

## 技术与方法

## 微流控芯片技术用于精子与上皮细胞分离的研究

欧元<sup>1,2#</sup> 刘蔚然<sup>3#</sup> 董军磊<sup>4</sup> 李彩霞<sup>1</sup> 靳现霆<sup>5</sup> 刘琳<sup>4</sup> 赵兴春<sup>1</sup> 叶健<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>公安部物证鉴定中心, 北京 100038; <sup>2</sup>北京理工大学生命学院, 北京 100081; <sup>3</sup>清华大学生物医学工程系, 北京 100084; <sup>4</sup>中国人民公安大学刑事科学技术学院, 北京 100038; <sup>5</sup>太原铁路公安局临汾公安处, 临汾 041000)

**摘要** 为研究建立使用微流控芯片技术分离精子与阴道上皮细胞的方法, 选用制作工艺简单的玻璃-PDMS芯片, 对混合样本进行分离。加样前分别在进、出口池中加入7  $\mu\text{L}$ 和10  $\mu\text{L}$ 缓冲液, 然后在进样口加入2  $\mu\text{L}$ 混合样本。至少静置8 min后, 从出口池中取出3  $\mu\text{L}$ 形成重力驱动的微流体后开始分离, 每隔5 min在进样口补加1  $\mu\text{L}$ 缓冲液。达到理想分离效果时, 用移液器从出口池取出分离出的精子, 核酸酶去除游离DNA, 经过提取、扩增和电泳分离/检测等步骤得到精子的分型结果。结果显示, 使用基于重力驱动微流体原理的微流控芯片可在30 min内分离出精子, 不会有上皮细胞进入分离通道; 通过核酸酶对分离出的精子液的去游离DNA处理, 可得到单一、完整的精子分型。与传统的差异裂解法相比, 这种方法在很大程度上节省了检验时间, 在性侵案件中具有一定的法医物证分析价值。

**关键词** 微流控芯片; 精子; 上皮细胞; 段串联重复序列; 分离

## Study on Separation of Sperm and Epithelial Cells in a Microfluidic Chip

Ou Yuan<sup>1,2#</sup>, Liu Weiran<sup>3#</sup>, Dong Junlei<sup>4</sup>, Li Caixia<sup>1</sup>, Jin Xianting<sup>5</sup>, Liu Lin<sup>4</sup>, Zhao Xingchun<sup>1</sup>, Ye Jian<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China; <sup>2</sup>School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China; <sup>3</sup>Department of Biomedical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

<sup>4</sup>School of Criminal Science and Technology, Chinese People's Public Security University, Beijing 100038, China;

<sup>5</sup>Linfen Public Security Department of Taiyuan Railway Public Security Bureau, Linfen 041000, China)

**Abstract** To develop the method for separation of sperm and epithelial cells in a microfluidic chip, the glass-PDMS chip, which is easy to manufacture, was selected to separation of sperm and epithelial cells. Buffer was added to the inlet (7  $\mu\text{L}$ ) and outlet reservoirs (10  $\mu\text{L}$ ) prior to sample addition, then a sperm/epithelial cell mixture (2  $\mu\text{L}$ ) was added to the inlet reservoir. After a minimum of 8 min of “settling time”, gravity-induced flow was initiated by removing 3  $\mu\text{L}$  of buffer from the outlet reservoir, then the inlet reservoirs was supplemented with 1  $\mu\text{L}$  buffer every 5 min. Following the desired separation time, product was removed from the outlet reservoir via pipet. Nuclease was used to remove free DNA, followed by extraction, amplification and electrophoretic separation/detection. By using microfabricated chip based gravity-induced flow mechanism, sperm can be separated from mixture in 30 min. No epithelial cells were observed passing through the channel during separation. After removing free DNA by using nuclease, a single and com-

收稿日期: 2013-03-29 接受日期: 2013-06-16

公安部重点实验室项目(批准号: 2011GABJC028)资助的课题

#共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 010-63434093, E-mail: yejian77@126.com

Received: March 29, 2013 Accepted: June 16, 2013

This work was supported by the Foundation of Key Laboratory of Forensic Genetics Ministry of Public Security (Grant No.2011GABJC028)

#These authors contribute equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-10-63434093, E-mail: yejian77@126.com

网络出版时间: 2013-09-25 11:15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130925.1115.001.html>

plete sperm STR profile can be obtained. Compared with the conventional differential extraction, this method can largely save test time and has a certain value for the analysis of forensic evidence in sexual assault cases.

**Key words** microfluidic chip; sperm; epithelial cells; STR; separation

DNA分型技术的出现,使得对人身的同一认定成为可能,这为性侵案件的侦破提供了有力的技术支持。通过对受害人身体上留下的犯罪嫌疑人的体液(如精液、唾液)的检验,可以直接确定犯罪嫌疑人,目前已是侦破此类案件不可或缺的技术手段。而通常用阴道拭子收集到的样本都男性精子与女性阴道上皮细胞的混合细胞样本。常规采用差异裂解法获得精子的STR分型,这一过程耗费的时间在3 h以上甚至需要过夜<sup>[1]</sup>,成为整个分析过程中耗时最长的步骤。

然而,随着案件搜集DNA样本量的增大及国家DNA数据库建设的快速推进,待检DNA样本数量激增,同时又需要为快速打击犯罪提供有力的证据,因此提高检验通量和缩短检验时间一直是法医DNA工作者研究的重要方向。目前,已经有报道可以在DNA提取、PCR、DNA分离方面提高检验速度及效率,这在很大程度上缩短了整个检验时间。而在最耗费时间的差异裂解步骤上的进展报道却很少。其他可实现精子与上皮细胞分离的方法,像免疫磁珠定向捕获<sup>[2]</sup>、激光捕获显微切割<sup>[3-4]</sup>等也都有操作复杂、耗时长缺点。微流控技术的出现使快速高效地分离细胞成为可能<sup>[5]</sup>。基于上皮细胞与精子细胞物理方面的差异(表1),Horsman等<sup>[6]</sup>在微流控芯片利用上皮细胞沉降速率快于精子的原理,通过微流体驱动精子而达到从上皮细胞/精子混合液中快速分离出精子,但其制作芯片的材料是玻璃,这种芯片的制作工艺复杂且耗时较长。

本实验研究也利用上皮细胞沉降速率快于精子的原理,不同的是采用聚二甲基硅氧烷(polidimethylsiloxane, PDMS)和玻璃两种材料制作芯片,与单一玻璃芯片制作工艺相比简单很多,并建立与之

相适应的分离方法,实现快速有效分离。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

数码照相显微镜(奥林巴斯公司,日本),磷酸盐缓冲溶液(PBS,北京索莱宝科技有限公司),QIAamp DNA mini M48提取试剂盒、Quant-iT™定量试剂盒(QIAGEN公司,德国),AmpFISTR® Identifier PCR扩增试剂盒、3130XL型遗传分析仪(AB公司,美国)。

### 1.2 混合细胞样本准备

加2 μL精液到口腔拭子上,然后把拭子放入1 mL pH7.4的1×磷酸盐缓冲溶液(PBS)中震荡1 min。最终混合液中每微升含有约2 000个上皮细胞和3 600个精子细胞,整个实验均使用此混合样本。口腔拭子(由棉签擦拭口腔内颊得到)和精液样本分别由健康成年女性和成年男性提供。

### 1.3 芯片制备

芯片由底层的玻璃载玻片和上层的PDMS组成,PDMS上的三个壁与载玻片形成完整通道。每次通过严格控制PDMS原料的使用量保证制作的PDMS厚度在0.3 mm左右,打孔器直径为0.2 mm,通道长2.61 cm,深约50 μm,宽约130 μm(图1)。

### 1.4 芯片细胞分离

芯片使用前用1×PBS液冲洗,使溶液充满通道,吸出进液口和出液口的溶液;在进、出口分别加7 μL和10 μL PBS液,加2 μL精子/上皮细胞混合液入进液口。对比最少静置5 min后从出液池中取出5 μL和最少静置8 min后从出液池中取出3 μL两种条件,发现后者不会有上皮细胞进入分离通道。每隔5 min在进液池中补加1 μL PBS液,保证持续的驱动力。包括静置时间在内的整个分离过程都在显微镜观察下进行,并

表1 阴道上皮细胞与精子的比较

Table 1 Comparison of vaginal epithelial cells and sperm

	直径(μm) Diameter(μm)	密度(g/mL) Density(g/mL)	吸附性 Adsorption	沉降率 Settling rate
Vaginal epithelial cells	40~60	1.04~1.08	Strong	Fast
Sperm	4~6	1.12	Weak	Slow

随时拍照记录。达到理想的分离效果时, 从出液池取出分离细胞液进行后续处理。

### 1.5 分离后样本处理

使用QIAamp DNA mini M48提取试剂盒对从出样池中分离出的细胞液进行DNA提取, 操作按照试剂盒推荐步骤进行。使用Quant-iT™定量试剂盒按标准操作步骤进行DNA定量。

对提取的DNA产物使用AmpFISTR® Identifiler PCR扩增试剂盒10  $\mu$ L扩增体系扩增: 反应缓冲液4  $\mu$ L、引物2  $\mu$ L、金牌Taq酶0.2  $\mu$ L和0.5~1.0 ng DNA样本。扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 11 min; 94  $^{\circ}$ C变性1 min, 59  $^{\circ}$ C退火1 min, 72  $^{\circ}$ C延伸1 min, 循环29次; 60  $^{\circ}$ C后延伸60 min。检测扩增产物均在3130XL型遗传分析仪上按照标准操作规则进行检测, 用GenMapper IDv3.2软件进行数据分析。

## 2 结果

### 2.1 重力驱动微流体分离细胞

按前述方法进行混合细胞的分离, 图2所示为分离前入口池中上皮和精子细胞混合液, 图3所示为分离期间通道中的精子。为了确定上皮细胞完全沉降所需的时间, 选择0~25 min的沉降时间进行实验。出口池取出5  $\mu$ L分离液后开始分离, 观察发现, 当沉降5 min或更长时间时, 没有上皮细胞移动进入通道。当沉降时间<4 min时, 上皮细胞会和精子一起进入通道, 有时甚至堵塞通道, 这与Horsman等<sup>[6]</sup>所得的结论基本一致。为了提高分离效率及稳定性, 分离速率减慢时, 在进样口补加1  $\mu$ L的PBS分离液, 可达到提高分离效率的目的。但在补加后由于重力



图1 用于分离的微流控芯片  
Fig.1 Microfluidic chip for separation

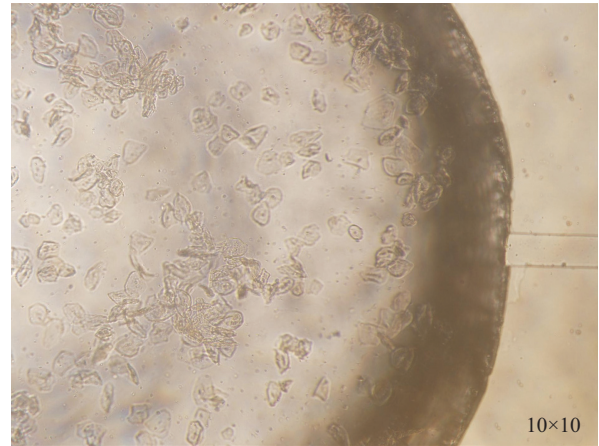


图2 分离前入口池中上皮和精子细胞混合液  
Fig.2 Sperm/epithelial cell mixture in the inlet reservoirs before separation

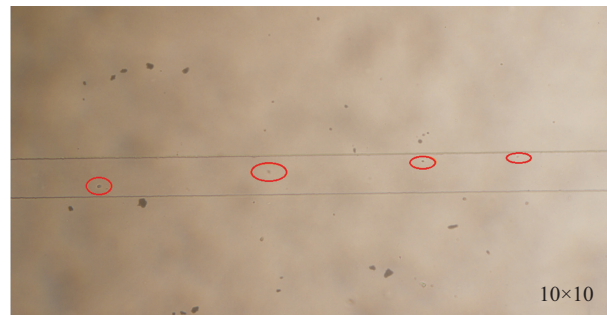
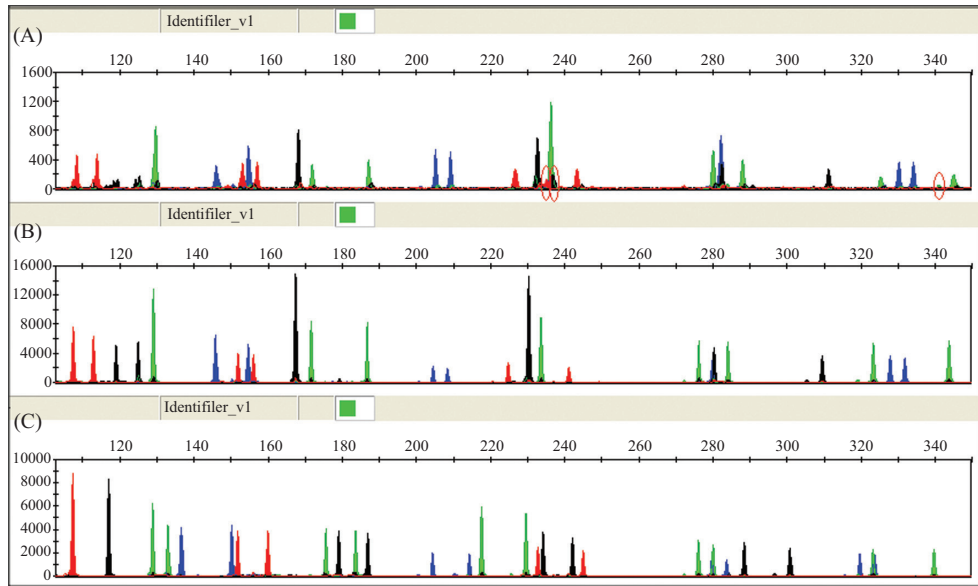


图3 分离期间通道中的精子(红圈所示)  
Fig.3 Sperm cells (indicated by the red circles) flowing down the microchannel during cell separation

诱导驱动力的突然增大, 会导致上皮细胞进入通道也分离过去。这种情况的出现, 是由于上皮细胞沉降吸附力不足以抵挡突然增大的微流体驱动力, 因此可通过增加沉降时间和避免驱动力突然增加过来解决。研究发现, 分离前沉降不少于8 min, 从出口池取出3  $\mu$ L形成重力诱导的驱动力。在开始分离后, 每隔5 min在进口池沿溶液表面补加1  $\mu$ L的PBS分离液来保持持续稳定的驱动力, 完成分离用时约20 min, 过程中没有上皮细胞进入通道。

分离结束后, 取出后经QIAamp DNA mini M48提取试剂盒进行DNA提取, 得到DNA液15  $\mu$ L, Quant-iT™定量结果为0.35 ng/ $\mu$ L, 随后使用AmpFISTR® Identifiler PCR扩增试剂盒加样3  $\mu$ L进行扩增, 最后进行电泳检测, 得到完整的STR(短串联重复序列, short tandem repeat)位点分型结果(图4A), 但相应位点有不同程度的不平衡性。通过与精子和女性上皮细胞的阳性对照结果(图4B和4C)对比发现, 有三个



A: 分离出的产物的STR分型结果图, 含有三个女性成分的位点(红圈示); B: 精子STR分型(阳性对照); C: 女性上皮STR分型(阳性对照)。A: short tandem repeat (STR) profile of the isolated product, the red circles indicated three female locus; B: sperm cells STR profile (positive control); C: female epithelial cells STR profile (positive control).

图4 分离产物STR分型及其阳性对照分型

Fig.4 Short tandem repeat (STR) analysis of the sorted cell product and positive control product

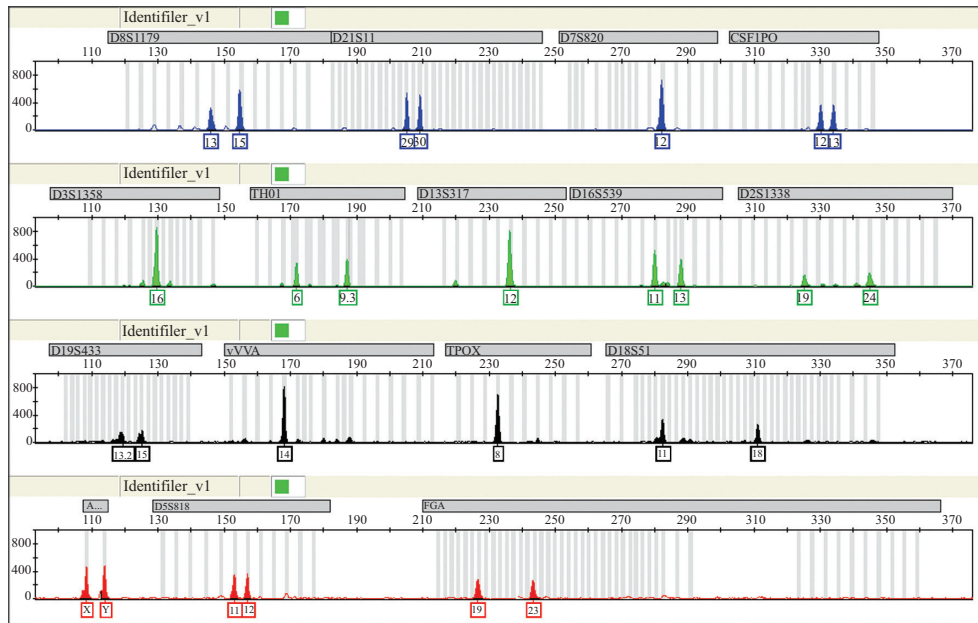


图5 分离出的产物经DNA酶处理后的STR分型

Fig.5 STR profile of the isolated product treated by the DNA enzyme

位点中有较明显杂峰(图中红色圈所示)。分析发现正是女性上皮分型中所包含的位点, 重复分离实验这些杂峰持续存在, 分析原因可能是样本中游离的女性DNA成分所致, 故仍需进一步分析。

2.2 游离DNA的控制

在正常分离完成后, 对分离对的产物使用DNA

酶处理, 再进行提取、扩增和电泳分析。从得到的结果(图5)中可以看出, 图4A中出现的杂峰全部消失。重复试验效果稳定。

2.3 对实际案件样本的应用分析

实际案件样本由公安部物证鉴定中心提供, 检材为一性侵犯案件中女性受害者的内裤。由于含有

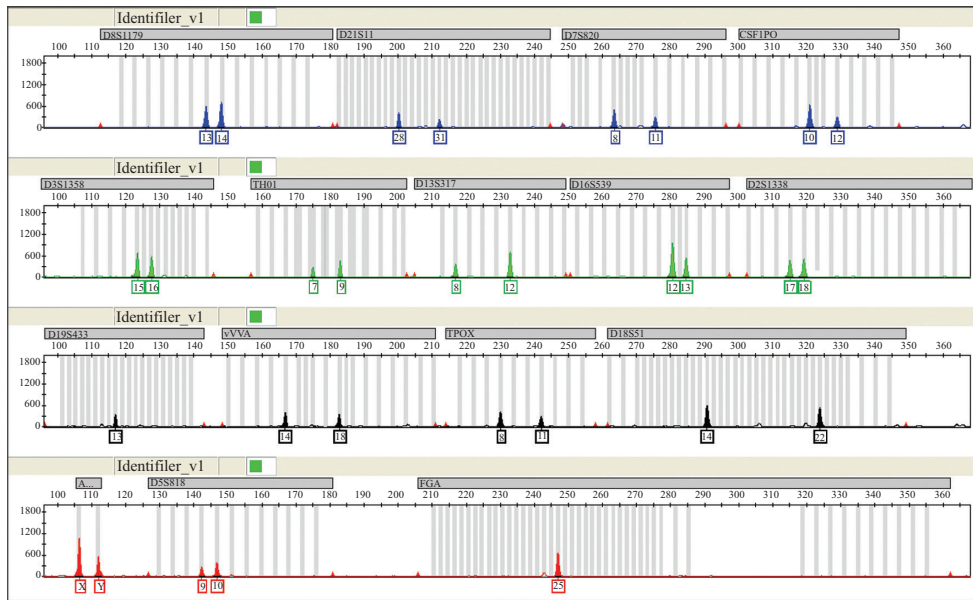


图6 实际案例样本分离分析STR分型

Fig.6 STR profile of actual case sample

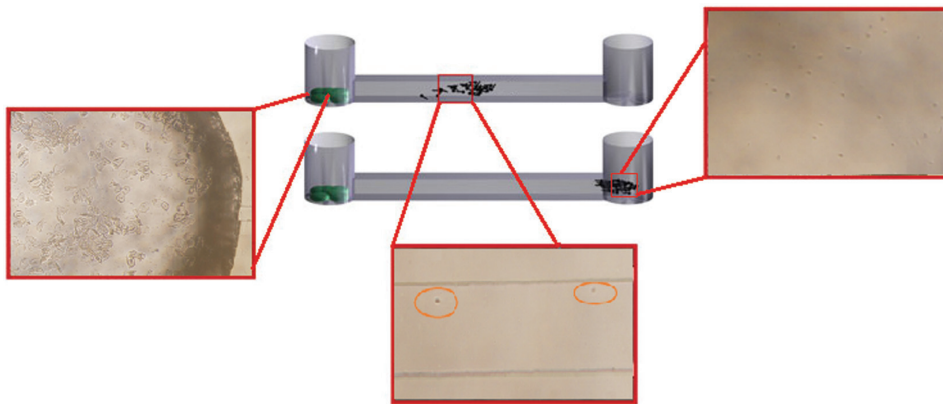


图7 分离芯片原理示意图(根据参考文献[6]修改)

Fig.7 Mechanism of microchip-based sperm and epithelial cell separation (modified from reference [6])

较高女性成分,采用常规差异裂解法,无法去除女性背景,得不到单一男性DNA分型。取2 mm×2 mm检材加入1 mL PBS溶液中震荡1 min。处理后每微升混合溶液中上皮细胞/精子值约为30/300(个)。由于实际检材中精子量较少,加样量由前述的2 μL调整至4 μL,具体分离操作按照上述方法进行;分离后去游离DNA处理、提取、定量得0.12 ng/μL DNA溶液7 μL,取0.38 μL用于PCR扩增,电泳分离检测可得到理想的分离结果(图6)。

### 3 讨论

根据细胞分离原理<sup>[6]</sup>,如图7所示,微流体在适

合的流速下,可以驱动精子从入口池通过通过进出口池而不干扰入口池中沉降的上皮细胞,达到从精阴混合液中分选出精子的目的。一般,要得到完整的分型结果,至少需要0.5~1 ng的DNA。DNA量过少(100 pg左右)会由于随机效应的存在仅得到部分分型结果。因此,要得到完整的STR分型结果,就需要从混合液分离出尽可能多的精子。但是,仅靠重力诱导的驱动力随着分离时间的延长,这种驱动力会越来越小,分离也越来越慢,完成分离就会耗费较长时间。

为了提高分离速度及效率,Horsman等<sup>[6]</sup>使用注射泵在出口池外加一回洗离,保证分离持续快速进

行。这种方法虽可快速有效地分离出精子, 提高分离效率, 但需要有相应设备支持且操作较为复杂。本实验采用增加分离前沉降的时间和间断补液的方法, 来保证整个分离过程的稳定性及分离效率, 进样在不需要外加设备的情况下, 整个过程用时不到30 min即可分离得到足够量的精子细胞。

分离后需要从出口池中取出分离出的精子细胞液, 在吸取的同时也可能把进口池中的精子和上皮细胞一起吸过来, 这样会导致分离失败。本实验使用的芯片是PDMS和以玻璃为底键合而成, PDMS有一定的韧性且可切割, 因此可在从出口池取样之前在PDMS上加以外力以闭塞通道或直接用刀把通道切断, 防止洗出进口池中的样本。为了提高取出精子的量, 可对出口池进行多次冲洗, 减少精子的残留。而Horsman等<sup>[6]</sup>未对这方面问题进行讨论分析。

与精子细胞相比, 上皮细胞的核膜是很脆弱的。上皮细胞核膜破裂后释放出DNA, 这些DNA会游离的溶液中, 分离时随溶液进入出口池。分离只有得到单一精子的分型结果才有意义, 所以要防止游离DNA进入出口池或在裂解精子前去除游离DNA。使用PBS作为分离缓冲液时, 底部的玻璃会对游离DNA有一定的吸附作用, 但吸附效果很难确定。为了保证得到单一精子分型, 在裂解提取之前, 对取出的精子分离液进行DNA酶处理, 可免除游离DNA对结果的影响。经过DNA酶处理过的分离产物, 达到了理想的去除游离DNA目的。

使用该方法对实际案例进行分析, 整个分离过程不到30 min。与传统的方法相比提高了检验速率, 也克服了传统方法不能完全去除女性成分的缺点。

本实验建立了一种新型快速从上皮细胞中分离出精子的方法, 对性侵案件中的精子/阴道上皮细胞混合检材的检验有着一定的应用价值。实验中使

用的是女性口腔上皮细胞与精子按一定比例配制的混合液, 而实际案件中精阴混合检材其所处环境要比实验室模拟检材的复杂很多, 如酸碱度、细菌等, 这些对分离都有一定的影响, 也会影响检材混合液中游离DNA的量。消除这些DNA对分离结果的影响, 使用DNA酶对分离出的产物进行处理, 可克服仅靠玻璃芯片壁吸附的不足。该方法可克服传统差异裂解法操作复杂、耗时长等缺点, 为打击性犯罪提供简单快速的技术支持。对于更高效地从芯片中取出或实现微流控芯片分离→(提取→)扩增→检测在线分析一体化, 仍需进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Budowle B, Baechtel FS, Comey CT, Giusti AM, Klevan L. Simple protocols for typing forensic biological evidence: Chemiluminescent detection for human DNA quantitation and restriction fragment length polymorphism (RELP) analyses and manual typing of polymerase chain reaction (PCR) amplified polymorphisms. *Electrophoresis* 1995; 16(1): 1559-67.
- 2 赵兴春, 姜伯玮. 精子细胞定向捕获与分离技术初步研究. 刑事技术(Zhao Xingchun, Jiang Bowei. Preliminary study on a high specific method for directional capture and separation of sperm cells from forensic samples. *Forensic Science and Technology*) 2012; 23(1): 14-7.
- 3 Vandewoestyne M, Deforce D. Laser capture microdissection in forensic research: A review. *Int J Legal Med* 2010; 124(6): 513-21.
- 4 Li CX, Han JP, Ren WY, Ji AQ, Xu XL, Hu L. DNA profiling of spermatozoa by laser capture microdissection and low volume-PCR. *PLoS One* 2011; 6(8): 1-7.
- 5 Bhagat AS, Bow H, Hou HW, Tan SJ, Han J, Lim CT. Microfluidics for cell separation. *Med Biol Eng Comput* 2010; 48(10): 999-1014.
- 6 Horsman KM, Barker SLR, Ferrance JP, Forrest KA, Koen KA, Landers JP. Separation of sperm and epithelial cells in a micro-fabricated device: Potential application to forensic analysis of sexual assault evidence. *Anal Chem* 2005; 77(3): 742-9.