

24 个常用 STR 基因座的突变观察与分析

李海霞¹, 马晓燕¹, 张晋湘¹, 张 何², 伍新尧¹, 孙宏钰^{1*}

(1. 中山大学中山医学院法医学系, 广东 广州 510080; 2. 广东省东莞市公安局刑警支队, 广东 东莞 523008)

摘 要:【目的】观察 24 个常用 STR 基因座等位基因突变的现象及特点。【方法】对 5 084 例肯定亲权关系的案例进行分析, 筛选等位基因突变事件, 确定突变等位基因的来源, 统计各 STR 基因座的突变率, 分析突变的规律及其特点。【结果】在 24 个 STR 基因座中共观察到 172 个突变事件, STR 基因座的突变率介于 0 ~ 0.492%。每个突变案例的突变基因座数目为 1 ~ 3 个。突变模式符合逐步突变模式, 最多突变步数为四步。父系突变与母系突变比例为 3.55:1。【结论】STR 基因座等位基因突变现象较为常见。当出现 STR 基因座突变时, 应结合突变的 STR 基因座信息计算 PI 值。

关键词: STR 基因座; 亲权鉴定; 突变

中图分类号: Q987

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)01-0013-04

Observation and Analysis of Mutation of 24 Short Tandem Repeat Loci

LI Hai-xia¹, MA Xiao-yan¹, ZHANG Jing-xiang¹, ZHANG He², WU Xin-yao¹, SUN Hong-yu^{1*}

(1. Department of Forensic Medicine, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Dongguan Municipal Public Security Bureau, Dongguan 523008, China)

Abstract: 【Objective】To analyze the phenomena and characteristics of the mutations in 24 short tandem repeat (STR) loci. 【Methods】A total of 5 084 parentage confirmed cases were analyzed. The mutation events were screened. The sources of mutant alleles were ascertained. The mutation rates of STR loci were calculated. The rule and feature of mutation were analyzed. 【Results】A total of 172 mutation events were observed in 24 STR loci. The mutation rate was between 0-0.492%. The number of mutation loci was between 1 and 3 for 1 case. The mutation model was accordant with stepwise mutation model. The maximum mutation step was four. In addition, the ratio of paternal versus maternal mutation was 3.55:1. 【Conclusion】STR mutation events were common in paternity testing. The information of mutated STR loci should be considered and included when calculating PI value.

Key words: short tandem repeat loci; paternity testing; mutation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1):13-16]

短串联重复序列(short tandem repeat, STR)是目前法医学中应用广泛的遗传标记。STR 基因座普遍多态性高, 个体识别能力强, 但同时突变率相应也较高^[1], 因此用于亲权鉴定时值得关注。本文对目前亲权鉴定常用的 PowerPlex™ 16 体系(Promega 公司, 美国)和 STRtyper™ 10 体系(科登公司, 珠海)包含的 24 个 STR 基因座的突变现象和特点, 以及突变对亲权鉴定的影响等进行了研

究, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

5 084 例经 PowerPlex™ 16 体系(包括 D3S1358、TH01、D21S11、D18S51、Penta E、D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、CSF1PO、Penta D、vWA、D8S1179、

收稿日期: 2009-07-01

基金项目: 国家自然科学基金(30400519); 教育部留学回国人员科研启动基金(2008-890); 公安部应用创新计划项目(2007YYCX GDST079)

作者简介: 李海霞, 硕士研究生, E-mail: lilihaixia2008@163.com; * 通信作者: 孙宏钰, 副教授, E-mail: sunhongyu2002@163.com

TPOX和 FGA 等 15 个 STR 基因座)检测并肯定亲权关系的亲权鉴定案件收集自中山大学法医鉴定中心日常检案,包括父母子三联体案件 3 690 例,父子单亲案件 895 例,母子单亲案件 499 例。其中 709 例经 STRTyper™ 10 体系(包括 D18S1364、D12S391、D13S325、D6S1043、D2S1772、D11S2368、D22-GATA198B05、D8S1132 和 D7S3048 等 9 个 STR 基因座)检测并肯定亲权关系的亲权鉴定案件收集自中山大学法医鉴定中心日常检案,其中包括父母子三联体案件 104 例,父子单亲案件 393 例,母子单亲案件 212 例。

1.2 检测方法

各案件的样本经 Chelex-100 法提取基因组 DNA,用 PowerPlex™ 16 体系和 STRTyper™ 10 体系进行 STR 分型。

1.3 突变基因座的确定

若 15 个 STR 基因座都符合孟德尔遗传规律,且亲权指数(paternity index) $PI > 10\ 000$,视为认定亲权;若出现 1 ~ 3 个违反遗传规律基因座,则加测 STRTyper™ 10 体系的 9 个 STR 基因座,若未发现新的违反遗传规律基因座或总的违反遗传规律基因座数小于 3,且计算 $PI > 10\ 000$,亦可视为认定亲权关系,违反遗传规律基因座认为是突变基因座;若两个体系中超过 4 个以上违反遗传规律基因座,且计算 $PI < 0.000\ 1$,则排除亲权关系。

符合遗传规律基因座根据 Lee 等^[2]的方法计算 PI 值;不符合遗传规律的基因座则按照 Brenner 法^[3-4]计算 PI 值,即:如果突变为 1 步的, $PI = X/Y = \mu/(4p)$;如果突变为 2 步的, $PI = X/Y = \mu/(40p)$,余此类推;同时规定父系来源突变是母系来源突变发生率的 3.5 倍(突变等位基因的来源确定原则^[5]:在双亲的等位基因中,以距突变成的新等位基因步数相差最小的等位基因为发生突变的等位基因;若相差的步数相同,则以结构相似的等位基因作为突变基因;若步数相同,结构相似,则判为来源不明)。突变率及人群频率资料来源于本实验室数据。

1.4 STR 基因座的突变率及相关因素的分析

根据直接计数法得出相应基因座的突变率,利用 Microsoft Office Excel 和 SPSS 13.0 软件的 Crosstabs 进行结果统计分析,并分析与突变率相关的因素。

1.5 突变案例的 PI 值统计分析

对突变案例的三联体和二联体亲权鉴定案例的 PI 值进行分析。

2 结 果

2.1 突变案例的一般资料

在 PowerPlex™ 16 体系中,共观察到 150 例突变案例(157 个等位基因突变事件),等位基因总的突变发生率为 0.205 9%,其中 5 个家系中出现 2 个 STR 基因座突变位点,1 个家系中出现 3 个 STR 基因座突变位点。

在 STRTyper™ 10 体系中,发现有 15 个案例各存在 1 个不符合遗传规律的 STR 基因座,三联体的有 4 例,父子单亲的有 9 例,母子单亲的有 2 例,等位基因总的突变发生率为 0.2351%。

2.2 24 个 STR 基因座的突变率

24 个 STR 基因座的突变率情况见表 1,可见 PowerPlex™ 16 体系中,CSF1PO 基因座的突变率最高,为 0.239%,而 TPOX 基因座的突变率最低,为 0.011%;而 STRTyper™ 10 体系中,D6S1043 的突变率最高,为 0.492%,D22-GATA198B05 尚未观察到突变事件。各基因座的突变率存在统计学差异(Fisher 确切概率法^[6]: $\chi^2 = 131.03$, $P < 0.001$)。

2.3 突变来源的分析

172 个突变事件中,父系突变的有 117 个(68.02%),母系突变的有 33 个(19.19%),其余 22 个判为来源不明,父系突变:母系突变 = 3.55:1,两种突变来源间存在显著性统计学意义(Z 检验: $P < 0.001$),显示突变事件存在性别差异。

2.4 突变步数分析

分析突变等位基因的步数发现(见表 2),一步突变有 160 例,占突变数的 93.02%。通过卡方(χ^2)检验得出: $\chi^2 = 566.51$, $P < 0.001$,即突变等位基因的步数存在显著的统计学意义。

2.5 突变案例的 PI 值统计分析

应用 Brenner 法计算 PI 值时,当仅计算 PowerPlex™ 16 体系的 STR 基因座, PI 值的范围是 $0.002 \sim 1.07 \times 10^{11}$,累计亲权指数(combined paternity index) $CPI < 10\ 000$ 的有 49 例,占 32.67%,其中 $CPI < 10$ 的有 4 例, $10 \leq CPI < 100$ 的占有 4 例。当增加计算 STRTyper™ 10 体系的基因座后, PI 值均达到 $10\ 000$,均可认定亲权关系。

表 1 24 个 STR 基因座的突变率
Table 1 Mutation rate of 24 STR loci

Serial number	Locus	No. of the mutation case	Mutation rate (mutation event/ No. of meioses) (%)
1	D3S1358	6	0.068(6/877 4)
2	TH01	2	0.023(2/877 4)
3	D21S11	9	0.103(9/877 4)
4	D18S51	19	0.217(19/877 4)
5	Penta E	15	0.171(15/877 4)
6	D5S818	8	0.091(8/877 4)
7	D13S317	10	0.114(10/877 4)
8	D7S820	6	0.068(6/877 4)
9	D16S539	9	0.103(9/877 4)
10	CSF1PO	21	0.239(21/877 4)
11	Penta D	6	0.068(6/877 4)
12	vWA	15	0.171(15/877 4)
13	D8S1179	12	0.137(12/877 4)
14	TPOX	1	0.011(1/877 4)
15	FGA	18	0.205(18/877 4)
16	D18S1364	1	0.123(1/813)
17	D12S391	2	0.246(2/813)
18	D13S325	2	0.246(2/813)
19	D6S1043	4	0.492(4/813)
20	D2S1772	3	0.369(3/813)
21	D11S2368	1	0.123(1/813)
22	D22-GATA198B05	-*	-*
23	D8S1132	1	0.123(1/813)
24	D7S3048	1	0.123(1/813)

—: not found mutation allele

表 2 突变等位基因的突变步数分析
Table 2 Analysis of mutated steps of mutated alleles

Mutation step	Mutation event	Ratio
One-step mutation	160	0.930
Two-step mutation	4	0.023
Three-step mutation	7	0.041
Four-step mutation	1	0.006
Total	172	1

3 讨 论

3.1 STR 基因座的突变率

本研究获得的 24 个 STR 基因座的突变率介于 0 ~ 0.492%, 各基因座的突变率存在统计学差异, 提示各基因座在进化的过程中突变率有高有

低, 这可能与基因座的重复序列的结构有关^[5]。实验结果显示 PowerPlex™ 16 体系中的 15 个 STR 基因座的突变率在 0.011% ~ 0.239% 之间, 而 STRtyper™ 10 体系中的 9 个 STR 基因座的突变率介于 0 ~ 0.492% 之间。通常规定亲权鉴定遗传标记的突变率应低于 0.1%^[7], 因此采用这些 STR 体系进行亲权鉴定时应注意突变的问题。

3.2 突变模式

目前多数学者认为 STR 等位基因是按照逐步突变模式 (stepwise mutation model, SMM)^[8] 发生突变的, 即绝大多数 STR 基因座的突变是完整重复单位的增加或减少, 主要是单个重复单位的增减, 二个或更多个重复单位的改变少见。突变的步数越多其发生的机会就越小。多步突变是通过逐步突变形成的。本次研究结果符合逐步突变模式, 一步突变 (one step mutation) 有 160 例, 占总数的 93.02%。一步突变发生率明显比其他的要高得多, 这与文献^[5,9-10] 的结果相一致。对于每个基因座, 增加重复单位、减少重复单位及不能确定增加或减少者出现的机率未见显著差异^[10]。

3.3 突变的性别差异

本次研究显示来自父系和母系来源的突变比例为 3.55:1, 具有明显性别差异, 这与 Brinkmann、李秋阳及台运春等^[5,9-10] 观察到的结果相符合。原因是男性精母细胞逐步分裂成精子的过程中, 细胞需要的分裂次数比女性配子细胞成熟需要的次数要多得多。28 岁的女性细胞分裂次数大概是男性的 1/28^[9]。DNA 复制的次数男性比女性的多, 突变发生在男性的机率也大些。

3.4 突变机制

目前大多数学者普遍接受 STR 基因座发生突变的机制是复制滑动 (replication slippage) 或复制滑链错配 (slipped-strand mispairing), 即在 DNA 复制的过程中, 新生链和模板链分离时, 在 STR 基因座的重复区域发生碱基错配形成一个或数个重复区域的环状结构, 继而出现新生链比模板链延长或缩短, 表现为增加或减少 1 个 (或数个) 重复单位^[11-13]。复制滑链错配通常发生在重复次数较多, 串联排列的正向重复序列中^[14], 故其突变率较大。本次研究的突变基因座均可用上述的理论解释。

3.5 突变案例的 PI 值计算

目前计算突变基因座的亲权指数 (PI) 的方法有多种, 例如以一个常数 (0.002 或 0.003) 作为 PI

值,或以基因座突变率直接作为 PI 值,或以基因座突变率除以平均非父排除率(PE)作为 PI 值等简略的计算方法,也包括考虑了群体因素、突变步数、突变来源、突变率等因素的 Ayres 法、Fimmers 法和 Brenner 法等^[15]。其中 Fimmers 法和 Brenner 法均为 AABB^[3,16]所推荐,但由于 Fimmers 法计算所需的等位基因突变率(the specific mutation frequency)目前尚未见完整报道,难以应用于实际检案中,故本次研究选择了 Brenner 法计算 PI 值。

从突变案例的 PI 值统计分析可看出,虽然 PowerPlex™ 16 体系在亲权鉴定中是高效和可靠的^[7],但从 Brenner 法计算 CPI 值的结果可知,对存在突变基因座的案例,特别是违反遗传规律基因座不止 1 个时,仅用 PowerPlex™ 16 体系进行分析是不够的,应增加检测基因座数目。当违反遗传规律基因座越多,作出认定或不排除结论应越谨慎。

STR 基因座突变普遍存在,为避免 STR 基因座突变而导致错误的排除亲权关系,必需考虑所有符合和不符合遗传规律的基因座分型结果,计算累积亲权指数,看是否达到适当的“认定”或“排除”标准,若仍未达到,则需增加更多基因定位明确、遗传不连锁的其他 STR 基因座进行检测。有条件的可进一步增加红细胞血型、HLA 及 SNP 等遗传标记系统、性染色体 STR 分型或 mtDNA 测序技术检测,确保结论的准确性。

参考文献:

- [1] Henke J, Henke L. Mutation rate in human microsatellites [J]. Am J Hum Genet, 1999, 64(8): 473-1474.
- [2] Lee SH, Lee JW. Motherless case in paternity testing [J]. Forensic Sci Int, 2000, 78(9): 114-157.
- [3] American Association of Blood Banks (AABB), Annual report for testing in 2004. (2009-07-10) http://www.aabb.org/Documents/Accreditation/Parentage_Testing_Accreditation_Program/rtannrpt04.pdf.
- [4] American Association of Blood Banks (AABB). Guidance for standards for relationship testing laboratories [M]. 7th ed. Maryland: AABB, 2006: 154-157.
- [5] Brinkmann B, Klitsch M, Neuhuber F, et al. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(5): 1408-1415.
- [6] 方积乾. 生物医学研究的统计方法 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 139-141.
- [7] John M. Butler. Forensic DNA typing second edition [M]. San Diego: Academic Press, 2005: 140-160.
- [8] Ohta T, Kimura M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population [J]. Genet Res, 1973, 22(8): 201-204.
- [9] 李秋阳, 丰伟军, 杨庆恩, 等. 常用 STR 基因座突变的观察与分析 [J]. 法医学杂志, 2005, 21(2): 86-89.
- [10] 台运春, 陆惠玲, 刘超, 等. 中国法医学最新科研与实践 [M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2004: 209-211.
- [11] 李茜, 程良红, 魏天莉, 等. 亲子鉴定中 STR 基因座的基因突变分析 [J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(6): 394-396.
- [12] Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation [J]. EMBO J, 2001, 20(10): 2587-2595.
- [13] Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA [J]. Nucleic acids Res, 1992, 20(2): 211-215.
- [14] 张玉静. 分子遗传学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2000: 4.
- [15] 朱运良, 欧雪玲, 蔡贵庆, 等. 用 STR 进行亲权鉴定时结果的判定及其理论根据 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(6): 534-537.
- [16] American Association of Blood Banks(AABB), Annual report for testing in 2006. (2009-07-10) http://www.aabb.org/Documents/Accreditation/Parentage_Testing_Accreditation_Program/rtannrpt06.pdf.

(编辑 王晓鹰)