

·技术研究·

23-plex Y-SNPs 复合扩增体系在法医学应用的研究

张爱平^{1,2,3}, 刘超^{1,2*}, 李越¹, 刘长晖¹, 陈丽伟^{1,2}, 葛璐璐¹, 陈晓晖¹

(1. 广州市公安局刑事科学技术研究所, 广东 广州 510030; 2. 中山大学中山医学院法医学系, 广东 广州 510080;

3. 佛山市顺德区公安局, 广东 佛山 528300)

摘要:【目的】应用 SNaPshot 技术建立 23-plex Y-SNPs 的复合扩增体系, 研究其在法医学中的应用价值。【方法】从 Y 染色体单体群命名树上选择 23 个 Y-SNP 位点: P164、P203、P148、P145、M89、P151、M216、P128、P157、P149、P131、P199、P123、P191、P201、M111、M9、P132、P200、P197、M119、P136 和 M134, 进行复合 PCR 扩增, PCR 产物纯化后利用荧光标记单碱基延伸技术(SNaPshot 试剂盒)结合毛细管电泳技术对单核苷酸多态性进行检测, 应用该体系调查了 290 名广东地区无亲缘关系的男性个体。【结果】所建立的 23 个 Y-SNPs 检测体系, 各位点均具有遗传多态性, 基因多样性范围为 0.013 7 ~ 0.491 2。在 290 名男性中检测到 143 个单体型, 单体型多样性为 0.990 7。【结论】该 23 个 Y-SNPs 检测体系能快速而准确的对样本进行 SNP 分型, 在法医学、人类学和相关学科的研究中具有较高的应用价值。

关键词: 个体识别; 单碱基延伸(微测序); SNaPshot 试剂盒; 单核苷酸多态性; Y 染色体

中图分类号: R325 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)05-0685-07

Development of 23-plex Y-SNPs Typing Method Based on Single-base Extension and Capillary Electrophoresis Technology and Its Application in Forensic Science

ZHANG Ai-ping^{1,2,3}, LIU Chao^{1,2*}, LI Yue¹, LIU Chang-hui¹, CHEN Li-wei¹, GE Lu-lu¹, CHEN Xiao-hui¹

(1. Guangzhou Criminal Science and Technology Institute, Guangzhou 510030, China;

2. Department of Forensic Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

3. Shunde Municipal Public Security Bureau of Foshan, Foshan 528300, China)

Abstract: 【Objective】To develop a robust single nucleotide polymorphism (SNPs) typing assay with co-amplification and to type 23 human Y chromosome SNPs using SNaPshot kit. 【Methods】Markers were drawn from the phylogenetic tree of Y chromosome: P164, P203, P148, P145, M89, P151, M216, P128, P157, P149, P131, P199, P123, P191, P201, M111, M9, P132, P200, P197, M119, P136, and M134. All 23 Y-SNPs in one reaction were amplified; the pooled PCR products were purified. The minisequencing reactions were performed simultaneously for all 23 Y-SNPs with fluorescein-labeled dideoxynucleotides. A total of 290 male Chinese in Guangdong were genotyped by capillary electrophoresis and multicolour fluorescence detection. 【Results】A 23-plex Y-SNPs co-amplification system was developed. All of the Y-SNPs are polymorphic in Chinese. The gene diversity of the Y-SNPs ranged from 0.013 7-0.491 2. A total of 143 haplotypes were found, the haplotype diversity was calculated to be 0.990 7. 【Conclusion】The 23-plex Y-SNPs system developed is efficient, high-throughput and appears to be suitable for forensic science and anthropometry.

Key words: individual identification; single base extension (SBE); minisequencing; SNaPshot Kit; single nucleotide polymorphism; Y chromosome

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(5):685-691]

人类 Y 染色体除拟常染色区外, 绝大部分为非重组区, 在减数分裂中不发生重组, 以单倍型的

形式呈男性伴性遗传, 为男性所特有。因此 Y-DNA 序列携带男性迁徙、进化史的信息, 被广泛应用于

收稿日期: 2009-12-01

基金项目: 国家十一五科技支撑计划课题(2006BAK07B01); 公安部重点科技攻关项目(20034421401)

作者简介: 张爱平, 医学硕士; * 通信作者: 刘超, E-mail: liuchaogaj@21cn.com

人类的起源和进化研究。虽然 Y-STR 标记多态性程度较高并已广泛应用,但与常染色体 STR 基因座一样,具有较高的突变率。Y-SNPs 的突变率低,一个位点通常只有 1 次突变,也不易受重组的影响,因而是进化事件的忠实记录者,可以鉴定稳定的谱系关系,其所构成的单倍型组保持完整,已经被广泛应用于研究世界人群的历史、进化和迁移模式^[1],且其密度高、代表性强、遗传稳定性高、易于实现分析的自动化,因而又广泛应用于遗传疾病、药物学研究等各个方面^[2]。通过对 Y 染色体 SNPs 单倍型的分析,可进行单亲案的父子亲缘鉴定,以及进行同一父系男性亲属关系的鉴定。同时 Y 染色体 SNPs 分布具有明显的地域性,可用于进行犯罪现场遗留的生物学个体所属群体的推断^[3]。本实验采用复合 PCR 扩增技术,荧光标记单碱基延伸技术结合毛细管电泳检测,同时对多个 Y-SNPs 位点进行快速、准确、高通量的分型检测。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

1.1.1 仪器 480 型扩增仪(Hema 公司),9700 型 PCR 扩增仪(AB 公司),3130xl 型 DNA 全自动遗传分析仪(AB 公司),7500 型定量 PCR 仪(AB 公司)。

1.1.2 试剂 SNaPshot 试剂盒(AB 公司)、ExoSAP-IT(USB 公司)、虾碱性磷酸酶 SAP(1 U/ μ L, Fermentas, MBI), Amp FL STR Profiler Yfiler™ 试剂盒(AB 公司)、Quantifiler human DNA quantification 试剂盒(AB 公司)、dNTPs 混合物(Fermentas, MBI 公司)。

1.2 材料及 DNA 提取

使用采血卡(公安部物证鉴定中心)或中性滤纸收集 290 份来自广东地区的无关男性个体的指尖血,用 TECAN 自动化工作站采用 IQ 磁珠法按照 Promega 公司的 DNA IQ™ 系统——小样品案例操作手册进行 DNA 提取。

1.3 Y-SNP 复合扩增体系的建立

1.3.1 Y-SNP 位点的选择 根据 Y 染色体命名协会(The Y Chromosome Consortium)^[4-6]的在线补充材料(附有可以用 PCR 方法检测的 599 个 Y-SNPs 位点及其组成的 311 个单体群的相关信息),结合 dbSNP 数据库以及 Y-SNPs 信息的在线网站 snp y

reference database(<http://www.snp-y.org/>),并参考国内外文献筛选出在亚洲人群中多态性较高的单体群及对应的 Y-SNPs 位点 23 个:P164、P203、P148、P145、M89、P151、M216、P128、P157、P149、P131、P199、P123、P191、P201、M111、M9、P132、P200、P197、M119、P136、M134。其中 M111 是 2 bp 缺失,M199 是 1 bp 插入,M134 是 1 bp 缺失突变,其余位点均为碱基的转换或颠换。

1.3.2 引物设计与验证 以数据库筛选的位点及其邻近序列为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件自行设计引物,并使用 Oligo 6.0 进行分析优化。引物设计原则:各位点的 PCR 引物的 Tm 相差 2~5 °C,避免引物间及引物自身二聚体及发夹结构的形成,引物的长度一般为 15~30 个核苷酸,G+C 含量在 40%~60%之间,碱基要随机分布,扩增产物的片段长度在 50~150 bp 左右,引物高特异性(blast 比对)。23 对引物由上海生物工程公司合成,HPLC 纯化。引物序列见表 1。

表 1 23 个 Y-SNP 位点的 PCR 扩增引物序列

Table 1 Primers for 23-plex Y-SNPs Markers

Markers	Forward PCR primer (5'→3')	Reverse PCR primer (5'→3')
P164	TCITTAGCATTITGGTCCC	CATTCATCCTCTTATCCCTC
P203	AAATGCTTGGCTATTGAGTT	GTAGTTAAGTATGGTAGGCAGA
P148	CCCTGTGAGGATGGTTTCT	TCATCTGTATCCATGTTGCA
P145	AAAACAAAGCCACTCTTACA	CTGGGTTGAGACACTGAAA
M89	CAGCTCTCTCCTAAGGTTAT	ACAGACTATCAGGAGAGGCT
P151	ACAGAGTATCAGGAGAGGCT	GGTTTTGACCTCAGGCTAC
M216	TAATCACTTTTATATCCTCAACC	TCTGAATTCTGACACTGCTAG
P128	CCTCCACTGACTGTAATAATG	AAGAGGGAGAAAACAGACCTA
P157	CGATGTGTAATTTCATTGATATG	TAATCTTTGCCCTCAGGAT
P149	TTCCAAGTCTACCTCTACAATAT	CACTAGAAGCAAGGCTGAA
P131	ATAGTCCCTTCCACTTAGTA	TGTAGAGAATTACATGTTGATCAT
P199	CAATCAGAAATGGGAAGACT	CTGTGAGAAAAAATGGC
P123	GTATTCCTATGTGGCTGGTC	CCTTACAGATTTATCTTTACTGTC
P191	CGCAAATAGTAGCAGAAAACC	ACCATCCACCTACTCATTGT
P201	GCTGTCCAAGTTGTGTGAT	AATGAAGGTAGAAGGGTGAAG
M111	CTTGTTTTGTGTAAGGTAATA	ACAATGCAGATCTTCTGAATA
M9	CCCTGAAATACAGAAGTGC	AGACATTGAAGGTTGAACA
P132	GTGATAGGGTCAGAAGAAAAC	GAATAAATACTAAAGGCTGCAAT
P200	TTGATGAATCTGTTAATCCG	CCTTACTGTTGAATGGAGA
P197	TTTCTATCCGTGACCAACC	GCAGAAGCGTAATAACCTTT
M119	GATGTAGAAAAATGTTATGGGT	TGTGTTTTTTGGGGAGAC
P136	GGGTATAAATCTGAACGCAA	AACTGCTGGGAACAATGG
M134	GATACTTTTGTATCCCAACA	TTTCCCACAACCAAGACA

1.3.3 单位点 PCR 扩增 以 1 个男性 DNA 样本定量后,分别用上述 23 个 Y-SNPs 位点引物对进行单独扩增,调整各项参数后,建立起适用于所选全部 SNP 位点的 PCR 扩增体系。最后,定出 PCR 反应体系为 25 μ L,其中包含 1 \times PCR buffer (不含 Mg^{2+}), 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 每种 dNTP 各 200 μ mol/L, 0.4 μ mol/L 上下游引物, 2.5 U AmpliTaq Gold DNA 聚合酶, 0.4 ~ 1 ng DNA 模板。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}C$ 11 min, 95 $^{\circ}C$ 30 s, 55 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 30 s, 循环 35 次, 最后延伸为 72 $^{\circ}C$ 10 min。

1.3.4 单位点 PCR 扩增产物的检测 取 2 μ L PCR 产物与 1.5 μ L 10 \times 上样缓冲液混合后上样于 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 ($C = 6\%$, $T = 3.3\%$)^[7], 450 V 电泳 3 h, 银染色。

1.3.5 复合 PCR 扩增体系的建立 使用单管包含 23 个 Y-SNPs 位点引物体系进行复合扩增, 反应为 25 μ L 体系, 含内含 0.4 ~ 1 ng DNA 模板, 1 \times PCR buffer (AB 公司, 美国), 8 mmol/L $MgCl_2$ (AB 公司), 每种 dNTP 各 600 μ mol/L, PCR 引物浓度在 0.006 8 ~ 0.067 6 μ mol/L, 2.5 U AmpliTaq Gold DNA 聚合酶 (AB 公司)。复合扩增的循环参数为: 95 $^{\circ}C$ 11 min, 95 $^{\circ}C$ 30 s, 55 $^{\circ}C$ 40 s, 65 $^{\circ}C$ 45 s, 循环 35 次, 最后延伸为 65 $^{\circ}C$ 10 min。

1.3.6 PCR 产物的纯化 为防止多余的引物和 dNTPs 对后续的单碱基延伸反应 (single base extension, SBE) 引物的影响, 在 SBE 之前用纯化剂去除多余的引物和 dNTPs^[8]。本试验取 5 μ L PCR 产物中加入 2 μ L ExoSAP-IT 37 $^{\circ}C$ 孵育 15 min, 80 $^{\circ}C$ 15 min 灭活, 对 PCR 产物进行纯化。

1.3.7 单碱基延伸引物 用于单碱基延伸的引物的 3' 末端位于 SNPs 变异位点上游一个碱基处, 用于检测插入/缺失突变的单碱基延伸引物的 3' 端位于插入/缺失碱基上游的一个碱基处, 使得各引物延伸的第一个碱基即表示该位点的多态性^[8]。为尽可能地实现高通量, 通过“加尾”的方法设计不同长度的单碱基延伸引物, 将 23 个位点进行配对组合, 引物之间长度间隔为 4 ~ 6 个核苷酸, 最终检测的产物长度范围在 20 ~ 85 个核苷酸之间。各 SNP 位点单碱基延伸引物见表 2。

1.3.8 单碱基延伸反应 (SBE) 及产物纯化 采用 SNaPshot 试剂盒推荐的反应体系: 纯化后复合 PCR 产物 2 μ L, 微测序引物混合物 2 μ L, SNaPshot mix 4 μ L, 去离子水 2 μ L。循环参数与试

表 2 各位点单碱基延伸引物

Table 2 The SBE primers of 23 Y-SNPs

Markers	Extension Primer with Poly T Tail for Spacing (5'→3')	Strand	Length(nt)
P164	GCATTTTGGTCCCATCTTTT	F	20
P203	TCTCTGGCTATTGAGTTAGCATAATCA	F	27
P148	AATCTATAGTTCACAGGACCATGTATT	F	27
P145	TCTCTCTAAGCCACTCTTACAGAAAGAAGT	F	30
M89	CTGACAATTCCTAAGGTTATGTACAAAATCT	F	32
P151	(TC) ₇ GACCTCAGGTACACATTTCC	R	35
M216	(TC) ₅ TAAAATTCCTTTATTAAGAAATGTAA	F	37
P128	(TC) ₉ CAAAGAGGGAGAAAACAGACCTA	R	40
P157	(CT) ₁₀ CATTTTAAGGTACATGGCTTTA	F	42
P149	(CT) ₁₂ ATCGCAATCCAATTTATGAGA	F	45
P131	(TC) ₁₁ AATCATTCTTTGTTATCTGTGTA	F	47
P199	(CT) ₁₄ CATCAGAAATGGGAAGACTTCA	F	50
P123	(TC) ₁₅ TTATGTGGCTGGTCTGTGTCT	F	52
P191	(TC) ₁₅ AGAAAGGTATAGTGTCAAATGTA	F	55
P201	(TC) ₈ TAACTGACTAAACTAGGCTTGTTAA GTCATTTGATCTCAG	F	57
M111	(TC) ₂₀ TGGTAAATTTGGGGAGAAAAAC	F	62
M9	(CT) ₂₅ CGGCCTAAGATGCTGAAT	F	69
P132	(CT) ₂₄ AAATCTCTGAATTATCACTCCCAAG	F	73
P200	(TC) ₂₁ TAACTGACTAATTAATCGCTCACCTTTCTCT	F	75
P197	(CT) ₂₇ CAGAAGGCTAATAACCTTTCAAG	R	77
M119	(CT) ₃₀ TCCAATTCAGCATAACAGGC	F	79
P136	(CT) ₃₁ TGGTGGGAACAATGTTTC	R	81
M134	(TC) ₃₃ ACTTTTGATCCCCACCAAT	F	85

Subscript numbers mean the repeated base numbers

剂盒推荐的 control 的反应条件一致: 96 $^{\circ}C$ 10 s, 50 $^{\circ}C$ 5 s, 60 $^{\circ}C$ 30 s, 循环 25 次。在 SBE 反应之后向单碱基延伸反应产物中加入 1 μ L SAP (1 U/ μ L), 37 $^{\circ}C$ 孵育 15 min, 80 $^{\circ}C$ 15 min 进行纯化处理, 去除多余的引物和 ddNTPs。

1.3.9 毛细管电泳和荧光检测 纯化后的 SBE 产物经 AB 3130xl 遗传分析仪进行电泳检测。取 1 μ L SBE 纯化产物加入 10 μ L Hi-Di 甲酰胺中, 同时加入 0.3 μ L GeneScan™ Size Standards LIZ-120 (AB 公司) 作为内标。进样时间为 10 s, 电压 15 kV, POP-4 凝胶, 36 cm 毛细管, 电泳 30 min, 电泳结束后, 利用 Genemapper ID V3.2 软件进行结果分析。

2 结 果

2.1 微测序法对多位点 Y-SNPs 分型

某男性个体 23-plex Y-SNPs 的电泳图谱见图

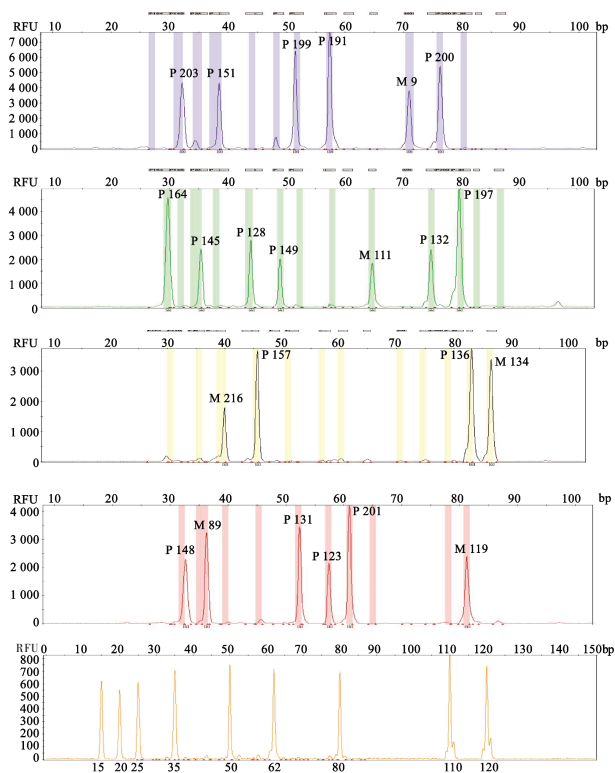


图 1 某男性个体 23-plex Y-SNPs 的电泳图谱

Fig.1 The electrophoretogram of 23-plex Y-SNPs from one male

RFU: relative fluorescence unit

1, 23 个位点均得到稳定的分型, 均为单倍型, 各个位点扩增均衡, 重复试验结果一致。

2.2 法医学参数的计算

等位基因频率和单体型频率用直接计数法统计, 基因多样性 (gene diversity, GD) 及单体型多样性 (haplotype diversity, HD) 按公式 $h = n(1 - \sum \chi_i^2) / (n - 1)$ 计算^[9]。23 个 Y-SNPs 位点在广州汉族群体中均具有多态性, 各个位点的基因多样性范围为 0.013 7 ~ 0.491 2, 在 290 名男性中共检测到 143 种单体型, 单体型多样性为 0.990 7。根据 Y 染色体协会的命名原则, 共有 12 种单体型, 单体型多样性为 0.840 1。各个位点的群体遗传学数据见表 3。

2.3 法医学应用

2.3.1 灵敏度 将浓度为 200 ng/ μ L 的参照 DNA (AB 公司 Quantifiler human DNA quantification 试剂盒的标准 DNA) 进行倍比稀释, 分别进行复合 PCR 和复合 SBE 反应。当 25 μ L 复合体系中 DNA 含量在 0.1 ~ 50 ng 时都能得到较好的分型结果 (图 2)。

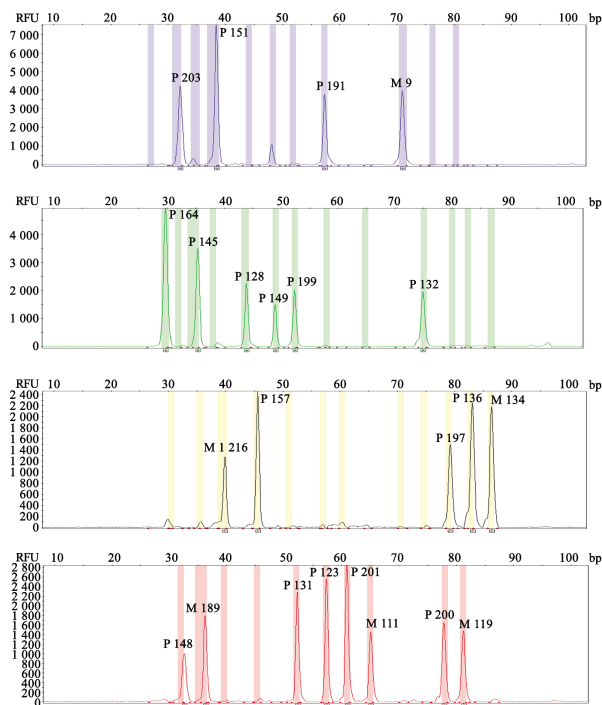


图 2 0.1 ng DNA 模板的 23-plex Y-SNPs 电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of 23-plex Y-SNPs from 0.1 ng template (male) DNA

RFU: relative fluorescence unit

2.3.2 种属特异性 对雄性的猴、猪、狗、黄牛、山羊、大白鼠、家兔、鸡八种动物各 5 例的血痕利用磁珠法提取 DNA, 并应用建立的复合体系进行扩增。在以上动物标本中均未检见任何 Y-SNPs 位点。猪的 23-plex Y-SNPs 的电泳图谱见图 3, 除去橙色内标外其余颜色未检见任何荧光峰。

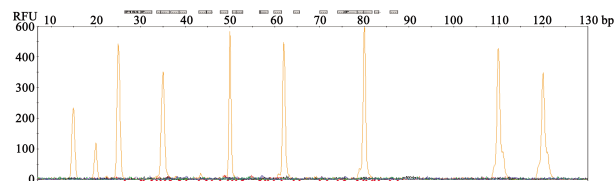


图 3 猪 23-plex Y-SNPs 的电泳图谱

Fig.3 The electrophoretogram of 23-plex Y-SNPs from pig DNA

RFU: relative fluorescence unit

2.3.3 组织同一性 同一男性个体的肌肉组织、骨骼、肋软骨、指甲、皮肤、肝脏、血痕等进行 23-plex Y-SNPs 复合检测, 分型一致。

2.3.4 案例应用 从广州市公安局刑事技术研究所日常检案中收集的 30 份腐败检材 (陈旧血痕、

表 3 23 个 Y-SNPs 位点的命名及群体遗传学研究

Table 3 A Nomenclature of the 23-plex Y-SNPs and its data of population genetics

Markers	Haplogroup	SNP(Ancestral/Derived)	Counts	Frequency(%)	Gene diversity
P164	O3a3b2	[A/G]	192/98	66.2/33.8	0.4490
P203	O1a1	[A/G]	2/288	0.7/99.3	0.0137
P148	F-R	[C/T]	23/267	7.9/92.1	0.1465
P145	F-R	[A/G]	227/63	78.3/21.7	0.3413
M89	F-R	[C/T]	31/259	10.7/89.3	0.1916
P151	F-R	[C/T]	4/286	1.4/98.6	0.0273
M216	C	[C/T]	282/8	97.2/2.8	0.0538
P128	K-R	[C/T]	41/249	14.1/85.9	0.2436
P157	F-R	[C/T]	281/9	96.9/3.1	0.0604
P149	F-R	[A/G]	2/288	0.7/99.3	0.0137
P131	K-R	[C/T]	15/275	5.2/94.8	0.0984
P199	O3a	[A/G]	92/198	31.7/68.3	0.4347
P123	IJ	[C/T]	2/288	0.7/99.3	0.0137
P191	O	[A/G]	24/266	8.3/91.7	0.1523
P201	O3a3	[C/T]	166/124	57.2/42.8	0.4912
M111	O2a1	2bp(TT)del [A/T]	267/23	92.1/7.9	0.1465
M9	K-R	[C/G]	9/281	3.1/96.9	0.0604
P132	K-R	[A/C]	287/3	99/1	0.0205
P200	O3a	[G/T]	186/104	64.1/35.9	0.4616
P197	O3a	[G/T]	168/122	57.9/42.1	0.4891
M119	O1a	[A/C]	124/166	42.8/57.2	0.4912
P136	F-R	[G/T]	179/111	61.7/38.3	0.4741
M134	O3a3c	1bp(G)del [G/T]	223/67	76.9/23.1	0.3565

腐败肌肉、腐败肋软骨、白骨化长骨、牙齿等),利用 IQ 法提取 DNA,用 yfiler[®] PCR Amplification Kit(AB 公司,美国)检测人 Y-STR,同时用 23-plex Y-SNPs 复合扩增体系检测,对比两者的检出效率。结果显示,同一样本 yfiler 试剂盒的检出效率为 50%左右(17 个 Y-STR 基因座仅能检出 6~8 个),Y-SNP 体系的检出效率约为 89%(23 个 Y-SNP 位点可检出 20 个)。

对广州市公安局刑事技术研究所的 10 例怀疑强奸案阴道拭子或内裤及嫌疑人血样,用 Identifiler[®] PCR Amplification Kit(AB 公司,美国)检测 STR,证实犯罪案件中内裤和阴道拭子上男性成分均与嫌疑人相同,用 23-plex Y-SNPs 复合扩增体系进行检测,结果与 STR 分型结果一致。

在珠江流域的河岸发现一具男性尸体,高度腐败,解剖后取肋软骨,除去表层腐败组织,用一次性消毒刀片刮下约 5 mg,切碎,按照骨孵育液结合 DNA IQ 系统磁珠法对检材进行 DNA 提取。利用 Yfiler[™] 荧光 Y-STR 复合扩增试剂盒进行 PCR

扩增及 STR 分型检测,电泳结果如图 4。

使用上述同样的 DNA 模板进行 Y-SNPs 检测分型,结果如图 5 所示,23 个位点中有 22 个 Y-SNPs 位点被检出。案件侦破后取无名尸父亲的 DNA 进行检测,与肋软骨分型相同。

3 讨论

3.1 检测结果的分析判断

本课题中采用的 SNaPshot[™] 是由 4 种不同荧光标记 ddNTPs 组成,各标记荧光所代表的碱基种类如表 4 所示。由于在 SNaPshot[™] 试剂盒中不同荧光物质标记的 ddNTP 所发射的荧光量有差异,FAM(蓝色)、HEX(绿色)、TAMRA(黄色)、ROX(红色)各荧光物质发射的荧光比约为 4:2:1:1。Y 染色体遗传标记为单体型,因此一般情况下无需判断纯合子与杂合子。但是在判读结果时需对不同荧光标记的 RFU 值进行标准化(除去由于不同荧光物质本身造成大的荧光强度差异),以确定该

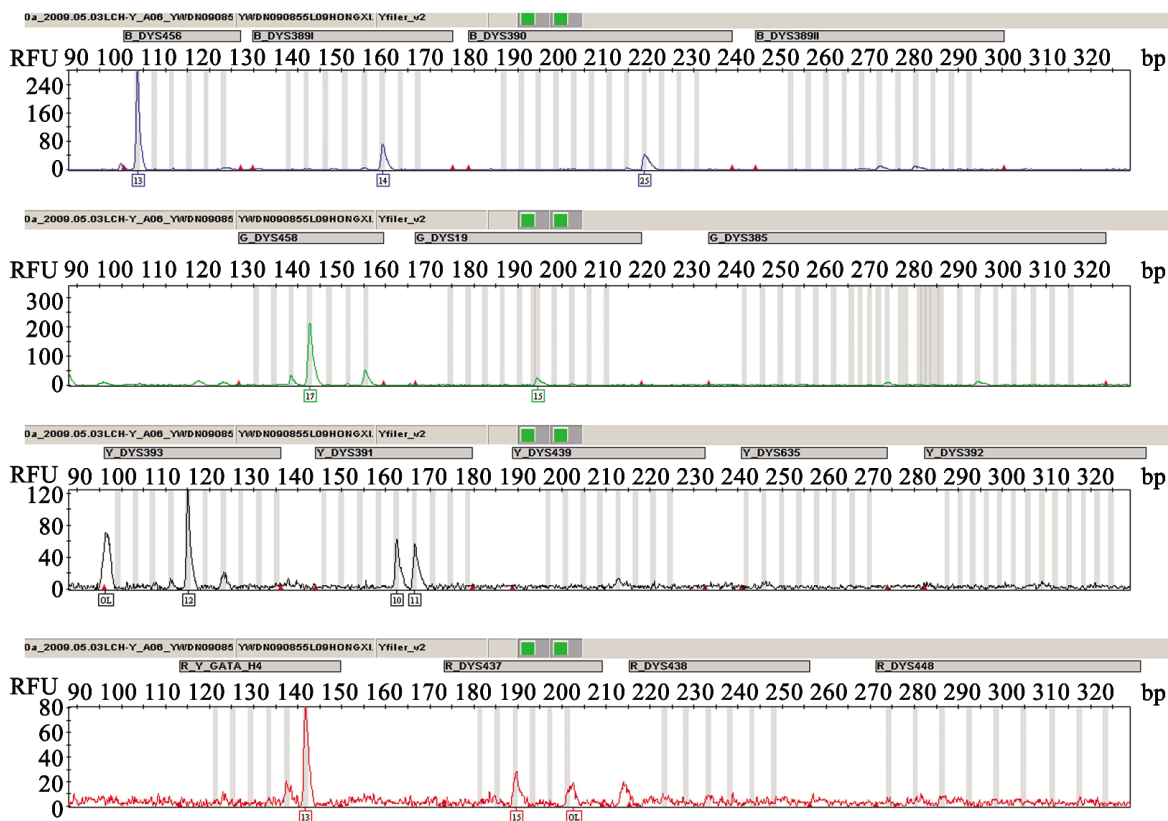


图 4 无名尸肋软骨 Y-STR 分型图谱

Fig.4 The Y-STR typing result of one unknown corpse

RFU: relative fluorescence unit

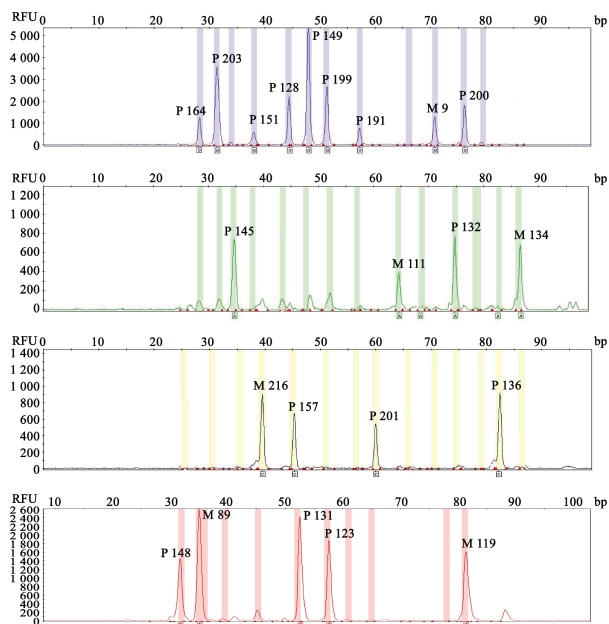


图 5 无名尸体 DNA 样本 23-plex Y-SNPs 电泳图谱

Fig.5 23-plex Y-SNPs CE result of the DNA sample from the corpse

RFU: relative fluorescence unit

表 4 四色荧光标记 ddNTPs

Table 4 Four ddNTPs with different fluorescences

ddNTP	Dye	Label
A	dR6G	Green
C	dTAMRA™	Black
G	dR110	Blue
T	dROX™	Red

位点的变异类型,以及非特异性峰。本文所要求的标准蓝色为 400 RFU,绿色为 200 RFU,黄色和红色为 100 RFU,低于此标准的判定为杂峰。对 30 名个体进行测序验证该标准,发现与复合扩增结果一致,说明按此标准获得的结果可靠。

3.2 Y-SNPs 复合检测体系的建立和优化

为实现复合扩增,所有 PCR 引物的 T_m 在 55 °C 左右 (± 2 °C),PCR 引物长度之间差异不超过 2 ~ 5 个核苷酸,并将扩增的目的片段长度控制在 53 ~ 146 bp 内。通过正交实验方法,对 PCR 体系中各引物对浓度进行调整;在退火温度为 55 °C 时复

合扩增的效率和特异性都较好。实验中我们在复合 PCR 体系内增加 $MgCl_2$ 和 dNTPs 的浓度后,各位点的扩增效率得到明显提高。

将选择的 23 个 Y-SNPs 位点根据碱基变异类型进行配对,可以用相同或相近长度的单碱基延伸引物同时检测两个位点的两种多态性。单碱基延伸引物小于 60 个碱基的要经 HPLC 纯化,大于 60 个碱基的在 HPLC 纯化的基础上进行质谱检测,保证引物的纯化效果^[10]。当利用正义链的 PCR 扩增产物无法设计出理想的单碱基延伸引物时,可根据反义链的 PCR 扩增产物设计引物,检测的变异类型与报道的互补。

PCR 产物和 SBE 产物的纯化效果直接会影响分型结果。本实验利用酶纯化的方法简单易行且效果较好。

3.3 体系的多态性评估

利用建立的反应体系,对各位点在广州地区无关个体中的分布频率进行调查。发现所选的 23 个 Y-SNPs 位点在广州人群中均具有遗传多态性,其基因多样性(GD)范围为 0.013 7 ~ 0.491 2,共检测到 143 种单体型,单体型多样性为 0.990 7。

杜宏等^[3]应用微测序法通过一个复合 PCR 体系和两个 SBE 体系检测了 12 个 Y-SNP 位点,获得了这 12 个位点在四川人群中的群体遗传学数据。12 个 Y-SNP 位点只有 M9 和 SRY8299 在中国人群中检测出多态性,变异频率分别为 5.1% 和 10.3%,多态性远远低于本课题建立的 23-plex Y-SNPs 复合扩增体系。

Sanchez 等^[8]应用微测序法通过一个 PCR 体系扩增 25 个 DNA 片段,一个 SBE 体系检测 35 个 Y-SNP 标记,获得了这 35 个标记在 194 名丹麦男性中的群体遗传学数据,17 个 Y-SNP 标记在丹麦人群中未检测到多态性。多态性程度低于本课题建立的 23-plex Y-SNPs 复合扩增体系。

本研究建立的 Y-SNPs 检测体系具有很好的男性特异性、组织同一性、种属特异性,可应用于法医学检验中,特别是对父系家族亲权鉴定的辅助检验、混合斑男性成分的检验、无名男尸的个人识别等法医学实践有非常积极的意义。对腐败检材的检测效果同样很好。同时由于 Y-SNPs 的特性,该体系在人类学研究方面,也有较好的前景。有些 Y-SNPs 成男性伴性遗传,可能与某些遗传性疾病的传递有关系,该体系有望用于遗传性疾病

的研究。

参考文献:

- [1] 柯越海,宿兵,肖君华,等. Y 染色体单倍型在中国汉族人群中的多态性分布与中国人群的起源及迁移[J]. 中国科学:C 辑,2000,30(6):614-620.
- [2] 孟祥宁,薛雅丽,傅松滨. 利用 Y 染色体进行人类起源和进化分析[J]. 国外医学:遗传学分册,2003,26(2):63-66.
- [3] 杜宏,张林,周斌,等. 微测序技术检测 12 个 Y-SNPs 及其遗传多态性[J]. 法医学杂志,2006,22(2):125-129.
- [4] The Y Chromosome Consortium. A Nomenclature System for the Tree of Human Y-Chromosomal Binary Haplogroups [J]. *Genome Res*, 2002, 12(2): 339-348.
- [5] Jobling MA, Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution [J]. *Trends Genet*, 1995, 11(11): 449-456.
- [6] Tatiana MK, Fernando LM, Monica BM, et al. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree [J]. *Genome Res*, 2008, 18(9): 830-838.
- [7] 伍新尧,杨庆恩,刘超,等. 法医学物证学实验指导[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:68-76.
- [8] Sanchez JJ, Børsting C, Hallenberg C, et al. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs: a model with 35 Y chromosome SNPs [J]. *Forensic Sci Int*, 2003, 137(1): 74-84.
- [9] Inagaki S, Yamamoto Y, Doi Y, et al. Typing of Y chromosome single nucleotide polymorphisms in a Japanese population by a multiplexed single nucleotide primer extension reaction [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2002, 4(3): 202-206.
- [10] Sanchez JJ, Phillips C, Bersting C, et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(8): 1713-1724.
- [11] Onofri V, Alessandrini F, Turchi C, et al. Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs [J]. *Forensic Sci Int*, 2006, 10, 157(1): 23-35.
- [12] Brion M, Blanco-Verea A, Lareu V, et al. 29 Y-chromosome SNP analysis in European populations [C]. *International Congress Series*, 2004(8): 73-75.