

鲁西南地区汉族人群 15 个 STR 基因座的突变观察与分析*

党珍^{1,2} 侯秀迪² 张晗¹ 王丹¹ 侯森^{1,2} 王业全^{1,2△}

(¹ 济宁医学院法医学与医学检验学院, 济宁 272067; ² 济宁医学院司法鉴定中心, 济宁 272013)

摘要 目的 观察和分析 15 个常染色体 STR 基因座在鲁西南地区汉族人群亲子鉴定中的突变现象及规律。方法 应用直接扩增法对 15 个常染色体 STR 基因座进行荧光标记复合扩增 PCR, 扩增产物用 3500 遗传分析仪电泳分离, GeneMapper ID-X 分析软件进行 STR 结果分型。并对 2013-2015 年受理的 9326 例亲子鉴定进行 STR 基因座突变规律的研究。结果 9326 例亲子鉴定中共观察到 77 例突变, 其中一步突变占 97.4%, 两步突变及三步突变各占 1.3%。在 15 个 STR 基因座中除 TH01 和 TPOX 外均发生突变, 突变频率介于 0 至 0.0011, 整体突变率为 0.0006。父源性 STR 基因座突变率远远高于母源性突变(3:1)。结论 STR 基因座突变是一种较为常见的遗传现象, 通过对突变案例的观察分析, 能够为法医物证学亲子鉴定 STR 基因座的选择提供有效的理论支撑, 避免突变对鉴定结论的干扰以保证鉴定结果的客观准确。

关键词 STR; 汉族; 亲权鉴定; 突变

中图分类号 DF795.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)12-434-05

Mutation analysis of 15 STR loci in the Han population of southwest Shandong province

DANG Zhen^{1,2}, HOU Xiudi², ZHANG Han¹, LV Chenxi¹, HOU Sen^{1,2}, WANG Yequan^{1,2}

(¹ Institute of Forensic Medicine and Laboratory Medicine, Jining Medical University, Jining 272067;

² Forensic Science Center of Jining Medical University, Jining 272013, China)

Abstract: Objective To observe and analyze the mutation phenomenon of 15 STR loci in Han population of southwest Shandong province. **Methods** In this study, the samples were directly amplified without DNA extraction by PCR amplification kit according to the manufacture's protocol. The detection of PCR products and genotyping were carried out on the ABI 3500 Genetic Analyzer using the ABI GeneMapperID-X data collection software. 15 STR loci were studied during 2013-2015 in 9,326 paternity testing cases in forensic science center of Jining Medical University. **Results** In the 9,326 cases, one step mutation cases were observed in which 97.4% of the total 77 mutations occurred. Two steps and three steps mutations had been occurred, respectively. Among them no mutation was found at TH01 and TPOX loci. The locus-specific mutation rate ranged from 0 to 0.0011, and the overall mutation rate estimation was 0.0006. The paternal mutation rate was more frequent than the maternal rate (3:1). **Conclusion** STR loci mutation is a common phenomenon. Our results provide useful information for further investigation on STR mutation in forensic genetics and population genetics, which ensures that the results are accurate and reliable.

Keywords: Short tandem repeats; Han population; Paternity testing; Mutations; Population genetics

短串联重复序列(short tandem repeats, STR),

又称微卫星 DNA, 是目前亲子鉴定及个体识别等法医物证鉴定工作中应用最广泛的长度多态性遗传标记, 也是亲权鉴定最行之有效的检验方法, 它的重复单位为 2~6bp, 具有高度多态性、重复单位较小、易于扩增、灵敏度高、可实现自动化分型等特

* [基金项目] 济宁医学院科研计划项目 (JY2015KJ006、JY2015BS01); 济宁市科技发展计划项目 (2015-57-85); 大学生创新训练计划项目 (cx2016028、201610443028)

△ [通信作者] 王业全, E-mail: wangyequan1103@163.com

点^[1-2]。但基因突变或 STR 分型异常可能会影响亲子鉴定结果的正确性,面临错判的风险,对刑事案件的侦破产生误导,因此,必须对 STR 基因座的突变高度重视^[3-4]。在亲子鉴定中,如果 1 个或多个 STR 基因座不符合孟德尔遗传定律,那么就需要用其他试剂盒来进行验证 STR 分型结果,证实突变客观存在,并根据司法部《亲权鉴定技术规范》(SF/Z JD0105001-2016)的要求增加 STR 基因座的数量,使得亲权指数大于 10^4 以排除突变对鉴定结果的影响^[5]。本文通过对 9326 例的亲子鉴定案件观察,对 15 个常染色体 STR 基因座的突变率、突变类型、父源或母源特异性突变等进行探讨分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料

9326 例亲子鉴定案件样本均来自济宁医学院司法鉴定中心法医物证鉴定室 2013 - 2015 年受理的鲁西南地区(包括济宁、菏泽、临沂)亲子鉴定案件。

1.2 仪器与试剂

9700 型 PCR 扩增仪(AB 公司,美国);ABI-3500 型遗传分析仪(AB 公司,美国);GeneMapper ID-X 分析软件(AB 公司,美国);AmpFISTR 扩增试剂盒(AB 公司,美国);Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒(基点认知公司,中国);除性别基因座外,包含共有的 15 个 STR 基因座分别是: D19S433、D5S818、D21S11、D18S51、D3S1358、D13S317、D7S820、D16S539、CSF1PO、vWA、D8S1179、TPOX、TH01、D2S1338、FGA。

1.3 实验方法

FTA 卡法进行直接 PCR 扩增,使用打孔器取直径 0.5mm 样本,采用 AmpFISTR 荧光标记复合直接扩增试剂盒进行扩增,反应总体系为 $10\mu\text{L}$,内含 PCR Master Mix $5.0\mu\text{L}$ 、Primer Mix $5.0\mu\text{L}$ 。热循环参数为 95°C 11min; 94°C 20s, 59°C 2min, 72°C 1min,共 25 个循环; 60°C 25min; 4°C 保温。如果进行复检则用 Goldeneye 20A 荧光标记复合直接扩增试剂盒进行扩增,反应总体系为 $10\mu\text{L}$,包括 PCR Master Mix $5.0\mu\text{L}$ 、Primer Mix $2\mu\text{L}$ 、Taq 酶 0.2ul 、水 2.8ul 。热循环参数为 95°C 11min; 94°C 30s, 60°C 2min, 70°C 1min,共 27 个循环; 60°C 60min, 4°C 保温。取 $1\mu\text{L}$ 扩增产物与内标 orange-500LIZ $0.3\mu\text{L}$

和去离子甲酰胺 $8.7\mu\text{L}$ 混合,扩增产物通过 3500 遗传分析仪电泳分离,然后应用 GeneMapper ID-X 分析软件进行 STR 结果分型。使用 <http://statpages.org/confint.html> 在线计算功能,计算突变率以及 95% CI(置信区间)。

2 结果

2.1 突变结果的确定

在法医物证亲子鉴定案件中,如果有 3 个或 3 个以上的常染色体 STR 基因座等位基因违反孟德尔遗传规律时,才可以排除亲权关系。若只有 1 个或 2 个 STR 基因座不符合遗传规律时,且基因分型相差一个重复单位时(如图 1),不能轻易做出排除亲子关系的结论,应考虑基因突变的可能,必需加做其他 STR 基因座,以确定鉴定结果^[6-7]。因此本文首先确定 9326 例亲子鉴定案件的 STR 分型结果,按照司法部《亲权鉴定技术规范》(SF/Z JD0105001-2016)其亲权指数均大于 10^4 ,并符合孟德尔遗传规律,支持亲子关系结论正确。其中发生突变的亲子鉴定案例都要通过加做其他试剂盒进行验证以排除主客观因素对实验结果的影响,进而保证突变的客观存在。

2.2 突变事件观察概况

在 9326 例亲子鉴定中共观察到 77 例突变,其中 75 例突变为一步突变,同时也分别观察到 1 例两步突变和三步突变的发生。在 15 个 STR 基因座中,除 TH01 和 TPOX 基因座外,其余 13 个基因座均观察到存在 STR 突变的发生。15 个 STR 基因座的突变率介于 $0 \sim 0.0011$,95% CI 为 $0.0000 \sim 0.0020$,平均突变率为 0.0006,突变率最高的 STR 基因座是 vWA,突变率为 0.11% (95% CI: $0.0005 \sim 0.0020$),其次是 D21S11、D18S51 和 FGA 基因座,突变率均为 0.10% (95% CI: $0.0004 \sim 0.0018$)。见表 1。

2.3 STR 基因座突变类型分析

在观察到的 77 例突变中,STR 基因座一步突变的比例为 97.4%,其中 36 个突变是 STR 基因座一个重复单位的增加,35 个突变是 STR 基因座一个重复单位的减少,其余 4 个是来源不确定的突变。除一步突变外,还发现在 D21S11 基因座两步突变和 D5S818 基因座三步突变各 1 例,均表现为 STR 基因座重复单位的减少。见表 2。

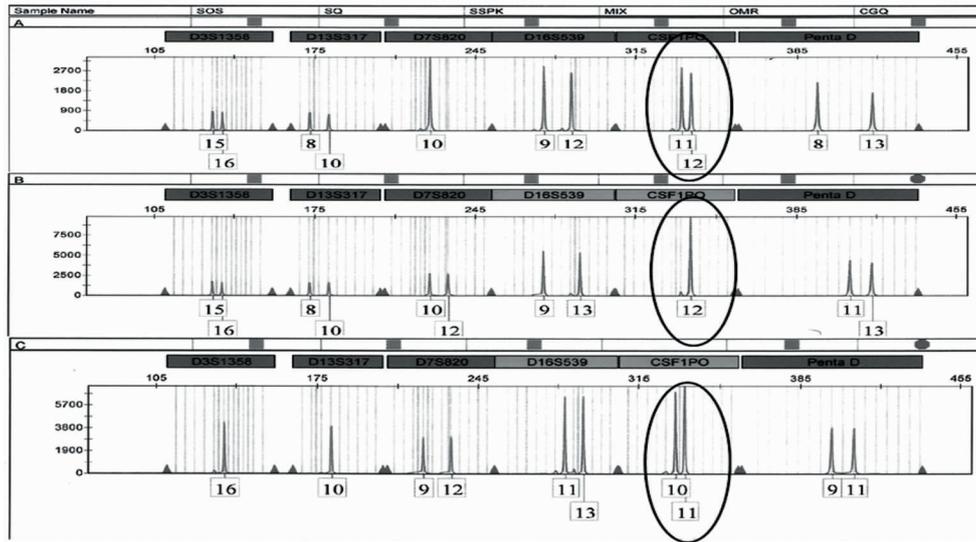


图 1 三联体亲子鉴定中 CSF1PO 基因座发生一步突变

表 1 鲁西南地区汉族人群 15 个 STR 基因座等位基因突变率和 95% 的置信区间

STR 基因座	父源			母源			父源或母源突变例数	整体概况		
	突变例数	突变率	95% CI	突变例数	突变率	95% CI		突变例数	突变率	95% CI
D19S433	2	0.0002	0.0000-0.0008	2	0.0002	0.0000-0.0008	0	4	0.0004	0.0001-0.0011
D5S818	3	0.0003	0.0001-0.0009	0	0.0000	0.0000-0.0004	0	3	0.0003	0.0001-0.0009
D21S11	2	0.0002	0.0000-0.0008	7	0.0008	0.0003-0.0015	0	9	0.0010	0.0004-0.0018
D18S51	5	0.0005	0.0002-0.0012	3	0.0004	0.0001-0.0011	1	9	0.0010	0.0004-0.0018
D3S1358	2	0.0002	0.0000-0.0008	0	0.0000	0.0000-0.0004	1	3	0.0003	0.0001-0.0009
D13S317	3	0.0003	0.0001-0.0009	0	0.0000	0.0000-0.0004	0	3	0.0003	0.0001-0.0009
D7S820	2	0.0002	0.0000-0.0008	1	0.0001	0.0000-0.0006	0	3	0.0003	0.0001-0.0009
D16S539	2	0.0002	0.0000-0.0008	2	0.0002	0.0000-0.0008	0	4	0.0004	0.0001-0.0011
CSF1PO	6	0.0006	0.0002-0.0014	1	0.0001	0.0000-0.0006	0	7	0.0008	0.0003-0.0015
vWA	7	0.0008	0.0003-0.0015	1	0.0001	0.0000-0.0006	2	10	0.0011	0.0005-0.0020
D8S1179	6	0.0006	0.0002-0.0014	0	0.0000	0.0000-0.0004	1	7	0.0008	0.0003-0.0015
TPOX	0	0.0000	0.0000-0.0004	0	0.0000	0.0000-0.0006	0	0	0.0000	0.0000-0.0004
TH01	0	0.0000	0.0000-0.0004	0	0.0000	0.0000-0.0004	0	0	0.0000	0.0000-0.0004
D2S1338	5	0.0006	0.0002-0.0014	1	0.0001	0.0000-0.0006	0	6	0.0006	0.0002-0.0014
FGA	9	0.0009	0.0004-0.0018	0	0.0001	0.0000-0.0006	0	9	0.0010	0.0004-0.0018

表 2 15 个 STR 基因座突变类型分析

STR 基因座	突变例数	突变重复单位						突变来源		
		-3	-2	-1	±1	+1	+2	父源	母源	父源或母源
D19S433	4			2		2		2	2	
D5S818	3	1				2		3		
D21S11	9		1	4		4		2	7	
D18S51	9			2	1	6		5	3	1
D3S1358	3			1		2		2		1
D13S317	3			3				3		
D7S820	3			3				2	1	
D16S539	4			3		1		2	2	
CSF1PO	7			2		5		6	1	
vWA	10			5	1	4		7	1	2
D8S1179	7			5		2		6		1
D2S1338	6			2		4		5	1	
FGA	9			3	2	4		9		
Total	77	1	1	35	4	36		54	18	5

2.4 STR 基因座突变性别差异分析

STR 基因座的突变一般是来自父源性或者母源性 STR 基因座重复单位的增加或减少。在父源性突变中 FGA (0.09%) 的突变率最高, 而母源性突变则为 D21S11 (0.08%)。在父源性 STR 基因座突变中仅有 TH01 和 TPOX 基因座未观察到突变, 而在母源性突变中 D5S818, D3S1358, D13S317, D8S1179, TH01, TPOX 和 FGA 均未观察到突变。父源性 STR 基因座整体突变率 (70.1%) 远远高于母源性 STR 基因座突变率 (23.4%), 其余 STR 基因座突变 (6.5%) 不能确定是父源性突变还是母源性突变。见表 3。

表 3 15 个 STR 基因座父源/母源突变分析

STR 基因座	突变等位基因			突变率/%
	父亲	孩子	母亲	
D19S433	14.2,17	13,16	13,14	0.04
	14.2,15	14,15.2	14,15	
	14,15	14,16.2	13,15.2	
	12,14	12,14	15,15.2	
D5S818	10,10	11,11	11,11	0.03
	10,13	11,11	11,12	
	13,13	10,10	10,12	
D21S11	30,32.2	28,31	28,32	0.10
	30.3,32	29,33	29,30	
	30,31	30,30	28.2,31	
	31.2,33	31.2,33.2	30,32.2	
	28,29	29,31	30,31.2	
	30,32	30,30	32,32.2	
	29,32.2	29,32.2	30,30	
	28,29	29,32	32.2,33	
D18S51	21,26	13,25	13,15	0.10
	17,23	19,24	16,19	
	21,23	16,22	14,16	
	13,15	16,21	14,21	
	16,17	15,23	15,23	
	15,21	15,26	13,25	
	16,19	14,16	13,18	
	13,16	16,16	14,15	
	13,15	15,16	15,19	
D3S1358	15,15	16,16	16,16	0.03
	17,17	16,16	16,17	
	15,15	15,16	15,15	
D13S317	10,10	9,9	9,12	0.04
	12,12	11,11	9,11	
	10,13	11,12	11,11	

D7S820	9,12	8,11	8,9	0.03
	8,13	11,12	11,12	
	8,11	8,9	10,11	
D16S539	10,13	12,14	12,13	0.04
	12,12	11,11	11,13	
	9,9	9,14	12,15	
	9,9	9,12	11,13	
CSF1PO	10,11	12,12	11,12	0.08
	12,12	11,13	11,12	
	11,12	10,13	10,12	
	11,11	10,12	11,12	
	11,14	12,13	12,14	
	12,12	10,13	10,11	
	11,11	11,14	12,13	
vWA	14,18	17,17	17,19	0.11
	19,19	14,20	14,14	
	17,17	14,18	14,17	
	17,21	14,20	14,16	
	15,19	16,18	16,17	
	17,19	15,18	15,19	
	14,17	16,16	16,18	
D8S1179	14,18	13,17	11,13	0.08
	12,16	10,15	10,11	
	11,14	10,13	13,14	
	14,14	15,16	13,16	
	13,14	15,16	14,16	
	13,15	12,16	12,16	
D2S1338	10,15	14,15	15,15	0.06
	19,23	20,20	20,23	
	18,24	23,25	19,23	
	20,23	19,19	19,19	
	19,23	20,24	23,24	
	24,26	19,23	19,26	
FGA	18,19	18,22	20,21	0.10
	22,23	24,24	19,24	
	23,23	22,25	20,25	
	21,26	23,25	22,23	
	22,23	19,24	19,22	
	22,24	20,23	20,21	
	20,21	19,24	20,24	
	25,25	23,26	19,23	
21,23	20,24	20,25		
21,23	22,25	22,25		

3 讨论

STR 基因座的突变率与遗传多态性程度有着

一定的关系,序列结构比较均一的基因座容易发生突变,而等位基因中含有不完全序列的基因座发生突变的概率较低,扩增片段较大的 STR 基因座更容易发生突变,这可能是由于重复单位多的基因座其长度也较长,必然多态性程度也较高,其突变概率会随之增加^[8]。本研究中突变率最高的 STR 基因座为 vWA, 突变率为 0.11%, 其次 D21S11、D18S51 和 FGA 基因座的突变率为 0.10%, 这与文献报道的结论基本一致,可能与 vWA、FGA 等基因座等位基因重复单位数目较多有关^[8]。

目前,STR 基因座的突变机制尚未清楚,普遍认可的机制是 DNA 复制滑动(replication slippage)导致 STR 基因座发生突变,同时复制滑动也是形成 STR 遗传多态性的原因之一,复制滑动突变主要表现为 STR 基因座等位基因重复单位的增加或减少^[9]。本文发现在观察到的 77 例突变中,STR 基因座一步突变占 97.4%, 其中 36 个突变是 STR 基因座重复单位的增加,35 个突变是 STR 基因座重复单位的减少。除一步突变外,还观察到在 D21S11 和 D5S818 两个基因座发生多步突变,均表现为 STR 基因座重复单位的减少,突变率为 2.6%, 且都是父源性突变,基因座突变是逐步发生的,多步突变是在前一次突变的基础上发生的,本文研究结果与其他研究结论相一致,并进一步证实了复制滑动的突变机制和逐步突变模式^[8,10-12]。

STR 基因座等位基因的突变与性别也有着一定的相关性,研究发现父源性基因突变多于母源性,突变的性别差异在本研究也得到了证实,父源性 STR 基因座的突变率高于母源性(3:1)这与其他研究的结果基本一致^[8,13]。基因的突变率与细胞分裂次数密切相关。由于男性精原细胞在发育成为精子前要经过多次分离,且分裂次数远远多于女性卵原细胞分裂的次数,因此 DNA 复制产生滑动错配的机会就增多,突变概率相应增加,除此之外随着年龄等因素的影响,最终导致男性 DNA 突变率高于女性^[14]。

因此在亲权鉴定过程中要注意 STR 基因座突变情况,通过多种 PCR 试剂盒的相互证实突变结果的客观存在,并增加其他遗传多态性好、突变率低的遗传标记进行综合判断,排除各种可能因素的干扰,以便有效避免错判的风险。

参考文献:

[1] Brettell TA, Butler JM, Almirall JR. Forensic science

[J]. Anal Chem, 2011, 83(12), 4539-4556.

- [2] Brettell TA, Butler JM, Saferstein R. Forensic science [J]. Anal Chem, 2005, 77(12): 3839-3860.
- [3] Cai GQ, Chen LX, Tong DY, et al. Mutations of 15 short tandem repeat loci in Chinese population [J]. Zhonghua yixue yichuanxue zazhi, 2005, 22(5): 507-509.
- [4] Lu D, Liu Q, Wu W, et al. Mutation analysis of 24 short tandem repeats in Chinese Han population [J]. Int J Legal Med, 2012, 126(2): 331-335. DOI: 10.1007/s00414-011-0630-1.
- [5] Gjertson DW, Brenner CH, Baur MP, et al. ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing [J]. Forensic Sci Int Genet, 2007, 1(3-4): 223-231. DOI: 10.1016/j.fsigen.2007.06.006.
- [6] 兰菲菲, 陈延冰, 杜丽, 等. 亲子鉴定常用 STR 基因座突变的特点 [J]. 广东医学, 2016, 37(2): 218-220.
- [7] 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.
- [8] 刘亚举, 张俊涛, 闫朋娟. 常染色体 20 个短串联重复序列基因座的突变观察与分析 [J]. 新乡医学院学报, 2015, 32(2): 135-138. DOI: 10.7683/xyxyxb.2015.02.011.
- [9] Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2007, 5(1): 7-14. DOI: 10.1016/S1672-0229(07)60009-6.
- [10] Sun M, Zhang X, Wu D, et al. Mutations of short tandem repeat loci in cases of paternity testing in Chinese [J]. Int J Legal Med, 2016, 130(5): 1203-1204. DOI: 10.1007/s00414-015-1229-8.
- [11] 邱平明, 陈玲, 余嘉欣, 等. 法医学常用 15 个 STR 基因座的突变分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(4): 222-226. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2016.04.002.
- [12] 帅莉, 汪军, 景强, 等. 1483 例亲子鉴定 STR 基因座突变的分析 [J]. 法医学杂志, 2014, 30(1): 44-46. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5619.2014.01.010.
- [13] Jin B, Su Q, Luo H, et al. Mutational analysis of 33 autosomal short tandem repeat (STR) loci in southwest Chinese Han population based on trio parentage testing [J]. Forensic Sci Int Genet, 2016, 23: 86-90. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.03.009.
- [14] 何保仁, 申卫东, 刘学军, 等. 广西地区 1786 例亲子鉴定 STR 基因位点突变的观察与分析 [J]. 重庆医学, 2016, 45(9): 1190-1191 + 1194.

(收稿日期 2017-07-20)

(本文编辑:甘慧敏)