

法務部法醫研究所
93 年度委託專題研究計畫期末報告書

計畫編號: IFM93-B2

計畫名稱	中文: DNA 鑑定之干擾因素研究:環境因子評估與改進方案
	英文: Interfering factors to DNA examination: evaluation of environmental interferences and their counter measures

執行機關:國立台灣大學

計畫主持人:張俊哲 E-MAIL 信箱:chunche@ntu.edu.tw

聯絡電話:02-27369366 傳真號碼: 02-27369366

執行期限:民國九十三年三月十日~十二月三十一日止

計畫名稱: DNA 鑑定之干擾因素研究:環境因子評估與改進方案

目	錄	頁碼
一、	目錄	121
二、	計畫中文摘要	122
三、	計畫英文摘要	123
四、	計畫緣由、目的	124
五、	研究方法	125
六、	計畫結果與討論	127
七、	計畫成果自評	131
八、	參考文獻	131
九、	附圖表	134

二、計畫中文摘要

我們研發出一套自土壤血液表層純化血液 DNA 的方法，就我們的了解之前並無文獻針對這方面之純化提出報導。利用細胞裂解液自土壤萃取血液 DNA，經過自創之混合與分離過程，我們所純化之 DNA 可供 PCR 分析。我們利用五組分析核 DNA 的引子，加上四組分析粒線體 DNA 的引子來偵測 DNA 裂解程度。作為分析核 DNA 裂解引子，其長度範圍涵蓋從 0.13 kb 至 1.6 kb；至於用在粒線體 DNA 裂解分析的引子，它們的檢測範圍則在 0.13 kb 至 0.17 kb 之間。我們發現血液在土壤中會隨時間之增長而逐漸裂解。核 DNA 在第零天並未有裂解現象出現，但血液置於土壤一天後，其中之核 DNA 便裂解至 0.13 ~ 0.16 kb 之間，至第六天，大於 0.13 kb 之片段便無法偵測得到。粒線體 DNA 之裂解程度較核 DNA 來得輕：我們的實驗顯示，它們進入第六天才有裂解現象。在 4 個放大區域 (amplicon) 中，只有一區域無法增幅。因第六、七天自土壤萃取的 DNA 在電泳膠片上與直接由血液萃取的 DNA 十分相近，沒有明顯的斷裂片段，我們推測土壤中血液 DNA 之裂解較有可能是單股異位而非雙股同位裂解。我們所研發出的這一整套純化分析系統，相信對土壤血液 DNA 定性 (characterization)，不論在學術或實務之運用，皆有其重要之貢獻。

三、計畫英文摘要

We have developed a novel method to extract human DNA from blood stains on the soil. By using cell lysis buffer, we first dissolved blood DNA from soil. Following with consecutive centrifugation at different speed, solid contaminants from soil were eliminated. Blood DNA then was purified through protein precipitation, DNA precipitation and rehydration. In order to analyze the degradation degree of purified DNA from blood stains on soil, we designed five sets of primers based upon the GAPDH sequences and adopted four sets of published primers of mitochondrial DNA. The GAPDH primers amplifying 5 PCR fragments ranging from 0.13 –1.6 kb, were used for detection the degradation degree of nuclear DNA; mitochondrial primers, whose amplicon sizes were between 0.13-0.17 kb, were for the analysis of mitochondrial DNA analysis. In our experiments, DNA harvested from the Day 0 soil blood stain showed no sign of degradation according to the identical PCR amplification pattern to the control group in which DNA was directly extracted from the liquid blood. After one day incubation, nuclear DNA appeared significant degradation to the size between 0.13 to 0.16 kb. Up to the Day 6, nuclear DNA fragments under 0.13 kb were undetectable. Mitochondrial DNA appeared more integrative than the nuclear DNA: only one out of four PCR amplicons was not

identifiable on the agarose gel since Day 6. Genomic DNA purified from Day 6 and Day 7 samples appeared little difference by the comparison with it from the positive control. We infer that blood DNA degradation on soil is single-strand damaged rather than double-strand cut.

四、計畫緣由與目的

本計畫之主旨，在於評估環境因子對 DNA 鑑定所造成之干擾程度，並進而研發克服干擾因子之策略與方法。經由文獻之搜尋與訪談法醫相關工作人員，我們發現：雖有許多期刊論文報導組織與血液 DNA 在金屬、動物體表、塑膠、衣物表面之純化與鑑定 (Esslinger et al., 2004; Minaguchi et al., 2003; Nakanishi et al., 2003; Noppinger et al., 1992; Pfeiffer et al., 2004)，但迄今尚未有針對從土壤中抽取、純化血液 DNA 的文獻報導。我們所蒐集到的資訊，僅止於土壤中固體組織 (如肌肉、牙齒) 的 DNA 萃取 (Alvarez Garcia et al., 1996; Nakanishi et al., 2003; Pfeiffer et al., 1999; Schwartz et al., 1991)。因為在戶外土壤佔地表大部分面積，很可能是案發現場血液濺漬所在，因此從土壤表層萃取血液 DNA 之方法，以及鑑定其裂解程度，確有其重要性所在。綜合以上考量及評估，純化土壤表層之血液 DNA 以及時間對其完整性影響之評量，遂成為本計畫主軸。

在第一階段的研究，我們已成功地研發自土壤淺表萃取出血液 DNA 的方法。同時，我們也設計出一套含有六對 PCR (polymerase chain reaction) 的引子 (primers)，分別利用它們增幅出大小不同的區段，來檢視 DNA 的裂解程度 (Fig. 1)。我們將 300 μ l 的人類血液滴在置於 15ml 的 Falcon 試管中 (土壤體積約佔 1 ml)，在不同之時間點萃取其 DNA。初步之成果顯示：在第一、二天的樣本內 DNA 已裂解至 1000 個鹼基對 (base pairs, bps) 以下 (Fig. 2)。

然而，將血液滴於試管底層之土壤，並加以封蓋，並不足以反應血液濺漬於戶外土壤之真實狀況。因此，在第二階段之實驗，我們改將血液滴於寬口圓盒裡面的土壤，不封蓋，以期更能反映真實環境條件。另外，我們利用另一套引子來檢視粒線體 (mitochondria) DNA 裂解之情形。我們增加這一組引子之目的，在於比對細胞核 (nuclear) DNA 與粒線體 DNA 的裂解程度，作為鑑識科學實驗室運用商業操作模組 (kit) 之前，判定土壤內血液 DNA 品質之前置鑑定。

五、研究方法

(一) 土壤來源：國立台灣大學校本部中研院原子與分子科學研究所近福利社之外側土壤。

(二) 血液來源：二十五歲，女性醫護人員血液。血液靜置於含有 K_2EDTA

的試管 (BD Vacutainer™) 保存於 4°C，兩週內用完。

(三) 血液以 300 μ l 為單一滴瀝體積。用微量吸管 (最大體積 1000 μ l

Eppendorf Ltd. 製造) 吸取後，垂直滴於土壤表面 (Fig. 3)。每個血液區的面積約為直徑 1.5~2.0 cm 的圓，滲入土壤內的深度約為 0.3~0.7 cm。

(四) DNA 萃取方法:

1. 將含血液之土壤區塊以酒精消毒的金屬藥勺自土壤分離，置於秤藥紙上，再將土塊以藥勺搗碎。
2. 將搗碎後之土壤粉末(含血液)倒入 15ml 之 Falcon tube 中；並加入 Cell Lysis Buffer 1000 μ l (Puregene®)，封蓋後，以滾筒式攪拌器使 Lysis Buffer 與土壤充分混合。反應條件：室溫，10 分鐘。
3. 以轉速 200 rpm 的離心轉盤將土壤與含血球 DNA 的 Lysis Buffer 分開。離心時間：室溫，1~2 分鐘。
4. 將第 3 步驟之上清液分裝於 1.5 ml 之微量試管，以 14,000 rpm 之高轉速於室溫離心 2 分鐘；取上清液後再重複此步驟一次。
5. 加入 RNaseA (4mg/ml) (Puregene®) 溶液，在 37°C 溫度，30 至 60 分鐘之反應條件下，去除 RNA 干擾 (RNaseA 體積：上清液體積=1.5 μ l: 300~500 μ l)
6. 加入 Protein Precipitation Solution (PPS) (Puregene®)，激烈攪拌 20

秒 (PPS 體積：上清液體積=100 μ l: 300 μ l) 之後室溫離心，14000 rpm，1 分鐘。

7. 取上清液，加入 Isopropanol 沉澱 genomic DNA (Isopropanol 體積：上清液體積=300 μ l: 400 μ l)。通常自 300 μ l 血液直接抽取 DNA，在這一沉澱步驟，可以看到白色紡絲狀之 DNA 沉澱。但自土壤萃取血液 DNA，因回收量較少，通常此類之沉澱看不見。為增加沉澱的效能，我們通常加入 1 μ l glycogen (20ug/ μ l) 當做 carrier。室溫離心，14000 rpm，1~2 分鐘。
8. 倒掉上清液，以 70% 酒精 700 μ l 洗去殘留的鹽。室溫離心，14000 rpm，1~2 分鐘。
9. 倒掉上清液，倒置未蓋之試管，以擦手紙將殘留之 70% 酒精吸乾；之後以乾熱器，溫控於 50°C，以加速 70% 酒精之蒸發。待酒精完全揮發後，以 50~100 μ l Rehydration Buffer (Puregene®) 溶解 DNA (通常我們將溶解過程延長至 12 小時，以得最大之溶解度)。

六、 研究結果與討論

(一) 引子(primer)之設計：

在檢測核 (nuclear) DNA 之列解程度方面，我們選取 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 這個基因 (Tso et al.,

1985), 在總長 5378 bp 的序列中, 設計可增幅長度不同之 DNA 片段。

Primer 代號與增幅之 DNA 片段長度如下 :

F780 - B908: 129 bp; F61 - B225: 165bp; F2097 - B2509: 413bp

F3701 - B4471: 771bp; F3354 - B5157: 1604bp

(F : forward primers ; B : backward (reverse) primer , 序列設計軟體

MacVector 7.0) 。在檢測粒線體 (mitochondria) DNA 之裂解程度方面 ,

我們採用 Gabriel 等人已發表的序列來進行測試(Gabriel et al., 2001)。

Primer 代號與增幅之 DNA 片段長度如下 :

MPS1A-F - MPS1A-R: 170 bp; MPS2A-F - MPS2A-R: 133 bp;

MPS3A-F - MPS3A-R: 126 bp; MPS4A-F - MPS4A-R: 142 bp

(F : forward primers ; R : reverse primer)

(二) 實驗結果

在第零天 (Day 0), 亦即血液甫滴於土壤之上, 靜置室溫 30 分鐘內即萃取, 我們可以增幅到所有的片段 (Fig. 4), 顯示在如此短的時間內, 血液 DNA 在土壤內並未有裂解至 1600 bp 以下之情形出現。然而, 在第一天 (Day 1) 的土壤檢體, 卻呈現明顯之裂解現象 (Fig. 5): 核 DNA 只見 129 bp 與 165 bp 片段被增幅; 粒線體 DNA 被增幅之片段雖依然可見, 然而其訊號強度卻明顯減弱。

在第二天 (Day 2) 之土壤檢體, 核 DNA 與粒線體 DNA 呈現進一

步之裂解 (Fig. 6)：核 DNA 只出現 129 bp 這個片段 (165bp 片段之訊號弱到幾乎偵測不到)；而粒線體 DNA 原有之 170 bp 與 142 bp 片段無法在膠片上辨識,只剩 133 bp 與 126 bp 這兩個片段。第三天 (Day 3) 的 DNA 裂解情形與第二天相同 (Fig. 7)。自第四天後，我們已經無法偵測到任何之增幅片段 (Fig. 8)，我們持續追蹤至第七天，並無任何可見之增幅片段再現 (Fig. 9 – 11)，顯示自第四天後之核 DNA 與粒線體 DNA 已分別遭裂解至 129 bp 與 126 bp 以下。

我們在上述追蹤土壤內血液 DNA 隨時間變化而裂解測的試後，進一步將所純化的 DNA 以 PCR cleaning kit (Qiagen) 再次淨化，目的在去除殘留之土壤含有成份。重複未淨化前的 PCR 反應條件，我們發現：Day 1 至 Day 3 的 PCR 結果與前述利用未淨化的 DNA 當作模板 (templates) 的 PCR 結果變動不大：淨化前、後共同點在於核 DNA 139bp 片段顯示於電泳膠片上，而些微之差異在於淨化前的 Day 1 組有 165 片段之增幅，但在淨化後的 Day 1 組則無法偵測到此片段 (Fig. 12)。針對這樣的差異，我們推測為 DNA binding membrane 的化學性質所導致。然而，在粒線體的 PCR 方面，我們卻發現在 Day2 與 Day3 組有較顯著的差異：未淨化前的 PCR 結果所看不見的片段 (170 bp 與 142 bp)，在淨化後都重新被增幅出可見之清楚片段 (Fig. 13)。顯示進一步的淨化確實會去除一些干擾粒線體 DNA 能增幅的因子。

在淨化的 Day 4 與 Day 5 PCR 4 條粒線體片段依然可被增幅，並清楚地呈現於電泳膠片上 (Fig. 14)。然而在 Day 6 與 Day 7 組，長度 170 bp 片段便無法測得 (Fig. 15)。顯示粒線體 DNA 已開始進行裂解。

綜合淨化前後的 PCR 結果，我們得到以下之結論：

- (一) 粒線體 DNA 因受保護於粒線體內，因此它們 (粒線體 DNA) 較不易遭受裂解；另外粒線體 DNA 的數目 (copy number) 遠勝雙套的核 DNA，在遭受裂解時亦較能保有較多完整性的粒線體 DNA。因此，我們所有的 PCR 結果都顯示粒線體 DNA 較諸核 DNA 來得完整，遭受裂解之時序亦較核 DNA 來得晚。
- (二) 血液中核 DNA 經過一天內於土壤之環境，即顯示明顯之裂解現象 (Fig. 5 and Fig. 12)。而且在 Day 6 之後，DNA 裂解之片段已小於 129bp。我們目前尚無同批血液檢體 Day 4 與 Day 5 之數據，但推測在 Day 1 至 Day 3 期間，其裂解程度應界於 129 – 165 bp 之間 (Fig. 5 and Fig. 12)。
- (三) 由 DNA 電泳膠片顯示，自 Day 6 與 Day 7 之土壤血液中抽取之 DNA，相較於直接從血液所抽取的 DNA，仍呈現高度之完整性 (Fig. 16)。然而 Day 6 與 Day 7 的 DNA 模板卻無法被增幅出任何高於 129 bp 之核 DNA 片段。我們推

論大部分 DNA 之裂解並非在「雙股、同位」，而是「單股、異位」。會造成「單股、異位」之裂解原因，有待進一步研究。

七、計畫成果自評

本計畫之主要貢獻在於發展出簡單、有效自土壤表層血漬純化出 DNA 之方法。這對於案發於花園、森林，或其他具土壤表面之現場，嫌犯或受害者所留下之血漬，採為 DNA 證物，並加以分析，有著十分重要之貢獻。

同時我們亦提供了 9 套引子對 (5 套核 DNA ; 4 套粒線體 DNA) 做為 DNA 裂解程度之分析。他們對進一步進行人別鑑定試驗，可提供鍵識單位對 DNA 品質之判定更加精準。

八、參考文獻

- Alvarez Garcia, A., Munoz, I., Pestoni, C., Lareu, M. V., Rodriguez-Calvo, M. S. and Carracedo, A. (1996). Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int. J. Legal Med.* 109, 125-129.
- Esslinger, K. J., Siegel, J. A., Spillane, H. and Stallworth, S. (2004). Using STR analysis to detect human DNA from exploded pipe bomb devices. *J. Forensic Sci.* 49, 481-484.
- Gabriel, M. N., Huffine, E. F., Ryan, J. H., Holland, M. M. and Parsons, T. J.

(2001). Improved MtDNA sequence analysis of forensic remains using a "mini-primer set" amplification strategy. *J. Forensic Sci.* 46, 247-253.

Minaguchi, K., Hanaoka, Y., Maruyama, S., Nonaka, I., Kajiwara, M., Takagi, T. and Sato, Y. (2003). DNA analysis of neonatal human remains wrapped and kept in a vinyl bag for 15 years. *Leg. Med. (Tokyo)* 5 Suppl 1, S183-186.

Nakanishi, A., Moriya, F. and Hashimoto, Y. (2003). Effects of environmental conditions to which nails are exposed on DNA analysis of them. *Leg. Med. (Tokyo)* 5 Suppl 1, S194-197.

Noppinger, K., Duncan, G., Ferraro, D., Watson, S. and Ban, J. (1992). Evaluation of DNA probe removal from nylon membrane. *Biotechniques* 13, 572-575.

Pfeiffer, H., Huhne, J., Seitz, B. and Brinkmann, B. (1999). Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int. J. Legal Med.* 112, 142-144.

Pfeiffer, I., Volkel, I., Taubert, H. and Brenig, B. (2004). Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Sci. Int.* 141, 149-151.

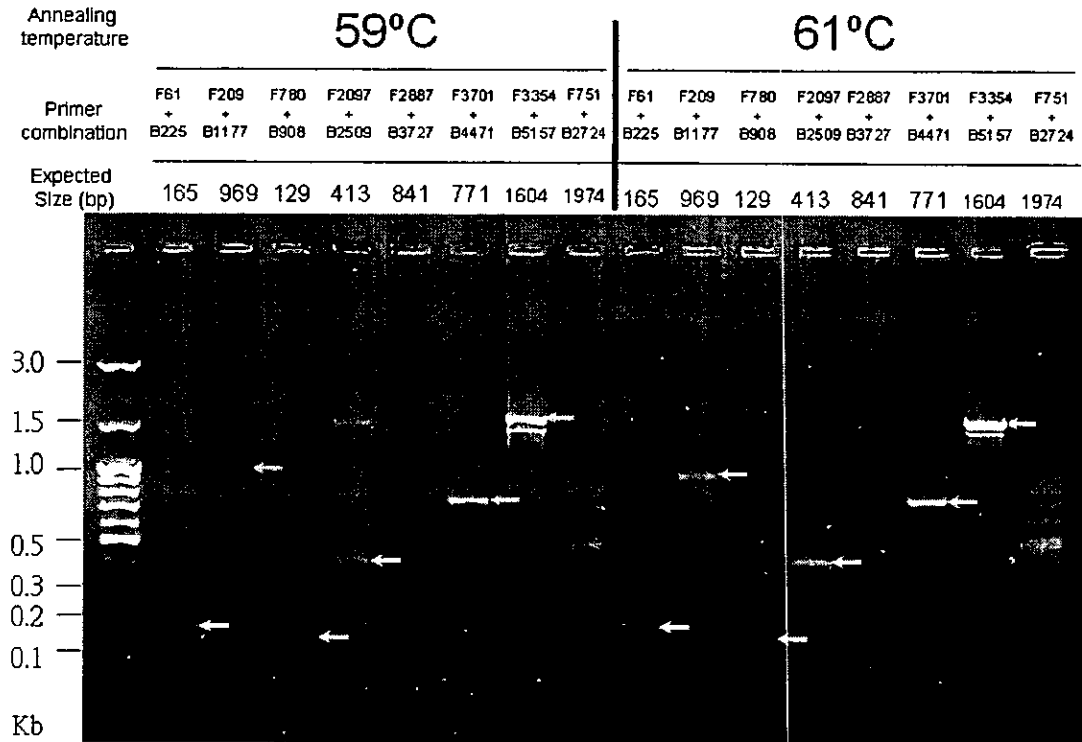
Schwartz, T. R., Schwartz, E. A., Mieszerski, L., McNally, L. and Kobilinsky, L.

(1991). Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J. Forensic Sci.* 36, 979-990.

Tso, J. Y., Sun, X. H., Kao, T. H., Reece, K. S. and Wu, R. (1985). Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 13, 2485-2502.

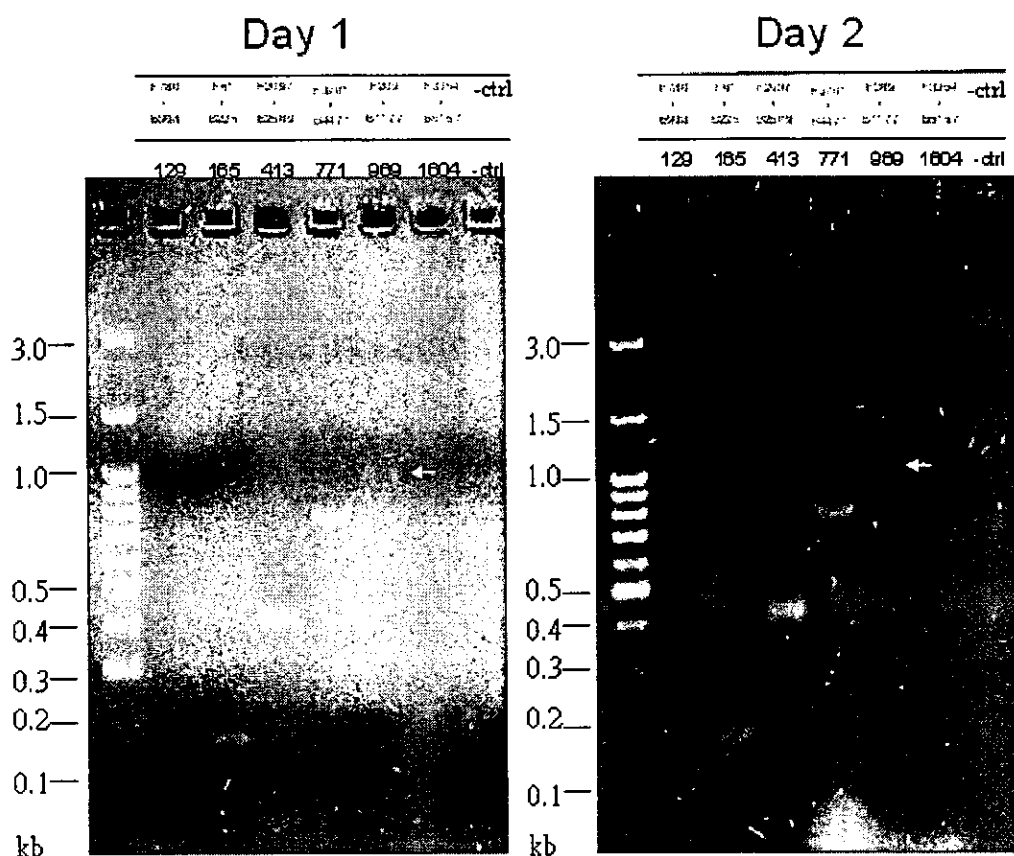
九、附圖表

Figure 1: PCR amplification of GAPDH amplicons with 8 sets of primers.



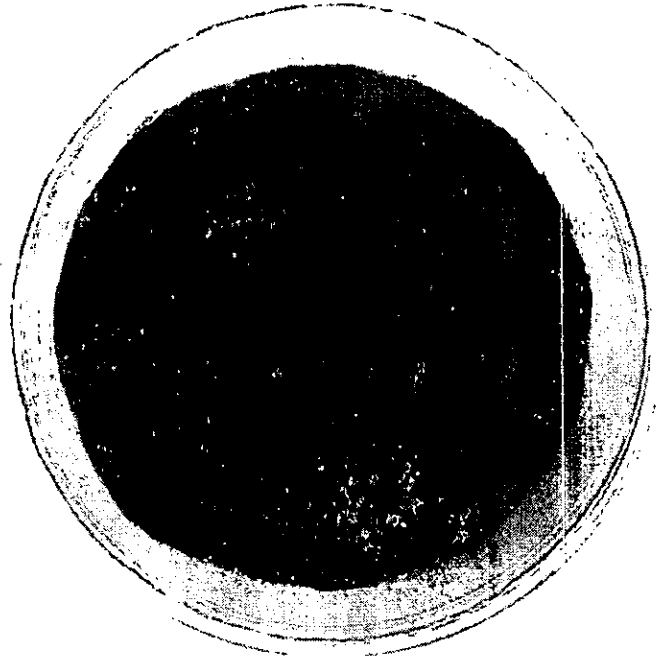
Expected sizes of amplicons were indicated with arrows. PCR specificity was improved by elevating the annealing temperature. Annealing temperature was adjusted from 59 °C to 61 °C respectively.

Figure 2: Examination of DNA fragmentation degree in the Day-1 and Day-2 samples.



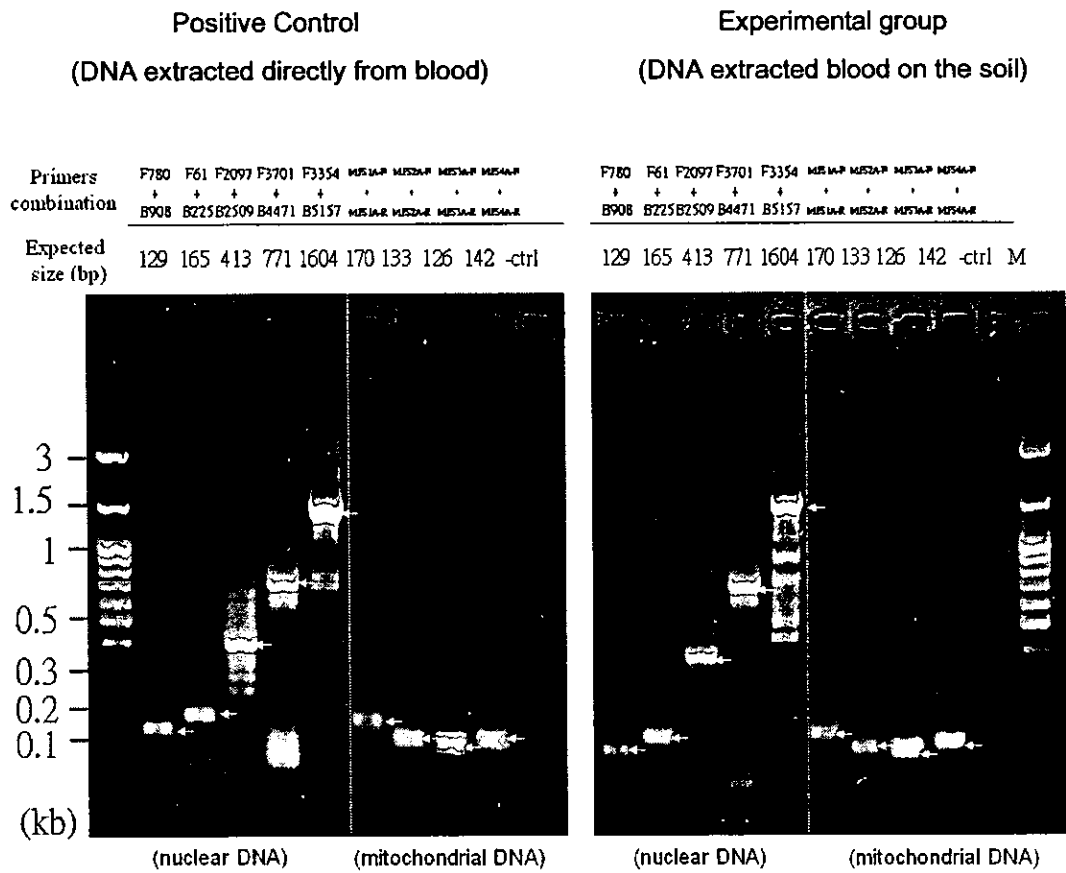
Blood DNA extracted from soil on Day 1 and Day 2 was used as the PCR templates. Extracted DNA was cleaned with a PCR cleaning kit (Bioman Ltd.) Amplification of four DNA fragments from 129 bp to 771 bp was identified in both Day-1 and Day-2 groups . A very weak amplification at the size of 969 bp was observed (arrow).

Figure 3. Blood stains on soil



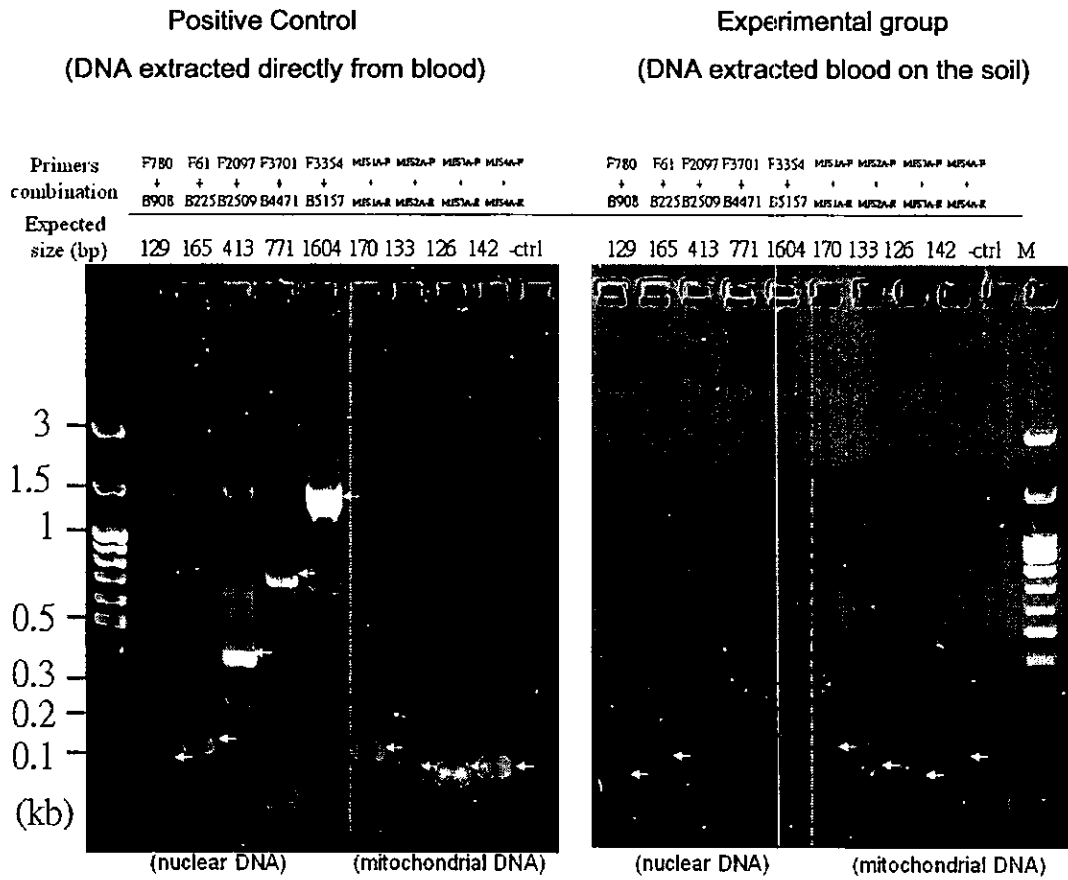
Each stain contains 300 μ l of human blood.

Figure 4. Identification of DNA-degradation degree from the Day 0 extraction with nuclear and mitochondrial primers.



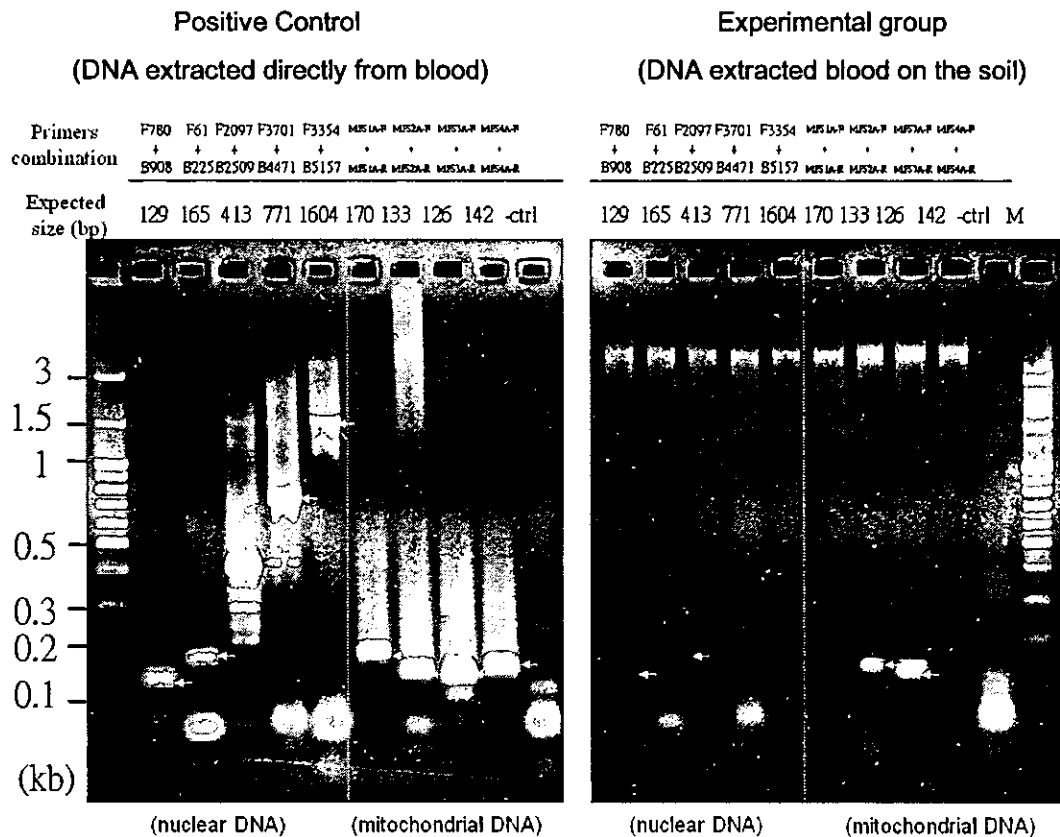
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 5. Identification of DNA-degradation degree from the Day 1 extraction with nuclear and mitochondrial primers.



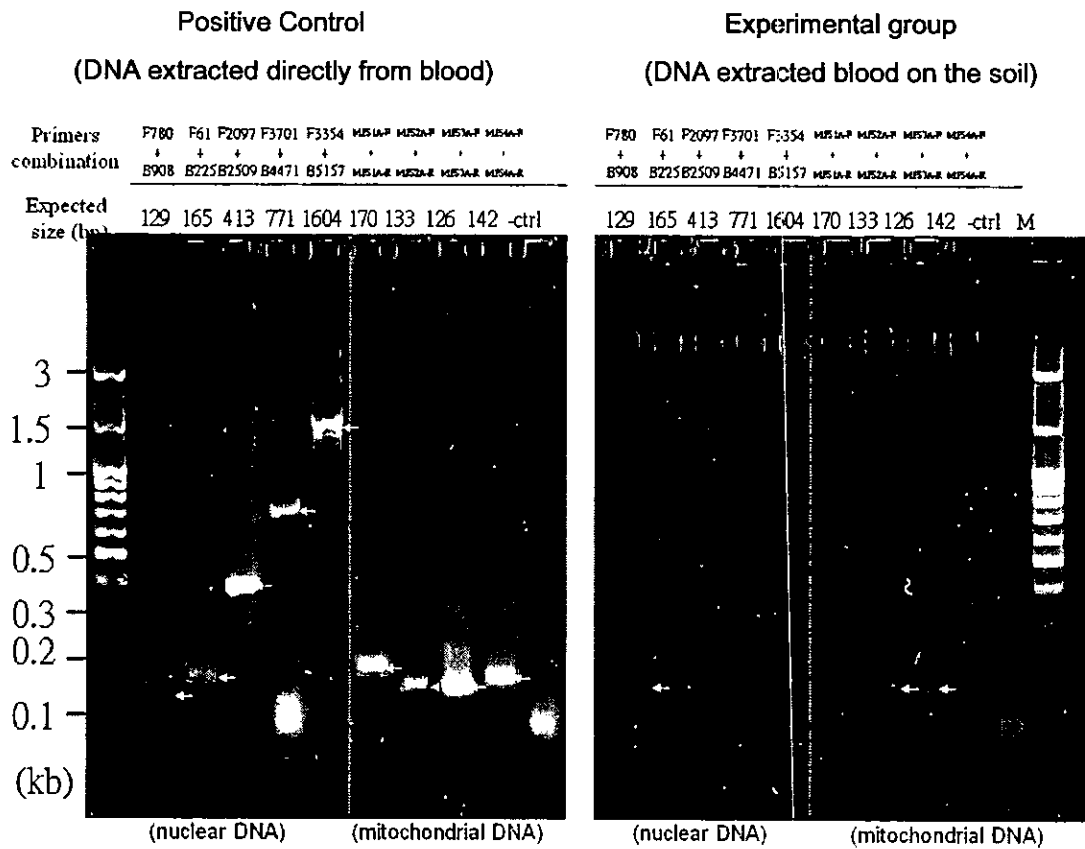
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 6. Identification of DNA-degradation degree from the Day 2 extraction with nuclear and mitochondrial primers.



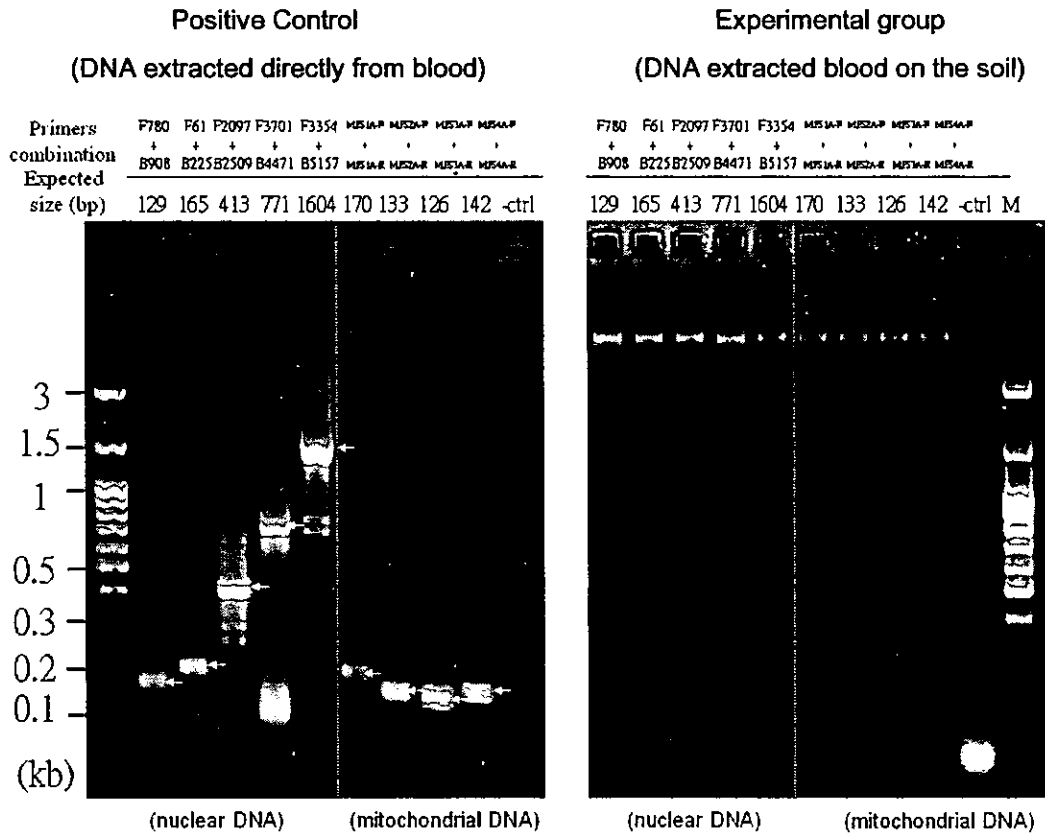
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 7. Identification of DNA-degradation degree from the Day 3 extraction with nuclear and mitochondrial primers.



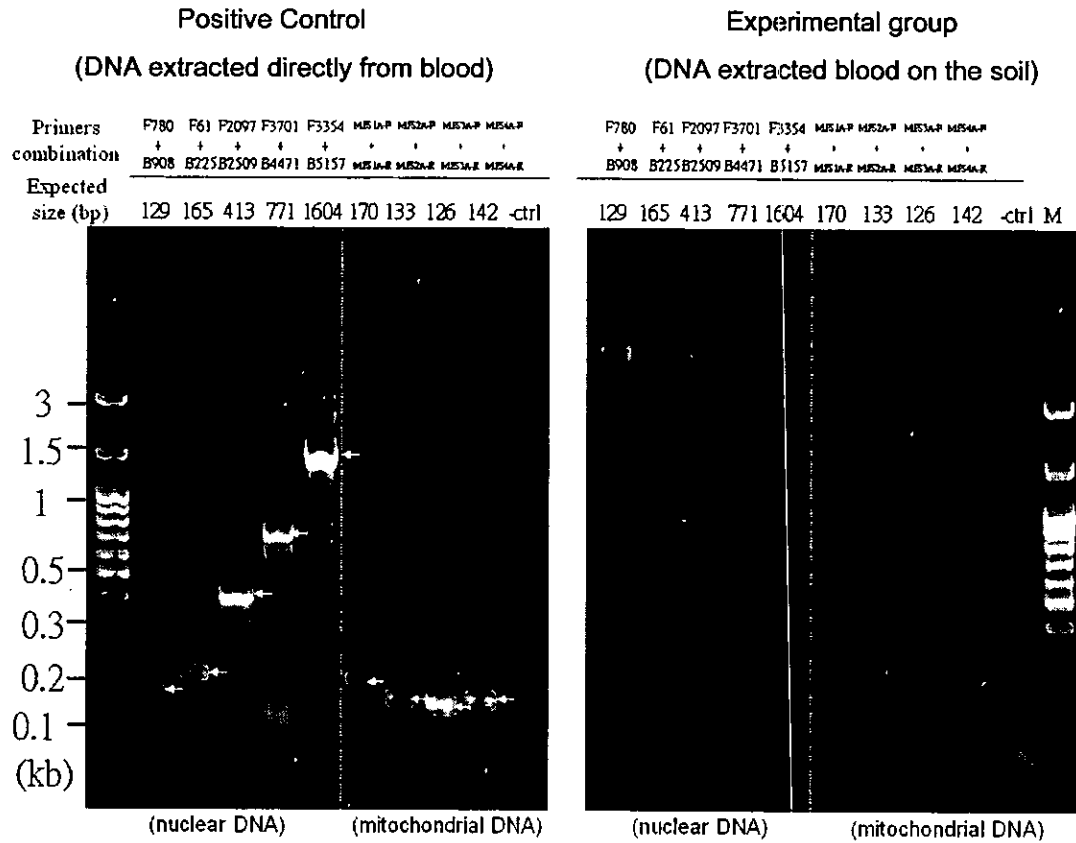
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 8. Identification of DNA-degradation degree from the Day 4 extraction with nuclear and mitochondrial primers.



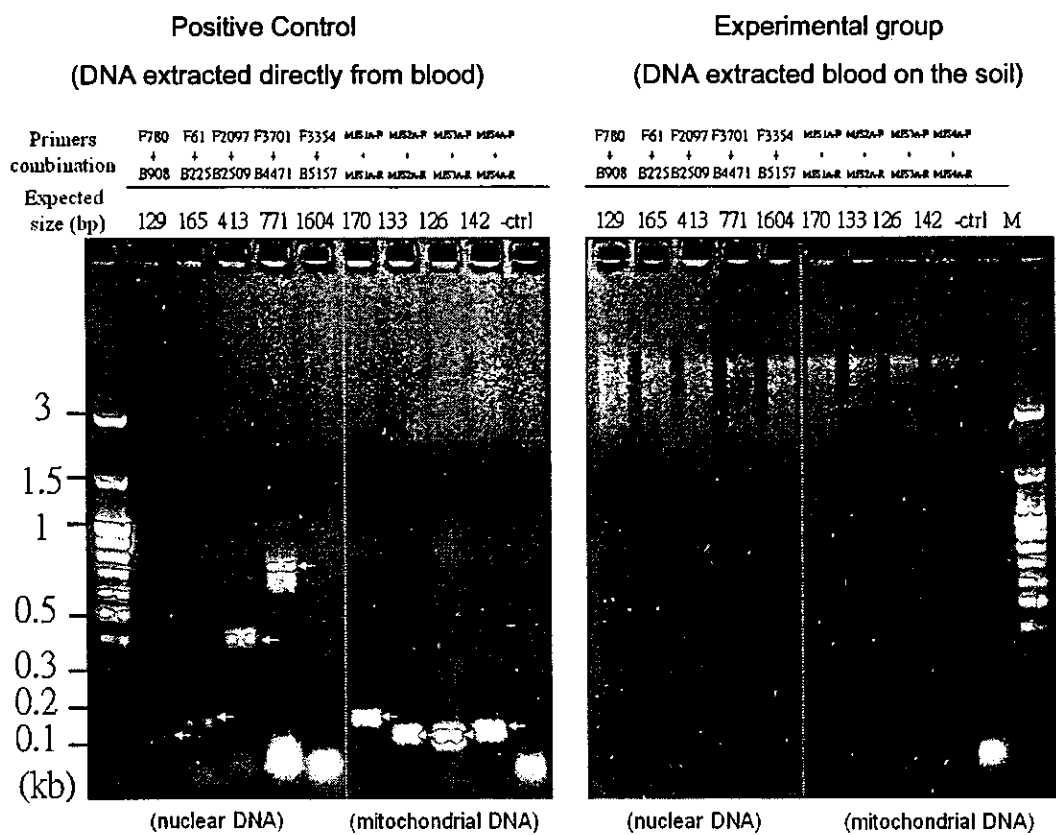
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 9. Identification of DNA-degradation degree from the Day 5 extraction with nuclear and mitochondrial primers.



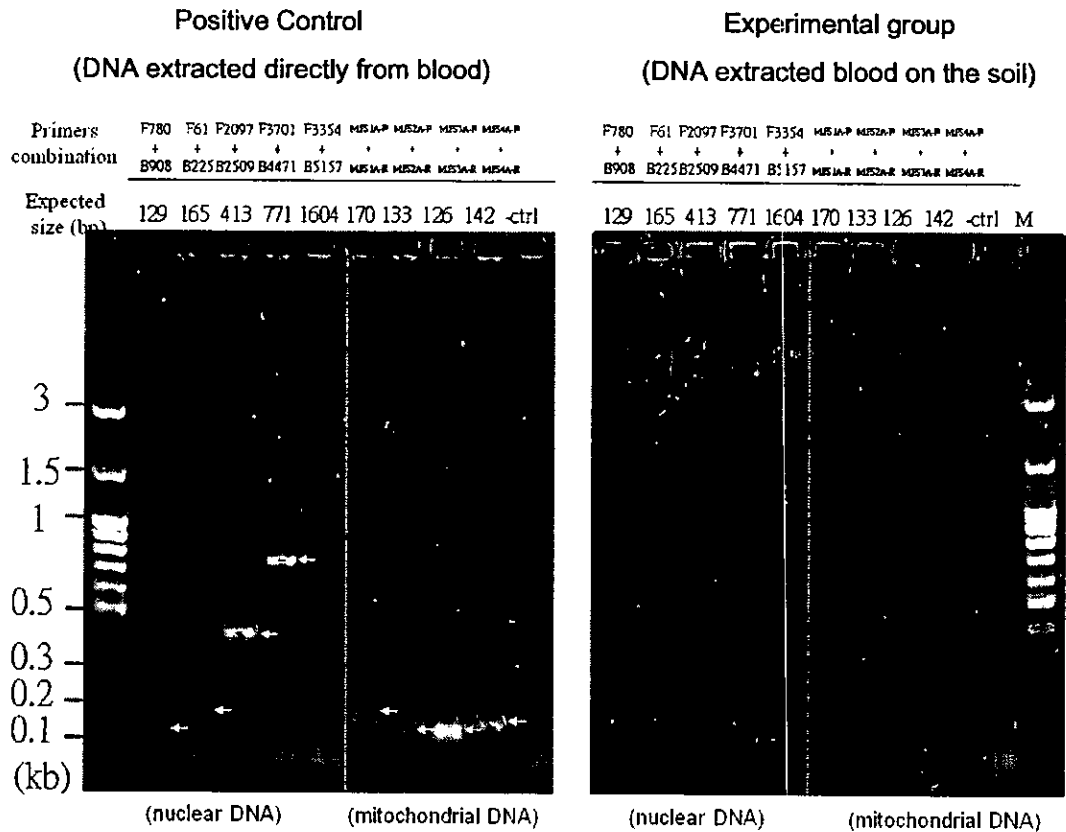
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 10. Identification of DNA-degradation degree from the Day 6 extraction with nuclear and mitochondrial primers.



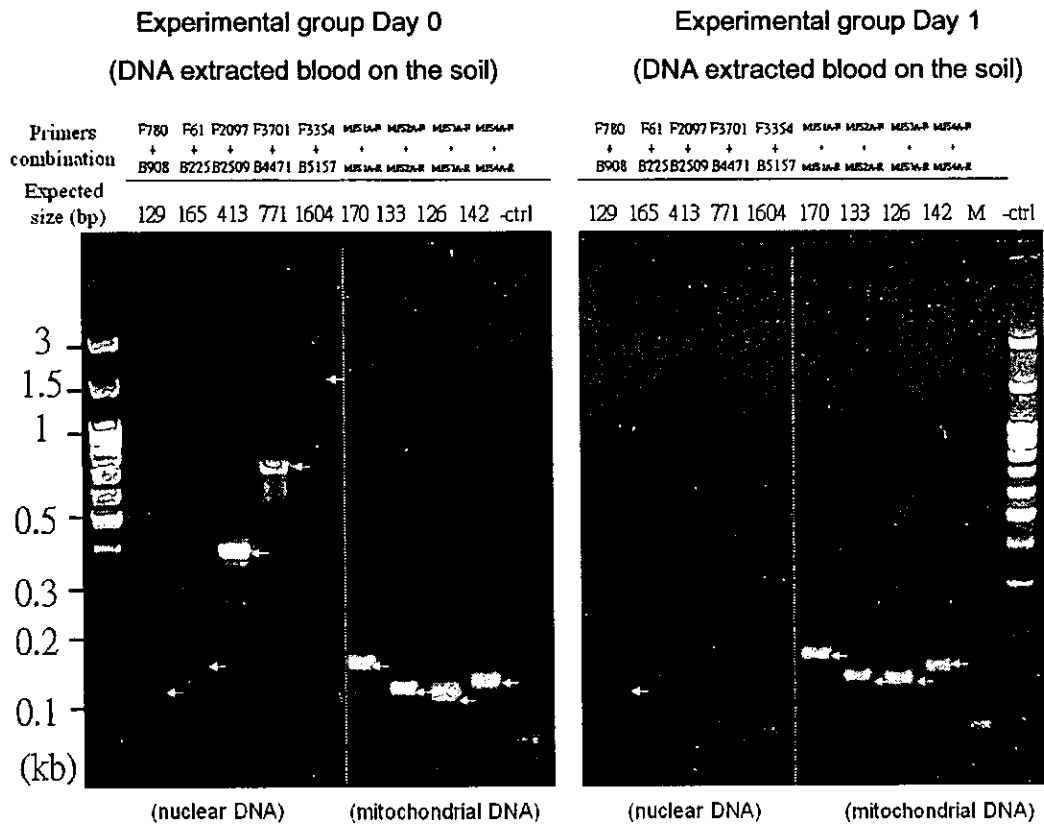
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 11. Identification of DNA-degradation degree from the Day 7 extraction with nuclear and mitochondrial primers.



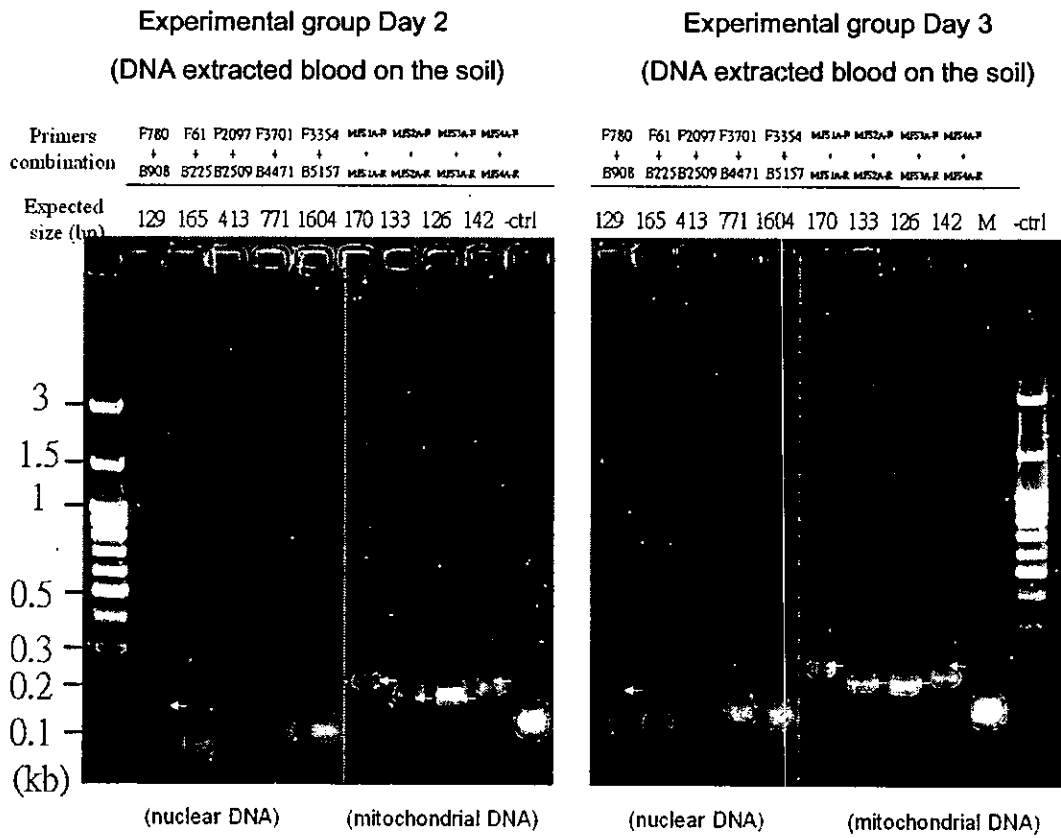
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 12. Identification of DNA-degradation degree from the Day 0-1 extraction cleaned samples with nuclear and mitochondrial primers.



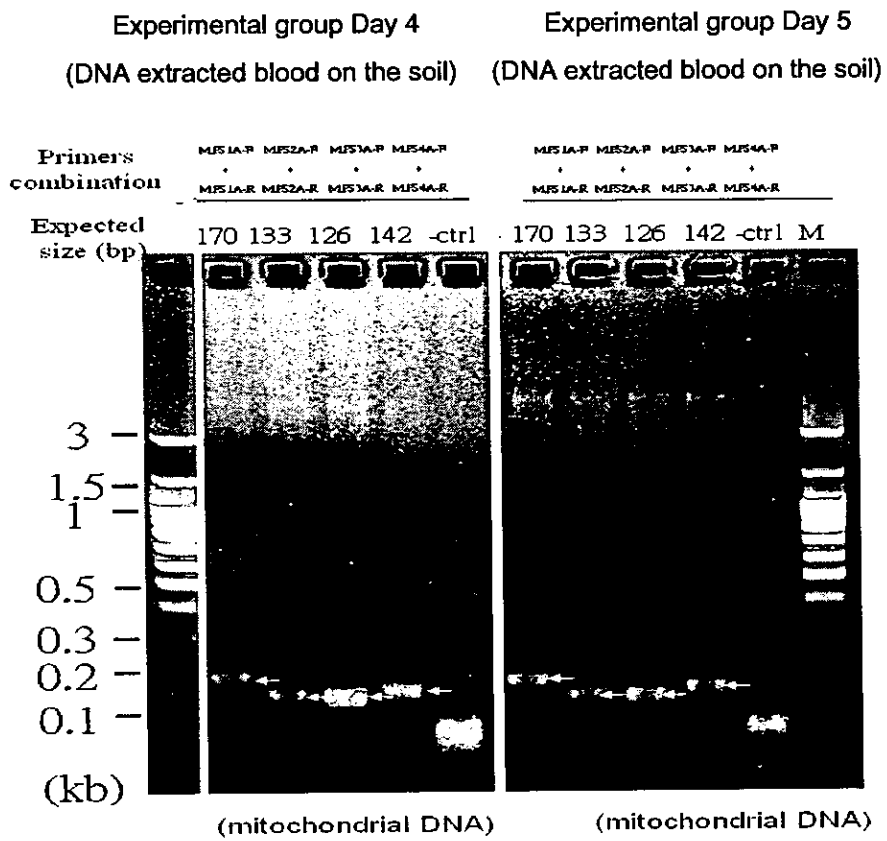
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 13. Identification of DNA-degradation degree from the Day 2-3 extraction cleaned samples with nuclear and mitochondrial primers.



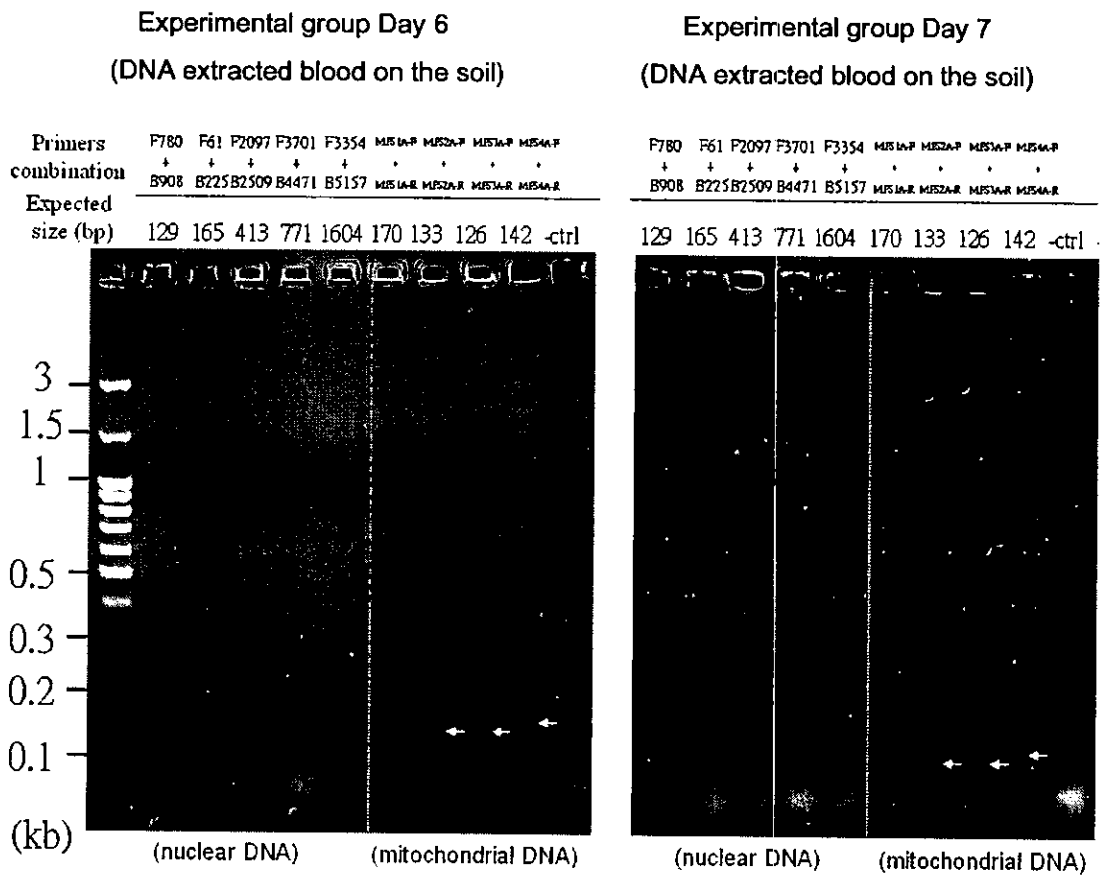
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 14. Identification of DNA-degradation degree from the Day 4-5 extraction cleaned samples with nuclear and mitochondrial primers.



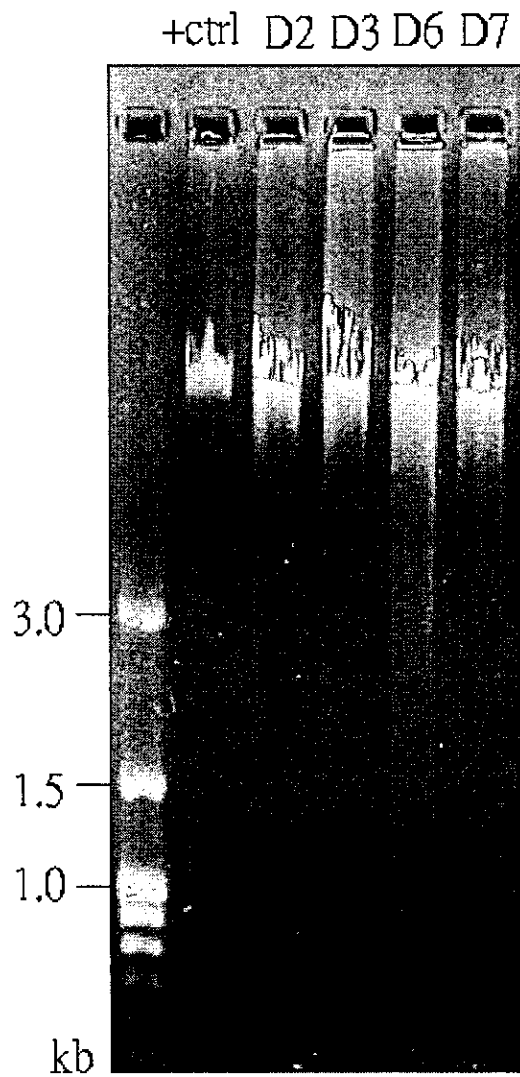
Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 15. Identification of DNA-degradation degree from the Day 6-7 extraction cleaned samples with nuclear and mitochondrial primers.



Expected size of amplicons are indicated with arrows.

Figure 16. Electrophoresis of blood DNA extracted from soil



Control (Ctrl) is DNA extracted directly from liquid blood. DNA extracted from blood stains on soil has minor smear but majority of DNA still keep intact.