

用荧光复合扩增体系检测5个X染色体短串联重复序列基因座的多态性

刘秋玲¹, 吕德坚¹, 赵虎^{1*}, 李新国², 陆惠玲¹, 孙宏钰¹, 梁艳芳¹, 伍新尧¹

(1. 中山大学中山医学院法医学教研室, 广东 广州 510089; 2. 新疆医科大学新医司法鉴定所, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要:【目的】为了研究X染色体短串联重复序列(X-STR)基因座的遗传多态性,我们检测了DXS6803、DXS981、DXS6809、DXS6789和DXS7132 5个基因座在广东汉族人群中的多态性。【方法】利用荧光标记引物PCR技术复合扩增上述5个基因座,并用ABI PRISM 3100毛细管电泳及GeneMapper ID3.1软件进行基因分型。【结果】在363个广东汉族无关个体(男性:181个,女性:182个)中5个基因座共检出54个等位基因。多态性信息含量为0.6935~0.8177;女性个体识别率为0.8976~0.9562。三联体非父排除率为0.7805~0.8467。【结论】这5个基因座多态性较高,在个体识别和亲权鉴定中具有重要的应用价值。

关键词: X-染色体短串联重复序列; 荧光复合扩增; 多态性; 广东汉族

中图分类号: R **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)04-0404-04

Polymorphism of Five X-STRs Loci with a New Pentaplex PCR

LIU Qiu-ling¹, LV De-jian¹, ZHAO Hu^{1*}, LI Xin-guo², LU Hui-ling¹, SUN Hong-yu¹,
LIANG Yan-fang¹, WU Xin-yao¹

(1. Faculty of Forensic Medicine, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510089, China;
2. Xinyi Justice Appraisal Institution, Xinjiang Medical University, Wulumuqi 830054, China)

Abstract: 【Objective】 To learn about the genetic diversity, we studied the five X-chromosomal STR (X-STR) loci in Guangdong Han Nationality Groups. 【Methods】 The five Loci (DXS6803, DXS981, DXS6809, DXS6789, and DXS7132) were amplified in a pentaplex PCR reaction. PCR products were analyzed using capillary electrophoresis and ABI prism 3100 Genetic Analyzer, with GeneMapper ID 3.1 Analysis Software. 【Results】 A total of 363 individuals (181 unrelated male and 182 unrelated female) from Guangdong Han population were tested, 54 alleles were observed for these loci. Polymorphism information content is 0.6935 ~ 0.8177. Power of discrimination in females was 0.8976 ~ 0.9562. Mean exclusion chance for X-STR in standard trios with daughters was 0.7805 ~ 0.8467. 【Conclusion】 The five loci in the multiplex system provide high polymorphism information for forensic identification and paternity testing, particularly for difficult paternity deficiency cases.

Key words: X-STR; multiplex PCR; polymorphism; Guangdong Han population in China

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4):404-407]

常染色体短串联重复序列(short tandem repeat, STR)和Y-STR已广泛应用于法医学个体识别和亲子鉴定中,而X-STR在法医学中的应用较少。随着法医学的发展和日常检案的复杂化,在亲权鉴定中遇到的某些特殊案例,仅靠常染色体STR、Y-STR及线粒体DNA难以解决^[1]。近年来法医工作者越来越关注研究性染色体和线粒体DNA(mtDNA)遗

传标记^[2-11]。X染色体属性染色体,男性个体的X-STR呈单倍型形式存在,只能从其母亲中得到,且只能遗传给女儿,故孙女X-STR基因座的1个等位基因与其祖母相同。由于其遗传的特性,X-STR在某些亲权鉴定(如缺少双亲的姐妹认亲、同父异母的半姐妹认亲、隔代认亲等)中潜在一些其他染色体无法比拟的优点。由于不同人群中等位基因分

布不同,因此建立当地的群体资料显得更为重要^[9]。本研究建立了二色荧光5个X-STR基因座复合扩增体系,调查广东汉族363个无关个体、565例家系,研究该体系的多态性,为建立X-STR基因座群体遗传学资料和建立X-STR数据库奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

363个广东汉族无关个体及家系样本来自本室日常检案样本。用Chelex-100法提取DNA。

1.2 引物

引物序列参照GDB(<http://www.gdb.org>)。

1.3 PCR扩增

总体积12.5 μL,内含200 μmol/L dNTP和1.5 mmol/L MgCl₂ (ABI, USA), 1 × buffer (ABI, USA), 1.5 U *Taq*-plus DNA聚合酶(北京,鼎国有限公司),各引物浓度及相关信息见表1,模板DNA 10 ~ 20 ng,在热循环仪(MWG-BIOTECH AG, Germany)上,预变性(94 °C, 5 min),然后经94 °C, 45 s; 60 °C, 45 s; 72 °C, 45 s, 30个循环,再72 °C延伸5 min。

表1 5个X-STR基因座基本信息
Table 1 Information of five X-STR loci

Locus	Chromosome location	Fragment size (bp)	Allele rang	Label	Primer concentration (μM)	Primer reference
DXS6803	Xq21.31	97 ~ 125	7 ~ 14	FAM	0.47	[8]
DXS981	Xq13.1	178 ~ 202	11 ~ 17	FAM	0.40	[8]
DXS6809	Xq21.33	239 ~ 279	28 ~ 38	FAM	0.43	[8]
DXS6789	Xq21.33	150 ~ 194	13 ~ 24	HEX	0.49	[9]
DXS7132	Xq12	276 ~ 304	11 ~ 18	HEX	0.54	[9]

1.4 产物电泳及结果分析

PCR产物用ABI PRISM 3100遗传分析仪和变性胶POP4 (Applied Biosystems, Foster city, USA)电泳, GeneMapper ID 3.1软件进行分型。用Genescan™-500 LIZ™ size standards校正片段的大小,并用K562、9947A和9948 (Promega, Madison, WI)阳性DNA校正等位基因ladder,每个基因座中随机抽取2个等位基因测序进一步验证等位基因ladder。用自制等位基因ladder进行基因分型。

1.5 统计学分析

用软件ARLEQUIN (<http://lgb.unige.ch/arlequin>)计算等位基因频率及基因多样性,比较男女性群体等位基因频率的差异,并按文献[12]的方法计算各种参数。

2 结果

本复合扩增体系结果清晰(图1)。在363个广东汉族无关个体中,5个基因座(DXS6803、DXS981、DXS6809、DXS6789和DXS7132)共检出54个等位基因。分别为13、13、12、9、7个。各基因座等位基因频率及其统计学参数见表2。

3 讨论

本复合扩增体系能得到清晰结果,没有影子带或非特异带出现。重现性好,灵敏度高,最低检出限为0.25 ng,模板DNA为10 ~ 20 ng时能得到最佳的结果。本体系用标准DNA K562、9947A和9948校正等位基因ladder,以保证各群体资料比较的正确性。K562、9947A和9948分型结果见图1,与Szibor等^[13]报道的一致。

用Powerplex™ 16 system试剂盒检测15个常染色体STR结果肯定的案例(其中有父-母-女三联体294例及母-子二联体271例),用本体系检测5个X-STR基因座共发现8例突变,其中DXS6803基因座2例(突变率为0.23%)、DXS6809基因座1例(突变率为0.12%)、DXS6789基因座2例(突变率为0.23%)和DXS7132基因座3例(突变率为0.35%),DXS981基因座未发现突变。在4295次减数分裂中发现8次突变,且所有的突变都是增加或减少1个重复单位的改变。平均突变率为 1.86×10^{-3} ,这与前人报道的X-STR基因座突变率一致^[1]。

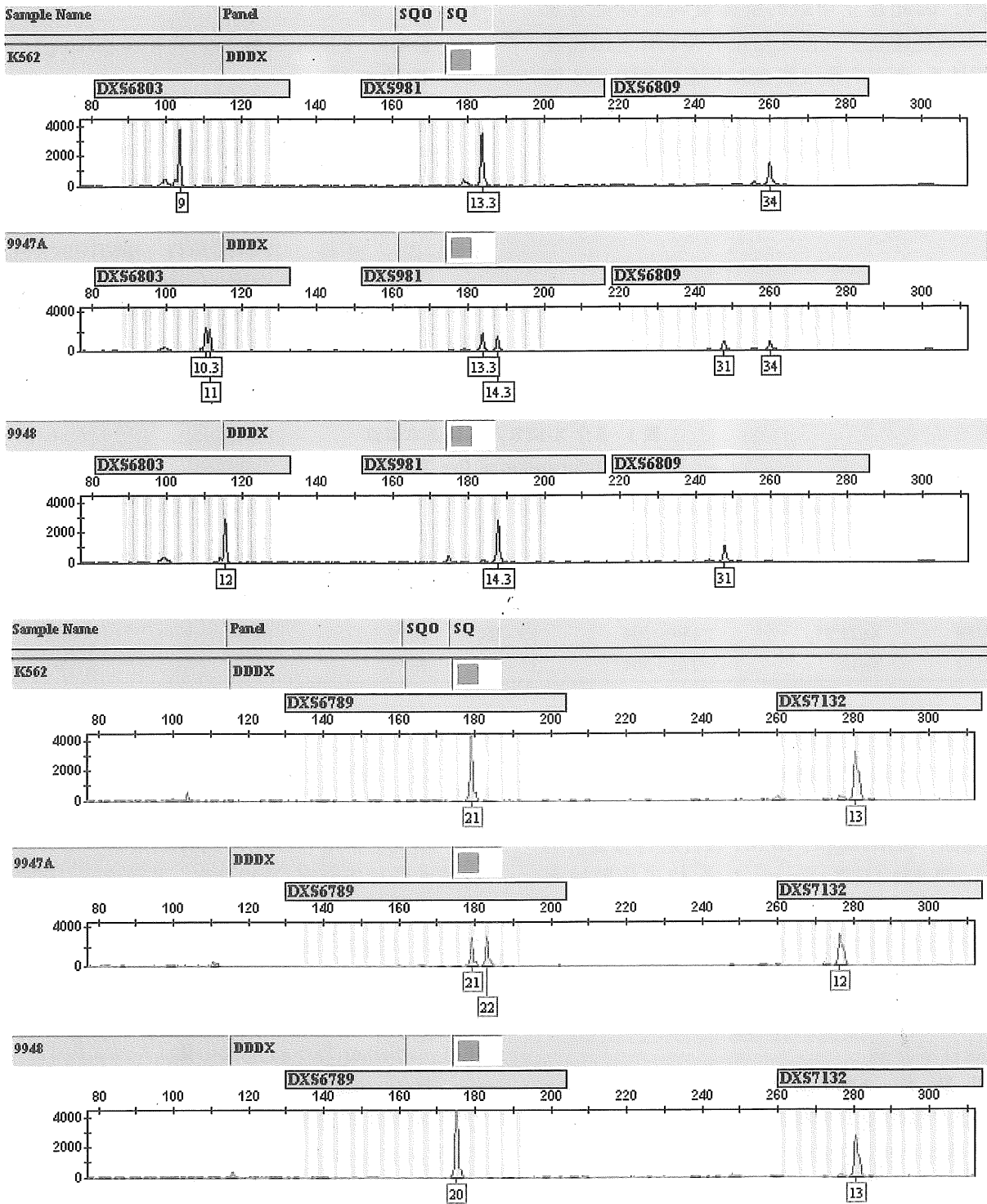


图 1 三个阳性 DNA 样本电泳图谱

Fig.1 Electropherogram of three cell line DNA (K562, 9947 and 9948) with pentaplex system

本体系中 5 个基因座多态性较高, 其中 DXS981 基因座有最高多态性和最高个体识别率, 以及最低的突变率, 在 4 295 次减数分裂中尚未发现其突变。这些高多态性和低突变率的基因座在法医学个体识别及亲权鉴定中具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] Szibor R, Krawczak M, Hering S, et al. Use of X-linked markers for forensic purposes [J]. Int J Legal Med, 2003, 117(2): 67-74.
- [2] Pico A, Castillo A, Vargas C, et al. Genetic profile

表2 5个X-STR基因座在广东汉族群体的等位基因频率及统计学参数

Table 2 Allele frequencies and statistical parameter of the five X-STR loci in Chinese from Guangdong Han population

 $(n_{\text{male}} = 181; n_{\text{female}} = 182)$

DXS6803		DXS981		DXS6809		DXS6789		DXS7132	
Allele	Freq	Allele	Freq	Allele	Freq	Allele	Freq	Allele	Freq
7	0.0018	11	0.0092	28	0.0037	13	0.0018	11	0.0074
7.3	0.0018	11.3	0.0037	29	0.0092	14		12	0.1011
9	0.0110	12	0.0551	30	0.0294	15	0.136	13	0.1746
9.3	0.0129	12.3	0.0717	31	0.1471	16	0.3695	14	0.3566
10	0.1415	13	0.1673	32	0.1838	17	0.0533	15	0.2555
10.3	0.0625	13.3	0.1728	32.1	0.0018	18		16	0.0864
11	0.1434	14	0.2757	33	0.2390	19	0.0147	17	0.0184
11.3	0.4485	14.3	0.0790	34	0.2187	20	0.1985		
12	0.0607	15	0.1048	35	0.1085	21	0.1526		
12.3	0.0846	15.3	0.0294	36	0.0423	22	0.0643		
13	0.0202	16	0.0257	37	0.0110	23	0.0092		
13.3	0.0073	16.3	0.0018	38	0.0055				
14	0.0037	17	0.0037						
PIC	0.7260		0.8177		0.7948		0.7453		0.6935
PDM	0.7123		0.8344		0.8259		0.8033		0.7731
PDF	0.9171		0.9562		0.9445		0.9094		0.8976
MECI	0.7841		0.8467		0.8323		0.7961		0.7805
MECII	0.5825		0.7112		0.6848		0.6148		0.5869

PIC: polymorphism information content; PDM: power of discrimination in males; PDF: power of discrimination in females; MECI: mean exclusion chance for X-STR in standard trios with daughters; MECII: mean exclusion chance for X-STR in father/daughter duos

characterization and segregation analysis of 10 X-STRs in a sample from Santander, Colombia [J]. *Int J Legal Med*, 2008, 122(4):347-351.

- [3] 吕德坚. 用复合PCR检测DXS7132和DXS6804的单倍型[J]. *遗传学报*, 2003, 30(1):10-14.
- [4] 刘秋玲, 吕德坚, 崔 崑. 3个X染色体短串联重复的复合扩增及其多态性 [J]. *中华医学遗传学杂志* 2004, 21(3):233-235.
- [5] Poetsch M, Petersmann H, Repenning A, et al. Development of two pentaplex systems with X-chromosomal STR loci and their allele frequencies in a northeast German population [J]. *Forensic Sci Int*, 2005, 155(1):71-76.
- [6] 高雅, 金天博, 余 兵, 等. 藏族X染色体10个STR位点的遗传多态性 [J]. *中华医学遗传学杂志* 2006, 23(1):97-99.
- [7] Hundertmark T, Hering S, Edelmann J, et al. The STR cluster DXS10148-DXS8378-DXS10135 provides a powerful tool for X-chromosomal haplotyping at Xp22 [J]. *Int J Legal Med*, 2008, 122(6):489-492.
- [8] Shin SH, Yu JS, Sun WP, et al. Genetic analysis of

18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population [J]. *Forensic Sci Int*, 2005, 147(1):35-41.

- [9] Gomes I, Prinz M, Pereira R, et al. Genetic analysis of three US population groups using an X-chromosomal STR decaplex [J]. *Int J Legal Med*, 2007, 121(3):198-203.
- [10] Liu QL, LV DJ, Zhu JZ, et al. Fluorescent Multiplex Amplification of Three X-STR Loci [J]. *Acta Genetic Sinica*, 2006, 33(12):1053-1059.
- [11] 孙宏钰, 黄艳梅, 伍新尧, 等. 中国6个群体线粒体DNA Region V的缺失多态性 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(4):308-310.
- [12] Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, et al. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA) [J]. *J Forensic Sci*, 1998, 43(5):1046-1049.
- [13] Szibor R, Edelmann J, Hering S, et al. Cell line DNA typing in forensic genetics—the necessity of reliable standards [J]. *Forensic Sci Int*, 2003, 138(1-3):37-43.

(编辑 徐 杰)