

## 血浆游离 DNA 的 STR 分型检测研究

陈 阳<sup>1)</sup>, 胡利平<sup>1)</sup>, 马 波<sup>2)</sup>, 马立宇<sup>1)</sup>, 聂胜洁<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学, 云南昆明 650500; 2) 云南沃森生物技术股份有限公司, 云南昆明 650106)

**[摘要]** **目的** 探讨利用血浆中游离 DNA 进行短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 分型检测, 解决法医学个体识别和亲权鉴定问题的可行性. **方法** 采集 36 例无关健康个体 EDTA-Na<sub>2</sub> 抗凝血样, 分离血浆, 采用经典酚-氯仿法分别处理血浆和血细胞, 对提取的 DNA 进行 15 个 STR 基因座常规 PCR 扩增和荧光标记复合扩增, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和毛细管电泳检测 2 种 STR 分型方法进行检测. **结果** 常规 PCR 扩增银染检测和荧光标记复合扩增毛细管电泳检测两种 STR 分型方法的结果表明, 同一个体的血浆游离 DNA 和血细胞 DNA STR 分型一致, 且分型效果接近. **结论** 血浆游离 DNA 可作为一种有效的生物学样本进行 STR 分型检测, 应用于法医个体识别和亲权鉴定.

**[关键词]** 血浆; 游离 DNA; STR 分型; 个体识别; 亲权鉴定

**[中图分类号]** R394.3; Q341 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 01 - 0140 - 04

## Study on STR Genotyping of Cell Free DNA in Plasma

CHEN Yang<sup>1)</sup>, HU Li-ping<sup>1)</sup>, MA Bo<sup>2)</sup>, MA Li - yu<sup>1)</sup>, NIE Sheng - jie<sup>1)</sup>,

(1) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Walvax Biotechnology Co., Ltd, Kunming Yunnan 650106, China)

**[Abstract]** **Objective** The purpose of this study was to investigate the feasibility of short tandem repeat (STR) genotyping of cell free DNA in plasma for individual identification and paternity testing. **Methods** EDTA-Na<sub>2</sub> DNA anti-coagulant blood samples were collected from 36 unrelated healthy volunteers, and both DNA in leukocytes and cell free DNA in plasma were extracted respectively using phenol-chloroform method. Target DNA in blood cells and plasma were amplified using regular STR typing and fluorescent multiplex STR assay separately, accordingly, the PCR products were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and capillary electrophoresis. **Results** Using either normal PCR-STR or fluorescent multiplex STR assay, the consistent STR genotyping results were detected with similar efficiency for cell DNA and plasma DNA samples from the same individual. **Conclusion** Cell free DNA in plasma samples can be used as useful biological samples for STR genotyping, which can be applied to individual identification and paternity testing in forensic practice.

**[Key words]** Plasma; Cell free DNA; STR genotyping; Individual identification; Paternity testing

口腔拭子、血痕、精斑和腐败组织等微量或高度降解的检材已广泛利用短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 分析技术实现法医学中常见案例的个人识别和亲权鉴定. 但在强奸致孕案、医疗纠纷和器官移植等特殊案例中, 常规检材受到取材条件、样本保存等诸多限制, 以致急需一

种可以满足此类案件的特殊检材. 而细胞游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 的发现<sup>[1,2]</sup>、来源特征分析<sup>[3-5]</sup>及血浆中肿瘤标记物和胎儿游离 DNA 等的临床研究<sup>[6-10]</sup>, 使血浆样本成为候选检材. 因此, 本研究主要通过血浆游离 DNA 的 STR 分型检测以探讨血浆样本进行个人识别和亲权鉴定的可行性.

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (31100906, 8124136); 云南省科技厅应用基础研究基金资助项目 (2009CD082)

**[作者简介]** 陈阳 (1987~), 女, 湖南常德市人, 在读硕士研究生, 主要从事法医学物证学工作.

**[通讯作者]** 聂胜洁. E-mail: nieshengjie@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 仪器** 低温高速离心机(德国Sigma公司), Master PCR 扩增仪(美国Bio-Rad公司), DYY-8B 电泳仪(中国北京市六一仪器厂), ABI3130 自动遗传分析仪(ABI, USA)。

**1.1.2 试剂** D8S1179、D21S11、D7S820、CSF1PO、D3S1358、D5S818、D13S317、D16S539、D2S1338、D19S433、VWA、D12S391、D18S51、D6S1043、FGA(参照NCBI设计,上海申博化工合成), AmpFISTR® Sinofiler™ 试剂盒(ABI, USA, 包括上述15个STR基因座以及Amelogenin), 10 mg/mL 蛋白酶K, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL), Gold Taq DNA 聚合酶(5 U/μL), GeneScan LIZ 内标, 甲酰胺。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 取2 mL EDTA-Na<sub>2</sub> 抗凝血样置于高速离心机中, 750 r/min 离心1 min, 将上层血浆转移到另一支2 mL 灭菌EP管中。为了减小从血浆和血细胞中提取的DNA浓度及纯度的差异, 根据其蛋白质和DNA含量, 各取400 μL 采用经典酚-氯仿法分别提取血浆和血细胞DNA: 破红细胞→消化(血浆样本中分4次加入20 μL 蛋白酶K, 血细胞样本中加入5 μL 蛋白酶K)→抽提→沉淀→干燥→溶解(血浆cfDNA中加入20 μL TE 缓冲液, 血细胞DNA中加入50 μL TE 缓冲液)→-20℃保存备用。

**1.2.2 常规PCR扩增银染检测** 引物设计与合成: 参照NCBI上查询到的15个STR基因座(D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, D5S818, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, D12S391, D18S51, D6S1043, FGA)的引物序列, 并由上海申博化工合成。

PCR反应体系(20 μL): 10×Buffer 2 μL, 血细胞模板DNA 1.0 μL 或血浆模板DNA 1.5 μL, dNTP 2 μL, 引物 1.0 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 补充PH8.2 灭菌DDW 至20 μL。

PCR反应条件: 95℃ 10 min→10个PCR循环: 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 70℃ 1 min 30s→20个PCR循环: 90℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min 30s→72℃ 7 min→4℃保存。

按照以上PCR反应体系和反应条件进行常规PCR-STR 扩增反应及聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测, 最后记录结果并拍照。

**1.2.3 荧光标记复合扩增毛细管电泳检测** PCR反应体系(10 μL): Reaction Mix 4.0 μL, 血细胞模板DNA 1.0 μL 或血浆模板DNA 1.5 μL, 引物 set 2.0 μL, 5 U/μL Gold Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 补充PH8.2 灭菌DDW 至10 μL。

PCR反应条件: 95℃ 10 min→28个PCR循环: 95℃ 1 min, 59℃ 1 min, 72℃ 1 min→60℃ 60 min→4℃保存。

随机选取5份血浆cfDNA和血细胞DNA按照AmpFISTR Sinofiler™ 试剂盒说明书进行荧光标记复合扩增反应及毛细管电泳检测, 经Data Collection V3.0和Gene Mapper ID V3.2分析电泳检测结果, 并保存分型图谱。

## 2 结果

### 2.1 血浆cfDNA和血细胞DNA常规PCR-STR分型结果比对

血浆cfDNA(P1~P36)和血细胞DNA(C1~C36) PCR-STR 扩增后的产物聚丙烯酰胺凝胶电泳比对分析以1~6号DNA经D21S11引物扩增后的结果为例, 见图1。

图1表明: 血浆cfDNA和血细胞DNA经15个STR基因座引物扩增后均获得清晰高效高特异性的DNA谱带。且同一个体中, 无论是基因分型、等位基因片段大小还是基因座信号强度均显示血浆和血细胞样本的STR分型结果基本一致, 表明血浆cfDNA分型准确。

### 2.2 血浆cfDNA和血细胞DNA荧光标记复合扩增结果比对

血浆cfDNA和血细胞DNA荧光标记复合扩增产物的STR分型以7号为例分析, 结果比对见图2、图3。

图2、图3表明: 血浆cfDNA和血细胞DNA均获得较好的STR图谱, 不存在差异扩增或优势扩增, 具体表现为: 没有出现基因座缺失或等位基因丢失的情况, 杂合子等位基因峰高和面积对称, 各基因座之间的峰高较均衡。与法医物证常规检材的血细胞DNA一样, 血浆cfDNA也能获得稳定特异的STR图谱。说明必要情况下, 血浆样本可以作为法医物证鉴定的补充检材。

## 3 讨论

本研究揭示, 作为法医学上以前不常见的重要生物检材之一的血浆将应用于法医学实践。血浆



果接近, 也证明了血浆 cfDNA 应用于个体识别和亲权鉴定的可行性, 因此血清样本也应该作为法生物检材之一应用于法医学实践, 为解决民事和刑事案件提供客观依据。

在今后的研究中, 基于血浆样本易采集且无创, 但 cfDNA 含量少、片段小、极易降解及受血液凝集和白细胞裂解、DNA 酶等生物特点的影响<sup>[26-18]</sup>, 使样本处理、DNA 提取和检测方法有待进一步改善。而作为一种由单核苷酸之间的差异引起的遗传多态性 DNA 片段而形成的新一代遗传标记系统且逐渐被应用于法医学领域的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)<sup>[9]</sup>将应用于此类生物检材的研究之中, 因为其 PCR 产物长度可小于 100 bp, 且较 STR 更更适用于微量降解的血浆样本的法医 DNA 分析和复合扩增系统的建立。所以, 为了更有效的解决法医学领域的个人识别和亲权鉴定, 血浆 cfDNA 的 SNP 分型检测值得下一步的深入研究。

#### [参考文献]

- [1] STEINMAN C R. Free DNA in serum and plasma from normal adults[J]. *J Clin Invest*, 1975, 56(2):512 - 515.
- [2] LO Y M, CORBETTA N, CHAMBERLAIN P F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *Lancet*, 1997, 350(9 076):485 - 487.
- [3] BENIRSCHKE K, WILLES L. Deportation of trophoblastic emboli to maternal lung: A source of cell-free DNA in maternal blood[J]. *Chimerism*, 2010, 1(1):15 - 18.
- [4] KIMURA M, HARA M, ITAKURA A, et al. Fragment size analysis of free fetal DNA in maternal plasma using Y-STR loci and SRY gene amplification [J]. *Nagoya J Med Sci*, 2011, 73(3-4):129 - 135.
- [5] REPISKA G, SEDLACKOVA T, SZEMES T, et al. Selection of the optimal manual method of cell free fetal DNA isolation from maternal plasma [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(6):1 185 - 1 189.
- [6] ROTH C, PANTEL K, MULLER V, et al. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(4): 4 - 15.
- [7] PAYNE R E, HAVA N L, PAGE K, et al. The presence of disseminated tumour cells in the bone marrow is inversely related to circulating free DNA in plasma in breast cancer dormancy[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(2):375 - 382.
- [8] ZHENG Y W, CHAN K C, SUN H, et al. Nonhematopoietically derived DNA is shorter than hematopoietically derived DNA in plasma: a transplantation model [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(3):549 - 558.
- [9] WROCLAWSKI M L, SERPA-NETO A, FONSECA F L, et al. Cell-free plasma DNA as biochemical biomarker for the diagnosis and follow-up of prostate cancer patients [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(5):2 921 - 2 927.
- [10] SWINKELS D W, WIEGERINCK E, STEEGERS E A, et al. Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma [J]. *Clin Chem*, 2003, 49(3): 525 - 526.
- [11] STROUN M, LYAUTEY J, LEDERREY C, et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release [J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 313(1-2):139 - 142.
- [12] CHAN K C, HUNG E C, WOO J K, et al. Early detection of nasopharyngeal carcinoma by plasma epstein-barr virus DNA analysis in a surveillance program [J]. *Cancer*, 2013, 119(10):1 838 - 1 844.
- [13] DURAND C M, MARR K A, ARNOLD C A, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in plasma as an adjunct diagnostic for gastrointestinal tract disease in kidney and liver transplant recipients [J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 12(11): 1 550 - 1 559.
- [14] HAYASHI T, SUGAHARA K, DATEKI N, et al. Characteristics of plasma DNA and its application for detection of K-ras gene mutation [J]. *Rinsho Byori*, 2000, 48(6): 547 - 553.
- [15] CHEREPANOVA A V, TAMKOVICH S N, BRYZGUNOVA O E, et al. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 11(37):218 - 221.
- [16] LEE T H, MONTALVO L, CHREBTOV V, et al. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma [J]. *Transfusion*, 2001, 41(2):276 - 282.
- [17] 李勤, 张毅, 丁宇烽, 等. 孕妇血样采集后体外存放对血浆中胎儿游离DNA水平的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29(9):1 042 - 1 045.
- [18] TAMKOVICH S N, CHEREPANOVA A V, KOLESNIKOVA EV, et al. Circulating DNA and DNase activity in human blood [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 9(1 075):191-196.
- [19] BORSTING C, MOGENSEN H S, MORLING N. Forensic genetic SNP typing of low-template DNA and highly degraded DNA from crime case samples [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, 7(3):345 - 352.

(2013 - 12 - 04 收稿)