

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.007

重庆地区 5 个 miniSTR 基因座群体遗传学研究

何寨寨, 万立华, 姚 岚, 唐祥勇, 贾 竞

(重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:建立荧光标记 D1S1676、D2S441、D3S4529、D22S1045、amelogenin 5 个 mini 短串联重复序列(mini short tandem repeat, miniSTR)基因座复合扩增体系,并对重庆地区汉族 200 名无关个体此 5 个基因座的遗传多态性进行研究分析。方法:分别用 5'TAMRA 标记 D1S1676 引物,5'6-FAM 标记 D2S441 和 D3S4529 引物,5'HEX 标记 D22S1045 引物,5'TET 标记 amelogenin 引物,构建及优化符合扩增体系,运用 3130 基因分析仪检测并收集电泳结果数据,通过 Gene Mapper v3.2.1 软件计算扩增产物片段相对大小以及进行样本基因型分型。结果:5 个 miniSTR 基因座荧光标记复合扩增体系每个位点都获得清晰的分型结果。对重庆地区汉族无关个体 200 份血样进行分型,5 个基因座分别检出 9、9、8、9、2 个等位基因和 103 种基因型,其基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。其中 D1S1676、D2S441、D3S4529、D22S1045 基因座在重庆汉族群体的杂合度(Heterozygosity, Ho)分别依次为 0.710、0.765、0.730、0.710;多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)分别依次为:0.660 041、0.798 329、0.753 177、0.797 888;累计非父排除率(Exclusion probability of paternity, EP)为 0.924 800 4,累计个人识别率为 0.999 955 1。结论:荧光标记 D1S1676、D2S441、D3S4529、D22S1045、amelogenin 5 个 miniSTR 基因座复合扩增体系,每个基因座可获得准确分型;重庆汉族群体该 5 个基因座的遗传学数据,可作为群体遗传学和法医学研究与应用的基础资料。

【关键词】法医物证学;miniSTR;复合扩增;遗传多态性

【中国图书分类法分类号】R89

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-10

Block population genetics research of five miniSTR loci in Chongqing

HE Zhaizhai, WAN Lihua, YAO Lan, TANG Xiangyong, JIA Jing

(Department Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To develop a fluorescent labeled multiplex amplification system which is consisted of 5 mini short tandem repeat(miniSTR) loci(D1S1676, D2S441, D3S4529, D22S1045 and amelogenin) and to analyze the genetic polymorphism of 200 unrelated Han people in Chongqing. Methods: Primer of D1S1676 was labeled with 5'TAMRA, D2S441 and D3S4529 were labeled with 5'6-FAM, D22S1045 was labeled with 5'HEX and amelogenin was labeled with 5'TET and the multiplex amplification system was established. Data were collected by the 3130 gene analyzer, the length of the amplification fragments was calculated and the genotyping was made using Gene Mapper v3.2.1 software. Results: Every locus of the 5 fluorescent labeled miniSTR multiplex amplification systems can be genotyped clearly. The data of genotyping showed that 9, 9, 8, 9, 2 alleles and 103 genotypes were obtained from blood sample of 200 unrelated Han people in Chongqing and the distribution of the genotypes was in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium. The heterozygosity(Ho) and the polymorphism information content(PIC) of the 5 loci in Chongqing Han population were 0.710, 0.765, 0.730, 0.710 and 0.660 041, 0.798 329, 0.753 177, 0.797 888, respectively. The cumulate exclusion probability of paternity(CPE) was 0.924 800 4 and the total probability of discrimination power(TPD) was 0.999 955 1. Conclusions: Each locus (D1S1676, D2S441, D3S4529, D22S1045, amelogenin) of the established 5 fluorescent labeled miniSTR multiplex amplification systems can be genotyped accurately and clearly. The genetic data of the 5 loci from Chongqing Han population can be used as basis materials for the study of population genetics and forensic appliance.

【Key words】forensic genetics; miniSTR; multiplex amplification; gene polymorphism

脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid, DNA)微量、降解的检材一直是法医进行 DNA 检验的难点。对于实际案件检验中一些微量、降解的检材,常规

短串联重复序列(Short tandem repeat, STR)技术并不理想,经常会出现“优势扩增”和“无效扩增”,这就给 DNA 正确分型带来了困难^[1]。miniSTR 技术使得 PCR 扩增产物片段更小,显著提高微量、降解的 DNA 成功分型率。多色荧光标记的复合扩增检测技术已被广泛应用于 STR 遗传标记的基因型分型,该

作者介绍:何寨寨(1986-),男,硕士,

研究方向:法医物证学。

通信作者:万立华,男,教授,Email:ccfw@cqmu.edu.cn。

方法具有效率高,分型结果准确,重现性好等优点,在遗传连锁分析和法医学亲权鉴定与个体识别中成为重要的分析手段^[2,3]。本研究筛选了 4 个非 DNA 联合索引系统(Combined DNA index system,CODIS)系统的三核苷酸或四核苷酸重复的 miniSTR 基因座,即 D1S1676、D2S441、D3S4529、D22S1045,及性别位点 amelogenin,采用复合扩增及四色荧光标记技术,用 5 个位点建立了扩增片段长度小于 200 bp 的复合扩增体系,以期得到完整的样品分型结果,并调查其在重庆地区汉族人群中的等位基因分布。

1 材料与方法

1.1 样本 DNA

人群纳入标准:①至少 2 代以上为重庆籍且长居重庆主城区地区;②无 3 代以内直系或旁系血缘关系;③汉族个体。排除标准:①外来务工者;②非重庆籍;③不符合纳入标准的情况。

研究表明^[4]采用多个基因座的复合扩增体系进行常染色体 STR 基因座遗传多态性研究,采集样本量应大于 80,继续增加样本量对结果无明显影响。其中 4 个非 CODIS 系统基因座在常染色体,采集样本时不必刻意考虑男女性别比例。本研究为保证数据的准确性,加大样本量至 200,对前往医院就诊的患者及家属进行随机调查,抽取符合条件的个体 EDTA 抗凝血 200 份(重庆医科大学附属第一医院提供),采用 Chelex 法提取模板 DNA。通过 nanodrop2000 进行 DNA 定量。

1.2 合成引物

通过查阅文献获得 D1S1676、D2S441、D3S4529、D22S1045、amelogenin 5 个 miniSTR 基因座的引物序列,应用 primer premier 5.0 软件对引物进行设计,应用 autodimer v1 软件对复合扩增中 5 对引物间相互作用进行检测(由上海生工生物工程技术有限公司合成)。分别用 5'TAMRA 标记 D1S1676 引物,5'6-FAM 标记 D2S441 和 D3S4529 引物,5'HEX 标记

D22S1045 引物,5'TET 标记 amelogenin 引物(引物详细信息见表 1)。

1.3 不同引物间相互作用

对 5 个不同基因座的引物进行两两组合 PCR 扩增,对扩增产物进行 2%琼脂糖电泳;对 5 个基因座单独 PCR 扩增产物进行 12%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,均采用溴化乙锭(Ethidium bromide,EB)染色后,应用凝胶成像仪,紫外光下观察电泳结果。

1.4 优化 PCR 复合扩增反应条件

模板浓度:以 9947 标准品 DNA(10 ng/μl)为模板,设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ng 梯度浓度进行试验。

Mg²⁺ 浓度:设置 Mg²⁺ 终浓度梯度(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L)进行试验。

引物浓度:设置引物终浓度梯度(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μmol/L)进行试验。

TaqDNA 聚合酶用量:设置 Taq 聚合酶(5 U/μl)浓度梯度(0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 U)进行试验。

退火温度:设置退火温度梯度(54 ℃、55 ℃、56 ℃、57 ℃、58 ℃、59 ℃、60 ℃)进行试验。

PCR 循环次数:在确定最佳退火温度、模板浓度、Mg²⁺ 浓度、引物浓度及酶的用量条件后,设置 PCR 循环次数梯度(28、29、30、31、32 次)进行试验。

1.5 统计学分析

应用 POWERSTATS 统计学软件(Promega 公司)对数据进行统计分析,获得各基因座的等位基因频率、匹配概率(Match probability, P_m)、观察杂合度(Heterozygosity, H_o)、多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)、个人识别能力(Probability of discrimination power, DP)和非父排除率(Exclusion probability of paternity, EP)。采用 Arlequin 311 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。

2 结果

2.1 四色荧光符合体系的建立

通过上述反应条件的测试与优化,建立了 10 μl 的复合

表 1 构建复合扩增体系的 5 个基因座基本信息

Tab.1 Basic information of 5 loci for multiplex system

基因座	重复序列	等位基因范围	长度 (bp)	引物序列及荧光标记 (5' -3')
amelogenin	无	106/112	106/112	[TET]-CCCTGGGCTCTGTAAGAATAGTG ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG
D1S1676	GAAG	10~18	81~113	[TAMRA]-GGGAAGGAGGGAAGCATAGA GGAGCTTAGCCTGCCTGACT
D2S441	TCTA	9~15	172~198	[FAM]-CAAAAGGCTGTACAAGGGCTA GTTCACTCTCCTTCCCAAATGTT
D3S4529	ATYT	13~20	111~139	[FAM]-CCCAAAATTACTTGAGCCAAT AGACAAAATGAAGAAACAGACAG
D22S1045	ATT	11~19	88~112	[HEX]-ATTTTCCCGATGATAGTAGTCT GCCAATGTATGATTGGCAATATTTTT

注:Y 可为 C 或 T

扩增体系: $10 \times$ PCR 缓冲液 $1 \mu\text{l}$, 1 mmol/L ; Mg^{2+} $0.6 \mu\text{l}$, 25 mmol/L ; dNTP $1 \mu\text{l}$, 2.5 mmol/L ; D1S1676 和 amelogenin 上、下游引物各 $0.15 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{mol/L}$; D2S441, D3S4529, D22S1045 上、下游引物各 $0.2 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{mol/L}$; *Taq* 聚合酶 $0.15 \mu\text{l}$, $5 \text{ U}/\mu\text{l}$; 模板 DNA $0.6 \mu\text{l}$ $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$; 灭菌双蒸水 $4.85 \mu\text{l}$ 热循环参数为 95°C 预变性 3 min , 94°C 变性 30 s , 60°C 退火 30 s , 72°C 延伸 60 s , 32 个循环, 最后 72°C 延伸 15 min 。

2.2 电泳结果

不同基因座间引物未见非特异性扩增产物形成; 5 个基因座扩增产物 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳成像清晰 (图1)。

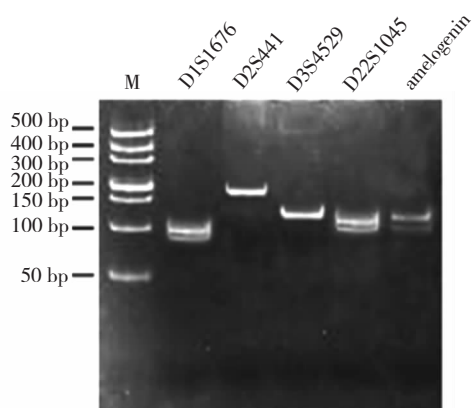


图1 紫外光下 5 个 miniSTR 扩增产物电泳 EB 染色图

Fig.1 Electrophoresis map of 5 miniSTR amplification products under ultraviolet light stained with EB

2.3 样本分型

根据本实验室自制等位基因分型标准物对 5 个 miniSTR 基因座的复合扩增产物进行电泳, 得到清晰的分型图谱, 未见明显非特异性扩增产物, 荧光值在 $600 \sim 3600 \text{ RFU}$ 之间, 未见干扰分型的杂峰 (图 2)。5 个 miniSTR 基因座的扩增片段长度均小于 200 bp 。

2.4 遗传多态性数据调查

根据 5 个 miniSTR 基因座分型结果分别计算每个基因座在 200 份重庆汉族无关个体中 H_o 、 PIC 、 P_m 、 DP 、 EP 及累计非父排除率 (Cumulate exclusion probability of paternity, CPE), 累计个人识别能力 (Total probability of discrimination power, TPD)。结果见表 2、表 3。其中, amelogenin 基因座的检测结果与样品实际人群性别一致。

3 讨论

miniSTR 技术在提高降解检材分型成功率方面具有明显优势^[5]。将多个 miniSTR 基因座引物加入同一扩增管中, 寻找相同的扩增条件, 在同一 PCR 体系中获得多个目标基因座, 能显著提高检测的效率, 降低成本, 减少操作强度。本研究中的 D1S1676、D2S441、D3S4529、D22S1045, 4 个 miniSTR 基因座均为非 CODIS 系统的基因座。其中 D2S441、D22S1045 已经被欧洲收入为法医学 DNA 检测的核

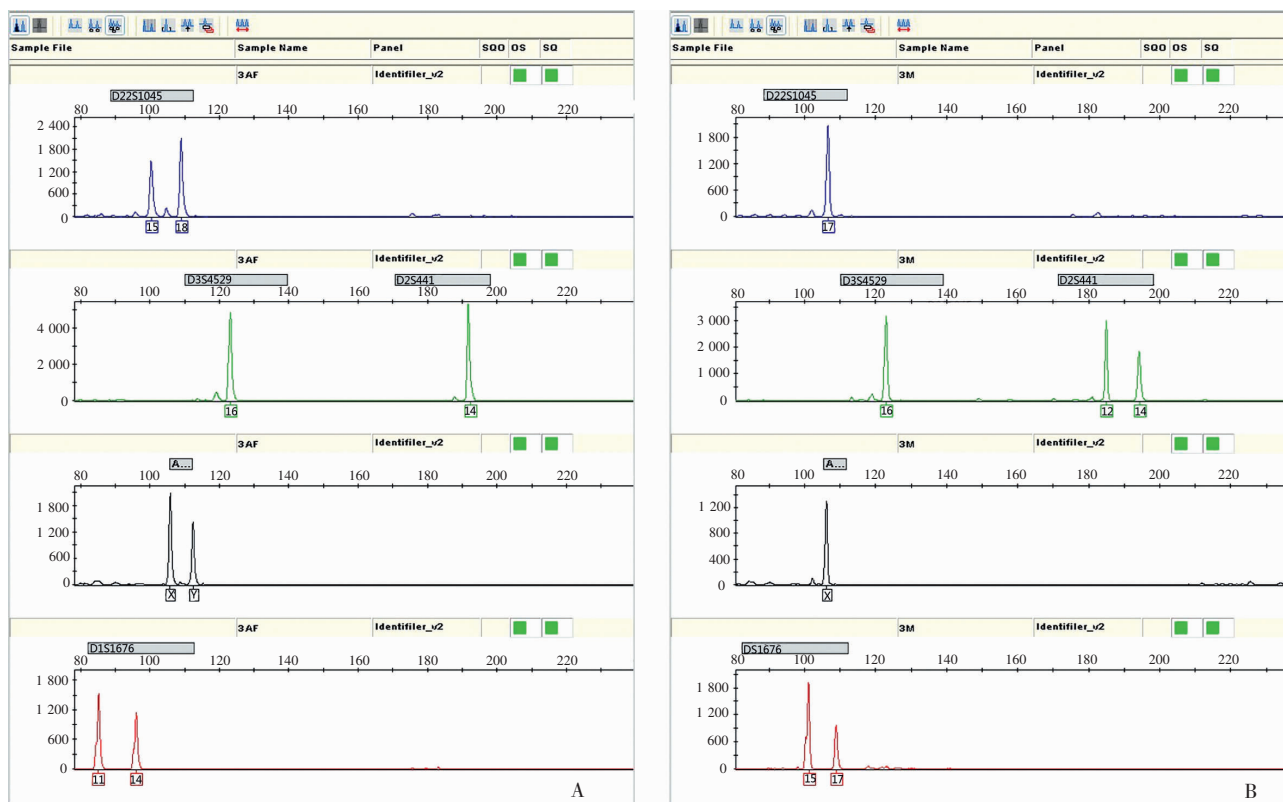


图2 5 个 miniSTR 基因座荧光复合扩增体系样品分型结果

Fig.2 Typing results of fluorescent multiplex PCR system for 5 miniSTR loci

表 2 重庆汉族群体 4 个 miniSTR 基因座等位基因频率分布 ($n=200$)
Tab.2 Allele frequency distribution of 4 miniSTR loci of Han population in Chongqing ($n=200$)

D1S1676		D2S441		D3S4529		D22S1045		amelogenin	
基因型	频率	基因型	频率	基因型	频率	基因型	频率		
10	0.005 0	9	0.020 0	13	0.027 5	11	0.045 0	男性	0.520 0
11	0.007 5	10	0.092 5	14	0.012 5	12	0.077 5	女性	0.480 0
12	0.397 5	11	0.180 0	15	0.095 0	13	0.130 0		
13	0.052 5	11.3	0.065 0	16	0.237 5	14	0.202 5		
14	0.012 5	12	0.312 5	17	0.302 5	15	0.272 5		
15	0.052 5	13	0.147 5	18	0.215 0	16	0.185 0		
16	0.335 0	13.3	0.055 0	19	0.102 5	17	0.062 5		
17	0.127 5	14	0.110 0	20	0.007 5	18	0.022 5		
18	0.010 0	15	0.017 5			19	0.002 5		

表 3 重庆地区汉族群体 4 个 miniSTR 基因座多态性参数
Tab.3 Genetic polymorphism parameters for 4 miniSTR loci of Han population in Chongqing

基因座	Ho	PIC	Pm	DP	EP	H-W 平衡检验
D1S1676	0.710	0.660 041	0.143 15	0.856 85	0.443 899	$P>0.05$
D2S441	0.765	0.798 329	0.060 05	0.939 95	0.535 777	$P>0.05$
D3S4529	0.730	0.753 177	0.087 75	0.912 25	0.476 181	$P>0.05$
D22S1045	0.710	0.797 888	0.059 50	0.940 50	0.443 899	$P>0.05$

注:CPE 为 0.924 800 4,TPD 为 0.999 955 1

心位点,美国、日本、西班牙等相继报道了其在本国人群的群体遗传学数据及其法医学应用。D1S1676、D3S4529 也有过中国不同地区的相关研究,而关于重庆地区汉族群体相关报道较少并缺少群体遗传学数据,因而,本研究中的 4 个非 CODIS 系统 miniSTR 基因座及 amelogenin 的复合扩增体系的建立十分必要。

3.1 复合扩增体系反应条件的优化

由于本研究中 5 个 miniSTR 扩增产物片段大小均小于 200 bp,不同基因座扩增产物之间有重叠部分,因此,采用 FAM,HEX,TRAMA 和 TET 四色荧光标记识别技术,可清晰辨别各基因座扩增产物,对每个基因座实现准确分型。

引物的优劣是复合扩增体系成功建立的关键。设计引物时,根据查阅文献所获得的 5 个 miniSTR 基因座引物序列,应用 NCBI 数据库进行比对,primer premier 5.0、autodimer1 软件对引物进行重新设计,在要求单个引物碱基变异少,不形成发夹结构的同时,也要求不同引物之间减少引物二聚体的形成,并充分考虑退火温度、扩增产物片段大小之间的差距等因素。在进行复合扩增时调整引物浓度至各基因座产物基本平衡,减少非特异性产物,使得分型效果较为理想。

Taq DNA 聚合酶常在 PCR 产物的末端添加额外的核苷酸,经常为“A”(称为腺苷酰化作用),使

PCR 产物 3'末端加有一个额外的腺嘌呤^[6]。但是,这种加“A”现象并不是存在于所有产物片段中,当合成链的 3'末端核苷酸本身为“A”时,则不再添加“A”;而当 3'末端为胞嘧啶 C 时,Taq DNA 聚合酶的末端转移酶活性最强,此时扩增产物加“A”几乎达到 100%^[7,8],因此在 PCR 产物当中有两种相差一个腺嘌呤的片段,称为“加‘A’不全”。此时电泳图谱上表现为“双尖峰”或“裂口峰”(Split peak)。本研究在第 1 次进行荧光检测扩增产物时,D3S4529 出现了裂口峰。经过实验,本文采用热循环结束加 1 个 72℃延伸 15 min 的过程,使加“A”完全,结果证实没有裂口峰出现。

3.2 4 个 miniSTR 基因座的多态性

本研究的 5 个 miniSTR 基因座,采用常规Chelex 法提取 EDTA 抗凝血模板 DNA 进行扩增,结果理想,分型准确、清晰、稳定。其中 D1S1676、D2S441、D3S4529、D22S1045,4 个基因座在重庆汉族群体中分别检出 9、9、8、9 个等位基因,其中基因频率 >0.05 的常见等位基因分别为 4、5、5、6 个(表 2),其中 DP 从 0.856 85~0.940 50,EP 从 0.443 899~0.535 777,PIC 从 0.660 041~0.798 329(表 3),表明各基因座具有较好的多态性及信息含量。各基因座基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$),表明研究所产生的数据可以作为群体相关数据的代表。4 个基因座具有较高的 TPD(0.999 955 1)及 CPE

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.008

金雀异黄素与 5-氟尿嘧啶单独或联合抑制人胃癌 BGC-823 细胞的体外研究

王正文¹, 龚 军², 朱明才³, 汤为学⁴, 崔海宁¹

(1. 海南医学院附属医院普外科, 海口 570102; 2. 四川省医学科学院、四川省人民医院肝胆胰外科, 成都 610072;

3. 重庆医科大学附属第一医院普外科, 重庆 400016; 4. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室, 重庆 400016)

【摘 要】目的: 研究金雀异黄素(Genistein, Gen)与 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)联合应用对人胃癌细胞 BGC-823 的生长抑制是否具有协同作用及其可能的作用机制。方法: MTT 法检测 Gen、5-FU 单独及联合对 BGC-823 细胞生长的抑制作用并用中效原理定量分析两药合用的剂量-效应关系。Gen、5-FU 单独及联合处理 BGC-823 细胞 72 h 后, 流式细胞术检测细胞周期分布的变化, 并在透射电镜下观察细胞超微结构的改变。结果: Gen、5-FU 单用或联合应用对 BGC-823 细胞的生长均有显著的增殖抑制作用, 且呈剂量和时间依赖性。两药联合应用时, 当药物效应(抑制率)大于 50% 时, 具有协同作用($CI \leq 1$); 6.06 mg/L Gen 作用 72 h 后, 95.74% 的 BGC-823 阻滞在 G₂/M 期; 1.23 mg/L 5-FU 作用 72 h 后, G₀/G₁ 及 S 期细胞分别为 58.26% 和 41.59%, 0.81 mg/L Gen 与 1.01 mg/L 5-FU 联合应用 72 h 后, 67.99% 的 BGC-823 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期。Gen、5-FU 单独或联合均可诱导 BGC-823 细胞凋亡。结论: Gen 和 5-FU 单独或联合应用, 均对 BGC-823 细胞具有抑制增殖的作用, 在一定浓度范围内, Gen 与 5-FU 联合应用对胃癌细胞的增殖具有协同抑制作用, Gen 与 5-FU 可能通过阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡而抑制胃癌细胞的生长。该研究为 Gen 与 5-FU 可能联合用于胃癌的治疗提供了依据。

【关键词】金雀异黄素; 5-氟尿嘧啶; 胃癌; 抑制作用; 细胞周期; 凋亡

【中国图书分类法分类号】R735.35

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-14

作者介绍: 王正文(1974-), 男, 主治医师, 硕士,

研究方向: 胃肠道肿瘤的综合治疗、胃肠微创外科。

通信作者: 朱明才, 男, 教授, Email: cqzhume@163.com。

(0.924 800 4), 表明样本容量合适, 能够获得较好的数据结果。Amelogenin 基因座的检测结果与样品实际人群性别一致。结果表明, 本研究中 4 个非 CODIS 系统的 miniSTR 基因座 D2S441 在法医亲子鉴定及个体识别中有较高的应用价值, D1S1676、D3S4529、D22S10454 EP 略低, 亦可结合其他基因座分型, 作为法医学亲子鉴定及个体识别的补充与辅助, 丰富了法医学及人类遗传学数据, 还可作为商品化试剂盒的补充, 增加信息含量, 提高检验效能。

参 考 文 献

- [1] Whitaker J P, Clayton T M, Urquhart A J, et al. Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples[J]. Biotechniques, 1995, 18(4): 670-677.
- [2] Krenke B E, Tereba A, Anderson S J, et al. Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system[J]. J Forensic Sci, 2002, 47(4): 773-785.
- [3] Micka K A, Amiot E A, Hockenberry T L, et al. TWGDAM valida-

tion of a nine-locus and a four-locus fluorescent STR multiplex system[J]. J Forensic Sci, 1999, 44(6): 1243-1257.

[4] 高雅, 李生斌. STR 遗传多态性研究中样本数量对等位基因检出数量的影响[J]. 遗传, 2008, 30(3): 313-320.

Gao Y, Li S B. Effects of sample size on the observed number of allele of 9 STR loci with various genetic data[J]. Hereditas, 2008, 30(3): 313-320

[5] Thomsen A R, Hallenberg C, Simonsen B T, et al. A report of the 2002-2008 paternity testing workshops of the English speaking working group of the International Society for Forensic Genetics[J]. Forensic Sci Int Genet, 2009, 3(4): 214-221.

[6] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.

[7] Magnuson V L, Ally D S, Nylund S J, et al. Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning[J]. Biotechniques, 1996, 21(4): 700-709.

[8] Brownstein M J, Carpten J D, Smith J R. Modulation of non-template nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping[J]. Biotechniques, 1996, 20(6): 1004-1006, 1008-1010.

(责任编辑: 关蕴良)