

多色荧光 STR 新位点在诊断染色体数目中的应用研究

严晓玲^{1,2} 邹刚² 段涛^{2*}

(1. 复旦大学, 上海 200032; 2. 上海市第一妇婴保健院, 上海 200040)

【摘要】 目的 应用 13、18、21 号染色体上 18 个 STR 新位点 (D21S11L、D21S1409、D21S1809、D21S2052、D21S1994、D21S1446、D21S1435、D21S11 D21S1442、D21S1809、D21S1432、D13S800、D13S886、D13S796、D18S877、D18S851、D18S847、D18S847), 了解新位点在诊断染色体数目中的应用价值。方法 在 50 例正常人血清标本和 5 例 21-三体综合征患者血清标本中, 通过 PCR 扩增基因测序的方法, 用 SPSS12.0 软件直接计算新位点杂合度(H)和多肽信息含量(PIC), 并对 13、18、21 染色体数目进行诊断。结果 13 号染色体中 STR 位点 H 0.6-0.74, PIC 0.65-0.7。18 号染色体中 STR 位点 H 0.69-0.81, PIC 0.68-0.8。21 号染色体中 STR 位点 H 0.7-0.87, PIC 0.63-0.84。21、13、18 染色体, 二倍体检出率为 100%。在 5 例 21-三体阳性标本中, 三倍体检出率为 100%。结论 STR 新位点杂合度和信息含量高, 可在诊断 21、13、18 染色体数目中被应用。

【关键词】 荧光定量酶联聚合反应; 短串联重复序列; 快速产前诊断法

Diagnostic value of 18 new STR markers on chromosome number by QF-PCR

Yan Xiao-ling^{1,2}, Zou Gang², Duan Tao^{2*}

(1. Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai First Maternity and infant hospital, shanghai 200040, China)

【Abstract】 **Objective** To assess the diagnostic value of 18 new short tandem repeat markers (D21S11L、D21S1409、D21S1809、D21S2052、D21S1994、D21S1446、D21S1435、D21S11 D21S1442、D21S1809、D21S1432、D13S800、D13S886、D13S796、D18S877、D18S851、D18S847、D18S847) by determining the euploidy characteristic of chromosome 13, 18 and 21. **Methods** Eighteen new STR markers on 13, 18, 21 chromosome were amplified by QF-PCR with a touch-down procedure in 50 normal individual human samples and 5 Down's syndrome patients. Heterozygosity (H) and polymorphism information content (PIC) of each marker were calculated. **Results** Heterozygosity were H 0.7-0.87, PIC 0.63-0.84 on chromosome 21, and H 0.6-0.74, PIC 0.65-0.7 on chromosome 13 and H 0.69-0.81, PIC 0.68-0.8 on chromosome 18 as well. All results were as same as cytogenetic result. **Conclusion** The new 18 STR markers can be applied in the diagnosis of number of chromosome.

【Key words】 Polymorphism Chain Reaction (PCR); Short Tandem Repeat (STR); Rapid Antenatal Diagnosis (RAD).

人类的遗传图谱绘制需要应用多态性标志。首先出现的多态性标志是 20 世纪 80 年代中期最早应用的限制性酶切片长度多态性 (RFLP)。此类标

记数量较少, 多态性信息含量也较低。80 年代后发展了短串联重复序列 (Short Tandem Repeat, STR), 又称微卫星 (microsatellite, MS), 其染色体分布和信息含量明显优于 RFLP。近年又有第三代多态性标志 SNP 被大量发现, 成为研究基因组多样

基金项目: 中华医学会分子生物学临床应用研究专项 CAMB012010

* 通信作者: 段涛. Email: tduan@yahoo.com

性和识别、定义疾病相关基因的一种手段。

STR 具有高度多态性、杂合度和多态信息量,主要源于核心序列重复次数个体间的差异,这种差异在基因传递过程中一般遵循孟德尔共显性遗传规律,均匀地分布于人类基因组。本研究在 50 例无关个体中检测 13、18、21 号三条染色体上 18 个 str 位点的多态性和杂合度,并在 5 例 21-三体综合征患者的外周血中进行检测,用以了解是否可在染色体数目异常的检测中被使用。

1 材料和方法

1.1 对象来源 从 2008~2009 年在本院就诊的患者,抽取 50 例正常人抗凝全血样本和 5 例 21-三体综合征患者的外周血抗凝全血标本。

1.2 试剂和设备

1.2.1 试剂 QIAamp DNA Blood Mini Kit 购自瑞士 Qiagen 公司;荧光素 (FAM、HEX、TAMRA)

和金牌 Taq 酶购自美国 ABI 公司;引物合成与荧光素标记由上海生工生物技术有限公司完成;PCR 反应缓冲液、dNTP、Mg²⁺ 购自瑞士 Qiagen 公司。

1.2.2 设备 美国 ABI 公司 2700 型扩增仪、3130 型遗传分析,德国 EPPENDORF 公司的微量移液器、高速离心机、ELGA 公司纯水仪、德国 Heraeus Biofuge Pico 离心机。

1.2.3 引物设计和合成 在 STR 基因座的选择上,选择基因座首先符合 Hardy-Weinberg 平衡,多态信息含量大于 0.5,杂合度在 0.6 以上的基因座^[1]。串联重复单位为四或五核苷酸,确定的基因座见下表 1。UCSC(<http://genome.ucsc.edu/>)上搜基因原序列。在引物设计过程中主要考虑以下影响因素:①引物长度在 19~28 bp 之间;②各基因引物 T_m 值尽量一致;③ PCR 产物片段长度在 400 次/分以内。使用 primer premier 5.0 设计 PCR 引物。

表 1 各 STR 位点及其引物信息

STR 位点	PCR 产物长度	荧光标记	正向引物	反向引物
D13S800	295-319	blue	AGGGATCTTCAGAGAAACAGG	TGACACTATCAGCTCTCTGGC
D13S886	300-315	black	CCCAAACCTGTTTATGTCCA	CCTCCACTGTAAGTCTCCCA
D13S796	152-168	green	CATGGATGCAGAATTCACAG	TCATCTCCCCTGTTTGGTAGC
D18S877	117-137	blue	GATGATAGAGATGGCACATGA	TCTTCATACATGCTTTATCATGC
D18S851	253-254	green	CTGTCTCTAGGCTCATTTAGC	TTATGAAGCAGTGATGCCAA
D18S847	212-232	green	TTAAATTTGACTCTGAGAGTTCTCC	CAGATGGCCTGTAGTGGAAC
D18S819	253	black	ACCACAGTTACTAAGATGTAA	GCCTCCAGAAAAAATTTCCA
D21S11L	202-260	blue	ATATGTGAGTCAATTCCCAAG	TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG
D21S1409	173	blue	GGAGGGGAATACATTTGTG	TTGCCTCTGAATATCCCTAT
D21S1809	207-208	black	TACCCAAGGTGACAGACACC	GAGCAGGTTGTCCTACCTCA
D21S2052	120	black	GCACCCTTTATACTTGGGGT	TAGTACTCTACCATCCATCTATCCC
D21S1994	236-264	blue	TTTAAATCACAGAAGGTGTAGGC	CACCTTTGTTGCCAAGAGTC
D21S1446	209-223	blue	ATGTACGATACGTAATACTTGACAA	GTCCCAAAGGACCTGCTC
D21S1435	181-205	green	CCCTCTCAATTGTTGTCTACC	GCAAGAGATTTCAAGTGCCAT
D21S11	202-260	green	ATATGTGAGTCAATTCCCAAG	TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG
D21S1442	237-269	black	CTCCTCCCCACTGCAGAC	TCTCCAGAATCACATGAGCC
D21S1809	207-208	black	TACCCAAGGTGACAGACACC	GAGCAGGTTGTCCTACCTCA
D21S1432	127-155	black	CTTAGAGGGACAGAATAATAGGC	AGCCTATTGTGGGTTTGTGA

注:引物交由公司合成,经 PAGE 纯化(polyacrylamide gel electrophoresis purification)

1.3 试验方法

1.3.1 PCR 反应体系 反应体系为 5 μ L: 早先加入板中的 10 ng DNA 模板(即 2.5 μ L 模板), 0.25 μ M 引物(正反引物各 0.05 μ L), 25 units DNA 聚合酶(0.05 μ L), 2mM MgCl₂(0.3 μ L)及 200 μ M dNTP(0.3 μ L)。热循环条件选用退火温度逐渐降

低的程序(touchdown),如图 1:

- ① 94 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟;
- ② 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒;
- ③ 64 $^{\circ}$ C 退火 30 秒;
- ④ 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒;
- ⑤ 返回② 44 个循环,退火温度依次下降 0.5 $^{\circ}$ C

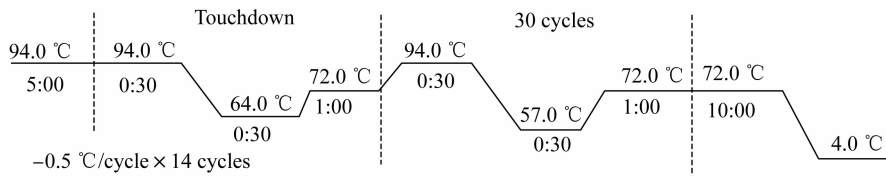


图 1 热循环条件选用退火温度逐渐降低的程序(touchdown)

注:PCR 进行过程中为减少反应体系的蒸发,反应前预设热盖过程,顶盖温度设为 101 °C。

至 57 °C 后维持;

⑥ 72 °C 延伸 10 分钟。

1.3.2 荧光素的选择 由于不同的荧光素在光谱上存在一定的干扰,荧光素的激发波长越接近,干扰会越强烈,不同的荧光素标记方式会产生不同的分子构象,从而影响分子的电泳迁移率和激光对荧光素的激发^[2]。同时参考 Micel B 等的文献报道,选择 FAM、HEX、TAMRA 进行试验。

1.3.3 毛细管电泳和测序 使用 ABI3130 基因测序仪,使用 3130 数据收集软件的样品列表,对样本设置不同名字和编码,确定内标,按颜色信息和解释将数据纳入表格中,建立荧光标记,用 36 cm 毛细管运行模式处理样本,关键参数是聚合物和毛细管阵列的设置。经 Gene Mapper ID 3.2 软件分析处理。

其具体步骤为:

- ① 加入 6.85 μL GS500 LIZ 内标,与 250 μL Hi-Di 甲酰胺混匀后,并取出 15 μL 加入相应的 96 孔板中;
- ② 加入 3 μL 待测 PCR 产物,混匀,密封 96 孔板;
- ③ 将 96 孔板置于 PCR 仪上 94 °C 保持 3 分钟,降温到 4 °C 保持 30 秒;
- ④ 1 000 转离心 10 秒后放入测序仪中。

1.4 统计学分析 用 SPSS12.0 软件使用直接计算法,计算每个等位基因出现的频数与频率以及每个微卫星位点各杂合子峰面积比值的平均值和其标准差。

峰面积的计算公式根据色谱峰面积 A 的测量方法:

峰面积 $A = 1.065 h \times w_{1/2}$ (h 为荧光峰的高度, w 为峰宽)

杂合度的计算公式^[3]:

$H = N[1 - \sum p_i^2] / (N - 1)$ (p_i 为第 i 个等位基因的频率, N 为样本数)

PIC^[4] 的计算公式:

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

P_i、P_j 分别为第 i、j 个等位基因的频率。

2 结果

2.1 50 例正常无关二倍体中,根据染色体的不同,STR 位点的杂合度和多态信息含量(见表 2)。21 号染色体选取 11 个 STR 位点 (D21S11L、D21S1409、D21S1809、D21S2052、D21S1994、D21S1446、D21S1435、D21S11 D21S1442、D21S1809、D21S1432),其中 D21S11 的杂合度和多态信息含量最高,遗传多态性较佳。D21S1809 遗传多态性较差。13 号染色体选取 3 个 STR 位点 (D13S800、D13S886、D13S796),其中 D13S886 遗传多态性较好、D13S800 遗传多态性较差。18 号染色体选取 4 个 STR 位点 (D18S877、D18S851、D18S847、D18S847),其中 D18S819 遗传多态性较好、D18S851 遗传多态性较差。

2.2 50 例无关人群的外周血经过染色体核型分析证实为正常二倍体,通过对 13、18、21 染色体 STR 位点的检测,二倍体检出率为 100%。

2.3 5 例 21-三体综合征患者的外周血抗凝血标本,检出率为 100%。5 例样本都呈现双峰面积比例 1:2 或 2:1 或 1:1:1。图 2 为 1 例 21-三体综合征患者的 STR 位点扩增产物图:

3 讨论

基因组扫描是目前定位疾病基因最常用的方法,在进行基因组扫描时,由于所选择的多态位点间距较大,为获得足够信息采用多态信息量高,分型容易的多态位点是连锁分析成功的关键,而 STR 的高度多态性和高频性的特点,使 STR 成为目前应用最

表 2 STR 位点的杂合度和多态信息含量

str 位点	染色体位置	杂合度	多态信息含量	杂合子等位基因峰面积比值(均数)
D13S800	13q22.1	0.62	0.65	1.082±0.018
D13S886	13q22	0.74	0.7	1.156±0.106
D13S796	13q33.3	0.66	0.67	1.285±0.165
D18S877	18q12.1	0.78	0.77	1.264±0.216
D18S851	18q12.33	0.69	0.68	1.097±0.163
D18S847	18q12.1	0.78	0.76	1.059±0.145
D18S819	18q11.1	0.81	0.8	1.204±0.129
D21S11L	21q12	0.7	0.71	0.965±0.088
D21S1409	21q11.2	0.72	0.68	1.158±0.107
D21S1809	21q22.2	0.69	0.67	1.782±0.163
D21S2052	21q21.3	0.76	0.79	1.300±0.126
D21S1994	21q21.1	0.85	0.83	1.149±0.112
D21S1446	21q22.3	0.79	0.77	1.110±0.211
D21S1435	21q21.3	0.75	0.71	1.183±0.126
D21S11	21q12	0.87	0.84	1.281±0.207
D21S1442	21q21.3	0.79	0.77	1.189±0.285
D21S1809	21q22.2	0.67	0.62	1.109±0.176
D21S1432	21q21.1	0.77	0.65	1.184±0.205

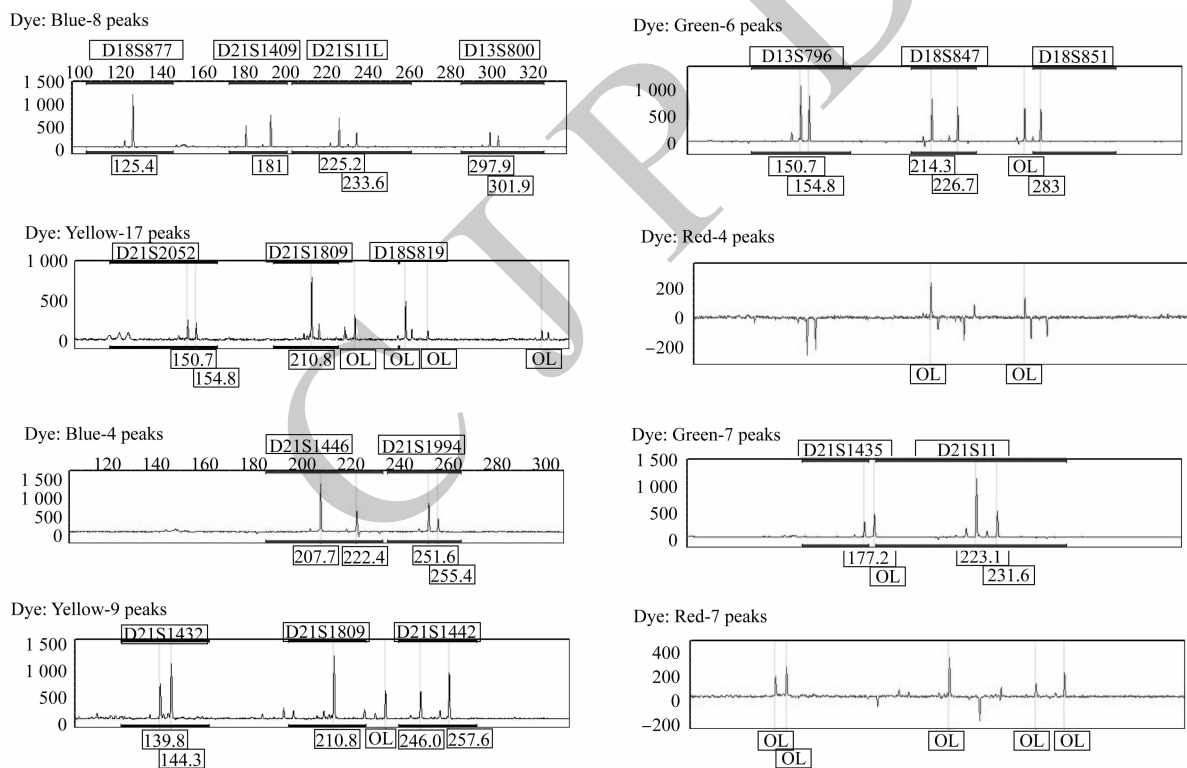


图 2 1 例 21-三体综合征患者的 STR 位点扩增产物图

广的人类遗传标志。STR 绝大多数位于非编码区，不转录、不编码蛋白质和 RNA，不受选择压力的影响，其 2 条带的扩增产量相等，不存在优先扩增和漏带现象。杂合度 (heterozygosity) 是指随机选择的某个个体在某一标记位点上同时具有 2 个不同的等

位基因的可能性。PIC (polymorphism information content) 是多态信息含量，是衡量 DNA 位点信息度 (即利用该位点去对兴趣基因或者另一位点进行连锁分析时可以获得的信息量，从而判断该位点与其他基因或位点之间的连锁关系) 的一个参数。PIC

主要源于核心序列重复次数个体间的差异,这种差异在基因传递过程中一般遵循孟德尔共显性遗传规律,均匀地分布于人类基因组^[5]。

STR 遗传多态性可用杂合度和多态信息量等指标来衡量,多态信息量大于 0.5,表明遗传标记可提供高度的遗传信息^[6]。多态位点的基因频率、杂合度、多态信息含量等参数因样本来源、群体不同而有差异,本研究分析的 18 个位点均选自在白种人群中多态性较好的多态位点^[7]。通过对 50 例正常无关亚洲人群外周血来检测 STR 的实际杂合度、多态信息量的检测,新位点的多态遗传信息含量为 0.62~0.87,均>0.5,表明本实验所选取的微卫星标记基本上可提供高度的遗传信息。结果显示实际的杂合度与文献和基因库中所记载的杂合度相似,但实际检测值较低可能与样本量较小有关。另外我们的预计值多来自西方文献报道,可能与我们汉族人群特别是上海地区人群存在一定差异。

在实际操作中会出现同一座位的等位基因会由于优先扩增而导致等位基因脱失(ADO),即在 PCR 反应起始时,一个正常的二倍体细胞的 2 个等位基因中的一个会被优先扩增,并随着反应地进行被优先扩增的产物也被用作模板过表达^[8],所以在结果中显示的等位基因的峰面积比值并不是完全的 1:1,比值范围在 0.9~1.28 之间,与文献报道^[9]的正常杂合二倍体每一检测位点双峰面积比值一般在 0.8 到 1.4 的范围内相符合。

高雅等曾以中国 30 个不同民族的 9 个常染色体 STR 基因座的群体遗传研究数据资料为对象,发现在一定范围之内,样本量的大小与所观测到的不同基因座等位基因检出数量之间存在正相关关系。当超过一定范围时,样本量的继续增加不再明显影响等位基因的检出数量。多态性低的基因座需要的样本量较小,50 个样本量即可以检测出常见等位基因。

在使用单管多重 QF-PCR 体系中,我们使用新位点对 5 例 21-三体综合征患者外周血进行检测,没

用假阳性和假阴性,通过 11 个位点的结合检测,检出率高达 100%。杜鹃^[10]等曾采用 5 个位点检测 21-三体,证实使用 4 个以上位点结合检出 21-三体才可达 100%。因此,上述新位点可被用于 21-三体的诊断。

参考文献

- [1] 高雅,李生斌. STR 遗传多态性研究样本量对等位基因检出数量的影响[J]. 遗传,2008,30(3):313-320.
- [2] 李莉,陈光辉,李成涛,等. 多色荧光 STR 检测试剂盒的研制与验证[J]. 法医学杂志,2006,22(2):111-115.
- [3] Hearne CM, Gho S, Todd JA. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits[J]. Trends Genet,1992,8(8):288-294.
- [4] Nei M, Roychoudhury AK. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance[J]. Genetics, 1974,76(2):379-390.
- [5] Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymorphism chain reaction[J]. Am J Hum Genet 1989,44(3):388-396.
- [6] 陈艳炯,陈峰,辛娜,等. 中国甘肃裕固族 X-STR 遗传多态性及其应用研究[J]. 遗传,2008,30(9):1143-1152.
- [7] Vincent MA, Liu JJ, James AK, et al. A Comprehensive Linkage Analysis of Chromosome 21q22 Supports Prior Evidence for a Putative Bipolar Affective Disorder Locus[J]. Am J Hum Genet.1999,64:210 - 217.
- [8] Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J, et al. Rapid detection of aneuploidies by microsatellites quantitative fluorescent polymerase chain reaction[J]. Prenat Diag, 1997, 17(13):1299-1311.
- [9] Gang Zou, Tony Duan, et al. Quantitative fluorescent polymerase chain reaction to detect chromosomal anomalies in spontaneous abortion[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2008,103(3):237-240.
- [10] 杜鹃,许娟娟,郑晨光等. STR 新位点产前诊断 21、13、18 三体综合征[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,18(6)31-34

编辑:刘邓浩

(收稿日期:2011-05-21)