

## 线粒体基因种属鉴定复合扩增体系

方月琴<sup>1,2</sup>, 顾准<sup>1</sup>, 侯一平<sup>2</sup>

(1. 健雄职业技术学院 生物与化学工程系, 江苏 苏州 215411;  
2. 四川大学 华西基础医学与法医学院, 四川 成都 610041)

**摘要:**针对 cyt b 基因和 ND6 基因序列, 设计两对引物, 以 14 种常见动物(包括人)生物性检材为对象进行 PCR 扩增, 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、硝酸银染色进行分析。结果证明, 两条电泳条带者为人样本, 分别是 cyt b 基因片段(358 bp)和 ND6 基因片段(181 bp); 一条电泳条带者为动物来源, 是 358 bp cyt b 基因片段。在 37.5  $\mu$ L PCR 反应体系中最小检出模板量为 0.25 pg 基因组 DNA。检材在 4  $^{\circ}$ C、室温和 37  $^{\circ}$ C 温度下, 经过 4 个月后均可获得正确的种属区分。高度潮湿环境中放置 50 d 的检材、形成于水泥地面、墙面、泥土等基质上的血痕, 本方法可得到正确区分。由此建立的种属鉴定的线粒体基因复合扩增体系, 其检测片段短、灵敏度高、操作简易, 适合法医学上微量、降解、陈旧检材的种属判定。

**关键词:**种属鉴定; 线粒体 DNA; cyt b 基因; ND6 基因; 法医学

**中图分类号:**R318.11   **文献标识码:**A   **文章编号:**1671-5322(2012)01-0019-06

种属鉴定在法医学上有非常重要的意义, 其任务主要是鉴定生物性检材的种属来源, 明确检材是来自人类还是动物<sup>[1]</sup>。这是一切法医物证学实验室的常规工作。种属鉴定有多种方法, 包括形态学方法、血清学方法、细胞学方法、分子生物学方法及生物化学方法<sup>[2]</sup>。

目前种属鉴定的研究重点主要集中在在线粒体脱氧核糖核酸(简称 mtDNA), 因细胞内线粒体拷贝数远高于核内 DNA, 在核 DNA 已经降解的样品中仍有较大可能提取到 mtDNA。而法医学实践中经常遇到腐败、陈旧以及微量的检材, 正好借助 mtDNA 的这一优点。但目前种属鉴定方法尚存在不足, 如现有的复合扩增反应体系有潜在的不稳定性、某些缺乏必需的内对照和一些检测体系费用昂贵。本研究拟针对目前种属鉴定中存在的这些不足, 选择 mtDNA 编码基因为目标片段, 优化复合扩增体系, 建立稳定可靠的线粒体基因复合扩增技术方案, 以期为法医学种属鉴定提供更为实用的技术方法。

### 1 材料和方法

#### 1.1 样本

1.1.1 人类样本来自四川成都地区汉族群体, 随机抽取 13 名男性、13 名女性共 26 名无血缘关系个体的静脉血 1 mL, EDTA 抗凝, -20  $^{\circ}$ C 保存。本实验共取了 13 种常见动物, 每种各 2 个个体的样本。这 13 种动物分别为恒河猴、家猪、牛、羊、狗、兔、豚鼠、鸡、鸭、鲢鱼、鳙鱼、大鼠、牛蛙。前 7 种动物取血液约 2 mL, EDTA 抗凝, -20  $^{\circ}$ C 保存; 其余取肌肉或肝脏组织约 20 g, 直接 -20  $^{\circ}$ C 冷冻保存。

1.1.2 灵敏度检测所需样本取自本校法医病理学 3 具送检解剖样本, 每例各取肌肉组织 20 g 左右, 直接 -20  $^{\circ}$ C 冷冻保存。

1.1.3 陈旧样本取自本实验室历年检案检材, 包括室温条件下放置 9 年的人类血痕样本和约 10 年的人类骨骼样本。

收稿日期: 2011-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30872917; 81072510)

作者简介: 方月琴(1979-), 女, 浙江衢州人, 教师, 硕士, 主要研究方向为生物医学。

### 1.2 试剂与仪器

引物 (Invitrogen 公司)、Taq 酶、dNTP 和 Marker I(天为时代, 国产)。PE9600 扩增仪(PE 公司, 美国)、可调移液器(Eppendorf 公司, 德国)、多功能电泳仪(Pharmacia 公司, 瑞典)、UV-260 紫外分光光度计(岛津公司, 日本)、纯水体系(Millipore 公司, 法国)等。

### 1.3 基因组 DNA 提取

Chelex-100 法提取全血、肝脏组织、肌肉组织样本和陈旧血痕的 DNA。经典酚-氯仿法提取灵敏度检测肌肉样本的 DNA。CTAB(十六烷基三甲基溴化胺)法提取陈旧骨骼样本的 mtDNA。

### 1.4 PCR 扩增

PCR 扩增总体积为 37.5 μL。普通 PCR 扩增体系中, 加入一对引物, 其用量为 50 μM, 0.3 μL, Taq 酶用量为 1.5 U。复合扩增体系中, 加入 2 对引物, 其用量分别是 cyt b 引物为 50 μM, 0.25 μL, ND6 引物为 50 μM, 0.3 μL, Taq 酶用量为 1.75 U。在 PCR 扩增时设立阴性对照和阳性对照。阴性对照所用模板为纯水。阳性对照为 PCR 体系中加入等体积的已知人的 DNA 样本。将上述反应体系在 PE9600 热循环仪上进行扩增, 先进行

94 °C 预变性 3 min; 然后运行 30 次 PCR 循环, 退火温度定为 52 °C; 最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物 4 °C 保存。

### 1.5 PAGE - 银染显色

将 PCR 产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶连续缓冲系统进行垂直电泳, 2 μL 上样。电泳条件为恒压 600 V 电泳 60 min, 硝酸银染技术进行显色。

## 2 结果

### 2.1 cyt b 引物和 ND6 引物复合扩增体系的建立

PCR 扩增体系中将 cyt b 和 ND6 两对引物进行复合扩增, 在 37.5 μL 复合扩增反应体系中, 若 cyt b 和 ND6 两对引物以相同浓度 50 μM, 0.3 μL 参与反应, 经电泳银染显色, cyt b 基因片段的条带明显浓于 ND6 基因。因此根据两者条带在动物与人类样本中的浓淡, 相应调整反应体系中 cyt b 引物至 50 μM, 0.25 μL, 而 ND6 引物用量不变, 使两者 PCR 产物相当。

本系统检测结果为动物样本检出一条带; 人的样本检出两条带, 这表明本研究建立的复合扩增体系能成功区分人和动物的种属(图 1)。

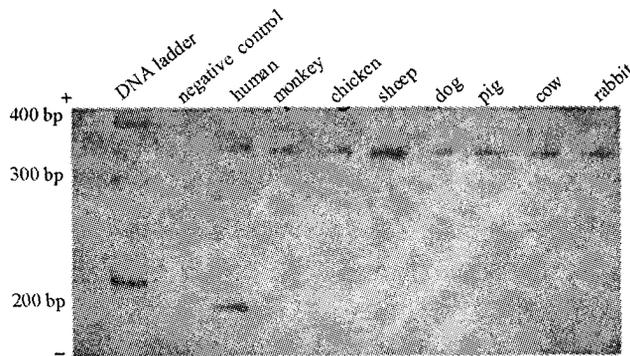


图 1 cyt b 引物和 ND6 引物扩增人和动物样本的电泳图

Fig. 1 Coamplification of cyt b and ND6 for various animals and human DNA samples

图左侧数字为分子量 Marker 的大小, 图上方为不同样本。M: Marker I (100 ~ 600 bp)。图上方为阴极, 下方为阳极。该图表明 cyt b/ND6 复合扩增体系能区别人和动物。PAGE - 银染显示 2 条带为人的样本, 显示 1 条带的为动物样本。

### 2.2 系统灵敏度检测

经典酚-氯仿法提取的人类 DNA 样本用紫

外分光光度计测量 260 nm、280 nm 和 330 nm 处的 OD 值, 三管 DNA 平均后分别为: 0.415、0.269 和 0.029。依据公式计算 DNA 浓度 (μg/mL) = (OD<sub>260</sub> - OD<sub>330</sub>) × 500 μg/mL × 稀释倍数 (100), 所得结果为 579 μg/mL; DNA 纯度 = (OD<sub>260</sub> - OD<sub>330</sub>) / (OD<sub>280</sub> - OD<sub>330</sub>), 所得结果为 1.61。纯度比值在 1.6 ~ 1.8 范围内说明所得

DNA 纯度较高。将该 DNA 溶液稀释后进行检测,最终反应体系中加入 DNA 模板量分别为:2 pg、1 pg、0.5 pg、0.25 pg 和 0.2 pg,PCR 产物经

PAGE - 银染显色后,实验结果表明在本实验条件下,37.5 μL 体系中 0.25 pg 以上均可得出正确的分析结果(见图 2)。

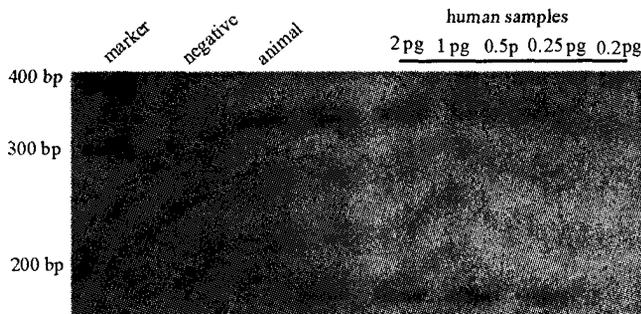


图 2 灵敏度检测电泳图  
Fig.2 Detective limit of sensitivity

### 2.3 环境对检材的影响

人血痕样本在 4 ℃、室温和 37 ℃ 环境条件下,放置 0 d、7 d、15 d、30 d、50 d、90 d、120 d 后, Chelex - 100 法提取 DNA, 然后扩增进行检测, 结果显示 120 d 后所有检测均可经本法得以正确区分(见图 3)。该结果表明,本研究所建立的复合扩增体系可以对保留在 4 ~ 37 ℃ 范围内、时间在

120 d 之内甚至更长时间的检材作出正确的种属鉴定;并且条带颜色深浅无明显可见的变化,体现了该方法的稳定性。根据本实验室建立的潮湿模型,将人血痕样本分别置于不同湿度环境中,结果发现在高度潮湿环境中经过 50 d,本方法可正确区分人和动物样本(见图 4)。

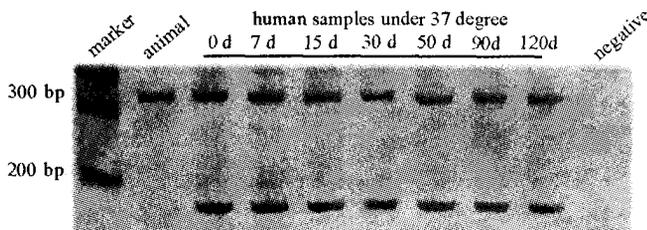


图 3 检材在 37 ℃ 放置不同时间后进行种属鉴定的电泳图  
Fig.3 PAGE gel result of species identification for samples under 37 ℃ for different time

### 2.4 基质对结果的影响

人血液在餐巾纸、棉签、塑料薄膜、塑料泡沫、水泥地面、白墙面、泥土、窗帘布等基质上制成血痕,用 Chelex - 100 法提取 DNA, 然后进行复合扩增检测。所有检材均获得了正确的检测结果。提示上述的血痕基质对本方法没有显著影响(电泳结果未提供)。

### 2.5 陈旧样本检测

Chelex - 100 法提取陈旧样本 DNA, 用该方法进行检测, 均能得出正确的结果(图 5), 表明可以用于陈旧血痕样本和骨骼样本的种属鉴定。

图左侧数字为分子量 Marker 的大小, 图上方为样本。M: MarkerI (100 ~ 600 bp)。图上方为阴极, 下方为阳极。该图表明血痕样本和骨骼样本在室温下存放较长时间, 运用本方法可获得正确的种属鉴定。



量、腐败降解检材,无需昂贵的基因测序就可以满足大部分法医学应用的要求。

mtDNA 的所有 37 个基因中,将人类和动物基因进行序列比对发现 16S rRNA、12S rRNA 和 ND6 等基因符合上述原则。这些基因序列中均有一段 80 bp 左右长的片段,其序列在人与动物中几乎没有同源性。但是 16S rRNA 和 12S rRNA 的这段区域 AT 含量高,回文序列多,同时还有多个碱基容易与其他碱基错配,因而难以设计出令人满意的引物。DN6 基因的 288 ~ 375 bp 区域的序列在人和动物中相差也非常大,但是不存在上述影响引物设计的不足。本课题设计的后引物即位于该区域,前引物在这个区域的下游,可特异扩增出人 mtDNA ND6 基因的一个长度为 181 bp 的片段(图 6)。

图 6a 为人与猴子 ND6 基因序列比对图,中间空缺部分代表两者序列不同区域;图 6b 显示 ND6 基因位于线粒体 L14438 与 L14525 之间。图 6c 为 7 种动物的 ND6 基因序列比对图,“\*”代表不同碱基。

因法医物证检材具有易变性、变质、降解、腐败及微量的特点,它们所受环境因素影响千差万别,所以对本系统进行了灵敏度测定。在 37.5 μL 体系中,模板 DNA 稀释到 0.25 pg 以上均可得出正确分析结果。该体系可以对 4 ~ 37 °C 范围内、时间在 120 d 之内甚至更长时间的检材作出正确的种属鉴定;未观察到各种血痕基质对该系统有抑制作用。也能对四川成都室内环境中存放 10 年的骨骼样本和血痕样本作出正确鉴定,表明了系统对陈旧样本的检测能力。因此从灵敏度、环境因素、血痕形成基质和陈旧样本等 4 方面对本方法进行可行性检测,均获得了满意的结果,可基本确认该方案在法医学实际检案中的可行性和实用性。

本研究建立的线粒体基因复合扩增技术具有

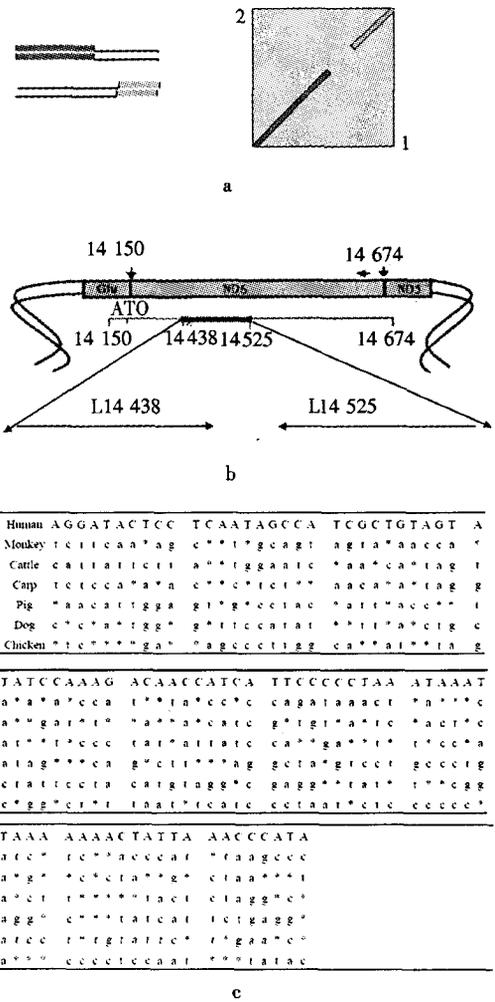


图 6 ND6 基因位于线粒体 L14438 与 L14525 之间  
Fig. 6 The ND6 positions of L14150 and L14674 on mitochondrial DNA. Numbering is according to the human mtDNA sequence

方法稳定、灵敏度高、费用低廉和操作简便等优点,能满足法医学上常规的种属鉴定。但是该技术能否真正运用于法医学的实践中,还需要作进一步的检测。比如增加检测的动物和人类的样本数,以明确其扩增结果的一致性。

参考文献:

[1] Cattaneo C, DiMartino S, Scali S, Determining the human origin of fragments of burnt bone: a comparative stuey of histological, immunological and DNA techniques[J]. Forensic Sci. Int. 1999,102:181 - 191.

[2] 周斌,张林,吴梅筠,等. DNA 分析与种属鉴定[J]. 法医学杂志,2003,19(4):245 - 248.

[3] Parson K W, Pegoraro H, Foger M N. Species identification by means of the cytochrome b gene[J]. Int. J. Legal Med. 2000,114:23 - 28.

- [4] Balitzki - Korte B, Anslinger K, Bartsch C, et al. Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12 S rRNA gene[J]. *Int. J. Legal Med.* 2005, 119:291 - 294.
- [5] Kazuhiko I, Tomoko A, Sachio M. Species Identification using 16s Ribosomal RNA Coding Region in Mitochondrial DNA [A]. 17th Meeting of the International Association of Forensic Sciences. 2005.
- [6] Tozzo P, Ponzano E, Novelli E, et al. Discrimination Between Human and Animal DNA: Application of a Duplex Polymerase Chain Reaction to Forensic Identification[J]. *Am J Forensic Med Pathol.* 2011 epub.
- [7] 田力, 宋晓红, 云利兵, 等. 线粒体 DNA 16srRNA 和 ND4 基因荧光标记复合扩增在法医学种属鉴定中的应用研究[J]. *中国法医学杂志*, 2006, 21:272 - 274.

## Duplex Amplification of Mitochondrial DNA for Species Identification

FANG Yue-qin<sup>1,2</sup>, GU Zhun<sup>1</sup>, HOU Yi-ping<sup>2</sup>

(1. Department of Biological and Chemical Engineering, Chien - Shiung Institute of Technology, Suzhou Jiangsu 215411, China; )  
(2. School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu Sichuan 610041, China )

**Abstract:** Two pairs of primers for the cyt b gene and ND6 gene sequences were designed and biological sample of 14 species of animals (including humans) PCR were amplified, and the products were analyzed by poly - acrylamide gel electrophoresis (PAGE) and stained with silver nitrate. The results demonstrate that the two electrophoretic bands of the cyt b gene fragment (358 bp) and ND6 gene fragment (181 bp) are human samples; and the one electrophoresis strip of 358 bp Cytb gene fragments is animal sources. In 37.5  $\mu$ l PCR reaction system, the minimum detectable template concentration is 0.25 pg genomic DNA. Samples can be distinguished correctly at 4 $^{\circ}$ C, room temperature and 37  $^{\circ}$ C, after four months later. Samples placed in a high humidity environment for 50 days and bloodstains formed in the concrete floor or on the walls, and soil matrix, can be distinguished correctly by the methods. The species identification method of the mitochondrial genome multiplex PCR system with short detected fragments are high sensitivity and easy to operate and suitable to determine the trace or degradation or obsolete samples of forensic.

**Keywords:** species identification; Mitochondrial DNA; cyt b gene; ND6 gene; Forensic science

(责任编辑:沈建新)