

· 技术与应用 ·

微量生物物证提取套装在现场微量血痕DNA检验中的应用

巴华杰, 金明, 石津玮, 朱爱华, 马骏

常州市公安局物证鉴定所, 江苏 常州 213003

摘要: 目的 探讨微量生物物证提取套装应用于提取现场微量血痕DNA的检验效果。方法 将静脉血制成地面血痕。分别应用微量生物物证提取套装法和普通法提取血痕。分别于恒温摇床放置2、24、48、72、96 h(每组50份)进行血痕DNA检验,对比各组检验结果。结果 恒温摇床上分别放置24、48、72、96 h后,微量生物物证提取套装法的DNA检出率(分别为100.00%、100.00%、100.00%、96.00%)均高于普通法(分别为62.00%、26.00%、10.00%、0),差异均具有统计学意义($P<0.05$)。恒温摇床上放置2 h,两种方法的DNA检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 微量生物物证提取套装可有效提升放置时间较久的现场微量血痕的检出率和检出时限。

关键词: 法医遗传学;血痕;微量生物物证提取套装;现场

中图分类号: DF795.2 文献标志码: A doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2020.500303

文章编号: 1004-5619(2021)01-0065-04

Application of Trace Biological Evidence Collection Kit in DNA Examination of Trace Bloodstain Samples from the Scene

BA Hua-jie, JIN Ming, SHI Jin-wei, ZHU Ai-hua, MA Jun

Institute of Forensic Science of Changzhou Municipal Security Bureau, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China

Abstract: Objective To evaluate the effects of DNA examination of trace bloodstain samples from the scene collected with Trace Biological Evidence Collection kit. **Methods** Venous blood was made into bloodstains on the ground. The trace bloodstain samples were collected with Trace Biological Evidence Collection kit and common methods, respectively. DNA examination of trace bloodstain samples (50 from each group) was conducted on the constant temperature shaker for 2, 24, 48, 72, and 96 h, respectively, and the examination results of every group were compared. **Results** When the trace bloodstain samples were placed on the constant temperature shaker for 24, 48, 72, and 96 h, the DNA detection rates in the group which used Trace Biological Evidence Collection kit (100.00%, 100.00%, 100.00%, 96.00%) were significantly higher than those in the group using common methods (62.00%, 26.00%, 10.00%, 0), the differences had statistical significance ($P<0.05$). When the trace bloodstain samples were placed on the constant temperature shaker for 2 h, the differences of DNA detection rates between the two groups had no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** The Trace Biological Evidence Collection kit can effectively improve DNA detection rate and extend detection time limit for trace bloodstain samples from the scene that have been stored for a relatively long time.

Keywords: forensic genetics; bloodstain samples; Trace Evidence Collection kit; scene

随着DNA检验技术的发展,能成功获得DNA分型的生物物证所需DNA含量已经从纳克级减少到皮克级,甚至单个细胞也可能成功检出^[1]。如何尽可能将现场生物物证进行转移提取,不断提升DNA检出率是目前一直探索的问题^[2-3]。微量生物物证的类型、载体表面的性状以及提取工具的选择均会影响DNA

检验的成功率^[4-5]。虽然行业标准^[6]规定提取的生物物证应当晾干后放入透气纸质物证袋内低温、干燥保存,但并没有规定生物物证放置的具体操作技术规范 and 评价指标。实际工作中较为常见的做法^[7-8]是,采用棉签蘸纯水“干湿两步法”提取现场微量生物物证,提取后放入纸质物证袋内进行送检。该方法可能存在

的不足有:(1)棉签蘸纯水进行擦拭后放入物证袋内后,在温度较高的夏天,尤其是我国南方地区,棉签处于潮湿状态下,生物物证容易产生腐败,还可能有霉菌生长,对生物物证中的DNA造成严重破坏;(2)在送检过程中,棉签与物证袋内壁可能进行反复摩擦,造成生物物证的转染损失^[8],致使后续的DNA检出率大大降低;(3)所采用的物证袋多没有经过外源DNA灭活处理,物证袋所用材料及物证袋在生产过程中很可能被接触过的外源DNA污染,同时因环节众多、质量控制样本也难以建立。针对上述问题,本研究将可推式棉签2根、生物检材采集保护液0.3 mL、离心套管1个预封装在一个多功能物证袋内,组成微量生物物证提取套装,以期解决现场微量生物物证现场提取及送检中存在的问题,有效提升微量生物物证的DNA检出率。本研究采用平行对照实验,将微量生物物证提取套装提取模拟现场微量血痕的DNA检验效果与普通法进行对比,以评估“微量生物物证提取套装”在提取现场微量生物物证中的DNA检验效果。

1 材料与方法

1.1 样本准备

1名志愿者提供的外周静脉血2 mL,于乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝管保存。采集血样后4 h内,用移液器将1 μ L血样滴于附有灰尘的楼道地面上,制成地面血痕以模拟现场微量血痕,共计500份。

1.2 主要仪器与试剂

Ther-Mix 恒温混匀仪(英国Integrated Technologies公司),QIA Symphony SP核酸纯化仪(德国Qiagen公司),Sigma1-14台式离心机(德国Sigma公司),Speed cycler 2扩增仪(德国Analytik Jena公司),Heraeus Labofuge 400平板离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司),3500xL基因分析仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),ZWYR-200D恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司)。QIA Symphony DNA Investigator试剂盒(德国Qiagen公司),VeriFiler™ Plus PCR扩增试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.3 提取工具

微量生物物证提取套装(自行设计):包含可推式棉签(天津诺维莱博科技有限公司)2根、生物检材采集保护液(天津诺维莱博科技有限公司,货号TECS1806)0.3 mL、离心套管(南京多利洋生物技术有限公司)1个,预封装在一个多功能物证袋内。

普通法:纯水、2根棉签和普通纸质物证袋。

1.4 方法

1.4.1 提取方法

微量生物物证提取套装法:250份现场微量血痕采用微量生物物证提取套装提取。具体操作流程:(1)打开多功能物证袋,取出生物检材采集保护液及2根可推式棉签,其中1根蘸取生物检材保护液。采用“干湿两步法”对现场微量血痕进行提取,擦拭过程中可反复旋转棉签头部,尽可能使血痕转移充分。(2)取出离心套管,打开管盖,将擦拭后的两根棉签头部推入离心套管的上层套管内。(3)将离心套管密封,放入多功能物证袋内保存,在袋子上做好标记。

普通法^[7-8]:250份血痕采用2根相同的可推式棉签蘸取纯水进行“干湿两步法”提取,提取好的血痕棉签置于普通纸质物证袋内,并用自封袋将其完全封闭。

为模拟高湿环境送检的过程,将以上装有现场微量血痕的500份物证袋放置在37℃的ZWYR-200D恒温摇床上进行振荡,振荡回旋频率为400 r/min。

1.4.2 检验方法

采用平行对照实验设计,分别在恒温摇床上2、24、48、72、96 h时,微量生物物证提取套装法和普通法各取50份,采用QIA Symphony SP核酸纯化仪依照操作说明书进行DNA提取,裂解体系为200 μ L,洗脱体系为50 μ L。采用VeriFiler™ Plus PCR扩增试剂盒10 μ L扩增体系(模板DNA 1 μ L)在Speed cycler 2扩增仪上进行扩增(26个循环),每次检验均加2800M和ddH₂O分别作为阳性对照和阴性对照,扩增产物应用3500xL基因分析仪进行检测,采用GeneMapper® ID-X v1.3软件(美国Thermo Fisher Scientific公司)进行数据分析。

1.4.3 判定标准^[9]

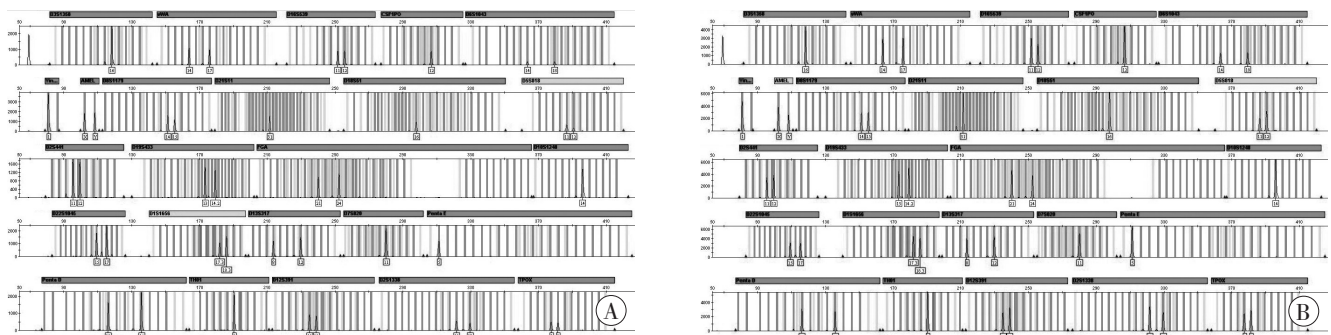
所有基因座均能正确分型,谱峰清晰均一、判型准确、峰值>200相对荧光单位(relative fluorescence unit, RFU)、杂合子两个峰高比例>70%、无或少杂峰等干扰判型的因素。

1.4.4 统计学处理

采用SPSS 19.0软件(美国IBM公司)对实验数据进行处理,检验成功率的比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

恒温摇床放置2 h时,微量生物物证提取套装法的检出率(100.00%)与普通法(98%)差异无统计学意义($P>0.05$)。尽管普通法中只有1例DNA检验失败,但普通法的峰高普遍较微量生物物证提取套装法低,个别基因座峰值均衡性有所下降(图1)。



A:普通法;B:微量生物物证提取套装法。

图1 恒温摇床放置2h的血痕样本STR分型图谱

Fig. 1 STR typing map of bloodstain samples on constant temperature shaker for 2 h

放置24、48、72、96 h后,微量生物物证提取套装法的检出率(100.00%、100.00%、100.00%、96.00%)均高于普通法(62.00%、26.00%、10.00%、0),差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 微量生物物证提取套装法与普通法对现场微量血痕提取后不同时间DNA检出率的比较

Tab. 1 Comparison of DNA detection rate after trace bloodstain samples from the scene collected at different time by Trace Biological Evidence Collection kit method and common method

时间/h	DNA检出量[n(%)]	
	微量生物物证提取套装法	普通法
2	50(100.00)	49(98.00)
24	50(100.00)	31(62.00) ¹⁾
48	50(100.00)	13(26.00) ¹⁾
72	50(100.00)	5(10.00) ¹⁾
96	48(96.00)	0(0) ¹⁾

注:1)与微量生物物证提取套装法相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

现场勘验中提取到足量的有核细胞是DNA分型成功的关键。因而,在送检过程中有效降低有核细胞的转染损失及腐败菌的破坏,以保证在DNA提取环节获得足够浓度的DNA溶液至关重要。研究^[8]结果显示,现场检材在送检过程中DNA转移率平均为22.06%,其中接触类生物物证在纸质物证袋内的平均转移率为52.85%,塑料物证袋内的平均转移率为36.87%。现场提取后棉签拭子沾染的腐败菌一直处于繁殖状态,其中37℃为多数腐败菌最理想的培养温度^[10],其繁殖能力处于最佳状态。

本研究使用的“微量生物物证提取套装”具有多种优势:(1)提取到的现场生物物证的棉签头放置在离心套管内全部用于后续的DNA检验,有效避免了运输过程中的损失。同时,后续的DNA检验省去了前处理的环节,检验工作更加高效。(2)擦拭中用生物

检材采集保护液代替纯水,有效抑制现场生物物证中腐败菌的繁殖,有效减缓了DNA的降解。(3)一个离心套管可以同时放置4根擦拭的棉签,有利于彻底提取现场局部的生物物证,提高其提取质量。基于以上优势,应用微量生物物证提取套装提取现场生物物证特别是微量生物物证的DNA,其检出率和检出质量都将有可能大幅度提升。

为增加本研究结果对实际案件现场勘验的参考价值,本研究在含有较多腐败菌的有浮尘的楼道地面以1 μL静脉血模拟现场微量血痕,将普通法的血痕棉签放置在透气性较差的密封纸质物证袋内并用自封袋封闭,同时采用恒温摇床模拟送检过程中生物物证与物证袋之间的摩擦,将温度设置在腐败菌繁殖能力最强的37℃,以应对现场生物物证可能出现的极端情况。为增加可比性,模拟的现场微量血痕的提取均采用相同的可推式棉签,并采取能够有效提升现场生物物证提取效果的“干湿两步法”^[11-13]进行提取。

本研究结果显示,在恒温摇床上放置2 h时,虽然微量生物物证提取套装法与普通法的检出率差异无统计学意义,但是从STR分型图谱的峰高和峰值均衡性来看,普通法血痕中可用于STR分型的DNA片段含量已经有降低的趋势,可见,在现实工作中,即便做到现场提取后及时送到实验室检测,这种方法所获得的STR分型结果的质量也很可能会受到一定影响。

在37℃恒温摇床上放置24~96 h,微量生物物证提取套装法的检出率均高于普通法($P < 0.05$)。72 h内微量生物物证提取套装法的检出率均为100.00%,这些结果表明,微量生物物证提取套装能够较好地保护现场提取到的生物物证中可用于STR分型的DNA片段。微量生物物证提取套装对DNA提取的较高效率很有可能是由于使用生物检材保护液抑制腐败菌的繁殖以及使用离心套管防止微量血痕与物证袋摩擦从而降低转染损失等综合因素导致的。在96 h时,

微量生物物证提取套装法的检出率(96.00%)开始降低,表明微量生物物证提取套装中的生物检材保护液有可能不能杀死生物物证中的腐败菌,可能只能一定程度抑制腐败菌的繁殖,延缓腐败菌对微量血痕中DNA的破坏。可见,使用微量生物物证提取套装提取生物物证也不能长期放置,应于96 h内及时送检,以防止在环境温度过高及生物物证中DNA含量较低等极端条件时,生物物证DNA检出失败的情况发生。

本研究通过对比微量生物物证提取套装法和普通法提取现场微量血痕,在不同放置时间后的STR分型结果,发现对于现场微量血痕,微量生物物证提取套装法优于普通法,可有效提升现场微量血痕的DNA检出率并延长现场微量血痕的检出时限。微量生物物证提取套装通过使用生物检材保护液抑制腐败菌的繁殖,使用离心套装避免生物检材的摩擦转染损失,可有效提升现场生物物证的DNA检出率,有望成为现场微量生物物证的理想提取工具。

参考文献:

- [1] FORSTER L, THOMSON J, KUTRANOV S. Direct comparison of post-28-cycle PCR purification and modified capillary electrophoresis methods with the 34-cycle "low copy number" (LCN) method for analysis of trace forensic DNA samples[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2008, 2(4): 318-328. doi: 10.1016/j.fsigen.2008.04.005.
- [2] 孔小平. 放置不同时间果核微量生物物证的提取[J]. *法医学杂志*, 2018, 34(4): 435-437. doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2018.04.020.
- [3] 宋立, 刘松, 吴卉, 等. 微量生物检材定量及分型[J]. *法医学杂志*, 2018, 34(6): 656-658. doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2018.06.017.
- [4] 张广峰, 陈松, 涂政, 等. 接触DNA检验成功率的影响因素探讨[J]. *刑事技术*, 2013(3): 9-13. doi: 10.3969/j.issn.1008-3650.2013.03.002.
- [5] 霍塞虎, 叶志鹏, 徐海军, 等. 盗窃案件现场检材提取与DNA检测结果的统计分析[J]. *中国法医学杂志*, 2018, 33(2): 162-166. doi: 10.13618/j.issn.1001-5728.2018.02.011.
- [6] 中华人民共和国公安部. 法医生物检材的提取、保存、送检规范: GA/T 1162—2014[S]. 2014.
- [7] 邓淑娇, 李萍, 黄桂清, 等. 检材采集与保存方式对DNA提取效率的影响[J]. *刑事技术*, 2015(3): 242-243. doi: 10.16467/j.1008-3650.2015.03.018.
- [8] 董会, 王晶, 秦翠娇, 等. 物证袋保存生物检材产生DNA转移问题研究[J]. *刑事技术*, 2016(3): 173-177. doi: 10.16467/j.1008-3650.2016.03.001.
- [9] 金明, 巴华杰, 朱爱华, 等. 联苯胺试验对血痕DNA检验的影响[J]. *法医学杂志*, 2018, 34(2): 157-160. doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2018.02.011.
- [10] 巴剑波, 陈双红, 徐雄利, 等. 聚维酮碘溶液消毒性能观察[J]. *中国消毒学杂志*, 2008, 25(2): 143-145. doi: 10.3969/j.issn.1001-7658.2008.02.009.
- [11] PANG B C, CHEUNG B K. Double swab technique for collecting touched evidence[J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2007, 9(4): 181-184. doi: 10.1016/j.legalmed.2006.12.003.
- [12] SWEET D, LORENTE M, LORENTE J A, et al. An improved method to recover saliva from human skin: The double swab technique[J]. *J Forensic Sci*, 1997, 42(2): 320-322.
- [13] VAN OORSCHOT R A H, PHELAN D G, FURLONG S, et al. Are you collecting all the available DNA from touched objects?[J]. *Int Cong Ser*, 2003, 1239: 803-807. doi: 10.1016/S0531-5131(02)00498-3.

(收稿日期: 2020-03-11)

(本文编辑: 刘希玲)