微腔型 PCR 芯片用于法医 DNA 分析的初步研究

董军磊[1]，欧　元[2,3]，李彩霞[2]，秦奎伟[3]，刘　琳[1]，姜伯伟[4]，赵兴春[2]，叶　健[1,2]（1. 中国人民公安大学，北京　100038；2. 公安部物证鉴定中心，北京　100038；3. 北京理工大学，北京　100081；4. 中科院上海应用物理研究所，上海　201800）

摘要： **目的**　为了克服传统 PCR 热循环仪体积大，运行电压高，耗时长，只能在实验室中应用的缺点，研究了一种微腔型 PCR 芯片，以期实现现场对 STR 片段的复合扩增。**方法**　采用在 PCR 反应缓冲液中加入不同浓度的 BSA 溶液对芯片进行表面优化处理的方法及不同酶量优化实现对 STR 片段的有效扩增。**结果**　使用浓度为 0.5mg/mL 的 BSA 可得到清晰完整的 STR 分型结果；加大酶量有益于扩增效率的提高。**结论**　该种微腔型 PCR 芯片经初步优化后可有效地对 STR 片段进行复合扩增，经进一步优化可真正实现法医 DNA 分析的更加微量化和快速化。

关键词： 法医遗传学；PCR 芯片；DNA 分析

中图分类号： DF795.2　**文献标识码：** A　**文章编号：** 1008-3650(2013)05-0022-03

Application of micro-cavity PCR chip in forensic DNA analysis

DONG Jun-lei, OU Yuan, LI Cai-xia, et al (*Chinese People's Public Security University, Beijing 100038, China*)

ABSTRACT: **Objective**　To develop a rapid method for DNA analysis by using micro-cavity PCR chip. **Methods**　By adding different concentrations of BSA solution and TaqGold polymerase in the PCR reaction buffer, the surface of the chip was optimized to achieve efficient amplification of the STR fragments. **Results**　Complete STR genotyping results were obtained with a concentration of 0.5mg/ml of BSA. **Conclusion**　The optimized micro-cavity PCR chip was effective for multiplex amplification of STR fragments, and it is possible to achieve a rapid forensic DNA analysis at the crime scene through further optimization.

KEY WORDS: forensic genetics; PCR chip; DNA analysis

聚合酶链反应（PCR）是一种选择性体外扩增 DNA 片段的方法，广泛应用于分子生物学的各个领域。利用微加工技术制备的微型 PCR 芯片以其体积小，升降温速度快和消耗试剂少等优势已成为当前研究的热点[1]。本研究用一种基于 NOA81 光胶的微腔型 PCR 芯片初步实现了 STR 片段的复合扩增，报道如下。

1　材料与方法

1.1　材　料

AmpFlSTR ®Identifiler PCR 扩增试剂盒（美国 AB 公司）、9700 型热循环仪（美国 AB 公司）、3130XL 型遗传分析仪（美国 AB 公司）、牛血清蛋白（BSA）（北京拜尔迪生物技术公司）、基于 NOA81 光胶的微腔型 PCR 芯片及加热温控装置（北京理工大学生命学院），见图 1。

图 1　微腔型 PCR 芯片及加热温控装置

1.2　方　法

用 AmpFlSTR ®Identifiler PCR 扩增试剂盒进行 DNA 扩增，对照试验用 9700 型热循环仪进行扩增，其余各组在 0.2mL PCR 管内配制反应混合液后取 5μL 加入芯片反应腔内，配比如表 1 所示。PCR 芯片用紫外光胶封口后连接控制装置，加热电压 6.9v，温感器电压 4.9v。扩增程序均为：95℃ 11min；94℃ 1min，59℃ 1min，72℃ 1min，29 个循环；60℃延伸 60min。所有产物均在 3130XL 型遗传分析仪上按照标准操作规则进行检测，用 GenMapper IDv3.2 软件进行数据分析。每组试验重复 5 次。

作者简介：黄军磊（1988—），男，河南唐河人，在读硕士，从事法医遗传学方面研究。

Tel：18010196564

表 1　实验分组及反应液配比

分组	缓冲液(μL)	引物(μL)	9947A(ng)	Taq 酶(U)	BSA(μL)	去离子水(μL)
9700 对照扩增	4.0	2.0	1.0	1	—	2.8
芯片常规扩增	2.2	1.2	0.5	0.5	—	补水至 5.5
芯片 BSA 优化	2.2	1.2	0.5	0.5	1(0.25、0.5、1.0、1.5mg/ml)	补水至 5.5
芯片酶量优化	2.2	1.2	0.5	0.5、1、1.5、2	1(0.5mg/ml)	补水至 5.5

2　结果与讨论

芯片常规组反应混合液中未加任何表面改性剂，相当于把传统的 PCR 体系缩小移植到芯片上，结果仅有个别位点得到有效扩增，且峰值很低(见图 2)；10μL 体系的常规对照结果正常(见图 3)。制作芯片反应腔的材料是 NOA81 紫外固化型光胶，目前未见其对 PCR 影响的相关报道。从这组的结果可以看出其固化后的表面化学性质对 PCR 反应会产生抑制作用。

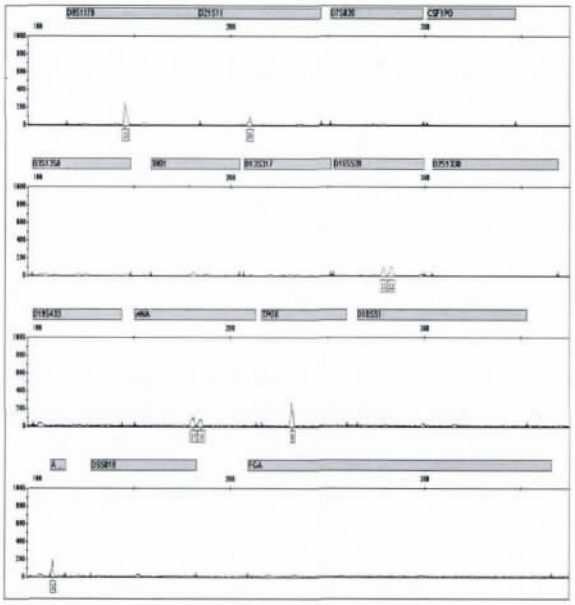

图 2　芯片常规扩增检测结果

2.1　表面处理对扩增的影响

芯片上的 PCR 扩增与传统的 PCR 扩增不同。由于体积的缩小，芯片的比表面积变大，表面作用更为明显，表面修饰处理显得更为重要[3]。BSA 是常用来进行芯片通道表面的动态改性试剂，一定浓度的 BSA 可以与 Taq DNA 聚合酶等形成竞争性吸附，而且能够被优先吸附到微通道的表面上，从而减少其对 Taq DNA 聚合酶的吸附，同时也避免了 PCR 混合液中其它组分在微通道表面的非特异性吸附[2]。本研究采用在 PCR 反应混合液中添加与 DNA 等比的 BSA 溶液的方法进行芯片反应腔内表面的动态改性。实验发现，当 BSA 溶液浓度小于 0.25mg/mL 时，达不到对通道内表面处理的效果；大于 1.5mg/mL 时效果也不好，原因可能是过高的蛋白浓度会对 PCR 反应有抑制作用，故选用浓度为 0.25、0.5、1.0、

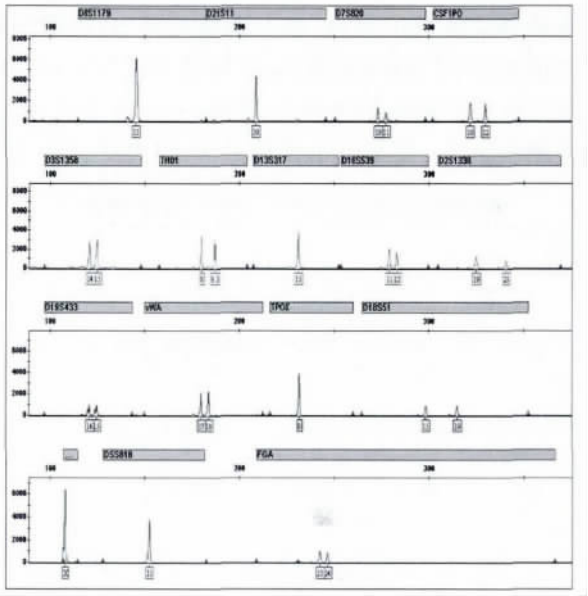

图 3　常规对照扩增检测结果

1.5mg/mL的 BSA 进行优化处理。结果表明：加入 BSA 溶度为 0.5mg/mL 时得到完整的 STR 分型(见图 4)，其余三个浓度在 D7S820、D2S1338、D19S433、D18S51 和 FGA 这 5 个位点均有不同程度的缺失或(和)峰值过低。用浓度 0.5mg/mL 的 BSA 优化处理得到的完整 STR 分型，但与常规对照相比仍有峰值较低、位点平衡度不高及非模板加 A 不完全等方面的问题。

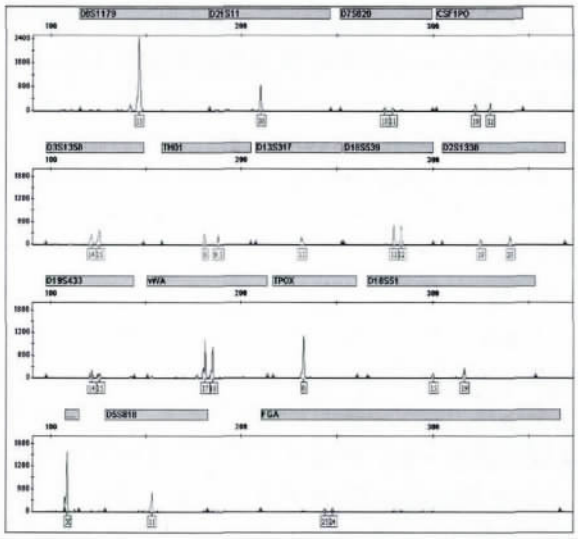

图 4　芯片 PCR 反应液中加入浓度 0.5mg/mL 的 BSA 进行表面优化处理，扩增后检测结果

2.2 不同酶量对扩增的影响

经过 BSA 对反应腔内壁封闭处理后，在一定程度上大大减少了内壁对 Taq 聚合酶的吸附，同时也起到稳定 Taq 聚合酶的目的。在采用浓度 0.5mg/mL 的 BSA 优化的同时加大反应液中的酶量对扩增效率仍有一定影响。在同一芯片的不同通道的 PCR 反应液中分别加入 0.5、1、1.5、2 U 的 Taq 聚合酶，扩增后电泳检测结果对比发现，加大酶量所得 STR 图的位点峰值均有不同程度的提高，扩增效率得到提高。加入 1.5 和 2 U 的酶效果相近(见图 5)。这是因为，虽然内壁经过了一定的表面修饰处理，但内壁对酶或者其他成分仍有一定的吸附或者抑制其活性。因此，在吸附饱和前，适当加大酶量，可以增加酶的活性，但当达到饱和吸附后，增加酶量对提高扩增效率已没有显著效果[3]。

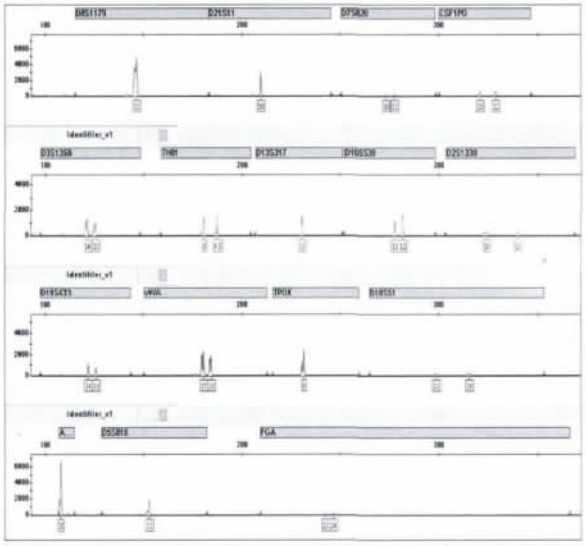

图 5 芯片 PCR 反应液中加入浓度 0.5mg/mL 的 BSA 进行表面优化处理，同时增加聚合酶量至 1.5 U 扩增后检测结果

本研究采用一种新型的 NOA81 光胶 PCR 芯片对 STR 片段进行复合扩增，获得的 STR 分型结果清晰、完整。通过优化对比扩增发现：一定浓度的 BSA 表面处理剂与适当增加酶量可提高扩增效率。虽然与常规 9700 型热循环仪的扩增效果相比，PCR 芯片在扩增效率、平衡性及稳定性等方面与还略有不足，但 9700 体积大，耗时长(完成扩增需近 3h)，而该套芯片装置体积小，运行所需电压小(仅 6.9v)，可利用车载电源在现场进行分析以便实现现场便携化，且消耗试剂少、耗时较短(完成扩增花费 2.5h)。后续的研究会对芯片及配套检测试剂进行优化，进一步降低扩增体系和缩短扩增时间，并对现场各类型样本进行有效性、稳定性和灵敏性的验证研究，以期实现真正的现场便携化和快速化。

参考文献：

[1] 董军磊，欧元，李彩霞，等. 微流控 PCR 芯片研究进展及其在法医 DNA 检验中的应用[J]. 生命科学仪器，2012，10(3)：45-51.

[2] 祁恒. 高聚物基连续流式 PCR 微流控芯片系统与应用技术研究[D]. 北京工业大学，2009.

[3] 邹志青，周天，赵建龙，等. 硅-玻璃聚合酶链式反应微芯片对 β-葡糖苷酸酶基因的扩增[J]. 生物化学与生物物理进展，2004，31(1)：41-45.

收稿日期：2012-11-20

(上接第 14 页)

位于尸体背侧及四肢坐位姿势低下未受压部位，压之褪色。颜面瘀血，口唇指端发绀，双侧角膜透明，瞳孔等大等圆，直径 5mm，双眼睑结膜见少量针尖样出血点。颈部可见多道宽 2cm～3cm 带状缢沟，缢沟生活反应明显，于双侧枕部向上提空。余尸表未见明显暴力打击损伤。解剖见：心、肺浆膜下有瘀点性出血，余未发现明显异常。提取胃壁组织及胃内容检验，未检出常见镇静安眠药物、常见农药、毒鼠强和乙醇等成份。

2 讨 论

本案由于原始现场已破坏，根据现场残留物品及尸体检验分析，可以重建死者以胶带纸缠绕颈部通过后座安全带缢挂于右后座扶手上呈坐位的状态，与死者家属描述原始状态一致。根据尸体检验所见颈部见带状缢沟，缢沟生活反应明显，死者颜面瘀血，口唇指端发绀，双眼睑结膜见少量针尖样出血点，呈典型窒息症状，余体表未见明显暴力损伤及异常，分析死者系胶带纸缢颈致机械性窒息死亡。死者颈部胶带呈多圈缠绕颈部形成闭锁环，车后座安全带自身为一封闭环，两者链接呈环环相扣，形成方式只能是将安全带环穿过扶手下拉后，胶带纸穿过安全带环一圈一圈缠绕颈部而形成该闭锁环。车内后排空间狭小，这一方式复杂，他人形成难。安全带具有在没有牵拉力的状态时会自动回缩，当突然受较大力时会自动锁紧的特点。经仔细分析、在有人员保护的情况下模拟重建，取用另一同品牌车辆，类似胶带纸及剪刀。用钥匙开车门，从内锁闭车门后，坐于右后座，将右后座安全带环穿过右后门上方扶手，将安全带下拉至适当位置用脚或其他物品(金属外网软管)固定牵拉后，双手配合用胶带纸穿过安全带环，再依次缠绕颈部数圈后，用剪刀将剩余胶带卷置于后座，松开安全带，安全带自动回缩，人稍站起，安全带自动回缩，然后突然坐下，胶带环牵拉安全带环突然受力，安全带锁闭，当事人颈部受力，以坐位姿势形成机械性窒息。结合痕迹检验发现胶带纸尾部断端与胶带卷起点断端呈整体分离改变，且残余胶带卷上熏显出死者指纹。分析本例性质为自杀。

收稿日期：2013-01-04