

广东汉族人群 Penta D 基因座 off-ladder 稀有等位基因分析

兰菲菲 周伟宁 陈延冰 丁红珂*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 分析广东汉族人群亲子鉴定中 Penta D 基因座出现在等位基因分型标准物(allelic ladder)之外(off-ladder, OL)的现象并计算/命名基因分型。**方法** 采用 Chelex-100 法提取样本 DNA, 用 PowerPlex®21 体系进行 PCR 扩增后, 毛细管电泳分析 STR 基因座的等位基因分型。**结果** 双亲三联体鉴定的父亲和孩子在 Penta D 基因座检测出 OL 等位基因, 经过计算得出该 OL 等位基因的基因分型为 21, 不在 Penta D 基因座 Allelic Ladder 范围之内, 是新的稀有等位基因。**结论** Penta D 基因座的 OL 稀有等位基因 21 在广东汉族人群中分布, 稀有等位基因的鉴定及分型计算/命名对于提高该基因座在亲权鉴定和个体识别中的能力具有重要科学意义。

【关键词】 亲子鉴定; Penta D 基因座; off-ladder 等位基因

【中图分类号】 **【文献标识码】** A

Analysis of off-ladder rare allele in Penta D locus in Guangdong Han population

Lan Feifei, Zhou Weining, Chen Yanbing, Ding Hongke

(Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511440, China)

Corresponding author: Ding Hongke, E-mail: 9200215@qq.com

【Abstract】 Objective To analysis the outside allelic ladder (OL) phenomenon of Penta D locus and calculate/name its genotyping in paternity testing of Guangdong Han population. **Methods** Sample DNA was extracted using Chelex-100 method, genotype of STR loci were determined and analyzed by PowerPlex®21 multiplex fluorescent PCR amplification and capillary electrophoresis. **Results** Father and child were detected OL allele in the Penta D locus in a two-parent triad. After calculation, the genotype of the OL allele was 21, which was not in the range of Allelic Ladder of Penta D locus as a new rare allele. **Conclusion** The OL rare allele 21 of Penta D locus was distributed in Guangdong Han population. The identification and typing calculation/nomenclature of rare alleles have important scientific significance for improving the ability of this locus in paternity testing and individual identification.

【Key words】 Paternity testing; Penta D locus; Off-ladder allele

短串联重复序列(short tandem repeat, STR)是由 2~8 个碱基组成核心序列的一类 DNA 遗传标记, 遵循孟德尔遗传定律^[1]。STR 基因座核心序列的重复数目在不同个体中存在差异, 具有高度的遗传多态性, STR 基因座的等位基因分型作为第二

代法医 DNA 分型技术广泛应用于法医遗传学的亲权鉴定和个体识别^[2]。目前应用于法医遗传学的检测试剂盒中等位基因分型标准物(allelic ladder)中包含了试剂盒所使用的每个 STR 基因座的人群中常见等位基因分型^[3]。随着 STR 基因座遗传标记在法医遗传学应用的显著增加及不同种族和民族等位基因分型的差异, 越来越多的等位基因分型标准

物之外的(off-ladder, OL)等位基因被发现^[4]。我们应用 Powerplex[®]21 体系检测广东地区汉族人群中 Penta D 基因座的 OL 等位基因现象,并计算/命名 OL 的等位基因分型,正确判读鉴定结果,为广东地区汉族人群 Penta D 基因座 OL 等位基因分型提供参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象 亲子鉴定家系来自广东省妇幼保健院 2016~2018 年受理的办理入户鉴定案件和个人了解的案件,筛选广东籍汉族人群列为研究对象。研究家系为生母、孩子和被检父的三联体亲子鉴定或者父子/女、母子/女的二联体亲子鉴定,签署知情同意后采集血液样本。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 血液样本按照 Chelex-100 法提取 DNA。在 1.5ml 的离心管中加入 1ml 纯净水,取 2 μ l 全血加入,剧烈震荡后室温放置 30 min。12000 转/分室温离心 3 min,弃上清后收集血细胞沉淀。加 200 μ l 5% 的 Chelex-100 混合液,剧烈震荡后瞬时离心,56 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。100 $^{\circ}$ C 煮沸 8min,13000 转/分室温离心 3min,上清 DNA 保存于 4 $^{\circ}$ C

备用。

1.2.2 PCR 扩增 取 DNA 1 μ l,按照 Powerplex[®]21 体系(美国 Promega 公司)的说明书进行 20 个常染色体和 1 个性染色体 STR 基因座的 PCR 复合扩增。

1.2.3 STR 基因座的等位基因分型 取 PCR 扩增产物 1 μ l,每个孔加入 8.5 μ l 甲酰胺及 0.5 μ l 分子量内标,同时设置 allelic ladder、阴阳性对照孔,充分混合后瞬时离心,95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后迅速置于冰上冷却 5 min。用 3500XL 基因分析仪(美国 AB 公司)进行毛细管电泳,使用 GeneMapper[®]ID-X 软件分析,获得 DNA 的 STR 基因座等位基因分型。

1.2.4 STR 基因座 OL (off-ladder)稀有等位基因的计算/命名 以 ladder 作为分型标准,结合 OL 等位基因的片段大小和漂移率进行计算命名^[5]。

2 结果

2.1 Penta D 基因座 STR 基因座 OL 等位基因分型结果 利用 PowerPlex[®]21 体系在三联体亲子鉴定案件的父亲和孩子中检测发现 Penta D 基因座存在 OL 等位基因(图 1),父亲的等位基因分型为 10, OL;孩子的等位基因分型为 9, OL;母亲的等位基因分型为 9。

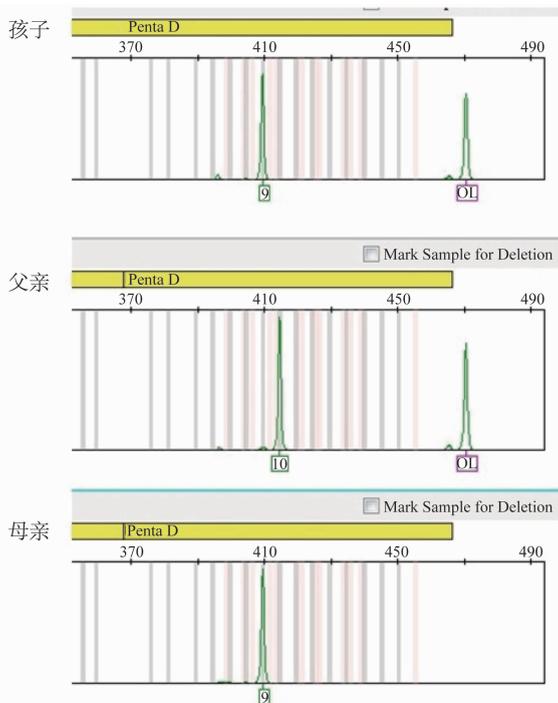


图 1 Powerplex[®]21 体系检测 Penta D 基因座 OL 等位基因分型

2.2 Penta D 基因座 off-ladder 等位基因的分型计算 根据 OL 等位基因的大小,结合基因分型标准物(allelic ladder)等位基因的大小,计算基因座的漂移率,进而计算 OL 等位基因的大小后进行分型命名。

3 讨论

亲权鉴定的实践和研究中,不同 STR 基因座的 off-ladder 等位基因现象国内外有报道,例如 D13S317、D19S433、D21S11、D16S539、D3S1358、TPOX、TH01、D7S820 和 FGA 基因座等^[5,6]。OL 等位基因一般分为两种类型:一种是超出了该基因座基因分型标准物(allelic ladder)的范围,在范围之外;另外一种是没有超出基因座的 allelic ladder 范围,在两个等位基因之间^[7]。Powerplex[®]21 体系是由 Promega 公司研发生产的遗传学检测系统,广泛应用于人群遗传多态性和法医物证检测研究,能够同时检测 20 个常染色体和 1 个性染色体 STR 基因座,但在国内没有应用该系统进行广东地区汉族人群 Penta D 基因座 OL 稀有等位基因的研究报道。本文发现的 OL 等位基因超出了 Powerplex[®]21 体系中 Penta D 基因座 Allelic Ladder 的最大范围 17,属于第一种类型。Penta D 基因座位于人类 21 号染色体短臂(21q22.3),是核心序列为 5 碱基(AAAGA)的重复序列,Powerplex[®]21 体系中采用 JOE 荧光标记,基因分型标准物(Allelic Ladder)的片段长度范围为 377~450bp,Penta D 基因座的等位基因分型标准物中核心序列重复次数范围为 2.2、3.2、5-17。该基因座的遗传多态性较高,有文献报道在 Penta D 基因座发现 OL 和稀有等位基因 11.2、18、19 等^[8],这些 OL 等位基因对于提高该基因座的个体识别能力具有重要意义。

遇到 STR 基因座出现 OL 等位基因时,根据 Allelic Ladder 的分型标准和漂移率计算命名,OL 等位基因计算命名一般有两种情况:过滤漂移率之后,如果 OL 峰的片段长度变化是 Allelic Ladder 相

对应峰的整数倍(X 倍),则计算为 Allelic Ladder 相对应峰大小 $\pm X$;如果 OL 峰的片段长度变化不是 Allelic Ladder 相对应峰的整数倍,只是增加或者减少几个碱基(bp),着计算为 Allelic Ladder 相对应峰大小. $X(X$ 为相差的碱基数)(例如相差 1 个碱基或者 2 个碱基分别为 10.1、10.2)。本研究中,孩子 Penta D 基因座的 OL 等位基因,过滤掉漂移率(-0.09 bp)之后,OL 等位基因(470.37 bp)比 Allelic Ladder 中 Penta D 基因座的等位基因 17(450.27 bp)大 20.19 bp,而 Penta D 基因座为五核苷酸的重复,即 OL 等位基因比 Allelic Ladder 中 Penta D 基因座的等位基因 17 大约 4 个重复序列($20.19/5 = 4.038 \approx 4$),因此,OL 等位基因命名为 21(图 2)。

父亲 Penta D 基因座的 OL 等位基因,过滤掉漂移率(0.03 bp)之后,OL 等位基因(470.47 bp)比 Allelic Ladder 中 Penta D 基因座的等位基因 17(450.27 bp)大 20.17 bp,而 Penta D 基因座为五核苷酸的重复,即 OL 等位基因比 Allelic Ladder 中 Penta D 基因座的等位基因 17 大约 4 个重复序列($20.17/5 = 4.034 \approx 4$),因此,OL 等位基因命名为 21(图 2)。本研究在广东地区汉族人群中发现 Penta D 基因座存在 OL 等位基因 21,该等位基因同时属于稀有等位基因,而且孩子与父亲同时存在 OL 等位基因,即孩子的 OL 等位基因 21 是来源于父亲的遗传,这种在亲代和子代中遗传的稀有等位基因发生频率非常低,在人群中的频率很小,因此,会对亲子鉴定中父权指数(PI)值和累积父权指数(CPI)值计算有很大的影响,进而影响亲子鉴定的鉴定结论。鉴于 OL 稀有等位基因非常小的人群频率,在计算 OL 基因座的父权指数时可以考虑使用该 STR 基因座的最小等位基因频率。本研究发现的 OL 稀有等位基因,可以作为 Powerplex[®]21 体系中 Allelic Ladder 等位基因的补充,对于提高该检测体系及 Penta D 基因座的检测效能提供一定的应用价值。

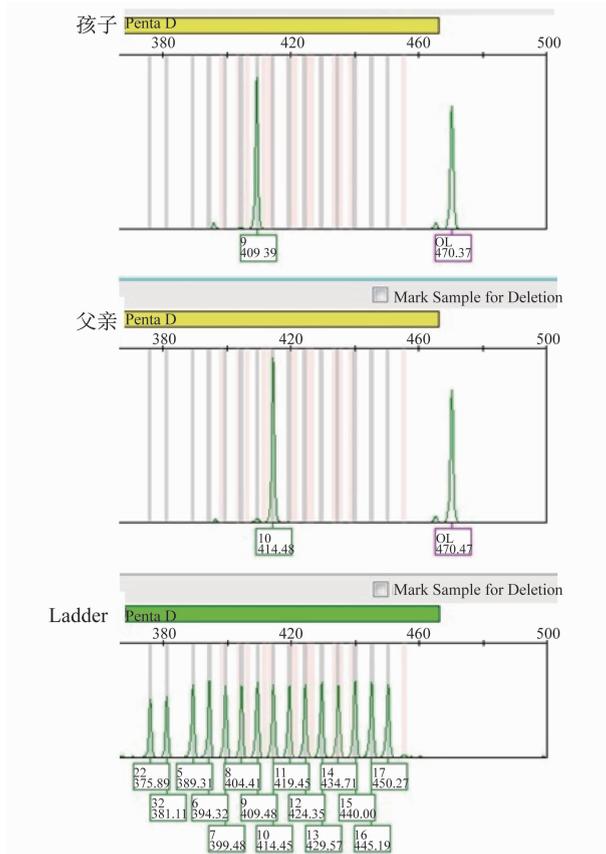


图 2 Penta D 基因座 OL 等位基因大小

参 考 文 献

[1] Lygo JE, Johnson PE, Holdaway DJ, et al. The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework [J]. *Int J Legal Med*, 1994, 107:77.

[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(医学科学版)*, 2009, A1:1672-3554.

[3] 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]. *法医学杂志*, 2008, 24(3):214-220.

[4] 庾蕾, 李建金, 伍新尧, 等. 三个短串联重复序列位点的等位基因遗传变异研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(4):308-312.

[5] 欧阳曙明, 杨旭, 申琴, 等. 应用 Identifiler™ 系统对湖南人群中 OL 等位基因的观察与分析[J]. *生命科学研究*, 2013, 17(3):193-195.

[6] Park H, Ra EK, Park SS, et al. Detection of very large off-ladder alleles at the Penta E locus in a 15 locus autosomal STR database of 199 Korean individuals [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, 6(6):189-191.

[7] 刘秋玲, 梁艳芳, 吕德坚, 等. Powerplex 16 system 在中国人群中 OL 等位基因的研究 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2009, 30(3s):29-31.

[8] 曾艳红, 孙宏钰, 童大跃, 等. PowerPlex™16 体系在中国人群中罕见等位基因及其类型 [J]. *中国法医学杂志*, 2004, 19(2):78-83.

(收稿日期:2019-11-19)

编辑:宋文颖