

尿液检材的 DNA 提取及法医学检验

余姣龙

武汉市华谷生物科技有限公司法医物证司法鉴定所, 湖北武汉, 430070;

摘要: DNA 检测通常依赖于血液、唾液或组织样本等, 用于亲子鉴定、疾病诊断以及法医学个体识别等领域。然而, 近年来, 尿液作为一种非侵入性样本, 逐渐受到研究者的关注。尿液不仅能够反映机体的代谢状态, 还包含少量细胞成分, 可用于 DNA 提取与分析。尽管尿液中的 DNA 含量较低, 且 STR 分型检出率不如血液或精斑样本, 但其在法医学中的应用潜力不可忽视, 尤其是在运动员兴奋剂检测、毒品代谢物分析以及某些疾病的早期诊断中具有重要意义。本文系统总结了尿液 DNA 的提取方法、检验技术及其在法医学中的应用, 同时探讨了尿液与尿斑 DNA 分型的差异及其影响因素。

关键词: 法医学; 尿液检测; DNA 提取; DNA 检验; STR 分型

DOI:10.69979/3029-2808.24.11.022

1 尿液检测的意义与应用

尿液是人体泌尿系统排泄的代谢产物, 主要由水、无机盐、尿素、尿酸以及少量细胞成分组成。由于其取样简便、无创且成本低廉, 尿液检测在临床医学和法医学中具有广泛的应用价值。

1.1 临床医学中的应用

在临床医学中, 尿液检测常用于疾病诊断和健康监测^[1]。通过分析尿液的物理性质(如透明度、颜色)和化学性质(如酸碱度、蛋白质含量), 可以初步判断肾脏功能、泌尿系统疾病以及代谢异常。例如, 尿液中白细胞和红细胞的增多可能提示尿路感染或肾炎, 而尿糖和尿酮体的检测则有助于糖尿病的诊断。

此外, 近年来尿液 DNA 检测在肿瘤早期诊断中的应用逐渐受到关注。例如, 膀胱癌患者的尿液中可能含有脱落的肿瘤细胞, 通过提取和分析这些细胞的 DNA, 可以实现无创诊断和病情监测^[2]。

1.2 法医学中的应用

在法医学领域, 尿液样本主要用于个体识别和毒品检测。例如, 在运动员兴奋剂检测中, 可疑尿样的 DNA 分型可以确认样本来源, 避免样本混淆或篡改。此外, 尿液中的毒品及其代谢物检测也是法医毒理学的重要内容。

然而, 与血液、精斑等样本相比, 尿液 DNA 的 STR 分型检出率较低, 这主要与尿液中的 DNA 含量少、降解程度高以及杂质干扰等因素有关。因此, 如何高效提取

尿液 DNA 并提高分型成功率, 成为法医学研究的重要课题。

2 尿液中 DNA 的提取方法

尿液中的 DNA 主要来源于脱落的泌尿道上皮细胞、白细胞以及其他细胞成分。由于尿液中的 DNA 含量较低且易降解, 提取方法的选择对后续检测结果至关重要。目前, 常用的尿液 DNA 提取方法包括 Chelex 法、有机试剂法、无机盐法以及商品化试剂盒法。

2.1 Chelex 法提取

Chelex 法是一种基于 Chelex-100 树脂的 DNA 提取方法, 其原理是利用树脂的螯合作用吸附金属离子, 同时释放 DNA。该方法将 50-300 μ L 4% Chelex 溶液和 2-6 μ L 20mg/mL 蛋白酶 K 溶液加入适量经预处理后的尿液或尿斑洗脱液中, 混匀后 56℃ 消化 2h 以上, 然后煮沸 8min 以上, 离心取上清液进行 PCR 扩增。该法操作简单、快速, 且无需使用有毒有机溶剂, 因此在法医学中广泛应用。

然而, 单纯使用 Chelex 法提取尿液 DNA 时, 往往存在 DNA 浓度低、杂质残留多的问题, 这可能影响后续 PCR 扩增的效率^[3]。为提高提取效果, 研究者通常会对尿液样本进行预处理, 如超滤离心或浓缩纯化。例如, 有研究报道, 采用 Microcon-100 柱对 Chelex 法提取的尿液 DNA 进行纯化, 可显著提高 STR 分型的成功率。

2.2 有机试剂法提取

有机试剂法是一种传统的 DNA 提取方法,其原理是利用苯酚、氯仿等有机溶剂使蛋白质变性,从而分离 DNA。该方法在预处理后的尿液或尿斑洗脱液中加入 1/10 体积的 10%SDS 和 1/20 体积的 20mg/ml 的蛋白酶 K,使终浓度分别为 1%和 100 μ g/ml,置于 55℃消化 3~4h。消化完全后,用等体积的酚、酚/氯仿、氯仿各抽提 DNA 一次。上清液中加入 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠和 2 倍体积冰冷(-20℃保存)无水乙醇,混匀,10000rpm 离心 10min,弃上清,用 70%冷乙醇洗 DNA 沉淀,反复三次。除去液体,室温晾干(或真空抽干),加适量的 TE 液溶解 DNA,溶解后的 DNA 进行 PCR 扩增。该方法提取的 DNA 纯度较高,且适用于多种生物样本。有研究报道,有机试剂法可以从 10ml 尿液中可提取 1.5~15 μ g DNA,但小体积样本(如 0.1ml)的 DNA 浓度往往低于检测限。此外,有机试剂法的操作步骤复杂、耗时长,且存在有机溶剂污染的风险^[4]。

2.3 无机盐法提取

无机盐法是一种基于高盐溶液沉淀蛋白质的 DNA 提取方法^[5],其优点在于避免了有机溶剂的使用,降低了环境污染和健康风险。该方法将预处理后的尿液或尿斑洗脱液中加入 SDS 和蛋白酶 K 后,在 56℃ 消化 2h,然后用饱和氯化钠沉淀蛋白质,并经离心除去,上清液直接用无水乙醇沉淀 DNA,沉淀的 DNA 用 TE 溶解后可以进行 PCR 扩增。该方法适用于冷冻保存的尿液样本。

然而,无机盐法提取的 DNA 中可能残留高浓度盐类,这些盐类可能抑制后续 PCR 反应。此外,无机盐法的操作步骤较为繁琐,且提取效率受样本保存条件的影响较大。

2.4 商品化试剂盒提取

近年来,随着分子生物学技术的发展,多种商品化 DNA 提取试剂盒被开发并应用于尿液样本。这些试剂盒通常基于硅胶膜或磁珠法,全程按照试剂盒说明书进行操作,具有操作简便、提取效率高以及 DNA 纯度好的优点。

例如, DNA IQTM SYSTEM 是一种基于磁珠法的 DNA 提取试剂盒,可高效捕获尿液中的微量 DNA。此外,结合激光显微捕获技术(LCM),可以从尿液细胞中提取高质量 DNA,用于 STR 分型检测。研究表明,新鲜尿液样本的 STR 分型成功率较高,但随着样本保存时间的延

长,分型成功率逐渐下降。

3 尿液与尿斑的 DNA 分型

在法医学实践中,尿液样本通常以液态或干燥的尿斑形式保存。液态尿液样本可直接用于 DNA 提取,而尿斑则需要通过特定方法处理^[6]。

3.1 液态尿液样本的 DNA 分型

液态尿液样本的 DNA 提取相对简单,主要采用 Chelex-100 法或商品化 DNA 提取试剂盒。Chelex-100 法通过整合二价阳离子,抑制 DNA 酶的活性,同时使蛋白质变性,从而实现 DNA 的快速提取。研究表明,0.5ml 尿液样本即可获得理想的 STR 分型结果,其完整 STR 图谱的检出率可达 85%以上。增加样本量至 1~2ml 可提高基因座检出率,但过大的样本量(>5ml)可能导致杂质增多,特别是尿酸盐和蛋白质的干扰,反而降低 DNA 提取效率。因此,建议将样本量控制在 0.5~2ml 范围内,并在提取前进行离心处理以去除沉淀物。

3.2 尿斑样本的 DNA 分型

尿斑是将液态尿液滴在纱布、滤纸等载体上,经自然晾干或 37℃ 恒温干燥后形成的干燥样本。尿斑的 DNA 提取过程较为复杂,通常需要将载体剪碎至 1mm×1mm 大小,并用 0.9%生理盐水在 4℃ 条件下浸泡 12~24 小时,以充分洗脱细胞成分。然而,由于载体面积较大且细胞分布不均匀,细胞洗脱不完全可能导致 DNA 分型失败。研究表明,尿斑的 STR 分型成功率(约 60~70%)显著低于液态尿液样本,这主要与 DNA 降解和抑制剂残留有关。

为提高尿斑 DNA 的提取效率,建议从以下几个方面进行优化:首先,选择具有高吸附性和低抑制性的载体材料,如多层纱布或专用滤纸;其次,优化洗脱条件,建议将洗脱时间延长至 24 小时,并在洗脱过程中辅以温和振荡;最后,在 DNA 提取前增加纯化步骤,如使用硅胶柱纯化法去除抑制剂。此外,研究表明,采用微型磁珠法提取尿斑 DNA 可显著提高 STR 分型成功率,该方法对微量 DNA 具有较高的捕获效率,且能有效去除尿斑中的抑制物质。

通过上述优化措施,尿斑样本的 STR 分型成功率可提升至 75~85%,为法医学实践提供了更可靠的技术支持。然而,在实际应用中仍需注意样本的保存条件,建议将尿斑样本置于干燥、避光的环境中,温度控制在 4~25℃ 范围内,以最大限度保持 DNA 的完整性。

4 影响尿液 DNA 分型的因素

尿液 DNA 的 STR 分型成功率受多种因素影响,包括样本保存条件、提取方法以及检测技术等。

4.1 样本保存条件

尿液样本的生物稳定性较差,在室温(20-25℃)下 DNA 降解速率较快,这主要与尿液中的核酸酶活性以及微生物繁殖有关。研究表明,4℃保存的尿液样本在 10 天内 STR 分型成功率可维持在 90%以上,而室温保存的样本在 7 天后分型成功率下降至 60-70%^[7]。对于需要长期保存的样本,建议采用-20℃或-80℃冷冻保存,并添加等体积的 DNA 稳定剂(如 RNAlater)。值得注意的是,反复冻融会显著影响 DNA 完整性,因此建议将样本分装保存,每个冻存管体积以 1-2ml 为宜。

4.2 提取方法的选择

不同的 DNA 提取方法对分型结果有显著影响。例如, Chelex 法操作简便但 DNA 纯度较低,而有机试剂法提取的 DNA 纯度较高但操作复杂。在实际应用中,应根据样本特点和研究目的选择合适的提取方法。

4.3 尿液预处理

尿液预处理是提高 DNA 提取效率的关键步骤。研究表明,在尿液采集后立即加入 40mM EDTA(终浓度)可有效螯合二价金属离子,抑制 DNA 酶活性。此外,添加尿蛋白酶抑制剂(如 1mM PMSF)可防止蛋白质降解产生的抑制物干扰。值得注意的是,离心处理会导致上皮细胞破裂,使 DNA 释放至上清液中难以回收^[8],因此确需离心操作,建议采用低速长时离心或直接过滤法(0.45 μm 滤膜)进行细胞收集。对于微量样本,可采用纯化柱浓缩法,将 5-10ml 尿液浓缩至 0.5-1ml,可显著提高 DNA 得率。

4.4 性别

显微镜下可见男性新鲜尿液尿沉渣中脱落细胞数量明显少于女性,推测主要是由两者生理结构差异导致。因此,按常规方法,女性尿液比男性尿液提取后较易获得 STR 分型^[9]。为提高男性尿液 DNA 的提取效率,建议适当增加样本量(2-5ml)并延长蛋白酶 K 消化时间(至 4-6 小时)。

4.5 检测技术的优化

随着分子生物学技术的发展,新一代测序技术(NGS)和微滴式数字 PCR(ddPCR)等新技术逐渐应用于尿液 DNA 检测。这些技术具有高灵敏度、高通量以及低背景噪音的优点,可显著提高尿液 DNA 的检测效率。

5 结论

尿液作为一种非侵入性样本,在法医学和临床医学中具有重要的应用价值。尽管尿液 DNA 的 STR 分型检出率较低,但通过优化提取方法和检测技术,可以显著提高分型成功率。未来,随着分子生物学技术的不断发展,尿液 DNA 检测将在疾病诊断、个体识别以及法医学鉴定中发挥更大的作用。

参考文献

- [1]徐涛,秦彩朋.尿液 DNA 甲基化检测在膀胱癌无创诊断中的研究进展[J].中华泌尿外科杂志,2020,41(10):721-723.
- [2]徐兰锋,朱丹,袁潮.生存蛋白在膀胱癌患者尿液脱落细胞中的表达及临床相关性研究[J].中国实验诊断学,2020,024(002):316-319.
- [3]田小兰,冯俊丽,汪艺.一种快速高效的 DNA 提取方法及其在 qPCR 检测金黄色葡萄球菌中的应用[J].食品科技,2019,44(02):344-350.
- [4]杨璐,刘虹,陈文敏,等.cDNA 与 DNA 标本检测 AML 患者 c-KIT 基因外显子 17 突变的比较[J].中华检验医学杂志,2019,42(006):453-457.
- [5]杨伟健,郑亦男,沈海广,等.不同体液巨细胞病毒 DNA 实时荧光定量-PCR 检测在免疫正常婴儿巨细胞病毒肺炎中的诊断价值[J].中华实用儿科临床杂志,2019,34(009):669-674.
- [6]陈荣华,顾利华等.尿液及尿斑 DNA 分型的研究[J].中国法医学杂志,2005,20(2):71-73.
- [7]杨彦梅,曹永林等.存放 5d 尿液检验 DNA 成功 1 例[J].法医学杂志,2007,23(6):474-475.
- [8]徐小玉,畅晶晶等.尿液中 DNA 的提取与检验[J].中国法医学杂志,2018,33(2):146-149.
- [9]孙树毅,焦德利等.冰冻尿液的 DNA 提取及其检验[J].中国法医学杂志,2010,25(4):259-261.