

河南汉族群体短串联重复 vWA 遗传多态性研究

李 怡,郝冰涛,杨艳丽,朱文玉,司艳梅,王应太

(河南省人民医院遗传研究所,郑州 450003)

摘要:研究人类短串联重复序列 vWA 在河南汉族人群中遗传多态性,探讨该基因座在法医学和基因诊断中的应用的可能性;同时和中国成都人群、美国黑人、高加索人群、西班牙人群、西班牙南方人群的 vWA 遗传多态性进行比较,以期了解该基因座在人种、地域上是否有差异。采集河南地区无血缘关系汉族个体血样,应用 Chelex 法提取 DNA,聚合酶链式反应扩增,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分型, χ^2 检验。得到 vWA 在河南汉族群体中的基因频率,有 8 个等位基因,24 个基因型,杂合度为 0.80,个体识别率为 0.84,非父排除率为 0.61;河南汉族人群和中国成都人群 vWA 遗传多态性无显著性差异($\chi^2=9.6, P>0.05$),而与美国黑人群($\chi^2=118.48, P<0.05$)、高加索人群($\chi^2=45.48, P<0.05$)、西班牙人群($\chi^2=86.87, P<0.05$)、西班牙南方人群($\chi^2=85.68, P<0.05$)均有显著性差异。说明该基因座多态性较好,分布符合 Hardy-Weinberg 平衡,可以用于个体识别和亲权鉴定。同时也说明河南汉族人群具有一定的代表性,其群体遗传特征的调查研究对群体遗传学和人类学有着重要意义。

关键词:聚合酶链式反应;短串联重复序列;遗传多态性;vWA

中图分类号:Q987;Q347

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2002)06-0639-04

Genetic Polymorphisms of Human Short Tandem Repeat vWA

LI Yi, HAO Bing-tao, YANG Yan-li, ZHU Wen-yu, SI Yan-mei, WANG Ying-tai

(Genetics Department, the People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: We researched the genetic polymorphisms of vWA in Henan population and its usefulness in forensic science. DNA extracted from non-relative persons in Henan population with Chelex was amplified by polymerase chain reaction and was typed by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis silver staining. A total of 8 alleles and 19 genotypes were found in Henan population, its heterozygosity is high and the locus can be used in forensic genetics. We obtained the allelic frequency of the locus vWA in Henan population. The results of amniotic fluid, villus, blood stain indicate vWA is a good locus for forensic study.

Key words: polymorphism; short tandem repeats; polymerase chain reaction; vWA

短串联重复序列(short tandem repeat, STR)又称微卫星 DNA,是基因组中广泛存在的一种重复结构,它的核心序列一般有 2~6 碱基构成,核心序列重复次数构成了遗传多态性。它散布于整个基因组中,平均每 15kb 就存在一个 STR 基因座,具有分布广泛,易于检测,信息度高并遵循孟德尔共显性遗传等优点。它不仅可以用于绘制基因组遗传图谱和遗传连锁分析的标尺,而且可用于法医学中的个体

识别和亲权鉴定^[1~7]。vWA 是位于 12 号染色体上的一个短串联重复基因座,我们对该基因座在汉族人群中的遗传多态性进行了研究。

1 材料与amp;方法

1.1 样本 DNA

374 份 EDTA 抗凝血采自中国河南省无血缘关系的汉族个体。Chelex 法提取 DNA,血痕、精斑、

口腔黏膜上皮细胞、胚胎绒毛以及羊水细胞均采用 Chelex 法提取 DNA。

1.2 PCR 扩增

引物^[8] a:3'-CTAATAAGAATAGGTGATC CC-5'; b:3'-GGTAGGTAGGATACATAAAT AGTAGACAGG-5' (大连宝生物公司合成), 每个 PCR 反应包括: 2~40ng 人基因组 DNA, 1×Taq 酶缓冲液, 1.5mmol/L MgCl₂, 200μmol/L dNTP, 1U Taq 聚合酶(Promoga 公司产品), 0.25μmol/L 引物, 反应体积为 25μl。扩增仪为 Eppendorf Master gradient cycler, 扩增条件为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 40s, 57℃ 退火 40s, 72℃ 延伸 1min, 循环 33 次。

1.3 PCR 产物的检测和等位基因分型

扩增产物 2μl 加上样缓冲液 2μl 混合, 与等位基因标准分型物同时上样, 6% 的非变性聚丙烯酰胺 (5% 的交联度) 垂直凝胶电泳, 恒电压 500V, 电泳 2h, 银染显色, 与标准分型物比较得出分型结果。并对分型结果进行命名。

1.4 数据的统计处理

计算基因频率、期望杂合度、个体识别率及非父排除率, 对群体数据作 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验; 群体间等位基因构成比较用 χ^2 检验。

1.5 标准分型物的制作

采用不同的已知基因型个体的扩增产物混合在一起构成标准分型物。

2 结 果

2.1 电泳分型

图 1 为 vWA 的扩增产物经过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后的分型结果, vWA 的等位基因分型可以清晰地从凝胶上读出。血痕、精斑、口腔黏膜上皮

细胞、胚胎绒毛、羊水细胞均可以扩增出清晰的带纹。

2.2 vWA 基因座的序列

CTAATAAGAATAGGTGATCCCTAGTGGATGA TAAGAATAATCAGTATGTGACTTGGATTGA TCTATCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCT ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT ATCCATCTATCCATCCATCCATCCTATGTATTAT CATCTGTCC 核心序列为 TCTA。按照国际法医血液遗传学会 DNA 委员会推荐原则, 以核心序列重复次数命名等位基因。分别为: [TCTA]₁₃ 为 13, [TCTA]₁₄ 为 14, [TCTA]₁₅ 为 15, [TCTA]₁₆ 为 16, [TCTA]₁₇ 为 17, [TCTA]₁₈ 为 18, [TCTA]₁₉ 为 19, [TCTA]₂₀ 为 20。

2.3 基因型分布与频率

统计每种基因型的个体数目(见表 1), 计算每个等位基因的的基因频率(见表 2), 并进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验。

表 1 vWA 基因座在河南汉族群体中的基因型分布

Table 1 Genotypes distribution of vWA in Han population in Henan province

Allele (等位基因)	Genotype(基因型)							
	13	14	15	16	17	18	19	20
13	1							
14		12	5	18	22	18	9	1
15				1	2	2	3	
16				8	12	13	3	1
17					11	11	9	1
18						15	6	
19							3	
20								

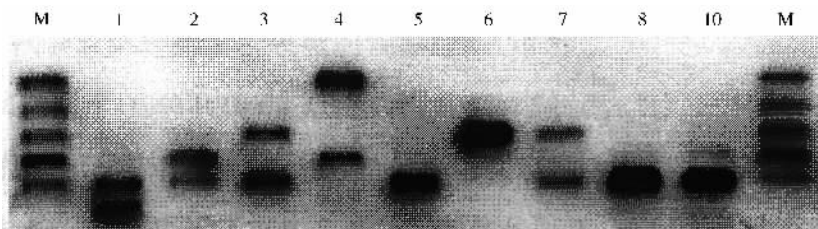


图 1 STR 基因座 vWA 电泳分型照片

M: 标准分型物; 1~9: 13/14, 14/15, 14/16, 15/18, 14/14, 16/16, 14/16, 14/14, 14/14。

Fig. 1 Result of vWA typing electrophoresis

Lane M: human allele ladder; lane 1~9: 13/14, 14/15, 14/16, 15/18, 14/14, 16/16, 14/16, 14/14, 14/14.

表 2 河南汉族群体 vWA 基因各等位型的频率
Table 2 Frequency of vWA alleles in Han population in Henan province

Allele	13	14	15	16	17	18	19	20
Size(bp)	126	130	134	138	142	146	150	154
Number	2	97	13	64	79	80	36	3
Frequency	0.0053	0.2594	0.0348	0.1711	0.2112	0.2139	0.0963	0.0080

2.4 期望杂合度

$$H_{et} = 1 - \sum P_{i2} = 0.80$$

(P_i 代表群体中第 i 个等位基因的频率)

个体识别率: $DP = 1 - \sum P_{i2} = 0.93$

(P_i 代表群体中第 i 个表型的频率)

$$\text{非父排除率: } C_E = \sum P_i (1 - P_i)^2 (1 - P_i + P_{i2})^2 + \sum \sum P_i P_j (P_i + P_j) (1 - P_i - P_j)^2 = 0.61$$

(P_i 代表群体中第 i 个基因的频率, P_j 代表群体中第 j 个基因的频率)

2.5 遗传距离

采用 Nei 氏公式计算出 6 个群体间的遗传距离, 画出 6 个群体间的系统树(见图 2)。

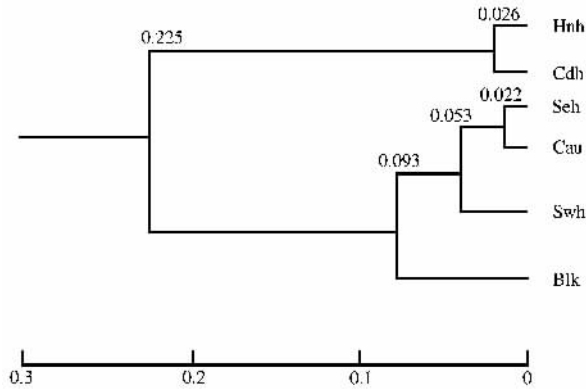


图 2 依据 vWA 基因座的 6 个群体进化系统树
Fig. 2 vWA evolution systemic tree of 6 ethnic groups

2.6 显著性检验

不同群体 vWA 基因座等位基因频率及 χ^2 显著性检验: vWA 基因座等位基因频率在不同人群中的分布特征不同, 河南汉族、成都汉族常见的等位基因分别为 vWA * 14、vWA * 17, 而美国黑人和西班牙人的 vWA * 16、高加索人和东南西班牙人的 vWA * 17 的基因频率最高。 χ^2 检验结果说明河南汉族与成都汉族在 vWA 基因座等位基因频率分布

特征上无差异, 而河南汉族与 美国黑人、西班牙人、高加索人、东南西班牙人均存在显著性差异(见表 3, 4)。

表 3 6 个群体 vWA 基因座等位基因频率比较

Table 3 Gene frequency Comparison of vWA in 6 ethnic groups

	Han (Henan 汉族)	Han (Chengdu 汉族)	Blk (美国黑人)	Cau (高加索人)	Seh (东南西班牙人)	Swh (西班牙人)
* 11	0	0	0.003	0	0	0.002
* 13	0.005	0.004	0.006	0.005	0.004	0.000
* 14	0.259	0.232	0.067	0.102	0.069	0.062
* 15	0.035	0.012	0.236	0.112	0.100	0.076
* 16	0.171	0.157	0.269	0.202	0.269	0.360
* 17	0.211	0.302	0.183	0.263	0.304	0.222
* 18	0.214	0.182	0.136	0.222	0.188	0.195
* 19	0.096	0.099	0.072	0.084	0.050	0.071
* 20	0.008	0.012	0.028	0.010	0.017	0.012
Total	374	250	360	392	480	406

表 4 6 个群体 vWA 基因座等位基因频率分布 χ^2 检验

Table 4 χ^2 test of vWA allelic gene frequency distribution of in 6 ethnic groups

	Han (Henan 汉族)	Han (Chengdu 汉族)	Blk (美国黑人)	Cau (高加索人)	Seh (东南西班牙人)	Swh (西班牙人)
$\chi^2 = 9.86$	$\chi^2 = 118.48$	$\chi^2 = 45.48$	$\chi^2 = 86087$	$\chi^2 = 85068$		
$df = 7$	$df = 8$	$df = 7$	$df = 7$	$df = 7$	$df = 8$	
$P > 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	

3 讨 论

短串联重复序列 (STR), 又称微卫星 DNA (microsatellite DNA), 是基因组中广泛存在的一种重复序列。它散布于整个基因组中, 有着高度的多态, 并且能比较稳定的遗传, 遵守孟德尔共显性遗传规律。在构建基因组遗传图谱中, 它作为序列标记位标 (site target sequence, STS) 而起着重要作用; 它对于基因定位、克隆, 遗传病的连锁诊断等方面也有重要意义。另一方面, 它的多态分布在不同的民族和群体中有着一定的差异, 代表着一个民族和群体的遗传特征, 反映了群体间的进化关系。对它的群体遗传特征进行调查研究对群体遗传学和人类学有着重要意义; 并为其在法医遗传学中的应用提供群体数据, 起着理论指导作用。

近年来, 国内外学者对 STR 展开了广泛的研

究,获得了多个基因座在不同群体中的遗传学资料,并且应用于法医学中的个体识别和亲权鉴定^[9~14]。目前已经有学者对我国南部白族、傣族等少数民族的 *vWA* 遗传多态性进行了研究,获得了各少数民族的 *vWA* 基因座的群体遗传学特征^[15]。河南地处中原,中华民族历史上在此汇聚交流,河南群体的遗传学特征对中国汉族人群有较好的代表性,我们对河南群体的遗传学特征进行研究,可以对中国汉族人群的遗传学特征有初步的了解。

我们对 *vWA* 的群体遗传学特征进行了调查研究,发现了 8 个等位基因,24 个基因型。该基因座的杂合度为 0.80,个体识别率为 0.93,非父排除率 0.61,具有多态性好、符合 Hardy—Weinberg 平衡等优点,可以用于个体识别和亲权鉴定。对于河南群体和其它群体间的比较研究^[16,17],可以看到,河南群体与成都群体间的遗传距离最近,这符合进化的规律。另外可以看到西班牙人中的两个群体之间距离也是最近的。然而,我们得到系统树与用血清遗传标记所得到的结果有一些差异,我们发现中国人与白种人的距离要近于与黑种人之间的距离,而血清遗传标记显示白种人与黑种人之间的距离要近于中国人。这可能与 STR 与血清遗传标记在进化上所受选择压力不同造成的,血清遗传标记要受到一定的进化选择压力,而 STR 几乎不受选择压力的影响。我们采用 Chelex 法提取 DNA,可以最大限度地减少提取过程中的 DNA 损失,可以对血痕、精斑、口腔粘膜上皮细胞进行分型,这表明,对于微量的 DNA 也可以进行分型,可以用于公安机关采集现场微量遗留血样的分析。同时对于胚胎绒毛、羊水细胞的分型研究表明,该基因座也可以用于产前基因诊断。

参 考 文 献 (References):

[1] 吴 谨,李英碧,侯一平. 中国成都汉族和大理白族群体 *D3S1545* 基因座的遗传多态性研究[J]. 华西医科大学学报, 1999,30:277~279.
 [2] 邹 苹,杨 燕,李德林. 云南省白族六个基因座的遗传多态性调查[J]. 中华医学遗传学杂志,1999,16:160~163.

[3] 陈国弟,辛军平,等. 中国成都地区汉族群体 5 个 STR 基因座的遗传多态性研究[J]. 中华医学遗传学杂志,1999,16:77~80.
 [4] 吴 谨,侯一平,李英碧. 中国汉族群体和德国群体 FES 基因座的遗传多态性研究[J]. 中华医学遗传学杂志,1999,16:167~170.
 [5] 侯一平,吴 谨,李英碧. 中国汉族群体五个 STR 基因座遗传多态性研究[J]. 中华医学遗传学杂志,1999,16:228~232.
 [6] 侯一平,苟 清,等. 人类短串联重复序列 *HUMTH01* 基因座的遗传特征. 遗传学报,1996,23:174~182.
 [7] Polymeropoulos M H, Rath D S, Xiao H, *et al.* Tetranucleotide repeat polymorphism at the human C-fes/fps proto-oncogene(FES) [J]. Nuclei Acids Res,1991,19:4018.
 [8] [Http://www.gdb.org](http://www.gdb.org)
 [9] The Utah marker development. A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome[J]. Am J Hum Genet,1995,57:619.
 [10] Hou Y, Jin Z, Li Y, *et al.* *D20S161* data for three ethnic populations and forensic validation[J]. Int J Legal Med,1999,112:400~402.
 [11] Edwards A, Hammond H A, Jim L, *et al.* Genetics variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups [J]. Genomics,1992,12:241~253.
 [12] Ohno Y, Sebetan I M, Akaishi S. A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles[J]. Forensic Sci Int,1982,19:93~98.
 [13] Fisher R A. Standard calculations for evaluating a blood group system[J]. Heredity,1951,5:95~102.
 [14] Hou Y, Prinz M, Staak M. Comparison of different tests for deviation from Hardy—Weinberg equilibrium of AMFLP population data[M]. In: Bar W, Fiori A, Rossi U. eds. Advances in forensic haemogenetics 5. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag,1994,511~514.
 [15] 邹浪萍,申 滨,杨 燕,李德林,褚嘉祐. 云南十个少数民族的 *F13A01*、*FESFPS* 和 *vWA* 位点遗传多态性分析[J]. 遗传学报,2001,28(10):895~902.
 [16] Kupferschmid T D, Calicchio T, Budowle B. Main Caucasian population DNA database using twelve short tandem repeat loci[J]. J Forensic Sci,1999,44(2):392~395.
 [17] Budowle B, Tamyra R, Moretti, A L. Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, U. S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians [J]. J Forensic Sci,1999,44(6):1277~1286.