

研究工作

人头发 DNA 的提取及其基因扩增*

刘敬忠 唐奇志**

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

提 要

头发是犯罪现场最容易得到的材料之一。本文报道从人的头发中提取 DNA 的方法以及利用 PCR (聚合酶链反应) 技术, 从少量人发 DNA 扩增大量拷贝数的基因片段。对基因扩增得到的大量基因片段进行进一步的基因分析, 将为法医物证学提供客观证据, 具有重要价值。

关键词 头发 DNA, PCR (聚合酶链反应)

DNA 重组技术与分子遗传学的发展, 使法医学中个人识别和亲子鉴定技术有了突破性进展^[1,2]。1985 年 Jeffreys 首次报道用人体特异的 DNA 探针, 对人体小卫星 DNA 的 RFLPs 进行研究, 发现这种 DNA 指纹图谱鉴别率高, 个体特异性极显著^[3], 使法医物证学研究进入了一个新时期。但这类研究需 DNA 量较大, 且要求 DNA 分子相当完整。这对于法医所能获取的材料, 如头发、血斑等是困难的。Higuchi 等^[4]利用近年来发展起来的 PCR 技术, 将从一两根头发中提取到的少量 DNA 进行体外扩增, 再用三种不同的方法进行分析, 即测量扩增片段长度的不同, 用特异寡核苷酸探针杂交以及直接测 DNA 序列, 获得反映不同个体基因特异性的多种信息。本文报道我们从人头发提取 DNA 的方法, 并就有关问题进行讨论, 以及利用人发 DNA 进行 PCR 的结果。

材 料 和 方 法

试剂 蛋白酶 K, DTT, Taq 聚合酶均从华美生物工程公司购进, F. D. 聚合酶 (PCR 级) 系复旦大学毛裕民惠赠, 其它试剂均为国产

分析纯。

头发之采集 从不同个体采集头发数根, 尽量拔出根部毛囊, 立即提取 DNA, 或保存不同天数后提取 DNA。自然脱落头发系从不同个体收集。

头发 DNA 的提取 按 Higuchi 等^[4]方法稍加改进。将头发先后在蒸馏水中及 95% 乙醇中各漂洗两次。取近根部长约 1—2 厘米部分, 剪碎, 于 1.5ml 小离心管中, 加 0.5ml 消化液 (含 Tris-HCl 0.01mol/L, pH8.0, EDTA 0.01mol/L, NaCl 0.1mol/L, SDS 2%, 蛋白酶 K 20μg/ml, DTT 0.039mol/L), 37℃水浴中保温 10 小时左右, 至头发完全消化溶解。消化液用等体积饱和酚抽提两次, 用等体积氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提两次, 酒精沉淀 DNA, 室温下晾干, 加适量 TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀。

DNA 浓度测定 测 DNA 制备液的稀释液的 OD₂₆₀, 计算其浓度及总得量; 或取 5—10 μl, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色后, 紫外灯光下观察 DNA 的完整程度及含量之多

* 本工作得到国家 863 研究基金资助。

** 唐奇志: 协和医科大学五年级学生。

表 1 用于 PCR 的引物的序列
Table 1 The sequence of primers for PCR

Primer	5'-----3'									
P1	GTA	CGG	CTG	TCA	TCA	CTT	AGA	CCT	CA	
P2	GGT	GAA	CGT	GGA	TGA	AGT	TG			
P3	TGC	AGC	TTG	TCA	CAG	TGC	AGC	TCA	CT	
P4	TAT	CAT	GCC	TCT	TTG	CAC	CAT	TC		
P5	AGC	AGA	CAG	ACC	AGC	ACG	TT			

寡。

人头发 DNA 的 PCR 采用本实验室常规方法^[3]。所用引物系特异于人 β 珠蛋白基因片段扩增的三对引物,其位置见图 4b,其序列见表 1,系本实验室用 DNA 合成仪合成。

结果与讨论

从图 1 可见,从相同根数的不同个体的头发提取到的 DNA 量显著不同,发粗、毛囊大者,提取到的 DNA 量大。头发根部约 0.5cm 部份为提取 DNA 的有效部分。再增加头发长度,所得 DNA 无明显增加。

从 5—6 根新采集的头发一般可提取到 2—7 微克 DNA,从 2 根头发提取的 DNA,在琼

脂糖凝胶电泳上能观察到 DNA 区带(约 0.2 微克)。这些 DNA 制备物中,除含有高分子量的基因组 DNA 外,尚含有三条 EB 染色带。图 2 显示,用 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 不含 DNase 的 RNase I 消化 DNA 制备物(37°C , 2 小时)后,三条小分子量荧光带消失(图 2 第三行),只剩下高分子量 DNA 带,证明它们是 RNA。

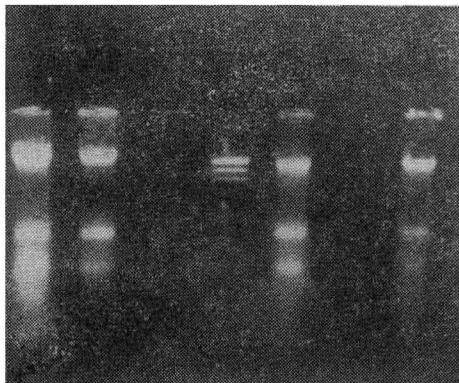


图 1 不同个体头发 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 1 Photograph of an agarose gel electrophoresis of human hair's DNA from different individuals.

C, L, T, Z represent different individul. T3 T5 is the DNA from 3 and 5 hairs plucked freshly from the same person. Ts is of shed hairs from the person. M: λ DNA-Hind III digest.

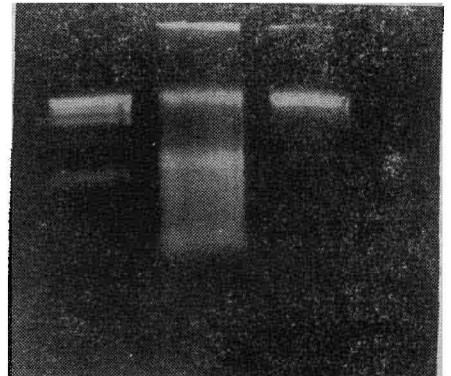


图 2 头发 DNA 的 RNase I 酶解
Fig. 2. Photograph of an agarose gel electrophoresis of RNase-treated DNAs of hairs

M: λ DNA-Hind III digest
N: without treatment with RNase I
Y: RNase-treated DNA. RNase I, $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, digestion at 37°C for 2h.

为检查从采集头发到提取 DNA 期间存放时间对 DNA 提取量的影响,将拔下的头发置纸袋中于室温下保存 3 天、8 天及 15 天后,分别提取 DNA,结果如图 3 所示,上述存放时间内,对提取 DNA 的数量及质量无明显影响。样品 1,3 DNA 少于 2,4,可能是提取及纯化时损失大所致。由于几根头发中 DNA 的含量及

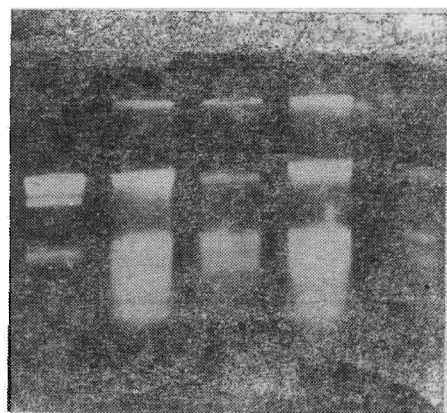


图3 从存放不同时间的头发提取的 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 Effect of deposit periods of the plucked hairs on DNA isolation

C₁₅, C₈, C₃, C₀ is the hair's DNA from the same person C, but with different periods after pluck, 15 days, 8 days, etc. M: λ DNA-Hind III digest

提取时操作溶液总体积都很小,极易造成损失,故须十分小心。

脱落头发 DNA 含量明显小于拔下的带根部毛囊的头发,最多曾用 16 根脱落头发提取 DNA,在琼脂糖凝胶电泳上仍观察不到 DNA 荧光带,图 1 中 Ts 即是。因此必须采用先进的 PCR 技术。图 4 是以头发 DNA 为模板,以特异地人 β 珠蛋白基因上长度分别为 600, 400 及 280bp 的三个片段的三对引物进行 PCR 的结果。经 93°C, 30sec $\rightarrow$ 55°C, 30sec $\rightarrow$ 70°C, 1.5min 共 35 个循环后,在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳,观察到了预期长度的扩增带。图 4a 中第 3 个样品是以脱落头发 DNA 作扩增的产物。可见同样得到了大量拷贝数的特异基因片段,足以供进一步的基因分析之用。犯罪现场得到的头发往往是来自不同个体的,故对单根头发的分析更有意义。本文所用的提取头发 DNA 方法及 PCR 技术,使从单根头发得到多拷贝数的某些基因片段成为可能。后者或者用

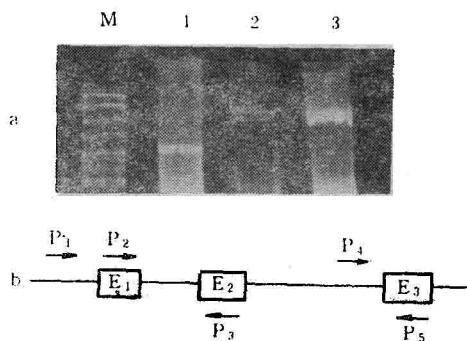


图4 头发 DNA 的 PCR

Fig. 4 The PCR of the hair's DNA

(a): Electrophoresis patterns of the PCR products on polyacrylamide gel (12%)

M: pBR322 DNA-Msp I digest

1. PCR with primers P₄-P₅

2. PCR with primers P₁-P₃

3. PCR of DNA from shed hairs with primers P₂-P₃

(b): The location of primers for PCR on human β -globin gene

E₁, E₂, E₃ is the exon1, exon2 and exon3 respectively

于特异寡核苷酸探针的斑点杂交,或者用于某些多态性限制酶片段长度多态性 (RFLP) 分析,或者用于直接测 DNA 序列^[4],从而为个人识别获取更多的客观证据。头发取材方便,不需任何器械,无痛苦,保存运输方便。可见,从人头发中提取 DNA,配合以 PCR 技术,在人类遗传病基因诊断及法医物证学中有广阔的应用前景。进一步的研究正在进行之中。

高庆生同志合成 PCR 用引物,赵敏顺教授审阅指导,作者一并表示感谢。

参 考 文 献

- 1 洪贤德等,法医学杂志,1988;4(1): 36
- 2 伍新尧,国外法医学,1987;1: 17
- 3 Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. *Nature*, 1985; 318: 76
- 4 Higuchi R *et al.* *Nature*, 1988; 332: 543
- 5 Liu Jingzhong *et al.* *Hemoglobin*, 1989; 13(6):585

【本文于 1989 年 4 月 18 日收到】

THE ISOLATION OF DNA FROM HUMAN HAIRS AND ITS PCR

Liu Jingzhong Tang Qizhi

(The Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

Abstract

Human hairs are one of the most easily found forms of biological evidence at crime scenes, Here we report a method isolating DNA from single hairs and the results of the gene amplification (PCR) from the hairs' DNA. Further studies on the amplified gene fragments are valuable for the forensic identification of individuals.

Key words human hairs, DNA, PCR (polymerase chain reaction)

经验交流

合成寡核苷酸的简易纯化方法

方 福 德

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

关键词 合成寡核苷酸, 简易纯化法

由手工或机器合成寡核苷酸到使用它们的过程中, 纯化步骤经常成为速度限制因素, 因为目前采用的常规纯化方法比较繁复^[1,2], 特别当样品数和每份样品量多时, 往往难以满足工作的需求。有鉴于此, 1986年 Lloyd 等报道了一个简易的纯化方法^[3], 似可克服上述不足。笔者从 1986 年以来曾多次参照 Lloyd 等法(仅在某些细节上略作改变)纯化由合成机合成的脱氧寡核苷酸片段(其长度为 30-mer—50-mer), 效果不错, 在此作一介绍, 以供参考。

一、样品的处理

纯化之前, 合成寡核苷酸加等体积浓 NH_4OH 溶液密封后置于 55℃ 水浴 5 小时以去三苯甲基化 (de-tritylation)。真空干燥之。

二、全长度寡核苷酸片段的分离

根据寡核苷酸长度选择适当的聚丙烯酰胺凝胶的浓度(含 8 mol/L 脲)按常规方法电泳分离, 凝胶置于荧光 TLC 板上, 用紫外线照射以显示全长度 (full-length) 寡核苷酸片段区带的位置, 再用刀片切下所需胶条。

三、全长度寡核苷酸片段的纯化

胶条研碎, 加入约 1—1.5 体积蒸馏水, 于 37℃ 温室振荡过夜。胶状液通过一具有 0.45 μ 孔径的微孔滤膜的注射针头过滤, 收集滤过液, 真空干燥, 用无水乙醇洗涤 5 次, 每次 1—1.5 ml, 沉淀物为寡核苷酸, 真空干燥后加入 50—100 μ l 水使溶解, 测定 OD_{260} 值, 按 $1\text{OD}_{260} = 20\mu\text{g}$ 计算产率。

四、产率

产率取决于多种因素, 主要包括合成效率和分离纯化过程中的损失程度等。根据我们的结果, 合成 30-mer—50-mer 寡核苷酸的产率通常在投料量的 10% 左右。

五、应用

由本法纯化所得之寡核苷酸具有较多用途^[3]。我们主要将之用作标记探针筛选含特定基因的重组体克隆。例如, 我们曾合成一个与人谷胱甘肽转移酶 π (GST- π) cDNA 5' 端序列相互补的 30-mer 脱氧寡核苷酸, 用 5' 末端标记法获得了高比活 ($> 1 \times 10^6$ cpm/ μ g) 的标记寡核苷酸探针, 说明合成寡核苷酸可作为 T₄ 多核苷酸激酶磷酸化作用的底物。我们用此标记探针进行原位杂交, 从 cDNA 文库中筛选得到 3 个含人 GST- π 基因的重组体。实践还表明, 此法纯化的寡核苷酸也可用作核酸序列测定的引物。

参 考 文 献

- 1 Alkinson T, Smith M. In: Gait M J ed, *Oligonucleotide synthesis a practical approach*, Oxford and Washington: IRL press, 1984: 35—81
- 2 Wu R et al. in: Gait M J ed, *Oligonucleotide synthesis, a practical approach*, Oxford and Washington: IRL press, 1984: 135—151
- 3 Lloyd R S et al. *Biotechniques*, 1986; 4: 8

[本文于 1989 年 6 月 19 日收到]