

Optimization of Differential Lysis Method for Mixed DNA Profiling from Vaginal Swabs

Yongyi Qian Peng Wang Xiaowei Chen Haipeng Wu Dawei Wang

Shenzhen Guangming District Forensic Science Center, Shenzhen, Guangdong, 518100, China

Abstract

This study addresses the challenge of mixed DNA profiling from a vaginal swab in a gang rape case and systematically optimizes the differential lysis method. The initial examination adopted the conventional differential lysis procedure, which only detected the mixed typing of the victim and one of the suspects, with an excessively high proportion of female components and weak typing of the suspect. Through analysis, incomplete digestion of female epithelial cells and insufficient release of sperm DNA could be the main reasons. Re-examination was performed under optimized conditions, including increasing the proteinase K reaction temperature to 56°C, extending digestion time, supplementing enzyme additions, and enhancing washing steps. These modifications successfully yielded clear mixed STR profiles of both suspects, while the profile of the victim was substantially eliminated. This study demonstrates the effectiveness of optimizing the differential lysis parameters for multi-contributor mixtures and provides a technical strategy that can be referred to in similar cases for mixed DNA profiling.

Keywords

forensic genetics; differential lysis method; mixed DNA profiling; proteinase K

混合DNA分型阴道擦拭子的差异裂解优化

钱永仪 王鹏* 陈晓威 巫海鹏 王大伟

深圳市光明区司法鉴定中心, 中国·广东 深圳 518100

摘要

本文针对一起轮奸案件中的阴道擦拭子混合DNA分型难题, 对差异裂解法进行了系统性优化。初次检验采用常规差异裂解流程, 仅检出被害人与其中一名嫌疑人的混合分型, 且女性成分占比过高, 嫌疑人分型微弱。通过分析认为女性上皮细胞消化不彻底及精子DNA释放不全应是主要原因。二次检验中优化了蛋白酶K作用温度(提升至56°C)、延长消化时间、增加酶添加频次及洗涤次数, 最终成功获得两名嫌疑人的清晰混合STR分型, 被害人分型基本消除。本研究证实了针对多人混合样本优化差异裂解参数的有效性, 为类似案件中的混合DNA分型提供了可借鉴的技术策略。

关键词

法医遗传学; 差异裂解法; 混合DNA分型; 蛋白酶K

1 引言

在强奸案各类检材中, 被害人的阴道擦拭子作为定性的关键检材, 其检出嫌疑人分型, 对强奸案的定性意义尤为重要。然而因强奸案属于两人乃至多人活动的案件, 阴道擦拭子常为两人乃至多人混合的混合检材。嫌疑人为单个男性的强奸案中, 实验员可利用精子细胞与体细胞的结构差异, 使用差异裂解法进行检验。而在轮奸案或者被害人在案发前后数日内有过性行为的强奸案中, 常规提取的阴道擦拭子常

检出三人以上混合分型。针对此类情况, 需要实验员严谨初次检验结果, 视检材条件对二次实验相关参数进行针对性调整, 以过滤女性被害人分型背景, 得到男性嫌疑人混合分型。

2 简要案情

2.1 简要警情

2024年12月, 某派出所接被害人阮某报警, 称其于酒店房间内被两名男子陈某和何某轮奸, 已提取被害人、嫌疑人样本及相关检材进行比对鉴定。

2.2 相关笔录要点

被害人阮某称, 其与两名嫌疑人发生性关系时间间隔极短, 并且发生关系时均未戴避孕套, 且都存在阴道内射精行为。嫌疑人均不承认与被害人发生过性关系。

【作者简介】钱永仪(1999-), 女, 中国江西上饶人, 硕士, 初级司法鉴定人, 从事DNA检验鉴定研究。

【通讯作者】王鹏(1991-), 男, 中国安徽芜湖人, 本科, 副高级警务任职资格, 从事法医物证研究。

3 样本初次检验

3.1 检材

依据口供，提取被害人阮某阴道擦拭子等八份检材备检。

3.2 检验过程

按照行标 GA/T766-2020、GA/T 383-2014、GA/T 1163-2014 进行检验分析。

3.2.1 确证检验

取被害人阮某阴道擦拭子适量，采用人精液 PSA 检测金标试剂条法（GA/T 766-2020）进行精斑确证，结果显示阳性。

3.2.2 DNA 提取（常规差异裂解法）

剪取每一根阴道擦拭子适量棉签头，置于 1.5mL 离心管中，加入 1000 μ L 纯水，37 $^{\circ}$ C 浸泡 30min。后加入约 110mL 10% SDS 至终浓度 1%，加入 50 μ L 10mg/mL 蛋白酶 K，37 $^{\circ}$ C 恒温孵育过夜（16h）。

孵育后震荡，取上清转移至新 1.5mL 离心管，13000rpm/min 离心 3min，弃除上清，加入 1000 μ L 纯水震荡洗涤。共重复 3 次，后弃除上清，留沉淀物。

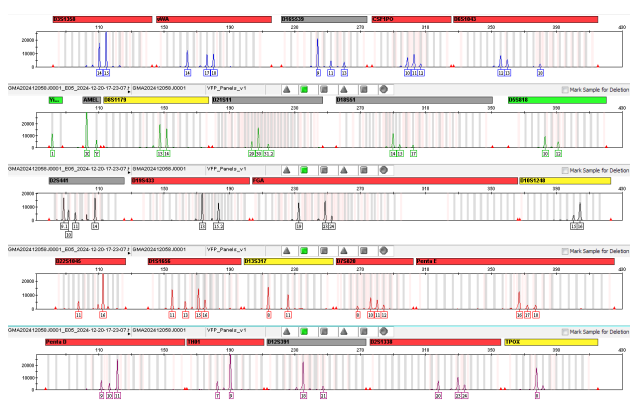
采用 Chelex 法提取沉淀物 DNA，采用磁珠法提取其余检材。

3.2.3 常染色体 STR 多态性检验

以上提取产物均使用 VeriFiler_Plus 试剂盒进行扩增，扩增体系为 10 μ L，扩增循环数为 28，扩增产物经 ABI-3500XL 型遗传分析仪检测，使用 GeneMapper ID-X 分析基因分型。

3.3 检验结果

初次检验所得分型为被害人阮某和嫌疑人何某的混合分型，其中被害人阮某为主要贡献者，嫌疑人何某为次要贡献者，嫌疑人陈某分型峰高极低，存在大量掉带（图 1）。



图一

此结论可确定被害人阮某阴道擦拭子包含嫌疑人何某分型，但无法确定是否包含嫌疑人陈某分型，对案件定性有较大影响。因初次检验的图谱中，若干位点存在嫌疑人陈某分型，故尝试针对性调整实验参数，重新提取。

根据初次检验结果，分析以下原因：

被害人女性分型浓度较高，分析可能为女性成分浓度过高导致，即检材中女性上皮细胞数量过大，未在第一步消化中处理到位，且在洗涤过程中保留过多。需要调整试剂参数，针对性加强消化效力，增加洗涤力度，去除女性成分。

结果包含较低浓度的嫌疑人何某分型，而嫌疑人陈某分型存在且掉带较多。分析可能是检材投放量较低，且第二部消化中精子 DNA 释放不全，故需提高精子 DNA 消化释放能力。

嫌疑人陈某分型掉带严重，分析可能为检材投放量较低，且第二部消化中精子 DNA 释放不全，并且需要在以上基础上提高其扩增效率。

4 二次检验

4.1 检验过程

按照行标 GA/T766-2020、GA/T 383-2014、GA/T 1163-2014 进行检验分析。

4.1.1 DNA 提取

剪取阴道擦拭子剩余部分（投放检材量大于初次实验），置于 1.5mL 离心管中，加入 1000 μ L 纯水，37 $^{\circ}$ C 浸泡 30min。后加入约 110mL 10% SDS 至终浓度 1%，加入 50 μ L 10mg/mL 蛋白酶 K，37 $^{\circ}$ C 恒温孵育过夜（16h），期间隔 8h 添加 20ul 蛋白酶 K。

加入 50 μ L 10mg/mL 蛋白酶 K，56 $^{\circ}$ C 孵育 4h，期间隔 2h 添加 20ul 蛋白酶 K。孵育后震荡，取上清转移至新 1.5mL 离心管，13000rpm/min 离心 3min，弃除上清，加入 1000 μ L 纯水震荡洗涤，共重复 4 次，后弃除上清，留沉淀物待检。

4.1.2 常染色体 STR 多态性检验

以上提取产物均使用 VeriFiler_Plus 试剂盒进行扩增，扩增体系为 10 μ L，扩增循环数为 29，扩增产物经 ABI-3500XL 型遗传分析仪检测，使用 GeneMapper ID-X 分析基因分型。

4.2 检验结果

改进实验后，差异裂解法处理阴道擦拭子得到嫌疑人何某与嫌疑人陈某混合分型，其中嫌疑人何某为主要贡献者，嫌疑人陈某为次要贡献者，存在两个基因座位点丢失，被害人阮某分型几乎不可见，可作为背景峰消除（图 2）。

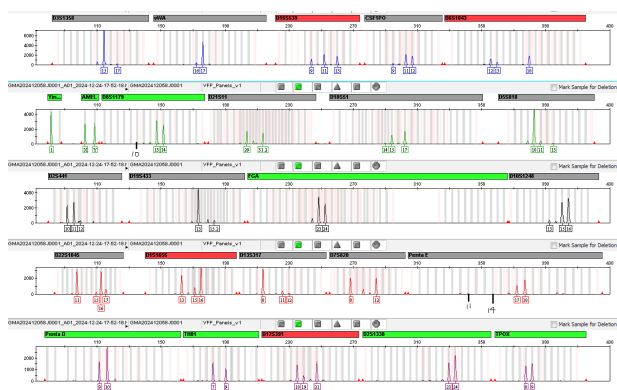
5 结果与讨论

初次实验中，使用常规差异裂解法的参数进行检验，获得的分型中，被害人女性分型浓度较高，而嫌疑人两男性分型浓度总体较低。分析原因：

女性分型浓度过高，考虑为第一步消化过程，针对女性阴道上皮细胞等体细胞的消化未彻底，且清洗后未彻底，保留过多女性分型。

男性分型浓度总体过低，考虑检材量不足，在洗涤过

程中丢失过多精子细胞，且在第二步消化过程中，未充分破坏精子细胞，精子细胞DNA释放不全[1]。另外，考虑适当增加扩增系数，也能提高男性分型浓度。



图二

经查找文献，蛋白酶K在56℃裂解效率更佳[2]，故而选择增加裂解时间，并选在56℃进行消化裂解，以增加女性成分的裂解释放。且蛋白酶K活性在56℃的半衰期约为3h[3]。

综上所述，针对初次实验结果做出以下调整：

针对初步结果所获分型女性占主要贡献者，说明消化不彻底，故在二次检验中延长第一步消化的孵育时间基础上，每隔一段时间添加一定蛋白酶K，保证酶活性，提高消化能力。并且增加洗涤次数，尽量去除女性成分。

针对男性成分总体浓度过低，在二次检验的第二步消化里，首先增加检材投放量，并延长消化时间，调整孵育温度至蛋白酶K活性最佳温度，同时定时补充蛋白酶K，保证酶活性及浓度足够覆盖消化过程。

调整扩增参数，适当增加循环数，保证背景峰较低的基础上，提高男性分型的浓度。

6 总结与心得

针对差异裂解法，目前已有多种方法对其孵育温度和时间进行优化改进。在实际应用中，可以结合初次实验结果及检材特异性情况，对实验参数进行不同的调整优化。

在本次检验中，由于受限于检材数量，防止无法得到有效数据，未做调整多个变量的优化调整。今后可根据类似案事件情况，扩大样本容量，对不同实验参数变量进行梯度调整，得到更多数据，以研究针对多嫌疑人的强奸案件中混合斑迹的检验方法。

检验人员需要在检验前适当了解案情。本次案件中，要求委托方提供的笔录显示，两位男性嫌疑人与被害人发生关系时均未戴避孕套且有射精行为，故及时进行检验。在初次实验中适当放宽实验参数，尽量检验出全面的多人混合分型。谨慎分析结果，在发现个别位点存在三人以上混合分型后，及时对初次检验参数进行针对性调整，最终做出嫌疑人两人混合分型，为案件定性起到强有力支持，为后期侦查破案提供线索，为案件诉讼提供证据。

参考文献

- [1] 刘琳, 陈水琴, 胡志敏, 等. 混合斑中精子细胞分离方法的应用研究进展[J]. 生命科学研究, 2014, 18(1): 55-59, 89.
- [2] 张子阳, 聂世昌, 马奇兴. DNA检案中混合拭子提取方法的优化[J]. 法医学杂志, 2017, 33(5): 540-542.
- [3] 张奇兵, 那馨竹, 尹宗宁. 光谱法表征蛋白酶K的热变性过程[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(7): 1749-1753. DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2013)07-1749-05.