

D21S11 和 Penta D 分型异常 在 21 三体综合征鉴定中的应用*

庞潜潜^{1,2} 李长征^{1,2} 王业全^{1,2} 刘奇^{1,2} 侯秀迪¹ 崔文^{1Δ}

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

摘要 目的 通过多位点 STR 复合扩增技术进行亲子关系鉴定并检测 21 号染色体上基因座的 STR 分型,探讨亲权关系鉴定中 D21S11 和 Penta D 基因座分型异常在 21 三体综合征鉴定中的应用。方法 应用 Goldeneye 20A 和华夏TM白金 PCR 扩增试剂盒进行 PCR 扩增以及毛细管电泳,并进行 STR 分型及结果判读。结果 两种试剂盒在共有的 19 个 STR 位点的分型结果一致,包括 21 号染色体上的三等位基因的结果,并且被检人的 STR 分型结果符合单亲遗传关系,一个被检人确定为 21 三体综合征。结论 D21S11 和 Penta D 基因座分型在 Goldeneye 20A 和华夏TM白金 PCR 扩增试剂盒能够相互印证的基础上可以用于 21 三体综合征的基因诊断。

关键词 法医物证学;短串联重复序列;21 三体综合征;D21S11;Penta D

中图分类号:DF795.2 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)10-343-05

The application of D21S11 and Penta D with tri-allelic patterns in the parentage testing for 21 trisomy syndrome identification

PANG Qianqian^{1,2}, LI Changzheng^{1,2}, WANG Yequan^{1,2}, LIU Qi^{1,2}, HOU Xiudi¹, CUI Wen^{1Δ}

(¹ Judicial Expertise Center of Jining Medical University, Jining 272067, China;

² School of Forensic Medicine and Laboratory Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To identify the STR genotype of chromosome 21 in parentage testing by STR multiplex amplification technology and explore the application of D21S11 and Penta D with tri-allelic patterns in the parentage testing for 21 trisomy syndrome identification. **Methods** PCR amplification was measured by using Goldeneye 20A PCR amplification kit and HuaxiaTM Platinum Kit and the capillary electrophoresis was used for STR genotyping. **Results** The STR genotyping results of the two kits were identical on the common 19 STR loci, including the tri-allelic of loci on chromosome 21, and the STR genotyping results of the two individuals were in accordance with the single-parent genetic rule, and one subject was identified as Down syndrome. **Conclusion** Genotyping of D21S11 and Penta D loci can be used for gene diagnosis for Down syndrome based on the mutual confirmation of Goldeneye 20A Kit and HuaxiaTM Platinum Kit.

Keywords: Forensic genetics; STR; 21 trisomy syndrome; D21S11; Penta D

短串联重复序列(short tandem repeats, STR)是一类在人类基因组中分布非常广泛的 DNA 长度多态性遗传标记,一般是 2~6 个碱基串联重复排列形成。因为 STR 的核心序列的重复次数的不同,使得 STR 具有极高的多态性。STR 基因座等位基因命名来源就是其核心序列的重复次数,遵循孟德

尔遗传规律,在亲权鉴定和个体识别中应用非常广泛,目前常用于分型的 STR 基因座多为 4 核苷酸重复的 STR 位点,个别位点是 5 核苷酸重复。在实践中,联合使用多个 STR 可以产生数亿的基因型组合,而每一种组合在群体中出现的频率都非常低,可以在很高的概率水平上认定嫌疑人。因此,STR 基因座的 PCR 分型目前是国内外法医学亲缘鉴定和个体识别最主要的技术。欧盟法医 DNA 分型标准化委员会认为,虽然近些年新的技术与新的遗传标记在不断地涌现,但在今后相当长时期内,

* [基金项目] 2016 年济宁医学院博士科研启动项目;济宁医学院青年教师科研扶持基金(JY2017FY002)

Δ [通信作者] 崔文, E-mail: cuiwenmd@163.com

STR 将仍然是法医学应用最主要的遗传标记^[1]。

唐氏综合征(Down syndrome, DS)即 21 三体综合征,又称为先天愚型,是最常见的染色体数量异常疾病之一,表现为严重智力低下及发育异常,新生儿发病率约 1/600 ~ 1/800^[2],患儿在出生时即表现出特殊面容。唐氏综合征主要是卵子减数分裂时 21 号染色体不分离,形成异常卵子导致胚胎发育障碍引起的^[3]。目前正常孕检项目已包括唐氏筛查项目,并且唐筛高危人群可以选择羊水穿刺或者无创 DNA 技术进一步确认胎儿染色体数目是否正常。D21S11 和 Penta D 是位于 21 号常染色体上的两个距离较近的 STR 基因座,相距大约 25Mb, D21S11 是一个四核苷酸重复的 STR 位点, Penta D 是一个五核苷酸重复的 STR 位点,在法医学 21 三体综合征鉴定中具有重要应用价值^[4-6]。

1 材料和方法

1.1 样本来源

受检样本来自济宁医学院司法鉴定中心法医物证实验室受理的亲权鉴定案件。样品采集时间为 2018 年 4 月 10 日,样品为血样, FTA 卡采集,室温存放。具体案情为:被检母亲妊娠期唐氏筛查检测结果显示低风险,但是考虑到被检母亲为高龄产妇(38 岁),增加了无创 DNA 检测项目进行确定。无创 DNA 检测结果未显示有 21 三体综合征等遗传疾病的风险,被检母亲生产后发现新生儿出现 21 三体综合征患儿的特殊面容,因此需进行 DNA 检测以确定新生儿是否为 21 三体综合征患儿。被检母亲现场抽血(以下称为被检母亲)并提供了自称为新生儿的血样检材(以下称为血样检材)。

1.2 仪器与试剂

PCR 扩增仪(AB 公司,美国);ABI-3500 遗传分析仪(AB 公司,美国);GeneMapper ID-X 1.4 软件(AB 公司,美国);Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒(基点认知公司,中国);华夏TM白金 PCR 扩增试剂盒(AB 公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒检测 用 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒复合扩增 Amelogenin 基因座和 19 个 STR 基因座(D19S433, D5S818, D21S11, D18S51, D6S1043, D3S1358, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1P0, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX, Penta E, TH01, D12S391, D2S1338, FGA)。使用 ABI 9700(金座)热循环仪,反应体系为 10 μ l, 含 H₂O 3.84 μ l、PCR Reaction Mix 4.0 μ l、引物 2.0 μ l、

FTA 卡打孔 0.5mm、Gold Taq 酶(5U/ μ l)0.16 μ l。PCR 反应条件为 96 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 94 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 70s, 共 27 个循环后; 60 $^{\circ}$ C 延伸 30min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 华夏TM白金 PCR 扩增试剂盒检测 华夏TM白金 PCR 扩增试剂盒复合扩增 Amelogenin 基因座和 22 个 STR 基因座(D19S433, D5S818, D21S11, D18S51, D6S1043, D3S1358, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1P0, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX, Penta E, TH01, D12S391, D2S1338, FGA, D22S1045, D10S1248, D1S1656)。使用 ABI 9700(金座)热循环仪,反应体系为 10 μ l, 含 PCR Reaction Mix 4.0 μ l、引物 4.0 μ l、Prep-n-go 2.0 μ l, FTA 卡打孔 0.5mm。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1min; 94 $^{\circ}$ C 3s, 59 $^{\circ}$ C 16s, 65 $^{\circ}$ C 29s, 共 27 个循环后; 60 $^{\circ}$ C 延伸 5min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.3 结果判定 用 ABI 3500 分析仪进行毛细管电泳,通过 GeneMapper ID - X 1.4 软件进行结果分析。检测结果通过计算亲权指数(paternity index, PI)、累积亲权指数(cumulative paternity index, CPI),遵循孟德尔遗传定律判定血样检材与被检母亲是否亲生关系。STR 基因座出现 3 个等位基因荧光峰,峰值面积比值为 1:1:1 时,或者出现两个等位基因荧光峰,峰值面积比为 2:1 或 1:2 (或出现峰值面积未达到 2:1/1:2, 但 <0.65 或者 >1.8)时,或者出现 1 个峰且峰面积是相邻杂合子单峰峰面积 3 倍时,制定为三等位基因。

2 结果

2.1 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒的 STR 分型及鉴定结果

对被检母亲现场抽取的血样及其提供的血样检材进行常规亲子鉴定所用的 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒进行扩增,扩增后 STR 分型。见表 1。

血样检材 STR 分型结果显示:该血样检材包括 D19S433 在内的 19 个常染色体 STR 基因座的等位基因均可以从被检母亲中找到来源。但是 D21S11 和 Penta D 这两个基因座的 STR 分型出现异常,均出现了 3 个峰,为三等位基因(图 1)。被检母亲的 D21S11 和 Penta D 这两个基因座的等位基因分型正常(图 1)。通过与相应的 Cadder 进行比较结果显示(图 2、图 3):D21S11 和 Penta D 两个基因座出现的 3 个等位基因峰没有显著差别,与 Cadder 的峰位置能够完全对应,并且与被检母亲对应的峰位置相同,这就说明这两个位点的 STR 分型结果能够确定为三等位基因。

表 1 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒基因座分型结果		
STR 基因座	被检母亲	血样检材
D3S1358	15	15/16
vWA	14/18	14/17
D16S539	10/11	9/11
CSF1PO	12	11/12
TPOX	8	8/11
D8S1179	12/14	13/14
D21S11	28/29	28/29/30
D18S51	13/15	13/20
Penta E	17/18	12/18
D2S441	11	10/11
D19S433	14. 2	14/14. 2
TH01	9	7/9
FGA	19/27	22/27
D22S1045	11/15	15
D5S818	10/12	11/12
D13S317	11/12	12
D7S820	10/11	10/12
D6S1043	13/19	12/13
D10S1248	12/14	12/14
D1S1656	15/16	15/17
D12S391	17/18	18/19
D2S1338	23/24	24
Penta D	13/14	12/13/14

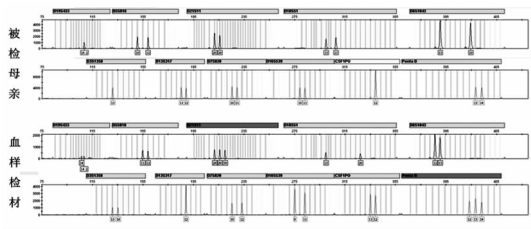


图 1 被检母亲和血样检材的 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒 STR 分型结果

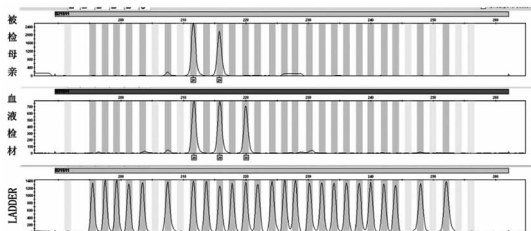


图 2 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒 D21S11 基因座比对结果

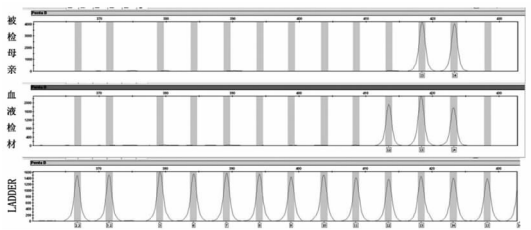


图 3 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒 Penta D 基因座比对结果

2.2 华夏™白金 PCR 扩增试剂盒的 STR 分型及鉴定结果

为了确认 Goldeneye 20A 的 STR 得到的三等位基因的分型结果,被检母亲及血样检材通过华夏™白金 PCR 扩增试剂盒扩增进行验证,以确保结果的准确性。扩增后 STR 分型结果见表 2。

血样检材 STR 分型结果显示:该血样检材包括 D3S1358 在内的 23 个常染色体 STR 基因座的等位基因均可以从被检母亲中找到来源,与 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒分型结果一致的是 D21S11 和 Penta D 这两个基因座的 STR 分型依然是存在 3 个等位基因峰(图 4)。通过与相应的 Cadder 进行比较,结果也可以明显看出:D21S11 和 Penta D 两个基因座出现的三个等位基因峰没有显著差别,峰的位置与 Cadder 能够对应,并且与被检母亲的对应峰位置也相同,再一次说明这两个位点的 STR 分型结果为三等位基因。见图 5、6。

表 2 华夏™白金 PCR 扩增试剂盒基因座分型结果		
STR 基因座	被检母亲	血样检材
D3S1358	15	15/16
vWA	14/18	14/17
D16S539	10/11	9/11
CSF1PO	12	11/12
TPOX	8	8/11
D8S1179	12/14	13/14
D21S11	28/29	28/29/30
D18S51	13/15	13/20
Penta E	17/18	12/18
D2S441	11	10/11
D19S433	14. 2	14/14. 2
TH01	9	7/9
FGA	19/27	22/27
D22S1045	11/15	15
D5S818	10/12	11/12
D13S317	11/12	12
D7S820	10/11	10/12
D6S1043	13/19	12/13
D10S1248	12/14	12/14
D1S1656	15/16	15/17
D12S391	17/18	18/19
D2S1338	23/24	24
Penta D	13/14	12/13/14

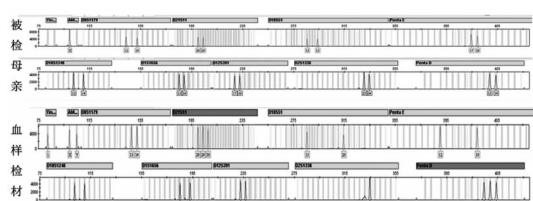


图4 被检母亲和血样检材的华夏™白金 PCR 扩增试剂盒 STR 分型结果

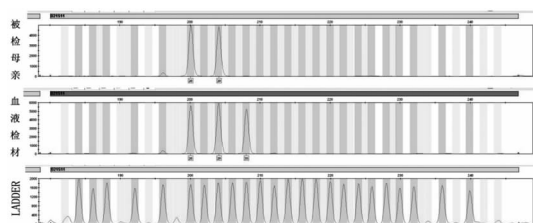


图5 华夏™白金 PCR 扩增试剂盒 D21S11 基因座比对结果

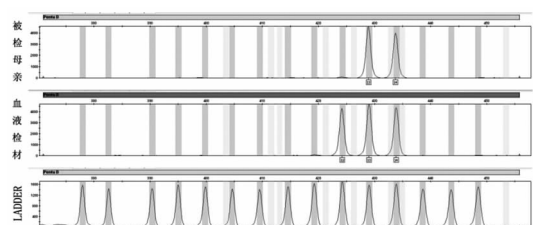


图6 华夏™白金 PCR 扩增试剂盒 Penta D 基因座比对结果

3 讨论

在本案件亲权关系鉴定过程中,被检母亲及其提供的新生儿血样(血样检材)通过 Goldeneye 20A PCR 扩增试剂盒进行扩增,STR 分析的结果显示:血样检材各个基因座的等位基因均可以从被检母亲中找到来源,符合孟德尔遗传定律。

但是血样检材中的 D21S11 (28/29/30) 和 Penta D (12/13/14) 这两个基因座的 STR 分型均出现了 3 个等位基因,并且 D21S11 和 Penta D 都位于第 21 号染色体。为了确认该结果,排除实验过程中操作引起分型异常,我们进一步用华夏白金试剂盒 PCR 扩增分型进行验证,结果显示:血样检材中 D21S11 和 Penta D 这两个基因座的 STR 分型依然出现了 3 个等位基因,除此之外的其他染色体上的位点 STR 分型均是正常的二等位基因,以此可以推断该血样检材来自 21 三体综合征患者。经过案情回访调查发现,该新生儿已经进行了染色体检查,共检测了 50 个核型,其中 48 个核型存在三条

21 号染色体(见图 7),这就进一步确证了该新生儿是 21 三体综合征患者。

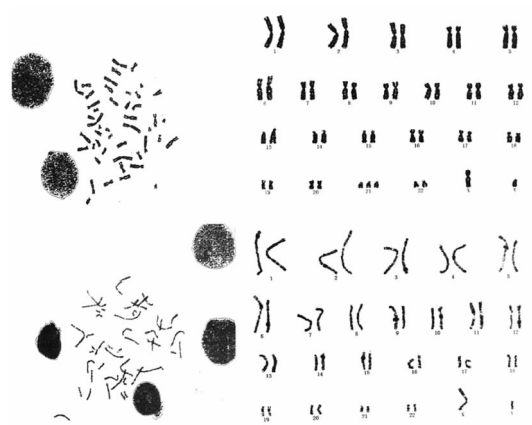


图7 核型诊断结果

STR 分型结果显示被检母亲的 19 个 STR 位点分型是正常的,另据被检母亲叙述,该新生儿父亲也没有 21 三体综合征的相关表现。一般情况下,来源于父亲减数分裂失败的染色体三体十分少见^[7],这说明了该新生儿的 3 条 21 号染色体可能是由于减数分裂时的 21 号染色单体分离失败导致的。由于并不能确认该新生儿的第 3 条 21 号染色体的来源,因此累计亲权指数的计算较为复杂,需多加注意^[8]。

在亲权鉴定中,有时候会出现某一基因座有 3 个带型或者 3 个等位基因分型的 STR 结果,这一现象可能是由于拷贝数变化、染色体数目异常(18 染色体三体,21 染色体三体等)或者是引物的结合区发生突变导致的^[9],因此需要多个试剂盒进行扩增,并对多个试剂盒的检测结果进行综合判断,排除干扰因素,确认该 STR 分型结果。三带型基因座的三个峰高可能相同也可能不同,21 三体样本检验中除出现 3 条带外,还可能出现 2 条或 1 条带^[10]。出现 3 条带判型较易判别,而当出现 2 个峰,但峰面积之比为 2:1 或出现 1 个峰且峰面积是相邻杂合子单峰峰面积 3 倍时,应注意排除本症。本文通过多位点 STR 复合扩增技术的两种试剂盒相互验证,确定 21 号染色体上的两个基因座 D21S11 和 Penta D 确实为三等位基因,并且结合已有的染色体核型检测结果确定该血样来自 21 三体综合征患者。

在亲权关系鉴定或个体识别过程中,如果出现三等位基因现象一定要非常重视,需要使用不同的扩增试剂盒和重复检测验证分型结果^[11-12],以排除污染和泳道渗漏等导致误判的问题。

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] 王琳, 王毅, 薛红, 等. D21S11、PentaD 基因座的遗传多态性及其在唐氏综合征基因诊断中的初步应用研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2006(10): 609-611.
- [3] Mazurek D, Wyka J. Down syndrome--genetic and nutritional aspects of accompanying disorders [J]. Rocz Panstw Zakl Hig, 2015, 66(3): 189-194.
- [4] Gettings KB, Aponte RA, Vallone PM, et al. STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues [J]. Forensic Sci Int Genet, 2015, 18: 118-130. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.06.005.
- [5] 童梦洁, 马庆, 王冬花, 等. PentaD、D21S11 基因座分型异常分析 3 例[J]. 中国法医学杂志, 2015, 30(2): 196-197.
- [6] 张杰, 王河涛, 贺仲, 等. 21 三体综合征 STR 分型异常 1 例[J]. 中国法医学杂志, 2012, 27(2): 168-169.
- [7] 崔英霞, 王咏梅, 兵姚, 等. DNA 多态性诊断额外染色体和 46, XX/46, XY 嵌合体起源[J]. 医学研究生学

报, 2004, 17(9): 775-778.

- [8] 刘亚举, 岳俊涛. D21S11 和 Penta D 基因座 STR 分型异常 2 例[J]. 刑事技术, 2014(5): 62-63.
- [9] Jiao H, Ren H, Yang Y, et al. Tri-allelic patterns of STRs and partially homologous non-sister chromatid crossover observed in a parentage test [J]. Leg Med (Tokyo), 2018, 30: 34-37.
- [10] Picano JB, Raimann PE, Motta CHASD, et al. Identification of the third/extra allele for forensic application in cases with TPOX tri-allelic pattern [J]. Forensic Sci Int Genet, 2015, 16: 88-93. DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.11.016.
- [11] 党珍, 王业全, 李学博, 等. 不同位点 STR 复合扩增技术在亲权亲权鉴定及 18S51 基因座分型异常中的应用[J]. 济宁医学院学报, 2016, 39(4): 267-270.
- [12] 傅燕芳, 吴微微, 郝宏蕾, 等. 不同商品化试剂盒 STR 分型异常的 2 例分析[J]. 中国法医学杂志, 2017, 32(3): 326-327.

(收稿日期 2018-09-03)

(本文编辑: 石俊强)

(上接第 342 页) 卫生服务网络中。将基层医疗卫生机构和养老机构组织的异质性相结合, 由乡镇卫生院定期为养老机构提供巡诊服务, 并接受养老机构病人的上转, 充分利用基层医疗卫生机构的床位和医疗技术服务, 实现医疗和养老的深度融合。

参考文献:

- [1] Moore S, Buckeridge DL, Dubé L. Cohort profile: the montreal neighbourhood networks and healthy aging (MoNNET-HA) study [J]. Int J Epidemiol, 2016, 45(1): 45-53. DOI: 10.1093/ije/dyu137.
- [2] Kishimoto Y, Suzuki E, Iwase T, et al. Group involvement and self-rated health among the Japanese elderly: an examination of bonding and bridging social capital [J]. BMC Public Health, 2013, 13: 1189. DOI: 10.1186/1471-2458-13-1189.
- [3] 张存刚, 李明, 陆德梅. 社会网络分析——一种重要的社会学研究方法[J]. 甘肃社会科学, 2004(2): 109-111.
- [4] 曾文, 李卫燕, 陆嘉燕. 澳门老年人社会网络与身体健康状况及日常居家活动能力的相关性分析[J]. 护理管理杂志, 2012, 12(7): 457-459. DOI: 10.3969/j.issn.1671-315X.2012.07.001.
- [5] 裴晓梅, 王浩伟, 罗昊. 社会资本与晚年健康——老年人健康不平等的实证研究[J]. 广西民族大学学报

(哲学社会科学版), 2014(1): 17-24.

- [6] 郝晓宁, 薄涛. 我国城市老年人口的社会网络及社区养老分析——基于北京市的抽样调查[J]. 中国卫生政策研究, 2012, 5(2): 17-23.
- [7] 李亚萍. 社会网络视角下的陕西农村社区养老影响因素研究[D]. 西安: 西安科技大学, 2016.
- [8] 李凤玲, 陈艳. 留守儿童家庭环境与自我和谐的相关性研究[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(5): 344-346. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2014.05.014.
- [9] 国务院关于印发“十三五”国家老龄事业发展和养老体系建设规划的通知[EB/OL]. 2017-03-06 http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-03/06/content_5173930.html.
- [10] 汪志豪, 杨金侠. 增强理解力: “将健康融入所有政策”的首要策略[J]. 中国卫生政策研究, 2016, 9(10): 56-60.
- [11] 刘琥, 翟敏, 冯冰, 等. 某市养老机构生命关怀认知及医养结合服务能力现状调查[J]. 济宁医学院学报, 2016, 39(3): 193-195. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2016.03.012.
- [12] 刘稳, 徐昕, 李士雪. 基于 SWOT 分析的“医养结合”养老服务模式研究[J]. 中国卫生事业管理, 2015, 32(11): 815-817.

(收稿日期 2018-05-07)

(本文编辑: 石俊强)