

· 论 著 ·

广东汉族人群 D18S51 基因座等位基因分型现象分析*

兰菲菲, 陈延冰, 丁红珂, 杜 丽, 张 彦, 尹爱华[△]

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 D18S51 基因座等位基因的特殊分型现象。方法 采用 Chelex-100 法提取 DNA, 采用 Powerplex[®]21 体系对广东汉族 9 419 例研究对象进行 PCR 复合扩增, 采用毛细管电泳分析 STR 基因座的等位基因分型, 采用 Identifiler[™] 体系验证其特殊分型。结果 发现 D18S51 基因座存在三带型等位基因和 off-ladder(OL) 等位基因 2 种特殊分型, 基因型频率分别为 0.010 6% 和 0.021 2%。OL 等位基因命名为 28, 由母亲遗传给孩子。不同检测体系证实了特殊分型发生的真实性。结论 对于 STR 基因座的特殊分型, 应采用不同试剂盒验证, 正确命名 OL 等位基因及计算三带型等位基因的亲权指数。

关键词: D18S51 基因座; 三带型等位基因; off-ladder 等位基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.010 **中图法分类号:** R-33

文章编号: 1673-4130(2021)07-0812-04

文献标志码: A

Analysis of allelic typing of D18S51 locus in Guangdong Han population*

LAN Feifei, CHEN Yanbing, DING Hongke, DU Li, ZHANG Yan, YIN Aihua[△]

Department of Medical Genetics Center, Guangdong Provincial Maternity and Child Health Hospital, Guangzhou, Guangdong 511442, China

Abstract: Objective To analyze the peculiar typing phenomenon of alleles at the D18S51 locus in the Han population in Guangdong. **Methods** Chelex-100 method was used to extract DNA, Powerplex[®]21 system was used to perform PCR multiplex amplification on 9 419 subjects of Han nationality in Guangdong, the allele typing of STR locus was analyzed by capillary electrophoresis, and Identifiler[™] system was used to verify its special classification. **Results** It was found that there were two special types of three-band alleles and off-ladder (OL) alleles in the D18S51 locus. The genotype frequencies were 0.010 6% and 0.0212%, respectively. The OL allele was named 28 and was passed from mother to child. Different detection systems had confirmed the authenticity of the occurrence of special typing. **Conclusion** For the special typing of STR loci, different kits should be used to verify, correctly name the OL alleles and calculate the parental index of the three-band alleles.

Key words: D18S51 locus; three-band allele; off-ladder allele

短串联重复序列 (STR) 是人类基因组 DNA 中遗传学标记之一, 在法医学研究中具有重要应用价值。在鉴定中会遇到 STR 基因座的特殊分型现象, 例如三带型等位基因和 off-ladder (OL) 现象等。三带型等位基因的发生机制较为复杂, 发生率不高, 有研究表明中国人群中 TPOX 等基因座的检出率在 0.01% ~ 0.09%^[1], 陈玲等^[2] 报道中国人群 D18S51 基因座检出率为 0.013 7%。而 OL 现象较常见, 有报道显示不同 STR 基因座均会发生 OL 现象^[3-4]。正确计算特殊分型基因座的亲权指数 (PI) 及计算和 (或) 命名 OL 等位基因, 对亲权鉴定的结论和科学性均有不同程度

的影响。本文对发现的 D18S51 基因座特殊分型现象进行了分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本中心日常受理检测的 9 419 例研究对象, 均在本中心进行三联体 (母亲、孩子与被检父亲) 或二联体 (孩子与被检父亲或母亲) 亲子鉴定, 研究对象均为广东地区汉族人群。本研究经本中心伦理委员会审核通过, 所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 全部血液标本采用 Chelex-100

* 基金项目: 广东省医学科研基金项目 (B2021205)。

作者简介: 兰菲菲, 女, 副主任技师, 主要从事临床分子遗传学相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: yinaiwa@vip.126.com。

本文引用格式: 兰菲菲, 陈延冰, 丁红珂, 等. 广东汉族人群 D18S51 基因座等位基因分型现象分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(7): .

法提取基因组 DNA。血液轻轻混匀后,吸取 2 μL 全血至 1.5 mL 的离心管中,加入 1 mL 灭菌纯净水,剧烈震荡 30 s,室温放置 30 min;13 000 r/min 离心 3 min,收集沉淀;在沉淀中加 200 μL 5% 的 Chelex-100 悬液,用震荡仪剧烈震荡,震荡后瞬时离心,放入恒温水浴箱中 56 °C 孵育 30 min;100 °C 煮沸 8 min,取出后剧烈震荡,13 000 r/min 离心 3 min,吸取上清液保存于 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 多重 PCR 扩增 取上清液 1 μL,采用 Powerplex® 21 扩增体系(购自美国 Promega 公司),按照操作说明书进行 20 个常染色体和 1 个性染色体 STR 基因座的多重 PCR 扩增。

1.2.3 STR 基因座的等位基因分型 每个标本取 1 μL PCR 扩增产物、9 μL 甲酰胺与 0.5 μL 的 Powerplex® 21 体系内标充分混合均匀,用 3500XL 基因分析仪(购自美国 AB 公司)进行毛细管电泳,标记每个 STR 基因座的扩增片段大小。按照 Powerplex® 21 体系操作说明,利用 GeneMapper® ID-X 软件(购自美国 AB 公司)分析电泳后的数据,以 Powerplex® 21 体系的每个 STR 基因座等位基因分型标准物作为标准,获取被检测标本的 STR 基因座的等位基因分型。

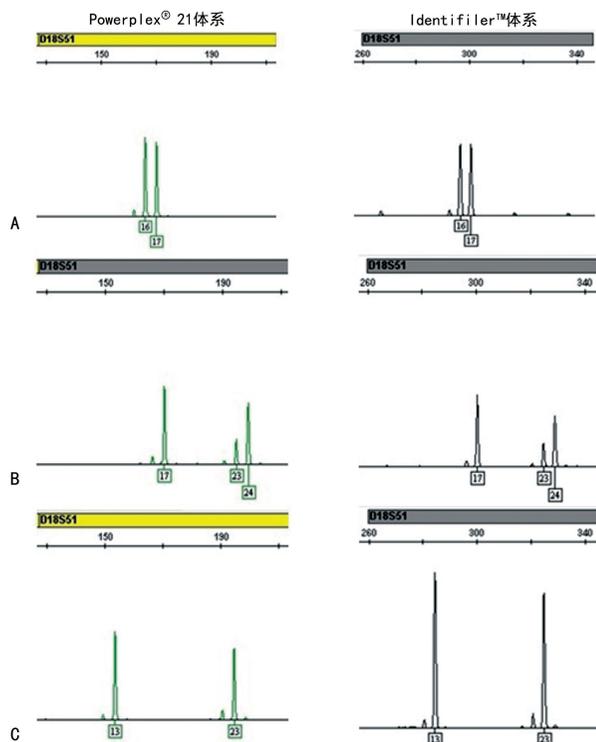
1.2.4 D18S51 基因座特殊分型等位基因的验证 选取 Powerplex® 21 体系检测发现的三带型等位基因及 OL 等位基因的家系标本,重新提取 DNA,采用 Identifiler™ 体系(购自美国 AB 公司)进行验证。

1.2.5 OL 等位基因的分型计算 根据 GeneMapper® ID-X 软件中给出的 OL 等位基因片段大小,结合基因分型标准物中 D18S51 基因座等位基因的大小,计算并减掉基因座的漂移率,计算 OL 等位基因的大小后进行等位基因分型的命名^[3]。

1.3 统计学处理 使用 GeneMapper® ID-X 软件对等位基因进行计算并命名,计数资料以例数和百分率表示。

2 结 果

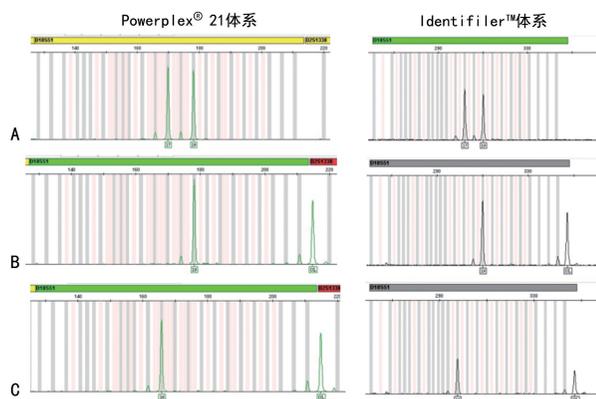
2.1 D18S51 基因座三带型等位基因分型结果 利用 Powerplex® 21 体系进行 20 个常染色体 STR 基因座检测,在 9 419 例研究对象中发现 1 个家系的孩子 D18S51 基因座存在三带型等位基因 17, 23, 24 (Type1 类型),峰高比例约为 3 : 2 : 1,等位基因 17 的峰面积约为等位基因 23 和 24 之和。该家系标本重新提取 DNA 后经过 Identifiler™ 体系检测验证,确定了该孩子在 D18S51 基因座发生三带型等位基因现象。该三带型等位基因基因型频率为 0.010 6% (1/9 419)。见图 1。



注:A 为父亲;B 为孩子;C 为母亲。

图 1 不同检测体系的 D18S51 基因座三带型等位基因分型

2.2 D18S51 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的家系中检测到母亲和孩子存在 OL 等位基因,采用 Identifiler™ 体系重复检测证实 OL 等位基因的存在。父亲的等位基因分型为 17, 19;孩子的等位基因分型为 19, OL;母亲的等位基因分型为 16, OL。OL 等位基因的基因型频率为 0.021 2% (2/9 419)。见图 2。

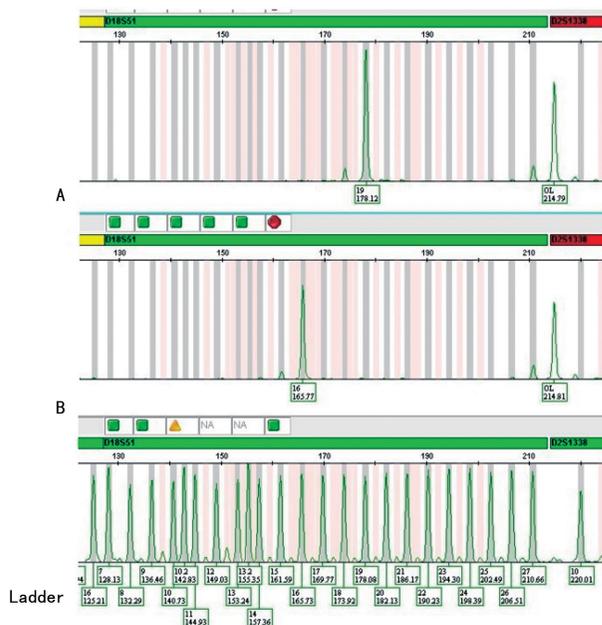


注:A 为父亲;B 为孩子;C 为母亲。

图 2 不同检测体系的 D18S51 基因座 OL 等位基因分型

2.3 OL 等位基因的分型计算 本研究中孩子 D18S51 基因座的 OL 等位基因,减掉漂移率(0.04 bp),OL 等位基因(214.79 bp)比 Ladder 中 D18S51 基因座的等位基因 27 (210.66 bp) 大 4.09 bp,而 D18S51 基因座为 4 个核苷酸的重复,即 OL 等位基因比 Ladder 中 D18S51 基因座的等位基因 27 大约 1 个重复序列(4.09/4=1.023),因此,孩子的 OL 等位基因命名为 28。母亲 D18S51 基因座的 OL 等位基因,

减掉漂移率(0.05 bp),OL 等位基因(214.81 bp)比 Ladder 中 D18S51 基因座的等位基因 27(210.66 bp)大 4.1 bp,即 OL 等位基因比 Ladder 中 D18S51 基因座的等位基因 27 大约 1 个重复序列(4.1/4 = 1.025),因此,母亲的 OL 等位基因命名为 28。见图 3。



注:A 为孩子;B 为母亲。

图 3 Ladder 和 D18S51 基因座 OL 等位基因片段

3 讨论

三带型等位基因和 OL 等位基因是 STR 基因座分型中的主要特殊分型^[5-6],在应用 STR 基因座分型技术进行的临床检测和分析(例如亲权鉴定或染色体非整倍体快速诊断)中较为重要。在健康人群中,常染色体的单个 STR 基因座进行 PCR 扩增后电泳得到的基因分型是双等位基因或者单等位基因,图谱表现为杂合子的 2 条带(2 个基因峰),或者纯合子的 1 条带(1 个基因峰),并且基因分型一般在等位基因分型标准物范围之内。特殊情况下,单个 STR 基因座分型会出现 3 条带(3 个基因峰),即 STR 基因座的三带型等位基因。DNA 复制过程中的碱基错配、滑动或者核心重复序列的插入或缺失、体细胞突变等均可导致三带型等位基因的出现^[7]。在分析 STR 基因座的等位基因分型时,采用各 STR 基因座的等位基因与检测体系的等位基因分型标准物进行比较,再根据 Ladder 的基因分型命名得到 STR 基因座等位基因的分型,出现在 Ladder 之外的特殊分型即 OL 等位基因。由于 STR 基因座核心重复序列在不同种族、不同地区人群和个体间有一定的差异性,实际检测中会遇到 OL 等位基因。

本研究通过分析 9 419 例研究对象 20 个常染色体 STR 基因座的等位基因分型,在 D18S51 基因座发现了三带型等位基因分型 17,23,24 和 OL 稀有等位基因

28,基因型频率分别为 0.010 6%和 0.021 2%。其中三带型等位基因属于 Type1 类型,3 个等位基因峰高度不平衡,比例为 3 : 2 : 1,且等位基因 17 的峰面积约为等位基因 23 和 24 的面积之和。其中,等位基因 23 和 24 只相差 1 个核心序列,可能因为该个体 D18S51 基因座原来的杂合子其中的 1 个等位基因发生了滑动错配或者体细胞突变,产生了 2 个等位基因^[7-8]。Type1 类型三带型等位基因相对 Type2 类型较为多见,Type2 类型的三带型等位基因的 3 条带峰高度平衡,有研究推测与杂合子基因座发生了染色体重新排列有关^[8]。OL 等位基因根据其分布可以分为 2 种情况:一是 OL 等位基因在该基因座的基因分型标准物范围之内,位于 2 个等位基因之间;二是 OL 等位基因超出该基因座的基因分型标准物范围^[9]。本研究发现的 D18S51 基因座 OL 等位基因 28 超出了 Powerplex[®] 21 体系中该基因座 Ladder 的最大范围 27,是稀有等位基因,发生频率较低。因为与基因座的亲权指数计算相关,OL 等位基因的正确命名较为重要,过滤漂移率之后,经过计算,孩子和母亲的 OL 等位基因命名为 28,由母亲遗传给孩子。

许泽辉等^[10]在中国人群中发现三联体亲子鉴定的母亲发生了 D18S51 基因座三带型等位基因 17,18,19,父亲和孩子分型正常。有研究发现母子单亲鉴定中孩子在 D18S51 基因座检测出三带型等位基因 15,16,17,母亲分型正常^[11]。唐剑等^[12]发现 D18S51 基因座存在的三带型等位基因 14,16,18。除此之外,D18S51 基因座的 OL 等位基因丢失及突变均有报道^[13-14]。在检测中遇到特殊分型现象,首先要用不同检测试剂盒验证其发生的真实性,排除试验过程中标本污染等因素。本研究应用 Powerplex[®] 21 体系和 Identifiler[™] 体系对发现的 D18S51 基因座三带型及 OL 等位基因进行验证,2 种检测试剂盒的分型结果相同。另一个关键环节为基因座亲权指数的计算及 OL 等位基因的命名,对于计算及命名的具体方法,目前国内尚无国家标准及行业标准。本研究中孩子 D18S51 基因座的等位基因 23 遗传自母亲,推测 24 可能由等位基因 23 突变形成。亲权指数可参考应用以下 2 种计算方式:(1)将等位基因 24 由 23 突变而来的因素考虑在内,亲权指数 = X/Y = μm/(2p23p24)^[11],μm 为母源性突变的平均突变率^[15];(2)将等位基因 23 和 24 看作一个整体,根据双等位基因的方法计算^[16],亲权指数 = X/Y = 1/(2p17)。OL 等位基因根据基因分型标准物的分型标准和漂移率命名。由于亲代和子代中遗传的稀有等位基因发生频率很低,OL 基因座的亲权指数可考虑使用 D18S51 基因座的最小等位基因频率计算。

本研究利用 Powerplex[®] 21 体系检测分析广东汉族人群 D18S51 基因座的特殊分型现象,其中 D18S51 基因座的三带型等位基因分型 17,23,24 在 STRBase

数据库 (<http://www.cstl.nist.gov/biotech/str-base/>) 中尚未见收录, 是新发现的三带型等位基因。在广东汉族人群中发现 D18S51 基因座的 OL 等位基因 28, 数据库中暂无收录, 可作为 Powerplex[®] 21 体系 Ladder 等位基因的补充, 可提高该检测体系的检测效能, 本研究探讨了亲权指数的计算及命名, 在鉴定实践中可作为参考。

综上所述, 在鉴定中遇到 D18S51 等 STR 基因座的特殊分型现象, 可利用含有相同 STR 位点的不同试剂盒验证基因座的分型是否正确, 排除试验的非特异性扩增或污染、内标及 Ladder 等毛细管电泳的因素。本研究对 OL 等位基因进行了正确命名, 计算了发生三带型等位基因或 OL 基因座的亲权指数, 丰富了 STRBase 数据库中 D18S51 基因座的三带型等位基因分型, 补充了广东汉族人群 D18S51 基因座 OL 等位基因分型和频率数据库。

参考文献

- [1] 刘芳, 任贺, 陈冲, 等. 三联体常染色体 STR 三带型基因座父权指数计算[J]. 刑事技术, 2017, 42(6): 471-475.
- [2] 陈玲, 刘超, 邱平明, 等. 常染色体 STR 基因座三带型的观察与分析[J]. 中国法医学杂志, 2014, 29(4): 316-318.
- [3] 张应爱, 王顺兰, 文小红, 等. 一例大片段重复序列 Penta E 基因座 off-ladder 等位基因的测序鉴定[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(2): 168-170.
- [4] WU J, LI J L, WANG M L, et al. Evaluation of the MiSeq FGx system for use in forensic casework[J]. Int J Legal Med, 2019, 133(3): 689-697.
- [5] YANG Q, LIU B, SHAO C, et al. Characterization of the extra copy of TPOX locus with tri-allelic pattern[J]. BMC Genet, 2019, 20(1): 18.
- [6] JONES R J, TAYYARE W A, TAY G K, et al. Population data for 21 autosomal short tandem repeat markers

in the arabic population of the united arab emirates[J]. Forensic Sci Int Genet, 2017, 28(1): 41-42.

- [7] PUMPERNIK D, OBLAK B, BORSTNIK B. Replication slippage versus point mutation rates in short tandem repeats of the human genome[J]. Mol Genet Genomics, 2008, 279(1): 53-61.
- [8] CLAYTON T M, GUEST J L, URQUHART A J, et al. A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling[J]. J Forensic Sci, 2004, 49(6): 1207-1214.
- [9] AL-SNAN N R, MESSAOUDI S R, BABU S, et al. Population genetic data of the 21 autosomal STRs included in GlobalFiler kit of a population sample from the Kingdom of Bahrain[J]. PLoS One, 2019, 14(8): e0220620.
- [10] 许泽辉, 严提珍, 罗世强, 等. 两例短串联重复序列三带型等位基因的遗传多态性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(2): 97-102.
- [11] 王亚丽, 宋振祥, 白慧茹, 等. STR 基因座中检测出三带型等位基因 2 例[J]. 激光生物学报, 2019, 28(3): 264-269.
- [12] 唐剑, 李晋齐, 刘凯, 等. D18S51 基因座检出三带型等位基因一例[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(6): 745-746.
- [13] 林汉光, 董建国, 钟思婷, 等. 引物结合区点突变致 D18S51 等位基因丢失[J]. 刑事技术, 2020, 45(2): 201-203.
- [14] 胡锡阶, 刘祖林, 章涛, 等. 亲子鉴定中 STR 基因座 D18S51 罕见多步突变 1 例[J]. 中国法医学杂志, 2019, 34(1): 98-100.
- [15] 中国国家标准化管理委员会. 亲权鉴定技术规范: GB/T 37223-2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [16] 任静妮, 喻芳, 张倍铭, 等. STR 基因座中检出三带型等位基因 3 例[J]. 中国法医学杂志, 2019, 34(2): 192-193.

(收稿日期: 2020-08-15 修回日期: 2020-12-13)

(上接第 811 页)

- [14] WRIGHT H, BONOMO R A, PATERSON D L. New agents for the treatment of infections with gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn[J]. Clin Microbiol Infect, 2017, 23(10): 704-712.
- [15] PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS M, FLIGOU F, BARTZAVALI C, et al. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infection in critically ill patients: risk factors and predictors of mortality[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(7): 1125-1131.
- [16] TUMBARELLO M, TRECARCHI E M, DE-ROSA F G, et al. Infections caused by KPC-producing Klebsiella pneumoniae: differences in therapy and mortality in a multicentre study[J]. J Antimicrob Chemother 2015, 70(7): 2133-2143.
- [17] ZUSMAN O, ALTUNIN S, KOPPEL F, et al. Polymyxin

monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and meta-analysis[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(1): 29-39.

- [18] NORDMANN P, POIREL L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes[J]. Clin Microbiol Infect, 2002, 8(6): 321-331.
- [19] XU M, FU Y, FANG Y, et al. High prevalence of KPC-2-producing hypervirulent Klebsiella pneumoniae causing meningitis in Eastern China[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12(1): 641-653.
- [20] PITOUT J D, NORDMANN P, POIREL L. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae, a key pathogen set for global nosocomial dominance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10): 5873-5884.

(收稿日期: 2020-06-22 修回日期: 2020-12-17)