



物体表面灰尘采集及DNA提取方法优化研究*

杨琪^{1,2)} 彭加金^{2,3)} 王乐²⁾ 卢颀²⁾ 梅宏成²⁾ 戈文东⁴⁾ 张涛⁵⁾
季安全²⁾ 叶健^{2)**} 康克莱^{2)**}⁽¹⁾ 中国人民公安大学侦查学院, 北京 100038; ⁽²⁾ 公安部鉴定中心, 法医遗传学公安部重点实验室, 北京 100038;⁽³⁾ 昆明医科大学法医学院, 昆明 650500; ⁽⁴⁾ 福建省公安厅刑事技术总队, 福州 350003;⁽⁵⁾ 新疆生产建设兵团公安局, 乌鲁木齐 830001)

摘要 目的 灰尘作为法庭科学极具特色和应用价值的物证, 其中包含丰富的环境DNA信息, 逐渐成为领域内的前沿研究热点。然而, 作为办案应用中的关键基础环节, 从法庭科学领域实际应用出发的物体表面灰尘的采集及DNA提取研究, 仍亟待开展。**方法** 使用Copan Liquid Amies Elution Swab拭子擦拭物体表面采集灰尘, 将采集样品管内拭子头、沉淀、上清液分别提取DNA, 评估DNA含量从而选定应处理和裂解的样品管内成分。按照5种不同采样面积(25~400 cm²)采集灰尘样本并检测DNA浓度, 确定合适的采样面积。比较3种商业化DNA提取试剂盒对灰尘样本的提取效果, 并检测评估提取的灰尘DNA片段大小以及是否含人源DNA, 同时通过16S rDNA扩增子测序分析物体表面灰尘DNA中的细菌信息, 从而建立灰尘DNA提取产物的质量控制方法。针对DNA提取中的细胞裂解关键步骤, 比较评估在不同的细胞裂解方式以及震荡裂解次数下提取DNA的量, 从而建立适合灰尘DNA提取的细胞裂解方法。**结果** 灰尘采样管内沉淀与拭子头为DNA的主要来源部位, 后续提取时均应纳入处理。灰尘的采样面积与灰尘DNA浓度呈正相关, 且灰尘采样面积宜大于5×5 cm²。使用DNeasy PowerSoil Pro试剂盒可以获得较高的DNA产量, 同时3种DNA提取试剂盒提取的DNA片段大小无显著差异, 从上述灰尘样本提取的DNA中未检出人源DNA, 而物体表面灰尘DNA中含有细菌DNA, 并且不同采样点之间的微生物物种组成存在差异。此外, 使用生物样品均质器进行研磨裂解4 min (2 min×2次)时, 得到的灰尘DNA浓度最高。**结论** 灰尘DNA的提取与采样面积、提取试剂盒、裂解方式均有关, 建立完整且适合的灰尘DNA提取方案至关重要。这不仅为研究挖掘灰尘中的环境DNA数据打下基础, 还为环境样本的实际办案应用提供了方法参考。

关键词 灰尘DNA, 灰尘采集, DNA提取, 微生物组**中图分类号** R89, D919**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0430

灰尘在环境中普遍存在, 在案发现场可持续附着在衣物、鞋子、橡胶等物体上, 为案件侦破提供重要的线索和证据^[1]。灰尘含有矿物质、纤维等成分, 也常混有各类细菌、真菌、病毒等微生物, 以及植物花粉、昆虫卵和排泄物、人体皮屑等复杂生物成分。这些环境中的DNA, 能为案件提供痕迹线索之外的环境生物线索^[2-4], 或将案发现场、嫌疑人和受害人、案发过程等联系起来, 助力案件侦破。已有研究表明, 灰尘DNA在环境监测^[5-7]、疾病诊断^[8-9]、案件调查^[10-11]、耐药性研究^[12]等方面均具有重要的应用价值。环境微生物学研究表明, 泥土、空气、灰尘、水体等环境中分布着大量微生物且其分布呈现多样性, 在不同地区、甚至同

一地区不同地点的环境微生物种类和构成均不相同, 随着环境的变化各类生物会快速地适应和进化, 形成生物地理学动态改变^[13-15]。MetaSUB (The Metagenomics and Metadesign of the Subways and Urban Biomes) 国际联盟^[12]利用世界各地公共交通系统和医院中采集的灰尘样本测序数据, 创建地理空间的宏基因组图和法医遗传图谱。WLOH

* 公安部鉴定中心基本科研业务费(2022JB022)和公安部科技强警基础工作计划(2023JC14)资助项目。

** 通讯联系人。

叶健 Tel: 010-83752807, E-mail: yejian77@126.com

康克莱 Tel: 010-83752707, E-mail: kang_kl@yeah.net

收稿日期: 2023-11-05, 接受日期: 2024-06-12

(Wild Life of Our Homes) 项目^[16]研究了室内不同位置的灰尘中细菌群落多样性, 并发现其细菌群落之间存在显著差异。Grantham等^[17]从美国大陆各地采集室外灰尘样本, 其真菌类群可用于识别灰尘的来源, 从而推断样本地理位置, 误差中位数为230 km。Chase等^[18]对不同办公室内灰尘测序数据预测样本来源城市准确率达85%。已有研究表明, 环境灰尘的DNA信息有望准确推断地理空间来源, 这为法庭科学领域应用打开全新的视角。

灰尘样本因其数量和质量的限制, 其中的微生物等生物组分的含量可能极低。Afshinnkoo等^[19]通过大约929 cm²的擦拭面积提取灰尘DNA, 获得DNA产量中位数仅为188 ng, DNA洗脱体积溶剂为8 μ l。在实际应用中, 案发现场的擦拭面积受限, 若应用当前热门的微生物群落研究技术如宏基因组测序, 文库制备所需DNA量较高, 商业化试剂盒一般推荐100 ng以上, 往往在微量灰尘样本测序中存在挑战。

采样和DNA提取是获得高质量DNA样品的关键, 直接影响后续检测和分析的质量。Sinha等^[20]用23个粪便样本评估扩增子测序过程中不同阶段(DNA提取、样本保存、测序和数据分析)对结果的影响, 认为各实验阶段(样本提取、建库、数据分析)对最终结果皆有一定影响, 其中DNA提取影响最大。有研究表明, 不同的DNA提取方法对真核浮游生物的 α 多样性无显著影响, 但是对浮游细菌的 α 多样性有显著影响^[21]。针对不同的环境样本(如土壤、水、粪便、植物等), 一般采用相对应的DNA提取商品化试剂盒效果最佳, 然而针对灰尘样本的研究较少, 目前国际上并没有统一的专用的灰尘DNA提取方法。Sui等^[22]研究了宏基因组测序中4种DNA提取方法对人类和环境微生物群落和功能影响的比较, 结果表明, 没有任何一种提取方法在所有样品类型中DNA产量处于最高, 样本类型是DNA产量的重要影响因素。Amin等^[23]通过5种DNA提取方法对捕获的空气中灰尘DNA的提取效率进行了比较, DNeasy PowerSoil Pro试剂盒的DNA提取率最高, 为灰尘DNA的提取试剂盒选择提供了参考。

在法庭科学领域, 案发现场遗留物证多见微量、降解或环境胁迫等复杂情况^[24], 难以像其他应用领域可获得和使用标准化、高质量样本。在实际应用中, 针对灰尘样本的发现、提取、检验等实验方法, 很可能无法直接采用其他领域研究建立的

高质量样本的实验方法, 针对灰尘这种法庭科学极具特色的物证, 适合法庭科学应用的灰尘DNA检测方法仍待建立和优化。因此, 本文研究建立物体表面灰尘的采集及DNA提取全流程方法, 助力环境DNA高通量测序研究, 进而为环境DNA数据准确推断地域来源打下基础, 为物证溯源等刑侦实战难题提供新型技术支撑。

1 材料与方法

1.1 灰尘采集

1.1.1 采样地点及采集方法

在实验室周边(北京市昌平区)同一小区内, 从室外环境中常见的物体表面采集灰尘样本, 并确保采样表面具有足够的面积(图S1、表S1)。同时采集7处不同位置的室外灰尘样本, 采样的物体表面材质分别为木材、合金、瓷砖和塑料, 采样日天气为晴天。使用拭子Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab, Copan Diagnostics公司, 意大利)擦拭采集灰尘样本, 擦拭时间为1 min。采样时, 将拭子在保存液中浸泡润湿约2 s, 从选取采样点的一侧往另一侧滚动擦拭粘取灰尘。擦拭完毕后将拭子头放入样本管内, 在折断处折断拭子, 去除拭子尾部, 将拭子密封保存并编号记录。环境阴性对照的采集方法和灰尘样本采集基本一致, 但不进行擦拭, 手握拭子一头静置于采样点的空气中, 放置1 min。使用足量干冰运输灰尘样本, 置于-80℃冰箱保存。

1.1.2 样本均一化处理

灰尘DNA提取方法优化研究时, 为避免采样差异干扰不同处理条件的结果, 进行均一化处理制备出平行重复样本。在每个采样点按10×10 cm²采样面积采集25份灰尘样本。首先将一个采样点内平行采集的25份灰尘样本随机平分为5组, 用无菌剪剪下同组灰尘样本的所有拭子头并转移至新的5 ml离心管中。然后将所有离心管在生物样本均质器Bead Ruptor 12 (OMNI International公司, 美国)震荡7~8 s后全部转移至同一个100 ml烧杯中, 在搅拌状态下将拭子头和保存液均分为25份平行重复样本, 即得到均一化的灰尘样本。

1.2 灰尘DNA提取和测序

本研究使用了3种不同的试剂盒对灰尘样本进行DNA提取。分别是DNeasy PowerSoil Pro试剂盒(QIAGEN公司, 德国)、TIANamp Soil DNA试剂

盒（天根生化科技有限公司，中国）、ZymoBIOMICS 96 MagBead DNA 试剂盒（ZYMO RESEARCH公司，美国），并按照各试剂盒说明书操作。本研究还采用了两种不同的仪器进行细胞震荡裂解，比较了涡旋震荡仪 Vortex-Genie2（Scientific Industries 公司，美国）以最大速度（3 200 r/min）震荡 15 min 和生物样本均质器 Bead Ruptor 12（震荡强度： $S=6$ m/s）以不同的震荡时间对 DNA 提取的影响。灰尘 DNA 提取使用 ZymoBIOMICS® Microbial Community Standard（ZYMO RESEARCH公司，美国）作为阳性对照，以检测 DNA 提取方法的偏差，最终洗脱体积均为 50 μ l。用 Qubit® dsDNA HS Assay 试剂盒（Thermo Fisher公司，美国）在 Qubit® 3.0 Fluorometer 定量仪器（Thermo Fisher公司，美国）上进行 DNA 浓度测定。使用 2100 生物分析仪（Agilent公司，美国）对 DNA 片段大小进行检测，使用 GlobalFiler™ PCR Amplification 试剂盒（Thermo Fisher 公司，美国）在 3500XL 基因分析仪（Applied Biosystems 公司，美国）上检测人源 DNA。

使用针对细菌 16S rDNA V4 区域的通用引物 515F（5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'）和 806R（5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'）进行扩增，使用 MiSeq® Reagent Kit V3 试剂盒在 MiSeq（Illumina 公司，美国）仪器上进行 16S rDNA 扩增产子测序。

1.3 生物信息分析

测序完成后，获得原始下机数据。使用 fastp 软件去除测序质量低于 Q20 的碱基，通过 USEARCH^[25-26] 微生物组生物信息学平台进行分析：将所有样本序列合并至同一文件，去除重复序列；经 unoise3 算法进行降噪、聚类；使用 DP Gold 数据库去除嵌合体；使用 rdp_16s 数据库对得到的 ASV 序列进行物种注释，最终得到属水平的注释结果。

1.4 统计学分析

采用配对秩和检验（Wilcoxon 配对法）进行统计学分析， $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 拭子头、沉淀、上清液中DNA含量评估

保存灰尘的样品管内含有拭子头和液体部分，液体部分经过离心可获得沉淀和上清液（图1）。

为确定拭子头、沉淀、上清液等各部分的 DNA 含量，采用 DNeasy PowerSoil Pro 试剂盒分别提取各部分的 DNA。结果表明，从沉淀中提取到的 DNA 浓度最高，均高于从拭子头提取的 DNA 浓度，但从上清液中提取未定量出 DNA 浓度值（表1）。基于上述研究，实验对 DNA 提取回收率进行了优化：在超净实验台用无菌剪刀将每个样本的拭子头剪下，随即放入试剂盒提供的 PowerBead Pro Tubes 中；将样品管内其他部分一起转移到无菌 1.5 ml 离心管中，15 000g 离心 1 min，丢弃上层清液，将下层灰尘沉淀与试剂 CD1 溶液（试剂盒内组分）混匀和拭子头一起全部转移至 PowerBead Pro Tubes 中，进行后续 DNA 提取。

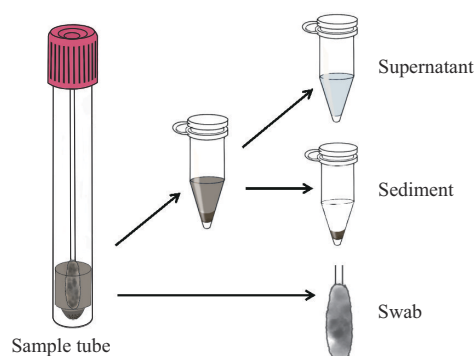


Fig. 1 Schematic diagram of each component of the sample tube

Table 1 DNA concentration of dust in different components of the sample tube

Sample number	$\rho(\text{swab})/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{sediment})/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{supernatant})/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
1	1.65	8.92	—
2	1.83	8.30	—
3	0.216	1.04	—
4	0.56	1.08	—
5	1.73	6.20	—
6	8.66	17.40	—
7	3.50	5.68	—

“—” denotes the absence of any observed DNA concentration.

2.2 灰尘采样面积研究

为探讨采集不同面积获得灰尘样本的 DNA 含量，从 7 处不同位置采样，每处位置均设置 5 cm×5 cm、5 cm×10 cm、10 cm×10 cm、10 cm×20 cm、20 cm×20 cm 的面积梯度，DNA 提取浓度结果如图 2 所示。研究发现，即使采样面积相同，不同位置采集的灰尘所提取的 DNA 的浓度可能差异较大。

当采样面积为5×5 cm²时, 各采样点的灰尘DNA浓度较低。灰尘样本提取的DNA浓度随着采样面积的增大会逐渐增加。后续研究采用的采样面积均为10 cm×10 cm。

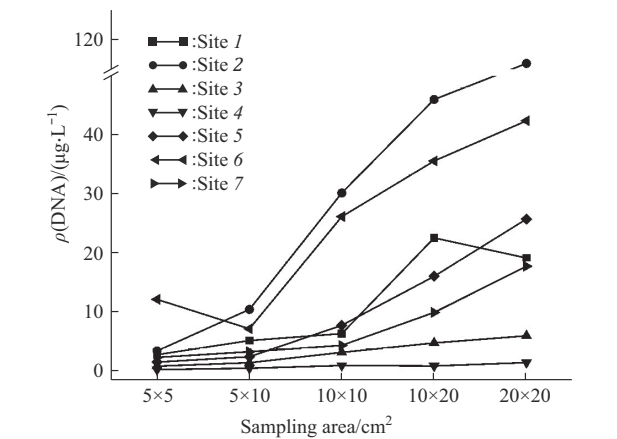


Fig. 2 The effect of sampling area on the concentration of dust DNA extraction

2.3 三种DNA提取试剂盒效果比较

为探索灰尘样本最适合的DNA提取试剂盒, 针对7处位置采集的灰尘平行重复样本, 分别采用了3种DNA提取试剂盒进行DNA提取。在相同洗脱溶解体积下, 各试剂盒提取的DNA浓度如图3所示。其中DNeasy PowerSoil Pro试剂盒提取7处灰尘样本得到DNA浓度为 $(17.60\pm11.74)\mu\text{g/L}$ 、TIANamp Soil DNA试剂盒提取7处灰尘样本得到DNA浓度为 $(3.12\pm2.55)\mu\text{g/L}$ 、ZymoBIOMICS 96 MagBead DNA试剂盒提取7处灰尘样本得到DNA浓度为 $(1.43\pm1.59)\mu\text{g/L}$ 。所有灰尘样本中采用

DNeasy PowerSoil Pro Kit试剂盒提取的DNA浓度明显高于其他两种试剂盒。

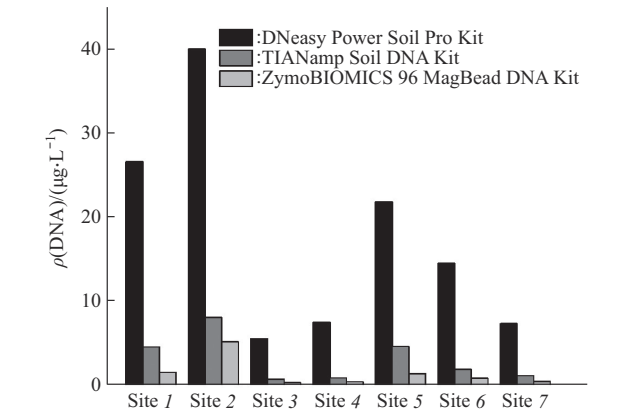


Fig. 3 Comparison of concentration of dust DNA extracted from three kits

采用2100生物分析仪检测灰尘样本提取的DNA片段大小(图4): 使用DNeasy PowerSoil Pro试剂盒提取的采样点4的DNA片段主峰均分布在900~1300 bp左右。此外, 3种DNA提取试剂盒提取的DNA片段大小均无显著差异。为监测灰尘样本提取得到的DNA是否有人源DNA, 在3500XL遗传分析仪上进行检测(图5): 在24个人类常染色体STR基因座中没有检出基因分型, 结果表明, 采用上述灰尘样本提取的DNA中未检出人源DNA。将提取的灰尘DNA样本在MiSeq测序仪上进行16S rDNA扩增子测序分析, 通过USEARCH软件在微生物属水平进行物种注释(图6), 结果表明, 物体表面灰尘DNA中含有细菌DNA, 且不同采样点之间的微生物物种组成存在差异。

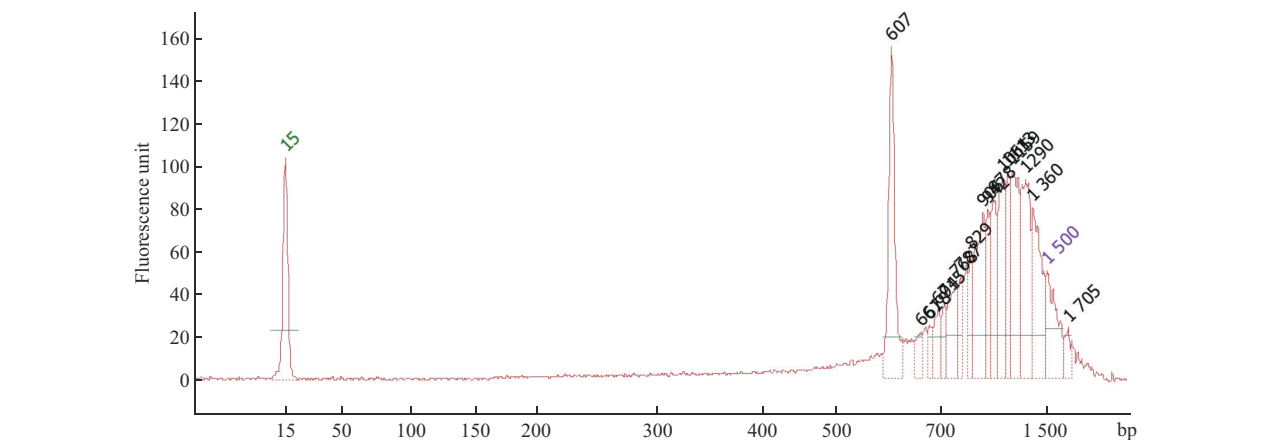


Fig. 4 Fragment size analysis of DNA extracted from dust samples

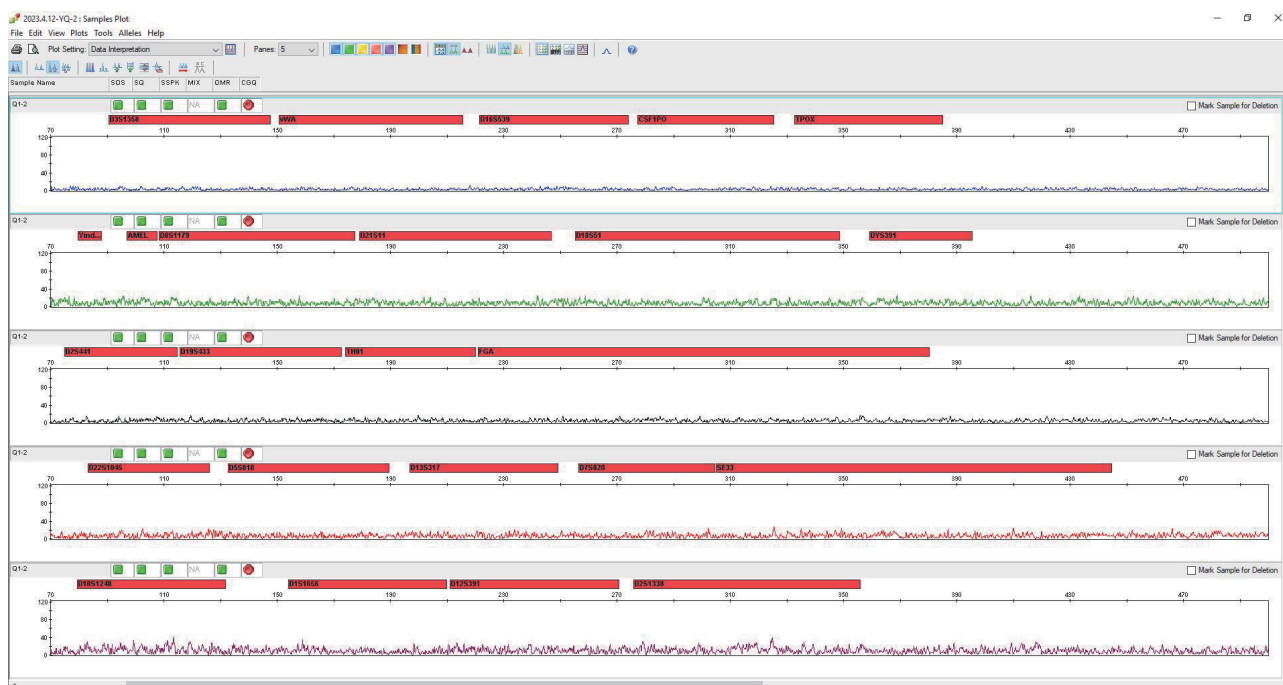


Fig. 5 Human autosomal STR genotyping of DNA extracted from dust samples (Sample 1) detected by capillary electrophoresis

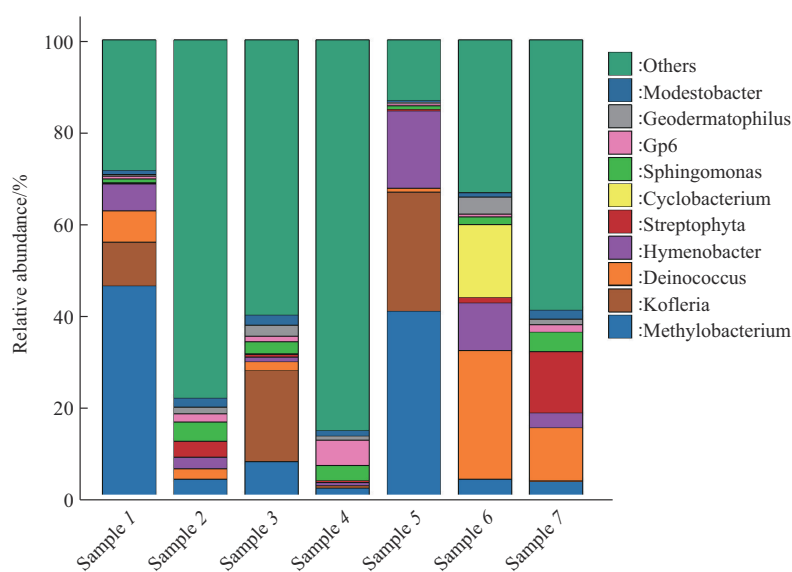


Fig. 6 Microbial species in dust sample annotated map

2.4 细胞裂解方式优化

考虑到灰尘中生物成分的复杂性,进一步研究了提高震荡裂解细胞的强度是否能够增加DNA的提取量。引入了生物样品均质器对灰尘样本进行细胞裂解,通过DNeasy PowerSoil Pro试剂盒说明书推荐的裂解方法(即涡旋震荡仪震荡15 min)对

比,比较不同裂解方式对DNA提取结果的影响。采用生物样品均质器对样本进行细胞裂解,分别设置0.5、1、2、4、8、16 min 6个不同裂解时间进行灰尘样本细胞裂解,震荡时间超过4 min时,按连续震荡4 min即停顿降温后再继续震荡。结果显示,使用涡旋震荡仪裂解细胞时,7处灰尘样本

DNA 浓度为 $(11.48 \pm 8.88) \mu\text{g/L}$; 使用生物样品均质器以不同时间进行细胞裂解得到 7 处灰尘样本的 DNA 浓度分别为 $(8.91 \pm 7.10) \mu\text{g/L}$ (0.5 min)、 $(15.36 \pm 13.21) \mu\text{g/L}$ (1 min)、 $(19.01 \pm 16.15) \mu\text{g/L}$ (2 min)、 $(21.70 \pm 18.37) \mu\text{g/L}$ (4 min)、 $(19.17 \pm 14.61) \mu\text{g/L}$ (8 min)、 $(12.18 \pm 9.30) \mu\text{g/L}$ (16 min), 灰尘 DNA 浓度随着时间的增加而增加, 达到峰值后逐渐降低, 当震荡时间大于 1 min 时, 灰尘 DNA 浓度均高于使用涡旋震荡仪进行细胞裂解所得到的浓度 (图 7)。比较两种不同方法裂解细胞获得的灰尘 DNA 浓度差异, 不同采样点的灰尘 DNA 浓度不服从正态分布, 适用非参数配对秩和检验, 本数据集采用此方法进行统计分析。结果显示, 涡旋震荡仪裂解组与生物样品均质器裂解组在 0.5、2、4 和 8 min 的震荡时间下, DNA 浓度有显著差异 ($P=0.018$ 、 $P=0.028$ 、 $P=0.018$ 、 $P=0.018$)。使用生物样品均质器的优化裂解方法, 显著提高了灰尘 DNA 的提取效果, 其中震荡时间为 4 min 时 DNA 浓度最高。

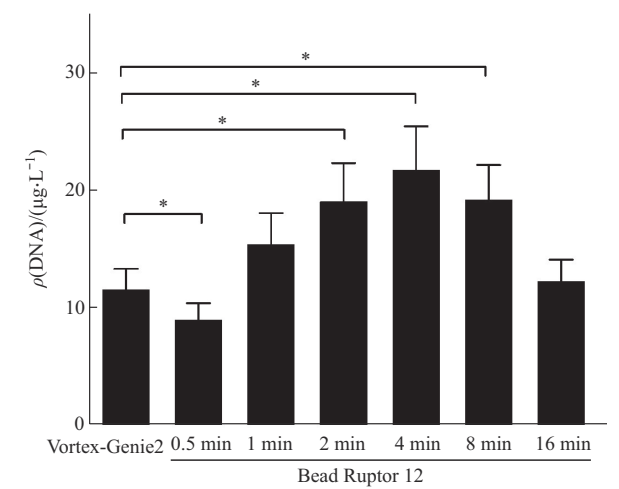


Fig. 7 Comparison of dust DNA extraction concentration between the two instruments
 $*P<0.05$.

研究发现, 采用生物样品均质器进行细胞裂解时, 样本在震荡裂解过程中温度会逐渐升高, 为探索长时间高强度裂解对 DNA 提取效果的影响, 实验在确保灰尘样本总震荡均质时间为 4 min 的条件下, 设置不同震荡次数分别进行灰尘 DNA 提取。实验使用 DNeasy PowerSoil Pro 试剂盒进行灰尘 DNA 提取, 震荡循环方案分别设置为 15 s×16 次、30 s×8 次、60 s×4 次、120 s×2 次、240 s×1 次五组,

每次震荡后将样本放置在冰上降温 1~2 min。实验结果显示, 使用生物样品均质器连续震荡 240 s×1 次时灰尘 DNA 浓度为 $(16.48 \pm 15.84) \mu\text{g/L}$; 其他循环方案时灰尘 DNA 浓度分别为: $(16.76 \pm 12.12) \mu\text{g/L}$ (15 s×16 次)、 $(18.48 \pm 13.48) \mu\text{g/L}$ (30 s×8 次)、 $(18.97 \pm 14.59) \mu\text{g/L}$ (60 s×4 次)、 $(22.17 \pm 17.56) \mu\text{g/L}$ (120 s×2 次)。震荡次数设置为 120 s×2 次时, 灰尘 DNA 浓度最高, 且与 60 s×4 次和 15 s×16 次两组实验组具有显著差异, P 值均为 0.043, 其他实验组间无显著差异 (图 8)。优化后的 DNA 提取方法对应 7 处位置采集的灰尘 DNA 浓度平均增加了 91%。

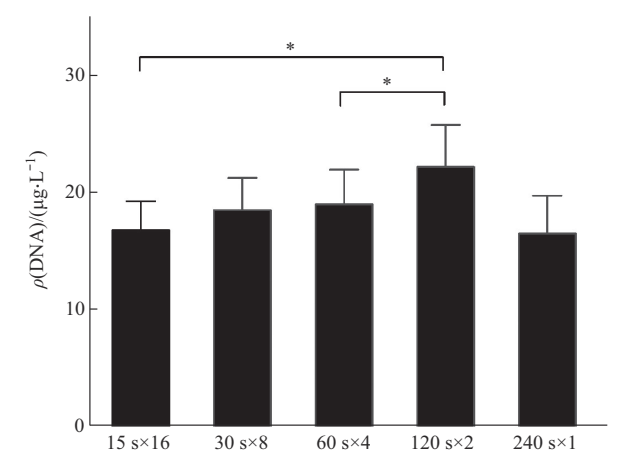


Fig. 8 Comparison of dust DNA extraction concentration with different shock times
 $*P<0.05$.

3 讨 论

灰尘颗粒微小、富含丰富微生物种类、广泛存在于周围环境, 特定地点的灰尘微生物信息可以用于建立个人或物品与特定位置之间的联系。Lax 等^[27]发现, 一个人鞋底的微生物特征取决于其走过的地面, 因此可以根据鞋底与某一地点的微生物群落的匹配程度来判断此人是否去过该地。在公安实战中, 灰生物证在无名尸来源推断、物证溯源 (如走私、运毒等缴获物品)、入室盗窃线索排查、高坠案件的现场重建等疑难案件中具有重要应用潜力。然而, 针对不同环境的灰尘样本, 灰尘的采集和 DNA 提取方法, 特别是高质量 DNA 的提取方面尚待研究。本研究通过样品管内拭子头、沉淀、上清液中 DNA 含量评估、采样面积研究、不同 DNA 试剂盒比对和细胞裂解方式对灰尘 DNA 的采集与

提取方法进行了优化,并据此建立了完整的灰尘DNA提取方案。

在法医学研究中灰尘采集使用最多的是擦拭法,即直接采用拭子在灰尘表面进行擦拭。MetaSUB 国际联盟^[12]采用 Copan Liquid Amies Elution Swab 和 Isohelix Buccal Mini Swab 直接在灰尘表面进行擦拭;WLOH 项目^[16]采用 BBL™ CultureSwabs™ 擦拭收集来自全球家庭的灰尘样本。灰尘DNA的提取效果与样本的采集和处理方法密切相关,研究中采用拭子头和采样管内沉淀合在一起进行DNA提取,以增加灰尘样本的起始量来增加DNA浓度。同时本文探索了不同采样面积下灰尘DNA提取浓度差异,结果表明:随着采样面积的增加,灰尘样本的DNA浓度均逐渐增加,采样面积与灰尘DNA浓度呈正相关。但采样点1的灰尘DNA浓度在20×20 cm²时相较10×20 cm²略有降低,这可能是随机采样时采样点微生物群落位置分布差异造成^[28]。部分采样点在所有采样面积下灰尘DNA浓度均较低,由此可见灰尘DNA的浓度不仅与采样面积有关与采样点也有密切联系。

通常情况下,环境样本的DNA浓度和物种丰度均与环境基质、目标物种和季节等因素有很大的关系,同时也与DNA提取方法有关^[29-30]。目前广泛使用的DNA提取方法主要有两大类,分别为硅膜法^[12]和磁珠法^[31],本文选择了不同提取方法的DNA提取试剂盒并对其DNA提取效率进行了对比,其中硅膜法有DNeasy PowerSoil Pro 试剂盒、TIANamp Soil DNA 试剂盒,磁珠法有ZymoBIOMICS 96 MagBead DNA 试剂盒。实验结果如图2所示,实验采用DNeasy PowerSoil Pro 试剂盒的灰尘DNA浓度最高。另一方面,细胞裂解方式是环境DNA提取中重要的一部分,细胞裂解情况会直接影响DNA提取效率^[32],因此实验引入专用于破碎细胞的生物样品均质器^[33],并与试剂盒推荐细胞裂解方法进行了对比。生物样品均质器连续震荡2 min后,样本温度平均升至37℃,4 min后平均升至68℃。为避免研磨管形变和DNA降解,连续震荡时间不宜超过4 min。结果显示,使用生物样品均质器进行细胞震荡裂解,震荡时间为4 min(震荡裂解2次,2 min/次)时,灰尘DNA的提取浓度最高。按照优化后的灰尘样本采集和DNA提取方法,在10×10 cm²的采样面积条件下,7处采样地点的灰尘DNA浓度平均值为(22.17±17.56) μg/L,体系溶剂为50 μl,能够满足

宏基因组测序所要求^[34]。目前,已有许多文献报道了使用DNeasy PowerSoil Pro 试剂盒进行环境DNA提取的研究^[35]。采用DNeasy PowerSoil Pro 试剂盒推荐的提取方法,灰尘DNA浓度为(11.48±8.88) μg/L,优化后平均DNA浓度增长了91%,灰尘DNA提取效果具有显著提升。在现有研究中,MetaSUB 团队^[12]采集了4 728个环境灰尘样本进行鸟枪法全基因组测序,但未公布可供参考的灰尘DNA浓度数据,无法评估其灰尘DNA提取效率。Hewitt等^[36]针对不同城市办公室中常见物体表面的灰尘进行细菌DNA定量,54个样本浓度均仅为4~10 μg/L。Yooseph等^[4]采集了室内外空气灰尘样本,尽管取样了大量空气(0.9×10⁶~10.8×10⁶ L),但每个样本的DNA产量仍不到15 ng。在科研或其他领域中,通过增加高质量样本的采样量一般可解决灰尘DNA提取产量和质量低的难题,但法庭科学的实际应用往往面临难以从案件现场获得足够量的高质量样本,这直接阻碍了本领域灰尘中环境DNA信息的检测、挖掘和应用。因此,本文对物体表面灰尘的采集和DNA提取全流程进行了优化,但本研究所用试剂盒有限,仅探索了3种DNA提取试剂盒的提取效果对比,且实验样本均为室外灰尘样本,室内灰尘的样本采集方法尚待研究,后续可以考虑在室内灰尘的采集和DNA提取等方面继续优化,对本方法进行进一步的验证。

4 结 论

综上所述,本文研究了物体表面灰尘采集及DNA提取方法优化,实验结果表明:灰尘样本的采样面积与灰尘DNA浓度呈正相关,且灰尘采样面积宜大于5×5 cm²;使用DNeasy PowerSoil Pro 试剂盒进行灰尘DNA提取,用生物样品均质器进行细胞裂解,裂解时合并处理拭子头和沉淀,震荡裂解2次,2 min/次,总时间4 min,该方案下从灰尘中提取DNA浓度最高。本研究建立的优化方法可提高灰尘样本提取的DNA量,为利用灰尘样本挖掘环境中各类生物的组成和多样性信息建立良好前提,为疑难复杂案件应用提供方法参考。

附件 见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>):

PIBB_20230430_Figure_S1.pdf

PIBB_20230430_Table_S1.pdf

参 考 文 献

- [1] Allwood J S, Fierer N, Dunn R R. The future of environmental DNA in forensic science. *Appl Environ Microbiol*, 2020, **86**(2): e01504-e01519
- [2] Barberán A, Ladau J, Leff J W, *et al.* Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(18): 5756-5761
- [3] Robinson J M, Pasternak Z, Mason C E, *et al.* Forensic applications of microbiomics: a review. *Front Microbiol*, 2020, **11**: 608101
- [4] Yooseph S, Andrews-Pfannkoch C, Tenney A, *et al.* A metagenomic framework for the study of airborne microbial communities. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e81862
- [5] Nazzari Y, Howari F M, Yaslam A, *et al.* A methodological review of tools that assess dust microbiomes, metatranscriptomes and the particulate chemistry of indoor dust. *Atmosphere*, 2022, **13**(8): 1276
- [6] Park J H, Lemons A R, Roseman J, *et al.* Bacterial community assemblages in classroom floor dust of 50 public schools in a large city: characterization using 16S rRNA sequences and associations with environmental factors. *Microbiome*, 2021, **9**(1): 15
- [7] Zendoia I I, Barandika J F, Hurtado A, *et al.* Analysis of environmental dust in goat and sheep farms to assess *Coxiella burnetii* infection in a Q fever endemic area: geographical distribution, relationship with human cases and genotypes. *Zoonoses Public Health*, 2021, **68**(6): 666-676
- [8] Assen A M, Groves P J, Etherington A, *et al.* Field application of qPCR monitoring of infectious laryngotracheitis virus in settled chicken house dust and its role in control of a major outbreak. *Avian Dis*, 2022, **66**(3): 1-9
- [9] Bindari Y R, Kheravii S K, Morton C L, *et al.* Molecular detection of *Eimeria* species and *Clostridium perfringens* in poultry dust and pooled excreta of commercial broiler chicken flocks differing in productive performance. *Vet Parasitol*, 2021, **291**: 109361
- [10] Prasetyo A P, Murray J M, Kurniawan M F A K, *et al.* Shark-dust: application of high-throughput DNA sequencing of processing residues for trade monitoring of threatened sharks and rays. *Conserv Lett*, 2023, **16**(5): e12971
- [11] Lennartz C, Kurucar J, Coppola S, *et al.* Geographic source estimation using airborne plant environmental DNA in dust. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 16238
- [12] Danko D, Bezdán D, Afshin E E, *et al.* A global metagenomic map of urban microbiomes and antimicrobial resistance. *Cell*, 2021, **184**(13): 3376-3393.e17
- [13] Scheibe A, Steffens C, Seven J, *et al.* Effects of tree identity dominate over tree diversity on the soil microbial community structure. *Soil Biol Biochem*, 2015, **81**: 219-227
- [14] Habtom H, Pasternak Z, Matan O, *et al.* Applying microbial biogeography in soil forensics. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, **38**: 195-203
- [15] Dlugosch L, Poehlein A, Wemheuer B, *et al.* Significance of gene variants for the functional biogeography of the near-surface Atlantic Ocean microbiome. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 456
- [16] Dunn R R, Fierer N, Henley J B, *et al.* Home life: factors structuring the bacterial diversity found within and between homes. *PLoS One*, 2013, **8**(5): e64133
- [17] Grantham N S, Reich B J, Pacifici K, *et al.* Fungi identify the geographic origin of dust samples. *PLoS One*, 2015, **10**(4): e0122605
- [18] Chase J, Fouquier J, Zare M, *et al.* Geography and location are the primary drivers of office microbiome composition. *mSystems*, 2016, **1**(2): e00022-e00016
- [19] Afshinnekoo E, Meydan C, Chowdhury S, *et al.* Geospatial resolution of human and bacterial diversity with city-scale metagenomics. *Cell Syst*, 2015, **1**(1): 72-87
- [20] Sinha R, Abu-Ali G, Vogtmann E, *et al.* Assessment of variation in microbial community amplicon sequencing by the Microbiome Quality Control (MBQC) project consortium. *Nat Biotechnol*, 2017, **35**: 1077-1086
- [21] Liu M, Xue Y, Yang J. Rare plankton subcommunities are far more affected by DNA extraction kits than abundant plankton. *Front Microbiol*, 2019, **10**: 454
- [22] Sui H Y, Weil A A, Nuwagira E, *et al.* Impact of DNA extraction method on variation in human and built environment microbial community and functional profiles assessed by shotgun metagenomics sequencing. *Front Microbiol*, 2020, **11**: 953
- [23] Amin H, Marshall I P G, Bertelsen R J, *et al.* Optimization of bacterial DNA and endotoxin extraction from settled airborne dust. *Sci Total Environ*, 2023, **857**: 159455
- [24] Karadayı S. Assessment of the link between evidence and crime scene through soil bacterial and fungal microbiome: a mock case in forensic study. *Forensic Sci Int*, 2021, **329**: 111060
- [25] Edgar R C. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv*, 2016. <https://doi.org/10.1101/081257>
- [26] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, **26**(19): 2460-2461
- [27] Lax S, Hampton-Marcell J T, Gibbons S M, *et al.* Forensic analysis of the microbiome of phones and shoes. *Microbiome*, 2015, **3**: 21
- [28] Worrich A, Musat N, Harms H. Associational effects in the microbial neighborhood. *ISME J*, 2019, **13**(9): 2143-2149
- [29] Nagler M, Podmirseg S M, Ascher-Jenull J, *et al.* Why eDNA fractions need consideration in biomonitoring. *Mol Ecol Resour*, 2022, **22**(7): 2458-2470
- [30] Stewart K A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodivers Conserv*, 2019, **28**(5): 983-1001
- [31] Haarkötter C, Saiz M, Gálvez X, *et al.* Usefulness of microbiome for forensic geolocation: a review. *Life*, 2021, **11**(12): 1322
- [32] Bruner E A, Okubara P A, Abi-Ghanem R, *et al.* Use of pressure cycling technology for cell lysis and recovery of bacterial and fungal communities from soil. *Biotechniques*, 2015, **58**(4): 171-180
- [33] Yu V M. Bead beating offers high-performance homogenization

- for molecular biology downstream processing of tough and difficult samples//Micic M. Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples. New York: Humana Press, 2016: 85-97
- [34] Simon C, Daniel R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, **85**(2): 265-276
- [35] Foster N R, Taylor D, Hoogewerff J, *et al.* The secret hidden in dust: assessing the potential to use biological and chemical properties of the airborne fraction of soil for provenance assignment and forensic casework. Forensic Sci Int Genet, 2023, **67**: 102931
- [36] Hewitt K M, Gerba C P, Maxwell S L, *et al.* Office space bacterial abundance and diversity in three metropolitan areas. PLoS One, 2012, **7**(5): e37849

Optimization of Dust Collection and DNA Extraction Methods on Object Surfaces*

YANG Qi^{1,2)}, PENG Jia-Jin^{2,3)}, WANG Le²⁾, LU Qi²⁾, MEI Hong-Cheng²⁾, GE Wen-Dong⁴⁾,
ZHANG Tao⁵⁾, JI An-Quan²⁾, YE Jian^{2)**}, KANG Ke-Lai^{2)**}

⁽¹⁾School of Investigation, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China;

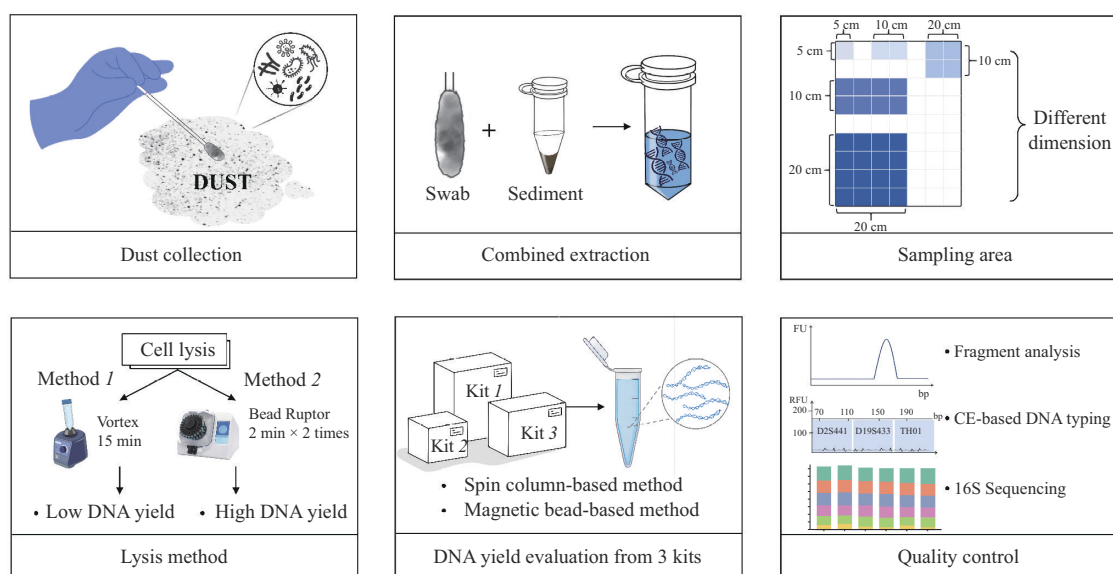
⁽²⁾Key Laboratory of Forensic Genetics, Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China;

⁽³⁾School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

⁽⁴⁾Forensic Science Division of Fujian Province Public Security Department, Fuzhou 350003, China;

⁽⁵⁾XPCC Public Security Bureau, Urumqi 830001, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Dust has steadily emerged as a frontier research in the field of forensic science because it is a material evidence with significant features and application potential that carries rich environmental DNA information. However, as a crucial foundational step in forensic applications, the collection and DNA extraction research of dust on object surfaces from the perspective of practical applications in forensic science are still in urgent need of development. **Methods** Dust was collected from object surfaces using a Copan Liquid Amies Elution Swab. DNA was extracted separately from the swab head, sediment, and supernatant within the sample

* This work was supported by grants from the Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security of China (2022JB022) and Ministry of Public Security of China (2023JC14).

** Corresponding author.

YE Jian. Tel: 86-10-83752807, E-mail: yejian77@126.com

KANG Ke-Lai. Tel: 86-10-83752707, E-mail: kang_kl@yeah.net

Received: November 5, 2023 Accepted: June 12, 2024

collection tube to evaluate DNA content, thereby determining which components within the tube should be processed and lysed. Dust samples were collected according to five different sampling areas (25–400 cm²) and the DNA concentration was measured to determine the optimal sampling area. The extraction efficiency of three commercial DNA extraction kits for dust samples was compared. The size of the DNA fragments extracted from the dust was analyzed, as well as the presence of human DNA. Additionally, 16S rDNA amplicon sequencing was used to analyze the bacterial information in dust DNA from object surfaces. This process aimed to establish a quality control method for dust DNA extraction. Regarding the critical step of cell lysis in DNA extraction, the quantity of DNA extracted was compared and evaluated under different cell lysis methods and varying vortexing times. This was done to establish an appropriate cell lysis method for dust DNA extraction. **Results** The sediment and swab head in the dust sampling tube are the primary sources of DNA, and both should be included in subsequent extraction processes. The sampling area of dust is positively correlated with dust DNA concentration, and it is recommended that the sampling area be larger than 5×5 cm². Using the DNeasy PowerSoil Pro kit can yield a higher amount of DNA. Additionally, there were no significant differences in the sizes of DNA fragments extracted by the three different DNA extraction kits. No human DNA was detected in the DNA extracted from the dust samples, while bacterial DNA was present in the dust from object surfaces. Furthermore, there were differences in microbial species composition between different sampling points. Additionally, using a biological sample homogenizer to grind and lyse for 4 min (2 min× 2 times) resulted in the highest concentration of dust DNA. **Conclusion** The extraction of dust DNA is influenced by the sampling area, extraction kits, and lysis methods. It is crucial to establish a comprehensive and suitable dust DNA extraction scheme. This not only lays the foundation for researching and extracting environmental DNA data from dust, but also provides a methodological reference for forensic case work involving environmental samples.

Key words dust DNA, dust collection, DNA extraction, microbiome

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0430