

毛干 DNA 提取方法概述*

管政 陈爱亮**

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 北京 100081)

摘要 毛干作为最容易取得的一种无创、运输和储存方便的生物样本,对从核酸分子水平上进行各方面研究有着十分重要的意义。但毛干中 DNA 含量低,不易提取,而且存在大量角蛋白和色素,纯化不净会对下游 PCR 扩增等反应产生抑制作用。基于毛干 DNA 提取现状,综述并比较了近三十年动物及人类毛发的毛干 DNA 提取、纯化等相关方法,拟为毛干 DNA 提取在分子生物学各领域的推广应用提供充分的文献支持和参考。

关键词 毛干 DNA 提取

中图分类号 Q812

毛干(hair shaft),即不包含毛根的毛发。它作为最容易取得的一种无创、运输和储存方便的生物样本,对从核酸分子水平上进行动物物种鉴定、物种起源、亲缘关系、系统进化、多样性评估、良种繁育、疾病监测、刑侦法医及古生物学等方面研究都有着十分重要的意义。

随着分子生物学及 PCR 技术的发展,利用毛发提取 DNA^[1]、进行 DNA 分型^[2]等研究具有了现实可行性。然而,由于毛干结构组成不同于常规生物样本、DNA 含量低等问题,常造成 DNA 提取、纯化困难,导致毛干取材的分子生物学相关研究受到限制、并造成进一步实验的不稳定,影响下游工作。因此,本文对涉及毛干 DNA 提取方法相关的文献进行了比较整理和综述,以期对相应领域的实验研究提供参考与借鉴。

1 毛干结构分析^[3]

如表 1 所示,毛干由髓质层(核心层)、皮质层(中层)和角质层(外层)组成。毛干的主要组成部分是角蛋白纤维,它们组成了狭长的皮质细胞,毛干中 90% 以上由蛋白组成。皮质层中,交联角蛋白组成了毛干内部的支撑结构,并大量填充了 α -角蛋白,皮质细胞核被坚硬的角蛋白包裹着,因此毛干 DNA 的提取一般需包含降解角蛋白的步骤。通常需在 56℃ 消化 8 小时以上,此过程多采用 SDS 裂解细胞、蛋白酶 K 降解角蛋白、二硫苏糖醇或 2-巯基乙醇打开交联蛋白的二硫键。此外,髓质层与皮质层中含有大量色素,在一般提取操作中色素不易与 DNA 分离而可能抑制 PCR 扩增^[4-5]。

表 1 毛干结构组成^[3]

Table 1 Biomolecular characteristics of hair sections

组成	髓质层	皮质层	角质层
质量百分比	<2%	88%	10%
主要蛋白组成	毛透明蛋白	α -螺旋角蛋白纤维,交联角蛋白	毛透明蛋白,交联角蛋白
主要氨基酸	谷氨酸盐,谷氨酰胺,瓜氨酸,亮氨酸	半胱氨酸,丝氨酸,谷氨酸盐	半胱氨酸,丝氨酸,脯氨酸,甘氨酸,谷氨酸盐
蛋白交联	谷氨酰-赖氨酸	二硫键,憎水基	二硫键,异构肽键

有研究表明,在毛发生长过程中,毛发的角质化会导致皮质细胞溶解、核 DNA (nuclear DNA, nuDNA) 损

失^[6]。毛干中可提取得到 DNA 的主要区域现今尚未有确切说法。Kalbe 等^[7]曾从人发干中提取得到约 20000bp 的 DNA,并认为其主要存在于外部的角质层。

收稿日期:2012-07-02 修回日期:2012-09-03

* 公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(201203046)

**通讯作者,电子邮箱:ailiang.chen@gmail.com

2 毛干 DNA 提取方法整理与比较

毛干 DNA 的提取是在常规血液、肌肉组织等样本 DNA 提取方法的基础上改进而成的,主要特殊点在于大量坚硬的角蛋白包裹、DNA 含量低以及色素等的存在对下游工作的影响。因此,细胞裂解、降解角蛋白、打开二硫键进而最大限度释放 DNA 并在此过程中尽量减少蛋白、色素在提取液中残留的步骤是关系整个毛干 DNA 提取成败的主要步骤。同时,杂质多、含量低的问题也使得毛干 DNA 的进一步纯化、富集及其相应的下游 PCR 扩增方法等步骤显得十分重要。故本文拟对毛干 DNA 提取及涉及下游 PCR 实验相关的纯化、富集方法作一比较综述。

2.1 毛干 DNA 提取方法

分析 CNKI、万方、维普、Web of Science、PubMed 等几个数据库检索所得的近三十年涉及毛干 DNA 提取

的国内外文献,大致可将毛干 DNA 提取等相关方法分为 5 类:

- (1)经典有机溶剂提取法(酚、氯仿等有机溶剂提取前,加 SDS、DTT、TritonX-100 等裂解并加蛋白酶 K 在 37~65℃ 下水浴消化 8h 以上);
- (2)Chelex 100 处理法;
- (3)Qiagen、Promega 等试剂盒处理法;
- (4)PCR 缓冲液加蛋白酶 K 快速提取法;
- (5)组合方法,如“经典有机溶剂法”结合“纳米磁珠法”等。

其中,除第 4 类方法外,一般都需要或包含再行纯化、富集的步骤,如超滤除盐、乙醇沉淀等。每一类方法在实际应用中各自在同类试剂选择及试剂浓度、每步重复次数、处理时间、温度上会有差别,具体代表性方法应用的文献整理见表 2。

表 2 成功提取毛干 DNA 的代表性方法汇总
Table 2 Summary of DNA extraction methods in hair shafts

提取纯化方法	DNA 得率	具体步骤
经典有机溶剂提取法	nuDNA ^[8] 1.45 μg/mg	样品液氮中磨碎,加裂解液(Tris 缓冲液、EDTA、SDS、蔗糖)及蛋白酶 K,50℃ 水浴 20h,Tris 饱和酚、氯仿:异戊醇(24:1)各抽提 1 次,加醋酸钠、无水乙醇沉淀,70% 乙醇洗
	mtDNA ^[9] (—)	样品加裂解液(DTT、SDS、EDTA-N16)及蛋白酶 K,37℃ 水浴过夜,至毛干溶化,Tris 饱和酚、饱和酚:氯仿(1:1)、氯仿各抽提 1 次,加醋酸钠、无水乙醇沉淀,70% 乙醇洗
	mtDNA ^[10-13] (—)	样品加裂解液[SDS、DTT、PTB(N-phenacylthiazolium bromide)、NaCl、Tris 缓冲液]及蛋白酶 K,55℃ 水浴 24 h,Tris 饱和酚-氯仿抽提,Millipore 公司产品超滤
	mtDNA ^[14] (—)	样品加裂解液(DTT、CaCl ₂ 、Tris 缓冲液)及蛋白酶 K,55℃ 水浴 10h,酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)、氯仿各抽提 1 次,Microcons 30YM 超滤,膜 TE 洗 3 次
	mtDNA ^[2, 5, 15-16] (—)	样品加裂解液(SDS、DTT、EDTA、NaCl、Tris 缓冲液)及蛋白酶 K,56℃ 水浴过夜,Tris 饱和酚、氯仿各抽提 1 次,Amicon 公司 Centricon30 或 Microcon 100 超滤
	总 DNA ^[17] 5ng/mg	样品冻干粉粉碎,加裂解液(含羟基喹啉、醋酸钠的苯酚、SDS、EDTA)过夜,氯仿-异戊醇(25:1)抽提 2 次,无水乙醇沉淀,70% 乙醇洗,色素等琼脂糖凝胶纯化
Chelex-100 法	mtDNA ^[18] (—)	样品加裂解液(SDS、DTT、PTB、NaCl、Tris 缓冲液)及蛋白酶 K,55℃ 水浴 24h,酚、氯仿抽提,Millipore 公司 microcon 产品超滤
	nuDNA ^[19] 0~0.117 ng/cm 0~80ng/mg	样品不清洗,加裂解液(EDTA、NaCl、Tris 缓冲液)浸泡 1-24 hr,加蛋白酶 K 与 CaCl ₂ ,56℃ 水浴 2h,酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)、氯仿各抽提 1 次,超滤
	nuDNA 及 mtDNA ^[20, 21] (—)	样品 5% Chelex 100(Sigma 公司),56℃ 水浴 30 min-6h,100℃ 水浴 8 min,离心
	mtDNA ^[22] (—)	样品 Chelex 100 法抽提,Microcon 100 纯化
	mtDNA ^[23] (—)	样品德国 QIAGEN 公司 QIAamp® DNA Mini Kit 试剂盒处理(其中需另加蛋白酶 K,52℃ 水浴过夜)
试剂盒处理法	mtDNA ^[24] (—)	样品粉碎,美国 Promega 试剂盒处理(DNA IQTM System, Cat. #DC6701 及 Cat. #DC6740)
	nuDNA ^[25] 0~0.726ng/cm	样品德国 QIAGEN 公司 QIAquick® PCR Purification Kit 试剂盒处理(有方法改进)
	mtDNA ^[26] (—)	样品日本 Nippon Gene 公司 ISOHAIR 试剂处理,NaI 法提取纯化,Wako 公司 Genome DNA 抽提试剂盒进一步处理
	mtDNA ^[27] (—)	样品德国 QIAGEN 公司 QIAamp® DNA Micro Kit 试剂盒处理
	mtDNA ^[28] (—)	样品美国 Promega 公司 Tissue and Hair Extraction Kit 试剂盒处理
	mtDNA ^[29] (—)	样品美国 Applied Biosystems 公司 PrepFiler BTA Express™ 处理(AutoMateExpress™ 设备,裂解时间 2h)

(续表 2)

提取纯化方法	DNA 得率	具体步骤
PCR 缓冲液快速提取法	总 DNA ^[30-31] 27.5 ~ 50ng/cm	样品在 PCR 缓冲液、MgCl ₂ 溶液及蛋白酶 K 组成的 PCR 反应系统中, 65℃ 30min, 95℃ 15min, 4℃ 10min, PCR1 个循环后瞬时离心
	nuDNA 及 mtDNA ^[32] (一)	样品在 DTT、TritonX-100、PCR 缓冲液及蛋白酶 K 组成的 PCR 反应系统中 65℃ 水浴 30min, 100℃ 8min, 4℃ 10min, 瞬时离心
	mtDNA ^[33-36] (一)	样品在 AB 公司 Gene-Amp® PCR 缓冲液 II, Sigma 公司 DTT 及蛋白酶 K 组成的 PCR 反应系统中, 56℃ 水浴 1 ~ 2h, 95℃ 10min
	mtDNA ^[37] (一)	样品压发机碾压后, 加裂解液 (DTT、TritonX-100、EDTA、Tris 缓冲液) 及蛋白酶 K, 50℃ 摇床水浴 1 晚, 100℃ 8min, 凝胶回收试剂盒 (东盛生物科技有限公司) DNA 吸附纯化柱纯化
组合法	总 DNA ^[26, 38] 0 ~ 7.8ng/根	样品加裂解液 (DTT、SDS、Tris 缓冲液) 及蛋白酶 K, 56℃ 水浴, 直至毛发消化完全, 纳米磁珠法纯化
	mtDNA ^[4] < 0.5ng/cm (低于检测限)	样品加裂解液 (SDS、DTT、NaCl、EDTA、Tris 缓冲液) 及蛋白酶 K, 37℃ 水浴 1 晚, Tris 饱和酚抽提 1 次, 酚-氯仿抽提 2 次, 氯仿抽提 1 次, Amicon 公司 Centricon 30 超滤, CTAB 法纯化
	nuDNA ^[39] 0.1ng/cm	样品加裂解液 (SDS、DTT、PTB、EDTA、醋酸钠、Tris 缓冲液) 及蛋白酶 K, 55℃ 水浴过夜, 酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提 2 次, Talent 公司 CleanMix 试剂盒并 DNase / RNase-free 处理, Millipore 公司 Microcon YM30 超滤
	nuDNA ^[40] (一)	样品加含 DTT 的裂解液, 二氧化硅膜柱处理, Microcon 100 超滤

注: (一) 文献未注明得率。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)

2.2 影响毛干 DNA 提取的因素分析与方法比较

Allen 等^[35]发现毛发中 DNA 含量对其提取及下游 PCR 扩增的成功率有较大影响, nuDNA 在每个细胞中只有 1 个 copy, 而 mtDNA 则有 10³ ~ 10⁴ 个 copy, 因此毛干 mtDNA 的提取扩增往往能获得较高的成功率有较好的重复性, 更多的研究也相应集中在 mtDNA 的提取及应用上。但由于 (1) mtDNA 资料无法在各数据库中进行 STR 基因分型的对比, 缺乏 STR 判别特性; (2) mtDNA 不能显现母源的特征; (3) mtDNA 在基因分型上会产生显著但不规律的异质性等原因^[19]而存在应用限制, 故同时寻找毛干 mtDNA 及 nuDNA 各自合适的提取方法显得尤为重要。

在本综述的文献整理过程中, 毛干两种 DNA 的提取、扩增、测序等实验的得率及成功率曾被作为主要考察因素来观察究竟何种提取、纯化、富集的方法更适用于二者及总 DNA 的研究, 但由于物种差异、个体差异、毛发质地和生长期差异、色素及提取溶剂对 PCR 扩增的抑制、染发、样品存放时间、PCR 扩增条件等等因素的原因, 确实很难单纯地对各文献报道的提取相关方法的优劣作一简单比较。

因而各毛干 DNA 提取相关研究的影响因素及其相关统计资料的总结对方法比较显得更为重要。国际法医遗传组织 (International Society of Forensic Genetics, ISFG) 的西班牙葡萄牙合作组 (Spanish and Portuguese working group, GEP) 在 2000 ~ 2001 年间做了毛干

mtDNA 相关的一个联合研究^[41], 西班牙、葡萄牙及拉丁美洲部分国家的 64 个实验室参与了这次质控的实验。他们研究了 5 份不同的生物样本, 其中 2 段 2 ~ 4cm 长的毛干取材作为样本 5 做了 mtDNA 的提取、扩增与测序研究, 结果 23 个实验室 (43%) 没能在这个项目的实验中取得数据, 只有 3 个实验室得到了正确的测序报道, 其中不少曾经在过去的毛干 mtDNA 相关的联合研究中取得过成功检测结果的实验室并未在这次实验中取得相应结果, 该组织认为不同的提取方法与下游 mtDNA 扩增的成功率无关。同时, 此次研究进一步对毛干取材样本的 mtDNA 提取、扩增、测序影响因素做了考察, 发现取材 mtDNA 基因位点的突变对扩增无干扰, 增加 PCR 模板及 Taq 酶用量有助于增加扩增效率, 另外涉及 DNA 提取的研究表明与前人研究^[6]一致的是无髓鞘的发干的 DNA 提取得率较高, 而提取中引起的各种 PCR 扩增抑制性因素对下游实验有较大影响^[5, 42]。

除了上述影响因素外, 从 DNA 提取、扩增成功的原因分析上看, Gilbert 等^[11]认为由于毛干角质层结构特殊角质蛋白包埋保护了 DNA, 故可从古生物毛干上成功提取扩增 DNA, 但亦有报道认为样本存放时间不同对毛干 mtDNA 提取扩增的成功率有较大影响^[40]; Heywood 等^[43]认为永久性染发、清洗等因素会导致可检测 DNA 的含量降低, 涂政等^[44]的研究则发现女性中烫染发个体 STR 分型成功率为 33.3%, 非烫染发个体

为 29.4%,认为烫染发对 nuDNA 的 STR 分型成功率影响可能跟烫染发方式、频率及其后毛发的持续生长有关;另外,关于毛干提取前的清洗及裂解消化的处理对 DNA 提取扩增成功率等的研究上也有一些有意思的现象,一些研究者认为提取前样本清洗及裂解消化的过程会降低 nuDNA 和 mtDNA 的提取得率及提取扩增的成功率^[17, 19, 41],但也有研究^[39]发现不同的样本前处理对毛干 nuDNA 的提取扩增没有影响,并从西伯利亚干尸中成功获取了 nuDNA。值得注意的是,一系列研究^[4, 5]发现色素对 PCR 扩增抑制严重,取样量过低或过高都可导致毛干 DNA 提取及其 PCR 扩增检测失败,建议最佳取样量为 5~10cm。从这些不同的研究分析,毛干 DNA 的存在部位未必尽如一般认为的那样仅主要存在于外部角质层^[7, 19, 43],合适的条件下也可能存在于毛干内部^[11, 45~46],而不同样本在不同的环境中核酸酶的存在可能是导致毛干 DNA 检测成功与否及含量差异的一个主要影响因素^[47],推测样本合适的取样量、样本处理及处理中产生的 PCR 抑制因素对后续实验的影响可能是最终毛干 DNA 提取扩增成功与否的关键。

从不同的文献对各类毛干 DNA 提取方法的方法学比较看,结论主要有如下几种:Vigilant^[36]做了 mtDNA 4 种不同提取方法的对比实验,结果经典有机溶剂提取法提取扩增成功率为 48%,Qiagen tissue kit 试剂盒成功率为 42%,Chelex 方法成功率为 70%,PCR 缓冲液快速提取法成功率最高,为 85%。

Takayanagi 等^[26]做了 mtDNA 3 种不同提取方法的对比实验,结果组合方法中加纳米磁珠法纯化的方法提取及扩增效果稳定且迅速,组合方法中以 NaI 纯化的方法效果亦稳定,但经典有机溶剂法提取需要较高的人员操作技巧,结果不如前两种方法有效、可靠。

胡钰娟等^[20]采用经典有机溶剂法、Chelex100 法、PCR 缓冲液快速提取法对大鼠毛发 DNA 做了提取的方法学考察,结果显示,PCR 缓冲液快速提取法不能从毛干中提取 nuDNA,经典有机溶剂法不能从 1、2 根鼠毛中提取 mtDNA,而 Chelex100 法可从毛干和单根鼠毛中提取 mtDNA 和 nuDNA。

高林林等^[22]采用 Chelex100 法、经典有机溶剂提取法及三种不同的组合方法对染色毛发 mtDNA 进行了提取扩增,结果 Chelex-100 结合 Microcon100 超滤提取扩增染色毛发 mtDNA 效果较好,其余方法均无扩增产物。

McNevin 等^[19]报道,蛋白酶 K、游离 Ca^{2+} 的存在(减少 EDTA 与 Ca^{2+} 结合)可相应增加成功率,SDS 则对 PCR 扩增有抑制。

Barbaro^[40]等在考察提取方法时发现,样品用加含 DTT 的裂解液处理,无论在二氧化硅膜柱提取纯化情况下或用经典有机溶剂法提取均可加强提取效果、增加提取得率。

苏一等^[8]用经典有机溶剂提取法考察了 3 种不同的提取方法的提取效率,发现在裂解液中增加蛋白酶 K 用量、添加蔗糖升高溶液黏度及用液氮预先将毛干在冷冻状态下碾磨粉碎有助于提高 DNA 得率。

3 总结与讨论

分析成功提取毛干 DNA 的文献资料发现,使用经典有机溶剂法成功提取毛干 DNA 的研究占近 37%,其主要文献基础是 Higuchi 等^[2]的方法略做变化而来,且组合方法中的初步提取亦常以有机溶剂提取法为基础;不同试剂盒提取法占 21%,其中以德国 Qiagen 及美国 Promega 试剂盒为主;PCR 缓冲液加蛋白酶 K 快速提取法占 18%;Chelex100 法占 8%;其余则多为联用方法。其中,成功提取得到 nuDNA 的方法报道,主要为基于有机溶剂提取法的组合方法及 PCR 缓冲液加蛋白酶 K 快速提取法,而 mtDNA 在各提取方法中提取成功率均较高。此外,国际法医遗传组织(International Society of Forensic Genetics, ISFG)的西班牙葡萄牙合作组(Spanish and Portuguese working group, GEP)在 2003~2004 年的合作研究中^[48]毛发 mtDNA 的各提取方法各实验室应用情况统计数据报道为:经典有机溶剂提取法 37%,Chelex100 法 20%,其余则为试剂盒法、PCR 缓冲液快速提取法及组合方法。

从文献提取得率及 PCR 扩增成功率看,相同的提取方法各文献报道的得率与成功率变化区间很大,不具有直接可比性,这个推论与国际法医遗传组织(International Society of Forensic Genetics, ISFG)西班牙葡萄牙合作组(Spanish and Portuguese working group, GEP)在 2000~2001 年间做的毛干 mtDNA 相关的一个联合研究^[41]的认识基本一致。推测主要是由于样本间差异及操作、试剂等方面的不同引起。

文献比较之后,各方法的优缺点总结如下:

(1)经典有机溶剂提取法与组合方法:适用于取样量较大、有较充足样本的情况下做 DNA 提取,尤其是疑难样本,多次纯化后可得到高纯度 DNA;但对操作技

术及后期纯化要求较高、耗时较多。

(2) Chelex 100 处理法与试剂盒处理法: 操作技术要求较低, 尤其适用于毛干样本量较少的情况, 如法医学、考古学材料; 但价格较贵、不适用于农业如畜牧业物种溯源等需要大范围、大量取样的研究。

(3) PCR 缓冲液加蛋白酶 K 快速提取法: 操作技术要求较低, 且耗时较少、试剂成本较低, 不需后期纯化步骤即可顺利进行 PCR 扩增; 但对样品取样量范围需做考察, 以减少杂质对 PCR 扩增的影响, 亦不适用于大量 DNA 的制备。

建议在毛干 DNA 的提取过程中: (1) 一般情况下样本宜尽量减少清洗步骤, 必须清洗则采用超纯水或乙醇做适当的清洗, 以减少 DNA 在清洗过程中可能的损失; (2) 提取 nuDNA 可首先考虑采用加蛋白酶 K 缓冲液温和浸泡处理提取, 不必做过多的细胞裂解等工作, 在不减少 nuDNA 得率的情况下尽量减少色素、蛋白及提取液成分造成的污染, 避免对下游 PCR 扩增造成抑制; (3) 毛发取用量亦在 5 ~ 10cm 为宜, 这也是文献报道^[4]的 DNA 模板量充分且色素含量不至于完全抑制 PCR 扩增的区间(若所用样本 DNA 含量过低, 10cm 取样仍无法顺利扩增, 则可增加取样量并采用 CTAB 法纯化或者大量取样按文献^[17]报道的方法提取后做琼脂糖凝胶电泳, 回收后再行扩增, 以除去色素抑制); (4) 经典溶剂法提取时, 蛋白酶 K、游离 Ca^{2+} 的存在(减少 EDTA 与 Ca^{2+} 结合)及使用 DTT 裂解可相应增加成功率, SDS 对 PCR 扩增有抑制使用时宜减少用量^[19, 40]; (5) 五类提取方法除第 4 类外, 一般均宜增加超滤除盐步骤, 以减少多步骤提取后不明小分子成分造成的 PCR 扩增抑制^[19]; (6) mtDNA 提取采用第 4 类方法(PCR 缓冲液加蛋白酶 K 快速提取法), 是文献报道较前三类方法取得扩增成功率更高, 且操作更为便捷的方法^[36]; (7) 条件允许的情况下, 认为新鲜的毛发及冷冻储存将会对增加 DNA 尤其 nuDNA 提取、扩增成功率产生帮助; (8) 如样本 DNA 含量过低造成提取、扩增困难则建议尝试基于有机溶剂提取法的组合方法(可参见“表 2”组合提取法列表文献及其他提取方法文献), 并考虑色素及提取裂解中可能产生的且未能在超滤过程中清除干净的小分子物质对 PCR 扩增的抑制, 增加模板及 Taq 酶的用量、增加 PCR 循环数(≥ 34 次)或进一步采取巢式 PCR 的方法等。

参考文献

[1] Bradfield R B, Gray S O. Letter: simplified procedure for field

preparation of hair DNA specimens. *Lancet*, 1975, 1(7903): 406-409.

- [2] Higuchi R, Vonberoldingen C H, Sensabaugh G F, et al. DNA typing from single hairs. *Nature*, 1988, 332(6164): 543-546.
- [3] Mcnevin D, Wilson-Wilde L, Robertson J, et al. Short tandem repeat (str) genotyping of keratinised hair-part 1. Review of current status and knowledge gaps. *Forensic Science International*, 2005, 153(2-3): 237-246.
- [4] Nozawa H, Yamamoto T, Uchihi R, et al. Purification of nuclear DNA from single hair shafts for DNA analysis in forensic sciences. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*. 1999, 1: 61-67.
- [5] Uchihi R, Tamaki K, Kojima T, et al. Deoxyribonucleic-acid (DNA) typing of human-leukocyte antigen (hla)-dqa1 from single hairs in Japanese. *Journal of Forensic Sciences*, 1992, 37(3): 853-859.
- [6] Linch C, Whiting D, Holland M. Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist. *Journal of Forensic Sciences*, 2001, 46(4): 844-853.
- [7] Kalbe J, Kuropka R, Meyer-Stork L S, et al. Isolation and characterization of high-molecular mass DNA from hair shafts. *Biol Chem*, 1988, 369: 413-416.
- [8] 苏一, 边连全, 宣之兴. 猪毛干部位基因组 DNA 的三种提取方法比较. *湖北农业科学*, 2010(10): 2337-2340.
Su Y, Bian L Q, Xuan Z X. Comparison of three DNA extraction methods from the hair shaft of swine. *Hubei Agricultural Science*, 2010(10): 2337-2340.
- [9] 白梅. 辽宁地区汉族人群 D17S518 基因座多态性及其毛发检材的应用研究. 北京: 中国医科大学, 2008.
Bai M. Study on genetic polymorphism of D17S518 in Liaoning Han population and its application in hair samples. Beijing: China Medical University, 2008.
- [10] Wilson A S, Dixon R A, Dodson H I, et al. Yesterday's hair - human hair in archaeology. *Biologist*, 2001, 48(5): 213-217.
- [11] Gilbert M, Menez L, Janaway R C, et al. Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Science International*, 2006, 156(2-3): 208-212.
- [12] Barnes I, Matheus P, Shapiro B, et al. Dynamics of pleistocene population extinctions in beringian brown bears. *Science*, 2002, 295(22): 2267-2270.
- [13] Thomas M, Gilbert P, Wilson A S, et al. Ancient mitochondria DNA from hair. *Current Biology*, 2004, 14(12): R463-R464.
- [14] Clack A A, Macphee R D, Poinar H N. *Myiodon darwini* DNA sequences from ancient fecal hair shafts. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2012, 194(1): 26-30.
- [15] Jehaes E, Gilissen A, Cassiman J J, et al. Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. *Forensic Science International*, 1998, 94(1-2): 65-

- 71.
- [16] Vigilant L, Pennington R, Harpending H, et al. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a Southern African population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 9350-9354.
- [17] Schreiber A, Amtmann E, Storch V, et al. The extraction of high-molecular-mass DNA from hair shafts. *Febs Letters*, 1988, 230(1-2): 209-211.
- [18] Gilbert M, Janaway R C, Tobin D J, et al. Histological correlates of postmortem mitochondrial DNA damage in degraded hair. *Forensic Science International*, 2006, 156(2-3): 201-207.
- [19] Mcnevin D, Wilson-Wilde L, Robertson J, et al. Short tandem repeat (str) genotyping of keratinised hair - part 2. An optimised genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of str profiles. *Forensic Science International*, 2005, 153(2-3): 247-259.
- [20] 胡钰娟, 孔维佳, 韩月臣, 等. 提取大鼠毛发核酸 3 种方法的比较. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2004(5): 288-291.
Hu Y J, Kong W J, Han Y C, et al. The comparison of three ways for extracting nucleic acid from rat's hair. *J Clin Otorhinolaryngol (China)*, 2004(5): 288-291.
- [21] 陈青, 马力宏, 张纯斌. 人类运动能力的遗传学研究新方法——单根毛发中线粒体 DNA RFLP 分析. *中国运动医学杂志*, 1999, 18(1): 44-45.
Chen Q, Ma L H, Zhang C B. A method for genetic study of human exercise capacity—the RFLP analysis of mitochondrial DNA from a single hair. *Chinese Journal of Sports Medicine*, 1999, 18(1): 44-45.
- [22] 高林林, 唐晖, 严江伟, 等. 染色毛干 mtDNA 不同提取方法的研究. *中国法医学杂志*, 2006(5): 284-286.
Gao L L, Tang H, Yan J W, et al. A study of methods extracting mtDNA from coloring hair shafts. *Chin J Forensic Med*, 2006(5): 284-286.
- [23] 蔡大伟, 于慧鑫, 赵欣, 等. 一种简便高效的古代动物毛皮 DNA 提取方法. *吉林大学学报(理学版)*, 2010, 48(4): 689-693.
Cai D W, Yu H X, Zhao X, et al. A simple and efficient method for DNA extraction from ancient animal dried skin. *Journal of Jilin University (Science Edition)*, 2010, 48(4): 689-693.
- [24] 金美菊, 阮勇, 严冰冰, 等. 羊绒羊毛纤维线粒体 DNA 提取方法研究. *毛纺科技*, 2011, 39(11): 53-55.
Jin M J, Ruan Y, Yan B B, et al. Extraction method of mtDNA for cashmere and wool fibers. *Wool Textile Journal*, 2011, 39(11): 53-55.
- [25] 邵碧英, 林志武, 陈文炳, 等. 快速、高效的羊绒羊毛织品 DNA 提取方法的建立. *生物技术*, 2009, 19(5): 38-39.
Shao B Y, Lin Z W, Chen W B, et al. Development of a rapid and high effective DNA extraction method for cashmere and wool textiles. *Extraction method of mtDNA for cashmere and wool fibers. Biotechnology Journal*, 2009, 19(5): 38-39.
- [26] Takayanagi K, Asamura H, Tsukada K, et al. Investigation of DNA extraction from hair shafts. *Progress in Forensic Genetics*, 2003, 9(1239): 759-764.
- [27] Godoy C D, Kunii I S, Funabashi K S, et al. Mitochondrial DNA in a population of individuals from the city of são paulo. DNA extraction from head and pubic hair and blood. *Forensic Science International; Genetics Supplement Series*, 2011, 3: e149-e150.
- [28] Bekaert B, Larmuseau M H, Vanhove M P, et al. Automated DNA extraction of single dog hairs without roots for mitochondrial DNA analysis. *Forensic Science International; Genetics*, 2012, 6: 277-281.
- [29] Almeida M, Betancor E, Fregel R, et al. Efficient DNA extraction from hair shafts. *Forensic Science International; Genetics Supplement Series*, 2011, 3: e319-e320.
- [30] 黄娅琳. 一种简便的 DNA 提取方法在动物毛发检验中的应用. *中国司法鉴定*, 2008(2): 25-27.
Huang Y L. A simple method of DNA isolation from animal hair shaft. *Chinese Journal of Forensic Sciences*, 2008(2): 25-27.
- [31] 赵春江, 李宁. 一种从毛发中提取 DNA 的简易方法. *遗传*, 2003(1): 69-70.
Zhao C J, Li N. A study of a brief protocol to extract DNA from hair. *Hereditas*, 2003(1): 69-70.
- [32] 刘颖, 孙蓓, 马彦, 等. 从一根毛发中分别提取 nDNA 和 mtDNA 的简易方法. *天津医药*, 2008(7): 510-512.
Liu Y, Sun B, Ma Y, et al. The study of the DNA extraction procedure from a single hair. *Tianjin Med J*, 2008(7): 510-512.
- [33] Andreasson H, Nilsson M, Budowle B, et al. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Science International*, 2006, 164(1): 56-64.
- [34] Andréasson H, Asp A, Alderborn A, et al. Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology. *Biotechniques*, 2002, 32: 124-133.
- [35] Allen M, Engström A, Meyers S, et al. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci.*, 1998, 43(3): 453-464.
- [36] Vigilant L. An evaluation of techniques for the extraction and amplification of DNA from naturally shed hairs. *Biol Chem*, 1999, 380: 1329-1331.
- [37] 郑一诚. 发干线粒体 DNA 提取改良法的建立、缺失类型的筛选及其缺失量与年龄的关系. *中山大学*, 2009.
Zheng Y J. Establishment of reformativ mtDNA extraction methods from hair and investigation of applicability of mtDNA deletion types and amounts in human hair age estimation. *Sun Yat-Sen University*, 2009.

- [38] 徐怀亮,汪宴廷,姚永芳,等. 藏酋猴毛干 DNA 的 3 种提取方法. 东北林业大学学报,2010(2):58-61.
Xu H L, Wang Y T, Yao Y F, et al. Comparison of methods for DNA extraction from hair shaft of *Macaca thibetana*. Journal of Northeast Forestry University, 2010(2):58-61.
- [39] Amory S, Keyser C, Crubezy E, et al. Str typing of ancient DNA extracted from hair shafts of siberian mummies. Forensic Science International, 2007,166(2-3):218-229.
- [40] Barbaro A, Cormaci P, Barbaro A. Multiplex str amplification from hair shaft: validation study. International Congress Series, 2006,1288:676-678.
- [41] Prieto L, Montesino M, Salas A, et al. The 2000-2001 gep-isfg collaborative exercise on mtDNA: assessing the cause of unsuccessful mtDNA PCR amplification of hair shaft samples. Forensic Science International, 2003,134(1):46-53.
- [42] Yoshii T, Tamura K, Ishiyama I. Presence of a PCR-inhibitor in hairs. Nihon Hoigaku Zasshi (the Japanese Journal of Legal Medicine),1992,46(5):313-316.
- [43] Heywood D M, Skinner R, Cornwell P A. Analysis of DNA in hair fibers. Journal of Cosmetic Science,2003,54(1):21-27.
- [44] 涂政,陈松,李万水,等. 脱落毛发及毛干 DNA 的 STR 分型研究. 刑事技术,2011(5):3-7.
Tu Z, Chen S, Li W S, et al. STR genotyping of tolegen hairs and hair shafts. Forensic Science and Technology, 2011(5):3-7.
- [45] Wilson M R, Dizinno J A, Polanskey D, et al. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. International Journal of Legal Medicine,1995,108:68-74.
- [46] Brandstatter A, Parson W. Mitochondrial DNA heteroplasmy or artefacts - a matter of the amplification strategy? International Journal of Legal Medicine,2003,117(3):180-184.
- [47] Poinar H N. The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. International Congress Series, 2003,1239:575-579.
- [48] Crespillo M, Paredes M R, Prieto L, et al. Results of the 2003-2004 gep-isfg collaborative study on mitochondrial DNA: focus on the mtDNA profile of a mixed semen-saliva stain. Forensic Science International, 2006,160:157-167.

Review of Different DNA Extraction Methods in Hair Shafts

GUAN Zheng CHEN Ai-liang

(Institute of Quality Standard & Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract Hair shaft can be a valuable source of DNA for the noninvasive study of human and nonhuman populations because it's easy to get, transport and store. However, hair shafts contain extremely small quantities of DNA but a large quantity of impurities like keratin and pigment, making the method used to extract the DNA of paramount importance. In order to provide sufficient documentation to help hair shaft DNA extraction, a review of recent 30 years literatures on procedures for obtaining DNA from hair shaft was presented and some conclusions for high efficiency DNA extraction in hair shaft were drawn.

Key words Hair shaft DNA Extraction