

利用复合 PCR 扩增荧光自动 STR 分型方法 认定犯罪嫌疑人 1 例报告

江 斌

(湖南省衡阳医学院分子生物学研究中心, 湖南 衡阳 421001)

关键词: 荧光自动 DNA 检测; 聚合酶链反应; 性犯罪; 个人识别方法

中图分类号: R89 文献标识码: B 文章编号: 1000-257X(2000)01-0072-02

某派出所送来蒋某(女)控告于 1998 年 7 月 1 日被嫌疑人张某(男)强奸的有关检材。送检样品: ① 避孕套一只; 套内精液少量, 呈红棕色、恶臭、腐败状; ② 受害者蒋某血纱一份; ③ 嫌疑人张某血纱一份。送检目的: 要求做 DNA 鉴定以确定避孕套内的精液是否为张某所留。本研究所利用复合 PCR 扩增荧光自动短片段串联重复序列(short tandem repeat, STR)分型方法, 最后定性为强奸案, 现予以报道。

1 材料与方 法

1.1 DNA 抽提

将送检样品以常规等体积酚-氯仿方法抽提 DNA^[1]。

1.2 PCR 反应

体积为 25 μ L, 每一批均附有阳性及阴性(水)对照。反应成分: 模板 DNA 3 μ L, 每种引物(美国 PE 公司)0.08~0.12 μ mol/L, dNTPs(上海生工)0.2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶(上海生工)10 kU/L, 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.01 mL/L gelatin, MgCl₂ 0.15 mmol/L, PCR 循环: 90 $^{\circ}$ C 5 min, 93 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 28 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。仪器为 PE Gene-Amp PCR system 2400。

1.3 电 泳

1.3.1 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(ndPAGE) 取 PCR 扩增产物 5~10 μ L 与 1 μ L 加样缓冲液混匀, 加入加样孔中, 以 Phix-174 作为 DNA 标准参照物, 8%聚丙烯酰胺凝胶(聚丙烯酰胺与双甲叉聚丙

烯酰胺之比为 29:1) 200 V 恒压电泳至溴酚蓝染料迁移至下电泳槽内为止。银染检测扩增产物, 电泳仪: Hoefer 公司 SE600 型电泳仪,

1.3.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(dPAGE) 取荧光标记 PCR 扩增产物 0.5 μ L 与适量加样缓冲液混匀, 6%聚丙烯酰胺凝胶(6 mol/L Urea)在 1680 V、51 $^{\circ}$ C 恒压恒温电泳 4 h(电泳仪: 美国 PE 公司 Prism 377 型荧光 DNA 自动检测仪), GeneScan 672 收集并分析数据。

2 结 果

2.1 ndPAGE、银染检测 STR 结果

精液与张某在 D₂₁S₁₁、D₁₉S₂₅₃、PLA、ATT、ARA 等 STR 位点的基因型均相同, 但在 TH01 及 TPOX 两位点的基因型则不相同, 部分结果见图 1。

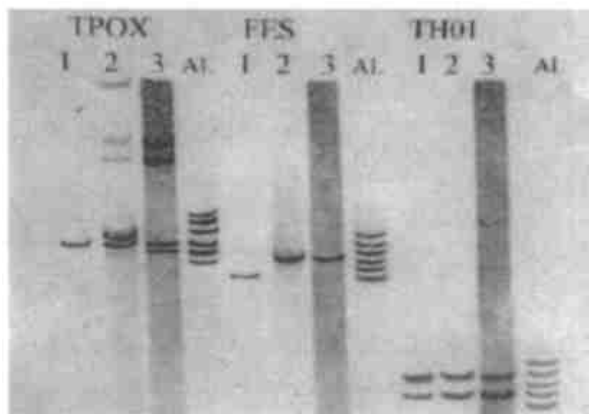


图 1 三样本非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 STR 结果

Fig. 1 Analysis of loci TPOX, FES, TH01 on non-denaturing PAGE of three samples

1. The victim; 2. The suspect; 3. The sperm

收稿日期: 1999-01-13

基金项目: 广东省重点科技攻关项目(99M04813G)

作者简介: 江 斌(1968-), 女, 法医博士, 现任主检法医师。1998 届中山医科大学校友。近两年来完成了广东及其邻近省市包括凶杀、碎尸、交通事故、强奸、伤害、亲子鉴定等各种案件 70 余宗的 DNA 鉴定工作。

2.2 变性 PAGE、荧光 STR 检测结果

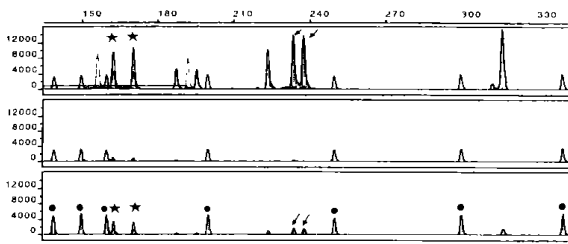
精液与张某在所检测的 6 个 STR 位点及 1 个性别鉴定位点的分型均相同, 将基因分型结果列于表 1, 其荧光扫描结果见图 2。

根据 DNA 分型结果可知, 送检避孕套内精液所检测的 6 个 STR 位点基因型、1 个性别 Amelogenin 基因位点分型与嫌疑人张某的均相同, 偶合率达 1.059×10^{-10} 。

表 1 7 个位点荧光检测结果

Table 1 Genotypes of the three samples obtained by fluorescent DNA detection at 7 loci

No	Sample	Amelogenin	VWA31A	TH01	F13A1	FES	TPOX	CSF1PO
1	Spem	X/Y	18/18	7/9	6/6	11/11	8/9	12/12
2	The suspect	X/Y	18/18	7/9	6/6	11/11	8/9	12/12
3	The victim	X/X	14/16	7/9	3.2/4	8/8	7/8	10/12



Dye/Sample	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1B_1.9	85.33	162.67	4887	49974	1845
1B_2.2	88.73	170.67	5456	49439	1811
1Y_6	128.22	233.83	5632	57921	2443
1Y_7	128.03	237.85	5521	56506	2478
7B_5	95.27	162.69	505	3872	1844
7B_7	98.63	170.59	422	3214	1908
7Y_5	128.12	233.83	182	1353	2441
3B_4	85.38	162.69	1742	13228	1848
3B_8	99.79	170.67	1700	12905	1912
3Y_1	128.33	233.97	679	5847	2445
3Y_2	128.33	237.88	658	5737	2480
3R_6	85.97	159.00	851	5786	1884
3R_7	89.09	159.00	905	6182	1742
3R_9	94.24	180.00	887	8587	1824
3R_9	111.44	200.00	887	6765	2157
3R_10	133.86	250.00	788	6987	2587
3R_11	158.31	300.00	903	7943	3084
3R_12	177.47	349.00	946	8708	3435

基因型不相同, 送案单位 ABO 血型鉴定结果“不排除嫌疑人张某”, 用相同 STR 位点进行 PCR 扩增并结合运用荧光 DNA 自动检测仪进行荧光自动 STR 分型, 发现避孕套内精液及嫌疑人张某的一致, 偶合率达到 1.059×10^{-10} , 得出了“认定嫌疑人”的结论; 该报告发出后, 经侦察人员多方取证, 嫌疑人张某供出全部作案经过, 最后该案定性为强奸案。荧光自动 STR 分析为破获该案提供了科学依据。

变性和非变性 PAGE 所得结果不同的原因, 与常规 PAGE 中存在泳道间泳动速率不一致, 使相同等位基因在不同胶或同一板胶不同泳道中的泳动快慢不一有关, 这种情况在作者以前的工作中亦出现过, 尤其是非变性 PAGE 中出现较多; 荧光自动检测在同一泳道中, PCR 扩增产物与相对分子质量对照同时加样电泳, 避免了泳道间差异, 本文所用自动测量等位基因长度系统的百分精确度在 99.42% ~ 99.96% 之间, 分辨力可达 1 bp。

此外, 这种现象还与非变性 PAGE 中某些 DNA 片段表现出异常的泳动速率有关^[3], 这种现象可能是 DNA 片段碱基排列结构的差异使双链 DNA 分子的曲率发生变化而阻碍其迁移, 使该等位基因在非变性 PAGE 中的泳动失常。一个很好的例子, 如本文图 1 所示受害者 TPOX 位点的基因型为 7/8, 但图中仅显示出一条泳带。故运用非变性 PAGE 进行 STR 位点的分型时应慎重。

参考文献:

[1] 江 斌. STR 分型和性别鉴定及其法医学应用[D]. 广州: 中山医科大学, 1998.

图 2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、荧光 STR 部分检测结果

Fig. 2 Analysis of 7 loci on denaturing PAGE by fluorescent STR profiling assay

●: Internal size standard; ✓: TPOX; ○: TH01; upper, middle and lower lane; the spem, the victim and the suspect respectively. The data in table show the length of corresponding DNA fragments(bp)

3 讨论

荧光 DNA 自动检测技术具有准确、灵敏等优点, 在国外已运用于实际办案, 国内由江斌等^[1,2]率先引进, 进行了一系列法医学应用的研究工作, 并率先用荧光 STR 技术进行办案, 取得非常好的效果。多色荧光技术使复合 PCR 扩增的位点可达 10 个之多(本文暂应用 7 个位点), 极大地提高了工作效率。

本案中, 采用常规非变性 PAGE STR 分型发现精液及嫌疑人张某在 TH01 和 TPOX 两个 STR 位点的

(下转第 75 页)

卧床,多合并便秘,下腹胀痛,精神紧张,对痛觉敏感,易使医务人员对下腹痛有麻痹心理;④对IVF患者,我院常规于停经第40天使用hCG黄体支持,加之宫内妊娠分泌hCG,所以宫内外合并妊娠患者尿hCG水平并不较正常妊娠低,甚至高于正常妊娠;⑤由于IVF后尽量避免妇检刺激,在发病早期腹痛刺激不明显时未及时妇检,忽略了附件包块的存在,而发病后期,腹痛剧烈,腹肌紧张,附件包块亦不易扪及;⑥B超是诊断宫内外合并妊娠的最有效手段,对于早期诊断非常重要,B超下可见子宫大小与停经月份相符,宫内见妊娠囊,宫外见半囊实肿物,但促排卵药物刺激卵巢增大,囊性变,与宫外孕包块鉴别有一定困难。

由于IVF患者对妊娠有很高期望,所以宫内外合并妊娠治疗方面应以安全、快速、彻底为原则,减少对宫内妊娠的影响,及时消除宫外孕。显然中药或米非司酮等保守治疗是不可行的。一经诊断无论是否破裂出血均应及时手术治疗。对于未破裂病例,国外采用B超引导下宫外孕囊内注射高浓度氯化钾或高渗糖的方法治疗^[4,5]。对于已破裂的病例,过去国内常规开腹手术。术中尽量避免对子宫的刺激,效果亦不错。我院1990~1996年间有3例IVF后宫内外合并妊娠^[3]。3例均行开腹切除患侧输卵管手术。其2例继续妊娠至足月分娩,1例手术后宫内妊娠胚胎停止发育而流产。因此开腹手术虽然操作方便快捷,但手术创伤性大,对宫内妊娠有相当大的威胁。为尽量降低手术对宫内妊娠的影响,本例患者我们采用了腹腔镜下手术。手术采用气管内全麻,腹腔内压力控制在10mmHg左右,避免腹腔内压力过高。手术操作轻柔,避免牵拉或触动子宫。采用三圈套扎切除患侧输卵管的简洁快速方法。患者术中、术后均无阴道出血。术

后第1天即可进食,床边活动。术后进一步加强支持治疗,纠正贫血,hCG、黄体酮支持黄体,患者很快出院。至发稿时为止患者已宫内妊娠2月。

3 小 结

宫内外合并妊娠是一种罕见疾病,辅助生育技术的开展提高了宫内外合并妊娠的发病率。它的危险性大,易危及患者生命或引起宫内妊娠流产,所以早期诊断至关重要。腹腔镜下手术与开腹手术相比有对患者损伤性小,视野清晰,对周围器官特别是子宫影响小,操作简便,术后患者恢复迅速的优点。所以对于希望继续宫内妊娠的患者,采用腹腔镜下手术解决宫外孕是安全可行的。

参考文献:

- [1] Reece E A, Petrie R H, Simans M F, *et al*. Combined intrauterine and extrauterine gestations: a review[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1983, 146(2): 323.
- [2] Joseph T, Sami H, Nina G, *et al*. Heterotopic pregnancy after ovulation induction and assisted reproductive technologies: a literature review from 1971 to 1993[J]. *Fertility and Sterility*, 1996, 66(1): 1.
- [3] 姚书忠,庄广伦,周灿权. 体外受精-胚胎移植后宫内外同时妊娠3例报告[J]. *中山医科大学学报*, 1997, 18(4): 313.
- [4] Amy W, Carole L K, Ruben Q, *et al*. Selective embryo reduction in a heterotopic pregnancy using potassium chloride injection resulting in a hematosalpinx[J]. *Fertility and Sterility*, 1996, 66(6): 1028.
- [5] Heinz S, Andrees O, Rainer L, *et al*. Successful treatment of a heterotopic pregnancy by sonographically guided instillation of hyperosmolar glucose[J]. *Fertility and Sterility*, 1998, 69(1): 149.

(编辑 关淡庄)

(上接第73页)

- [2] 江斌,郭景元,梁赏猷. 运用变性PAGE和荧光检测技术对广州汉族人群六个STR位点的研究[J]. *法医学杂志*, 1999, 15(3): 141~143.
- [3] Erg B, Ainsworth P, Waye J S. Anomalous migration of PCR products using nondenaturing polyacrylamide gel electrophore-

sis: the amelogenin sex typing system[J]. *J Forens Sci*, 1994, 39(6): 1356~1359.

(编辑 刘清海)