·经验交流·

1 例暴露 7 年的牙齿标本的短串联重复序列分析*

张　彦,尹爱华△,杜　丽,张畅斌,李海霞(广东省妇幼保健院产前诊断中心　510010)

【摘要】 目的　提取暴露 7 年的人乳牙标本基因组 DNA,进行多重短串联重复序列片段扩增。**方法**　磨碎牙齿,脱钙后用氯仿提取 DNA,纯化后进行荧光多重聚合酶链式反应(PCR)扩增。**结果**　17 个短串联重复序列(STR)位点全部扩增成功,大片段峰值较低。**结论**　成功提取长期暴露的人乳牙标本基因组 DNA,并且成功进行 STR 位点分析。

【关键词】 牙齿;　微卫星重复序列;　聚合酶链式反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.13.045　**文献标志码:**B　**文章编号:**1672-9455(2011)13-1617-02

微卫星序列是广泛存在于人类基因组当中的一些短重复序列[1]。由于人群中不同个体同一基因的微卫星序列有别,因此,微卫星序列常被作为 DNA 指纹用于不同个体的基因分型[2]。对不同的检材进行人类基因组短串联重复序列(STR)分析结果差别较大,外周血研究较多,数据容易获得,部分罕见材料如牙齿、骨骼等材料的研究资料较少。本实验室长期从事 STR 相关研究[3-4],外周血、羊水、绒毛、毛发、口腔棉拭子、精液等标本都能得到较稳定的分型结果。本文用已有技术对 1 例暴露 7 年的乳牙标本进行基因组 DNA 提取并进行 STR 分析。

1　材料与方法

1.1　材料　EDTA-Na 购自北京鼎国生物技术公司,DTT 购自北京普博欣生物技术公司,Tris 碱购自 Sigma 公司,Bone incubation buffer 购自 Promega 公司,蛋白酶 K 购自 sigma 公司,氯仿、无水乙醇购自广州化学试剂厂,DNA 纯化试剂盒购自 TakaRa 公司,Identifiler PCR 试剂盒购自 ABI 公司。

1.2　方法　将一颗牙齿标本用洗涤剂洗涤 2 次,蒸馏水漂洗 3 次。用研钵将牙齿磨碎,平均分为两份,分别用两种骨裂解液进行下游处理。(1)EDTA-Na 脱钙 36 h;(2)分别用 3 mL Bone incubation buffer 和自行配制的骨裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,100 mmol/L NaCl,2%SDS,10 mmol/L EDTA,含 0.5 mg/mL 蛋白酶 K)1 mol/L DTT 20 μL 以及 5 mg/mL PK 150 μL,56 ℃ 水浴消化 12 h;(3)按前量补充蛋白酶 K,再消化 6 h,10 000 r/min 离心 5 min;(3)取离心后液体用氯仿抽提两次,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液用无水乙醇沉淀 DNA,离心弃上清液,70%乙醇洗沉淀两次。ddH_2O 50 μL 溶解沉淀,即为基因组 DNA,DNA 纯化试剂盒纯化基因组 DNA 即为 PCR 模板。

PCR 体系如下:ABI Master Mix 3 μL,Primer Mix 1.5 μL,DNA 2 ng,ddH_2O 补足总反应体系 7.5 μL。PCR 反应程序如下:95 ℃ 11 min;94 ℃ 1 min,59 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,循环 28 次;60 ℃ 60 min;4 ℃保温。取 PCR 产物加去离子甲酰胺以及 LIZ Standard ,高温变性后进行毛细管电泳。GeneScan Analysis v3.7 以及 Genotyper 分析数据。

2　结　　果

两种骨裂解液处理牙齿的方法均能从牙齿中提取到基因组 DNA 并且可以用于 STR 分型检测,见图 1。Identifiler 试剂盒检测从牙齿标本中提取到的 DNA 标本的 STR,图中 4 种颜色为四色荧光检测结果,每种颜色最上方一行为电泳时额外添加的 ladder,中间一行是自行配置裂解液提取 DNA 后的检测结果;最下方一行为 Promega 公司裂解液提取 DNA 后的检测结果。

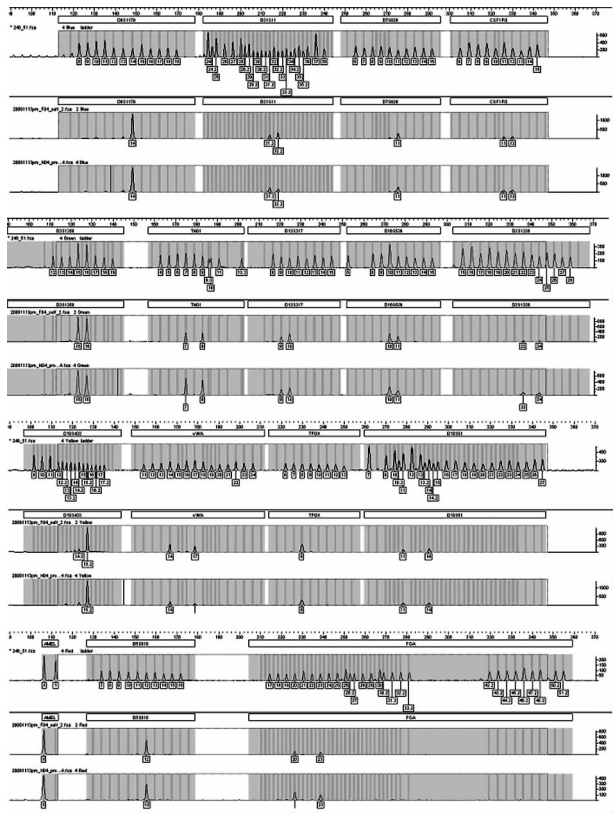

图 1　两种裂解液处理牙齿标本后 STR 分型

3　讨　　论

牙齿、骨骼等材料的 STR 分析大多应用于考古、刑侦等领域,相对于血液等标本而言,由于材质特殊,研究较少。由于大多牙齿、骨骼标本一般都得不到妥善保存,不良环境因素暴露很久以后才会被处理,牙齿等标本往往难于提取基因组 DNA,更难于进行 STR 分析。本例牙齿标本即为当事人肖某带几颗空气中暴露 7 年多的乳牙标本进行检测。根据已有文献采取数种方法提取 DNA 并进行 STR 分析,结果均不理想[5-7]。最后经 Promega 公司的骨裂解液和 sdjfa 报道的裂解液配方处

*　**基金项目:**广州市科技计划项目(2009J1-C211)。　△　**通讯作者**,E-mail:yinaiwa@126.com。

理，并进行纯化以后方得到较好的 STR 分型结果。推断类似标本脱钙时间要足够，处理过程中避免引起 DNA 再降解以及严重丢失。自行配制裂解液同样取得较好结果说明裂解类似标本需要高浓度的变性剂和蛋白酶 K 的持续作用。此外，DNA 纯化过程对于此类标本的处理至关重要，经过氯仿/乙醇提取到的 DNA 含有大量无机盐，会严重影响后续的 PCR 过程。至于不同纯化试剂盒之间的差别似乎并不明显，本实验用 Takara 公司的 PCR 产物纯化试剂盒也可以得到较好的结果。

从 STR 结果可以清晰地看到该例牙齿标本可完整地检测到 16 个基因位点，但是大片段的峰值明显低于小片段，存在峰值从小片段到大片段的坡度式降低，说明标本在 7 年多的时间当中存在保存不当，DNA 明显降解。

本实验利用自行配制的骨裂解液成功提取了暴露 7 年多的牙齿标本的基因组 DNA 并且成功地检测到了 16 个基因位点，建立了骨骼、牙齿等罕见标本的个体识别、亲权鉴定的实验室处理方法。

参考文献

[1] Bhargava A, Fuentes FF. Mutational dynamics of microsatellites[J]. Mol Biotechnol, 2010, 44(3): 250-266.

[2] Budowle B, Eisenberg AJ, Van Daal A. Validity of low copy number typing and applications to forensic science [J]. Croat Med J, 2009, 50(3): 207-217.

[3] 尹爱华，张畅斌，梁驹卿，等. 应用复合荧光标记 STR-PCR 排除绒毛取材中母体细胞污染[J]. 中山大学学报：医学科学版，2007，28(3S)：203-205.

[4] 麦明琴，吴菁，钟燕芳，等. 经腹绒毛活检术联合 STR 在孕早期产前诊断中的应用[J]. 广东医学，2009，30(8)：1097-1098.

[5] Imaizumi K, Noguchi K, Shiraishi T, et al. DNA typing of bone specimens-the potential use of the profiler test as a tool for bone identifcation[J]. Leg Med, 2005, 7(1): 31-41.

[6] 刘志芳，涂政，秦蓓蕾，等. 土埋 17 年尸体牙齿 DNA 检验 1 例[J]. 中国法医学杂志，2008，23(1)：55.

[7] 涂政，刘志芳，陈松，等. 牙齿的 DNA 提取及 STR 分型研究[J]. 刑事技术，2007(5)：9-11.

（收稿日期：2011-02-23）

门诊电子医嘱和样本管理系统的开发与应用

吴元健（江苏省苏州市立医院本部检验科　215002）

【摘要】 目的　建立一套较完善的门诊电子医嘱和样本管理模式。**方法**　通过门诊电子医嘱模块、指引单模块、样本管理模块软件的技术研发，对门诊电子医嘱和样本管理系统进行开发应用。**结果**　门诊电子医嘱和样本管理系统不仅实现了检验项目的电子开单和检验流程的无纸化，指引单还实现了个性化的患者准备告知的功能，并对样本采集、运送与接收整个过程做到实时监控。**结论**　研发的门诊电子医嘱和运用全信息条码的样本管理系统完全改变了原有的检验流程，改变后操作流程更加科学，工作效率、科室管理水平大幅提高。

【关键词】 门诊电子医嘱；　样本管理系统；　条形码；　无纸化；　分析前质量控制

DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2011.13.046　**文献标志码：**B　**文章编号：**1672-9455(2011)13-1618-03

实现医学检验的网络化、规范化、数字化以及全实验室自动化已成为建设现代化数字医院必不可少的条件。随着医院信息化建设的逐步推进以及临床实验室的发展，目前很多医院都应用了实验室信息系统，其中部分实验室在系统中还引入了对标本的条形码管理，在实际应用中很大程度地提高了工作效率。但无论是从管理、质量保证上，还是从智能化角度上看，还缺乏深层次的应用[1]。本院于 2008 年初通过检验软件的技术开发，实现检验项目的电子开单，充分利用全信息条码标签来实现检验流程的无纸化，通过指引单实现了个性化的患者准备告知等等功能，对门诊电子医嘱和样本管理系统进行了开发应用。经过几年的运行与完善，形成了一套较完善的门诊电子医嘱和样本管理模式。现总结介绍如下。

1　材料与方法

1.1　门诊检验基本流程　门诊患者先挂号就诊后，由门诊医生开具电子申请单；门诊患者交费后，在打印发票的同时打印检验指引单（带条形码）；根据指引单的提示到指定的检验窗口留取样本；检验窗口扫描指引单，打印出两张条码，即检验科使用的全息条码与给患者的取报告凭证；检验科标本接收中心接收标本并分离后送不同的检验部门；相应部门根据条码扫描出样本的相关信息，并将样本进行检测，仪器与电脑可进行数据双向通信；结果经审核后签发；患者可以凭取报告凭证在自助报告单机上打印检验报告。

1.2　门诊电子医嘱模块　包括各种不同需求检验申请单的流程设计，如：普通门诊患者申请单、健康体检者申请单、特诊患者申请单、门诊转诊申请单、特殊申请单等。

1.3　指引单模块　指引单包含患者基本信息、检验项目、患者准备告知、检验部门的地点及工作时间等等。

1.4　样本管理模块　具有从采用、交接、检验，直到报告的全过程管理的功能，对各节点都有时间控制与提醒。

2　结　　果

2.1　门诊电子申请单　在本院系统研发实施的过程中，对医生开检验单时可能遇到的问题进行了详细的分析，在解决问题的过程中，使流程得到优化控制。

2.1.1　各种不同需求检验申请单的流程设计

2.1.1.1　普通门诊患者申请单流程　即门诊检验基本流程。

2.1.1.2　健康体检者的申请单流程　体检者在体检系统中登记基本信息后，根据所选择的检验套餐，在系统中生成检验单申请明细；体检者凭体检条码到指定的窗口留取样本；检验部门在接收样本的同时，扫描体检者的条码，通过与体检系统的接口调取体检者的信息与检验项目，并打印样本条码；检验结