

· 研究综述 ·

# 基因工程技术 DNA 多态性 分析及应用<sup>①</sup>

伍新尧<sup>1,②</sup> 杨英浩<sup>1</sup> 罗超权<sup>1</sup> 周俊宜<sup>1</sup> 郭俊明<sup>1</sup>  
罗健扬<sup>1</sup> 胡学强<sup>2</sup> 韦相才<sup>3</sup>

(中山医科大学 1 生化教研室 2 神经科教研室 3 寄生虫学教研室; 广州, 510089)

**提 要** 自 1988 年以来, 本课题组应用基因工程技术对 DNA 多态性进行分析, 取得良好效果。这一技术避开了基因产物, 直接研究遗传物质本身——DNA 的多态性, 具有准确、分辨力高、不受基因表达过程影响因素干扰等许多优越性。在医学遗传学某些遗传病的诊断、基因连锁分析、疾病相关性分析、人类学、自身免疫性疾病、人类免疫调控、亲子鉴定和法医学个体识别等方面均具有广阔的应用前景。这些技术的实际应用已取得了明显的社会效益。

**关键词** 基因工程; DNA 多态性; 限制性片段长度多态性; 聚合酶链反应

**中图分类号** Q599; D919.2

自发现人类 ABO 血型以来, 人类遗传多态性的研究已有近百年的历史。这对促进人类学、遗传学、免疫学、法医学的发展, 和研究生物进化、阐明某些疾病的发病机理乃至协助诊断等起了十分重要的作用。以往研究遗传多态性都是通过检测表型物质, 间接分析、推论具有相应的遗传基因。遗传多态性, 归根到底是 DNA 序列的多态性。对 DNA 多态性的研究<sup>[1]</sup>只是近十余年的事情。几年来, 作者在国家自然科学基金等的资助下, 开展了限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、DNA 指纹的研究工作, 并以聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术分析 DNA 多态性, 调查了广东人群健康无关个体有关位点的基因频率, 应用于亲子鉴定、法医个体识别、某些人类疾病感染源的诊断和生物分类研究等, 已取得良好的社会效益, 现综述如

下。

## 1 DNA 指纹检测<sup>[2~4]</sup>

1988 年, 作者根据 DNA 指纹是人基因组中重复序列的 RFLP 的原理和人与鼠的髓鞘碱性蛋白(MBP)基因 cDNA 同源序列性高于 90% 的事实, 选用鼠 MBP cDNA 3' 端的一段序列, 它是非表达区高度重复序列, 且与人基因组中该类重复序列几乎完全同源的, 长度为 0.81kb 的片段作探针, 检测用 *Hae* III 酶解的人 DNA 限制性片段(RF), 在人群中可分出 22 条谱带, 受检的 30 例无血缘关系的个体之间没有两个人的谱带是完全相同的, 显示这一方法的高度个体特异性。这是国内首次用自己的力量找出检测 DNA 指纹的探针。此外, 作者还用含有 14 号染色体

① 国家自然科学基金资助课题, 其中“人 DNA 指纹”内容获广东省卫生厅 1993 年度科技进步二等奖;

② 第一作者, 52 岁, 男, 副教授

短臂一段重复序列的 pAW101 探针检测了 106 例广东地区无亲缘关系的健康个体, 共发现长度各异的 65 条 RF。每个受检者只具有其中的 1~2 条(具有一条 RF 的为纯合子, 具有 2 条 RF 的为杂合子)。用自己推导出来的数学模式计算出各 RF 的大小。统计分析证明, 这些 RF 的频率分布符合哈-温氏平衡。无亲缘关系的两个个体之间具有完全相同 RF 图谱的机会为 0.00048(1/2080)。家系调查证明, 这些 RF 符合孟德尔规律遗传。与国外资料比较, 等位基因及频率分布显示有种族差异。

## 2 PCR 技术检测 DNA 多态性<sup>[5~7]</sup>

PCR 技术因其固有的优越性引起广大生命科学工作者的高度重视, 并获得迅速推广和发展。作者利用 PCR 技术检测了 100 例无亲缘关系的广东汉族人血痕 DNA 的载脂蛋白 B(*apoB*) 基因 3' 端数量可变串联重复序列(variable number of tandem repeat, VNTR) 及 D17S5 位点的多态性。发现 *apoB* 3' 端 VNTR 位点在广东汉族人群中具有 19 个等位基因, 各等位基因的频率为 0.005~0.195, 杂合度达 88.8%, 父权排除率为 0.6395; D17S5 位点共有 12 个等位基因, 等位基因频率为 0.005~0.190, 杂合度为 85.93%, 父权排除率达 0.6245, 个体识别力为 0.9642。接着又作了 D1S80 位点和 HLA-DQA 位点在广东人群中等位基因频率分布调查。在 101 例无亲缘关系的健康个体中共发现 D1S80 位点有 19 个等位基因, 基因频率分布为 0.0099~0.1337, 杂合度为 93.11%, 父权排除率为 0.7554; HLA-DQA 位点有 6 个等位基因, 基因率为 0.0236~0.3255, 杂合度为 75.29%, 父权排除率为 0.5422。这些资料经统计学分析, 均证明这些位点的基因频率分布符合哈-温氏平衡。家系调

查资料均显示这些基因(特异性扩增片段)完全遵循孟德尔规律遗传。与国外相关资料比较后发现, 这些位点的等位基因数及频率分布均存在种族差异。

在上述基础上, 作者对各种可能的检材, 包括组织碎块、精斑、人工流产的胚胎组织、羊水细胞、毛发, 以及部分腐败的组织等, 用 PCR 技术成功地进行基因分型。

上述技术和资料为医学遗传学、基因连锁分析、人类学研究、亲子鉴定及法医个体识别等提供了有效的工具和基础资料。

## 3 DNA 多态性分析技术研究临床医学<sup>[8~11]</sup>

作者应用 RFLP 技术研究了广东汉族人 *apoA*-C III-AN 基因簇的 *Pst* I、*Sst* I 和 *EcoR* I RF 的多态性。其中等位基因  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $R_1$  和  $R_2$  的频率分别为 0.98, 0.02, 0.96, 0.04, 0.90 和 0.10。与其他种族的相关资料比较, 显示中国广东汉族人  $P_2$  等位基因频率低于日本人、亚洲印第安人和高加索人。 $S_2$  等位基因频率低于日本人、菲律宾人、沙特阿拉伯人和亚洲印第安人。同时显示,  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  和  $R_1$ ,  $R_2$  构成的单倍型处于连锁不平衡状态。在动脉粥样硬化性脑梗塞病人中发现了在正常对照组中未见到的单倍型  $R_2S_2$  和  $P_2S_2R_2$ 。而且此类患者中单倍型  $P_2S_1$ ,  $P_2S_1R_1$  和  $R_2S_2$  频率显著增高, 可作为一种有价值的遗传标记对动脉粥样硬化性脑梗塞的易感个体进行连锁分析。

弓形虫感染是习惯性流产和致畸胎的重要原因。作者等根据弓形虫 DNA 序列的保守区, 设计了一对对弓形虫特异的引物。实验证明用这对引物对弓形虫的宿主, 人、狗、猫等及常见寄生虫, 如恶性疟原虫、柏氏疟原虫、卡氏肺孢子虫、利什曼原虫、血吸虫、丝虫和部分细菌的 DNA 进行 PCR 实验时, 均无扩增产物, 只有以弓形虫的 DNA 为模板时,

才有 778 bp 的特异性扩增片段。在临床上, 可以取羊水、母血作检材, 以诊断弓形虫感染的带菌者。这一技术为避免因弓形虫致畸形胎儿的出生, 保证优生优育提供了可靠的早期诊断手段。

#### 4 DNA 多态性检测技术用于亲子鉴定和法医鉴定<sup>[12~19]</sup>

同以往的血型测定法相比, 以 RFLP 和 PCR 技术检测 DNA 多态性用于亲子鉴定和法医个人认定有无可比拟的优越性。不仅在结果的准确性和可靠性方面更优越, 而且血型测定法不能检测的许多案例, 现在都可以获得满意的解决。

**4.1 胚胎的亲权鉴定** 用血型测定法则要等胎龄 5 个半月以后才能进行。用 DNA 多态性分析技术则完全不受此限制, 胎龄小于 3 个月的只要取得胚胎组织, 或羊水、或绒毛组织等即可进行检查。这对某些特殊案件, 其需要尽早结束妊娠又要鉴定胚胎亲生父亲的案件, 能及时获得圆满解决, 有重要意义。对于那些少女被奸致孕案的处理, 本方法的意义尤为突出。利用本方法甚至还可以在不影响胚胎继续正常发育的前提下进行胚胎的亲权鉴定, 这在以前是无法想象的。

**4.2 部分腐败尸体、死胎等的亲权鉴定** 用血型测定法已无法检查此类案件, 但用本方法则同样可以获得满意结果, 使这些棘手的案件得以解决。实际应用本方法已经取得良好效果, 使狡猾凶残的罪犯受到法律制裁。

**4.3 边远地区的亲权纠纷案** 如果采用血型测定法鉴定, 这类案件往往受到交通等诸多因素的限制而无法进行。现在使用本方法则可以将新鲜血液制成血痕送检。

**4.4 微量检材的个人识别** 这是法医检案的重要而又困难的课题。血型测定法的分辨力很低, 对检材要求高, 遇上微量检材常常无能为力。作者用 PCR DNA 多态性分析技术

能对微量的血痕、精斑、1cm 长的毛发作出鉴定并提供进行个人认定的重要依据, 大大提高了物证检验的个体识别能力, 为疑难案件的侦破和判定提供重要线索和证据。

**4.5 种属鉴定** 种属鉴定是血痕个人识别的前提。作者的实验证实, 人 Y 染色体特异性探针和人 *apoB* 基因 3' 端 VNTR 特异性引物, 只与人的 DNA 杂交或产生特异性的 PCR 扩增带, 而对黑猩猩、猴、狗、牛、猪、羊、猫、鼠、鸡、鱼等常见动物的 DNA 都无相应的结果。这种一次实验即可同时解决血痕的种属和性别或种属和个体特征的鉴定技术在国内外尚未见报道。

#### 5 PCR 技术在生物分类中的应用<sup>[20]</sup>

生物分类的经典方法是依靠生物体表型的差异。环境因素对生物表型的影响使经典分类方法的缺陷逐渐暴露出来。作者用随机引物 PCR 技术, 以 4 株弓形虫 DNA 为模板, 不同株的 DNA 模板得到各异的扩增带, 且重复性好。在国内开创了 PCR 技术作生物分类的先例。

#### 6 PCR-SSCP 技术作 HLA-DQ、DR 基因分型<sup>[21,22]</sup>

HLA 是人类最复杂的遗传多态性系统。其检测首先用免疫学方法进行。但其检测对象仍是表型物质, 它固有的局限性已不言而喻。国内外目前多用 RFLP、PCR-RFLP、聚合酶链反应-等位基因特异性寡核苷酸探针 (PCR-ASO) 等技术对 HLA 进行基因分型。这些虽克服了免疫学方法的局限性, 但其方法仍嫌繁琐、费时、耗资、亟待改进。作者用聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 技术对已知血清型的 HLA-DR 样本或用 PCR-ASO 测知型别的 HLA-DQA 样本进行

基因分型,初步取得了良好的结果。所得图谱稳定、重复性好、易以辨读。对 HLA-Ⅰ类基因的全面分型工作正在进行。这项工作的完成将对医学遗传学、人类免疫调控机理、自身免疫性疾病、疾病相关性研究、人类学、器官移植、法医学等领域均有重要意义。

### 参 考 文 献

- 1 伍新尧. DNA 多态性及其分析技术. 广州医药, 1992, 23(6): 14
- 2 伍新尧, 罗超权, 杨英浩, 等. 人 DNA 指纹检测的初步研究. 中国法医学杂志, 1989, 4(4): 207
- 3 Luo Chaoquan, Wu Xinyao, Yang Yinghao. DNA RFLPs detected by pAW101 probe in population of Guangdong, China. In: IAFS ed. The First International Symposium on Advances in Legal Medicine, Kanazawa, Japan. 1990: 11~15
- 4 罗超权, 伍新尧, 杨英浩, 等. pAW101-EcoR I 限制性片段在广东人群中的分布及其在法医学上的应用, 中山医科大学学报, 1992, 13(1): 65
- 5 罗超权, 郭俊明, 杨英浩, 等. 广东汉族人载脂蛋白 B (apoB) 基因 3'端数目可变串联重复 (VNTR) 序列的遗传多态性研究. 生物化学杂志, 1993, 9(4): 485
- 6 Yang Yinghao, Wu Xinyao, Luo Chaoquan, et al. Studying on human genetic polymorphism of D17S5 locus of Han nationality population in Guangdong, China. In: IAFS ed. 13th Meeting of International Association of Forensic Sciences (IAFS), Dusseldorf, Germany. 1993: page A112
- 7 Zhou Junyi, Luo Chaoquan, Yang Yinghao, et al. HLA-DQA polymorphism analysis of Han nationality in Guangdong, China, using PCR and oligonucleotide probes. In: IAFS ed. 13th Meeting of IAFS, Dusseldorf, Germany. 1993: page A116
- 8 罗超权, 杨英浩, 胡学强, 等. 广东汉族健康人载脂蛋白 A I-CⅡ-AⅣ 基因簇 DNA 多态性及其单倍型分布. 生物化学杂志, 1992, 8(6): 700
- 9 胡学强, 刘焯霖, 梁秀龄, 等. 载脂蛋白 A I 基因多态性与脑血管病的关系. 中华医学杂志, 1992, 72(5): 260
- 10 胡学强, 刘焯霖, 梁秀龄, 等. 动脉粥样硬化性脑梗塞患者载脂蛋白 A I-CⅡ 基因簇多态性及不同基因型血脂脂蛋白的关系. 中国神经精神疾病杂志, 1992, 18(1): 2
- 11 韦相才, 陈观今, 郑焕钦, 等. 聚合酶链反应技术检测弓形虫核酸. 现代寄生虫学研究, [广东省寄生虫学会年报, 1992, 第 11-13 卷增刊] 1993, (1): 69
- 12 伍新尧, 杨英浩, 罗超权, 等. 应用 pAW101 DNA 探针作人流胚胎组织的亲权鉴定. 中山医科大学学报, 1992, 13(3): 40
- 13 杨英浩, 刘超, 罗超权, 等. 非同位素标记 pAW101 探针作人流胚胎组织的亲权鉴定. 中山医科大学学报, 1992, 13(4): 49
- 14 杨英浩, 伍新尧, 罗超权, 等. PCR 技术在亲权鉴定中应用的研究. 见: 广东省生物化学学会第五届年会论文集, 1993, 广州: 广东省生化学会 1993: 11
- 15 Wu Xinyao, Yang Yinghao, Luo Chaoquan, et al. The parentage identification of partial decomposed corpses. In: IAFS ed. 13th Meeting of IAFS, Dusseldorf, Germany. 1993: page A120
- 16 Wu Xinyao, Yang Yinghao, Luo Chaoquan, et al. The identification of hair trunk by genotyping with PCR technique. In: IAFS ed. 13th Meeting of IAFS, Dusseldorf, Germany. 1993: page A214
- 17 罗健扬, 郭俊明, 刘煦文, 等. PCR 在检测人类发干性别中的应用. 中山医科大学学报, 1993, 14(4): 286
- 18 杨英浩, 罗超权, 伍新尧, 等. 重组 DNA 技术斑点杂交法检测生物检材的性别. 中山医科大学学报, 1992, 13(2): 75
- 19 郭俊明, 罗超权, 杨英浩, 等. PCR 技术同时检测微量血液的种属来源及其 DNA 多态性. 见: 中国化学会编. 中国化学会第一届全国生物分析化学学术讨论会论文集. 江西井冈山, 1992, 北京: 中国化学会, 1992: 11~14
- 20 罗超权, 杨英浩, 韦相才, 等. 随机引物 PCR 技术在弓形虫菌株鉴定中的应用. 广东省生化学会编. 广东省生化学会第五届年会论文集. 广州:

- 广东省生化学会, 1993: 14
- 21 Zhou Junyi, Yang Yinghao, Zhang Qingxiu, et al. Genotyping of HLA-DQA alleles by PCR-polyacrylamide gel electrophoresis. In: IAFS ed. 13th Meeting of IAFS, Dusseldorf, Germany. 1993: page A120
- 22 林观平, 张清秀, 伍新尧, 等. PCR-SSCP 作 HLA-DRB 基因分型的初步研究. 中山医科大学学报, 1994, 15(3): 171
- (1994-05-04 收稿 1994-08-08 修回)

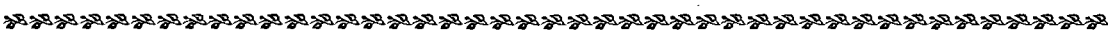
## THE ANALYSIS OF HUMAN GENETIC POLYMORPHISM WITH GENETIC ENGINEERING TECHNIQUES AND THEIR APPLICATION

Wu Xinyao<sup>1</sup> Yang Yinghao<sup>1</sup> Luo Chaoquan<sup>1</sup>  
Zhou Junyi<sup>1</sup> Guo Junming<sup>1</sup> Luo Jianyang<sup>1</sup> Hu Xueqiang<sup>2</sup> Wei Xiangcai<sup>3</sup>

(1. Department of Biochemistry 2. Department of Neurology 3. Department of Parasitology,  
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

The analysis of human genetic polymorphism has great significance for human genetics, forensic medicine, and anthropology, etc. In recent years, the authors applied genetic engineering techniques to analyse human genetic polymorphisms and obtained some desirable achievements. Passing by the gene expression products, we directly studied the polymorphisms of DNA which is real hereditary material. This technique possesses some advantages, such as exactitude, high discrimination, and is never affected by factors appearing in the process of gene expression. So it is very valuable in gene-linked analysis, diagnosis of some genetic diseases, disease-correlation analysis, paternity testing, forensic individual-identification, and studying of anthropology, etc. The good social benefit have been obtained from the practice.

**Key words** genetic engineering; DNA polymorphism; restriction fragment length polymorphism (RFLP); polymerase chain reaction (PCR)



### · 题 录 ·

- 王 斌, 曹丽萍, 徐裕英. 用 PCR 技术建立全基因的无性繁殖系. 中国免疫学杂志, 1994, 10(6): 5
- 朱全胜, 丘钜世. 骨巨细胞瘤细胞遗传学研究. 中华病理学杂志, 1994, 23(3): 162