法医病理学 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003672

应用不同DNA提取试剂盒对溺死硅藻检验后续分析的影响

哈 山[1]，王 博[2]，蔡 杰[2]，徐玉钊[3]，陈建华[3]，邓建强[3]

（1.海南医科大学公共卫生学院，海口 571199；2.海南政法职业学院海南公平司法鉴定中心，海口 571199；3.海南医科大学基础医学与生命科学学院，海南省热带法医学司法鉴定工程研究中心，海南省院士工作站/热带法医学，海口 571199）

【摘 要】目的：研究不同DNA提取试剂盒对水中溺死尸体器官组织中硅藻的分子生物学检测后续分析的影响。**方法：**本研究选取经案件侦查、病理学检验，并在电子显微镜下进行硅藻形态学检验确认为溺水死亡的组织及水样，本研究选择了4种不同原理的DNA提取试剂盒，从该死者的肺、肝、脾、肾组织及水样中提取DNA。首先，本研究测量了4种试剂盒提取产品的核酸含量和测定260 nm和280 nm下吸光度（absorbance，A）值，以评估DNA提取的质量；其次，使用真核18S rDNA V4区域通用引物对提取的产物进行高通量测序，以比较不同DNA提取试剂盒提取的硅藻种类和数量；第三，应用硅藻特异性引物对不同的目的基因进行聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）扩增，以显示不同试剂盒提取不同来源DNA的效果。**结果：**水样和组织的硅藻形态学检验共鉴定出19属硅藻。4种DNA提取试剂盒的提取产物$A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$均低于1.8，PowerSoil试剂盒的相对DNA含量高于其他试剂盒，最低的是BioTeKe试剂盒。高通量测序显示共有49种硅藻，不同试剂盒提取的硅藻DNA的质量和数量不同，不同试剂盒获得的硅藻物种丰富度和优势种群也不同，在4种试剂盒中，PowerSoil试剂盒在水样中提取的硅藻最多，TIANGEN试剂盒从水样中提取的硅藻种类最多，有38种。电泳结果表明，不同试剂盒对提取产物的扩增效果不同，同一试剂盒对不同的样本和不同的目标基因也有不同的扩增效果。**结论：**不同原理的试剂盒对后续硅藻分子学水平分析也存在不同效果，在法医学实践中应根据后续分析需求选择最适合的DNA提取试剂盒。

【关键词】DNA提取；溺水；硅藻；高通量测序

【中图分类号】R114 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2024-08-19

Influence of different DNA extraction kits on subsequent diatom analysis in forensic cases of drowning

Ha Shan[1], Wang Bo[2], Cai Jie[2], Xu Yuzhao[3], Chen Jianhua[3], Deng Jianqiang[3]

(1. School of Public Health, Hainan Medical University; 2. Hainan Gongping Forensic Center, Hainan Vocational College of Political Science and Law; 3. Hainan Provincial Tropical Forensic Engineering Research Center and Hainan Provincial Academician Workstation, Tropical Forensic Medicine, School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of different DNA extraction kits on the subsequent molecular biological analysis of diatom from the organs and tissues of drowned corpses. ***Methods*:** This study was conducted using the tissue and water samples confirmed as drowning deaths through case investigation, pathological examination, and morphological examination of diatom under an electron microscope, and four DNA extraction kits with different principles were used to extract DNA from the lung, liver, spleen, and kidney tissues of the deceased and from the water samples from drowning location. Firstly, the products extracted by the four kits were measured in terms of nucleic acid content and A_{260nm}/A_{280nm} value to evaluate the quality of DNA extraction; secondly, eukaryotic 18S rDNA V4 universal primers were used to perform high-throughput sequencing of the extracted products, and the results were used to compare the species and numbers of diatoms extracted by different DNA extraction kits; thirdly, PCR amplification was performed for different objective genes using diatom-specific primers to show the effect of DNA from different sources extracted by different kits. ***Results*:** A total of 19 genera of diatoms were identified based on the morphological analysis of water and tissue samples. The OD260/OD280 value was lower than 1.8 for the products extracted by all

作者介绍：哈 山，Email：1186527967@qq.com，研究方向：公共卫生环境与健康研究。

通信作者：邓建强，Email：forensicpatho@163.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：82060341，81560304）；海南省院士创新平台科研资助项目（编号：YSPTZX202134）；海南医学院研究生创新科研课题资助项目（编号：Qhys2023-444）。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241226.1541.012（2024-12-27）

four DNA kits; the PowerSoil kit showed a higher relative content of DNA than the other kits, while BioTeKe kit showed the lowest relative content of DNA. A total of 49 diatom species were obtained by high-throughput sequencing, and there were differences in the quality and quantity of diatom DNA extracted by different kits and the abundance and dominant species of diatom obtained by different kits. Among the four kits, PowerSoil kit obtained the highest relative abundance of diatom species in water samples, and TIANGEN kit obtained 38 species of diatom from water samples, which was significantly higher than the number of species obtained by the other kits. The results of electrophoresis showed that different kits had different amplification effects on the extracted products, and the same kit also had different amplification effects on different samples and different objective genes. ***Conclusion***: The kits with different principles of DNA extraction have different effects on subsequent molecular biological analysis of diatom, and in forensic practice, the most suitable DNA extraction kit should be selected according to the needs of subsequent analysis.

【Key words】DNA extraction; drowning; diatom; high-throughput sequencing

硅藻检验已被广泛用于鉴别水中尸体是否因溺水死亡[1-2]。硅藻检验方法主要分2种，即形态学方法和分子生物学方法，形态学检查虽直观，但其结果可能受到生物发育阶段和遗传变异的影响，且硅藻种类极多，专业分类生物学家稀缺，进一步限制了形态学方法的应用[3]。而硅藻分子生物学检测方法无需硝酸消化，省时环保，分类也不依赖于形态特征，因此，硅藻分子生物学检测具有较高的灵敏度、特异性和检出率。近年来，高通量测序的快速发展更使硅藻研究中的检测、分类及后续分析变得更加容易[4]。但在硅藻分子检测中，成功提取硅藻DNA是所有分析的基础。然而，由于硅藻的特殊结构——细胞被含有二氧化硅的细胞壁覆盖，致使硅藻的硅质硬壳不能被普通的DNA提取试剂盒破坏，在没有物理撞击的情况下较难破坏细胞壁，因此，从硅藻中提取DNA相对困难[5]。同时，硅藻DNA提取会受到人体组织的干扰，这使得水中尸体硅藻DNA提取比其他样本更困难[1]。在目前的法医实践中，市场上没有用于硅藻DNA提取的专用试剂盒，根据已发表的文献，多选用土壤DNA提取试剂盒提取硅藻DNA，土壤DNA提取试剂盒已成为相关法医学研究中硅藻DNA检测的标准技术方案[6-9]，而一些实验使用了植物或血液DNA提取试剂盒[10]。那么，不同的DNA提取试剂盒会影响分子生物学后续研究并导致结果差异吗？

本研究通过现场调查和法医尸检确定其溺死于河中，选取不同器官组织，同时收集了溺死处水样。本研究使用扫描电镜来确定组织和水样中是否有硅藻，再次验证死者因溺水死亡，并应用形态学方法确定样品中的硅藻种类。本研究选择了4种常用于硅藻分子检测但基于不同技术原理的DNA提取试剂盒，包括1种土壤DNA提取试剂盒、2种植物DNA提取试剂盒和一种血液DNA提取试剂盒，应用玻璃珠-涡旋振荡法来提高DNA提取试剂盒的效率[11]，同时避免因物理击打效果不足导致提取结果的差异。为了评估4种不同原理的DNA试剂盒获得的提取物是否会影响后续的分子实验，首先，通过分别测量DNA浓度和DNA纯度评价不同试剂盒的DNA提取效率：测定4种试剂盒提取产物的总DNA浓度，测定260 nm和280 nm下吸光度（absorbance，A）值（$A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$）以获得提取DNA的纯度。其次，通过高通量测序获得不同试剂盒提取的硅藻物种丰富度。第三，通过PCR扩增硅藻特异性产物，以阐明不同试剂盒提取硅藻核DNA、线粒体DNA和叶绿体DNA的效率和产量。以上结果可以为溺水案件中的硅藻分子检验提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 选取溺死者的组织及溺水现场采集的水样。在尸检过程中，仔细收集肺、肝、肾和脾等组织材料，严格避免污染。

1.1.2 仪器和试剂 MIX-30S迷你混合仪（杭州米欧仪器有限公司）、SCILOGEX D3024离心机（美国SCILOGEX有限公司）、Qubit4.0荧光定量仪（赛默飞世尔科学有限公司），Heme 9600基因扩增仪（珠海黑马医学仪器有限公司），BG-subMIDI电泳仪（北京百晶生物技术有限公司），Tanon 3500R凝胶成像仪（上海天能科技有限公司），VEGA3扫描电子显微镜（捷克TESCAN有限公司）。引物由北京中美泰和生物科技有限公司合成。

德国QIAGEN的DNeasy®Power Soil®PRO试剂盒（以下简称“Power Soil试剂盒”）；北京天根生化科技有限公司TIANGEN DNAsecure Plant新型植物基因组DNA提取试剂

盒（以下简称“TIANGEN试剂盒”）；成都福际生物技术有限公司的FOREGENE® Plant DNA Isolation试剂盒（以下简称“FOREGENE试剂盒”）；北京百泰克生物技术有限公司的BioTeKe®全血基因组DNA提取试剂盒（以下简称“BioTeKe试剂盒”）。

1.2 扫描电镜法的硅藻形态学检测

按照中华人民共和国公共安全行业标准《GA/T1662-2019法庭科学硅藻检验技术规范 微波消解-真空抽滤-显微镜法》进行硅藻形态学检验。将每个器官的10 g人体组织（肝、肺、肾和脾）切成薄片及10 mL水样，微波消解后抽滤烘干、喷金镀膜，采用VEGA3扫描电子显微镜对水中硅藻进行定性定量分析，参照硅藻分类相关专业书籍对采集水样中的硅藻种属进行鉴定识别。

1.3 高通量测序法的硅藻分子生物学检测

1.3.1 硅藻DNA的提取 样品制备：取肺、肝、肾、脾组织0.5 g，充分剪碎。将10 mL水样以13 400 g直接离心5 min，弃去上清液，留置底部液体200 μL。随后在全部水样及组织样品中分别加入0.35 g 2种尺寸的玻璃珠——大玻璃珠的直径为1.5~2.0 mm，小玻璃珠为0.4~0.6 mm，并以最大速度进行涡旋振荡4 min。4种试剂盒提取DNA的原理和步骤（图1）。

DNA提取：严格按照4种DNA提取试剂盒提供的操作说明书[12-15]，分别对水样及组织进行DNA提取。每种试剂盒分别对水、肺、肝、肾、脾5个样本的DNA进行提取。应用酶标仪测定$A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$值和核酸浓度，比较DNA纯度。用Qubit Assay Protocol确定DNA的总浓度，计算DNA在总核酸中所占的比例[c（DNA）/c（核酸）]。

1.3.2 高通量测序 应用4种不同的DNA提取试剂盒提取DNA后，将提取产物进行PCR扩增，选取18S rDNA V4区域引物扩增提取物，加入Phusion High-Fidelity PCR Master Mix和引物进行扩增；每一种扩增产物用Gene Tool Analysis Software上进行浓度对比，按等质量原则计算所需体积后将扩增产物混匀；用E. Z. N. A® Gel Extraction Kit凝胶回收试剂盒回收PCR混合产物；依据NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®标准流程构建文库。在TAG序列用于样品鉴别后，合格的文库使用Illumina Hiseq2500高通量测序平台进行测序。测序得到的原始数据，截去Barcode和引物序列后使用FLASH软件对样本的reads进行拼接，得到RAW Tags，使用fastp软件进行质控，得到高质量的Clean Tags。最后使用Usearch软件将Clean Tags与数据库进行比对以检测嵌合体并进行去除，从而得到最终的Effective Tags即有效数据。对以上得到的Effective Tags，使用QIIME2软件中的DADA2模块进行降噪，并过滤掉丰度<5的序列[16]，从而获得最终的特征序列（Amplicon Sequence Variants，

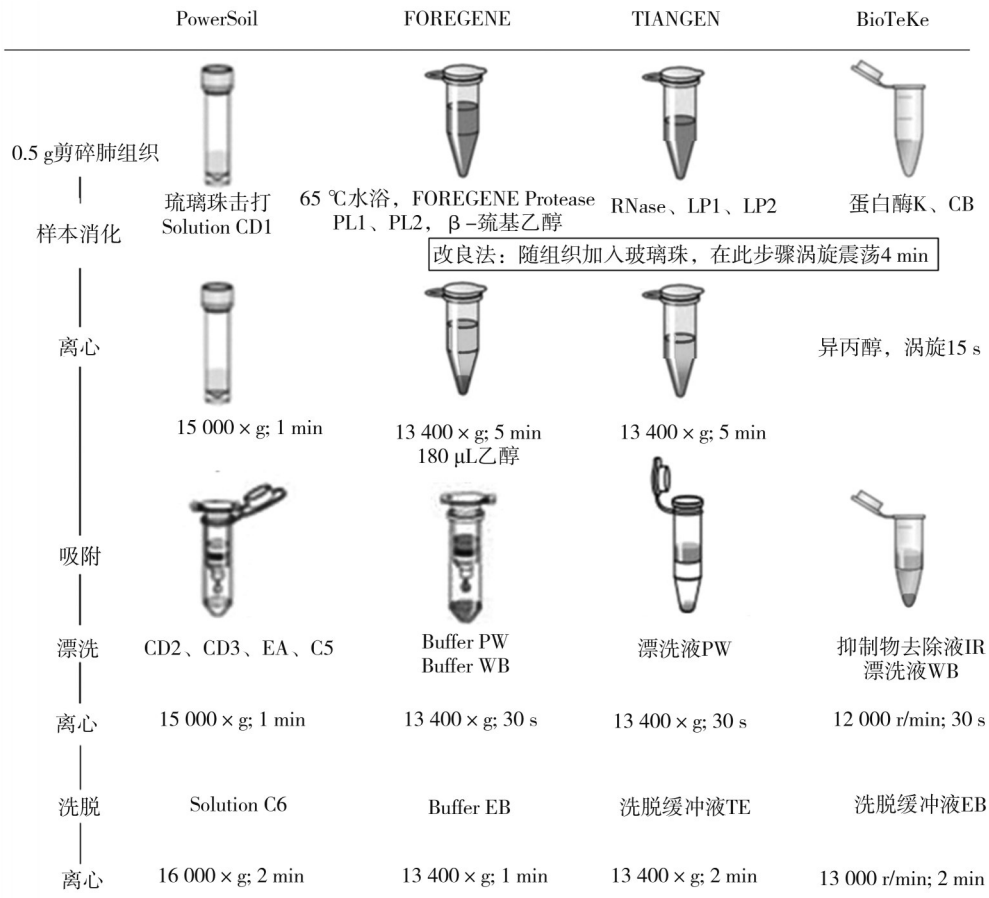


图1 4种试剂盒提取DNA的原理和步骤

ASVs）。采用QIIME2的classify-sklearn算法对每个ASV使用预先训练好的Naive Bayes分类器进行物种注释[17-18]。结合不同试剂盒提取的不同样品，得出硅藻种类的相对丰度和硅藻数量。

1.3.3 扩增不同来源的硅藻DNA 考虑到样品中硅藻DNA含量较少，因此使用PCR对硅藻DNA进行扩增。应用BLAST对引物的硅藻特异性进行检验，同时排除该引物扩增人类基因组的可能。选择能特异性扩增不同来源的硅藻DNA引物：核DNA引物D512/D978，线粒体DNA引物DiamF3/KFdtmR，叶绿体DNA引物UPA159-R/UPA159-F。对4个试剂盒的20个提取物进行PCR扩增，以确定DNA提取产物中是否含有硅藻DNA。具体引物信息如表1所示。

选择了可以特异性扩增不同来源硅藻DNA的引物，核DNA引物D512和D978，线粒体DNA引物DiamF3和KFdtmR，叶绿体DNA引物UPA159-R和UPA159-F。引物的详细信息，见表1。

PCR反应总体积为25 μL。包括：模板DNA 2 μL，正向和反向引物（10 μmol/L）各0.5 μL，ddH_2O 17.75 μL，10×buffer 2.5 μL，dNTP 0.5 μL，Taq酶1.25 μL。所有引物扩增条件如下。

D512/D978扩增条件：94 ℃ 10 min；94 ℃ 45 s，50 ℃ 45 s，72 ℃ 60 s，40个循环；72 ℃ 10 min。

UPA159F/R扩增条件：94 ℃ 10 min；94 ℃ 40 s，51 ℃ 30 s，72 ℃ 40 s，35个循环；72 ℃ 10 min。

DiamF3/KEdtmR扩增条件：94 ℃ 4 min；94 ℃ 30 s，45 ℃ 60 s，70 ℃ 60 s，35个循环；72 ℃ 7 min。

所有样品的PCR扩增产物通过2%琼脂糖凝胶进行电泳，电泳后Goldview显色，在Tanon 3500R凝胶成像仪下进行观察和分析。

2 结 果

2.1 水体及器官中硅藻的电镜观察结果

电镜下观察共5个样品，1个水样和4个不同器官组织样品中均含有硅藻，共有19种硅藻，其中，水样中可见17种硅藻，肺中可见17种硅藻，在其他组织中仅能观察到少数几种，且硅藻含量低。脾脏中的8种硅藻在所有样品中均存在。肺中硅藻的含量远高于其他组织，10 g肺组织样本中有770 168个硅藻。5个样品中硅藻的详细种类和数量见表2。图2为不同样品中部分硅藻的电镜照片。

2.2 各试剂盒提取的DNA总浓度和质量

肝组织核酸含量在各试剂盒所提取产物中均表现为最高；水样中DNA的总浓度低于组织。PowerSoil试剂盒和BioTeKe试剂盒提取的水样DNA浓度低于检测线（0.5 ng/mL），无法检测出浓度值；在所有样品中，BioTeKe试剂盒提取的DNA浓度低于其他试剂盒；所有样品的$A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$数据均低于1.8，其中PowerSoil试剂盒提取的水样$A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$数值最高为1.698，FOREGENE试剂盒提取的肾脏数值最低为0.595。因此本研究计算DNA在总核酸中的比例[c（DNA）/c（核酸）]，PowerSoil试剂盒的相对DNA含量高于其他试剂盒，BioTeKe试剂盒最低。所有数据如表3所示。

2.3 各试剂盒提取的硅藻物种的相对丰度

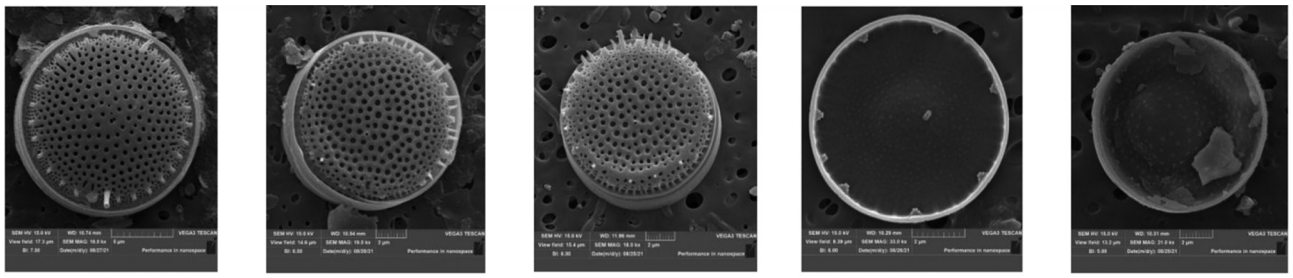
根据高通量测序结果分析，对比数据库中的已知序列，4个试剂盒提取的硅藻DNA来自3纲4目6科33属49种。其中，Power Soil试剂盒可以从水样中的30种硅藻中提取出6 170个硅藻DNA的ASV，相对丰度最高，其中2 239个硅藻为弧眼藻属。TIANGEN试剂盒可提取水样中最多38种硅藻DNA。BioTeKe试剂盒可从肾脏样本中的7种硅藻中提取

表1 引物详细信息

引物	序列（5′->3′）	目的基因	扩增长度（bp）	Tm（℃）	参考文献
D512	ATTCCAGCTCCAATAGCG	18s rDNA	390～410	50	Zimmermann J等[19]
D978	GACTACGATGGTATCTAATC				
DiamF3	CCAACCAYAAAGATATWGGWAC	COI-5P	665	45	Evans KM[20]
KEdtmR	AAACTTCWGGRTGACCAAAAA				
UPA159-F	CAGTGAGATACCCTTGTAATGTT	UPA	159	51	徐曲毅[21]
UPA159-R	TCTAGATACGATTTCTAACCGATAAGA				

表2 电镜观察硅藻结果

样品	硅藻种类	硅藻物种数	硅藻含量
水	菱形藻、卵形藻、桥弯藻、曲壳藻、小环藻、圆筛藻、针杆藻、舟形藻、双眉藻、双壁藻、布纹藻、盘杆藻、奇异硅杆藻、双菱藻、鱼鳞藻、直链藻、角毛藻	17	65 309/10 mL
肺	菱形藻、卵形藻、桥弯藻、曲壳藻、小环藻、圆筛藻、针杆藻、舟形藻、双眉藻、双壁藻、布纹藻、盘杆藻、奇异硅杆藻、双菱藻、鱼鳞藻、辐杆藻、骨条藻	17	770 168/10 g
肝	菱形藻、卵形藻、桥弯藻、曲壳藻、小环藻、圆筛藻、针杆藻、舟形藻、双眉藻、双壁藻	10	312/10 g
脾	菱形藻、卵形藻、桥弯藻、曲壳藻、小环藻、圆筛藻、针杆藻、舟形藻、直链藻	8	312/10 g
肾	菱形藻、卵形藻、桥弯藻、曲壳藻、小环藻、圆筛藻、针杆藻、舟形藻、双眉藻、直链藻	9	175/10 g


水样中圆筛藻　肺组织中圆筛藻　肝组织中圆筛藻　脾组织中圆筛藻　肾组织中圆筛藻


水样中布纹藻　肺组织中辐杆藻　肝组织中双壁藻　脾组织中双眉藻　肾组织中针杆藻

图2　不同样品中部分硅藻的电镜照片

表3　不同试剂盒提取的DNA浓度和DNA纯度

样品	试剂盒	核酸含量(ng/mL)	DNA含量(ng/mL)	c(DNA)/c(核酸)	$A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$
水	Power Soil	4 672	a	a	1.189
	BioTeKe	497	a	a	1.273
	TIANGEN	8 549	125	1.462%	1.244
	FOREGENE	3 181	123	3.867%	1.238
肺	Power Soil	3 916	2 501	63.866%	1.698
	BioTeKe	8 434	98	1.162%	1.218
	TIANGEN	18 072	1 930	10.680%	1.120
	FOREGENE	2 410	237	9.834%	1.449
肝	Power Soil	8 954	4 316	48.202%	1.431
	BioTeKe	12 877	83	0.645%	0.772
	TIANGEN	23 239	690	2.969%	1.229
	FOREGENE	114 286	1 268	1.109%	1.076
脾	Power Soil	1 918	201	10.480%	1.540
	BioTeKe	11 001	113	1.027%	1.195
	TIANGEN	19 580	1116	5.700%	1.090
	FOREGENE	2 321	31	1.336%	1.392
肾	Power Soil	1807	287	15.883%	1.171
	BioTeKe	18 976	30	0.158%	0.738
	TIANGEN	10 442	636	6.091%	1.003
	FOREGENE	8 133	38.5	0.473%	0.595

注：**a.**DNA浓度低于检测线（0.5 ng/mL）

出3 019个硅藻DNA的ASVs，其中骨条藻属的硅藻有2 830个。BioTeKe提取的肝、肺、脾样本中弧眼藻属分别为1 561个、1 209个和571个，硅藻的物种丰富度排名第3至第5。4种DNA试剂盒所提取的硅藻种类最多的是弧眼藻属，其他含量较高的硅藻有骨条藻、直链藻、舟形藻。弧眼藻也是肺和肝中最多的物种（表4）。图3所示，按照4个试剂盒所提取的不同样本的硅藻总数排列，同时显示优势种硅藻的数量及不同试剂盒提取的硅藻物种数。

2.4　不同试剂盒应用不同区域引物扩增及电泳结果

用引物D512/D978扩增硅藻18S rDNA时，在所有样品中，4种试剂盒提取的扩增产物均出现条带，条带长度在250~400 bp。Power Soil试剂盒，所提取的肾脏中硅藻DNA的扩增产物电泳条带比其他条带更暗（图4A）。BioTeKe试剂盒提取物的整体电泳条带均有显示但较暗（图4B）。

FORGENE 试剂盒提取的水样中硅藻 DNA 的电泳条带明显亮于其他组织的条带（图 4C）。TIANGEN 剂盒提取的肝和肾组织中硅藻 DNA 扩增条带稍暗（图 4D）。

使用引物 DiamF3/KEdtmR 扩增线粒体 COI-5P 区域的硅藻 DNA 时，所有电泳条带均可见，条带长度在 500~750 bp。但所有组织的扩增产物电泳条带均比水样亮，BioTeKe 提取的水样中硅藻 DNA 的电泳条带最暗（图 5）。

使用引物 UPA159F/UPA159R 扩增叶绿体 UPA 区域的

表 4　4 种试剂盒的物种丰富度

样品	试剂盒	硅藻数量	物种数	最多物种	最多物种数量
水	Power Soil	6 170	30	Arcocellulus	2 239
	TIANGEN	5 716	38	Melosira	2 025
	FOREGENE	1 364	15	Navicula	674
	BioTeKe	691	16	Arcocellulus	336
肺	BioTeKe	1 449	23	Arcocellulus	1 209
	Power Soil	1 197	19	Arcocellulus	1 011
	TIANGEN	442	16	Arcocellulus	236
	FOREGENE	21	5	Arcocellulus	10
肝	BioTeKe	1 809	20	Arcocellulus	1 561
	Power Soil	699	17	Arcocellulus	525
	TIANGEN	225	11	Arcocellulus	162
	FOREGENE	164	19	Arcocellulus	26
脾	BioTeKe	661	15	Arcocellulus	571
	FOREGENE	510	15	Arcocellulus	397
	Power Soil	379	10	Arcocellulus	221
	TIANGEN	59	10	Navicula	15
肾	BioTeKe	3 091	7	Skeletonema	2 830
	Power Soil	379	26	Arcocellulus	208
	FOREGENE	106	12	Cyclotella	16
	TIANGEN	49	6	Arcocellulus	20

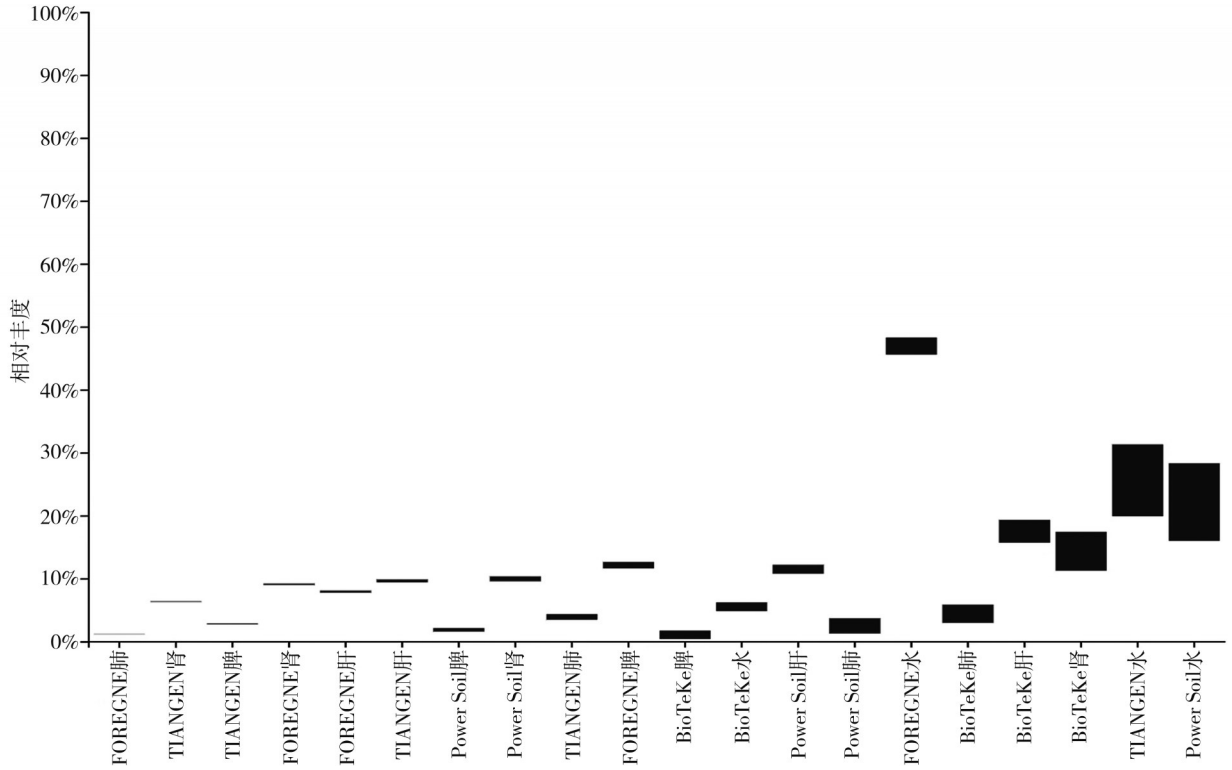
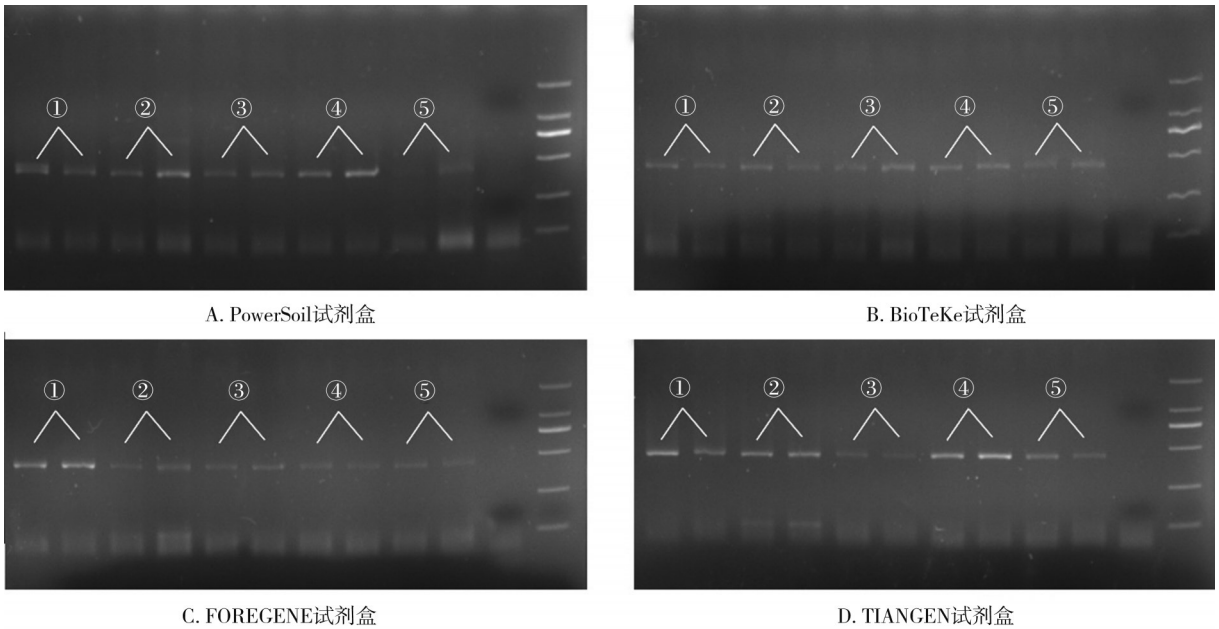


图 3　不同试剂盒从不同样品中提取的硅藻种类的相对丰度从少到多

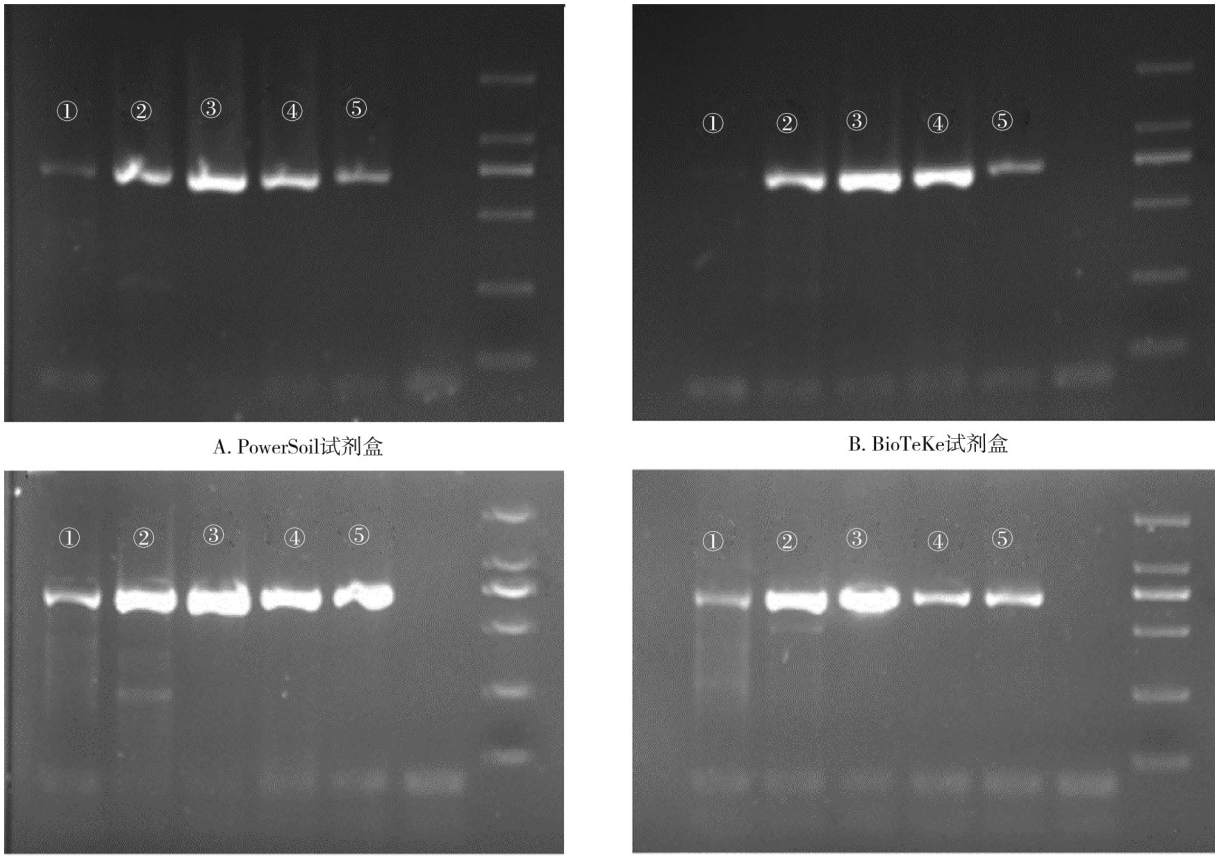


A. PowerSoil试剂盒　　B. BioTeKe试剂盒

C. FOREGENE试剂盒　　D. TIANGEN试剂盒

注：①水样；②肺组织；③肝组织；④脾组织；⑤肾组织

图4　不同试剂盒提取的硅藻DNA应用引物D512/D978进行PCR扩增的电泳图



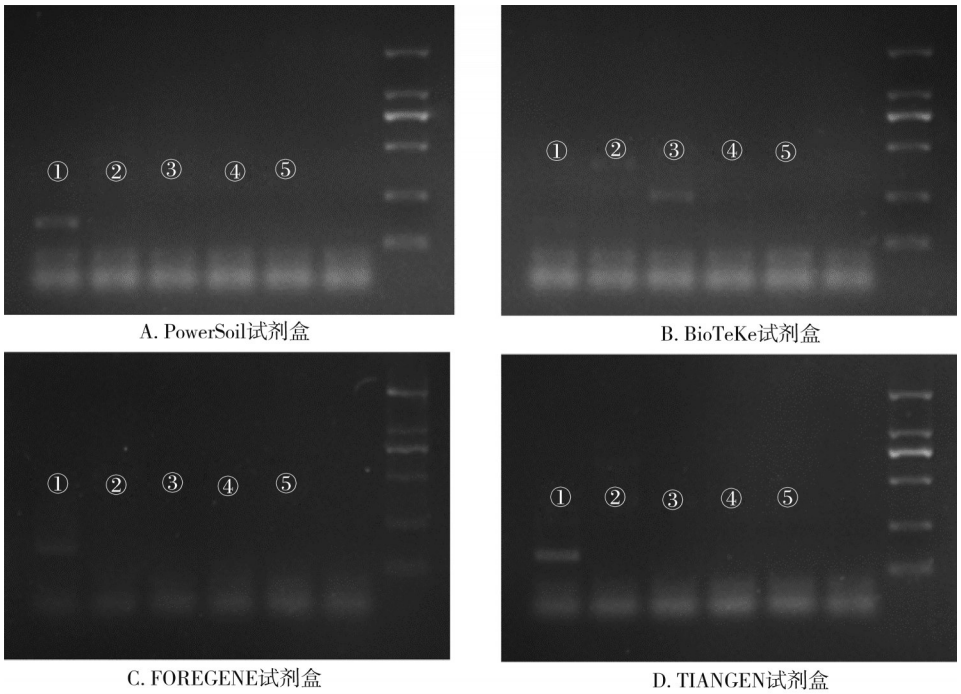
A. PowerSoil试剂盒　　B. BioTeKe试剂盒

C. FOREGENE试剂盒　　D. TIANGEN试剂盒

注：①水样；②肺组织；③肝组织；④脾组织；⑤肾组织

图5　不同试剂盒提取的硅藻DNA应用引物DiamF3/KEdtmR进行PCR扩增的电泳图

硅藻DNA时，只有水样的扩增产物电泳条带可见，且正确的长度位于100~200 bp。BioTeKe试剂盒提取的水样中硅藻DNA条带暗于其他条带。UPA159F/UPA159R扩增产物电泳条带均比其他目的基因引物扩增的条带暗（图6）。



A. PowerSoil试剂盒　B. BioTeKe试剂盒

C. FOREGENE试剂盒　D. TIANGEN试剂盒

注：①水样；②肺组织；③肝组织；④脾组织；⑤肾组织

图6　不同试剂盒提取的硅藻DNA应用引物UPA159F/UPA159R进行PCR扩增的电泳图

3　讨　论

在硅藻检验中，分子生物学方法的优势不言而喻，安全、环保、快速、准确，且结果更客观。在本研究中，高通量测序法在物种鉴定的精确度上明显优于扫描电镜法，扫描电镜法仅在属水平上进行分类，检测出19属硅藻，且每属硅藻的数量是通过公式换算进行的估算；通过高通量测序则检验出33属49种的硅藻，远多于扫描电镜的结果，每一种硅藻的数量是根据测序的DNA数量进行计数。

扫描电镜法在水样中检测到17种硅藻，在肺组织中检测到2种未发现的硅藻，这可能是因为水中这两种硅藻的含量较低，伴随肺的硅藻富集作用而在肺中被发现；同时，电子显微镜的视野范围非常有限，一些硅藻可能在肉眼观察中无法被准确发现[22]，同时，形态学检验依赖于硅藻外壳的完整性，这也可能是电子显微镜结果低于高通量测序结果的原因。但分析高通量测序的结果中，水样中硅藻的数量及物种均高于其他组织，且水样中的硅藻物种均涵盖各组织中的硅藻物种。

然而，高通量测序的结果对数据库有很强的依赖性。目前，高通量测序技术用于法医硅藻检验和分类的参考数据库并不完整，数据库中硅藻物种的全面覆盖尚未实现。藻类的分类也存在一些错误，这可能会导致不正确的分类结果[23]。虽然扫描电镜的检测结果具有很高的可靠性，但检测时间较长、样本需求量大，检测灵敏度低于高通量测序，同时，扫描电镜法要求硅藻外壳完整，微波消解法可能一定程度上会破坏硅藻的外壳，这也可能是电子显微镜结果低于高通量测序结果的原因[24]。然而，它们都不能进行完全准确的定量分析。电子显微镜的含量可以通过随机选择视野来计算，而高通量测序仍旧依赖于对全部的硅藻DNA进行提取，但可以保证提取比例的一致性[25]。这需要科学技术的不断发展来解决更精确的定量问题[26]。

在硅藻相关领域的研究中，研究主要针对水样和底栖硅藻样品的检测展开，因此硅藻DNA提取的主要方法是使用为植物或土壤样品开发的商业化试剂盒。在法医学中涉及溺水的硅藻检测中，不仅需要检测水样和肺组织，还需要从肝、脾、肾等组织中提取硅藻DNA。然而，到目前为止，还没有对不同原理试剂盒从法医溺水样本中提取硅藻DNA的效果进行比较研究。

本研究选择了4种具有不同原理的DNA提取试剂盒，在4种试剂盒中，Power Soil试剂盒使用物理击打和化学裂解法提取DNA；BioTeKe试剂盒使用蛋白酶K消化蛋白质；FOREGENE试剂盒使用专

利蛋白酶消化；TIANGEN 剂盒 DNA 提取采用非蛋白酶法提取植物 DNA，以上试剂盒部分专利试剂保密，更为详细的原理本研究也无法得知。由于硅藻的硅质外壳，通过物理击打破坏硅藻细胞壁更有利于 DNA 释放，也为排除因 PowerSoil 试剂盒由于物理击打效果较好的可能，在之前的研究中，本研究应用玻璃珠-涡旋振荡法对不同试剂盒进行改良，提取硅藻 DNA 均取得了良好的效果[11]。应用改良法后，本研究一方面需研究不同组织中是否因硅藻浓度不同而影响分子检验效果，另一方面不同原理 DNA 提取试剂盒是否影响后续硅藻分子学分析仍需进行比较研究。另外，市面上有多种 DNA 提取试剂盒，本实验的 4 个试剂盒并不能代表所有试剂盒，但选取了基于 4 种不同裂解原理的试剂盒作为实验对象。

根据 $A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$ 值可以判断 DNA 纯度，但本实验中所有的结果均低于 1.8，可能因为所提取的样品中含有蛋白质、酚类等物质。核酸含量和 DNA 浓度也不代表硅藻的数量，核酸含量包括 DNA 和 RNA，DNA 浓度包括所有生物的 DNA，但 DNA 在总核酸中的比例能表明不同 DNA 试剂盒纯化 DNA 的效能，至少展示了去除 RNA 的能力。此外，DNA 浓度也不会完全影响扩增效果，理论上 PCR 仅需一个基因组即可完成扩增[27]。因此本研究能确认的是所有试剂盒提取的 DNA 都与 RNA、蛋白质或其他物质混合，而许多研究表明手提法结合试剂盒法可以提高 DNA 纯度。

通过高通量测序计算提取硅藻的相对丰度，可发现 4 种试剂盒从水样中提取硅藻的相对丰度通常高于组织，肺组织中硅藻的相对丰度也远高于其他组织，主要原因是硅藻在水体中和肺中种类较多。一方面因为溺水时，溺水者在溺水过程中的剧烈呼吸使水由呼吸作用直接进入肺部；另一方面，硅藻通过血液循环进入其他器官，有些硅藻的直径比血管大，造成硅藻在肺内富集，数量及种类均较高[28]。但本研究也无法将水样和组织样本进行比较，因为它们检测的单位量不同。通过血液 DNA 提取试剂盒从组织中提取硅藻物种的相对丰度高于其他试剂盒。这种现象的可能原因还是 BioTeKe 试剂盒基于蛋白酶 K 具有很强的消化组织的能力[29]。

扩增产物电泳结果也反映了硅藻的物种丰富度，但不能在提取物中直接表示硅藻 DNA 含量，其中一个原因是 PCR 的优势扩增，不同的硅藻对不同的引物可能有不同的扩增效果[30]。目前尚不能解决混合物的 DNA 定量问题。在此研究中，本研究选择了细胞核、线粒体和叶绿体不同区域的引物，它们在扩增结果上展示了较大的差距。（1）使用相同 DNA 提取试剂盒时，细胞核和线粒体引物在所有样本中均有扩增条带，但叶绿体引物仅扩增出水样中硅藻 DNA，一个原因是叶绿体 DNA 总量少于细胞核和线粒体 DNA 总量；另一个原因可能是没有立即发现尸体，即硅藻已经进入组织一段时间，因此叶绿体（包括叶绿体 DNA）在没有光线的情况下会发生降解，且 DNA 提取时间更晚于尸体发现时间。因此，在应用叶绿体的引物对硅藻 DNA 进行扩增时，必须考虑叶绿体降解的因素，较晚发现的尸体最好选择细胞核线粒体引物进行 PCR 扩增，不应选用叶绿体 DNA 的引物。通过玻璃珠-涡旋振荡法改进的所有 4 种试剂盒提取产物可用于 PCR 扩增。（2）在不同的试剂盒中，BioTeKe 提取产物中，水样的硅藻 DNA 扩增产物电泳条带亮度略低于其他试剂盒，但是组织中硅藻 DNA 扩增产物的电泳条带亮度差距不大，这一结果与高通量测序的结果是一致的。在高通量测序的分析结果中，具有不同原理的不同试剂盒可能对特定硅藻具有更好的提取效果。例如，一些硅藻的细胞壁上有孔，而另一些则没有，这导致蛋白酶 K 不能进入所有硅藻壳进行消化裂解[24]。PowerSoil 试剂盒在每个样本中提取最多的硅藻均是 Arcocellus，这可能因为河流中 Arcocellulus 的含量最初比其他硅藻多，而一些硅藻的直径小于血管直径，这些硅藻更容易进入器官并在器官中富集。

本研究只选择了 1 个案例来研究从不同试剂盒中提取硅藻 DNA 的差异，因其目的不是研究溺死样本间的差异性，而是研究不同 DNA 提取试剂盒对法医学硅藻 DNA 提取的影响，并且通过 DNA 提取的基本原理可以合理化差异，保证了结果的一致性和可比较性，虽这种差异是否普遍仍具有一定风险，特别是物种丰度低的硅藻，提取时也可能未被抓取，导致结果的区别，但这种风险的影响较小，对优势物种的影响不大；另外，对于不同水域发生的溺死，即硅藻群落结构发生变化，特别是对基于蛋白酶 K 消化的 DNA 提取试剂盒影响也许会较大，是否具有相同的结果也是下一步继续研究的内容。因此，在后续研究中需增加溺死模型及样本量进行多次重复实验。

综上所述，应根据后续分析的需求，合理选用不同原理的 DNA 提取试剂盒对硅藻样本进行分子

生物学检验，也期待硅藻专用DNA提取试剂盒的研发，以方便法医实践中的应用。

参 考 文 献

[1] Zhou YY, Cao YJ, Huang J, et al. Research advances in forensic diatom testing[J]. Forensic Sci Res, 2020, 5(2): 98-105.

[2] Piette MHA, De Letter EA. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis[J]. Forensic Sci Int, 2006, 163(1/2): 1-9.

[3] Sánchez C, Cristóbal G, Bueno G. Diatom identification including life cycle stages through morphological and texture descriptors[J]. Peer J, 2019, 7: e6770.

[4] Liu MY, Zhao Y, Sun YZ, et al. Comparative study on diatom morphology and molecular identification in drowning cases[J]. Forensic Sci Int, 2020, 317: 110552.

[5] 付志鑫. 长白山地区桥弯藻科（Cymbellaceae）和舟形藻科（Naviculaceae）植物的分类学研究[D]. 哈尔滨：哈尔滨师范大学，2018.
Fu ZX. Taxonomic Study on Cymbellaceae and Naviculaceae Plants in Changbai Mountain Area[D]. Harbin: Harbin Normal University, 2018.

[6] Hu D, Pi ZY, Zhang ZR, et al. Application of 18S rDNA clone library to detect diatom population diversity in Dianchi[J]. Fa Yi Xue Za Zhi, 2019, 35(4): 444-447.

[7] Han JG, Wang CB, Li XB, et al. Comparative analysis between diatom nitric acid digestion method and plankton 16S rDNA PCR method [J]. Fa Yi Xue Za Zhi, 2013, 29(5): 356-359.

[8] Xiao C, Xu QY, Li H, et al. Development and application of a multiplex PCR system for drowning diagnosis[J]. Electrophoresis, 2021, 42(11): 1270-1278.

[9] Yu ZH, Xu QY, Xiao C, et al. SYBR Green real-time qPCR method: Diagnose drowning more rapidly and accurately[J]. Forensic Sci Int, 2021, 321: 110720.

[10] Vasselon V, Domaizon I, Rimet F, et al. Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: do DNA extraction methods matter?[J]. Freshw Sci, 2017, 36(1): 162-177.

[11] 蔡 杰，王 博，胡孙林，等. 玻璃珠-涡旋振荡改良法用于硅藻DNA提取[J]. 法医学杂志，2022，38(1)：119-126.
Cai J, Wang B, Hu SL, et al. Improved glass bead-*Vortex* oscillation method for DNA extraction from diatom[J]. J Forensic Med, 2022, 38(1): 119-126.

[12] Yuan J, Li MZ, Lin SJ. An improved DNA extraction method for efficient and quantitative recovery of phytoplankton diversity in natural assemblages[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133060.

[13] 天根 DNAsecure 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书. tiangen.com/upload/file/20230423/20230423163431_79728.pdf [EB/OL]. 北京天根生化科技有限公司.
Tiangen DNAsecure New Plant Genomic DNA Extraction Kit Instruction. tiangen.com/upload/file/20230423/20230423163431_79728.pdf[EB/OL]. TIANGEN Biotech (Beijing) Co., Ltd.

[14] 福际植物基因组DNA提取试剂盒说明书[EB/OL]. (2021-07-01)[2024-05-01]. http://www.foregene.com/Uploadfiles/Files/2021-7-1/2021711447549519.pdf.
Plant DNAIsolation Kit Instruction[EB/OL]. (2021-07-01)[2024-05-01]. http://www.foregene.com/Uploadfiles/Files/2021-7-1/2021711447549519.pdf.

[15] 全血基因组DNA提取试剂盒(溶液型)[EB/OL]. (2020-06-30)[2024-06-01]. http://www.bioteke.com/product-show-aid-431.
Whole blood genomic DNA extraction kit (solution type) [EB/OL]. (2020-06-30) [2024-06-01]. http://www. bioteke. com/product-show-aid-431.

[16] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nat Methods, 2016, 13(7): 581-583.

[17] Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, et al. Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns[J]. mSystems, 2017, 2(2): e00191-e00116.

[18] Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 90.

[19] Zimmermann J, Jahn R, Gemeinholzer B. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols[J]. Org Divers Evol, 2011, 11(3): 173-192.

[20] Evans KM, Wortley AH, Mann DG. An assessment of potential diatom "barcode" genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta)[J]. Protist, 2007, 158(3): 349-364.

[21] 徐曲毅. 溺死相关浮游生物DNA检测技术研究[D]. 广州：广东工业大学，2018.
Xu QY. Study on DNA detection technology of plankton associated with drowning[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2018.

[22] Zhang PP, Kang XD, Zhang SR, et al. The length and width of diatoms in drowning cases as the evidence of diatoms penetrating the alveoli-capillary barrier[J]. Int J Legal Med, 2020, 134(3): 1037-1042.

[23] Vasselon V, Rimet F, Tapolczai K, et al. Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France)[J]. Ecol Indic, 2017, 82: 1-12.

[24] Zgłobicka I, Gluch J, Liao ZQ, et al. Insight into diatom frustule structures using various imaging techniques[J]. Sci Rep, 2021, 11: 14555.

[25] 张丁予，章婷曦，王国祥. 第二代测序技术的发展及应用[J]. 环境科学与技术，2016，39(9)：96-102.
Zhang DY, Zhang TX, Wang GX. Development and application of second-generation sequencing technology[J]. Environ Sci Technol, 2016, 39(9): 96-102.

[26] 田 李，张 颖，赵云峰. 新一代测序技术的发展和应用[J]. 生物技术通报，2015(11)：1-8.
Tian L, Zhang Y, Zhao YF. The next generation sequencing technology and its applications[J]. Biotechnol Bull, 2015(11): 1-8.

[27] Gryp T, Glorieux G, Joossens M, et al. Comparison of five assays for DNA extraction from bacterial cells in human faecal samples[J]. J Appl Microbiol, 2020, 129(2): 378-388.

[28] Research status and prospects of DNA barcoding technology in tea varieties identification[J]. Bot Res, 2021, 10(5): 734-738.

[29] Ming M, Meng XZ, Wang EY. Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms[J]. Forensic Sci Int, 2007, 170(1): 29-34.

[30] 毛启迪，杨苏文，金位栋，等. DNA条形码技术在藻类分类学中的研究现状与展望[J]. 水生态学杂志，2020，41(6)：9-18.
Mao QD, Yang SW, Jin WD, et al. Research status and prospects for DNA barcode technology in algal taxonomy[J]. J Hydroecology, 2020, 41(6): 9-18.

（责任编辑：周一青）