文章编号:1000-5404(2006)18-1857-03

论著

荧光标记 RT-PCR 技术在实验动物死亡时间推断中的应用

朱方成[1],任 亮[2],刘 良[2],王树法[3],朱传红[4],朱少华[2] ([1]鄂阳医学院法医学教研室,十堰 442000;[2]华中科技大学同济医学院法医学系,武汉 430030;[3]湖北警官学院侦察系,武汉 430034;[4]武汉市公安局刑事侦察局,武汉 430019)

提 要:目的 探讨荧光标记逆转录-聚合酶联反应(RT-PCR)在死亡时间(PMI)推断中的应用。**方法** 44只大鼠断颈处死后置于20 ℃温度控制系统内,利用荧光标记RT-PCR技术检测大鼠脑及肝组织GAPDH mRNA在死后即刻至8 d的相对表达量的变化。**结果** 在大鼠死后即刻至7 d脑组织、2 d肝组织内均可检测到GAPDH mRNA,其扩增产物的降解呈现出一定的规律性。**结论** 荧光RT-PCR技术检测大鼠死后脑及肝GAPDH mRNA,可为PMI推断提供一种新的方法。

关键词: 法医病理学;逆转录-聚合酶联反应;荧光;3-磷酸甘油醛脱氢酶;死亡时间
中图法分类号: D919.4;DF795.1 **文献标识码:** A

Preliminary study on fluorimetric RT-PCR in estimating postmortem interval in rats

ZHU Fang-cheng[1], REN Liang[2], LIU Liang[2], WANG Shu-fa[3], ZHU Chuan-hong[4], ZHU Shao-hua[2] ([1] Department of Forensic Medicine, Yunyang Medical College, Shiyan 442000; [2] Department of Forensic Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030; [3] Faculty of Spy, Hubei Police College, Wuhan 430034; [4] Department of Criminal Police, Wuhan Public Security Bureau, Wuhan 430019, China)

Abstract: Objective To investigate the application of fluorimetric reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to estimate postmortem interval (PMI) in rats. **Methods** A total of 44 rats were killed by cervical dislocation and placed in a chamber with temperature-controlling system at 20℃ for 0 to 8 d postmortem. Changes of the relative content of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA in the brain and liver were examined by fluorimetric RT-PCR. **Results** The amplification of GAPDH mRNA could be detected within 7 d in the brain and 2 d in the liver postmortem respectively, in a fashion of decreasing. **Conclusion** Fluorimetric RT-PCR can detect the time-dependent degradation of GAPDH mRNA in the brain and the liver, so it maybe provide a new index for estimating PMI.

Key words: forensic pathology; reverse transcriptase-polymerase chain reaction; fluorescence; glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; postmortem interval

死亡时间(postmortem interval, PMI)在法医学上是指死后经历时间(the time since death),即发现、检查尸体时距死亡发生的时间间隔,PMI推断是法医学领域最为重要的研究课题之一[1-3]。准确地推断PMI,除了可为侦察部门提供案情线索、划定侦察范围外,对于死亡纠纷案件的仲裁、财产继承、保险理赔案件等司法实践也可提供重要的科学依据,因此,具有重要的社会意义。目前用于推断PMI的方法主要有:尸体现象、体液离子浓度变化、酶的测定、DNA检测[1-3]等。但影响PMI推断的外界因素较多,单一方法其准确性往往不能令人满意,多因素、多指标的综合即人工神经网络的研究成为所趋[2]。随着分子生物学和计算机技术的发展和应用,通过检测细胞mRNA成为推断PMI的可能。本研究应用荧光标记逆转录-聚合酶联反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测了大鼠死后不同时间间隔脑及肝组织3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)mRNA的降解情况,旨在为PMI的推断提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

TRIzol Reagent、RT-PCR试剂盒及DEPC处理纯水购自Gibco公司,9700型PCR基因扩增仪、3100型DNA遗传分析仪

基金项目:公安部科研基金资助项目(200342-213-04)
Supported by Ministry of Public Security Science Foundation of China (200342-213-04)

作者简介:朱方成(1976-),男,湖北省十堰市人,硕士,讲师,主要从事法医病理学方面的研究,发表论文12篇。电话:(0719)8875307,E-mail: zfc_8m@sina.com
通讯作者:刘 良,电话:(027)83692649

收稿日期:2005-10-18;修回日期:2006-03-19

购自 ABI 公司,1-13 型高速台式离心机购自 Sigma 公司,各种规格微量加样器购自 Gilson 公司,Milli-QA 型超纯水制备系统购自 Millipore 公司。

1.2 动物分组及处理

Wistar 大鼠 44 只,雌雄不限,体质量 200 ~ 250 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。大鼠断颈处死后置于 20 ℃温度控制系统内,分别于死后 0、1、2、3、4、5、6、7、8 d 解剖,其中,1 d 内又分 8、16、24 h 3 个时间点(共 11 个时间点,每时间点 4 只),分别剪取脑及肝组织备用。

1.3 总 RNA 提取

分别取脑、肝组织 100 mg 置于匀浆器中,加入 TRIzol 1 ml 低温快速匀浆,室温静置 5 min,15 000 r/min 离心 10 min,取上清至另一离心管中,加入氯仿 0.2 ml 充分混匀至乳白色,室温静置 3 min,15 000 r/min 离心 15 min,取上清 600 μl 至另一离心管中,加入异丙醇 0.5 ml 混匀,室温静置 10 min,15 000 r/min离心 15 min,去除上清,加入 75% 乙醇 1 ml 洗涤沉淀,10 000 r/min离心 10 min,去除上清,再加入 75% 乙醇重复 1 次,吸除所有上清,在超净工作台干燥,加入 DEPC 纯水溶解沉淀置 -70 ℃保存。

1.4 GAPDH mRNA 的检测

1.4.1 引物合成 管家基因 GAPDH 和内源性对照 β-actin 引物由上海生工合成。GAPDH 引物序列为:上游 5′-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3′,下游 5′-TGTCATTGAGAGCAATGCCAGC-3′,扩增产物长度为 148 bp;β-actin 引物序列为:上游 5′-GCAGTTGGTTGGAGCAA-3′,下游 5′-ATGCCGTGGATACTTGGA-3′,扩增产物长度为 114 bp。引物上游 5′端挂蓝色荧光 6-FAM。

1.4.2 一步法 RT-PCR 复合扩增 以 β-actin 为内对照,按照 RT-PCR 试剂盒(SuperScript™ one-step RT-PCR with Platinum® *Taq*)说明,进行一步法 RT-PCR 复合扩增。反应体系 10 μl,内含模板 RNA 4 μl,2 × Buffer 1 μl(内含有 dNTP),50 mmol/L $MgCl_2$ 0.45 μl,引物 GAPDH 和 β-actin 各 0.3 μl,RT/Platinum® *Taq* 混合酶 0.2 μl,加 RNase-free 的 Milli-Q 超纯水补足至 10 μl。反应条件:50 ℃,45 min,1 个循环;95 ℃,2 min,1 个循环;95 ℃、1 min,58 ℃、1 min,72 ℃、2 min,30 个循环;72 ℃,10 min,1 个循环;4 ℃保存。实验中以未加 RT/Platinum® *Taq* 混合酶作为阴性对照。

1.4.3 RT-PCR 扩增产物电泳 取上述扩增产物 1.5 μl,加入 18 μl 甲酰胺(内含 20 μl ROX/1 ml)混合,离心,95 ℃变性 3 min,冰浴 3 min。在 3100 型 DNA 遗传分析仪上建立相应的进样程序,电泳条件:16 根毛细管,每根内径 50 μm、长 47 cm,毛细管内凝胶为 POP-4™ 胶液(4%,8 M 尿素),进样时间 5 s,电压 1.5 kV,电流为 12 mA,功率为 9.9 W,电泳温度 60 ℃,电泳 24 min。结果均进行 4 次独立实验。

1.4.4 数据处理 应用 3100 DNA 遗传分析仪上的 GeneScan Analysis Version 3.1 分析软件,通过与 Genescan-500™ ROX 标准分子量作比对,确定脑、肝 GAPDH、β-actin mRNA 转化的 PCR 产物,并记录每个特异性峰的峰面积。

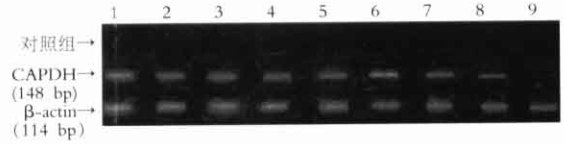
1.5 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Excel 2003 及 SPSS 12.0 软件进行方差分析及线性回归分析。

2 结果

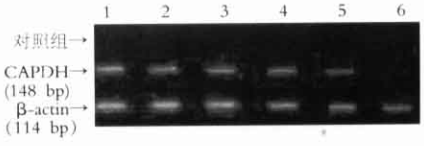
2.1 扩增产物电泳图

死后不同时间大鼠脑、肝组织 GAPDH mRNA 扩增产物电泳产生的谱带分别见图 1、2。从电泳图像可以看出,大鼠脑 GAPDH mRNA 在死后 7 d 内都可检测出,第 8 天消失;肝 GAPDH mRNA 在死后 48 h 内可检测出,第 72 小时消失;且其量均呈逐渐下降趋势(谱带变暗),而对照组未扩增出任何条带。



1 -9:大鼠死后 0 ~ 8 d

图 1 大鼠死后不同时间脑 GAPDH mRNA 的电泳图



1 -6:大鼠死后 0、8、16、24、48、72 h

图 2 大鼠死后不同时间肝 GAPDH mRNA 的电泳图

2.2 扩增产物峰面积及其比值

死后不同时间大鼠脑、肝组织 GAPDH mRNA 扩增产物峰面积分别见表 1、2。GAPDH 与内参照 β-actin 的峰面积之比作为其相对表达值。

表 1 大鼠死后不同时间脑 GAPDH mRNA 扩增产物荧光 RT-PCR 分析结果($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

PMI (d)	GAPDH	β-actin	GAPDH/β-actin
0	6 655 ± 374	8 756 ± 456	0.76
1	4 981 ± 247	7 015 ± 578	0.71
2	4 237 ± 365	6 054 ± 469	0.70
3	3 493 ± 291	5 214 ± 587	0.67
4	3 287 ± 338	4 789 ± 313	0.68
5	2 029 ± 312	3 327 ± 374	0.61
6	1 033 ± 209	2 198 ± 292	0.47
7	727 ± 182	1 774 ± 267	0.41
8	-	1 235 ± 198	-

表 2 大鼠死后不同时间肝 GAPDH mRNA 扩增产物荧光 RT-PCR 分析结果($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

PMI(h)	GAPDH	β-actin	GAPDH/β-actin
0	5 779 ± 421	8 756 ± 456	0.66
8	5 192 ± 372	8 241 ± 410	0.63
16	4 459 ± 293	7 823 ± 496	0.57
24	4 209 ± 307	7 015 ± 578	0.60
48	3 088 ± 390	6 054 ± 469	0.51
72	-	5 214 ± 587	-

2.3　线性回归分析

脑、肝细胞 GAPDH mRNA 的相对表达值（GAPDH/β-actin）均与 PMI 之间存在显著的相关性（$P<0.01$），见图 3、4。

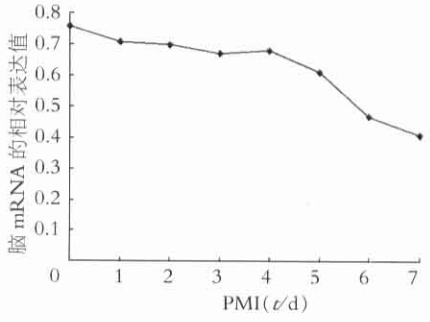


图 3　大鼠死后不同时间脑细胞 mRNA 降解趋势图

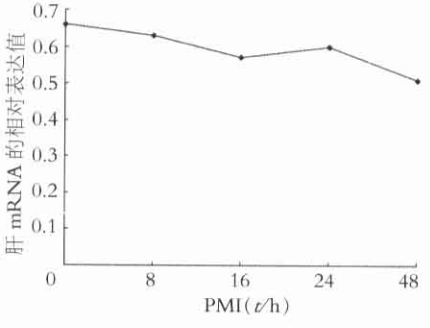


图 4　大鼠死后不同时间肝细胞 mRNA 降解趋势图

3　讨论

目前常用的半定量 RT-PCR 方法[4-9]，多在总 mRNA 定量的基础上进行逆转录后再进行 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳分离。其过程繁琐，人为影响因素多。琼脂糖凝胶电泳分离技术采用溴化乙锭染色显带方法，分辨率较低，分辨基因片段要求长度差别较大（有时甚至要求 PCR 产物相差数百个 bp），无法分辨片段长度相近的基因片段；采用凝胶成像系统扫描后进行图像分析，误差较大。本研究应用荧光标记及一步法 RT-PCR 复合扩增技术，克服了常规半定量 RT-PCR 方法的缺点与不足，此方法用于推断 PMI 目前国内尚少见报道。

按照结构和功能的不同，RNA 分为 mRNA、rRNA 和 tRNA 3 种类型，mRNA 作为蛋白质合成的模板，占细胞总 RNA 的 1% ~5%。长期以来，一直认为 RNA 代谢活跃，易于降解，其稳定性不如蛋白质，以 mRNA 作为 PMI 特别是晚期 PMI 推断的指标似乎不合适。然而对尸体检材的检测却发现管家基因 mRNA 同样具有相当高的稳定性[4,5,7-9]。关于 mRNA 在死后的变化，目前在法医学相关领域的研究认为[4-9]，目的基因和管家基因的 mRNA 都是随 PMI 的延长而降解的，GAPDH mRNA 的降解速度与全部 mRNA 的降解速度是一致的，但没有对其降解速度作进一步的研究及量化。本研究首次应用一步法复合扩增荧光 RT-PCR 技术，系统观察了大鼠脑及肝 GAPDH mRNA 随 PMI 的降解情况，发现大鼠死后 GAPDH mRNA 同样具有一定的稳定性，且不同器官其稳定性存在差异：脑在死后 7 d 内均能检测出（尤其适合较晚期尸体甚至是腐败尸体），而肝在死后 2 d 内能检出（对早期 PMI 推断有一定的价值）。且随着 PMI 的延长，GAPDH mRNA 的扩增产物逐渐减少并最终消失，呈现出一定的规律性。利用一步法复合荧光半定量 RT-PCR 技术检测死后脑、肝组织 mRNA，将成为 PMI 推断研究的新方向，尚需作进一步的研究（如缩短取材时间间隔、考虑环境温度等影响因素），更有待于在人体检材的研究中加以证实，以期早日应用于法医学检案实践，满足不同环境条件下对检材检测的需要，提高 PMI 推断的准确性。

参考文献：

[1] ELMAS I, BASLO M B, ERTAS M, *et al*. Compound muscle action potential analysis in different death models: significance for the estimation of early postmortem interval[J]. Forensic Sci Int, 2002, 127(1-2): 75 - 81.

[2] MUNOZ-BARUS J I, SUAREZ-PENARANDA J, OTERO X L, *et al*. Improved estimation of postmortem interval based on differential behaviour of vitreous potassium and hypoxantine in death by hanging[J]. Forensic Sci Int, 2002, 125(1): 67 - 74.

[3] 舒细记，王树法，李　艳，等. 死后 5 ~ 36 h 人脑细胞 DNA 降解含量的图像分析[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(8): 796 - 798.

[4] INOUE H, KIMURA A, TUJI T. Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study[J]. Forensic Sci Int, 2002, 130(2-3): 127 - 132.

[5] MARCHUK L, SCIORE P, RENO C, *et al*. Postmortem stability of total RNA isolated from rabbit ligament, tendon and cartilage[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1379(2): 171 - 177.

[6] CHANG A, LI P P, WARSH J. cAMP-Dependent protein kinase (PKA) subunit mRNA levels in postmortem brain from patients with bipolar affective disorder (BD) [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2003, 116(1-2): 27 - 37.

[7] YASOJIMA K, MCGEER E G, MCGEER P L. High stability of mRNAs postmortem and protocols for their assessment by RT-PCR[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2001, 8(3): 212 - 218.

[8] BAUER M, GRAMLICH I, POLZIN S, *et al*. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval——a pilot study[J]. Leg Med (Tokyo), 2003, 5(4): 220 - 227.

[9] TROTTER S A, BRILL L B 2nd., BENNETT J P Jr.. Stability of gene expression in postmortem brain revealed by cDNA gene array analysis[J]. Brain Res, 2002, 942(1-2): 120 - 123.

（编辑　龙　亮）