

· 生物技术与方法 ·

hLCN6 单克隆抗体偶联免疫磁珠用于混合细胞中精子的分离与法医学鉴定

陈炯, 冯巍, 詹飞

河南科技大学 法医学院, 河南 洛阳 471023

陈炯, 冯巍, 詹飞. hLCN6 单克隆抗体偶联免疫磁珠用于混合细胞中精子的分离与法医学鉴定. 生物工程学报, 2019, 35(1): 150-158.

Chen J, Feng W, Zhan F. Separation and forensic identification of sperm from cell mixtures using anti-hLCN6 monoclonal antibody coupled magnetic beads. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 150-158.

摘要: hLCN6 (Human lipocalin 6) 是附睾特异性分泌蛋白, 它能与精子结合, 对精子的成熟发挥着重要作用。为了探究应用抗 hLCN6 单克隆抗体偶联免疫磁珠技术分离混合细胞中精子的可行性, 建立混合斑中精子细胞分离的新方法, 制备了不同比例的精子-上皮细胞混合悬液及混合斑样本, 以生物素标记的 hLCN6 单克隆抗体孵育样品, 再用亲和素包被的免疫磁珠捕获分离精子细胞, 提取精子 DNA 进行 PCR-STR (Short tandem repeat) 分型, 同时以差异裂解法提取精子, 比较两者的差异。经 ELISA 检测, hLCN6 单克隆抗体与抗原的亲和力解离常数 (K_d) 为 3.47×10^{-9} mol/L。免疫印迹和免疫荧光结果显示, hLCN6 在精子中可检测到, 主要定位于精子头部的顶体后区域, 但不能在上皮细胞中检测到。hLCN6 抗体偶联的免疫磁珠复合物能够实现精子细胞的捕获和分离, 显微镜观察显示免疫磁珠能够与精子头部特异性结合。对精子个数为 10^3 /mL 的混合悬液, STR 分型成功率 (正确分型 13 个以上, RFU>200) 为 90%。当精子数量 $\geq 10^4$ /mL 时, 分型成功率达 100%; 对精子数分别为 10^3 /mL、 10^4 /mL、 10^5 /mL 的混合斑 STR 分型成功率分别为 40%、90% 和 100%。综上, hLCN6 抗体偶联免疫磁珠法可以有效分离混合细胞中的精子, 分型成功率高于传统的差异裂解法。该方法简单高效, 可作为性侵案件中法医混合斑检验的有效补充手段。

关键词: hLCN6, 免疫磁珠, 混合斑, 精子, PCR-STR

Received: March 9, 2018; **Accepted:** May 30, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81501634), Key Scientific Research Project of Higher Education of Henan Province (No. 15A340001), Youth Scientific Fund of Henan University of Science and Technology (No. 2015QN043).

Corresponding author: Jiong Chen. Tel: +86-379-64830344; Fax: +86-379-64820696; E-mail: chenjjiong2004@hotmail.com

国家自然科学基金 (No. 81501634), 河南省高等学校重点科研项目 (No. 15A340001), 河南科技大学青年科学基金 (No. 2015QN043) 资助。

网络出版时间: 2018-06-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180622.1455.005.html>

Separation and forensic identification of sperm from cell mixtures using anti-hLCN6 monoclonal antibody coupled magnetic beads

Jiong Chen, Wei Feng, and Fei Zhan

Department of Forensic Biology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

Abstract: Human lipocalin 6 (hLCN6) is an epididymis-specific secretory protein. It binds to sperm and plays important role in sperm maturation. To explore the feasibility for isolating spermatozoa from mixed cells using anti-hLCN6 monoclonal antibody-conjugated immunomagnetic beads (anti-hLCN6 IMBs) and establish a new method for the separation of sperms from mixed stains, 2 sets of 30 cases of cell mixture suspensions and stains containing different proportions of sperm and epithelial cells were prepared. Biotin-labeled anti-hLCN6 monoclonal antibody (mAb) was incubated with the cell mixtures, and the spermatozoa were then isolated with avidin-coated IMBs. Sperm DNA was extracted and analyzed by PCR-STR typing. Differential lysis was also conducted to compare the effect of the two different isolation methods. The dissociation constant (K_d) of anti-hLCN6 mAb was 3.47×10^{-9} mol/L measured by ELISA. Western blotting and immunofluorescence assays showed that hLCN6 was detectable on sperm cells and mainly located on the post-acrosomal region of the sperm head, but not in epithelial cells. Anti-hLCN6 IMBs could capture and separate the sperm cells successfully. Microscopic observation showed that the IMBs could bind to the head of sperm specifically. The success rate of STR typing (more than 13 STR loci, RFU>200) was 90% when the number of sperm cells was 10^3 /mL and 100% when the sperm cells number was equal to or more than 10^4 /mL. When the number of sperm cells was 10^3 /mL, 10^4 /mL and 10^5 /mL in mixed stain samples, the success rate of STR typing were 40%, 90% and 100%, respectively. Taken together, the anti-hLCN6 immunomagnetic beads (IMB) method described here could be effective for the isolation of sperm from mixed cells, and the success rate was higher than that of the traditional differential lysis strategy. IMB sorting is a simple and efficient method for the separation of sperms from sperm and epithelial cell mixture, and can be utilized as a supplementary method for forensic mixture samples analysis in sexual assault cases.

Keywords: hLCN6, immunomagnetic beads, mixed stain, sperm cell, PCR-STR

在性犯罪案件中,从受害人处收集的检材多是来自受害者和施暴者各种细胞和体液的混合物(混合斑)^[1-3]。此类案件中,精液或精斑作为重要的法医物证检材,通常伴随受害者的生物样本成分的存在。为了确认罪犯,法医学者尝试将混合物中的男性和女性细胞分离以获取嫌疑人的DNA图谱。根据细胞的形态、大小、比重及膜成分差异等,人们建立了从含有阴道上皮细胞的混合物中分离精子的多种方法,包括差异裂解法、滤膜法、激光捕获显微切割法和流式细胞分选法等^[4-7]。差异裂解法是从阴道拭子中分离精子DNA的传统方法。该方法利用精子和上皮细胞外膜特性的不同,将精子DNA与体细胞分离。此法的缺点是耗时长且自动化程度低^[8]。激光捕获显微切割法实现了精子与上皮细胞的精准分离,但成本昂贵,难以普及^[9-10]。此外,基于上皮细胞与精子沉降速率的差异, Horsman

等研发了微流控芯片技术,实现了精子的快速分离,但该装置工艺复杂,只适用于少数细胞类型的分离^[11-12]。因此,建立一种简便高效的精子分离方法仍是法医学急需解决的难题。

近年来,利用针对精子特异性蛋白的抗体结合免疫磁珠(IMB)技术,为精子分离提供了一种可供选择的方法。Li等^[13]研究发现利用精子运动结构域蛋白3(MOSPD3)抗体包被的磁珠可分离混合细胞中的精子,在精子浓度 $\geq 10^5$ /mL时,可获得完整的男性DNA图谱。Zhao等^[14]用抗精子特异性透明质酸酶(PH-20)抗体制备IMB,在混合物中精子/上皮细胞比例为 $10^3:10^5$ 时成功分离出精细胞。IMB法用于混合斑检验,依赖于与精子头部抗原特异性结合的抗体,因此寻找合适的抗体成为必由之路。人载脂蛋白6(Human lipocalin 6, hLCN6)是新发现的载脂蛋白家族成

员, 它由附睾分泌且能与精子结合, 与精子的成熟有关^[15]。用 RNA 干扰的方法将大鼠体内载脂蛋白 6 (rLcn6) 的表达抑制后, 精子的活力降至原来的 10% 以下 (结果未发表)。虽然 hLCN6 与精子相互作用的分子机制尚不清楚, 但根据其在精子上呈现的离散型斑点状分布模式, 人们推断 hLCN6 极有可能是通过和精子表面特异性受体之间的相互作用而结合到精子上。hLCN6 因其在附睾中的特异表达及所具有的生物功能在生殖医学领域受到重视, 而 hLCN6 能够与精细胞结合的特性, 使其作为特异性生物标记用于法医学精细胞鉴定以及混合斑中精细胞的分离成为可能。本实验室曾以原核表达纯化的 hLCN6 蛋白为抗原, 成功获得了抗 hLCN6 单克隆抗体 (anti-hLCN6 mAb)^[16]。在此基础上, 本研究进一步将抗体偶联到 IMB 上, 以期分离捕获混合细胞中的精子, 尝试建立混合细胞体系内精子分离的新方法。

1 材料与方 法

1.1 材料及仪器

按照知情同意的原则, 实验用精液样本及女性口腔上皮细胞样本, 分别由本实验室 10 名健康成年男性和 10 名女性志愿者提供。蛋白酶 K 和二硫苏糖醇 (DTT) 购自 TaKaRa 公司; QIAamp DNA 微量提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; AmpFlSTR Identifiler Plus PCR 扩增试剂盒购自美国 ABI 公司; 膜蛋白提取试剂盒购自美国 Biovision 公司; Sulfo-NHS-LC-Biotin、BCA 蛋白定量试剂盒和增强型化学发光底物 (ECL) 购自 Pierce 公司; 透析袋购自美国 Viskase 公司; Dynabeads FlowComp Flexi 试剂盒与 RNase-free DNase I 购自 Thermo Fisher 公司; 鼠抗人 β -肌动蛋白 (β -actin) mAb 购自美国 Cell Signaling 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG 和 Dylight 488 荧光标记羊抗鼠二抗购自武汉博士德公司; Prolong 抗荧光衰减封片剂购自美国 Life Technologies 公司; 其

余各种化学试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司。

Centrifuge 5810R 型低温冷冻高速离心机和 Thermomixer comfort 恒温混匀仪购自 Eppendorf 公司; OmegaLum G 型凝胶成像分析仪购自美国 Aplegen 公司; Sunrise 型 96 孔酶标仪购自 TECAN 公司; 3130XL 遗传分析仪购自美国 ABI 公司; MagneSphere 磁分离架购自美国 Promega 公司。

1.2 抗 hLCN6 mAb 亲和力的测定

利用间接 ELISA 法测定抗 hLCN6 mAb 的亲合力, 以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组蛋白 His-hLCN6 包被酶标板, 封闭后加入倍比稀释的 mAb, 以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 酶标仪读取 OD_{450} 吸光值。当连续几个稀释度的 OD_{450} 读数不再增大时视为抗原抗体 100% 结合, 以抗体浓度 (mol/L) 为横坐标, OD_{450} 吸光值为纵坐标做散点图, 生成对数趋势线和公式。将 OD_{450} 最大值的一半代入公式, 求出此时的抗体浓度即为 mAb 的亲合力解离常数 (K_d)^[17-18]。

1.3 精子与口腔上皮细胞混合悬液及混合斑的制备

精液在射精后 30 min 内经 PBS 洗涤 3 次去除精浆及其他成分, 用细胞计数板计数确定单位体积内精子数量, 以 PBS 缓冲液倍数稀释, 分别配制成精子数为 $10^3/\text{mL}$ 、 $10^4/\text{mL}$ 、 $10^5/\text{mL}$ 的 3 组悬液。取女性志愿者口腔拭子, 用 PBS 缓冲液洗脱后, 在显微镜下计数, 制成 $10^4/\text{mL}$ 的上皮细胞悬液。同时取每位志愿者血样作为 DNA 分型对照样本。

取 1 mL 上皮细胞悬液加入到 1 mL 已制备的不同数目的精子悬液中混匀, 8 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 制成含约 10^4 个上皮细胞、精子数分别为 10^3 、 10^4 、 10^5 个的混合悬液 (1 mL) 3 组各 10 份备检。同法配制上述混悬液各 1 mL, 8 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 沉淀加 50 μL PBS 重悬后滴于纱布上模拟制作混合斑。

1.4 免疫印迹检测

取精子 ($10^5/\text{mL}$) 和口腔上皮细胞 ($10^4/\text{mL}$)

悬液各 10 份,用膜蛋白提取试剂盒提取精子细胞膜蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,每份样品取等量 (80 μg) 进行 SDS-PAGE,200 mA 恒电流转膜 1 h。含 5%脱脂奶粉的 PBST 溶液 (含 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液) 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,加 hLCN6 mAb (1 : 20 000 稀释) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 5 000 稀释) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, ECL 显色后进行成像分析。用 β -actin 作为内参。

1.5 免疫荧光检测

将冷冻保存的精子用 PBS 洗涤,2%多聚甲醛固定 15 min 后,将精子在含 50 mmol/L 甘氨酸的 PBS 中洗涤 3 次,沉淀重悬于 PBS 中,调至 $10^7/\text{mL}$ 。取 1 滴细胞悬液做涂片,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。染色当天,将精子在 PBS 中再水化 15 min,用含 4%山羊血清的 PBS 封闭 15 min。将精子与 1 : 500 稀释的抗 hLCN6 mAb 孵育 1 h。经 PBS 洗涤后加入 1 : 500 稀释的荧光标记二抗,室温孵育 60 min,洗涤后用抗荧光衰减封片剂封片,荧光显微镜下观察结果。用免疫前小鼠 IgG 作为对照。在光镜下 (400 \times),随机选取 6 个视野,每个视野计数 50 个细胞中阳性细胞数,计算平均阳性率^[19]。

1.6 IMB 分离混合细胞中的精子

1.6.1 hLCN6 抗体的生物素标记

向 hLCN6 mAb (5 mg/mL) 中加入 Sulfo-NHS-LC-Biotin,按试剂盒说明书的操作步骤,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 72 h,将反应产物转移到透析袋中,加 PBS 缓冲液 (1 L) 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。

1.6.2 精子细胞的捕获与分离

向制备好的精子与上皮细胞混合液 (混合斑使用前用 PBS 洗脱细胞) 中加入 2 μL 生物素标记的抗体,置于恒温混匀仪上,37 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 孵育 1 h,2 000 r/min 离心 8 min,弃上清后沉淀用 500 μL PBS 洗涤 3 遍。用 100 μL PBS 重悬细胞,并加入 20 μL 链酶亲和素包被的磁珠,5 $^{\circ}\text{C}$ 、30 r/min 孵育 15 min。将抗体和 IMB 的悬液用磁分离架吸

附 5 min,吸弃上清后加入 200 μL 预冷 PBS 洗涤 3 次,取 2 μL 悬液涂片镜检;用磁分离架吸附 5 min,吸弃上清后加入 500 μL 洗脱缓冲液洗脱并回收精子,后用 DNase I 处理样品去除女性 DNA (具体参照说明书)。

1.7 差异裂解法

按 GA/T383 2002 差异裂解法,提取 1.3 中制备的另一组混合悬液或混合斑,第一步消化后回收精子。

1.8 DNA 提取、扩增及检测

将志愿者血样以及上述回收的精子按 QIAamp DNA 微量提取试剂盒操作步骤分别提取 DNA,应用 Identifiler Plus 试剂盒进行 PCR 复合扩增,PCR 产物用 3130XL 遗传分析仪进行电泳分离,电泳结果用 GeneMapper ID v3.2 软件分析。

1.9 统计学分析

以志愿者血样的 DNA 分型作为参考,计算 IMB 分离法及差异裂解法得到的单一男性分型个数,同时统计每个样本正确分型的基因座数,以正确分型 13 个以上、基因座峰值在 200 相对荧光单位 (Relative fluorescence units, RFU) 以上为检测成功。对两种方法的结果采用 SPSS 20 统计学软件进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 抗 hLCN6 mAb 亲和力的测定

利用间接 ELISA 方法测定抗 hLCN6 mAb 的亲合力,结果表明该抗体与抗原的亲合力解离常数 (K_d) 为 3.47×10^{-9} mol/L (图 1)。

2.2 hLCN6 在精子及上皮细胞中的免疫印迹分析

采用 Western blotting 对不同个体的精子细胞进行检测,各样本均检出 hLCN6 蛋白,分子量约为 16 kDa,与蛋白已知分子量相一致。而口腔上皮细胞中无 hLCN6 蛋白的表达 (图 2)。

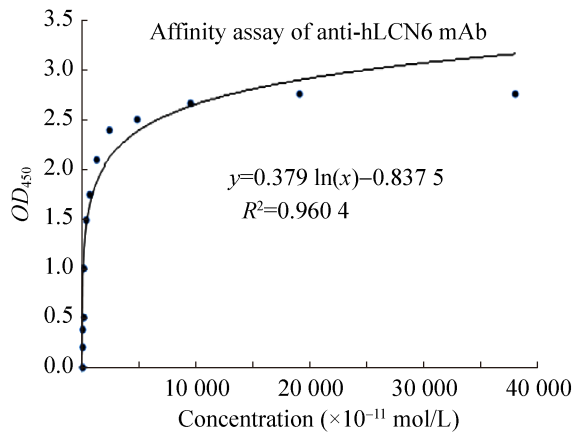


图 1 抗 hLCN6 mAb 亲和力测定

Fig. 1 Affinity assay of anti-hLCN6 mAb.

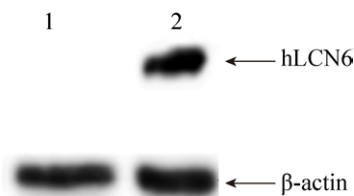


图 2 Western blotting 检测 hLCN6 在精子及口腔上皮细胞的表达

Fig. 2 Western blotting analysis of hLCN6 expression in spermatozoa and buccal epithelial cells. 1: buccal epithelial cells; 2: spermatozoa.

2.3 hLCN6 的精细胞定位

用纯化的抗 hLCN6 mAb 对精子进行免疫荧光染色, 结果显示, 在精子头部的顶体后区域出现明显的荧光信号 (图 3), 证明 hLCN6 蛋白主要分布在精子头部, 这与之前文献报道一致。与 hLCN6 蛋白结合的精子阳性率为 $(90\pm 5)\%$ ($n=6$)。而对照抗体染色的精细胞头部为阴性。

2.4 Anti-hLCN6 IMBs 捕获精子情况

将生物素标记的抗 hLCN6 mAb 包被 IMBs, 与细胞混合悬液进行孵育, 充分洗涤后将样品制备成涂片进行显微观察。显微镜下见精子结构完整, 每个精子可结合多个磁珠, 主要结合在精子头部 (图 4)。镜下未检测到口腔上皮细胞。

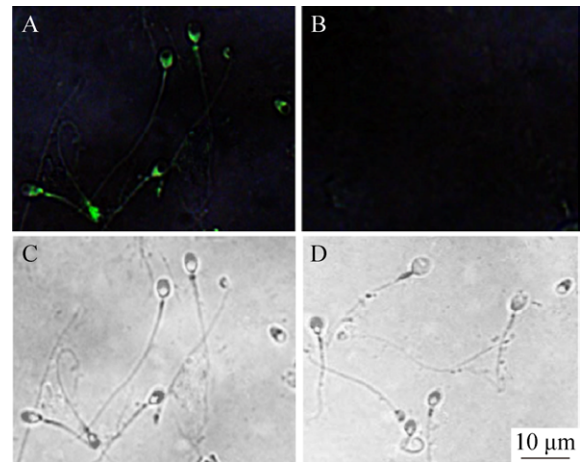


图 3 抗 hLCN6 mAb 的免疫荧光染色分析

Fig. 3 Immunofluorescence analysis of anti-hLCN6 mAb staining in sperm cells. (A) Immunofluorescent staining of spermatozoa with anti-hLCN6 mAb. (B) Control immunofluorescent staining of spermatozoa with normal mouse IgG. (C, D) Sperm cells observed under a light microscope.

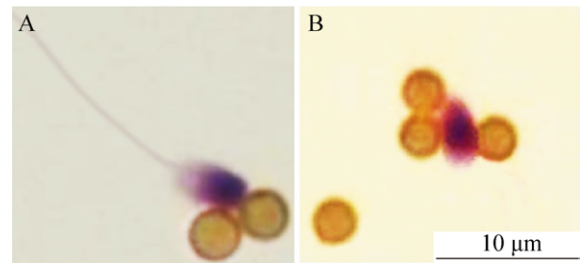


图 4 显微镜观察 anti-hLCN6 IMBs 捕获精子情况

Fig. 4 Optical microscopy image for intact (A) and tail-lost sperm cell (B) captured by anti-hLCN6 IMBs (400 \times).

2.5 IMB 法和差异裂解法分离精子 DNA 分型检测情况

为了检测 anti-hLCN6 IMBs 分离精子的效率和灵敏度, 制备了一系列不同比例的精子-上皮细胞混合悬液和混合斑, 分别用 IMB 法和差异裂解法对样品中的精子进行分离回收, 提取精子 DNA 后进行 PCR-STR 分型检验, 统计结果见表 1。当混合细胞中精子数量为 $10^3/\text{mL}$ 时, 10 份样品中 9 份得到成功分型, 成功率为 90%, 而差异裂解法分型成功率仅为 40%, 两者具有显著差异 ($P<0.05$, 图 5, 表 1)。精子细胞数为 $10^4/\text{mL}$ 和 $10^5/\text{mL}$ 时,

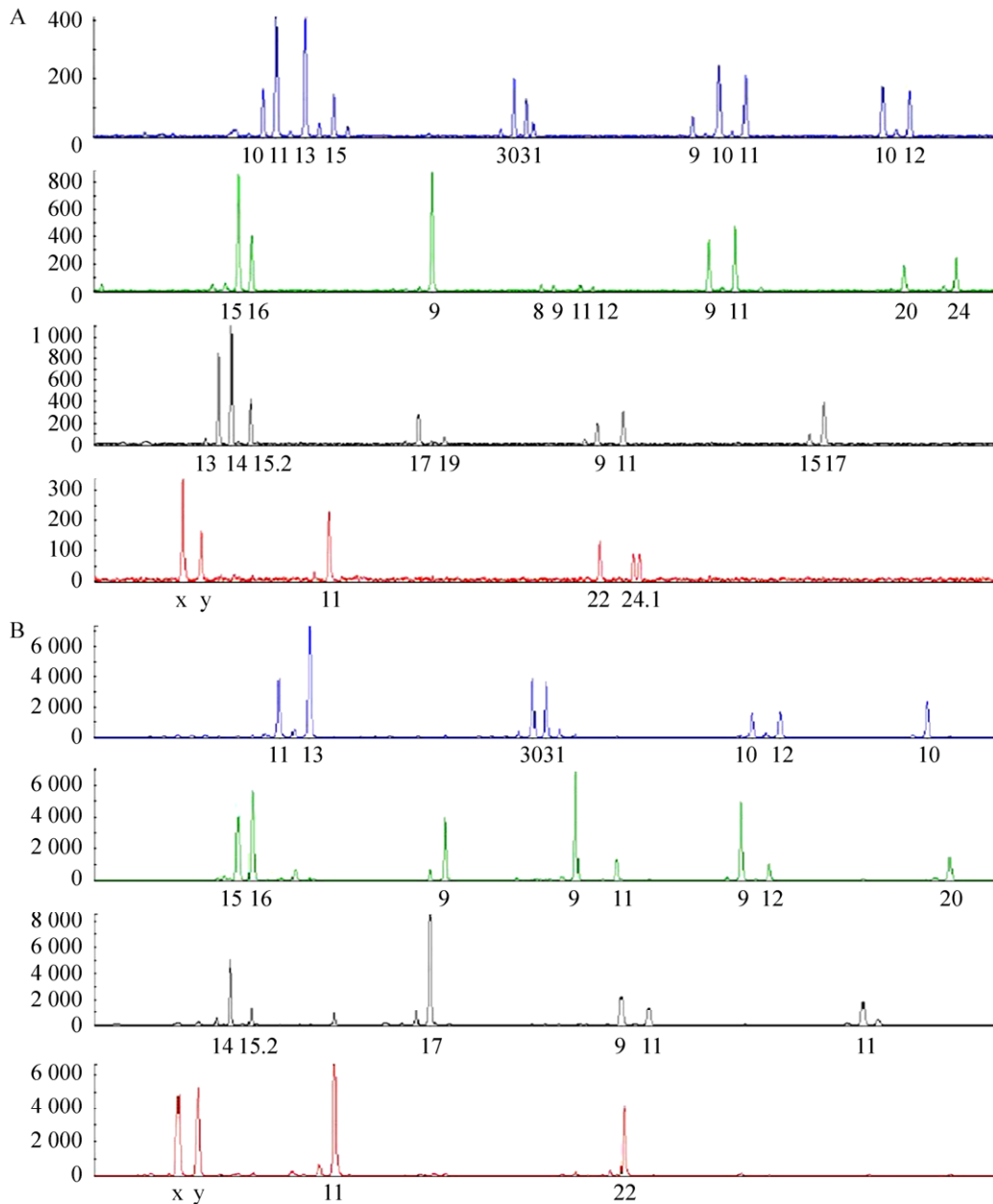


图 5 混合细胞悬液中精子分离的 STR 分型检测结果

Fig. 5 STR typing of spermatozoa isolated from mixed cell suspensions. Sperm cells were separated with common differential lysis (A) and anti-hLCN6 mAb IMBs-based method (B). Female epithelial cell and sperm concentrations were $10^4/\text{mL}$ and $10^3/\text{mL}$, respectively.

IMB 法检测的单一男性 13 个 STR 基因座的正确分型率均为 100%，两种检测方法成功率无明显差异 ($P>0.05$)。不同数量的精子 ($10^3/\text{mL}$ 、 $10^4/\text{mL}$ 、 $10^5/\text{mL}$)与上皮细胞混悬液制作的混合斑中，IMB 法检测的各组样本 13 个 STR 基因座的单一男性

正确分型率分别为 40%、90%和 100%，每组的 10 份样品中分别有 0、4、10 份样品获得了单一男性 16 个 STR 基因座的正确分型 (表 2)。对于相同精子数量的混合悬液及混合斑，IMB 法的 STR 检出率均高于差异裂解法 (表 1、2)。

表 1 不同精子数的细胞混悬液中精子 DNA 的 STR 基因座检出数

Table 1 Number of STR loci successfully amplified from cell mixture suspensions with different sperm cells number

Sperm concentration	Anti-hLCN6 IMBs					Differential lysis				
	16	15	14	13	<13	16	15	14	13	<13
10 ³ /mL	2	2	2	3	1	0	1	1	2	6
10 ⁴ /mL	9	1	0	0	0	5	2	1	1	1
10 ⁵ /mL	10	0	0	0	0	8	1	1	0	0

表 2 不同精子数的模拟混合斑中精子 DNA 的 STR 基因座检出数

Table 2 Number of STR loci successfully amplified from simulated mixed stains with different sperm cells number

Sperm concentration	Anti-hLCN6 IMBs					Differential lysis				
	16	15	14	13	<13	16	15	14	13	<13
10 ³ /mL	0	0	2	2	6	0	0	1	1	8
10 ⁴ /mL	4	2	2	1	1	1	1	3	3	2
10 ⁵ /mL	10	0	0	0	0	6	2	2	0	0

3 讨论

由精液和阴道分泌液组成的混合斑是性侵案件中最常见的生物学检材, 如何从男女混合成分中分离出单一男性成分并进行 DNA 分型, 是法医物证检验中急需解决的难题^[20-21]。近年来, IMB 技术凭借其快速、简单、高效等特点, 已被广泛应用于生物医学领域的研究, 包括微生物的免疫检测、肿瘤细胞分选以及生物大分子的分离纯化等^[22-23]。法医学也尝试将该方法用于混合斑中精子的分离检测并取得了良好的结果。Arthur 等^[24]用 MHS-10、NUH-2、HS-21 三种抗体分别与磁珠偶联, 实现了精子的特异性捕获, 其中 MHS-10 磁珠的捕获率最高。Anslinger 等^[25]针对精子表面血管紧张素转化酶 (tACE) 抗原筛选抗体制备免疫磁珠, 其中 4E3 抗体捕获效果最好, 对含有 10⁶ 个精子的混合斑捕获效率接近 100%。张尔力等^[26]选用一种人类精子膜抗原对应的抗体——抗 ADAM₂ 制备免疫磁珠, 对混合样本进行分离。结果显示在精子含量为 10³/mL 时的分离成功率为 70%。李学博等^[27]利用精子特异性抗体 SPAG8 结

合免疫磁珠技术分离混合细胞系中的精子, 建立混合斑中精子细胞分离的新方法。本实验结果表明, 该法用于混合细胞悬液中精子的分离效果明显好于混合斑。

已往的文献报道均是选用精子自身抗原与相应抗体结合从而进行分离, 本研究是利用附睾特异性分泌蛋白 hLCN6 与精子结合, 再用抗 hLCN6 单克隆抗体与之结合进而分离。前期研究中, 利用抗 hLCN6 多克隆抗体证实该蛋白在附睾组织表达并分泌后结合到精子上, 可能与精子成熟有关。本研究采用制备的抗 hLCN6 mAb 进行 Western blotting 检测发现, 精子细胞中存在 hLCN6 蛋白, 而上皮细胞中 hLCN6 表达呈阴性。免疫荧光实验显示, hLCN6 蛋白大量分布于精子细胞表面, 且以精子头部的顶体后区域浓度最高, 这将有利于 IMB 的结合。显微镜下可见精子头部与 IMBs 的结合, 证明了抗 hLCN6 mAb 结合的有效性。

本实验制备的 anti-hLCN6 IMBs 能够将精子从混合细胞悬液中分离出来, 实验显示在精子数量为 10³/mL 时的分型成功率达 90%, 明显高于差

异裂解法 (40%)。这可能是由于当精子含量较少时, 差异裂解法两步消化造成精子细胞损失所致。而当精子浓度 $\geq 10^4/\text{mL}$ 时, 所有样品均可得到单一男性分型。

IMB 法对模拟混合斑中精子 DNA 的检验结果显示, 精子数为 $10^3/\text{mL}$ 、 $10^4/\text{mL}$ 、 $10^5/\text{mL}$ 的混合斑, 各组样本分型成功率以及 16 个 STR 位点检出率均高于差异裂解法。在精子数相同情况下, 模拟混合斑的分型成功率低于混悬液, 这可能是由于混合斑中的精子在被干燥和从纱布上洗脱时, 细胞发生破裂导致表面抗原数量减少^[28], 影响了磁珠的结合效率所导致。鉴于一些上皮细胞可能在精子分离前被破坏, 释放的女性 DNA 附着在 IMB-精子复合物表面导致出现混合图谱(图 5), 因此我们在提取精子 DNA 前, 将 IMB-精子复合物与 DNase I 进行孵育以消除外源 DNA 的污染。

综上, 我们首次成功利用附睾特异性分泌的能与精子结合的蛋白进行了精子分离, 建立了基于 anti-hLCN6 IMBs 的混合斑中精子分离的新方法。该方法简单高效, 其分型成功率高于传统的差异裂解法, 可解决目前精子分离中的特异性差和体细胞 DNA 污染等问题, 不仅为性侵案件中法医学鉴别并分离精细胞及后续的个体识别提供新方法, 而且为依据抗原-抗体反应分离混合斑中的精细胞开辟新途径。此项技术可作为性侵案件中法医混合斑检验的有效补充手段, 对法医物证检案具有一定的实用价值。

REFERENCES

- [1] Keating SM. Information from penile swabs in sexual assault cases. *Forensic Sci Int*, 1989, 43(1): 63–81.
- [2] Voskoboinik L, Darvasi A. Forensic identification of an individual in complex DNA mixtures. *Forensic Sci Int Genet*, 2011, 5(5): 428–435.
- [3] Lei L, Zang LL, Xu J, et al. Research advances of mixed stains in forensic science. *Chin J Forensic Med*, 2015, 30(3): 273–276 (in Chinese).
- 雷亮, 臧丽丽, 徐洁, 等. 法医学混合斑研究进展. *中国法医学杂志*, 2015, 30(3): 273–276.
- [4] Hennekens CM, Cooper ES, Cotton RW, et al. The effects of differential extraction conditions on the premature lysis of spermatozoa. *J Forensic Sci*, 2013, 58(3): 744–752.
- [5] Garvin AM. Filtration based DNA preparation for sexual assault cases. *J Forensic Sci*, 2003, 48(5): 1084–1087.
- [6] Budimlija ZM, Lechpammer M, Popiolek D, et al. Forensic applications of laser capture microdissection: use in DNA-based parentage testing and platform validation. *Croat Med J*, 2005, 46(4): 549–555.
- [7] Schoell WM, Klintschar M, Mirhashemi R, et al. Separation of sperm and vaginal cells with flow cytometry for DNA typing after sexual assault. *Obstet Gynecol*, 1999, 94(4): 623–627.
- [8] Klein SB, Buoncristiani MR. Evaluating the efficacy of DNA differential extraction methods for sexual assault evidence. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, 29: 109–117.
- [9] Vandewoestyne M, Deforce D. Laser capture microdissection in forensic research: a review. *Int J Legal Med*, 2010, 124(6): 513–521.
- [10] Li CX, Han JP, Ren WY, et al. DNA profiling of spermatozoa by laser capture microdissection and low volume-PCR. *PLoS ONE*, 2011, 6(8): e22316.
- [11] Horsman KM, Barker SLR, Ferrance JP, et al. Separation of sperm and epithelial cells in a microfabricated device: potential application to forensic analysis of sexual assault evidence. *Anal Chem*, 2005, 77(3): 742–749.
- [12] Liu WR, Chen WX, Liu R, et al. Separation of sperm and epithelial cells based on the hydrodynamic effect for forensic analysis. *Biomicrofluidics*, 2015, 9(4): 044127.
- [13] Li XB, Wang QS, Feng Y, et al. Magnetic bead-based separation of sperm from buccal epithelial cells using a monoclonal antibody against MOSPD3. *Int J Legal Med*, 2014, 128(6): 905–911.
- [14] Zhao XC, Wang L, Sun J, et al. Isolating sperm from cell mixtures using magnetic beads coupled with an anti-PH-20 antibody for forensic DNA analysis. *PLoS ONE*, 2016, 11(7): e0159401.
- [15] Hamil KG, Liu Q, Sivashanmugam P, et al. LCN6, a

- novel human epididymal lipocalin. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1(1): 112–125.
- [16] Chen J, Feng W, Zhao Y, et al. Expression, purification, and refolding of human lipocalin 6 and production of a monoclonal antibody against this protein. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2017, 36(4): 185–191.
- [17] Liddell JE, Cryer A. *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*. Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 1991: 110–115.
- [18] Guan XY, Xu ZC, Wang YQ, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against chicken interleukin 4. *Chin J Biotech*, 2017, 33(1): 44–54 (in Chinese).
关晓宇, 徐志超, 王永强, 等. 抗鸡白细胞介素 4 单克隆抗体的制备及鉴定. *生物工程学报*, 2017, 33(1): 44–54.
- [19] Luo JM, Zheng YL, Zhou YC, et al. Identification of sperm-binding proteins in the ventral prostate of the golden hamster. *Nat J Androl*, 2007, 13(10): 883–889 (in Chinese).
骆建民, 郑玉鸾, 周元聪, 等. 金黄地鼠腹侧前列腺来源蛋白结合精子表面的实验研究. *中华男科学杂志*, 2007, 13(10): 883–889.
- [20] Butler JM. *DNA mixtures//Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. San Diego: Elsevier Inc., 2014: 32–41.
- [21] Li XJ, Han JL, Li L, et al. Research advances of separation methods of sperm cells from mixtures. *J Kunming Med Univ*, 2016, 37(2): 140–143 (in Chinese).
李秀江, 韩建利, 李丽, 等. 混合斑中精子细胞的分离方法研究进展. *昆明医科大学学报*, 2016, 37(2): 140–143.
- [22] Šafařík I, Šafaříkva M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1999, 722(1/2): 33–53.
- [23] Lei JH, Guan F, Xu H, et al. Application of an immunomagnetic bead ELISA based on IgY for detection of circulating antigen in urine of mice infected with *Schistosoma japonicum*. *Vet Parasitol*, 2012, 187(1/2): 196–202.
- [24] Arthur E. Spermatozoa capture during the differential extraction process for STR typing of sexual assault evidence. US, 2000-IJ-CX-K009. 2002-02.
- [25] Anslinger K, Bayer B, Danilov SM, et al. Application of sperm-specific antibodies for the separation of sperm from cell mixtures. *Foren Sci Int: Genet Suppl Ser*, 2008, 1(1): 394–395.
- [26] Zhang EL, Dong JL, Liu L, et al. Magnetic bead-based directional capture of sperm using a polyclonal antibody against ADAM₂. *Life Sci Instr*, 2014, 12(6): 34–36, 48 (in Chinese).
张尔力, 董军磊, 刘琳, 等. 抗 ADAM₂ 抗体免疫磁珠捕获精子的新方法研究. *生命科学仪器*, 2014, 12(6): 34–36, 48.
- [27] Li XB, Wang QS, Ning SH, et al. Separation of sperms from cell mixtures by sperm-specific antibody SPAG8. *J Third Mil Med Univ*, 2014, 36(12): 1322–1326 (in Chinese).
李学博, 王清山, 宁淑华, 等. 利用精子特异性抗体 SPAG8 分离混合细胞体系中的精子. *第三军医大学学报*, 2014, 36(12): 1322–1326.
- [28] Willott GM, Allard JE. Spermatozoa—their persistence after sexual intercourse. *Foren Sci Int*, 1982, 19(2): 135–154.

(本文责编 陈宏宇)