

• 临床检验研究论著 •

基于 Sinofiler 检测系统的福建汉族群体遗传多态性研究

纪凤卿¹, 滕菁¹, 赖力², 韩丽丽², 沈晓丽², 浦晓东³

(1. 厦门中医院检验科, 福建厦门 351009; 2. 福建省立医院司法鉴定所, 福建福州 351004;
3. 福建省立医院心血管病研究所, 福建福州 351004)

摘要:目的 调查福建地区汉族群体 15 个 STR 基因座遗传多态性参数, 同时评估 Sinofiler 荧光标记复合扩增系统在福建地区汉族群体中的法医学应用价值。方法 应用 Sinofiler 荧光标记复合扩增系统检测 500 个福建地区汉族无关个体的 15 个 STR 基因座的多态性, 统计该群体各项遗传学参数。结果 15 个 STR 基因座的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) 定律。15 个 STR 遗传标记均具有高度多态性, 匹配概率为 0.033~0.140, 个体识别力为 0.860~0.967, 多态性信息含量为 0.70~0.85, 非父排除率 (PPE) 为 0.492~0.774, 纯合度为 0.110~0.261, 杂合度为 0.739~0.890。发现 18 个稀有等位基因。结论 Sinofiler 检测系统的 15 个 STR 基因座在福建地区汉族群体中具有较高的遗传多态性。

关键词:短串联重复序列; 遗传多态性; 等位基因频率; 福建

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2835-02

A study on genetic polymorphism of Han population in Fujian based on Sinofiler detection system

Ji Fengqin¹, Teng Qing¹, Lai Li², Han Lili², Shen Xiaoli², Pu Xiaodong³

(1. Department of Clinical Laboratory, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen, Fujian 351009, China;

2. Institute of Forensic Analysis, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 351004, China;

3. Guangdong Cardiovascular Institute, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 351004, China)

Abstract: **Objective** To investigate genetic polymorphism parameters of 15 STR loci of Han population in Fujian region and evaluate the forensic application value of Sinofiler fluorescent multiplex amplification system in them. **Methods** Sinofiler fluorescent multiplex amplification system was used to detect 15 STR loci polymorphism of 500 Han unrelated individuals in Fujian region. Their genetic parameters were calculated. **Results** 15 STR loci genotype distributions were found to conform with the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) laws, 15 STR genetic markers showed highly polymorphic, and their matching probabilities were 0.033—0.140, discrimination powers were 0.860—0.967, polymorphism information contents were 0.700—0.850, probabilities of paternity exclusion (PPE) were 0.492—0.774, homozygosity were 0.110—0.261 and heterozygosities were 0.739—0.890. 18 rare alleles were found. **Conclusion** 15 STR loci in Sinofiler system shows highly genetic polymorphism in Han population in Fujian region.

Key words: short tandem repeats; genetic polymorphism; allele frequency; Fujian

短串联重复序列 (short tandem repeats, STR) 又称微卫星 DNA, 是一种广泛存在于人类基因组中可遗传的、稳定的、具高度多态性的 DNA 序列^[1]。目前人类基因组内已发现了 7 000 个以上的 STR 位点, 平均每 15 kb 就存在一个 STR 基因座。STR 核心单位重复数目的变化, 构成了 STR 基因座的遗传多态性。STR 基因座因具有分布广泛、信息量大、基因片段短、扩增效率高、易检测、判型准确等诸多优点, 且具有高度多态性, 并遵循孟德尔共显性遗传规律, 已广泛应用于遗传连锁分析、肿瘤等疾病相关基因的定位、人类遗传学、法医学亲权鉴定及个体识别等研究领域。STR 基因座的等位基因频率和基因型的分布在不同地区、不同民族之间存在差异, 国内、外许多 DNA 实验室致力于 DNA 检测基因座的群体遗传学研究^[2-3], 以寻找适合于不同民族、不同群体个人识别和亲权鉴定的 STR 基因座。国内已有不少有关 Identifiler 检测系统与 PowerPlex 16 检测系统的 15 个基因座的遗传多态性报道, 但是针对中国人群基因特点而设计的 Sinofiler 检测系统的报道相对较少, 福建地区更是未见报道。故本研究针对 Sinofiler 检测系统的 15 个 STR 基因座在 500 个福建汉族无关个体的遗传多态性, 可进一步丰富福建地区, 乃至中国汉族群体遗传学信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集来自福建省立医院司法鉴定所 2012 年 1 月至 2013 年 3 月的日常案例, 共 500 个福建地区汉族无关个体。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂为 Sinofiler 荧光标记复合扩增系统试剂盒 (美国 ABI 公司)。主要仪器为 Eppendorf Master Gradient 型 PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司)、Applied Biosystems 3130 型遗传分析仪 (美国 ABI 公司)。

1.3 DNA 提取 采用 Chelex-100 快速提取法从血样中提取 DNA, 经 DNA 浓度测定, 符合标准后于 -20 ℃ 保存。

1.4 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) PCR 反应在 Eppendorf Master Gradient 型 PCR 扩增仪上进行, 反应体系和条件严格按说明书进行操作。

1.5 毛细管电泳 将 PCR 扩增产物与 DNA 分子量标准 550 及去离子甲酰胺混匀, 95 ℃ 变性 3 min, 立即冷却到 4 ℃, 在 Applied Biosystems 3130 遗传分析仪上进行毛细管电泳。

1.6 荧光检测分型 用基因扫描软件 (Data collection) 检测扩增片段的荧光标记, 以 LIZ-550 等为内标, 根据扩增的 STR 片段大小确定 STR 基因座, 以等位基因梯阶 (Ladder) 为标准,

用 Genemapper ID v3.1 基因分型软件确定 15 个常染色体 STR 基因座的等位基因型。

1.7 数据处理分析 运用 PowerMarker V3.1 软件及 Modified-powerstates 软件记录无关个体的基因型,对 15 个 STR 基因座进行 Hardy-Weinberg 平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)定律检验,计算各 STR 基因座等位基因数目及基因型、等位基因频率、杂合度、个体识别能力(Discrimination power, DP)、非父排除率(probabilities of paternity exclusion, PPE)、多态性信息量(polymorphism information content, PIC)。

2 结 果

福建汉族群体 Sinofiler 检测系统的 15 个 STR 基因座等位基因频率分布见附表 1、附表 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。所检测的 15 个 STR 遗传标记均具有高度多态性,匹配概率为 0.033~0.140,DP 为 0.860~0.967,PIC 为 0.70~0.85,PPE 为 0.492~0.774,纯合度为 0.110~0.261,杂合度为 0.739~0.890,15 个 STR 基因座的基因型频率分布均符合 HWE 定律,见表 1。福建汉族群体 Sinofiler 检测系统的 15 个 STR 基因座等位基因频率分布见表 1。福建汉族 500 个无关个体在 Sinofiler 检测系统的 15 个 STR 基因座发现的稀有等位基因数据见表 2。

表 1 福建地区汉族群体 15 个 STR 基因座的遗传学统计数据

基因座	匹配 概率	DP	PIC	PPE	杂合度	杂合度	P (HWE)
D8S1179	0.044	0.956	0.83	0.710	0.142	0.858	0.6065
CSF1PO	0.110	0.89	0.70	0.519	0.244	0.756	0.5451
D13S317	0.070	0.93	0.70	0.576	0.212	0.788	0.4925
D19S433	0.063	0.937	0.78	0.584	0.208	0.792	0.5014
D18S51	0.033	0.967	0.85	0.730	0.132	0.868	0.9570
D6S1043	0.036	0.964	0.85	0.774	0.110	0.890	0.1643
D21S11	0.059	0.941	0.79	0.635	0.181	0.819	0.7855
D3S1358	0.140	0.860	0.66	0.492	0.261	0.739	0.2447
D16S539	0.083	0.917	0.75	0.601	0.199	0.801	0.3324
vWA	0.074	0.926	0.76	0.573	0.214	0.786	0.5938
D5S818	0.083	0.917	0.74	0.534	0.236	0.764	0.4856
D12S391	0.045	0.955	0.82	0.647	0.174	0.826	0.2727
D7S820	0.105	0.895	0.71	0.544	0.230	0.770	0.2358
D2S1338	0.034	0.966	0.85	0.679	0.158	0.842	0.1186
FGA	0.038	0.962	0.84	0.679	0.158	0.842	0.4342

表 2 福建地区 500 个无关个体发现的稀有等位基因情况

基因座	D13S317	D12S391	D19S433	D18S51
稀有等位基因	7	8	12.5、18.2	8
基因座	D16S539	D7S820	D3S1358	D6S1043
稀有等位基因	16	9.1、9.2	20	20.3、22.3
基因座	FGA	FGA	FGA	FGA
稀有等位基因	16.20.2、21.2	22.2、23.2、24.2	25.2	—

—:此项目无数据。

3 讨 论

应用 STR 基因座作为亲子鉴定的优点包括:STR 基因座在人类基因组中分布广泛,基因片段长度差异较小,容易扩增,

各基因座的扩增条件相似,没有优先扩增的问题,适用复合扩增,具有程序简化、分型规范、自动化程度高、效率高的特点[6]。本研究对 15 个 STR 基因座进行基因分型,其重复单位为 3~5 bp,分型结果稳定,重复性好,符合理想 STR 基因座的条件。

Sinofiler 检测系统的 15 个 STR 基因座在福建汉族群体中的法医学应用评估显示,以往有关 STR 研究中认为,遗传标记的多态性及其应用价值一般用杂合度、PIC、DP 和 PPE 来衡量。杂合度能客观反映群体的遗传变异水平。杂合度值越大,表明群体内遗传差异越大,则多态性越高。PIC 直接反映一个遗传标记所能提供的遗传信息含量。当 PIC>0.5 时,遗传标记具有高度的多态性。PPE 和 DP 则反映了遗传标记在法医学个体识别及亲权鉴定中的能力。一般认为 DP>0.8、PPE>0.5 时,属于高度多态性遗传标记,具有较高的应用价值[7],这 15 个 STR 基因座在福建汉族群体中基因频率分布均符合 HWE 定律。Gin[8]认为 DP≥0.9、杂合度不低于 0.7 的基因座具有高鉴别力。按此标准,本研究选择的 15 个基因座除 CSF1PO(0.890)、D3S1358(0.860)、D7S820(0.895)外的 DP 均大于 0.9,杂合度均大于 0.7,PIC 均大于 0.7,故 15 个 STR 基因座具有较高法医学个人识别和亲子鉴定运用价值。通常情况下,检测这 15 个 STR 基因座已能够基本满足法医物证中个体识别和三联体亲子鉴定的检测要求。STR 基因座存在高度多态性,同时也存在高度的突变率。故在一些二联体和出现了突变可能的三联体案件中,需要检测更多的 STR 基因座。有关方面的研究进展还有待于学者们进一步探索。2010 年司法部出台的亲权鉴定技术规范中对常染色体 STR 基因座的选择有明确的要求[9],即,经过群体遗传学调查,多态性高,PPE 在 0.7 以上;经过 500 次以上减数分裂的家系调查,基因座的突变率在 0.002 以下。按此标准,Sinofiler 体系中 15 个 STR 基因座在福建汉族人群中的 PPE 只有 D8S1179、D18S51、D6S1043 基因座的 PPE 满足 0.7 以上,其余 13 个基因座并没达到此标准。对于此现象笔者认为有必要进一步扩大样本量寻求更确切的结果。同类的现象也发现于江苏地区[10]、重庆[11]、辽宁 [12]及新疆地区[13],由此初步推断,Sinofiler 检测系统的 15 个 STR 基因座并非完全符合福建汉族群体,甚至中国群体的个体识别和三联体亲子鉴定的检测要求,因此,学者有必要进一步寻求更符合该地区的高鉴别能力的 STR 基因座。

该研究所发现稀有等位基因的应用价值。当大量群体进行 STR 分型时,往往会发现一些新的等位基因,在实践中称这些等位基因为“Off-ladder(OL)”等位基因,即稀有等位基因[11]。本研究共发现稀有等位基因有 18 个。若要发现更多稀有等位基因,无疑需要进一步扩大群体数量。其类型有 2 种[12]:一是超出该基因座 Ladder 范围的稀有等位基因(第 1 类型);二是出现在 2 个等位基因之间的稀有等位基因(第 2 类型)。这些 OL 基因型可根据分型图谱,结合等位基因分型标准物 Ladder 的片段大小进行推算。在国内通用的一些进口试剂盒中,Ladder 主要也以欧美等西方人群遗传背景为基础制备,而 STR 基因座的核心序列,在不同种族的人群中分布差异较大。本研究中发现有些 OL 基因,如 D12S391 基因座的基因型 8,其频率为 0.004;D7S820 基因座的基因型 9.1,其频率为也 0.005。若是以 1/1 000 为标准,均不能归(下转第 2839 页)

HBeAg 蛋白表达缺失,临床表现为 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎^[7-8]。本研究结果显示,HBeAg 阴性的 HBV-DNA 阳性率最高达 28.17%,提示虽然 HBeAg 检测为阴性,但 HBV-DNA 检测仍可为阳性,此时,HBV 仍处于复制活跃状态;HBeAg 阴性并不能作为 HBV 复制终止的判断依据。而 HBV-DNA 定量检测可灵敏地反映 HBV 的复制水平,对评估抗病毒治疗的疗效有重要意义。但是,有研究指出部分病毒复制不活跃的乙型肝炎患者,其血清 HBV-DNA 测定结果为阴性^[9],提示单独检测 HBV 载量判断患者体内 HBV 复制状况具有一定的局限性,仍需要血清免疫标志物检测来反映机体对 HBV 的免疫状况^[10]。本研究结果显示,“乙肝两对半”模式与 HBV-DNA 阳性率有明显相关性。“乙肝两对半”检测与 HBV-DNA 水平测定应相互弥补才可准确反映患者体内 HBV 的复制状况。

综上所述,“乙肝两对半”模式与 HBV-DNA 有明显相关性,HBV-DNA 可反映 HBV 的感染及其活动水平,“乙肝两对半”测定可反映患者对 HBV 的免疫状况,二者相互弥补,可作为乙型肝炎早期诊断、疗效评估的可靠指标。

参考文献

- [1] 黄长武,谢礼琼,张明. 乙肝血清学标志物定量检测的临床意义[J]. 吉林医学,2010,31(18):2814-2815.
- [2] Chen CF, Lee WC, Yang HI, et al. Changes in serum levels of HBV DNA and alanine aminotransferase determine risk for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2011, 141(4): 1240-

1248.

- [3] Han GR, Cao MK, Zhao W, et al. A prospective and open-label study for the efficacy and safety of telbivudine in pregnancy for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2011, 55(6): 1215-1221.
- [4] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎诊断标准(2010 年版)[J]. 中西医结合肝病杂志, 2011, 21(2): 121-122.
- [5] Lang T, Lo C, Skinner N, et al. The hepatitis B e antigen(HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway[J]. J Hepatol, 2011, 55(4): 762-769.
- [6] Vivekanandan P, Daniel HD, Kannangai R, et al. Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA[J]. J Virol, 2010, 84(9): 4321-4329.
- [7] 温洪周, 黄震, 束振华, 等. 乙肝“两对半”检验模式变迁分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(4): 263-265.
- [8] 应晟, 杨美云. 对 138 例 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者血清学指标的探讨[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 418-419.
- [9] 郑春梅, 邓巧娟, 龙尧. HBeAg 阴性慢性乙型肝炎 HBV-DNA、ALT 水平与病理关系的探讨[J]. 山东医药, 2010, 50(16): 57-58.
- [10] 黄华泥, 张业久, 徐五星. HBV-DNA 定量检测结果与乙肝两对半模式相关性分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(31): 3459-3460.

(收稿日期:2013-05-20)

(上接第 2836 页)

为中国汉族人群的稀有等位基因。本研究还发现该检测系统 Ladder 中,很多等位基因在本地区的汉族人群中并未检出,如 FGA 基因座的一些等位基因(如 33.2、42.2、43.2、46.2、48.2、50.2)。此研究提示这些以欧美人群的资料制作的 Ladder 并非完全适合中国人群使用。稀有等位基因的出现,给检测结果的判读带来一定困难。而本研究认为稀有等位基因的存在及其确定,有助于提高各 STR 基因座的 DP、PPE 等,同时也提示各试剂公司应制备更加完善的、适合中国人群的 Ladder 以分析这些数据,尤其在试剂国产化的过程中更要注重这方面数据的收集,并将其放在 Ladder 中,使 DNA 个体识别和亲权鉴定的试剂更加符合中国人群。

参考文献

- [1] Edwards A, Civitello A, Hammond HA, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats[J]. Am J Hum Genet, 1991, 49(4): 746-756.
- [2] 薛天羽, 成建定, 张晋湘, 等. 华南地区汉族群体 15 个 STR 基因座的遗传多态性调查[J]. 中山大学学报, 2009, 30(3S): S45-50.
- [3] 陈伟. 重庆汉族、土家族群体 STR 基因座遗传多态性研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2005.
- [4] Khodjet-el-Khil H, Fadhlaoui-Zid K, Gusmão L, et al. Allele frequencies for 15 autosomal STR markers in the Libyan population[J]. Ann Hum Biol, 2012, 39(1): 80-83.
- [5] Gaibar M, Esteban E, Moral P, et al. STR genetic diversity in a Mediterranean population from the south of the Iberian Peninsula[J]. Ann Hum Biol, 2010, 37(2): 253-266.
- [6] 张红岩, 万加华, 高自华, 等. 青岛地区汉族群体 15 个 STR 基因

座的遗传多态性研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(7): 24-26.

- [7] Shriver MD, Jin L, Bocerwinkle E, et al. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci[J]. Mol Bio Evol, 1995, 12(5): 914-920.
- [8] Gill P. A new method of STR interpretation using inferential logic development of a criminal intelligence database[J]. IN J Leg Med, 1996, 109(1): 14-22.
- [9] 中华人民共和国司法部, 司法鉴定管理局. 亲权鉴定技术规范[S]. 2010-04-07.
- [10] 潘猛, 陈子庆, 丁小健, 等. 江苏汉族群体 15 个 STR 基因座遗传多态性分析[J]. 中国法医学杂志, 2012, 38(5): 561-564.
- [11] 李成涛, 郭宏, 赵珍敏, 等. 亲权鉴定中常用 STR 基因座的基因组学和遗传学分析[J]. 中国法医学杂志, 2008, 24(3): 214-218.
- [12] Crouse CA, Rogers S, Amiot E, et al. Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems[J]. J Forensic Sci, 1999, 44(1): 87-94.
- [13] 图尔逊·尼亚孜比力盖, 古力娜尔·库尔班, 张丽萍. 新疆维吾尔族 20 个 STR 基因座遗传多态性[J]. 中国法医学杂志, 2012, 27(2): 138-140.
- [14] 李成涛, 郭宏, 赵珍敏, 等. 亲权鉴定中常用 STR 基因座的基因组学和遗传学分析[J]. 中国法医学杂志, 2008, 24(3): 214-218.
- [15] Crouse CA, Rogers S, Amiot E, et al. Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems[J]. J Forensic Sci, 1999, 44(1): 87-94.

(收稿日期:2013-06-29)