

TPOX 基因座三带型的检出及初步分析

张玉红^{1*}, 黄洪武²

(¹江苏省南通市公安局刑警支队, 南通 226007; ²昆山市公安局刑警大队)

[摘要] 目的:对检出 TPOX 基因座三带型进行初步分析。方法:通过 PCR 扩增,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染技术对 TPOX 基因座进行分型,并对检出的三带型进行分析。结果:在 2 例样本中,TPOX 基因座均出现三带型等位基因,两者的 3 个等位基因在荧光检测引物区内除重复次数不同其他序列完全相同,2 个样品的等位基因在荧光引物外侧存在几处突变。结论:通过不同方法验证,三带型等位基因在 TPOX 基因座上确存在。

[关键词] 三带型等位基因;TPOX 基因座;短串联重复序列

[中图分类号] Q343.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1674-7887(2013)06-0503-03

Analysis on 3 tri-allelic variant cases of the STR TPOX locus

ZHANG Yuhong^{1*}, HUANG Hongwu² (¹Criminal Police Branch, Nantong Public Security Bureau, Jiangsu Province, Nantong 226007; ²Criminal Police Brigade, Kunshan Public Security Bureau)

[Abstract] Objective: To investigate the three-banded alleles of the STR TPOX locus. Methods: The genotype of the TPOX locus was determined and analysed by PCR technique followed by the non-denatured PAGE and silver staining. Results: Three-banded alleles were detected in the TPOX locus of two samples. Sequencing proved that the only difference among them was the number of repeat unit for sample one. It might be due to the unequal exchange between homologue chromosomes, which resulted in the chimera. Conclusion: Three-banded alleles of the TPOX locus were detected and confirmed by different methods.

[Key words] three-banded alleles; TPOX locus; short tandem repeat

短串联重复序列(short tandem repeats, STR)是由 2~6 个碱基组成为核心单位重复串联的一类 DNA 序列,核心重复单位数目的变化构成了其遗传多态性^[1]。在人类基因组中,平均每 15~20 kb 就有 1 个 STR 基因座,这不仅为人类提供了丰富的遗传标志来源,更有益于个体识别^[2-3]。STR 现已广泛应用于群体遗传学、遗传病诊断和法医学鉴定等^[4]。

Thyroid peroxidase(TPOX)基因座发现于人类甲状腺过氧化物酶基因的第 10 个内含子,位于人类 2 号染色体短臂近末端(2p23-2pter),其序列图的位置(Sequence Map Position)为 1 483 854~1 484 085 bp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)^[5]。它是 4 个核苷酸 AATG 为重复单位串联重复形成的微卫星序列。R. Anker^[6]于 1992 年首次报道了其遗传多态性。目前,在 13 个 Combined DNA Index System(CODIS)核心基因座中已经超过 50 种不同的三带型,大多见于 TPOX 和 FGA^[7]。笔者在检测 STR 基因座时发现 TPOX 基因座出现三带型,并对其进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 样本 血样采自于违法人员 DNA 数据库个体。

1.2 DNA 制备 采用 Chelex-100 快速提取法制备基因组 DNA。

1.3 PCR 扩增 根据文献[8]自行设计 TPOX 大片段克隆引物,序列如下:上游引物 5'-CCCAGCACACACCTTGCCTC-3',下游引物 5'-GAGCACTCTCGTGTTCGCTC-3'。PCR 扩增体系:ddH₂O 9.9 μL, 2.5× Reaction Mixture 10 μL, 模板 DNA 4.0 μL, 引物混合物(20 μmol)0.6 μL, 热启动 Taq 酶(5 U/μL)0.5 μL, 扩增循环参数:95℃预变性 11 min, 94℃变性 45 s, 58℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环,最后 60℃延伸 60 min, 4℃保存。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用胶浓度 6%, 交联度 5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶(200 mm×200 mm×0.5 mm)垂直板电泳。将 5 μL 扩增产物与双倍体积样品缓冲液混匀上样,预电泳 20 min,电压 300 V,电泳 1.5~2 h。电泳后银染显色。

1.5 目的基因克隆 根据 Bio-Basic pUCm-T Vector 操作手册,将 PCR 扩增产物与 pMD18-T simple vector 连接后转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂布 LB 平板培养基(含氨苄青霉素、IPTG、X-Gal),37℃培养 14~16 h,筛选白色阳性克隆菌落进行 PCR 验证(AGCU 17+1 STR 荧光检测试剂盒),扩增体系:ddH₂O 9.9 μL, 2.5×Reaction Mixture 10 μL, 模板 DNA 4.0 μL, 引物混合物(20 μmol)0.6 μL, 热启动 Taq 酶(5 U/μL)0.5 μL。扩增循环参数:95℃预变性

* [作者简介] 张玉红,女,汉族,生于 1968 年 11 月,江苏省南通市人,副主任,研究方向:DNA 检验技术。

11 min 94 °C变性 45 s 60 °C退火 30 s 72 °C延伸 1 min , 共 30 个循环 ,最后 60 °C延伸 60 min 4 °C保存。

1.6 毛细管电泳检测及测序 取 1 μL 扩增产物加入适量甲酰胺 ,95 °C变性 3 min ,经 ABI 3130 基因分析仪电泳。将含有目的等位基因的克隆样品送至上海生工生物技术公司进行测序。

2 结 果

在用 AGCU 17+1 STR 荧光检测试剂盒进行 STR 分型时 ,发现 2 例样本中 TPOX 基因座出现三带型 :样本 1 的 3 个等位基因为 8、11、12 ,样本 2 为 8、9、11 ,两者 3 个峰的峰高、峰面积、信号强度基本相同(图 1~2)。重复提取样本 DNA ,采用不同的试剂盒(AmpFISTR Identifiler™ 和 PowerPlex® 16)进行 PCR 扩增、毛细管电泳检测结果一致。此结果排除了由实验室的污染或电泳时泳道渗漏造成的假象的可能 ,也说明该结果不是 PCR 扩增引起的非特异产物。

为究其原因 ,另外我们对样本 1、2 的基因座分别进行了大片段克隆 ,获得各等位基因克隆后进行测序(图 3~4)。得出样本 1、2 的 TPOX 基因座的 3 个等位基因在荧光检测引物区内 ,除重复次数不同外其它序列完全相同。说明都是真正存在的 TPOX 等位基因。

3 讨 论

近年 ,STR 作为重要的遗传标志已在基因定位、法医鉴定、遗传育种等领域得到广泛应用。正常人群中 90%以上个体在单个 STR 基因座的 PCR 扩增时 ,表现为 2 条带或 2 个峰(杂合子) ,且它们的荧光强度比相同(1:1) ,少部分正常人为纯合子 ,表现为 1 条带

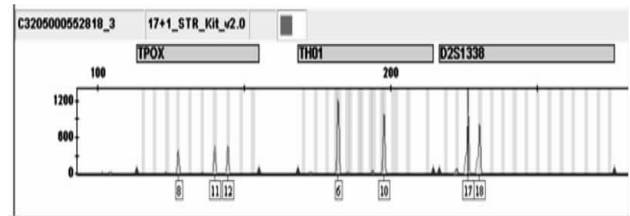


图 1 样本 1 AGCU 17+1 分型结果

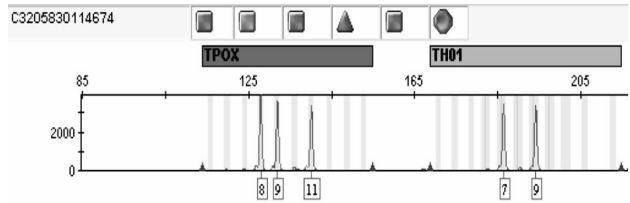


图 2 样本 2 AGCU 17+1 分型结果

或 1 个峰^[9]。1999 年 ,C.A.Crouse 等^[10]首次发现 18 例 TPOX 基因座及 1 例 CSF1PO 基因座出现三带型等位基因的个体 ,其信号强度、峰高和峰面积接近。R.J.Rubocki 等^[11]检测的 1 个个体 9 个基因座中有 4 个基因座(vWA、FGA、TH01、D5S818)都表现为三带型等位基因 ,且有 2 条荧光强度很高的“主带”和 1 条荧光强度较低的“次带”。后得知该个体有 1 个双胞胎兄弟 ,推测可能在子宫内胚胎间发生血液交换导致三带型等位基因的出现。2009 年 ,李坤明^[12]检出 D3S1358 基因座存在三条带并对其进行了分析。目前在 STR 数据库中(<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>)共收录了 198 例 21 个 STR 基因座的三带型等位基因资料(包括 CODIS 系统的 13 个常染色体 STR、Penta D、Penta E、D2S1338、D19S433、FES/FPS、D10S1248、D12S391 和 DYS456)^[13]。在已有报道^[5]中 TPOX 基因座出现三带型的概率是最高的 ,中国汉族人群 TPOX 位点出现 3 等位基因的频率约为万分

TPOX-12	ACTGGCACAG	AACAGGCACTTAGGGAA	CCCTCACTGAATGAATGAATGAATGAATGAATG
TPOX-11	ACTGGCACAG	AACAGGCACTTAGGGAA	CCCTCACTGAATGAATGAATGAATGAATGAATG
TPOX-8	ACTGGCACAG	AACAGGCACTTAGGGAA	CCCTCACTGAATGAATGAATGAATGAATGAATG

TPOX-12	AATGAATGAATGAATGAATGAATG	TTTGGGCAAATAAACGCTGACAAGGACAGAAGGGCC	
TPOX-11	AATGAATGAATGAATGAATG	TTTGGGCAAATAAACGCTGACAAGGACAGAAGGGCC	
TPOX-8	AATGAATG	TTTGGGCAAATAAACGCTGACAAGGACAGAAGGGCC	

TPOX-12	TAGCGGGAAGGGAACAG	GAGTAAGACCAGCGCACAG	CCCGACTTGTGTTTCAGAAGACCTG
TPOX-11	TAGCGGGAAGGGAACAG	GAGTAAGACCAGCGCACAG	CCCGACTTGTGTTTCAGAAGACCTG
TPOX-8	TAGCGGGAAGGGAACAG	GAGTAAGACCAGCGCACAG	CCCGACTTGTGTTTCAGAAGACCTG

注 :方框 ,荧光检测引物结合区 ;加粗字体 ,核心重复区。

图 3 样本 1 TPOX 核心重复序列比对结果

```

TPOX-11      CGACTGGCACAGAACAGGCACTTAGGGAACCCTCACTGAATGAATGAATGAATGAATGAA
TPOX-9       CGACTGGCACAGAACAGGCACTTAGGGAACCCTCACTGAATGAATGAATGAATGAATGAA
TPOX-8       CGACTGGCACAGAACAGGCACTTAGGGAACCCTCACTGAATGAATGAATGAATGAATGAA
*****

TPOX-11      TGAATGAATGAATGAATGAATGTTTGGGCAAATAAACGCTGACAAGGACAGAAGGGCCTA
TPOX-9       TGAATGAATGAATG-----TTTGGGCAAATAAACGCTGACAAGGACAGAAGGGCCTA
TPOX-8       TGAATGAATG-----TTTGGGCAAATAAACGCTGACAAGGACAGAAGGGCCTA
*****

TPOX-11      GCGGAAGGGAACAGGAGTAAGACCAGCGCACAGCCCGACTTGTGTTCAGAAGACCTGGG
TPOX-9       GCGGAAGGGAACAGGAGTAAGACCAGCGCACAGCCCGACTTGTGTTCAGAAGACCTGGG
TPOX-8       GCGGAAGGGAACAGGAGTAAGACCAGCGCACAGCCCGACTTGTGTTCAGAAGACCTGGG
*****

```

注 :方框 荧光检测引物结合区 ,加粗字体 核心重复区。

图 4 样本 2 TPOX 核心重复序列比对结果

之一。

目前三带型等位基因产生的确切机制尚不十分明确,我们推测,这种现象的产生原因可能有以下几个方面:一是同源染色体在减数分裂时不等价交换所致;本案例即是某一 2 号染色体上出现 2 个 TPOX 基因座的“嵌合”而导致个体的 3 个序列同时存在;二是在受精卵发育阶段,染色体不分离产生不同基因型细胞组成的嵌合体;三是异基因骨髓或造血干细胞移植后形成的嵌合体,形成三或四带等位基因^[11,14]。综上所述,导致 STR 基因座出现三带型等位基因的原因繁多。

在基因分型时,三带型等位基因现象时有发生,应当引起重视。首先应重复实验排除模板、试剂等污染问题,然后采用其他扩增体系进一步验证。若 1 个基因座上仍能检出三条带,应对该基因座进行克隆测序,以保证鉴定结论的可靠性。对于三带型等位基因的处理,应视情况而定,大体分为:(1)在 DNA 数据库建设时,应根据建库要求对三带型基因座进行酌情处理,或删除或保留,建议在内部文档进行存储,以备后续研究;(2)在刑事案件分析时,由于样品均取自于现场,往往可根据三带型的特殊性进行嫌疑人的侦查摸排,为侦破案件提供有价值的线索,故应对其进行保留。

[参考文献]

[1] Edwards A, Civitello A, Hammond HA, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats[J]. Am J Hum Genet, 1991, 49(4):746-756.

[2] Edwards A, Hammond HA, Jin L, et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups[J]. Genomics, 1992, 12(2):241-253.

[3] Lins AM, Sprecher CJ, Puers C, et al. Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci-silver stain and fluorescence detection[J]. Biotechniques, 1996, 20(5):882-889.

[4] 美朗曲措, 应斌武, 范红. 6 个 STR 基因座在四川成都汉族人群多态性分布[J]. 华西医学, 2009, 24(1):143-145.

[5] 刘秋玲, 赖运科, 吕德坚, 等. TPOX 基因座遗传多态性及三等位基因研究[J]. 证据科学, 2010, 18(6):748-749.

[6] Anker R, Steinbrueck T, Donis-Keller H. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase(hTPO) locus[J]. Hum Mol Genet, 1992, 1(2):137.

[7] Butler JM. 法医 DNA 分型[M]. 侯一平, 刘雅诚, 译. 北京: 科学出版社, 2007:126-130.

[8] Huang NE, Schumm J, Budowle B. Chinese population data on three tetrameric short tandem repeat loci-HUMTHO1, TPOX, and CSF1PO-derived using multiplex PCR and manual typing[J]. Forensic Sci Int, 1995, 71(2):131-136.

[9] 曾艳红, 孙宏钰, 伍新尧, 等. STR 基因座中检出三带型等位基因 5 例[J]. 中国法医学杂志, 2003, 18(2):112-113.

[10] Crouse CA, Rogers S, Amiett E, et al. Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems[J]. J Forensic Sci, 1999, 44(1):87-94.

[11] Rubocki RJ, Mccue BJ, Duffy KJ, et al. Natural DNA mixtures generated in fraternal twins in utero[J]. J Forensic Sci, 2001, 46(1):120-125.

[12] 李坤明. D3S1358 基因座检出三条带分析[J]. 法医学杂志, 2009, 25(4):316-317.

[13] 韩莉莉, 潘棱, 沈晓丽, 等. STR 基因座中检出三带型等位基因三例及遗传分析[J]. 海南医学, 2011, 22(15):1-3.

[14] 李璞. 医学遗传学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000:139-150.

[收稿日期] 2013-09-29