文章编号:1000-5404(2012)15-1501-04

论著

激光捕获显微切割技术诊断石蜡切片中早期胚胎成分与亲权关系的研究

李艮平[1],李彩霞[2,3],郝建文[4],万立华[1],胡 兰[2,3],韩俊平[5],杨 帆[5] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院法医学教研室[1];100038 北京,公安部物证鉴定中心[2];100038 北京,法医遗传学公安部重点实验室[3];400014 重庆,重庆市公安局[4];100038 北京,中国人民公安大学法医学教研室[5])

[摘要] **目的** 通过激光捕获显微切割技术捕获石蜡切片中胚胎绒毛细胞,进行低体积扩增,实现胚胎个体分型,证实亲子关系。**方法** 通过激光捕获显微技术捕获石蜡切片上胚胎绒毛细胞,设置20、30、40个细胞数目组,分别捕获不同数目绒毛细胞,利用低体积扩增仪进行1.5 μl体系PCR扩增,采用3130遗传分析仪得出胚胎个体分型图谱,并比较各细胞数目组胚胎个体识别的检出率、等位基因丢失率和非特异性扩增情况。最后进行实际案例应用。**结果** 捕获20个胚胎绒毛细胞即可获得胚胎个体分型,40个细胞数目组的胚胎分型检出率最高,等位基因丢失率和非特异性扩增率最低。20个细胞数目反之。**结论** 激光捕获显微切割技术结合低体积扩增技术可应用于石蜡切片,实现胚胎与母体成分的精确分离并确证亲权关系。

[关键词] 法医DNA;流产绒毛;激光捕获显微切割技术
[中图法分类号] D919.2; R321.5; R446.8 [文献标志码] A

Separation of chorionic villi from paraffin-embedded early abortion materials and confirmation of parent-child relationship by laser capture microdissection

Li Genping[1], Li Caixia[2,3], Hao Jianwen[4], Wan Lihua[1], Hu Lan[2,3], Han Junping[5], Yang Fan[5] ([1]Department of Forensic Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Center of Forensic Science, [3]Key Laboratory of Forensic Genetics, Ministry of Public Security, Beijing, 100038; [4]Chongqing Public Security Bureau, Chongqing, 400014; [5]Department of Forensic Medicine, Chinese People's Public Security University, Beijing, 100038, China)

[**Abstract**] Objective It remains difficult to genotype the mixture of maternal and embryo from early abortion tissues to investigate forensic evidence and confirm parent-child relationship. Our study was aimed to confirm the parent-child relationship by using laser capture microdissection (LCM) to capture the embryonic villi cells in paraffin-embedded section for genotyping embryonic individual *via* ultralow volume PCR amplification. Methods Embryonic villi cells in the paraffin sections was captured by LCM technology. With the setting of cell numbers at 20, 30 and 40 cells as a group, villus cells of different cell numbers were captured and subjected to PCR amplification at low volume of 1.5 μl by using 3130 Genetic Analysis instrument to yield embryonic genotyping maps. The artificial alleles, detection rate and allelic dropout rate of each group were compared. The technology was also applied on an actual case. Results Embryonic villi cells in the paraffin sections were captured by LCM technology. With the setting of cell numbers at 20, 30 and 40 cells for group, villus cells of different cell numbers were captured and subjected to PCR amplification at low volume of 1.5 μl, and embryonic genotyping maps were obtained. The rate of embryo genotyping in the group of 40 cells was the highest whereas the rate of allele loss and non-specific amplification was the lowest. Vise versa for the group of 20 cells. Conclusion LCM combined with the low volume amplification technique can be applied to paraffin-embedded tissue sections to achieve accurate separation of the embryo and maternal components and obtain conclusive evidence for parental rights.

[**Key words**] laser capture microdissection; forensic genetic DNA; chorionic villi; abortion

Supported by the Key Project of Ministry of Public Security(2010ZDYJGAE010). Corresponding author: Wan Lihua, E-mail: ccfw@cqmu.edu.cn

[基金项目] 公安部重点研究计划(2010ZDYJGAE010)
[通信作者] 万立华, E-mail: ccfw@cqmu.edu.cn

混合生物检材是犯罪现场经常遇到的检材,也是法医检案的难题之一。近年来,激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)研究为混合样本分离检验提供了全新解决方案[1]。在法庭科学实验室解决性侵犯案件和亲子鉴定案件中,经常会遇到强奸案的混合物证和怀孕3个月内早期胚胎流产的情况,母体成分与胚胎成分难以有效分离,大量母体成分会导致混合DNA分型或分型失败,而混合DNA分型不能作为直接认定的证据,这样就不能充分发挥生物检材的法医证据价值。本研究的重点是早期胚胎的分离锁定,具体方法是利用福尔马林固定、石蜡包埋的切片,应用LCM进行胚胎绒毛细胞捕获,进行低体积扩增,捕获石蜡切片中20个绒毛细胞即可获得胚胎分型,通过低体积扩增灵敏性与LCM技术的特异性捕获相结合,建立一种早期流产组织中胚胎与母体混合成分DNA分离检验的方法,实现微量混合生物样本的精确分离检验。

1 资料与方法

1.1 实验样本

早期流产组织5例,样本均来自匿名捐赠者捐赠;实际案例检材由本实验室提供。

1.2 主要试剂和仪器

Leica Rm2235 切片机; Leica HI1210 振片机;Leica HI1220 烤片机;Leica auto stainer XL 染色机;Leica EG1140H 包埋机;Leica ASP200s 全自动脱水机;DHG9023A 型电热恒温鼓风干燥箱;PALM 激光显微切割系统(ZEISS Germany);覆膜玻片(ZEISS Germany);AG480F AmpliGrid 微量反应玻片(Advalytix Germany);ASC200D AmpliSpeed 热循环仪(Advalytix Germany);Identifier® 试剂盒包括 10 × Buffer(含 Mg^{2+})、*Tag* Gold DNA 聚合酶、Primer Set 引物;蛋白酶K;矿物油; ABI3130 遗传分析仪;涡漩振荡器;Biofuge 台式离心机。

1.3 方法

1.3.1 样本的处理

1.3.1.1 石蜡切片制备 石蜡切片制备按照常规石蜡切片制作方法进行固定、脱水、包埋, 包埋好的石蜡块即可进行切片;切片的厚度为5 μm,切片后在LCM带覆膜的专用切片上铺片,铺片后按常规HE染色步骤进行染色,染色后由于后续进行激光捕获显微切割可不封片。

1.3.1.2 案例检材样本的处理 新鲜组织参照常规石蜡切片步骤制作切片,已做成石蜡切片的用二甲苯浸泡后,去除盖玻片后直接用于细胞捕获。

1.3.2 激光显微切割 ①将带有薄膜的石蜡切片放置在载物台上,用10×10倍目镜观察细胞形态和染色情况,找到细胞密集,形态较好,染色满意区域,在10×40倍目镜下调节粗细螺旋,使切片处在一个合适的观察视野。②在电脑屏幕上实时观察石蜡切片绒毛细胞,使用绘图工具,通过软件选定需要分离的细胞,然后依次在软件控制下对带细胞的膜进行切割,完成细胞分离过程。③放置安利快得反应玻片于石蜡切片的上端,调节好它们的对应关系,在软件控制下,依次对带细胞的薄膜进行弹射,从而完成了对胚胎绒毛细胞的收集。④通过软件调节视野到安利快得反应玻片上,确认收集到所需的绒毛细胞,即完成了显微分离的操作。重复上述步骤,捕获石蜡切片绒毛细胞约20、30、40个细胞数目组,不同细胞数目组均重复8次,收集到AG480F AmpliGrid微量反应玻片的反应位点。

1.3.3 细胞裂解与DNA的扩增检测 反应位点上加入0.75 μl蛋白酶K(0.4 mg/ml)裂解细胞释放DNA,用5 μl封闭液密封,放置到低体积扩增热循环仪上,56 ℃ 3 h、99 ℃ 10 min。低体积PCR扩增:用加样枪尖穿过封闭液加入0.75 μl的Identifier PCR反应MIX,将微量反应玻片放在低体积扩增热循环仪上。循环参数为:95 ℃ 11 min;94 ℃ 1 min,59 ℃ 1 min 15 s,72 ℃ 1 min 15 s,30个循环;60 ℃延伸60 min;4 ℃保存,每组均设置阴性对照,阴性对照在AG480F AmpliGrid微量反应玻片的反应位点上加0.75 μl裂解液后直接用5 μl封闭液密封,余步骤同前。扩增结束后将1.5 μl扩增产物及5 μl封闭液全部吸走,通过3130XL型遗传分析仪检测,获得胚胎、母体STR-DNA分型图谱,检测操作按照试剂和仪器说明书进行。

1.3.4 数据分析 所得STR-DNA分型检测图谱均与已知分型结果比对,获得13个基因座(除Amelogenin)以上正确分型且各等位基因峰高高于50RFUs为有效分型结果。各组的实验结果按照同一基因座出现该峰3次以上的统计原则进行结果叠加,综合结果与已知分型比对。检出率=有效分型次数/重复次数;非特异扩增率=出现非特异性扩增的位点/16个位点×重复次数×100%;等位基因丢失率=等位基因丢失总数/预计等位基因总数。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,对不同细胞数目捕获组之间的检出率、等位基因丢失率、非特异扩增率进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 不同细胞数目石蜡切片DNA检测结果

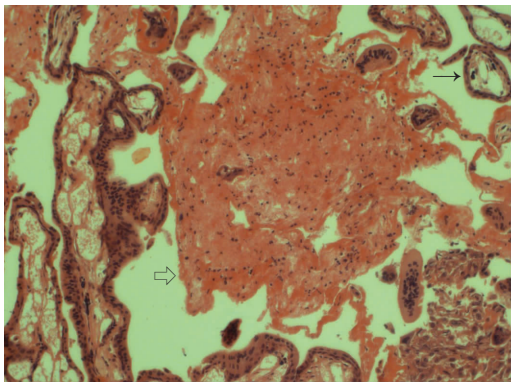
激光捕获显微切割胚胎绒毛细胞不同细胞数目检出率、等位基因丢失率、非特异性扩增不同,40个细胞数目组的胚胎分型检出率最高,等位基因丢失率和非特异性扩增率最低。20个细胞数目胚胎分型检出率最低,等位基因丢失率和非特异性扩增率最高。STR-DNA分型图谱获得13个基因座(除Amelogenin)以上正确分型且各等位基因峰高高于50RFUs为有效分型结果,统计的次数为有效分型次数,统计出现非特异扩增的位点数目,不同细胞数实验组检出率差别有统计学意义($\chi^2 = 8.652$, $P < 0.05$)。见表1。

表1 石蜡切片样本的DNA检测结果

细胞数	检出率(%)	等位基因丢失率(%)	非特异性扩增(位点数,%)	重复次数
20	70.00	12.86	5.31	40
30	82.50	9.96	4.22	40
40	95.00	4.89	3.13	40

2.2 显微镜下观察到胚胎与母体细胞情况

胚胎与母体混合组织制成石蜡切片后在 10×10 倍显微镜下观察到的胚胎绒毛细胞和母体蜕膜组织(图 1)。在 10×40 倍显微镜下观察到激光捕获显微切割的绒毛细胞已被弹射(图 2)。显微镜下观察捕获到的细胞已收集到 AG480F AmpliGrid 微量反应玻片的反应位点(图 3)。



↑:胚胎绒毛细胞;⇧:母体蜕膜组织

图 1 胚胎、母体成分病理学观察 (HE ×100)

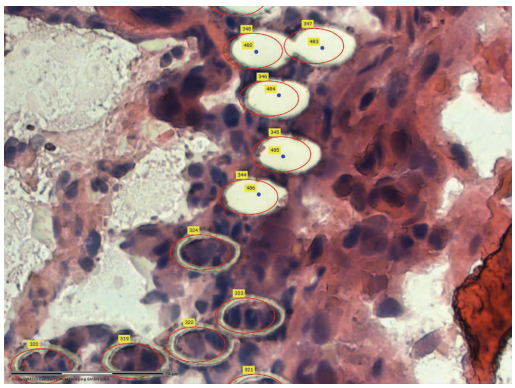


图 2 激光捕获显微切割技术选定绒毛细胞并被弹射后病理学观察 (HE ×400)

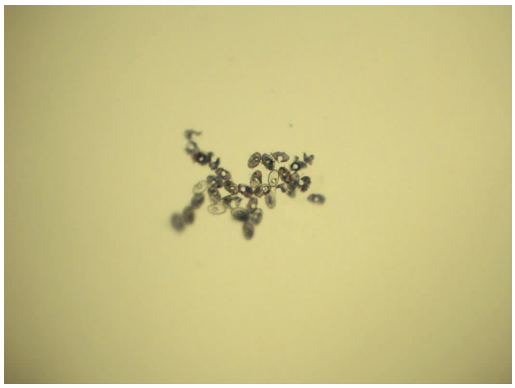


图 3 显微镜下观察目的细胞被切割后弹射到收集玻片上 (×100)

2.3 典型案例分析

2009 年,某女被强奸致孕,在医院接受了人工流产手术。为了查清案情并取证,承办警方送检了被害人血样、被害人流产组织,要求进行亲子鉴定。经常规 DNA 提取扩增方法检测得到的是母体胚胎混合基因型,多个基因座出现 3 个等位基因。参照上述方法的步骤,捕获 40 个绒毛细胞重复 8 次进行实验得到胚胎的 STR 分型图谱,每个基因座均只有 2 个以下等位基因,并且与母体分型匹配。具体胚胎 STR-DNA 分型、母亲血样分型、混合分型结果见表 2。

3 讨论

早期流产的胚胎处于主要器官的分化发育期,此期胚胎体长仅为 2~3 cm,在实行人流术时常遭到破坏,肉眼观察与母体蜕膜组织不易区分,在检验中常难以取材,利用磁珠、Chelex 常规方法提取流产组织 DNA 后进行扩增、检测,经常得出母体、胚胎混合分型,不能成为直接认定的证据。LCM 技术为该问题提供了有效解决途径,它可以在直视下从流产的绒毛膜组织、母体血液、母体蜕膜等混合组织中获得胚胎的单一细胞成分,从而得到胚胎 DNA 的 STR 分型。LCM 技术在法医 DNA 检测平台中的实际应用,国内仅限于混合斑中精子细胞分离以及口腔细胞的分离[1],在性侵犯案件中,国外利用该技术进行精子细胞的分离,获得 10 个、数十个精子细胞即可成功进行分型[2-5],从而锁定嫌疑人。但是利用该技术进行胚胎个体分型需要的细胞数相对还是较多,从数十到数百不等[6-11],Bauer 等[8]捕获 200 个绒毛细胞获得胚胎成分的 DNA 分型进而准确认定生物学父亲。Robino 等[9]利用 LCM 技术捕获胚胎绒毛细胞,10 μl 体系 PCR 扩增至少通过捕获 50 个绒毛细胞获得胚胎分型图谱。本研究通过 LCM 技术分别捕获石蜡切片上约 20、30、40 个胚胎绒毛细胞,利用低体积扩增仪进行 1.5 μl 体系 PCR 扩增,捕获石蜡切片中 20 个绒毛细胞即可获得胚胎分型。充分利用低体积扩增的灵敏性与 LCM 技术的特异性捕获相结合[12],成功进行了胚胎成分 DNA 的基因分型,而常规 PCR 扩增体系为 25 μl 或 10 μl,由于其所需要的细胞数多,无法彻底解决混合微量样品检验的问题。低体积扩增系统,使 PCR 反应体积缩小到 1 μl,使 DNA 模板、反应混合物(master mix)锚定在玻片表面构建 48 个 1 μl 亲水性基因座上,提供了微

表 2 典型案例 DNA 检测结果叠加

检材	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	Amel	D5S818	FGA
混合分型	10,13,14	31	10,11,12	10,11,12	17	6,9	10,11	9,11	21,23,24	12,14	16,17	8	14	X	12,13	23,24,25
胚胎组织	10,14	30,31	10,11	10,11	17	6,9	10,11	9,11	21,23	12,14	16,17	8	14	X	12,13	24,25
母亲血样	10,13	30	10,12	10,12	15,17	6,9	10,12	9,13	21,24	14	16,17	8	14	X	11,13	23,24

量反应最佳的环境,使灵敏度大大提高,解决了混合检材精准分离和微量检出的技术难题。

福尔马林固定石蜡包埋组织(formalin fixed and paraffin embedded tissues, FFPET)是一些刑事案件和医疗纠纷的重要物证,在实际检案中由于案情的需要,常需对FFPET进行个体识别。但这是长期以来一直是困扰法医物证检验的技术难题,因为在制作过程中需要经过福尔马林固定、浸蜡与石蜡包埋等多个步骤,DNA在此期间因接触多种化学试剂和经历温度的变化而难免发生降解,不易从中获得大片段DNA,致扩增成功率减小。有研究表明单细胞悬液经30 min福尔马林固定后,DNA产量减少到30%,随着固定时间的延长,可螺旋化的高分子量DNA明显减少[15]。本研究用10%中性福尔马林溶液固定流产组织约12 h,实验结果证明大片段等位基因丢失较少,固定时间延长后大片段等位基因丢失增多激光捕获获得的目的细胞最好弹射在安利快得反应玻片48孔板上,捕获成功率高于捕获管的捕获帽子上,因为帽子捕获面积大,适于捕获目标较多,捕获量相对较大的组织。由于石蜡切片后期要进行激光捕获,所以石蜡切片最好不要封片,但不封片会造成组织收缩、变黑,显微镜下难以区分目的细胞。本研究通过在LCM捕获细胞之前加少量水于玻片上,选定胚胎绒毛细胞,待水干之后再切割弹射,从而避免了以上问题,提高了捕获的准确性及捕获效率。如有案件检材制成的石蜡切片已封片可用二甲苯浸泡切片,待盖玻片去除后再用于LCM捕获细胞。由于病理切片中细胞距离较近,每次切割时可能切割多个细胞,本研究证明对实验结果无任何影响。

综上所述,LCM技术结合低体积扩增技术可应用于福尔马林固定、石蜡包埋组织切片,实现胚胎与母体成分DNA的精确分离和亲权关系的确证,同时本研究亦为法医物证检验解决已被福尔马林固定的组织切片中低拷贝DNA检出找到了一个可靠的新方法。

参考文献:

[1] 周怀谷, 张晨, 平原. 激光捕获显微切割技术在法医物证检验中的应用[J]. 法医学杂志, 2004, 20(4): 231-232.

[2] Vandewoestyne M, Van-Nieuwerburgh F, Van-Hoofstat D, *et al*. Evaluation of three DNA extraction protocols for forensic STR typing after laser capture microdissection[J]. Forensic Sci Int Genet, 2012, 6(2): 258-262.

[3] Meredith M, Bright JA, Cockerton S, *et al*. Development of a one-tube extraction and amplification method for DNA analysis of sperm and epithelial cells recovered from forensic samples by laser microdissection [J]. Forensic Sci Int Genet, 2012, 6(1): 91-96.

[4] Thorpe S M, Prince D V, van-Oorschot R A H. Comparison of extraction methods for spermatozoa recovered using laser microdissection[J]. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2011, 3 (1): e147-e148.

[5] McAlister C. The use of fluorescence in situ hybridisation and laser microdissection to identify and isolate male cells in an azoospermic sexual assault case[J]. Forensic Sci Int Genet, 2011, 5(1): 69-73.

[6] Elliott K, Hill D S, Lambert C, *et al*. Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides [J]. Forensic Sci Int, 2003, 137(1): 28-36.

[7] Budimlija Z M, Lechpammer M, Popiolek D, *et al*. Forensic applications of laser capture microdissection: use in DNA-based parentage testing and platform validation[J]. Croat Med J, 2005, 46 (4): 549-555.

[8] Bauer M, Thalheimer A, Patzelt D. Paternity testing after pregnancy termination using laser microdissection of chorionic villi[J]. Int J Legal Med, 2002, 116(1): 39-42.

[9] Robino C, Barilaro M R, Gino S, *et al*. Incestuous paternity detected by STR-typing of chorionic villi isolated from archival formalin-fixed paraffin-embedded abortion material using laser microdissection[J]. J Forensic Sci, 2006, 51(1): 90-92.

[10] Reshef A, Barash M, Voskoboinik L, *et al*. STR typing of formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) aborted foetal tissue in criminal paternity cases[J]. Sci Justice, 2011, 51(1): 19-23.

[11] Jakovski Z, Jankova R, Nikolova K, *et al*. Forensic DNA expertise of incest in early period of pregnancy[J]. J Forensic Leg Med, 2011, 18(1): 34-37.

[12] Li C, Qi B, Ji A, *et al*. The Combination of single cell micromanipulation with LV-PCR system and its application in forensic science[J]. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2009, 2 (1): 516-517.

[13] Gilbert M P, Haselkorn T, Bunce M, *et al*. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues—which methods are useful when? [J]. PLoS One, 2007, 2(6): e537.

[14] Hewitt S M, Lewis F A, Cao Y, *et al*. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue[J]. Arch Pathol Lab Med, 2008, 132(12): 1929-1935.

[15] Okello J B, Zurek J, Devault A M, *et al*. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues[J]. Anal Biochem, 2010, 400(1): 110-117.

(**收稿**:2012-03-14;**修回**:2012-04-24)

(编辑 吴培红)