR-HRM; 以 1.3.2 节试剂盒 (kit) 提取的细菌基因组 DNA 为模板时, 称为 kPCR-HRM。

每批次检测均以多杀性巴氏杆菌的基因组 DNA 和纯水分别作为阳性和阴性对照模板, 模拟斑痕实验时以擦拭载玻片空白区的纱线同步制作空白基底对照。以 Chelex 法提取的人外周静脉血基因组 DNA 为无菌模板, 验证引物和 PCR 扩增的特异性。每个反应至少设置两个复管。

1.4 方法评估

以已知序列的阳性对照模板 (多杀性巴氏杆菌基因组 DNA) 优化反应体系、循环参数, 建立细菌 16S rDNA V4 区的 PCR-HRM 法, 所得图谱与 uMelt^[23] (<https://dna-utah.org/index.html>) 预测图谱比较, 并用 10 倍梯度稀释 (250 ng/ μL 至 2.5×10^{-3} ng/ μL) 的多杀性巴氏杆菌 DNA 测试灵敏度。

分别以混检样本的菌群 DNA、菌群悬液及其梯度稀释液为模板, 优化建立的 kPCR-HRM、dPCR-HRM

技术, 并测试灵敏度。以建立的 kPCR-HRM、dPCR-HRM 法分别检测 T1~T5 号样本及混检样本, 比较两种方法所得图谱并验证其可行性和鉴别能力。

使用 dPCR-HRM 法, 间隔 1 d、1 周重复检测 T1~T5 号唾液样本, 评价方法的稳定性; 调查两组模拟唾液斑样本, 分析 dPCR-HRM 法用于斑痕检材的效果, 初步评价其法医学实用性; 调查混检样本菌群悬液的梯度稀释液, 分析样本稀释对 dPCR-HRM 图谱的影响, 探索一般个体获得菌群代表性 HRM 图谱的稀释度范围; 调查 61 份唾液样本 (编号 19~79), 根据相似度对样本图谱进行聚类, 计数各类样本的例数, 评价唾液菌群 dPCR-HRM 图谱的群体多样性, 再随机从上述 61 份样本中抽取 6 份进行盲测, 与原聚类结果进行比较, 验证 dPCR-HRM 用于未知样本分型的可行性。

1.5 数据分析

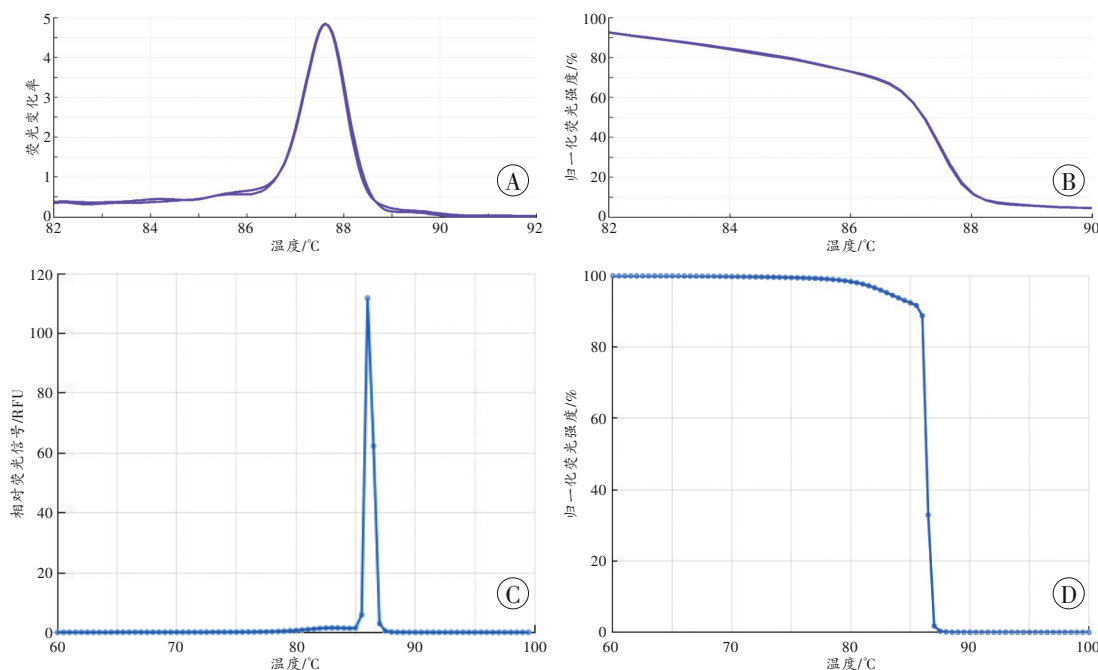
参考 NUNZIATA 等^[24-25]的方法, 以判型置信度 (genotype confidence percentage, GCP) 为衡量 HRM 图谱之间相似性的客观指标。待测样本相对于参考样本的 $\text{GCP} = 1.05^{[-0.02 \times d_n^2]}$, 其中 d_n 为待测曲线与参考曲线之间的欧氏距离。应用 Rotor-Gene Q 2.3.1 软件 (德国 Qiagen 公司), 结合人工核查, 进行数据分析和判型。

Rotor-Gene Q 2.3.1 软件采集扩增和熔解过程中的荧光强度数据, 自动生成扩增曲线和 HRM 曲线。根据扩增曲线的循环阈值 (cycle threshold, Ct) 排除扩增失败的反应管; 然后用 “Melt” 模式分析, 核查熔解曲线的峰型, 确定熔解的温度范围 (82.5~91 $^{\circ}\text{C}$); 再用 “HRM” 模式分析, 以熔解前 1 $^{\circ}\text{C}$ (81.5~82.5 $^{\circ}\text{C}$) 和后 1 $^{\circ}\text{C}$ (91~92 $^{\circ}\text{C}$) 两个区间的荧光值为准, 对原始 HRM 曲线进行归一化, 生成归一化的 HRM 曲线。在 “HRM” 模式下, 定义 “菌群型” 及其参考样本, 调整 GCP 界值, 查看待测样本的判型与 GCP 值。以 GCP=80% 为界值^[26], 判断两个 HRM 图谱是否能归为同一种菌群型。复管取均值后, 导出 GCP 等数据及熔解曲线和 HRM 图谱。涉及不同批次间的比较, 如群体样本调查时, 先把上述分批检测、导出的数据用 Origin 8 软件 (美国 OriginLab 公司) 进行整合, 各批次均包含 22 号样本, 以控制和修正批次间差异^[25], 然后导入 LabSpec 5 软件 (日本 HORIBA Scientific 公司) 统一进行平滑、扣基线和校准, 生成与系列图谱相应的数据矩阵, 再用 LabSpec 5 软件的 “Model” 模式进行建模分析, 结合数据和人工读图判定新检出的 “菌群型”, 统计各种型的数目。

2 结 果

2.1 细菌 16S rDNA V4区的PCR-HRM

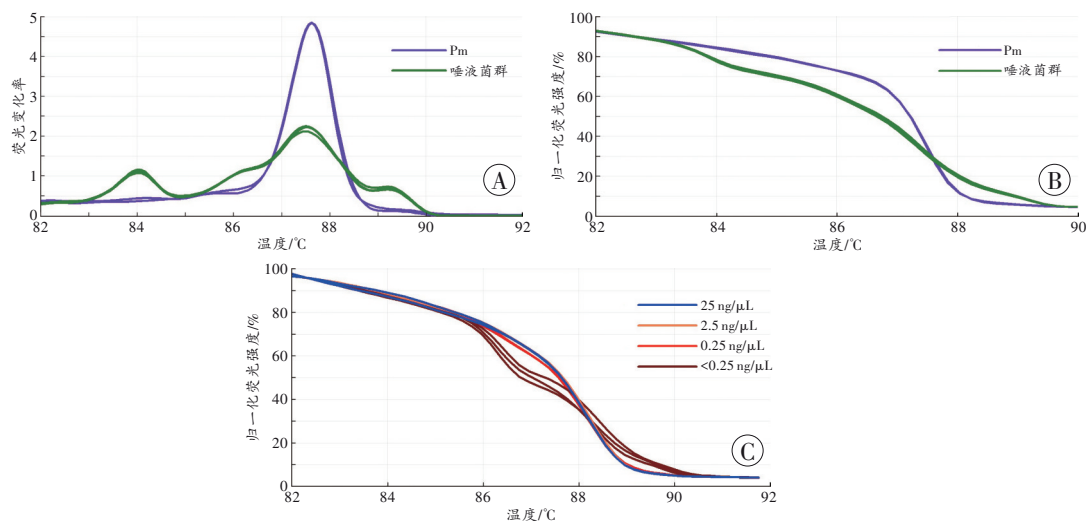
经优化反应体系、循环参数,以多杀性巴氏杆菌基因组 DNA 为模板,可以得到典型的熔解曲线(图 1A)、HRM 图谱(图 1B),与根据多杀性巴氏杆菌 16S rDNA V4 区序列预测的图谱(图 1C~D)基本一致。阴性对照、无菌的人 DNA 对照,在超净台内操作时无扩增和熔解信号,但常规条件下循环次数大于 35 次时会有非特异性信号。



A: 熔解曲线; B: HRM 图谱; C: 预测的熔解曲线; D: 预测的 HRM 图谱。

图 1 多杀性巴氏杆菌 16S rDNA V4 区的 PCR-HRM 图谱

Fig. 1 PCR-HRM profiles of 16S rDNA V4 region of *Pasteurella multocida*



A: 唾液菌群的熔解曲线; B: 唾液菌群的 HRM 图谱; C: 同一样本不同浓度的 HRM 图谱。

图 2 唾液菌群的 kPCR-HRM 图谱

Fig. 2 kPCR-HRM profiles of salivary bacterial community

2.2 菌群的 kPCR-HRM

与单一菌株相比,菌群的熔解曲线(图 2A)主峰常较宽,有肩峰或多个峰,相应的 HRM 曲线(图 2B)也可分为多段,各段斜率(即荧光下降速率)不同。

以 2.5×10^{-3} ng/ μ L 的混检样本 DNA 为模板也可得到 HRM 图谱,但与该样本模板 DNA 量在 0.25~25 ng/ μ L 的图谱(图 2C)明显不同。以 2.5 ng/ μ L 菌群 DNA 的 HRM 图谱为参考标准,模板 DNA 量在 0.25~25 ng/ μ L 所得图谱的 GCP > 96.2% ($98.19\% \pm 1.75\%$),而 < 0.25 ng/ μ L 或 > 25 ng/ μ L 所得图谱的 GCP < 41.98% ($32.14\% \pm 11.65\%$)。

2.3 菌群的 dPCR-HRM

直接以 1.3.1 节制备的细菌悬液为模板,用 dPCR-HRM 法进行分析,可以在 90 min 内得到样本菌群的 HRM 图谱。同一唾液样本,其 dPCR-HRM 图谱与 kPCR-HRM 图谱相似(图 3),两种方法所得 HRM 图谱之间的 GCP>95.85%(96.95%±1.56%)。

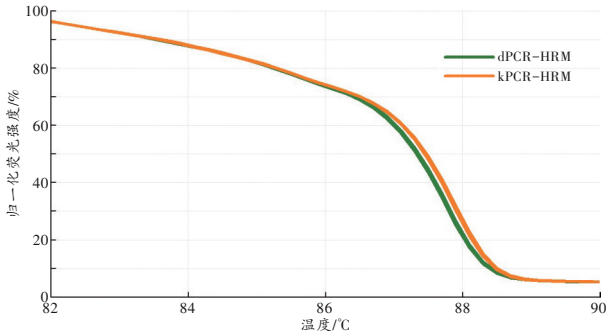


图 3 同一样本的 dPCR-HRM 和 kPCR-HRM 图谱
Fig. 3 dPCR-HRM and kPCR-HRM profiles of the same sample

稀释 35~3.5×10³ 倍的混检样本,模板的唾液量为 0.29~29 nL, Ct 值在 15~30, dPCR-HRM 图谱基本相似(图 4),以 350 倍稀释时的图谱为参考标准, GCP>92.11%(96.97%±2.79%)。稀释 3.5×10⁵ 倍,相当于约 2.9×10⁻³ nL 的唾液仍可检测,但模板的唾液量大于 29 nL 或小于 0.29 nL、Ct 值不在 15~30 范围内时,HRM 图谱可见明显变异(图 4),如仍以 350 倍稀释时的图谱为参考标准, GCP<81.96%(66.43%±17.23%)。

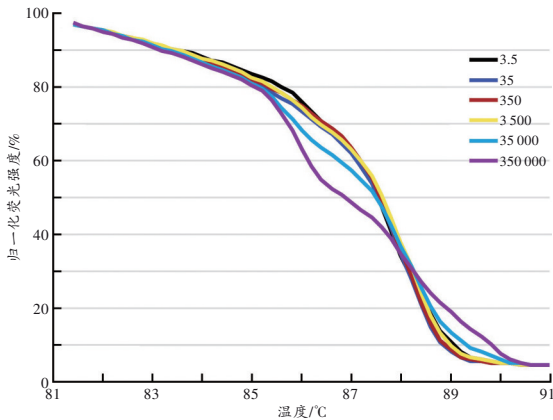


图 4 梯度稀释混检样本的 dPCR-HRM 图谱
Fig. 4 dPCR-HRM profiles of the mixed sample with gradient dilution

2.4 dPCR-HRM 的菌群鉴别能力、稳定性和适用性

用 dPCR-HRM 技术检测 T1~T5 号唾液样本,不同个体有不同的 dPCR-HRM 图谱[GCP<87.07%(52.11%±22.79%),图 5]。同一唾液样本,间隔 1 d、1 周重复检测,所得图谱基本相同[GCP>92.39%(97.78%±2.30%)]。模拟唾液斑样本在纱线转移后使用 dPCR-

HRM 法也可成功检测,且至少在 8 h 内图谱相对稳定[GCP>90.83%(96.67%±2.98%),图 6]。

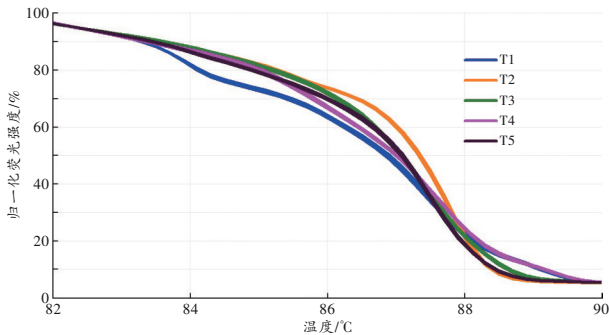


图 5 不同个体唾液菌群的 dPCR-HRM 图谱
Fig. 5 dPCR-HRM profiles of salivary bacterial community of different individuals

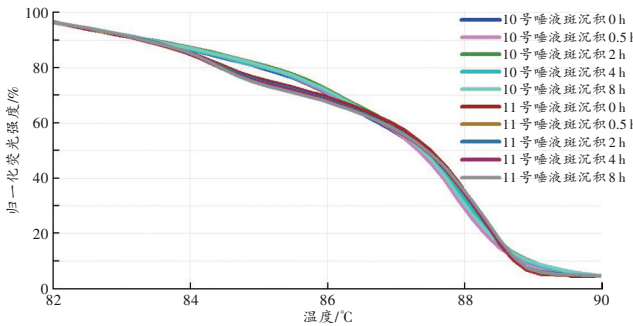
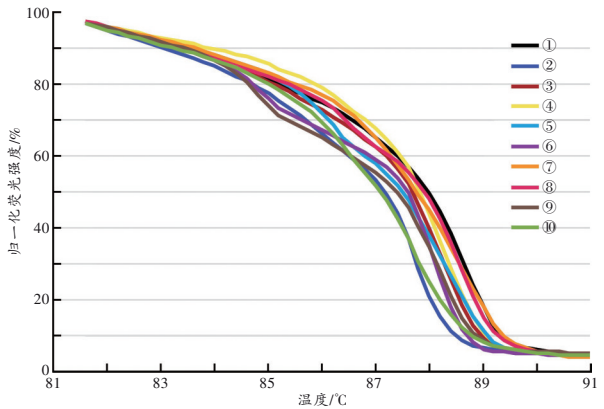


图 6 不同沉积时间唾液斑的 dPCR-HRM 图谱
Fig. 6 dPCR-HRM profiles of salivary stains with different deposition times

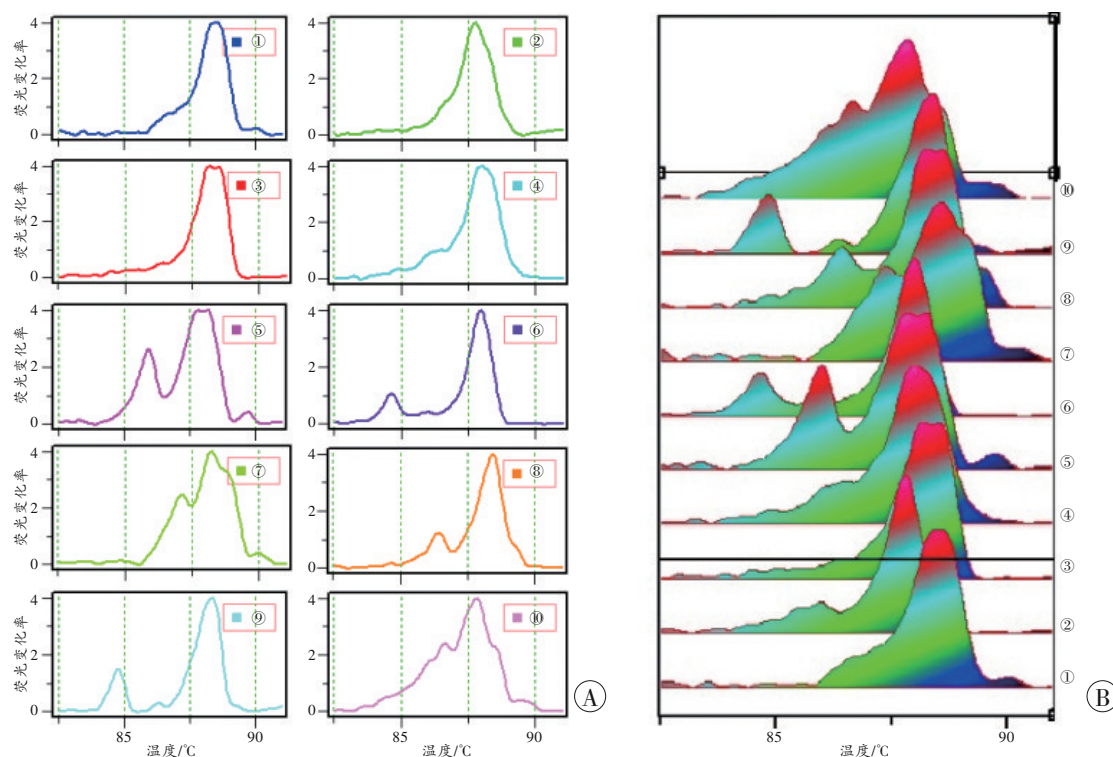
2.5 群体唾液菌群的 dPCR-HRM 型分析

用建立的 dPCR-HRM 法集中分析 61 名志愿者的唾液,以 GCP=80% 为界值,可分为 10 种基本类型,以 ①~⑩表示(图 7~8)。由 ①到 ⑩,各型检出的频数分别为 6、3、9、13、2、2、4、9、12、1。再随机抽取 6 份进行盲测,除 1 个需要修正温度偏离外,对照基本型均可以作出正确判断。



①~⑩指样本中检出的 10 种菌群型。

图 7 10 种唾液菌群型的归一化 HRM 图谱
Fig. 7 Normalized HRM profiles of 10 bacterial community types in saliva



A: 熔解曲线; B: 3D 熔解曲线。①~⑩指样本中检出的 10 种菌群型。

图 8 10 种唾液菌群型的熔解曲线

Fig. 8 Melting curves of 10 bacterial community types in saliva

3 讨论

法医学现场检材中细菌的种类和数量包含着其来源个体、遗留时间等信息,为法医学问题的解决提供了新的思路。但目前的菌群分析技术^[27]尚难以满足法医学应用要求,需要结合法医学检验目的、技术要求等进行改进和评价。本研究结合 dPCR 和 HRM 技术建立了一种可用于人体菌群快速分析的 dPCR-HRM 技术,并初步评价了其应用于法医学领域的可行性。

3.1 dPCR-HRM 菌群快速检测的原理

常规的菌群 DNA 分析包括检材预处理、DNA 提取、扩增和 PCR 产物分析等,步骤多,耗时长,难以自动化、标准化。其中以 DNA 提取和产物分析最为繁琐,耗费检材,且可能改变样本菌群结构,增加污染风险。细菌 DNA 的提取有释放和纯化两个环节,即先用机械、理化或酶解等手段破坏细胞,释放 DNA,然后通过抽提或吸附等去除其中杂质。热解法不需要特别的设备、试剂,在各种破坏细胞壁的手段中最为简单。唾液等样本经简单处理后可直接加入 PCR 体系,利用扩增前预变性时的高温裂解细菌,即可释放出足够的模板^[19,22]。研究^[28]表明,在基于 16S rDNA 的 PCR 分析中,各种模板提取方法对结果影响不大,与采样等其他因素相比较几乎可以忽略不计。dPCR 技术本身在法医学领域就应用广泛^[29-30],如能实现基于

dPCR 的菌群 DNA 分析,不仅符合法医学检材特点和检验要求,也更易于普及推广。

菌群检测在 PCR 后须用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 等较为复杂的方法进行分析,耗时费力^[9-11]。双链 DNA 的熔解曲线因长度、序列和 GC 含量而异,HRM 利用解链温度差异鉴别 DNA,为菌群 PCR 产物的分析提供了一种新途径。可在扩增前将 EvaGreen 荧光染料加入 PCR 体系,连续进行扩增和 PCR 产物分析。菌群的 16S rDNA 片段扩增后,体系内既有来自各种细菌同一基因但序列各异同源双链 DNA,也有这些序列相互杂交形成的、不同程度错配的异源双链 DNA。这些同源、异源双链 DNA 的解链温度各不相同,拷贝数也因样本的菌群结构而异,整个体系在热变性时会生成复杂的熔解曲线,具体形态取决于样本的菌群结构,即细菌的种类和各种细菌的丰度。HRM 软件把每个样本的曲线作为一个整体进行分析、比较,计算样本曲线之间的欧氏距离,转换成 GCP,以客观、量化的形式反映两个样本 HRM 曲线的相似度。

联合应用 dPCR 和 HRM 技术,使用荧光定量 PCR 仪对样本的菌群进行 PCR-HRM 分析,可集传统的提取、扩增和 PCR 分析于一体,全程闭管、无缝衔接,按菌群结构对样本进行快速分类、筛选,减少需要 STR 分型或二代测序 (next-generation sequencing, NGS)

的样本数目,降低检验成本,提高检验效率。

3.2 dPCR-HRM的可行性

近年已有使用dPCR快速分析细菌DNA的报道^[31],但均以特定细菌为目标。与单一序列的扩增不同,菌群PCR不仅需要样本释放足够DNA模板,还应尽量保持各种细菌DNA所占的比例。为了验证dPCR用于菌群分析的可行性,本研究选取5份唾液样本,每份同时使用dPCR-HRM和kPCR-HRM进行菌群分析。两种方法除模板不同外,其他条件保持一致。结果表明,只要两种方法所用模板的样本来源相同,得到的HRM图谱高度相似,GCP超过80% $[GCP>95.85\% (96.95\%\pm 1.56\%)]$ 。这与多数文献^[19,22,28]报道的一致,即提取方法对菌群DNA分析的影响较小。至少对于唾液样本的菌群分型来说,不论直接扩增还是提取后扩增,两者的有效模板构成基本相同,不影响其HRM型的判读。HRM技术用于菌群分析的可行性已被EVERMAN等^[17,32]的研究证实,免于提取的dPCR-HRM在此基础上进一步简化,可在90 min内同步完成数十甚至上百个样本的分析,同时也更便于操作的自动化。

为了评价dPCR扩增时菌群模板DNA释放效率及所需最小样本量,本研究同时用dPCR-HRM和kPCR-HRM法调查了一组梯度稀释的唾液样本。该组样本由5人份唾液等体积混合、梯度稀释而成,以降低个体差异影响,更能代表一般个体的情况。调查结果表明,kPCR-HRM法可检测低至 2.5×10^{-3} ng/ μ L的唾液DNA,dPCR-HRM可检测到 2.9×10^{-3} nL的唾液。根据细菌平均基因组大小(约 4×10^6 bp)^[33]和唾液细菌含量(约 9×10^6 / μ L)^[34]估计,两者大约分别相当于500和20~30个细菌。虽然试剂盒提取的唾液DNA中难免混合人和其他微生物的DNA^[35],无法准确计算实际的细菌数,但结合两种模板稀释后的唾液量估计,dPCR-HRM法灵敏度不低于kPCR-HRM法,支持菌群DNA可以在本研究的直接扩增条件下有效释放,提取并非必要^[28]。

值得注意的是,菌群分析技术不能简单地用传统的灵敏度进行评价。虽然dPCR-HRM法可检测到稀释 3.5×10^5 倍唾液中的细菌,但所得HRM图谱已与稀释范围在 $35\sim 3.5\times 10^3$ 倍时的明显不同。分析认为,样本稀释倍数过高时,包含的细菌种类已不能代表样本原来的菌群结构,所得HRM图谱也不具有代表性,且易因随机因素和污染而不稳定。本研究对混检样本的分析结果表明,唾液量在 $1\times 10^{-4}\sim 1\times 10^{-2}$ μ L,相当于 $1\times 10^3\sim 1\times 10^5$ 个细菌时,所得HRM图谱基本一致且稳定。唾液量过高时,可能因干扰物过多或扩增不平衡等,所得图谱也不具有代表性。因此,dPCR-HRM菌

群分析的灵敏度以能获得样本代表性图谱的最小样本量来表示更有实际意义。本研究条件下,dPCR-HRM分析唾液菌群的灵敏度约为 1×10^{-4} μ L,至少含 1×10^3 个以上细菌。

3.3 dPCR-HRM菌群分析的应用

上述分析结果说明,只有样本用量在一定范围内时,菌群HRM图谱才有可比性,才能用于分析两个样本是否具有相同或相似的菌群结构。而现场斑痕无法估计沉积体液的量,直接扩增法不能通过DNA浓度估计细菌数量,必须利用其他信息来判断dPCR-HRM图谱是否能代表样本菌群特征。然而,dPCR-HRM的扩增过程本身具有实时定量的功能。分析上述梯度稀释样本的扩增曲线,结果表明,可以通过样本的Ct值来估计有效模板量。只要同批检验的两个样本的Ct值相差不大,即可认为通过HRM图谱来比较其菌群结构是有意义的。否则,应调整样本用量。实际应用中,应综合分析样本的扩增曲线、熔解曲线以及阴性、阳性对照,结合Ct、GCP等综合评判。

理想的菌群快速检测还应有较好的鉴别能力、稳定性和检材适应性^[36]。为了进一步验证dPCR-HRM鉴别菌群的能力,评价其稳定性和检材适应性,本研究调查了一组唾液样本和唾液斑样本。结果表明,来自不同个体的唾液有不同的HRM图谱。图谱的个体间差异虽然大小不一 $[GCP<87.07\% (52.11\%\pm 22.79\%)]$,但远大于同一样本在不同时间检测时的差异 $[GCP>92.39\% (97.78\%\pm 2.30\%)]$ 。且同一样本的dPCR-HRM图谱与kPCR-HRM图谱基本相同,方法间的差异也远小于样本间的差异。虽然样本量有限,但支持dPCR-HRM有较好的鉴别能力和稳定性。

菌群结构的多样性或个体差异是菌群分析法医学应用的主要基础。虽然唾液菌群的高度多样性已被包括NGS在内的诸多研究^[37-38]证实,但dPCR-HRM所能揭示的多样性尚待调查。本研究结果表明,即使受试者均在生活环境和饮食趋同的高校内,仅16S rDNA V4区就可检出多种类型。且考虑温度、PCR循环次数对HRM分型的影响,参考SAKARIDIS等^[26]的研究,本研究选择了较为保守的GCP界值(80%)。未来在体系内引入温度内参、控制循环次数,并在增强稳定性的基础上提高GCP界值,有望进一步提高dPCR-HRM技术的分型能力。

检材的复杂性是法医学检验的显著特征,斑痕是最常见的现场检材。本研究对dPCR-HRM用于唾液斑的可行性进行了初步评估,发现模拟唾液斑用常规的纱线转移法即可进行菌群分析。结合上述灵敏度实验,支持dPCR-HRM菌群检验并不需要额外的检

材处理和消耗,多数情况下常规检材浸洗液即可满足要求。对不同沉积时间唾液斑的调查结果表明,8 h之内唾液斑与其来源样本的图谱基本相同[GCP>90.83%(96.67%±2.98%)],说明本方法所揭示的斑痕菌群结构是相对稳定的,至少与形成斑痕时的唾液有可比性,这与关于采样时机、采集方法均会影响NGS菌群分析的报道^[39]并不一致。结合文献^[40]分析认为,与NGS的高成本、高分辨率不同,本研究所述方法类似于经典的DGGE菌群分析,分辨率低,对属以下水平变化、低丰度菌属变化和幅度小的变化不敏感。同时,由于唾液含菌量大,高丰度菌属间的比例不易因污染、采样而大幅改变。因此,唾液菌群的HRM图谱相对稳定,但该方法的分辨率或图谱的个体特异性远小于NGS分析,其意义主要在于样本初筛,在个体识别方面,可通过HRM图谱比较快速地排除一部分样本,为重点样本的精准分析创造条件,弥补NGS成本高、耗时长的局限性。如用于含菌量低、优势菌属不明显的样本,应控制环境、试剂和耗材等可能的细菌污染源,统一采样方式和提取方法,以保证样本间的可比性。

3.4 小结

细菌是法医学检材的重要组成部分。不同体液的菌群有明显差异,同一类型体液的菌群结构也因人而异。现场斑痕、尸体中的菌群包含着丰富的信息,菌群分析是解决一系列法医学问题的新途径。如能实现体液斑痕的菌群快速检测,按体液类型和来源个体对现场斑痕进行分类筛选,有助于明确目标,提高DNA分型针对性,提高办案效率。因此,研发简单快速的菌群分析技术具有重要意义。

本研究建立了一种不需要提取和电泳的dPCR-HRM菌群分析技术,简单快速且有较高的灵敏度、稳定性和鉴别能力,并初步验证了其在法医学领域的应用。但是,必须意识到菌群分析是以群体特征为目标的微生物学研究,菌群PCR与传统的单基因座PCR、复合扩增均有诸多区别。本研究仅以16S rDNA V4区和唾液(斑)为例,且只进行了小样本评估,包含温度内参的多片段dPCR-HRM分析、dPCR-HRM用于其他类型体液(斑)及应对复杂检材的能力还有待进一步研究。现场斑痕的溯源是法医学的核心问题,虽然人体菌群有高度的个体特异性,但目前还难以通过菌群分析进行个体识别。未来应扩大样本范围和样本量,调查不同采样时机和方法,全面评价各种影响因素,结合菌群溯源技术发展^[35,41],积极探索实现法医学斑痕菌群溯源的途径。

参考文献:

[1] 朱家辉. 人体微生物组研究进展[J]. 科学咨询(科技·

管理),2020(3):68-71.

ZHU J H. Research progress of human microbiome[J]. Kexue Zixun (Keji · Guanli),2020(3):68-71.

[2] FERNÁNDEZ-ESTUPIÑÁN E, GIRALDO-HUERTA T, GOMEZ A C. Individuality of the composition of the human microbiota[J]. Clin Exp Rheumatol, 2021,128(S1):33.

[3] 夏旭倩,牛青山. 皮肤微生物群落的研究进展及法医学应用[J]. 刑事技术,2019,44(3):195-200. doi:10.16467/j.1008-3650.2019.03.002.

XIA X Q, NIU Q S. Forensic potential of skin microbial community[J]. Xingshi Jishu,2019,44(3):195-200.

[4] NECKOVIC A, VAN OORSCHOT R A H, SZKUTA B, et al. Challenges in human skin microbial profiling for forensic science: A review[J]. Genes (Basel),2020,11(9):1015. doi:10.3390/genes11091015.

[5] 江鑫钰,王江峰,朱光辉,等. Biolog-Eco法检测尸体微生物群落的代谢功能变化[J]. 法医学杂志,2016,32(3):171-175,179. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2016.03.003.

JIANG X Y, WANG J F, ZHU G H, et al. Detection of metabolism function of microbial community of corpses by Biolog-Eco method[J]. Fayixue Zazhi,2016,32(3):171-175,179.

[6] 苑美青,殷世强,杨宇晨,等. 泥土微生物检验及其在法庭科学中的应用[J]. 刑事技术,2019,44(5):399-402. doi:10.16467/j.1008-3650.2019.05.005.

YUAN M Q, YIN S Q, YANG Y C, et al. Soil microbiological examination and its forensic application[J]. Xingshi Jishu,2019,44(5):399-402.

[7] 萨日娜,蔡令艺,武会娟,等. 宏基因组学在法医学鉴定中的应用[J]. 法医学杂志,2017,33(4):397-401. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2017.04.014.

SA R N, CAI L Y, WU H J, et al. Application of metagenomics in forensic identification[J]. Fayixue Zazhi,2017,33(4):397-401.

[8] 宋国庆,曹禹,李辉,等. 16S rRNA基因测序在法医学中的研究进展[J]. 法医学杂志,2018,34(5):542-548. doi:10.12116/j.issn.1004-5619.2018.05.021.

SONG G Q, CAO Y, LI H, et al. Progress in the 16S rRNA gene sequencing in forensic science[J]. Fayixue Zazhi,2018,34(5):542-548.

[9] 刘耘汀,孙大明,施少培,等. 示指与接触物菌群ERIC-PCR指纹图谱比对[J]. 法医学杂志,2018,34(1):33-36. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2018.01.007.

LIU Y T, SUN D M, SHI S P, et al. Comparison of bacteria ERIC-PCR fingerprints of index fingers and contactants[J]. Fayixue Zazhi,2018,34(1):

- 33-36.
- [10] 陈尚坤,王旭东,张晓嘉,等. 土壤微生物 16S rDNA 的 T-RFLP 法医学应用分析[J]. 中国刑警学院学报, 2016(3): 70-73. doi: 10.3969/j.issn.2095-7939.2016.03.016.
- CHEN S K, WANG X D, ZHANG X J, et al. Forensic application analysis of 16S rDNA of soil microorganisms by T-RFLP[J]. Zhongguo Xingjing Xueyuan Xuebao, 2016(3): 70-73.
- [11] KALLE E, KUBISTA M, RENSING C. Multi-template polymerase chain reaction[J]. Biomol Detect Quantif, 2014, 2: 11-29. doi: 10.1016/j.bdq.2014.11.002.
- [12] 岳阳阳,赵贵森,张倩,等. 单管一步甲基化可变位点分析技术[J]. 法医学杂志, 2013, 29(6): 419-424. doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2013.06.005.
- YUE Y Y, ZHAO G S, ZHANG Q, et al. One-step methylation variable position analysis technology in single-tube[J]. Fayixue Zazhi, 2013, 29(6): 419-424.
- [13] MIRANDA R R, SILVA T D, FORONES N M. High-resolution melting for detecting *KRAS* mutations in colorectal cancer[J]. Biomed Rep, 2019, 11(6): 269-273. doi: 10.3892/br.2019.1254.
- [14] MIZUTA S, YAMANE N, KOMAI T, et al. Investigation of screening method for *DNMT3A* mutations by high-resolution melting analysis in acute myeloid leukemia[J]. Int J Lab Hematol, 2019, 41(5): 593-600. doi: 10.1111/ijlh.13056.
- [15] VOSSEN R H A M. Genotyping DNA variants with high-resolution melting analysis[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1492: 17-28. doi: 10.1007/978-1-4939-6442-0_2.
- [16] ERAI M, WITTEW C T. High resolution melting analysis for gene scanning[J]. Methods, 2010, 50(4): 250-261. doi: 10.1016/j.jymeth.2010.01.013.
- [17] EVERMAN S, WANG S Y. Rapid differentiation of bacterial communities using high resolution melting analysis[J]. J Microbiol Methods, 2017, 140: 77-81. doi: 10.1016/j.mimet.2017.07.006.
- [18] WANG S S, SONG F, WANG Y Y, et al. High resolution melting analysis (HRM) based on 16S rRNA as a tool for personal identification with the human oral microbiome[J]. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser, 2019, 7(1): 161-163. doi: 10.1016/j.fsigss.2019.09.063.
- [19] 谷变利,王娟萍,孔金玉,等. 直接PCR法在口腔牙龈卟啉单胞菌检测中的应用[J]. 食管疾病, 2020, 2(1): 38-42. doi: 10.15926/j.cnki.issn2096-7381.2020.01.008.
- GU B L, WANG J P, KONG J Y, et al. Direct PCR assay for detection of *porphyromonas gingivalis* in human oral cavities[J]. Shiguan Jibing, 2020, 2(1): 38-42.
- [20] 刘爽爽,帖云,齐林,等. 16S rRNA 基因可变区与全长序列进化关系相似性分析[J]. 郑州大学学报(理学版), 2022, 54(1): 19-24. doi: 10.13705/j.issn.1671-6841.2021047.
- LIU S S, TIE Y, QI L, et al. Similarity analysis of evolution relationship between variable regions and full length sequence of 16S rRNA gene[J]. Zhengzhou Daxue Xuebao (Natural science edition), 2022, 54(1): 19-24.
- [21] 石雨婷,夏文君,邹岩,等. 高通量测序方法分析实验室培养对人体口腔唾液菌群的影响[J]. 口腔医学, 2018, 38(12): 1062-1067. doi: 10.13591/j.cnki.kqyx.2018.12.002.
- SHI Y T, XIA W J, ZOU Y, et al. Effect of culture *in vitro* on human salivary microflora by high throughput sequencing[J]. Kouqiang Yixue, 2018, 38(12): 1062-1067.
- [22] WEINROTH M D, BELK A D, DEAN C, et al. Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies[J]. J Anim Sci, 2022, 100(2): skab346. doi: 10.1093/jas/skab346.
- [23] DWIGHT Z, PALAIS R, WITTEW C T. uMELT: Prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application[J]. Bioinformatics, 2011, 27(7): 1019-1020. doi: 10.1093/bioinformatics/btr065.
- [24] NUNZIATA A, CERVELLI C, DE BENEDETTI L. Genotype confidence percentage of SSR HRM profiles as a measure of genetic similarity in *Rosmarinus officinalis*[J]. Plant Gene, 2018, 14: 64-68. doi: 10.1016/j.plgene.2018.04.006.
- [25] AWAD M, MYLONA P V, POLIDOROS A N. HRM efficiency and limitations for high-throughput SSR genotyping: A case study using grapevine flavor-linked markers[J]. Biomed J Sci Tech Res, 2019, 17(2): 12625-12631. doi: 10.26717/BJSTR.2019.17.002967.
- [26] SAKARIDIS I, GANOPOULOS I, MADEIS P, et al. Genotyping of *Listeria monocytogenes* isolates from poultry carcasses using high resolution melting (HRM) analysis[J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2014, 28(1): 107-111. doi: 10.1080/13102818.2014.901681.
- [27] 张琳. 大鼠尸体细菌群落演替与PMI推断意义[D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- ZHANG L. The succession of bacteria communities on rat carcasses and implications for PMI estimation[D]. Changsha: Central South University, 2013.

- [28] UDDIN W, SCHLAEPPI K, RONCHI F, et al. Evaluation of primer pairs for microbiome profiling from soils to humans within the One Health framework[J]. *Mol Ecol Resour*, 2020, 20(6): 1558-1571. doi:10.1111/1755-0998.13215.
- [29] 沈伟, 马骏, 潘豪杰, 等. 直接扩增技术在法医DNA检验中的研究进展[J]. *刑事技术*, 2018, 43(5): 390-395. doi:10.16467/j.1008-3650.2018.05.010.
- SHEN W, MA J, PAN H J, et al. DNA direct amplification: Its forensic application and research progress[J]. *Xingshi Jishu*, 2018, 43(5): 390-395.
- [30] 杨电, 陈俊璋, 李越. 擦拭直扩法和粘取磁珠法检测衣物脱落细胞DNA的比较[J]. *法医学杂志*, 2017, 33(5): 538-539. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2017.05.020.
- YANG D, CHEN J Z, LI Y. Comparison of wipe direct amplification method and magnetic bead adhesion method for DNA detection of clothing exfoliated cells[J]. *Fayixue Zazhi*, 2017, 33(5): 538-539.
- [31] SHRIVASTAVA P, JAIN T, KUMAWAT R K. Direct PCR amplification from saliva sample using non-direct multiplex STR kits for forensic DNA typing[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 7112. doi:10.1038/s41598-021-86633-0.
- [32] HJELMSØ M H, HANSEN L H, BÆLUM J, et al. High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(12): 3568-3575. doi:10.1128/AEM.03923-13.
- [33] PENNISI E. Mammoth mangrove bacterium has complex cell[J]. *Science*, 2022, 375(6584): 944. doi:10.1126/science.adb1758.
- [34] 王松灵. 涎腺非肿瘤疾病[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2001: 51.
- WANG S L. Non-neoplastic disease of the salivary glands[M]. Beijing: Scientific and Technological Literature Press, 2001: 51.
- [35] DÍEZ LÓPEZ C, VÍDAKI A, KAYSER M. Integrating the human microbiome in the forensic toolkit: Current bottlenecks and future solutions[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2022, 56: 102627. doi:10.1016/j.fsigen.2021.102627.
- [36] 赵书民, 李成涛. 微生物法医学的研究现状与进展[J]. *微生物与感染*, 2012, 7(3): 170-173.
- ZHAO S M, LI C T. The research progress in microbial forensics[J]. *Weishengwu Yu Ganran*, 2012, 7(3): 170-173.
- [37] XU X, HE J, XUE J, et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities[J]. *Environ Microbiol*, 2015, 17(3): 699-710. doi:10.1111/1462-2920.12502.
- [38] SEGATA N, HAAKE S K, MANNON P, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples[J]. *Genome Biol*, 2012, 13(6): R42. doi:10.1186/gb-2012-13-6-r42.
- [39] COSTEA P I, ZELLER G, SUNAGAWA S, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(11): 1069-1076. doi:10.1038/nbt.3960.
- [40] LIU Y X, QIN Y, CHEN T, et al. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(5): 315-330. doi:10.1007/s13238-020-00724-8.
- [41] YANG M, YUE Y J, GUO T T, et al. Limitation of high-resolution melting curve analysis for genotyping simple sequence repeats in sheep[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 2645-2653. doi:10.4238/2014. April.8.7.

(收稿日期: 2021-10-23)

(本文编辑: 张素华)