

·技术与应用·

D18S51 及其侧翼区 3 个 SNP 组成的 SNP-STR 在亲子鉴定中的应用

高泾尚¹, 叶 懿², 侯一平²

(1. 西藏自治区公安厅物证鉴定中心, 西藏 拉萨 850000; 2. 四川大学华西基础医学与法医学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 将一个单倍型区块内的遗传标记单核苷酸多态性(SNP)和短串联重复序列(STR)组成 SNP-STR 单倍型, 调查其在成都汉族人群中的分布, 并探讨其在特殊亲子鉴定案例中的应用价值。方法 选取 DNA 联合索引系统(combined DNA index system, CODIS)中突变率较高的基因座 *D18S51*, 与其侧翼区的 3 个 SNP 位点(rs8089331、rs8094489、rs7236090)组成 SNP-STR, 通过巢式等位基因特异性 PCR 的方法获得 SNP-STR 单倍型, 调查该单倍型在 75 名成都汉族人群中的分布, 并应用于两例 *D18S51* 基因座不符合遗传规律的二联体亲子鉴定案件。结果 成功建立 SNP-STR 分型方法, 在成都汉族人群中共发现 43 种单倍型, 多态性为 0.948 6, 并成功解决了两例二联体亲子鉴定案件。结论 SNP-STR 具有良好的多态性, 有望应用于特殊的亲缘关系鉴定。

关键词: 法医遗传学; 短串联重复序列; 单核苷酸多态性; 遗传标记; 组合; 成都; 汉族

中图分类号: DF795.2 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2017.06.008

文章编号: 1004-5619(2017)06-0607-04

Application of SNP-STR Composed by *D18S51* and Three SNPs of Its Flanking Region in Paternity Testing

GAO Jing-shang¹, YE Yi², HOU Yi-ping²

(1. Institute of Forensic Science, Tibet Autonomous Region Public Security Department, Lhasa 850000, China; 2. West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To develop a SNP-STR haplotype by consisting of the SNP and STR genetic markers, both of which locate in a haplotype block. To investigate its distribution in Han population from Chengdu, and explore its application in some special cases of paternity testing. **Methods** *D18S51*, one of the high mutation rate STR markers in combined DNA index system (CODIS), and three SNP loci rs8089331, rs8094489 and rs7236090 in its flanking region, were chosen to establish SNP-STR. Its haplotype was obtained by nested allele-specific polymerase chain reaction, and the relevant distribution of 75 unrelated individuals were investigated in Han population from Chengdu. The SNP-STR haplotype was tentatively applied in duo paternity testing cases with *D18S51* incompatibility. **Results** The SNP-STR typing method was established and a total of 43 haplotypes were obtained successfully in Han population from Chengdu. Its polymorphism was 0.948 6, and duo paternity testing cases were resolved by this method. **Conclusion** SNP-STR shows high diversity and can be applied in the identifications of some special paternity testing cases.

Keywords: forensic genetics; short tandem repeat; single nucleotide polymorphism; genetic markers; combination; Chengdu; Han population

短串联重复序列(STR)多态信息含量高,分型快速,是目前法庭科学领域应用最广泛的一类遗传标

记^[1]。STR 良好的多态性源于其在减数分裂过程中较高的突变率(1×10^{-3})^[2],也正因如此,日常检案中 STR 突变的现象并不罕见。当被检父和孩子有 1~2 个 STR 基因座不符合孟德尔遗传规律时,通常会考虑突变,并通过增加检测其他高度多态性且遗传稳定的 STR 基因座,使累积父权指数(combined paternity index, CPI)达到认定亲权关系的标准^[3]。但是,若被检父与可能的生父存在特殊的血缘关系(如父子关系、叔侄关

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81401557,81330073)

作者简介:高泾尚(1979—),男,主检法医师,主要从事法医病理、损伤和法医物证学研究;E-mail:35323811@qq.com

通信作者:侯一平,男,教授,博士研究生导师,主要从事法医遗传学研究;E-mail:forensic@scu.edu.cn

系、同胞兄弟关系等),他们之间可能仅有个别 STR 基因座无相同的等位基因^[4],这种情形下,被检父和孩子之间存在仅有 1~2 个 STR 基因座不符合遗传规律的可能,在没有检测其他可疑亲属的情况下,得出认定的结论,会有误判的风险^[5]。如果只能提供被检父的样品,则需要增加检测多态性更好而且稳定的遗传标记,才能有效地排除近亲属。

在选择多态性好且稳定的遗传标记方面,不少学者将处于一个单倍型区块的遗传标记 STR、单核苷酸多态性(SNP)、插入/缺失(insertion/deletion, InDel)组合成新的遗传标记,例如 SNP-SNP^[6]、SNP-STR^[7]和 Multi-InDel^[8]等单倍型,均显示比单个遗传标记有更好的多态性。同时,SNP、InDel 突变率低(为 10^{-9} ~ 10^{-8})^[9],更为稳定。本研究拟选取 DNA 联合索引系统(combined DNA index system, CODIS)中突变率较高的基因座 *D18S51*^[10],与其侧翼区的 3 个 SNP 位点[rs8089331 (C/G)、rs8094489 (A/G)、rs7236090 (T/C)],组成 SNP-STR 单倍型,调查其在成都汉族人群的分布情况,并应用于二联体亲子鉴定案件。

1 材料与方法

1.1 实验对象

选取成都地区 75 名无亲缘关系的汉族个体,在签署知情同意书后,抽取肘静脉血 2 mL 留检。

1.2 DNA 提取

采用盐析法^[11]提取核基因组 DNA。

1.3 STR 分型

D18S51 基因座引物信息来自 STRBase 数据库,反应体系和反应条件参照文献[12],在 9700 型 PCR 仪(美国 AB 公司)上进行扩增,PCR 产物进行 6%聚

丙烯酰胺凝胶电泳及银染,以实验室自制的等位基因分型标准物进行分型。

1.4 SNP 的筛选和分型

在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库查看基因座 *D18S51* 侧翼序列信息,选取侧翼区最小等位基因频率>0.1 的 SNP 位点。选择的 3 个 SNP 位点(rs8089331、rs8094489 和 rs7236090)与 *D18S51* 的相对位置如图 1 所示。

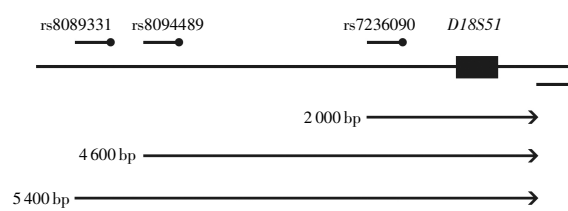


图 1 *D18S51* 及其侧翼区 3 个 SNP 的相对位置

通过等位基因特异性聚合酶链反应(allele specific polymerase chain reaction, ASPCR)方法^[13]获得 SNP 分型。根据 NCBI 数据库获取的 SNP 位点序列信息,使用 Oligo 6 软件设计引物,在正向引物 3'端引入错配碱基,通用反向引物为 5'-ATTCTACCAGCAACAA CACAAATAAAC-3',扩增采用 LATaq® DNA 聚合酶(日本 TaKaRa 公司),正向引物序列、具体反应体系及扩增条件如表 1(扩增条件均为预变性 95℃ 4 min 和最后延伸 72℃ 10 min,表中略)。PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,在紫外线灯下观察荧光带,通过条带的有无进行分型。为防止非特异性扩增导致的分型错误,每个样品同时通过限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术验证分型结果。

表 1 ASPCR 正向引物序列、反应体系、扩增条件及产物大小

正向引物	引物序列	[Mg ²⁺]/(mmol/L)	扩增条件	产物大小/kb
rs8089331C F	5'-CAGTACATGGGATGGTCTAGTAC-3'	1.375	95℃ 30s, 64.8℃ 30s, 72℃ 4min 30s, 32 个循环	5.4
rs8089331G F	5'-CAGTACATGGGATGGTCTAGTAG-3'	1.375	95℃ 30s, 62℃ 30s, 72℃ 4min 30s, 32 个循环	5.4
rs8094489A F	5'-TTGTTCCCCAGCACCAATAA-3'	1.625	95℃ 30s, 63℃ 30s, 72℃ 4min 15s, 33 个循环	4.6
rs8094489G F	5'-TTGTTCCCCAGCACCAACAG-3'	1.625	95℃ 30s, 66℃ 30s, 72℃ 4min 15s, 32 个循环	4.6
rs7236090T F	5'-CAACTAATTTATATCATTTAGGGTGAGAT-3'	1.625	95℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 1min 40s, 32 个循环	2.0
rs7236090C F	5'-CAACTAATTTATATCATTTAGGGTGAAAC-3'	1.625	95℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 1min 40s, 32 个循环	2.0

注:粗体表示人为错配的碱基

1.5 SNP-STR 单倍型分型

参照本课题组报道的巢式 PCR 技术^[7]:在 ASPCR 扩增后,选取距 STR 最远的 SNP 杂合子的 PCR 产物(如 rs8089331 为纯合子,选择 rs8094489 杂合子;如 rs8089331 和 rs8094489 为纯合子,选择 rs7236090 杂合子),稀释 10⁷ 倍作为扩增模板,重复 1.4 节获得单链的 SNP 单倍型,重复 1.3 节的步骤获得单链的 STR 分型,拼接后即可获得 SNP-STR 单倍型。

如果 3 个 SNP 均为纯合子,则直接获得单倍型。

1.6 单倍型统计

采用直接计数法计算单倍型的个数,根据 NEI^[14] 的公式计算单倍型多样性。

1.7 案例应用

案例 1:当事人怀疑孩子为妻子与自己父亲所生,故委托鉴定自己是否为孩子的生物学父亲,采用 AmpFℓSTR® Identifiler™ 试剂盒(美国 AB 公司)复合扩增后发现 *FGA*、*D18S51* 两个基因座不符合遗传规律,其中被检父基因型为 *FGA* (22,24)、*D18S51* (16,16),孩子为 *FGA* (23,26)、*D18S51* (13,17)。

案例 2:二联体亲子鉴定案例,采用 AmpFℓSTR® Identifiler™ 试剂盒复合扩增后发现 *D18S51* 基因座不符合遗传规律,被检父基因型为 *D18S51* (12,20),孩子为 *D18S51* (14,18),加做 STRtyper-10G 试剂盒(珠海科登生物技术有限公司)及本实验室自制的 miniY-STR 试剂盒^[15]进行验证。

两个案例均通过本文描述的方法获得 SNP-STR 单倍型,如果孩子可以从被检父处获得 SNP 单倍型,两步突变 PI 值^[16]的计算公式为:

$$PI = \frac{\mu_{STR}}{40P_{SNP-STR}}, \quad (1)$$

公式中 STR 位点的平均突变率(μ)参照 LI 等^[10] 的报道,*D18S51* 位点的 μ 值为 0.0025。

2 结 果

通过本研究建立的方法,成功获得 75 名个体的 150 个 SNP-STR 单倍型。仅检测 3 个 SNP 时,单倍型只有 7 种,当引入 STR 组成 SNP-STR 后,单倍型增加到 43 种。75 名个体的单倍型个数分布情况见表 2,单倍型多样性为 0.9486。

表 2 *D18S51* 基因座与其侧翼区的 3 个 SNP 组成的 SNP-STR 单倍型个数统计

SNP 单倍型	<i>D18S51</i> 分型														合计
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
CAT		1		9	22	10	6	4	7	3	2	1	4		69
CAC			1	4	7	14	12	2						1	41
GAC	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1					13
GAT				2	3	1		1				1			8
GGC			1	2			3		1						7
CGC			1	5		1									7
CGT					1				3		1				5
合计	1	2	4	23	34	29	23	8	12	4	3	2	4	1	150

案例 1 中,被检父 SNP-STR 单倍型为 CAC-16、CAC-16,孩子为 GGC-13、GAT-17,被检父和孩子无相同的 SNP 单倍型和 STR 分型,两个 SNP 和两个 STR 同时发生突变的概率极低,排除亲权关系。

案例 2 中,被检父 SNP-STR 单倍型为 CAC-12、CAT-20,孩子为 CAT-14、CAT-18,被检父和孩子有一个相同的 SNP 单倍型 CAT。引入 SNP-STR 后,PI 值为 0.001339286。联合 AmpFℓSTR® Identifiler™ 和 STRtyper-10G 两个试剂盒共 24 个 STR 基因座检测结果,CPI 为 1685160.35,检测系统的二联体非父排除率大于 0.999999^[17],且 6 个 Y-STR 基因座分型结果均符合父系遗传规律,支持父权关系的存在。

3 讨 论

STR 基因座,特别是 CODIS 的 13 个 STR 基因座,

包含在很多商品化试剂盒中,已做了大量的群体多态性调查,建立了相关的数据库,为个体识别和亲子鉴定提供了数据基础。在现有的 STR 数据基础上,引入 SNP 单倍型“尾巴”,组成 SNP-STR,可以提高遗传标记的信息量。但应注意选择的 SNP 应和 STR 在同一个单倍型区块,不能横跨突变热点。单倍型一般通过系谱推断、统计学计算或者实验法获得,对于单个个体的单倍型,只能通过实验法^[18]。本研究是通过 ASPCR 方法获取单拷贝片段,再对单拷贝片段的遗传标记进行分型,最后将分型结果顺序排列组成单倍型。但是,ASPCR 方法会出现假阳性的结果,可以通过升高退火温度、降低 Mg²⁺ 浓度、减少循环次数等方法提高 PCR 反应的特异性。同时,本研究还通过 RFLP 方法来确保 SNP 分型的正确性。但是,整个方法过于繁琐,且本次研究样品量偏少,在下一步的研究中会增加样本

量。随着三代测序平台的出现,例如单分子荧光或纳米孔^[19],可以简化获得常染色体单倍型的过程,在未来可能成为高通量且能得到较长单倍型片段的主流方法。

在成都汉族人群中,CAT、CAC 是两种主要的 SNP 单倍型,在 150 个单倍型中占了 73.3%。对于不同的 *D18S51* 等位基因,其尾随的 SNP 单倍型分布也各不一样:等位基因为 13、14 时,CAT 占多数;等位基因为 15、16 时,CAC 占多数。

单倍型区块中 SNP 个数越多,单倍型种类越多,*CSFIPO* 侧翼区的 5 个 SNP 共发现了 26 种单倍型^[7]。由于 SNP 突变率极低,多个 SNP 同时突变的情况接近于零。因此,案例 1 中孩子的 SNP 单倍型无法从被检父处找到来源,可以排除被检父为其生物学父亲的可能。如果能找到 SNP 单倍型来源,可以直接观察孩子的 STR 突变来自父亲的哪一条染色体。案件 2 中被检父和孩子有一个相同的 SNP 单倍型 CAT,所以孩子 *D18S51* 等位基因 18 是由被检父的等位基因 20 滑脱了 2 个核心序列后产生。将 SNP-STR 引入 PI 的计算,简化了公式,同时降低了误判的可能性,较 STR 可能会有更高的 PI 值,使 CPI 达到认定亲权关系的标准^[7]。

相对于 STR,SNP-STR 能以较少的数量达到 STR 同样的效能,而且可以在复杂亲缘关系鉴定中发挥重要的作用,应引起法医学者的重视。

参考文献:

- [1] 侯一平. 法医常染色体 STR 分型[J]. 中国法医学杂志, 2001,16(1):1-5.
- [2] 刘素娟,李成涛,陈文静,等. 常染色体 STR 突变率的研究[J]. 中山大学学报(医学科学版),2013,34(3):326-330.
- [3] 中华人民共和国司法部司法鉴定管理局. 亲权鉴定技术规范:SF/Z JD0105001—2016[S].2016.
- [4] ZAKEN N, MOTRO U, BERDUGO R, et al. Can brothers share the same STR profile?[J]. Forensic Sci Int Genet,2013,7(5):494-498.
- [5] 陈芳,陈俭,徐恩萍,等. 争议父与生父存在近亲血缘关系的亲权鉴定[J].法医学杂志,2015,31(2):150-151,155.
- [6] GE J, BUDOWLE B, PLANZ J V, et al. Haplotype block: a new type of forensic DNA markers[J]. Int J Legal Med,2010,124(5):353-361.
- [7] YE Y, LUO H, LIAO L, et al. A case study of SNPSTR efficiency in paternity testing with locus incompatibility[J]. Forensic Sci Int Genet,2014,9:72-75.
- [8] HUANG J, LUO H, WEI W, et al. A novel method for the analysis of 20 multi-Indel polymorphisms and its forensic application[J]. Electrophoresis,2014,35(4):487-493.
- [9] NACHMAN M W, CROWELL S L. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans[J]. Genetics, 2000,156(1):297-304.
- [10] LI H X, TONG D Y, LU H L, et al. Mutation analysis of 24 autosomal STR loci using in paternity testing[J]. Forensic Science International: Genetics Supplement Series,2011,3(1):e159-e160.
- [11] MILLER S A, DYKES D D, POLESKY H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells[J]. Nucleic Acids Res,1988,16(3):1215.
- [12] 李怡,司艳梅,杨艳丽,等. 河南汉族群体 *D18S51* 基因座的遗传多态性研究[J].中国优生与遗传杂志,2002,10(5):10-11,17.
- [13] HAYASHI K, HASHIMOTO N, DAIGEN M, et al. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus[J]. Theor Appl Genet,2004,108(7):1212-1220.
- [14] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics,1978,89(3):583-590.
- [15] ZHANG D, ZHANG D, WU W, et al. Haplotypes of six miniY-STR loci in the Han population from Sichuan province and the Zhuang population in Guangxi Zhuang autonomous region[J]. Forensic Sci Int Genet,2009,3(2):e49-e51.
- [16] Mutations in Paternity[Z/OL]. [2017-02-10]. <http://dna-view.com/mudisc.htm>.
- [17] HOU J Y, TANG H, LIU Y C, et al. How many markers are enough for motherless cases of parentage testing[J]. Forensic Science International: Genetics Supplement Series,2008,1(1):649-651.
- [18] 叶懿,罗海玻,侯一平. 单倍型的分析及其法医学应用[J].法医学杂志,2009,25(2):133-137.
- [19] SCHNEIDER G F, KOWALCZYK S W, CALADO V E, et al. DNA translocation through graphene nanopores[J]. Nano Lett,2010,10(8):3163-3167.

(收稿日期:2016-02-14)

(本文编辑:柳 燕)