



三类斑迹多重荧光扩增体系的构建及应用研究*

白一帆^{1,2)} 赵禾苗²⁾ 陈 静²⁾ 刘洪迪²⁾ 杨瑞琴^{1)**} 王 冲^{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)

摘要 目的 利用体液斑迹的组织特异性RNA标记, 构建一套基于毛细管电泳平台, 可同时检测唾液-精液-阴道分泌物特异性标记的多重复合扩增体系, 旨在用于对犯罪现场发现的疑似体液斑迹进行组织来源鉴定。方法 收集唾液、精液、阴道分泌物样本, 通过引物筛选、体系调配以及PCR条件优化, 构建出一套多重荧光复合扩增体系, 并对该体系的特异度、灵敏度以及对混合样本的检出能力进行探究。结果 本复合体系对上述3类体液均表现出较高的特异性, 每类体液标记物与其他两类间无交叉反应, 对3类体液的最低检测阈值分别达到了0.002 9、0.001 5和0.42 mg/L。同时, 本体系对混合样本的检验也有较高的区分度, 能够应用于实际样本。结论 该复合扩增检测体系可实现唾液、精液与阴道分泌物的正确筛选, 灵敏度满足实际工作需求, 操作简便, 为办案实践提供了一种体液斑迹的分析筛选方法。

关键词 法医物证学, 体液斑迹, mRNA

中图分类号 D919.4

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0379

CSTR: 32369.14.pibb.20240379

准确的体液斑迹组织来源推断可为案件侦查提供重要线索。在强奸、猥亵类案件中, 精斑、唾液斑、阴道分泌物斑迹以及其混合斑迹是常见的生物物证类型, 除通过DNA检验明确斑迹留存个体外, 随着法治建设的不断完善, 在法庭质证环节, 已有相当一部分案件需进一步明确DNA的组织来源, 以实现生物物证证据链条的闭环。目前, 关于法医转录组学的许多研究显示, 利用转录组RNA作为生物标记物用于体液斑迹组织来源推断颇具潜力^[1]。已有文献证明, 信使RNA^[2-6] (messenger RNA, mRNA)、微RNA^[7-11] (microRNA, miRNA)、环状RNA^[12-15] (circular RNA, circRNA)、Piwi相互作用RNA^[16-18] (Piwi-interacting RNA, piRNA)等, 都具有体液斑迹鉴定的价值。为解决单一标记扩增过程繁琐、cDNA模板量使用过多等问题, 在单一逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 扩增体系的基础上, 我们研发了一种可同时扩增属于3种斑迹的11重组组织特异性RNA标记的复合扩增体系, 用于检验犯罪现场

(尤其是性犯罪案件现场) 收集的生物物证。该体系可一次性扩增检测唾液 (SA) 标记 *HTN3*、*MUC4*, 精液 (SE) 标记 *PRM2-LC*、*PRM1*、*KLK3-LC*、*TGM4* 和 *SEMG1*, 以及阴道分泌物 (VS) 标记 *CYP2B7P1*、*HBD1* 和 *MUC4*。本研究还同步评估了该体系的特异度、检测阈值及其在混合体液识别能力方面的性能, 以期为实际应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 毛细管电泳平台体系搭建

1.1.1 主要仪器与试剂

QIAcube Connect全自动核酸纯化仪 (Qiagen, 德国), Qubit3.0 荧光计 (Invitrogen, 美国), GeneAmp® 9700 型 PCR 扩增仪 (Applied

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费 (2023JB005) 资助项目。

** 通讯联系人。

杨瑞琴 Tel: 010-83903263, E-mail: yangruiqin@ppsuc.edu.cn

王冲 Tel: 010-66269554, E-mail: wangannann@126.com

收稿日期: 2024-08-26, 接受日期: 2024-11-06

Biosystems, 美国), Proflex3×32 型 PCR 扩增仪 (Applied Biosystems, 美国), 3500xL 型遗传分析仪 (Applied Biosystems, 美国)。

RE-100 Oragene 唾液提取盒 (DNA Genotek, 加拿大), RNeasy® Mini Kit (Qiagen, 德国), Qubit™ RNA HS Assay Kit (Invitrogen, 美国), Qubit™ ssDNA Assay Kit (Invitrogen, 美国), HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (南京诺唯赞生物, 中国), Taq Pro C3 DNA 聚合酶 (南京诺唯赞生物, 中国)。

1.1.2 样本收集与保存

所有样本均收集自健康的成年志愿者 (表 1)。唾液样本由志愿者按说明书指引自然流出后收集在 Oragene 唾液收集管中; 精液样本由志愿者自行射出后收集在 50 ml 离心管中; 阴道分泌物样本使用阴道拭子由专业医师收集。所有样本在收集后存放于 -80℃ 环境备用。本研究的样本采集经过公安部鉴定中心科研伦理委员会审核批准 (批准号: 2023-037), 采集过程遵循相关流程和协议, 采样前所有志愿者均签署知情同意书。

Table 1 Number of samples collected			
Collect time	Saliva	Semen	Vaginal secretion
2015	15	20	20
2024	15	20	20

1.1.3 预处理与RNA提取

唾液样本预处理: a. 解冻 RE-100 Oragene 唾液收集管, 取 250 μl 收集管内液体置于 1.5 ml 离心管内, 50℃ 水浴加热 1 h, 后 90℃ 水浴加热 15 min, 自然冷却至室温; b. 向离心管内加入 10 μl 中和液, 震荡, 于冰上孵育 10 min, 以 13 000 r/min 离心 3 min, 弃去沉淀, 将上清液转移至新 1.5 ml 离心管中; c. 加入 -20℃ 保存的 95% 乙醇 400 μl, 震荡, 于 -20℃ 孵育 30 min。以 13 000 r/min 的速度离心 3 min, 弃去上清。

精液样本预处理: 解冻 50 ml 离心管内精液, 13 000 r/min 离心 10 s, 移取 125 μl 液体于棉签上。

阴道分泌物样本预处理: 解冻阴道拭子后, 剪取可视斑迹部分置于 1.5 ml 离心管内。

RNA 提取: a. 向预处理后的样本加入裂解液 (Buffer RLT 与 β 巯基乙醇的体积比为 1 000 : 10) 350 μl、Carrier RNA 稀释液 5 μl。56℃ 孵育 40 min, 后 4℃ 冷藏过夜; b. 使用 RNeasy® Mini Kit 于 QIAcube Connect 全自动核酸纯化仪上执行

RNeasy Mini-Animal tissues and cells 程序, 提取各体液总 RNA。

1.1.4 RNA定量与逆转录

提取得到的体液样本总 RNA, 按照 Qubit™ RNA HS Assay Kit 的操作说明进行 RNA 定量, 使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行逆转录, 操作流程遵照试剂盒说明书进行。

1.1.5 PCR扩增

使用 Taq Pro C3 DNA 聚合酶对 cDNA 进行管家基因扩增, 管家基因扩增体系见表 2, 作为检验 RNA 提取、cDNA 逆转录是否成功的标准。随后, 利用复合扩增体系 (详见 1.2 节) 对 cDNA 模板进行多重 PCR 扩增。

Table 2 B2M housekeeping amplification system		
Reagent	Volume/μl	Final concentration
cDNA	1	
Primer-B2M (10 μmol/L)	0.8	0.8 μmol/L
MgCl ₂ solution (25 mmol/L)	1.25	3.125 mmol/L
10×Multiplex Buffer	1	1×
dNTP mixture (2.5mmol/L each)	0.65	0.162 5 mmol/L each
Multiplex DNA polymerase (5 U/μl)	0.13	0.65 U/μl
ddH ₂ O	5.17	
Total volume	10	

1.1.6 电泳与数据分析

按照体积比 1 000 : 8 的比例配置 HiDi 甲酰胺和 Typer 500 内标混合液。向 96 孔电泳板内加入混合液 10 μl, 再加入 PCR 扩增产物 1 μl, 离心后采用 3500xL 型遗传分析仪进行毛细管电泳。使用 GeneMapper ID-X 1.6 软件分析电泳结果, 峰高信号高于或等于 150 相对荧光单位 (RFU 值) 被认为是阳性检出结果 [19]。

1.2 多重荧光复合扩增体系的构建

通过文献调研和 Primer3-BLAST 软件设计, 本研究使用的 12 对 (含 1 对管家基因) 体液特异性标记的引物如表 3 所示。其中 B2M、HTN3、STATH、MUC7、TGM4、PRM1、SEMG1、CYP2B7P1 (下称 CYP)、MUC4、HBD1 为 mRNA 序列的特异性标记, PRM2-LC、KLK3-LC 为 mRNA 和 circRNA 共有序列的特异性标记, 可同时扩增线性和环状转录本 [12]。后经过反复验证 (见 3.2 节), 最终确定多重荧光复合扩增体系 (表 4)。其中 PCR 条件为: 95℃ 预变性 15 min; 95℃ 20 s, 60℃ 70 s, 72℃ 40 s, 38 循环; 72℃ 延伸 25 min。

Table 3 The specific primer information

Gene name	Type of body fluids	Primer sequence	Amplicon size /bp	Fluorescent labeling	Primer design reference
<i>B2M</i>	Housekeeping	F: GGCATTCCTGAAGCTGACA R: AAACCTGAATCTTTGGAGTACG	121	ROX	[20]
<i>HTN3</i>	Saliva	F: TGTTTTTGCTTTAATCTTGGCTCT R: ATGCCCCGTGATTACTGAAG	168	HEX	[21]
<i>STATH</i>	Saliva	F: TTGGAGCTGATTCATCTGAAGAG R: GCCAATCAAGCCTCAATAATCAT	184	FAM	Primer3
<i>MUC7</i>	Saliva	F: GTTTGTGTGCATCTGTGCACTGAGTG R: GCCTACAGCGTTTGTGCAGACATTATAGG	197	ROX	[22]
<i>TGM4</i>	Semen	F: TGAGAAAGGCCAGGGCG R: AATCGAAGCCTGTCACACTGC	215	HEX	[22]
<i>KLK3-LC</i>	Semen	F: CACCTGCTCGGGTGATTCTG R: TTTCCACTTCCGGTAATGCACCA	139	ROX	[12]
<i>PRM1</i>	Semen	F: GCCAGGTACAGATGCTGTGCGCAG R: TTAGTGTCTTCTACATCGCGGTCT	153	TAMRA	[23]
<i>PRM2-LC</i>	Semen	F: GGCGCAAAGACGCTCC R: GCCCAGGAAGCTTAGTGCC	104	ROX	[12]
<i>SEMG1</i>	Semen	F: GGAAGATGACAGTGATCGT R: CAACTGACACCTTGATATTGG	121	ROX	[24]
<i>CYP</i>	Vaginal secretion	F: AGTCTACCAGGGATATGGCATG R: CTATCAGACACTGAGCCTCGTCC	146	FAM	[25]
<i>MUC4</i>	Vaginal secretion	F: GGACCACATTTTATCAGGAA R: TAGAGAAACAGGGCATAGGA	235	TAMRA	[23]
<i>HBD1</i>	Vaginal secretion	F: AGATGGCCTCAGGTGGTAAC R: GTCACTCCCAGCTCACTTGC	170	ROX	[26]

Table 4 Multiplex fluorescent amplification system

Reagent	Volume/ μ l	Final concentration
cDNA	1	
Primer-HTN3 (10 μ mol/L)	0.04	0.04 μ mol/L
Primer-STATH (10 μ mol/L)	0.05	0.05 μ mol/L
Primer-MUC7 (10 μ mol/L)	0.07	0.07 μ mol/L
Primer-PRM2-LC (10 μ mol/L)	0.03	0.03 μ mol/L
Primer-PRM1 (10 μ mol/L)	0.04	0.04 μ mol/L
Primer-KLK3-LC (10 μ mol/L)	0.05	0.05 μ mol/L
Primer-TGM4 (10 μ mol/L)	0.06	0.06 μ mol/L
Primer-SEMG1(10 μ mol/L)	0.1	0.1 μ mol/L
Primer-CYP (10 μ mol/L)	0.05	0.05 μ mol/L
Primer-HBD1 (10 μ mol/L)	0.3	0.3 μ mol/L
Primer-MUC4 (10 μ mol/L)	0.5	0.5 μ mol/L
MgCl ₂ solution (25 mmol/L)	1.25	3.125 mmol/L
10×Multiplex Buffer	1	1×
dNTP mixture (2.5 mmol/L each)	0.65	0.1625 mmol/L each
Multiplex DNA polymerase (5 U/ μ l)	0.13	0.65 U/ μ l
ddH ₂ O	4.68	
Total volume	10	

1.3 复合体系应用研究

1.3.1 复合体系特异度研究与样本稳定性检验

本研究利用复合体系对收集的3类样本进行扩增，以检验复合体系的特异度。同时，分别统计2015年和2024年所收集样本各标记电泳图谱的RFU值，进行Wilcoxon秩和检验，以探究新旧样本及保存方式对标记检出情况、复合体系扩增效能带来的影响。

1.3.2 复合体系灵敏度研究

本研究通过稀释RNA混合样本、cDNA来检测体系灵敏度。首先，混合每种体液前处理得到的总RNA，得到RNA混合样本，以均衡个体差异。通过倍比稀释方法将RNA混合样本进行梯度稀释，并按照前述方法进行逆转录、扩增，共分析混合样本30组。同时，考虑到RNA易降解的特性，单样本分析时选择不稀释RNA，而是采用稀释cDNA的方法来评估检测阈值。

1.3.3 混合斑迹检验

在犯罪现场，尤其是强奸、猥亵案件现场，所

获得的法医样本往往是多种体液的混合物。其中精液往往是最常见且含量最高的体液。为研究本复合体系在混合体液样本中的检验效能, 本研究制备了精液-唾液、精液-阴道分泌物不同比例RNA (其中精液占高比例) 的混合样本组, 并按照前述方法进行逆转录、扩增, 用于验证该复合体系对于混合斑迹的识别能力。为便于定量, 精液RNA混合样本的浓度稀释至1 mg/L, 唾液与阴道分泌物RNA混合样本的浓度稀释至1、0.1、0.01 mg/L, 从而得到精液与唾液、精液与阴道分泌物RNA浓度比为1:1、10:1、100:1的样本组, 每类样本组构建30个。随后对每个样本组总RNA逆转录并扩增, 通过毛细管电泳检测。

2 结 果

2.1 样本稳定性检验与复合体系的特异度研究

2015年和2024年所收集样本的峰检出情况见图1。相较于2024年, 2015年3类样本离散程度较大, 且大部分标记RFU平均值略有下降, 表明陈旧样本发生了一定程度降解, 且由于个体原因, 降解程度不同。Wilcoxon秩和检验(表5)显示, 在3类样本的11组标记中, 仅有MUC4双尾显著性水平小于0.05, 即新旧样本各标记(除MUC4外)出峰情况的差异不具备统计学意义, 由于在后续实验中新旧样本表现出的特性差异不大, 故后文不再区分新旧样本。

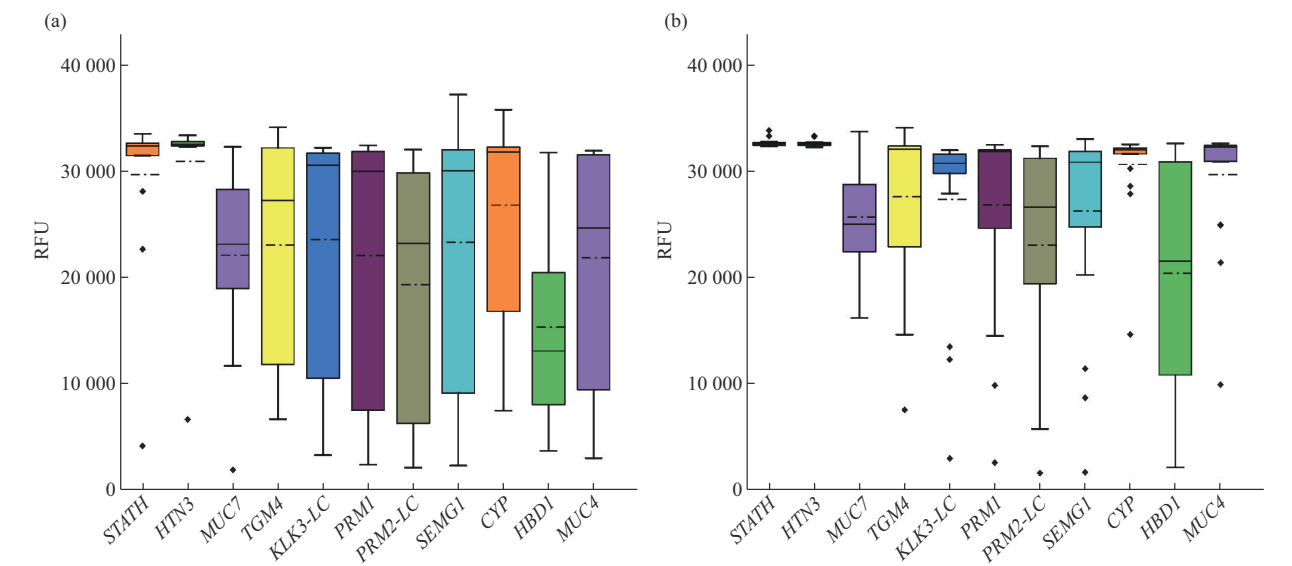


Fig. 1 Box plot of RFU values detected for each marker in samples from different years
(a) The statistical data of RFU values for each marker in the samples collected in 2015. (b) The statistical data of RFU values for each marker in the samples collected in 2024. The horizontal axis of the boxplot represents the genes amplified in the composite system, and the vertical axis represents the RFU values. The median and mean are represented by solid and dashed lines, respectively.

Table 5 The significance level of the Wilcoxon rank-sum test for each marker in samples from different years

mRNA marker	Significance level (<i>P</i> -value)
<i>STATH</i>	0.221
<i>HTN3</i>	0.590
<i>MUC7</i>	0.178
<i>TGM4</i>	0.268
<i>KLK3-LC</i>	0.752
<i>PRM1</i>	0.155
<i>PRM2-LC</i>	0.296
<i>SEMG1</i>	0.681
<i>CYP</i>	0.343
<i>HBD1</i>	0.099
<i>MUC4</i>	<0.01

表6汇总了利用复合体系扩增3类体液特异性标记的结果。如图2所示，各体液标记物均能检出特异峰，且不同体液标记物间未发现交叉反应。表明该体系针对3种体液斑迹检验具有较高的特异度。

Table 6 The specificity of RNA markers

mRNA marker		Saliva	Semen	Vaginal secretion
Housekeeping	<i>B2M</i>	30/30	40/40	40/40
	<i>STATH</i>	30/30	0/40	0/40
Saliva	<i>HTN3</i>	30/30	0/40	0/40
	<i>STATH</i>	30/30	0/40	0/40
	<i>MUC7</i>	30/30	0/40	0/40
	<i>PRM2-LC</i>	0/30	40/40	0/40
Semen	<i>PRM1</i>	0/30	40/40	0/40
	<i>KLK3-LC</i>	0/30	40/40	0/40
	<i>TGM4</i>	0/30	40/40	0/40
	<i>SEMG1</i>	0/30	40/40	0/40
Vaginal secretion	<i>CYP</i>	0/30	0/40	40/40
	<i>HBD1</i>	0/30	0/40	40/40
	<i>MUC4</i>	0/30	0/40	40/40

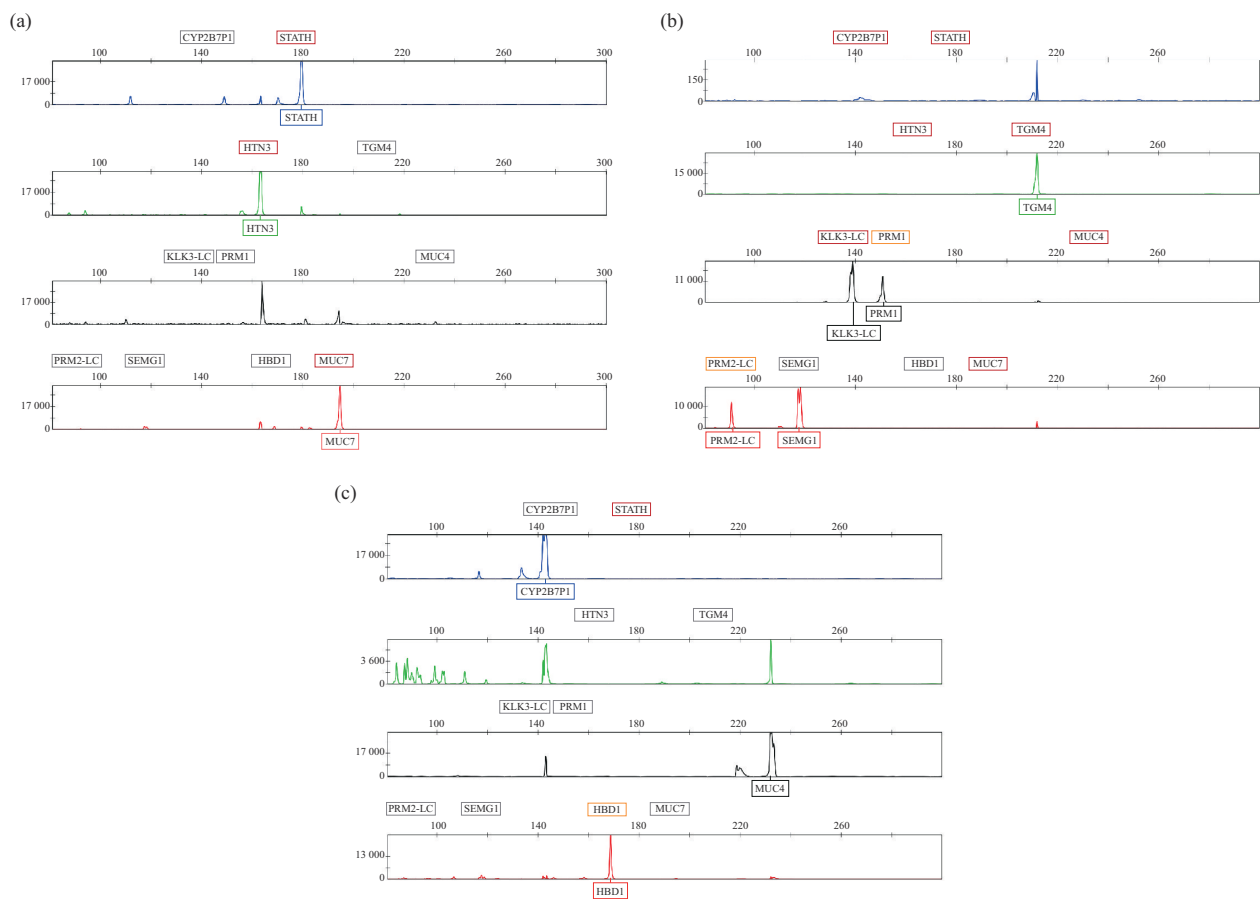


Fig. 2 Capillary electrophoresis results of the markers in saliva (a), semen (b), and vaginal secretions (c) The horizontal axis of each color channel represents the length of the amplified product, and the vertical axis represents the RFU value. The amplified products of different genes are labeled (the same below).

2.2 复合体系的最低检测阈值

2.2.1 RNA倍比稀释

表7显示了在复合体系下RNA混合样本的倍比稀释结果。对唾液而言,当RNA起始量为0.002 9 mg/L时,全部唾液标记均能检出,其中*STATH*、*HTN3*显示出较高的检出峰。对于精液而言,在RNA起始量为0.001 5 mg/L时,能检出全部精液特异性标记。对于阴道分泌物而言,*CYP*在RNA起始量为0.004 2 mg/L时能出现极强的特征峰。30次检测中,*MUC4*可完全检出的最小RNA模板起始量为0.42 mg/L,在RNA起始量为0.004 2 mg/L时,有2/3的样本可检出*MUC4*标记。*HBD1*的检测阈值则较高,当RNA起始量为4.2 mg/L时才能完全检出,当RNA起始量为

0.042 mg/L时几乎无法检出*HBD1*。

2.2.2 cDNA倍比稀释

在cDNA倍比稀释实验中,标记的检出情况与RNA类似(表8)。对于唾液而言,3类标记在设置的各稀释倍数下均能检出。对于精液而言,所有标记均表现出较高的灵敏度和较低的检测阈值,且不同个体间各标记的峰高比(RFU值比)没有较大差异。在1 000倍稀释时,大部分样本具有较大的RFU值。对于阴道分泌物而言,*CYP*仍然是最为灵敏的标记物,在1 000倍稀释下仍能检出。相较于*MUC4*,随着cDNA稀释倍数变大,*HBD1*的检出率下降较快,更不易检出。值得注意的是,*HBD1*在不同个体中表现出较大的差异性,部分个体难以检出,部分个体表现出高的RFU值。

Table 7 The detection profile of RNA markers at various dilution levels in mixed RNA samples

Dilution multiple of RNA	Saliva ¹⁾			Semen ²⁾					Vaginal secretion ³⁾		
	<i>HTN3</i>	<i>STATH</i>	<i>MUC7</i>	<i>PRM2-LC</i>	<i>PRM1</i>	<i>KLK3-LC</i>	<i>TGM4</i>	<i>SEMG1</i>	<i>CYP</i>	<i>HBD1</i>	<i>MUC4</i>
1	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
10	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	28/30	30/30
100	30/30	30/30	29/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	22/30	30/30
1 000	30/30	30/30	29/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	7/30	24/30
10 000				30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	29/30	2/30	20/30

¹⁾The initial concentration of the RNA mixture in the saliva sample is 2.9 mg/L. ²⁾The initial concentration of the RNA mixture in the semen sample is 15 mg/L. ³⁾The initial concentration of the RNA mixture in the vaginal secretion sample is 42 mg/L.

Table 8 The detection profile of RNA markers at various dilution levels in cDNA samples

Dilution multiple of cDNA	Saliva			Semen					Vaginal secretion		
	<i>HTN3</i>	<i>STATH</i>	<i>MUC7</i>	<i>PRM2-LC</i>	<i>PRM1</i>	<i>KLK3-LC</i>	<i>TGM4</i>	<i>SEMG1</i>	<i>CYP</i>	<i>HBD1</i>	<i>MUC4</i>
1	30/30	30/30	30/30	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40
10	30/30	30/30	30/30	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40	39/40	40/40
100	30/30	30/30	30/30	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40	40/40	34/40	38/40
1 000	30/30	30/30	30/30	40/40	40/40	39/40	38/40	39/40	40/40	21/40	33/40

2.3 混合体液斑迹样本检验

混合体液斑迹检验的结果如表9所示。在精液-唾液(SE-SA)样本组中,1:1混合条件下,唾液特异性标记与精液特异性引物均能检出(图3)。在10:1混合时,精液特异性标记RFU值与比例无明显变化,唾液特异性标记*STATH*、*HTN3*平均RFU值变化不大,*MUC7*平均RFU值降低,但仍在150 RFU之上。在100:1混合时,由于唾液RNA浓度相对较低,唾液特异性标记RFU值显著降低,只表现为一个小峰,但绝大部分样本仍可达到150 RFU的检出阈值。在精液-阴道分泌物(SE-

VS)样本组中,无论何种混合比例,*CYP*总是处于一个极高的检出水平,表明*CYP*是阴道分泌物的一个高灵敏度的特征标记。*HBD1*和*MUC4*始终处于较低的检出水平,在图谱中表现为一个小峰,随着精液浓度占比的提高,*HBD1*和*MUC4*的RFU值不断降低,直至部分样本组中*HBD1*和*MUC4*标记低于150 RFU的检出限。在精液-阴道分泌物(SE-VS)10:1的混样中,*HBD1*、*MUC4*的检出率分别为63.3%、60.0%,而在SE:VS=100:1的混样中,*HBD1*、*MUC4*的检出率分别降低到26.7%和53.3%。

Table 9 Detection of RNA markers in the RNA mixed sample group

Initial RNA	concentration	Saliva			Semen					Vaginal secretion		
		HTN3	STATH	MUC7	PRM2-LC	PRM1	KLK3-LC	TGM4	SEMG1	CYP	HBD1	MUC4
SE:SA	1:1	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30			
	10:1	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30			
	100:1	30/30	30/30	27/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30			
SE:VS	1:1				30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30
	10:1				30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	19/30	18/30
	100:1				30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	30/30	8/30	16/30

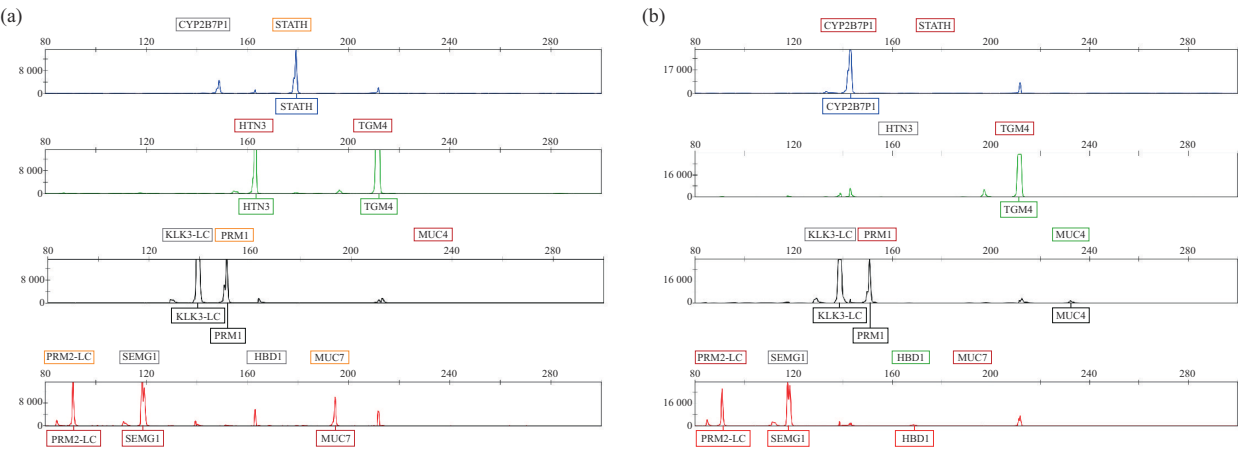


Fig. 3 The RNA concentration ratio of SE to SA is 1:1 (a) and SE to VS is 1:1 (b)

2.4 实际案件应用

案件一：一起猥亵案件中，犯罪嫌疑人用手指插入女被害人下体，当地公安机关在手指尖端及指甲缝中检出了嫌疑人和被被害人的混合DNA分型。后手指擦拭物送检至本实验室，要求鉴定是否有体液斑迹、含有何种类型的体液斑迹。本实验室按照体系方法进行前处理、逆转录与扩增，得到如图4a所示的毛细管电泳谱图。图中检出CYP2B7P1、MUC4、HBD1与STATH、HTN3、MUC7标记物，

故可确定手指擦拭物中含有唾液和阴道分泌物。结合DNA分型，可为嫌疑人涉嫌猥亵被害人提供有力证据。

案件二：一起非正常死亡事件中，当地公安机关对现场床单上可疑斑迹的组织来源存疑，要求本实验室鉴定含有何种斑迹。本实验室剪取可疑斑迹约2 cm²，按照体系方法进行前处理、逆转录与扩增，得到如图4b所示的毛细管电泳谱图。检出TGM4、KLK3-LC、PRM1、PRM2-LC与SEMG1标

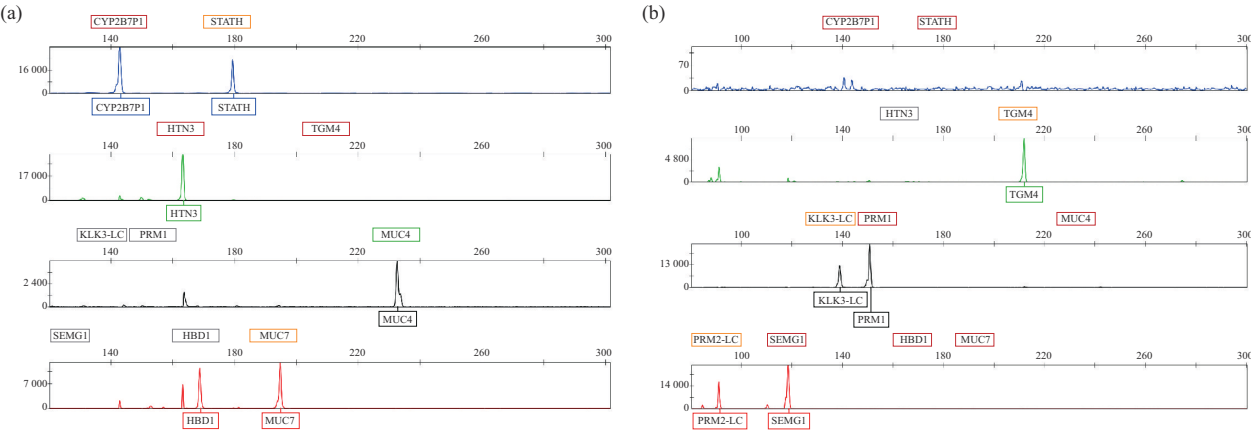


Fig. 4 The capillary electrophoresis results of Case 1 (a) and Case 2 (b)

记物, 证明床单上未知斑迹含有精液成分。

3 讨 论

现有研究在构建 RNA 检验复合扩增体系时, 往往存在标记检验特异度低、灵敏度低、各标记检验 RFU 值 (电泳图谱峰高) 不平衡等问题, 本文在综合文献调研和既往研究的基础上, 构建了一组可同时检测 mRNA 和 circRNA 的复合扩增体系, 可实现对唾液、精液、阴道分泌物 3 种法医工作中常见体液斑迹的准确识别, 该体系主要适用于涉及性侵、猥亵等犯罪行为的现场中生物物证组织来源的鉴定。通过进行倍比稀释实验、特异性实验、混合

样本等系列实验, 结果表明该体系具有较好的特异度、灵敏度和较低的检测阈值, 且能够在 3 种体液的混合斑迹检验中发挥作用。

3.1 体液特异性标记的筛选

在本研究的起始阶段, 我们筛选了体液特异性表达的基因, 初步确定了 3 种体液中的 17 个候选基因 (表 10)。这些基因包括 3 个管家基因, *TEF*、*UCE* 和 *B2M*, 5 个唾液特异性基因, *HTN3*、*STATH*、*MUC7*、*SMR3B* 和 *FDCSP*, 5 个精液特异性基因, *PRM1*、*PRM2*、*SEMG1*、*TGM4* 和 *KLK3*, 以及 4 个阴道分泌物特异性基因, *CYP*、*MUC4*、*HBD1* 和 *MYOZ1*。

Table 10 17 candidate genes and their functional descriptions

Body fluid	Gene name	Function description	Reference
Housekeeping	<i>TEF</i>	Transcription elongation factor	[27]
	<i>UCE</i>	Ubiquitin-binding enzyme	[27]
	<i>B2M</i>	β2-microglobulin	[20]
Saliva	<i>HTN3</i>	Histatin 3, an antimicrobial peptide, aids in the bactericidal properties of saliva	[21]
	<i>STATH</i>	Salivary acidic proline-rich proteins, associated with the protection of oral mucosa	[22]
	<i>MUC7</i>	Mucin 7, facilitates oral hygiene by promoting the removal of bacteria, and aids in chewing, speaking, and swallowing	[22]
	<i>SMR3B</i>	Submandibular gland androgen-regulated protein 3B, possesses antimicrobial properties	[22]
	<i>FDCSP</i>	Follicular dendritic cell-derived secretion protein, which has the function of binding to B cells and is found in saliva	[28]
Semen	<i>PRM1</i>	Protamine 1, present in sperm cells	[23]
	<i>PRM2</i>	Protamine 2, present in sperm cells	[12]
	<i>SEMG1</i>	Semenogelin 1, present in seminal plasma	[24]
	<i>TGM4</i>	Transglutaminase 4, present in seminal plasma and prostatic fluid	[22]
	<i>KLK3</i>	Kallikrein-3, involved in semen coagulation	[12]
Vaginal secretion	<i>CYP</i>	Cytochrome P450 family proteins, with their expression products detectable in vaginal secretions	[25]
	<i>MUC4</i>	Transmembrane glycoproteins, distributed in the cervical and vaginal epithelium	[23]
	<i>HBD1</i>	Human β-defensin-1, possesses antimicrobial activity	[26]
	<i>MYOZ1</i>	Myosin Z1, potentially associated with the contractile function of vaginal smooth muscle	[29]

本实验室针对每个基因设计了数对跨外显子接头的引物, 以扩增体液特异性基因的转录产物, 并对产物进行测序, 以检查是否可以扩增出目标序列。随后, 对筛选后的标记进行特异度检验、灵敏度检验、复合体系的预调, 最终筛选出本文所用 11 个基因的 11 对引物。其中, 精液特异性基因 *PRM2* 和 *KLK3* 我们使用了 LC 引物 (linear and circular primers) 进行扩增。图 5 展示了线性和环状 RNA 的关系^[14], 基因转录产生的 mRNA 和 circRNA 来源于同一个前体, LC 引物可以对其共有部分进行扩增, 从而同时检测 mRNA 和部分

circRNA。由于 circRNA 长度较短, 可以抵抗 RNA 酶消化, 因此在体系中引入 LC 引物, 可以增强体系对于降解或陈旧样本的鉴别能力。

3.2 多重荧光复合扩增体系的构建要求

本实验室在构建多重荧光复合扩增体系时, 主要从以下几个方面进行了考量。

首先, 在引物设计阶段, 将理论扩增长度统一设置为 80~300 bp。原因是较短的片段通常扩增效率较高, 对 RNA 模板的质量要求相对较低, 同时也降低了引物错配的可能性, 提高了引物的特异性。为了防止扩增片段长度重叠, 给 11 对引物分

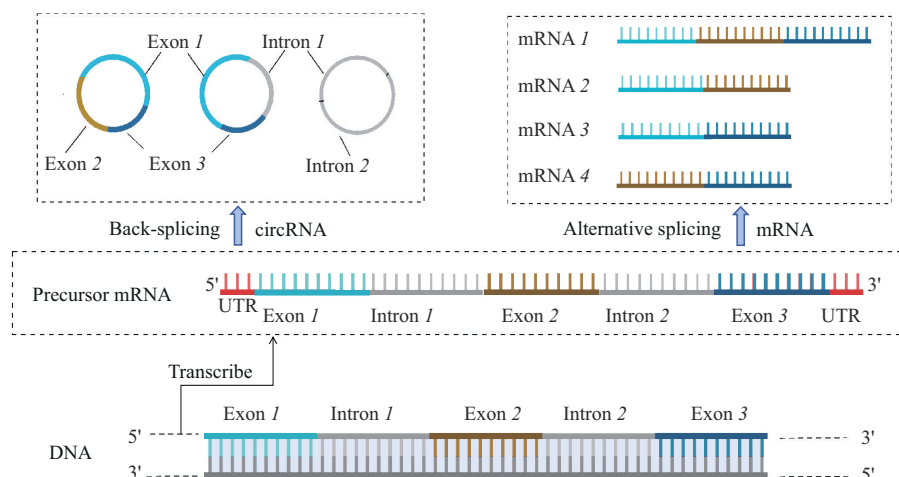


Fig. 5 The relationship between DNA, mRNA, and circRNA

配了FAM、HEX、TAMRA和ROX 4色荧光，并且考虑到过高的扩增片段浓度可能导致的光谱重叠问题而没有采用第5种荧光标记。

其次，在体系构建过程中，主要考虑了引物配比、试剂与酶的优化、PCR条件优化等。从添加等摩尔浓度引物开始，逐步确定优势引物（RFU值大、非特异性扩增）和劣势引物（扩增效率差、出峰率低），降低优势引物浓度，增加劣势引物浓度，最终得到峰高比合适的复合体系电泳图谱。此外，通过设计梯度实验，来逐步优化缓冲液、 Mg^{2+} 和dNTP的浓度，并结合对PCR过程温度和时间梯度实验优化，使酶保持在一个合理的活性区间，减少拖尾、裂分的峰形，获得各个标记出峰均衡的电泳图谱。

3.3 多重荧光复合扩增体系的适用性评估

考虑到当前实战亟需解决的是微量降解和混合生物检材的检验能力，本实验着重验证了多重荧光复合扩增体系的检测阈值与处理混合样本的能力。在验证检测阈值时，采用了对RNA混合样本和个体cDNA倍比稀释的方法，其一方面能够探究复合体系的最低检测阈值，同时也能探究个体间差异对检出限的影响。结果显示，本体系针对唾液、精液的检测限较低，RNA起始量浓度为 10^{-3} mg/L时可检出所有标记，对阴道分泌物的检测限略高，为 10^{-1} mg/L数量级的RNA起始量浓度。此外，cDNA的倍比稀释实验表现出的低个体差异性也表明本体系具有高稳定性。

我们曾尝试利用RNA混合样本作为内标，以构建RNA浓度与逆转录后cDNA浓度的对应关系。

但由于逆转录过程中随机引物、dNTP等的存在，cDNA定量结果的准确性不能保证，当RNA模板量小于一定值时，cDNA的定量结果不再可靠。

在强奸、猥亵等案件犯罪现场，现场生物物证多为精液-阴道分泌物等混合斑，即使在准确检出相关人员（嫌疑人或受害人）的DNA分型下，仍可能涉及到体液斑迹的来源推断问题（如上述斑迹中男性/女性供体的斑迹来源推断）。我们观察到，这种情况下男性生物物质例如精液含量往往较高，故着重做了精液-阴道分泌物、精液-唾液的混合样本实验。在利用研究构建的多重复合扩增体系检验混合样本前，我们将裂解后的载体与裂解液回收，同时进行了DNA分型检验，可得到良好的混合分型图谱。因此，若已知混合样本供体双方DNA分型时，在进行精液-唾液（女）、精液-阴道分泌物、唾液（男）-阴道分泌物等具有性别特质的混合斑来源推断时，本体系结合DNA分型检验可以实现斑迹个体来源的识别和组织来源的推断。近年来，对转录组中编码区单核苷酸多态性^[30]（coding single nucleotide polymorphism, cSNP）和编码区插入缺失多态性^[5]（coding insertion-deletion, cInDel）的研究让我们看到了在不具有性别特质的混合斑迹鉴定中进行个体来源识别的希望。本实验室未来将进一步筛选体液特异性的cSNP和cInDel位点，并将cSNP和cInDel的分析方法整合到现有多重荧光复合扩增体系中，以期用于体液斑迹鉴定和个体来源识别。

3.4 案件实用性思考

本项研究的样本分别来源于2015年和2024

年。在3.1节中提到的结果显示,尽管两组样本的标记物(不包括MUC4)通过Wilcoxon秩和检验得到的显著性水平(P 值)超过了0.05,意味着从统计学角度来看,两组样本最终的特异性标记检验结果之间没有显著差异。然而,通过分析电泳图谱中各个标记物的RFU值,仍然可以观察到陈旧样本产生了一定程度的降解。尽管如此,这种低程度的降解并未对后续体系的验证和应用造成影响。这表明本研究所构建的复合体系能够有效应用于至少10年内的陈旧样本。同时,这也反映出本研究中样本的保存方式(低温冷冻、避光保存和使用生物样本RNA提取专用试剂盒)是有效且可行的。但在实际案件检验中,现场生物检材的环境差异将导致检验结果存在多重不确定性。通常情况下,常规现案中涉及的生物物证核酸含量可能相对较高,使用复合体系一般能够检出大多标记。但当面对微量样本、陈旧样本或降解样本,就可能会遇到由于检材RNA含量过少或降解而导致标记难以全部检出的情况。因此,针对犯罪现场提取到的生物检材,如有斑迹鉴定的需求,建议低温冷冻保存并及时送检,最大限度避免检材中待检RNA降解,影响后续检验。此外,犯罪现场生物检材同期同源生物样本的检验也提供了一定的策略支持。例如在性侵犯案件中,由于检材保存时间过长或储存方式不当导致了一定程度的RNA降解,在犯罪嫌疑人内裤上发现的可疑斑迹中检出女性受害人DNA,但mRNA检验只检出了阴道分泌物的CYP标记。如果与嫌疑人内裤同期采集的被害人阴道拭子同样也只检出了CYP标记,则综合案件与检材情况,有理由考虑MUC4和HBD1的阴性结果是由于mRNA降解所致。同时针对复合体系中不可避免的假阴性情况,在检验过程中,可对在复合扩增体系中未出峰的基因续加灵敏度更高的单引物扩增。如在复合体系中HBD1和MUC4检验阈值相对较高,可能会在极微量样本中出现假阴性的情况,就可以通过续加单扩增再解决。事实上,本实验室曾对HBD1和MUC4进行单标记灵敏度测试,结果显示,HBD1和MUC4的检出率分别为79.03%和82.74%,且HBD1和MUC4在单引物扩增中检出限分别为0.5 ng和0.1 ng,因此可满足实战中办案需要。

4 结 论

本文在DNA实验室常规毛细管电泳平台基础上,建立了一套适用于唾液-精液-阴道分泌物等3

种现场体液斑迹鉴定的多重荧光复合扩增体系,在RNA水平上可同时检测11个针对上述3类斑迹的组织特异性标记,该体系具有较好的灵敏度、特异度,在较低的检测模板投入量时(0.1 mg/L)也可检出各类标记,与此同时,其对混合样本甚至是不均衡混合样本也有较好的检出能力。此外,本文还讨论了该体系构建过程中的引物筛选、构建标准等问题,为针对更多斑迹的更大体系研究提供了技术参考。在下一步的研究中,本实验室计划引入更多LC引物或其他引物以进一步提高检测灵敏度、筛选更多类型体液标记物以扩充体系检测的体液种类。在以上工作的基础之上,计划进一步筛选体液特异性cSNP和cInDel遗传标记,从而更准确地完成混合复杂斑迹的来源(个体和种类)推断。

参 考 文 献

- [1] 蔡美铭,陈曼,季观庆,等.法医转录组学的研究进展及展望.中国法医学杂志,2023,38(2): 166-171
Cai M M, Chen M, Ji G Q, *et al.* Chin J Forensic Med, 2023, 38(2): 166-171
- [2] Zhang X, Li J, Liu J, *et al.* Identification of the vaginal secretion donor in mixture stains using polymorphic cSNPs on mRNA biomarkers. Forensic Sci Int Genet, 2022, 59: 102703
- [3] Johannessen H, Gill P, Shanthan G, *et al.* Transfer, persistence and recovery of DNA and mRNA vaginal mucosa markers after intimate and social contact with Bayesian network analysis for activity level reporting. Forensic Sci Int Genet, 2022, 60: 102750
- [4] Johannessen H, Hanson E, Gill P, *et al.* Body fluid identification in samples collected after intimate and social contact: a comparison of two mRNA profiling methods and the additional information gained by cSNP genotypes. Genes, 2023, 14(3): 636
- [5] Wang S, Jiang T, Yuan C, *et al.* An mRNA profiling assay incorporating coding region InDels for body fluid identification and the inference of the donor in mixed samples. Forensic Sci Int Genet, 2024, 69: 102979
- [6] 赵禾苗,王冲,李万水,等.mRNA在体液斑迹鉴定与组织来源推断中的应用.中国法医学杂志,2016,31(5): 463-466
Zhao H M, Wang C, Li W S, *et al.* Chin J Forensic Med, 2016, 31(5): 463-466
- [7] Mayes C, Houston R, Seashols-Williams S, *et al.* The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. Leg Med, 2019, 38: 45-50
- [8] Wei S, Hu S, Han N, *et al.* Screening and evaluation of endogenous reference genes for miRNA expression analysis in forensic body fluid samples. Forensic Sci Int Genet, 2023, 63: 102827
- [9] Chen X, Xu H, Zhu B. Forensic validation of a combined analysis of mRNA and miRNA markers for precise tissue origin inferences of five kinds of body fluids by RT-qPCR. Electrophoresis, 2023,

- 44(21/22): 1714-1724
- [10] Bamberg M, Bruder M, Dierig L, *et al.* Best of both: a simultaneous analysis of mRNA and miRNA markers for body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet*, 2022, **59**: 102707
- [11] Liu Y, He H, Xiao Z X, *et al.* A systematic analysis of miRNA markers and classification algorithms for forensic body fluid identification. *Brief Bioinform*, 2021, **22**(4): bbaa324
- [12] Liu B, Yang Q, Meng H, *et al.* Development of a multiplex system for the identification of forensically relevant body fluids. *Forensic Sci Int Genet*, 2020, **47**: 102312
- [13] Zhang Y, Liu B, Shao C, *et al.* Evaluation of the inclusion of circular RNAs in mRNA profiling in forensic body fluid identification. *Int J Legal Med*, 2018, **132**(1): 43-52
- [14] Liu Z, Yang J, Wang N, *et al.* Integrative lncRNA, circRNA, and mRNA analysis reveals expression profiles of six forensic body fluids/tissue. *Int J Legal Med*, 2024, **138**(3): 731-742
- [15] 赵禾苗, 林清峦, 陈静, 等. circRNA 应用于体液斑鉴定的技术可行性研究. *中国法医学杂志*, 2018, **33**(1): 31-34
Zhao H M, Lin Q L, Chen J, *et al.* *Chin J Forensic Med*, 2018, **33**(1): 31-34
- [16] Wang S, Wang Z, Tao R, *et al.* Expression profile analysis of piwi-interacting RNA in forensically relevant biological fluids. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, **42**: 171-180
- [17] Wang S, Wang Z, Tao R, *et al.* The potential use of piwi-interacting RNA biomarkers in forensic body fluid identification: a proof-of-principle study. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, **39**: 129-135
- [18] Liu Z, Wang Q, Wang N, *et al.* A comprehensive characterization of small RNA profiles by massively parallel sequencing in six forensic body fluids/tissue. *Genes*, 2022, **13**(9): 1530
- [19] Akutsu T, Yokota I, Watanabe K, *et al.* Precise and comprehensive determination of multiple body fluids by applying statistical cutoff values to a multiplex reverse transcription-PCR and capillary electrophoresis procedure for forensic purposes. *Leg Med*, 2022, **58**: 102087
- [20] Hanson E K, Ballantyne J. Highly specific mRNA biomarkers for the identification of vaginal secretions in sexual assault investigations. *Sci Justice*, 2013, **53**(1): 14-22
- [21] Alvarez M, Juusola J, Ballantyne J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Anal Biochem*, 2004, **335**(2): 289-298
- [22] Roeder A D, Haas C. mRNA profiling using a minimum of five mRNA markers per body fluid and a novel scoring method for body fluid identification. *Int J Legal Med*, 2013, **127**(4): 707-721
- [23] Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int*, 2005, **152**(1): 1-12
- [24] Sakurada K, Ikegaya H, Fukushima H, *et al.* Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen. *Leg Med*, 2009, **11**(3): 125-128
- [25] van den Berge M, Carracedo A, Gomes I, *et al.* A collaborative European exercise on mRNA-based body fluid/skin typing and interpretation of DNA and RNA results. *Forensic Sci Int Genet*, 2014, **10**: 40-48
- [26] Xu Y, Xie J, Cao Y, *et al.* Development of highly sensitive and specific mRNA multiplex system (XCVR1) for forensic human body fluids and tissues identification. *PLoS One*, 2014, **9**(7): e100123
- [27] Fleming R I, Harbison S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Sci Int Genet*, 2010, **4**(4): 244-256
- [28] Park S M, Park S Y, Kim J H, *et al.* Genome-wide mRNA profiling and multiplex quantitative RT-PCR for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, **7**(1): 143-150
- [29] Chierito E, Alessandrini F, Bini C, *et al.* An mRNA profiling study of vaginal swabs from pre- and postmenopausal women. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, **45**(8): 6526-6537
- [30] Hanson E, Dørum G, Zamborlin M, *et al.* Targeted S5 RNA sequencing assay for the identification and direct association of common body fluids with DNA donors in mixtures. *Int J Legal Med*, 2023, **137**(1): 13-32

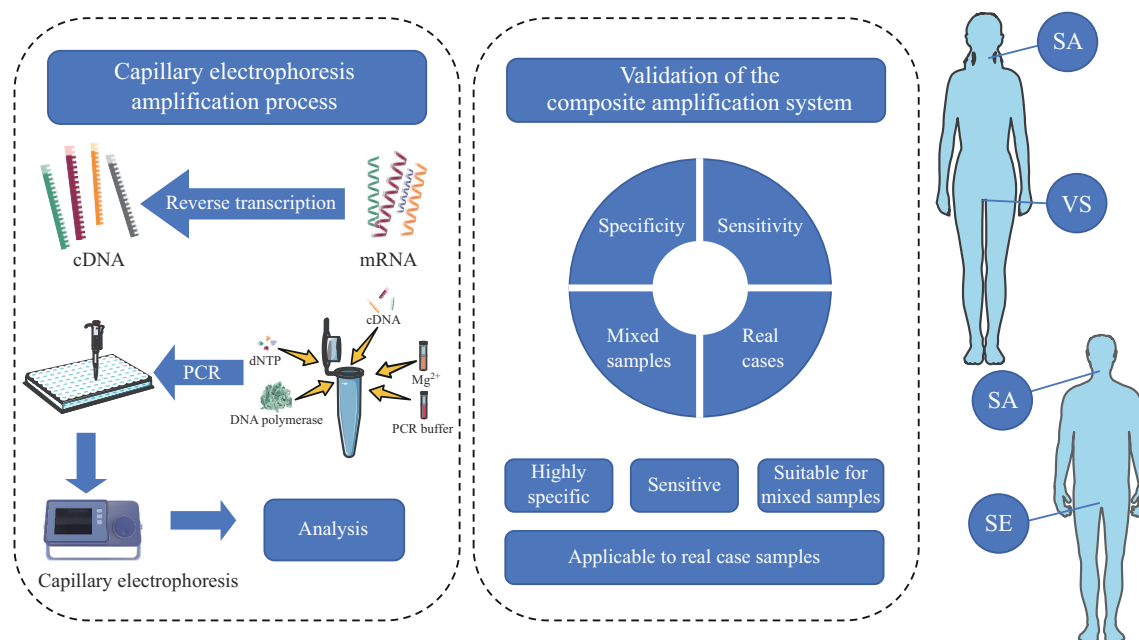
Research on The Construction and Application of Multiple Fluorescence Amplification System for Three Kinds of Stains*

BAI Yi-Fan^{1,2)}, ZHAO He-Miao²⁾, CHEN Jing²⁾, LIU Hong-Di²⁾,
YANG Rui-Qin^{1)**}, WANG Chong^{2)**}

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

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

Graphical abstract



Abstract Objective A multiplex amplification system was constructed based on the capillary electrophoresis platform for simultaneous detection of saliva, semen, and vaginal secretions using tissue-specific RNA markers. The aim of this study is to identify the tissue origin of suspicious body fluid stains found at crime scenes and determine whether the body fluid stains at the crime scene are one or several types among saliva, semen, and vaginal secretions. **Methods** Thirty saliva samples, forty semen samples, and forty vaginal secretion samples (half from 2015 and half from 2024) were collected from healthy adult volunteers. Through primer designing, system formulation, and PCR condition optimization, a multiplex fluorescent amplification system was constructed. The specificity, sensitivity, and detection ability for mixed samples of this system were investigated, and it was tested using real crime scene materials. In the primer design stage, to reduce the requirements for RNA

* This work was supported by a grant from Central Public-Interest Scientific Institution Funding Project (2023JB005).

** Corresponding author.

YANG Rui-Qin. Tel: 86-10-83903263, E-mail: yangruiqin@ppsuc.edu.cn

WANG Chong. Tel: 86-10-66269554, E-mail: wangannann@126.com

Received: August 26, 2024 Accepted: November 6, 2024

template quality, the amplification products were set within 80–300 bp. In the system formulation stage, dominant and subordinate primers were mainly considered. By reducing the concentration of dominant primers and increasing that of subordinate primers, a capillary electrophoresis spectrum with an appropriate peak height ratio was finally obtained. Additionally, gradient experiments were designed to adjust the concentrations of PCR reagents and PCR amplification conditions, and multiple versions of DNA amplification enzymes were optimized to achieve the best experimental results. **Results** Through statistical analysis, there was no significant difference in the capillary electrophoresis of the 3 types of body fluid samples from the two years (2015 and 2024), demonstrating that the sample preservation method in this study can preserve samples for a relatively long time. The composite amplification system constructed in this study exhibited high specificity for all 3 types of body fluid, with no cross-reactions between the markers of each type of body fluid. The minimum detection thresholds for the 3 types of body fluid reached 0.002 9, 0.001 5, and 0.42 mg/L, respectively. This system also had a high degree of discrimination for mixed samples, especially for semen-saliva mixtures, where each body fluid marker could still be successfully detected when the concentration ratio of semen to saliva was 100:1. Meanwhile, in the two actual cases presented in this article, the application of this composite amplification system performed outstandingly. **Conclusion** The composite amplification detection system constructed in this study can achieve the correct screening of saliva, semen, and vaginal secretions, overcoming the problems such as low specificity and sensitivity of marker tests and unbalanced RFU values of each marker in previous studies. The specificity and sensitivity meet the practical work requirements, and the operation is simple. It provides an analytical and identification method for body fluid stains in actual case and is applicable to the identification of the tissue origin of biological evidence at crime scenes involving sexual assault, indecent assault, and other criminal acts. In the future, more types of body fluid markers will be screened to expand the types of body fluids detected by the system, and body fluid-specific cSNP and cInDel genetic markers will be introduced to infer the sources (individuals and types) of mixed and complex stains more accurately.

Key words forensic genetics, body fluid stains, mRNA

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0379

CSTR: 32369.14.pibb.20240379