文章类型：论文 | 刊号（ISSN）：2972-4457(P) / 2972-452X(O)

微量降解检材 DNA 检验的技术难点及对策研究

李绍义
昆明锦康司法鉴定中心
DOI:10.32629/ffcr.v3i11.22346

[摘　要] 受自然环境作用而形成的微量降解检材，在 DNA 分型实际检验中处理难度较大。这类检材可利用的核酸模板有限，DNA 断裂降解问题较为突出，基质携带的各类杂质容易干扰扩增反应。采用常规检验手段处理该类检材，实验阶段常会出现等位基因丢失、扩增失衡、图谱杂峰、分型位点缺失等情况，实际分型成功率偏低。结合实际情况，本文梳理出微量降解检材 DNA 检验的四项主要技术难点，列举磁珠富集、mini- STR 结合 SNP/InDel- NGS 梯度检验等可行改进方案，同时剖析现有技术存在的局限，为同类疑难检材开展精准分型提供参考。
[关键词] DNA 检验；微量降解检材；基因分型；等位基因丢失；扩增抑制
中图分类号：D919.4 文献标识码：A

Research on Technical Difficulties and Countermeasures of DNA Detection for Trace Degraded Samples

Shaoyi Li
Kunming Jinkang Judicial Appraisal Center

Abstract: Trace degraded samples formed under natural environmental factors bring great difficulties to practical DNA typing. Such samples contain limited available nucleic acid templates with severe DNA fragmentation and degradation. Various impurities from the substrate tend to interfere with amplification reactions. When conventional detection methods are adopted for these samples, common experimental problems including allele dropout, amplification imbalance, miscellaneous peaks in electropherograms and missing genotyping loci will appear, leading to a low success rate of DNA typing. Combined with practical work, this paper sorts out four major technical difficulties existing in DNA detection of trace degraded samples, puts forward feasible improvement strategies such as magnetic bead enrichment and gradient detection combining mini- STR with SNP/InDel- NGS, analyzes the limitations of current technologies, and provides references for accurate genotyping of similar difficult forensic samples.
keywords: dna detection; trace degraded samples; genotyping; allele dropout; amplification inhibition

引言

生物检材置于野外环境，光照、温湿度变化、水环境、微生物均会直接破坏 DNA 分子，造成链断裂、碱基氧化脱嘌呤，模板含量随之下降，逐步形成微量高度降解的疑难检材[1]。

接触性 DNA 检材的 STR 分型成功率仅有 35%-45%，明显低于新鲜检材。常规检验方案面向高浓度完整样本开发，并不适配微量降解样本，很难得到完整可靠的分型图谱，这也是检材检验失败的重要原因。目前各类改良技术虽逐步应用，但缺乏系统规范的实操标准[2]。

泥土残留细胞、露天陈旧检材、腐败生物检材等环境检材，即使前处理规范，完整 STR 分型获取率仍然偏低[3]。此类检材检验失败会直接丢失检材线索，影响检材比对研判。因此梳理降解检材检验难点与优化方案，对基层 DNA 检验工作具有实际应用价值。

1 微量降解检材 DNA 检验核心技术难点

1.1 低模板量引发随机扩增误差

微量降解检材有效核酸模板拷贝数极低，远达不到常规检验标准。模板数量过低会破坏 PCR 扩增初始分配平衡，第一轮扩增就有可能出现部分等位基因扩增失效，带来位点随机丢失问题。

该类缺失无固定规律，平行实验结果一致性差，模板量越低，随机扩增误差越明显，是分型残缺、结果无效的主要原因。

低模板扩增极易产生等位基因丢失（Allele Drop-Out，ADO），杂合子位点常仅检出单一等位基因，易被误判为纯合子。该类误差不容易被察觉，单张图谱很难发现异常，会降低分型结果可信程度，给检材比对带来阻碍[4]。

Copyright © This work is licensed under a Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

1.2 DNA 高度碎片化导致扩增适配性不足

环境持续破坏会断裂 DNA 长链，形成大量长短不一的核酸碎片。常规 STR 扩增片段跨度大，对模板完整性要求高，仅可检出少量小片段位点，大片段分型信息普遍缺失。

DNA 降解存在明显不均一性，高湿腐殖环境下检材损伤最重，仅剩余 100-200 bp 短片段核酸[1]。常规 STR 试剂盒以中长片段扩增为主，无法适配重度碎片化模板，最终图谱残缺，无法满足同一认定要求。

1.3 基质杂质引发扩增体系抑制效应

环境微量检材基质复杂，表面附着腐殖酸、植物多糖、金属离子、腐败蛋白等杂质。常规纯化仅能去除大颗粒杂质，微量可溶性抑制物会残留于核酸样本中，进入扩增体系。

抑制成分会降低 DNA 聚合酶活性，干扰引物结合与碱基延伸，造成扩增失衡、信号紊乱。泥土、淤泥类检材抑制作用最为显著，部分样本核酸定量合格，但残留抑制物仍会导致扩增中断、杂峰增多，造成检验失败。

1.4 低模板体系外源污染风险突出

高浓度样本可耐受微量外源核酸污染，但微量降解检材模板基数极低，对污染高度敏感。实验室漂浮核酸、耗材残留核酸、操作交叉污染，均易产生假性扩增位点。

假性基因信号与真实等位基因相互混杂，大幅提升图谱判读误判概率，直接破坏分型结果的客观真实性。低模板体系的抗干扰短板，是微量降解检材检验稳定性差、误差率高的重要诱因。微量模板体系容错率极低，轻微污染即可改变整体分型特征，造成结果失真，无法用于检材比对工作。

2 微量降解检材 DNA 检验优化对策

2.1 优化核酸提纯富集工艺，降低随机扩增偏差

想要提高低拷贝模板的检出效果，核酸富集这一步十分关键。相较于传统离心柱提取方式，磁珠提取工艺对碎片化短链 DNA 有着更好的捕获效果。实操过程中可适当调整裂解体系盐离子浓度，延长磁珠与核酸之间的孵育吸附时长，尽可能回收样本内残存的微量 DNA 模板。

经过磁珠富集之后，如果核酸拷贝数依旧处于极低水平，可选用载体富集作为补充方案，减少 DNA 吸附在离心管壁、移液枪头带来的模板损耗。样本预处理步骤尽量精简，减少多次换管、反复转移核酸溶液等操作，降低模板损失，缓解低模板样本容易出现的等位基因丢失现象。

如果经过磁珠富集、载体富集处理后模板量仍然达不到扩增要求，可以选择多重置换扩增（Multiple Displacement Amplification，MDA）开展全基因组扩增。该技术无需高温循环变性，恒温条件下即可完成扩增，能够在原有基础上提升样本核酸总量，降低低拷贝样本等位基因丢失发生概率。但 MDA 扩增存在一定的扩增偏好性，过度扩增有可能引入分型偏差，因此该项技术仅适合常规富集手段效果不佳的疑难检材，不建议作为所有微量检材的通用处理方案。综合来看，磁珠富集更适合该类微量降解检材的前处理工作，可优先选用[5]。

2.2 更换短片段扩增体系，适配碎片化模板特征

当 DNA 模板破碎程度很高时，普通 STR 试剂盒很难扩增得到大片段位点。实际检验工作中可以放弃传统长片段扩增模式，采用微型短串联重复序列（mini-STR）扩增技术。该技术重新设计引物结合区域，缩短扩增产物片段的长度，更适配断裂破损的 DNA 模板，提高损伤检材各个基因位点的检出概率[6]。

遇到降解程度十分严重的检材，仅依靠 mini-STR 往往依旧难以获得完整分型结果，这时可以搭配单核苷酸多态性（Single Nucleotide Polymorphism，SNP）、插入缺失标记（Insertion- Deletion，InDel）开展联合检测。这类遗传标记扩增片段更短，几乎不受 DNA 降解的影响，能够补齐常规 STR 大片段位点缺失造成的分型缺口，提升图谱整体的完整程度[7]。

Mini-STR 技术虽能够改善碎片化模板检出效果，但引物优化后部分位点扩增片段区间距离较近，对后续电泳解析精度有着更高的要求。受试剂盒产品种类限制，该项技术目前在基层实验室还未得到大范围普及。而 SNP 与 InDel 标记受降解影响很小，可以作为重度降解检材十分可靠的补充检测手段。

2.3 建立分级纯化模式，消除扩增抑制干扰

基质杂质会造成扩增抑制，可采用分级纯化的方式处理实验样本。对于泥土等带有固体颗粒的检材，预处理阶段先通过低速离心、预清洗的方式去除粗杂质，从源头减少抑制性物质进入裂解体系。

核酸提取完成之后，检测核酸纯度，对纯度不达标的样本开展二次纯化，深度去除样本当中残留的腐殖酸、多糖等常见抑制物质。扩增环节优先选用抗抑制能力更强的 DNA 聚合酶，提升扩增体系对微量杂质残留的耐受能力，保障各个位点扩增反应均衡稳定进行，减少扩增失衡、图谱信号紊乱等问题。

2.4 强化标准化质控体系，规避外源污染干扰

微量模板体系抵抗外源核酸干扰的能力弱，需要落实全流程的防污染管控措施。实验耗材、操作台在使用之前完成紫外消杀，样本前处理、核酸提取、扩增配制等工作严格分区操作，避免不同样本之间发生交叉污染。每一批次样本检验时同步设置空白对照与阴性对照，实时监测实验室污染情况，一旦对照出现异常信号，即刻作废该批次检验结果[8]。

日常检验工作中统一标准化操作流程，降低人为操作带

Copyright © This work is licensed under a Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

来的误差，以此保障微量降解检材分型结果的真实性、稳定性，减少假性位点造成的判读错误。

2.5 多技术联合检测，提升疑难检材分型成功率

只依靠某一种检验手段，难以同时处理模板量少、DNA 高度降解、基质抑制等各类问题。在实际工作中可以将 mini-STR 作为基础分型方案，再结合二代测序（NGS）、SNP、InDel 标记检测形成一套互补的检验组合。

二代测序适合应用于模板含量极低、DNA 高度降解，常规毛细管电泳分型失败的样本。该技术可以一次性读取大量位点信息，对部分扩增不平衡的低峰信号也有较好检出能力，弥补 mini-STR 大片段位点丢失带来的数据缺口。SNP、InDel 标记主要负责补充常规 STR 丢失的大片段基因座，依靠其短片段扩增优势，找回降解检材当中遗失的分型信息[9]。

三者之间的配合顺序可按照梯度检验思路执行：首先采用 mini-STR 开展初筛分型，得到尽可能多的 STR 位点；分型位点残缺较多时，利用 SNP、InDel 标记补齐缺失的位点信息；剩余依旧无法获得有效分型的疑难样本，最后再采用二代测序技术进一步挖掘样本内残存的分型数据。梯度检验同时兼顾检材消耗，优先采用毛细管电泳平台，减少珍贵检材不必要损耗。通过分层递进、多技术互补的模式，提高疑难微量降解检材最终分型成功率。

3 总结与展望

当前各类优化处理方案仅能够改善微量降解检材的扩增分型效果，并不能修复已经断裂、碱基发生不可逆损伤的 DNA 链。当检材降解程度达到极限，样本内部几乎不存在完整有效的 DNA 模板时，无论采用何种前处理以及扩增方案，都很难获得可靠分型结果，这也是目前微量降解检材检验工作无法突破的现实局限。多技术联合检验虽然检出效果更好，但整套操作流程繁琐、试剂成本偏高、检验周期更长，并不适合大批量样本筛查，短时间内很难在基层实验室大范围推广应用[10]。

在微量降解检材 DNA 检验领域，还需要持续推进微量核酸高效富集、DNA 损伤修复试剂、短片段分型标准化、全流程防污染质控等相关技术。待损伤修复相关技术不断成熟之后，重度降解检材的位点检出水平还有提升空间。后续研究可以针对泥土、腐败检材等不同基质类型的微量降解检材，建立起分级处理流程与分型图谱判读标准，统一基层实验室的实操方案，不断提升疑难检材 DNA 分型准确率，完善环境类微量检材的检验技术体系。分级处理模式落地后，可减少前期试错带来的样本消耗，节约珍贵检材，推动基层微量降解检材 DNA 检验工作进一步规范化。

[参考文献]

[1]张洁,邴新亮.微量 DNA 在复杂环境下的降解机制及其法医学应用研究[J].广东公安科技,2025,33(01):45-48.

[2]王琳,董春楠,丛斌.降解生物检材DNA分析研究新进展[J].中国法医学杂志,2021,36(2):184-187.

[3]吴微微,刘振平,苏艳佳,等.陈旧降解生物样本与微量阳性对照品 007 混合 Y-STR 分型特征研究[J].中国法医学杂志,2025,40(6):702-706.

[4]毛华芬,许天龙,周保成,等.STRtyper-21G(Plus)试剂盒在法医物证检测中等位基因丢失现象的研究[J].中国司法鉴定,2024,(6):63-68.

[5]张雅昕,赵星天,艾康,等.微量降解检材 DNA 提取方法的现状与进展[J/OL].生命科学研究,1-10.https://doi.org/10.16605/j.cnki.1007-7847.2025.09.0169.

[6]吴应锋,沈高芳,苏蕊,等.miniSTR基因座双复合扩增体系的建立与验证[J].刑事技术,2025,50(6):591-596.

[7]韩伟,张庆珍,杨静,等.适用于降解样本的 201 个遗传标记检测体系的构建和验证[J].遗传,2024,46(4):306-318.

[8]周如冰.微量 DNA 检测实验的实验室防污染控制策略[J].中国法医学杂志,2024,39(01):112-115.

[9]陈安琪,张素华.高通量测序技术：解决法医学疑难生物检材鉴定的关键工具[J].中国法医学杂志,2024,39(6):730-740.

[10]张倩,张驰,康克莱,等.二代测序分析阈值与 STRSeqTyper122 试剂盒在混合 DNA 检验中的应用研究[J].中国法医学杂志,2026,41(2):147-154.

作者简介：

李绍义（1976.11-），男，云南人，副主任法医师，2001 年毕业于昆明医科大学法医学，长期从事法医类司法鉴定。

Copyright © This work is licensed under a Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.