

106例中国人 vW A 位点的研究

伍祥林¹ 郭景元¹ 梁赏猷² 王穗保² 刘超²

(1 中山医科大学法医学系; 广州, 510089; 2 广州市公安局刑事科学技术研究所; 广州, 510030)

摘要 应用聚合酶链反应 (PCR) 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染色技术, 检测了人类血管性假血友病因子 (vWF) 基因内含子 40 中的 vW A 位点等位基因及其无亲缘关系的随机个体频率。调查了 106 例中国人无关个体, 发现该位点有 8 个等位基因, 其大小为 138-166 bp, 18 种基因型, 符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。10 个 2 代家系和 1 个 4 代家系调查结果表明 vW A 位点的遗传符合孟德尔定律。此位点的杂合度为 0.787, 多态信息量 (PIC) 为 0.772, 具有高度遗传多态性。实验结果表明, 该位点能较好地解决法医学上因生物检材量少和 DNA 降解等难以进行鉴定的疑难问题, 在法医学应用上具有重要价值。

关键词 等位基因; 聚合酶链反应; 多态现象 (遗传学)

中图分类号 R 343.14

短串联重复序列 (STR) 是由 2~5 个碱基对作为核心单位, 串联重复形成的一类 DNA 序列, 由于核心重复单位数目的变化构成了 STR 位点的遗传多态性。其片段长度小, 在人体内分布广泛而均匀, 有利于 PCR 扩增, 与 AmpFLP 比较, STR 的敏感性要高出 10 倍^[1], 其对降解检材 DNA 的扩增成功率也明显升高^[1], 是法医学个人识别的研究方向。STR 遗传标记也可作为人类学研究, 分析基因从一个群体向另一个群体流动新手段。

vWF 基因位于 12p12-12pter 存在于 vWF 基因内的第 1640-1794 个核苷酸区的 vW A, 主要由 TC-TA 重复多次构成^[2]。在不同个体中, vW A 重复的次数不同构成其多态性。本文调查了 vW A 位点在 106 例中国人群无关个体 (下称无关个体) 中的分布情况, 并讨论了其在法医学上的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 DNA 标本的采集

取无关个体血液 10 例, 毛发 (含毛囊) 30 例, 血纱布 46 例, 10 个 2 代家系 30 人新鲜血液和 1 个 4 代家系 12 人血纱布。DNA 的抽提采用酚/氯仿或 Chelex-100 法。

1.2 引物的合成

根据 David J⁴ 等人报道的基因序列, 选取目标扩增片段两侧的核苷酸序列, 在 PE 公司合成。序列如下:

5'-CCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATG-3'
5'-GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'

1.3 DNA 体外扩增反应

50 μ l 反应体系中, 各种试剂的终浓度为: 模板基因组 DNA 20 ng, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Triton X 100 0.1%, MgCl₂ 1.7 mmol/L, dNTP 80 μ mol/L, 引物 20 pmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U。反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 7 min; 4 $^{\circ}$ C 终止反应。

1.4 制备 vW A 特异性等位基因 Ladder 和基因分型

制备 8% (19:1) 聚丙烯酰胺凝胶板 (21 cm \times 40 cm \times 0.04 cm), 室温 2 h, 200V, 预电泳 20 min 后, 加入适量上述扩增产物, 用 100 bp DNA Ladder (Gibco) 和 P_{ix} 174 DNA Marker 作参照物, 电泳, 200V, 22 h。凝胶用银染色法染色, 然后于凝胶干燥器中干燥, 室温保存。

染色后分别测量出凝胶上参照物各条带的迁移距离, 根据公式 $Y = 10^{A+BX}$ (其中 Y 为 DNA 的分子量, X 为条带的迁移距离), 可以计算同一凝胶上其它 PCR 扩增产物的分子量。选取扩增长度不一的 PCR 产物, 以适当的比例混匀, 用作样本 PCR 扩增产物检测时的参照物, 即 vW A 特异性等位基因 Ladder 用此 Ladder 对各样本的等位基因进行基因分型。

① 第一作者, 1965 年出生, 男, 博士研究生

1.5 等位基因数据的统计学处理

根据 106个无关个体中所得出的各种等位基因的观察值,按 Fisher 公式^[3]计算其理论值和 χ^2 值,检测其是否符合 Hardy-Weinberg 定律。杂合率 (h) 和多态信息含量 (PIC)按下列公式进行计算:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j^2$$

P_i 和 P_j 代表群体中第 i 和第 j 个等位基因的频率

2 结果

作者研究了 106例无关个体的 vWA 位点,发现了 8 个等位基因(图 1) 理论上 8 个等位基因有 36 种基因型,作者已发现其中 18 种。8 个等位基因大小及频率见表 1,其重复次数参照 Drozd^[5]标准及以上两种 DNA Marker,应为 14~ 21 次,各种基因型及其相关数据见表 2

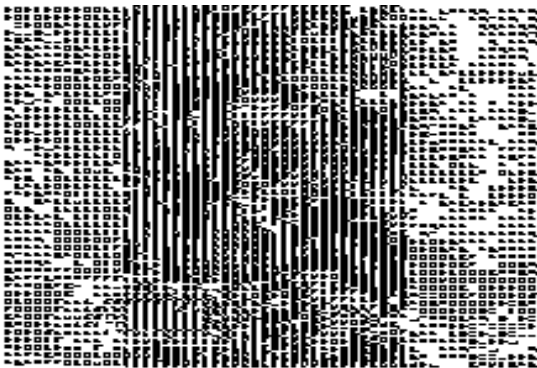


图 1 vWA 位点等位基因图

A 6 个 vWA 等位基因 Ladder, 162 158 154 150 142 和 138 bp; B 150 146 bp; C 154 150 bp; D 162 150 bp; E 158 138 bp; F 158 142 bp; G 166 142 bp; H Phix 174 DNA Marker, 118 194 bp 以上各区按从上到下顺序排列

表 1 106例中国人 vWA 基因频率分布

等位基因	观察值(例)	频率
14	1	0.0047
15	40	0.1887
16	3	0.0142
17	46	0.2170
18	67	0.3160
19	35	0.1651
20	19	0.0896
21	1	0.0047

表 2 106例中国人群 vWA 基因型

基因型	观察值	预期值	χ^2
21 15	1	0.19	3.4532
20 20	1	0.85	0.0265
20 19	5	3.14	1.1018
20 18	4	6.00	0.6667
20 17	6	4.12	0.8579
20 16	1	0.27	1.9737
20 15	1	3.85	1.8593
19 19	2	2.89	0.2741
19 18	12	11.06	0.0799
19 17	10	7.60	0.7579
19 15	4	6.60	1.0242
18 18	10	10.58	0.0318
18 17	16	14.54	0.1466
18 15	14	12.64	0.1463
18 14	1	0.31	1.5358
17 16	2	0.65	2.8033
17 15	12	8.68	1.2699
15 15	4	3.77	0.0140

$\chi^2 = 18.0234 \quad d.f. = 10 \quad 0.05 < P < 0.1$

由于 $P > 0.05$, 该基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg (HWE) 定律。

该位点的杂合度为 0.787, PIC 为 0.772

对 vWA 位点进行了 10 个 2 代家系 30 人和 1 个 4 代家系 12 人相关个体的基因分型分析, 孩子的谱带都分别来自父母, 完全符合孟德尔定律。

用 Chelex 100 处理的检材可以得到良好的扩增效果, 并且比酚 氯仿法更为简便, 快捷, 1 d 时间可完成整个实验过程。0.2 uL 血液, 1/20 根毛囊便可进行该位点分型。有些凶杀案现场的检材, 经 DNA 抽提, 用 VNTR 位点扩增不成功, 用此位点扩增可以得出良好的结果。

3 讨论

vWA 是 DNA 多态性系统中的一种, 其基因频率分布符合 HWE 遗传平衡定律。但在不同的人种间, vWA 基因频率的构成不同。在 11 种等位基因^[6]中, 11 次核心重复单位基因只在意大利人发现, 12 次核心重复单位基因只在非洲-加勒比人中发现, 且频率小于 0.01, 属稀有基因。我国人群基因多在 13~ 21 次之间重复, 13 14 和 21 次重复的基因频率较少。这些可能是由于人种差异所致。这些频率较少的基因可能助于人类种属的研究。

作者对 10 个二代家系和 1 个四代家系的 vWA 位点研究,未发现遗传突变(缺失和插入)现象,这与报道一致,表明 vWA 的遗传符合孟德尔遗传定律。

vWA 位点与其它 STR 位点相似,容易扩增,实验中,作者用经串联重复序列(VNTR)不能有效扩增的血痕检材,用 vWA 位点扩增,得出清晰可辨的结果,解决了限制性片段长度多态性(RFLP)和 VNTR 不能解决的个体识别问题。因其杂合度高, PIC 大,等位基因数较多,故比单个血型系统有更高的识别率。作者用 1 μ l 血液制成血纱布和 1 根毛发(含毛囊),用 Chelex 100 法抽提 DNA,1 μ l 血液能进行 5 次,1 根毛发能进行 20 次 PCR 扩增,表明该位点具有较高的灵敏度。vWA 的扩增不受其它种属 DNA 的影响,具有种属特异性。因此,具有重要的法医学应用价值。

由于单个遗传标记难以解决法医学个体识别的问题,多个遗传标记联合使用,要有各标记的频率资料,求得总概率才能进行。vWA 是一个新发现的有遗传多态性的位点,本文建立的中国人频率资料,增加了法医学个人识别的遗传标记。

目前,商品性 DNA Marker 和 Ladder 都不能作为理想的 vWA 等位基因分型参照物。vWA 位点相邻等位基因之间相差仅 4 bp,须要有较好的参照物才能行基因分型。本文制备 vWA 特异性 DNA Ladder,能较好地对 vWA 基因进行分型。其作为一标准,可以使不同条件下的电泳结果进行比较,并记录下来,增加了其实用性。

总之,vWA 位点因其扩增片段短,重复单位小,易于扩增,杂合度高, PIC 大,有较高的分辨率,在法医学上有较大的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Rand S, Puer C, Skowasch K. Population genetics and forensic efficiency data of 4 AM PFLPs. *Int. J. Leg. Med.* 1992, 104(2): 329
- 2 Drozd. M A, Archart L, Lincola PJ, *et al.* An investigation of the HUM vWA31A locus in British Caucasians. *Forensic Sci Int*, 1994, 69(2): 161
- 3 Fisher RA. Standard calculations for evaluating a blood group system. *Heredity*. 1995, 5: 95
- 4 David J, Mancuso, Elodee A, *et al.* Structure of the gene for human von Willebrand factor. *The journal of biological chemistry*. 1989, 264(33): 19514
- 5 Recommendations of the DNA Commission of the international society for forensic haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms. *Forensic Sci, Int*, 1992, 55(1): 1
- 6 侯一平, 苟清, 吴梅筠, 等. 人类短串联重复序列 vWA 基因座的群体遗传学研究, *中华医学遗传学杂志*, 1996, 13(2): 65

(1996-09-03 收稿 1996-11-08 修回)

RESEARCH OF THE vWA LOCUS IN 106 CHINESES

Wu Xianglin¹ Guo Jingyuan¹ Liang Shangyou² Wang Suibao² Liu Chao²

(1 Department of Forensic Serology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089;

2 The Institute of Guangzhou Criminal Science and Technology; Guangzhou, 510030)

The alleles and its frequencies of vWA locus which is in intron 40 of human von Willebrand Factor (vWF) gene were researched with polymerase chain reaction (PCR), polyacrylamide gels and silver staining, 106 unrelated Chinese, 10 of two-generation and 1 of four-generation families were examined. Eight alleles were observed with frequencies in the range 0.0047~0.316, 18 in 36 genotypes. The genotypes distribution meets Hardy-Weinberg equilibrium. The polymorphism is high in which the heterozygosity is 0.787, the polymorphic information content (PIC) is 0.772. The results show that the DNA typing about minimal DNA and degraded

samples can be solutioned with vWA locus which is useful in forensic medicine.

Subject headings alleles; polym erase chain reaction; polymorphism (genetics)

(上接第 43页)

STUDY OF THE CEA-cDNA RECOMBINANT VACCINIA VIRUS TO VACCINE ANIMALS

Yang Jie¹ Lai Huangwen² Luo Chaoquan¹ Yang Taichang² Xu Guoheng¹ Wang Xiaohuai²

(1 Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089;

2 Department of Medical Experiment, General Army Hospital, Guangzhou, 510060)

CEA cDNA-recombinant vaccinia virus, which had been constructed before, were used to vaccinate rabbits. In serum samples, high level of CEA and high titer of anti-CEA antibody were detected. Immunohistochemical method showed that intestine, liver, kidney and muscle could not express CEA. The vaccinated rabbits did not show toxic reactions. The results showed that it is safety to use vaccinia virus as a vector in vivo.

Subject headings vaccinia virus; carcinoembryonic antigen/therapeutic use; antibody formation /immunology; vaccination