

4种快速PCR检测试剂法医学应用的初步研究

刘琳¹, 项林平², 郭磊³, 董军磊¹, 秦翠娇¹, 董会⁴,
姜伯玮⁵, 欧元⁶, 赵兴春⁶, 叶健^{6*}

(1. 中国人民公安大学, 中国北京 100038; 2. 重庆市公安局 巴南区分局, 中国重庆 401320; 3. 苏州市公安局 中国江苏 苏州 215000; 4. 法庭科学生物芯片工程实验室, 中国北京 100038; 5. 公安部第一研究所, 中国北京 100048; 6. 公安部物证鉴定中心, 中国北京 100038)

摘要: 采用快速PCR扩增, 探索其法医学应用价值. 将 AmpFLSTR® Identifiler® 试剂盒分别与4种不同的快速PCR检测试剂联合构建快速PCR体系, 以9947A为模板, 采用各自优化的循环参数进行扩增, 并将各分型结果与常规方法进行比较. 结果表明: 联合构建的4种快速PCR体系均可获得与常规方法一致的DNA分型结果, 扩增用时最短可减少至22 min. 可见应用快速PCR方法进行扩增, 可获得与常规方法一致的STR分型, 并且显著缩短扩增时间, 提高DNA分型速率.

关键词: 法医物证学; AmpFLSTR® Identifiler® 试剂盒; STR; 快速PCR

中图分类号: R89; DF795.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2013)05-0431-05

The Application Research of Forensic Medicine with Four Rapid PCR Detection Reagent

LIU Lin¹, XIANG Lin-ping², GUO Lei³, DONG Jun-lei¹, QIN Cui-jiao¹,
DONG Hui⁴, JIANG Bo-wei⁵, OU Yuan⁶, ZHAO Xing-chun⁶, YE Jian^{6*}

(1. People's Public Security University of China, Beijing 100038, China; 2. Banan Branches of the Chongqing Municipal Public Security Bureau, Chongqing 401320, China; 3. Suzhou Municipal Public Security Bureau, Suzhou 215000, Jiangsu, China; 4. Forensic Science Biochip Technology Engineering Laboratory, Beijing 100038, China; 5. The First Research Institute of the Ministry of Public Security of P.R.C, Beijing 100048, China; 6. Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China)

Abstract: Rapid PCR amplification was performed to investigate the value of forensic science application. The AmpFLSTR® Identifiler® kit together with four rapid PCR reagent were used to establish rapid PCR system, respectively. With 9947A as a template, we used optimized cycle parameter for each kit to amplify the gene, and compared each DNA typing result with the conventional methods. The results showed that the amplification systems combined by the four rapid PCR reagent and the AmpFLSTR® Identifiler® kit could all get the DNA typing results consistent with the conventional methods. The shortest amplification time was 22 min. It was clear that rapid PCR amplification could get the STR typing result consistent with the conventional method, significantly shortened the time of amplification and improved the DNA typing rate.

Key words: forensic biological evidence; AmpFLSTR® Identifiler® Kit; STR; rapid PCR

(*Life Science Research*, 2013, 17(5): 431~435)

收稿日期: 2013-06-16; 修回日期: 2013-07-12

基金项目: 国家科技支撑计划课题项目(2012BAK02B04-1); 国家自然科学基金资助项目(81202384), 公安部科技强警基础工作专项项目(2011GABJC028)

作者简介: 刘琳(1987-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要从事法医遗传学研究; * 通讯作者: 叶健(1961-), 女, 贵州贵阳人, 公安部物证鉴定中心主任医师(法医), 博士, 主要从事法医遗传学方面的研究, Tel: 010-66269548, E-mail: yejian77@126.com.

随着各国证据意识与法制意识的不断增强,法医 DNA 分析技术在现代法庭科学中的重要性日益凸显,是各类案件、重特大事故及自然灾害等重大事件中最有效的个体识别工具^[1]。其中最常用的 PCR-STR 复合扩增技术,其本质是运用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增人类基因组 DNA 中高度多态性位点,再通过片段长度多态性对扩增产物进行分析,进而研究不同个体间 DNA 分子水平上的差异及其遗传规律^[2]。PCR 扩增是获得准确 STR 分型的关键步骤之一,常规扩增过程一般耗时 3 h 左右,难以满足某些紧急案件快速获得 DNA 分型结果的需求,于是该领域的一些研究者开始致力于快速 PCR 在法医学上的应用。

快速 PCR (rapid PCR 或 fast PCR)是指在保证 PCR 扩增反应结果准确性的前提下,尽量缩短 PCR 反应时间,实现快速扩增。目前主要在临床快速诊断^[3]、病原体快速检测^[4,5]、药物快速鉴别^[6]、动植物 DNA 快速检测^[7]等方面有较广泛的实际应用。但同时我们可以看到,快速 PCR 正逐渐成为法庭科学界的研究热点之一,例如, Laurin 等^[8]在 2012 年尝试运用 TaKaRa 快速 PCR 检测试剂对 AmpFLSTR[®] Profiler Plus[®] 试剂盒的引物进行快速 PCR 扩增,成功将扩增时间缩短至 26 min; 同年,王鸿迪等^[9]应用 QIAGEN Fast Cycling PCR 试剂盒在 60 min 内完成了对 AmpFLSTR Sinofile 试剂盒引物的扩增; 2013 年, Lounsbury 等^[10]将 Thermo 快速 PCR 检测试剂与 TaKaRa 快速 PCR 检测试剂组合,与 GenePrint[®] Amelogenin 试剂盒联合构建快速 PCR 扩增体系,整个 PCR 扩增用时不足 45 min。

AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒为包含 16 个基因座的荧光标记 STR 复合扩增试剂盒,是美国 Applied Biosystems[®] 公司较早推出的高识别力 STR 试剂盒,目前在国内的案件鉴定与 DNA 数据库建设中应用广泛。为了缩短 PCR 扩增时间,提高 STR 分型速率,更好的应用于法医实践,现本文将几种常用的快速 PCR 检测试剂与 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒联合构建快速 PCR 体系,并使用快速 PCR 仪进行扩增,探索其法医学应用价值。

1 材料与amp方法

1.1 样本

9947A DNA 标准品(1 ng/ μ L) (由公安部物证

鉴定中心提供)(注:该 DNA 标准品来源于 9947A 同源细胞系,通常用作 PCR 反应的阳性对照模板,确保所得 STR 图谱的正确性)。

1.2 主要仪器及试剂

Analytik Jena SpeedCycler[®] 热循环仪(Jena 公司,德国), GeneAmp[®] PCR System 9700 型热循环仪(Applied Biosystems 公司,美国), ABI 3130xl 遗传分析仪 (Applied Biosystems 公司,美国), AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒 (Applied Biosystems 公司,美国), SpeedSTAR[™] HS DNA Polymerase (TaKaRa BIO INC. 公司,日本), PyroStart[™] Fast PCR Master Mix (2X) (Fermentas 公司,加拿大), Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen 公司,美国), Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific 公司,美国)。

1.3 PCR 扩增方法

AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒与 4 种快速 PCR 检测试剂分别组合,构建快速 PCR 体系,采用各自优化后的循环参数,在 Analytik Jena SpeedCycler² 快速 PCR 仪进行扩增。同时按照 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒说明书推荐的标准程序,在 9700 型普通 PCR 仪上进行扩增。上述实验重复 3 次,最后比较扩增时间,分型结果一致性、峰高平衡性、等位基因缺失情况等(快速 PCR 循环参数的优化,是在各检测试剂推荐程序的基础上进行相应调整,优化过程略)。

1.3.1 快速 PCR 扩增

1.3.1.1 TaKaRa 快速 PCR 检测试剂

反应体系 10 μ L, 包含 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒的 Primer Set 2 μ L, TaKaRa 快速 PCR 检测试剂的 Fast Buffer I (10X) 1 μ L, SpeedSTAR[™] HS DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.3 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L each dNTP) 1 μ L, 去离子水 5 μ L, 9947A (1 ng/ μ L) 0.5 μ L。优化后 PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 2 s, 59 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 25 $^{\circ}$ C 保存。扩增用时 22 min。

1.3.1.2 Fermentas 快速 PCR 检测试剂

反应体系 10 μ L, 包含 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒的 Primer Set 2 μ L, Fermentas 快速 PCR 检测试剂的 PyroStart[™] Fast PCR Master Mix (2X) 5 μ L, 去离子水 2.5 μ L, 9947A (1 ng/ μ L) 0.5 μ L。优化后 PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 59 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 3 min; 25 $^{\circ}$ C

保存. 扩增用时 60 min.

1.3.1.3 Invitrogen 快速 PCR 检测试剂

反应体系 10 μL , 包含 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒的 Primer Set 2 μL , Invitrogen 快速 PCR 检测试剂的 High Fidelity PCR Buffer (10X) 1 μL , dNTP Mix (10 mmol/L each dNTP) 0.2 μL , MgSO_4 (50 mmol/L) 0.6 μL , Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (5 U/ μL) 0.2 μL , 去离子水 5.5 μL , 9947A (1 ng/ μL) 0.5 μL . 优化后 PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 25 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 扩增用时 38 min.

1.3.1.4 Thermo 快速 PCR 检测试剂

反应体系 10 μL , 包含 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒的 Primer Set 2 μL , Thermo 快速 PCR 检测试剂的 Phusion Flash PCR Master Mix (2X) 5 μL , Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μL) 0.5 μL , 去离子水 2 μL , 9947A (1 ng/ μL) 0.5 μL . 优化后 PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 25 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 扩增用时 36 min.

1.3.2 常规 PCR 扩增

10 μL 反应体系: AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒的 AmpFLSTR PCR Reaction Mix 4 μL , AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/ μL) 0.2 μL , AmpFLSTR Identifiler Primer Set 2 μL , 9947A (1 ng/ μL) 0.5 μL , 去离子水 3.3 μL . 标准 PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 11 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 59 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 28 个循环; 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 min; 25 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 扩增用时 190 min.

1.4 电泳及 STR 分型数据分析

将 1 μL 上述各 PCR 扩增产物分别与 10 μL 上样混合物(20 μL GeneScan LIZ500 内标+1 000 μL 去离子甲酰胺) 混合, 用 ABI 3130xl 遗传分析仪, 按照操作手册进行电泳分离检测, 电泳结果用 GeneMapper IDv 3.2 分析软件进行分析(注: Thermo 快速 PCR 检测试剂的扩增产物采用修改过的等位基因分型标准物(ladder)进行电泳检测).

2 结果与讨论

本文将 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒分别与 TaKaRa, Fermentas, Invitrogen, Thermo 4 种快速 PCR 检测试剂联合, 采用各自优化后的快速 PCR 扩增体系和热循环参数进行扩增, 获得的分型结果见图 1~4, 并与常规 PCR 扩增所得 STR 分

型结果(图 5)对比显示: TaKaRa 快速 PCR 检测试剂与 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒联合扩增, 获得的 STR 分型与常规 PCR 扩增结果一致, 图谱清晰、准确, 未出现等位基因缺失、非特异性扩增和非模板添加不完全所致的双峰现象, 扩增用时最短, 仅 22 min, 仅个别位点 RFU 值(relative fluorescence units, 相对荧光单位) 相对较低(图 1); Fermentas 快速 PCR 检测试剂与 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒联合扩增, 所获 STR 分型亦与常规 PCR 扩增结果一致, 未见双肩峰、等位基因缺失、非特异性扩增等现象, 但位点间的峰高不平衡性较明显(图 2); Invitrogen 快速 PCR 检测试剂与 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒联合扩增, 同样可得到样本的准确 STR 分型, 亦未见非特异性扩增、等位基因缺失等现象, 但个别位点存在双肩峰现象, 基因座间的峰高平衡性也有待优化(图 3); Thermo 快速 PCR 检测试剂与 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒联合扩增, 由于该酶无法进行腺苷酸添加, 故需使用修改后的匹配 ladder 辅助电泳检测(常见的 TaqDNA 聚合酶在复制过程中, 一般会在 PCR 扩增产物的 3' 末端添加一个额外的腺苷酸, 这种非模板添加称为腺苷酸添加, 而 Thermo 快速 PCR 检测试剂所使用的快速酶不具有此功能, 因此其扩增产物与普通的 ladder 不匹配), 这为该检测试剂今后在法医实践中的应用带来一定的不便, 但更换 ladder 后同样可获得样本的可靠分型, 且基因座间的峰高平衡性较好, 具有一定的实际应用价值. 同时, 以基因座 D2S1338 为例, 4 种快速 PCR 检测试剂的扩增效率比较结果见图 6, 从多次扩增结果的峰高平均值和标准差综合判断, TaKaRa 快速 PCR 检测试剂的扩增效率较高.

上述各快速 PCR 分型结果存在的问题, 推测其原因可能是所采用的扩增体系或循环参数未达到相应快速酶的最适宜扩增条件, 有待后续通过调整 Mg^{2+} 浓度或延长退火与终延伸时间等实现进一步优化.

3 结论

综上所述, 由 TaKaRa, Fermentas, Invitrogen, Thermo 4 种快速 PCR 检测试剂分别与 AmpFLSTR[®] Identifiler[®] 试剂盒联合构建快速 PCR 扩增体系, 所得 DNA 分型结果均与常规方法一致, 尤其是 TaKaRa 快速 PCR 检测试剂所得

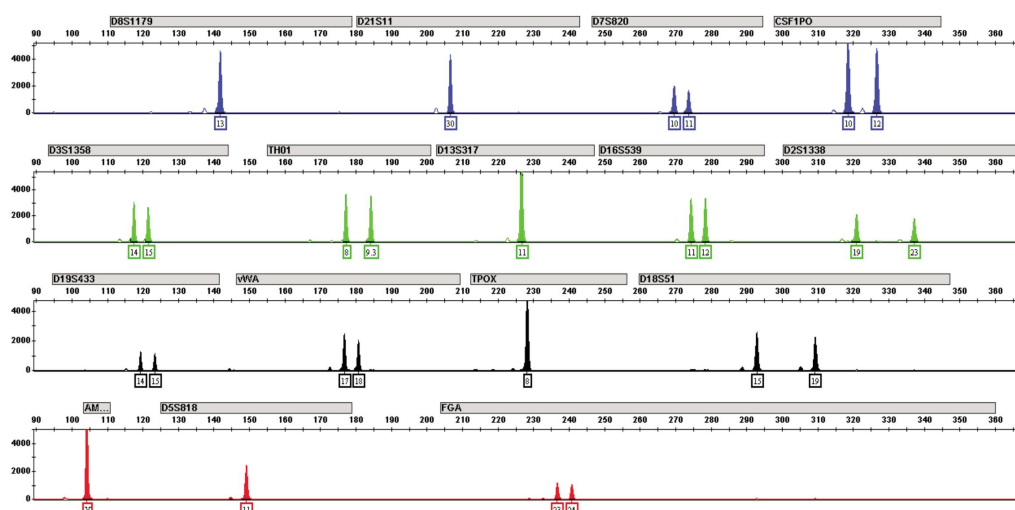


图1 TaKaRa 快速 PCR 检测试剂扩增结果

纵坐标表示峰高的 RFU 值; 横坐标表示 DNA 片段的大小; 4 种颜色代表荧光染料颜色标记的扩增产物(图 2~5 同).

Fig.1 The amplification result of TaKaRa rapid PCR detection reagent

The Y-axis represents RFU of peak height; the X-axis represents size of DNA fragments; 4 kinds of color represent the amplification products tagged by fluorescent dye (Same with Fig.2~5).

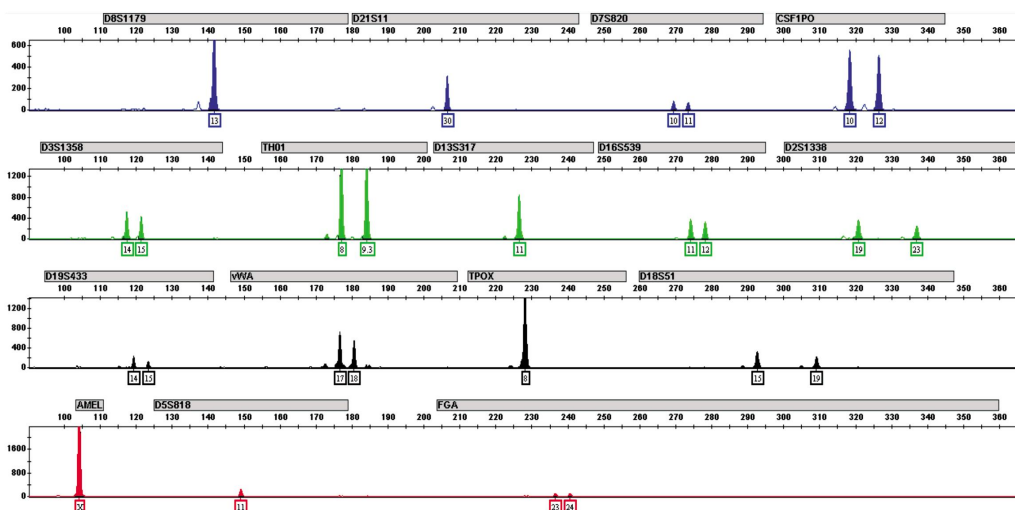


图2 Fermentas 快速 PCR 检测试剂扩增结果

Fig.2 The amplification result of Fermentas rapid PCR detection reagent

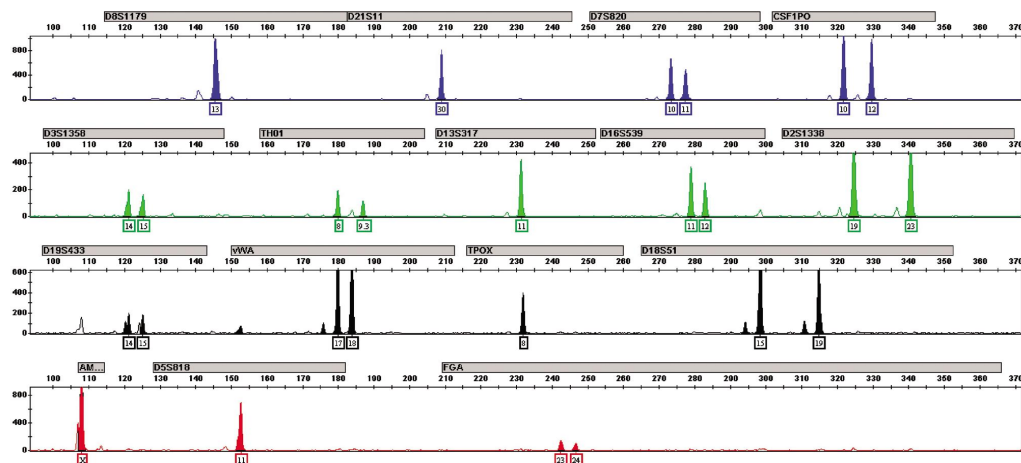


图3 Invitrogen 快速 PCR 检测试剂扩增结果

Fig.3 The amplification result of Invitrogen rapid PCR detection reagent

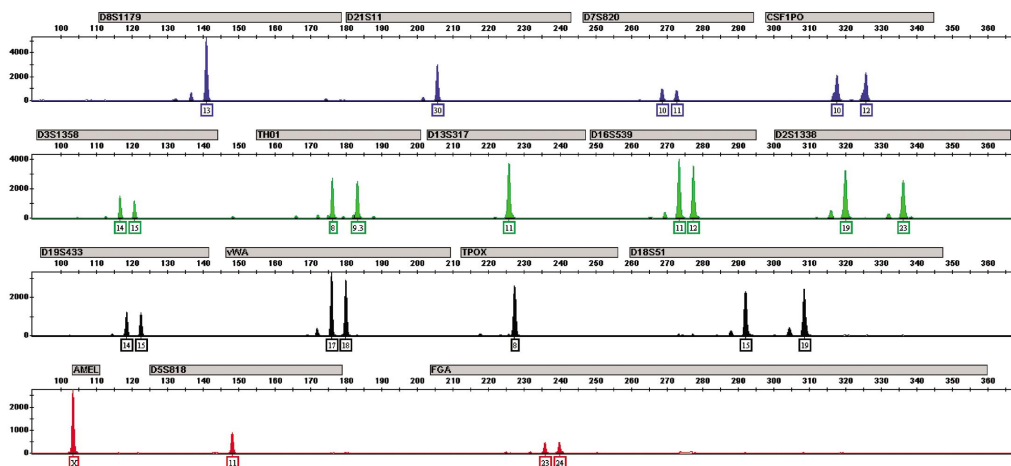


图 4 Thermo 快速 PCR 检测试剂扩增结果
 Fig.4 The amplification result of Thermo rapid PCR detection reagent

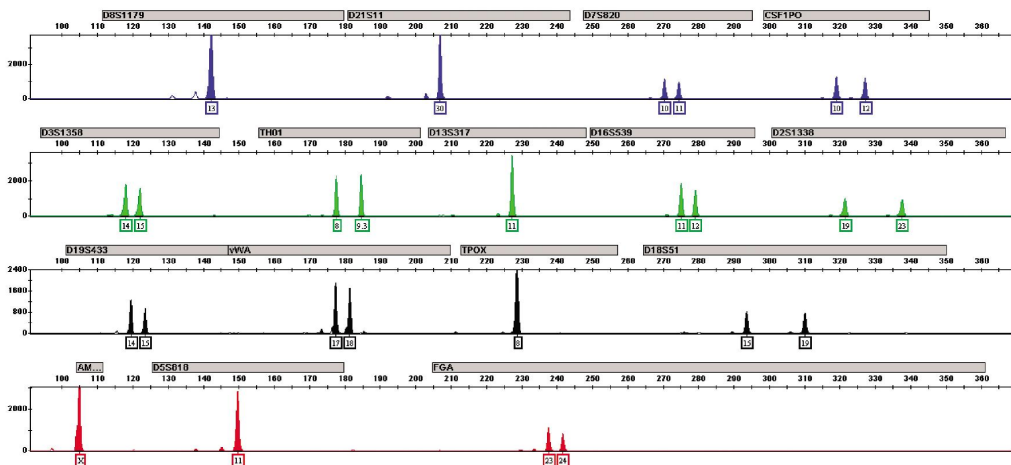


图 5 AmpFLSTR® Identifiler® 试剂盒常规扩增结果
 Fig.5 The conventional amplification result of AmpFLSTR® Identifiler® kit

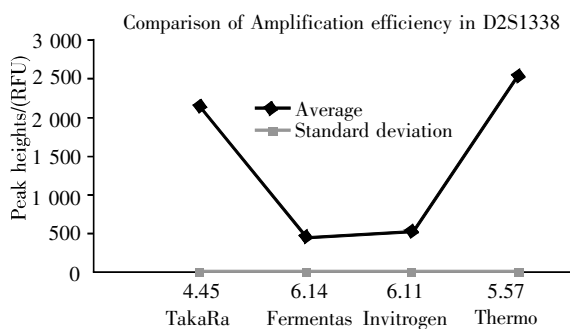


图 6 4 种快速 PCR 检测试剂的扩增效率比较
 纵坐标为峰高的 RFU 值, 横坐标示 4 种快速 PCR 检测试剂.
 Fig.6 Comparison of amplification efficiency on four rapid PCR detection reagent
 The Y-axis represents RFU of peak height and the X-axis represents four rapid PCR detection reagent.

的分型图谱清晰准确, 且扩增用时仅需 22 min, 较常规方法所需的 190 min 缩短了约 88%, 大幅度缩短了扩增时间, 提高了 DNA 分型速率, 在今后的法医实践中有很大的应用价值. 但如上所述, 仍需

通过后续研究实现 PCR 扩增体系与循环参数的进一步优化, 从而解决各种方法现存的问题, 提高各快速 PCR 检测试剂与 AmpFLSTR® Identifiler® 试剂盒的匹配程度, 更好地为法庭科学实践服务.

参考文献(References):

[1] 赵兴春, 姜伯玮. 精子细胞定向捕获与分离技术初步研究[J]. 刑事技术(ZHAO Xing-chun, JIANG Bo-wei. Preliminary study on a high specific method for directional capture and separation of sperm cells from forensic samples [J]. Forensic Science and Technology), 2012, (1): 14-17.

[2] 胡娜, 熊勇华, 许杨, 等. PCR-STR 分型技术的研究发展[J]. 国外医学(遗传学分册)(HU Na, XIONG Yong-hua, XU Yang, et al. The research and development of the PCR-STR technology[J]. Foreign Medical Sciences (Section of Genetics)), 2003, 26(6): 319-324.

[3] BERRY N, SEWELL B, JAFRI S, et al. PTH-169 clinical utility of a rapid PCR assay and traditional CCNA to detect clostridium difficile infection (CDI)-comparison to clinical diagnosis[J]. Gut, 2013, 62(1): A280-A280.

- [27] KARNIB H H, SANNA-CHERCHI S, ZALLOUA P A, *et al.* Characterization of a large Lebanese family segregating IgA nephropathy[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2007, 22 (3): 772-777.
- [28] WANG Z H, WANG W M, ZHOU T, *et al.* The association of single nucleotide P-selectin gene polymorphism with IgA nephropathy[J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 2006, 45 (7): 559-564.
- [29] TAKEI T, IIDA A, NITTA K, *et al.* Association between single-nucleotide polymorphisms in selectin genes and immunoglobulin A nephropathy[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2002, 70(3): 781-786.
- [30] WATANABE Y, INOUE T, OKADA H, *et al.* Impact of selectin gene polymorphisms on rapid progression to end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy[J]. *Internal Medicine*, 2006, 45(16): 947-951.
- [31] KIRYLUK K, NOVAKJ J, GHARAVI A G. Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy: recent insight from genetic studies[J]. *Annual Review of Medicine*, 2013, 64: 339-356.
- [32] TOMINO Y. Pathogenetic and therapeutic approaches to IgA nephropathy using a spontaneous animal model, the ddY mouse[J]. *Clinical and Experimental Nephrology*, 2011, 15(1): 1-7.
- [33] ZHENG F, KUNDU G C, ZHANG Z, *et al.* Uteroglobin is essential in preventing immunoglobulin A nephropathy in mice[J]. *Nature Medicine*, 1999, 5(9): 1018-1025.
- [34] GERMAIN D P. Fabry disease [J]. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2010, 5: 30.
- [35] SHEMESH T, WHYBRA C, DELGADO-SANCHEZ S, *et al.* Paraonase (PON1) gene polymorphisms in Fabry disease: correlation with renal disease[J]. *Nephron Clinical Practice*, 2010, 116(4): c289-293.
- [36] BENOIT G, MACHUCA E, ANTIGNAC C. Hereditary nephrotic syndrome: a systematic approach for genetic testing and a review of associated podocyte gene mutations[J]. *Pediatric Nephrology*, 2010, 25(9): 1621-1632.
- [37] MACKENSEN F, BILLING H. Tubulointerstitial nephritis and uveitis syndrome[J]. *Current Opinion in Ophthalmology*, 2009, 20(6): 525-531.
- [38] MACKENSEN F, DAVID F, SCHWENGER V, *et al.* HLA-DRB1*0102 is associated with TINU syndrome and bilateral, sudden-onset anterior uveitis but not with interstitial nephritis alone[J]. *The British Journal of Ophthalmology*, 2011, 95(7): 971-975.
- [39] LEVINSON R D, PARK M S, RIKKERS S M, *et al.* Strong associations between specific HLA-DQ and HLA-DR alleles and the tubulointerstitial nephritis and uveitis syndrome[J]. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2003, 44 (2): 653-657.
- [40] HAN K H, LEE H, KANG H G, *et al.* Renal manifestations of patients with MYH9-related disorders[J]. *Pediatric Nephrology*, 2011, 26(4): 549-555.
- [41] HEATH K E, CAMPOS-BARROS A, TOREN A, *et al.* Non-muscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2001, 69(5): 1033-1045.
- [42] SEKINE T, KONNO M, SASAKI S, *et al.* Patients with Epstein-Fechtner syndromes owing to MYH9 R702 mutations develop progressive proteinuric renal disease[J]. *Kidney International*, 2010, 78(2): 207-214.
- [43] PARKER L L, GAO J, ZUO J. Absence of hearing loss in a mouse model for DFNA17 and MYH9-related disease: the use of public gene-targeted ES cell resources[J]. *Brain Research*, 2006, 1091(1): 235-242.
- [44] ECCLES M R, SCHIMMENTI L A. Renal-coloboma syndrome: a multi-system developmental disorder caused by PAX2 mutations[J]. *Clinical Genetics*, 1999, 56(1): 1-9.
- [45] HEGELE R A, CAO H, LIU D M, *et al.* Sequencing of the re-annotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2006, 79(2): 383-389.
- [46] MOREL L. Genetics of human lupus nephritis[J]. *Seminars in Nephrology*, 2007, 2(1)7: 2-11.
- [47] CASTELLETTI F, DONADELLI R, BANTERLA F, *et al.* Mutations in FN1 cause glomerulopathy with fibronectin deposits[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2008, 105(7): 2538-2543.
- [48] ZSURKA G, ORMOS J, IVÁNYI B, *et al.* Mitochondrial mutation as a probable causative factor in familial progressive tubulointerstitial nephritis[J]. *Human Genetics*, 1997, 99(4): 484-487.
- [49] DELTAS C, PIERIDES A, VOSKARIDES K. The role of molecular genetics in diagnosing familial hematuria (s)[J]. *Pediatric Nephrology*, 2012, 27(8): 1221-1231.
- [50] KASHTAN C E. Familial hematuria[J]. *Pediatric Nephrology*, 2009, 24(10): 1951-1958.
- [51] 梁卉, 魏毅, 邓昊. 原发性震颤的遗传学研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*(LIANG H, GUO Y, DENG H. Progress in genetics of essential tremor[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2011; 38(1): 5-10.

(上接第 435 页)

- [4] STEGGER M, LINDSAY J A, MOODLEY A, *et al.* Rapid PCR detection of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying sau1-hsdS1[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(2): 732-734.
- [5] 谈忠鸣, 鲍昌俊, 潘红星, 等. 快速 PCR 检测猪链球菌 2 型方法的研究及应用[J]. *江苏预防医学*(TAN Zhong-ming, BAO Chang-jun, PAN Hong-xing, *et al.* Establishment of fast PCR assay 5 species genes for *Streptococcus Suis* serotype 2 and its application to detect strains isolated from Jiangsu[J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*), 2012, 23(6): 9-11.
- [6] 赵静雪, 崔光红, 辛敏通, 等. 金钱白花蛇快速 PCR 鉴别方法的建立[J]. *药学报*(ZHAO Jing-xue, CUI Guang-hong, XIN Min-tong, *et al.* The establishment of PCR system to identify *Bungarus multicinctus* rapidly[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*), 2010, 45(10): 1327-1332.
- [7] 赵成萍, 袁建琴, 唐中伟, 等. 转基因棉籽 DNA 提取纯化及快速 PCR 检测研究[J]. *现代农业科技*(ZHAO Cheng-ping, YUAN Jian-qin, TANG Zhong-wei, *et al.* Study on DNA extraction purification and rapid detection of transgenic cottonseed[J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*), 2011, (3): 32-32, 35.
- [8] LAURIN N, FRÉGEAU C. Optimization and validation of a fast amplification protocol for AmpFLSTR® Profiler Plus® for rapid forensic human identification[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2012, 6(1): 47-57.
- [9] 王鸿迪, 董海成, 于俊峰, 等. AmpFISTR Sinofiler 快速 PCR 扩增初探[J]. *中国法医学杂志*(WANG Hong-di, DONG Hai-cheng, YU Jun-feng, *et al.* Preliminary study of AmpFISTR Sinofiler rapid PCR[J]. *Chinese Journal of Forensic Medicine*), 2012, 27(5): 397-398.
- [10] LOUNSBURY J A, KARLSSON A, MIRANIAN D C, *et al.* From sample to PCR product in under 45 minutes: a polymeric integrated microdevice for clinical and forensic DNA analysis[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(7): 1384-1393.