

文章编号 1006-8147(2015)01-0022-03

论 著

天津汉族群体 DYS19、DYS390 和 DYS393 STR 基因座遗传多态性的研究

琚 端¹, 史云芳¹, 李晓洲¹, 李 岩¹, 辛 力², 姚静怡², 谢晓媛², 刘殿芹¹, 杨晓惠¹, 周佳妍³, 张 颖¹

(1.天津医科大学总医院妇产科, 天津 300052; 2.天津市妇女儿童保健中心, 天津 300074; 3.天津医科大学影像学院, 天津 300203)

摘要 目的:研究天津市汉族人群 DYS19、DYS390 和 DYS393 3 个短串联重复序列(STR)基因座遗传多态性,获得该地区相关群体遗传学数据,为用 STR 基因座进行染色体非整倍体及基因异常的诊断与产前诊断提供实验依据。方法:利用定量荧光 PCR(QF-PCR)对天津地区无血缘关系的 200 名男性 Y 染色体 3 个 STR 基因座进行扩增、毛细管电泳检测扩增产物、ABI3730 全自动 DNA 遗传分析仪进行结果分析,3 个基因座分别选择两个片段测序、命名。统计各基因座基因频率,计算基因差异性(GD)及单倍型多样性(HD)。结果:DYS19、DYS390 和 DYS393 3 个 STR 基因座分别检出 5、6、6 个等位基因,基因频率分别分布在 0.070 0~0.377 5, 0.005 0~0.390 0 及 0.005 0~0.540 0 之间;GD 值分别为 0.743、0.731 及 0.634,HD 为 0.706 8。结论:天津汉族人群 3 个 Y-STR 基因座多态性高,是 Y 染色体良好的遗传标记。

关键词 Y 染色体; STR 基因座; 遗传多态性; 汉族男性; 天津**中图分类号** R394**文献标志码** A

Research on genetic polymorphisms of DYS19, DYS390 and DYS393 STR loci in Han population in Tianjin

JU Duan¹, SHI Yun-fang¹, LI Xiao-zhou¹, LI Yan¹, XIN Li², YAO Jing-yi², XIE Xiao-yuan², LIU Dian-qin¹, YANG Xiao-hui¹, ZHOU Jia-yan³, ZHANG Ying¹

(1.Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Women and Children Health Care Center of Tianjin, Tianjin 300074, China; 3. Department of Medical Imaging, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

Abstract Objective: To study the genetic polymorphism of the three STR loci DYS19, DYS390 and DYS393 of Han population in Tianjin, China, to get the population genetic data and to provide the experimental basis for the research on population genetics, gene diagnosis and prenatal gene diagnosis of chromosomal aneuploidy and genetic abnormality. **Methods:** QF-PCR and capillary electrophoresis were applied to 200 unrelated individuals of Tianjin Han population of China. The relevant data were analyzed by ABI 3730. Gene frequency, gene diversity and haplotype diversity were counted. **Results:** Five, five and six alleles were found in DYS19, DYS390 and DYS393 locus, respectively. The gene frequencies were between 0.070 0~0.377 5, 0.005 0~0.390 0 and 0.005 0~0.540 0 and the gene diversities were 0.743, 0.731 and 0.634. The haplotype diversity was 0.706 8. **Conclusion:** DYS19, DYS390 and DYS393 locus are highly polymorphism in Tianjin Han population of China, and are proper genetic markers on chromosome Y.

Key words chromosome Y; STR loci; genetic polymorphism; males of Han population; Tianjin

我国是出生缺陷高发国家,出生缺陷逐渐成为影响儿童健康和出生人口素质的重大公共卫生问题。染色体非整倍体异常是导致出生缺陷最常见的原因。尽管染色体核型分析是诊断染色体病的金标准,但因其培养时间长、技术要求高,不能满足日益增长的产前诊断需要。短串联重复序列(short tandem repeat, STR)又称微卫星 DNA,是一种广泛存在于人类基因组中,以 2~6 个碱基为单位,具有长度多态性的 DNA 序列。Y-STR 在减数分裂过程中不

发生重组,具有稳定的单倍体父系遗传特征,被广泛用于个体识别、亲权鉴定、群体遗传学研究等领域。近年来,定量荧光 PCR(QF-PCR)扩增 STR 基因座已在许多欧洲国家被应用于产前诊断染色体非整倍体的检测^[1-2]。STR 基因座具有显著的人种和地域分布差异,因此国际遗传学 DNA 委员会倡导建立各地区各种族的群体遗传学数据^[3-4]。笔者对天津汉族男性群体 Y 染色体上 DYS19、DYS390 和 DYS393 3 个 STR 基因座的遗传多态性进行了研究,为天津地区性染色体异常的基因诊断和产前诊断提供实验依据。

基金项目 天津市科技计划项目基金资助(11ZCGYSY02500)**作者简介** 琚端(1987-),女,研究实习生,硕士,研究方向:优生与遗传学;通信作者:张颖, E-mail: tjzyzy@aliyun.com。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 200 例籍贯为天津、三代居住在天津且无亲缘关系的汉族男性个体外周静脉血 2 mL, EDTA 抗凝, -20 ℃ 保存。所有样本经染色体核型分析结果正常。

1.2 DNA 的提取 采用全血基因组 DNA 提取试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限公司), 实验步骤严格按照说明书进行。

1.3 引物选择 根据 NCBI UniSTS 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>), 确定基因座的引物序列, 正向引物 5' 端均由荧光染料 5-羧基荧光素标

记, 引物均由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成。DYS19、DYS390 和 DYS393 基因座的基本特征及引物序列见表 1。

1.4 QF-PCR 扩增 以提取的基因组 DNA 为模板, 在 GeneAmp PCR system 9600 扩增仪上进行 PCR 反应。PCR 扩增体系: d NTPs 1 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL、模板 DNA 2 μL、上游引物 0.5 μL、下游引物 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, ddH₂O 18 μL, 总体积为 25 μL。扩增条件为预变性 95 ℃ 5 min、变性 95 ℃ 30 s、退火 52 ℃ 30 s、延伸 72 ℃ 30 s, 35 个循环, 最后 72 ℃ 10 min, 4 ℃ 保存。

表 1 3 个 Y-STR 基因座的基本特征及引物序列

Tab 1 Essential characteristics and primer sequences of the three Y-STR loci

STR 基因座	基因库号	染色体定位	引物序列(5'-3')
DYS19	X77751(AC017019)	Yq	CTACTGAGTTTCTGTTATAGTATGGCATGTAGTGAGGACA
DYS390	G09611(AC011289)	Yq	TATATTTTACACATTTTTGGGCCTGACAGTAAATGAACACATTGC
DYS393	G09601(AC006152)	Yq	GTGCTCTTCTACTTGTGTCAATACAACCTCAAGTCCAAAAAATGAGG

1.5 PCR 扩增产物检测 产物经毛细管电泳检测, ABI Prism GeneMapper v3.0 软件分析数据, 得出片段大小, 整理结果。

1.6 测序及命名 3 个基因座分别选择两个片段进行测序, 根据重复序列的重复次数进行命名。测序由北京鼎国昌盛生物技术有限公司完成。

1.7 统计学方法 用直接计算法计算各等位基因频率, 基因多样性(GD)采用公式 $GD = n(1 - \sum P_i^2) / (n-1)$ 计算, 其中 P_i 为等位基因频率, n 为样本数。单倍型多样性(HD)用公式 $HD = n(1 - \sum H P_i^2) / (n-1)$ 计算。

2 结果

2.1 DYS19、DYS390 和 DYS393 基因座测序结果 DYS19 基因座测序 185 bp、201 bp 两个片段, 重复序列为 TAGA, 分别重复 7、11 次, 将其命名为 7、11。DYS390 基因座测序 208 bp、224 bp 两个片段,

重复序列为 TCTA, 分别重复 9、13 次, 将其分别命名为 9、13。DYS393 基因座测序 117 bp、121 bp 两个片段, 重复序列为 TATC, 分别重复 12、13 次, 将其分别命名为 12、13。

2.2 DYS19、DYS390 和 DYS393 基因座基因频率及单倍型频率 200 例汉族男性样本均扩增成功, 其中 DYS19 基因座共发现 5 个等位基因。等位基因频率在 0.070 0~0.377 5 之间。DYS390 基因座共发现 6 个等位基因。等位基因频率在 0.005 0~0.390 0 之间。DYS393 基因座共发现 6 个等位基因。等位基因频率在 0.005 0~0.540 0 之间。3 个基因座的 GD 值分别为 0.743、0.731 及 0.634。在本文调查的 200 例天津男性中, 3 个基因座共发现 63 种单倍型, 其中最多见的单倍型为 8-11-12(0.075), 在 15 个个体中出现, 单倍型多样性为 0.706 8。DYS19、DYS390 和 DYS393 基因座的基因频率见表 2。

表 2 DYS19、DYS390 和 DYS393 基因座基因频率

Tab 2 Gene frequencies of DYS19、DYS390 and DYS393

DYS19(GD=0.743)			DYS390(GD=0.731)			DYS393(GD=0.634)		
等位基因	片段长度/bp	等位基因频率	等位基因	片段长度/bp	等位基因频率	等位基因	片段长度/bp	等位基因频率
7	185	0.0700	8	204	0.0050	11	113	0.0300
8	189	0.2475	9	208	0.0900	12	117	0.5400
9	193	0.3775	10	212	0.3900	13	121	0.2350
10	197	0.2050	11	216	0.2800	14	125	0.1375
11	201	0.1000	12	220	0.1750	15	129	0.0525
			13	224	0.0600	18	141	0.0050

3 讨论

《中国出生缺陷防治报告(2012)》指出,我国出生缺陷发生率为5.6%左右,每年新增出生缺陷儿约为90万例。染色体非整倍体异常是导致出生缺陷最常见的原因。常见的异常包括21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征、克氏综合征(47, XXY)、Turner 综合征(45, X)、Jacobs 综合征(47, XXX)以及超雄综合征(47, XYY),约占产前诊断临床有意义染色体异常的80%^[5]。目前诊断及产前诊断染色体病的金标准是染色体核型分析,但该方法对技术要求高、分析培养时间长,有培养失败的可能,一旦培养失败不但会造成孕妇及家属较重的精神负担并且会延误最佳处理时机。

QF-PCR 技术是一种利用荧光引物对染色体上特异性 STR 位点进行扩增,通过荧光检测染色体拷贝数异常并做出快速产前诊断的方法。因具有准确、简便、快速、自动化、高通量等优点,一些欧洲产前诊断中心已常规将13、18、21、X 以及 Y 染色体的 STR 基因座用于染色体非整倍体的诊断和产前诊断^[1-2]。Plaseski 等^[6]利用多重 QF-PCR 方法通过扩增 X-STR 基因座、SRY 基因、Y-STR 基因座 DYS448 和 AZF 相关基因等联合检测男性不育的遗传性原因,包括染色体异常和 Y 染色体微小缺失等。

STR 最早于真核生物基因组中被发现^[7],因其核心序列的重复次数存在个体差异,故多数 STR 基因座具有高度多态性。1976 年 Cooke^[8]首先报道了存在于 Y 染色体上的 STR,之后越来越多的 Y 染色体 STR 基因座被开发并利用。与常染色体 STR 基因座分型相比, Y 染色体上的基因座无需进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,只需要单倍型分析即可,应用方便。联合多个 STR 复合扩增可极大程度降低偶合概率,提高个体识别率。男性群体 STR 基因座的研究表明, Y-STR 基因座多态性的分布具有明显的种族、地域差异性。在不同人群甚至关系相近的人群中,其基因频率分布均不同^[9-10]。因此,建立当地的等位基因频率和基因型分布资料是利用 Y-STR 进行快速产前诊断的前提和数据基础。

目前,人类基因组数据库中可供人类遗传学研究的 Y 染色体遗传标记有 200 多个,其中 DYS19、DYS385a/b、DYS389 I、DYS389 II、DYS390、DYS391、DYS392 和 DYS393 是欧洲 Y 染色体分型学会建立的“最小单体型”中最常用的一组多态性位点^[11]。本研究根据文献报道及预实验选择了常用的易于扩增、结果稳定、重复性好、多态性较高的 3 个基因座 DYS19、DYS390 和 DYS393 进行研究。结果显示

DYS19、DYS390 和 DYS393 3 个基因座分别发现 5、6、6 个等位基因,基因频率分别在 0.070 0~0.377 5、0.005 0~0.390 0、0.005 0~0.540 0 之间,3 个基因座的基因多样性分别为 0.743、0.731、0.634。200 例样本中共检出 63 种单倍型,单倍型多样性为 0.706 8。一般来说,STR 多态信息量大于 0.5,表明遗传标记可提供高度的遗传信息^[12]。结果显示,这 3 个基因座构成的单倍型多态性信息含量较高,具有较高的个体识别率,可提供高度的遗传信息。目前试剂盒中基因座的选择主要基于欧洲、非洲等人群中各个 Y-STR 的基因座个体识别能力的考虑^[13]。然而研究表明不同群体、不同地域关于 Y-STR 基因座的遗传学数据相比有一定的差异^[14]。张玉红等^[15]对 342 例南通汉族无血缘关系男性个体的 16 个 Y 染色体 STR 基因座进行研究, DYS19、DYS390 和 DYS393 3 个基因座分别发现 6、6、6 个等位基因, GD 分别为 0.904 2、0.642 6、0.635 7。宋兴勃等^[16]研究 111 名成都地区汉族群体 17 个 Y-STR 基因座多态性分布, 3 个基因座分别发现 6、6、5 个等位基因, GD 分别为 0.669 3、0.651 4、0.650 3。Brown^[17]在研究中提到所有利用 QF-PCR 进行染色体非整倍体产前诊断的实验室都应该建立自己独立有效的数据基础。本研究通过对本院进行优生咨询的无亲缘关系汉族男性 3 个 Y-STR 遗传多态性的研究,建立了本地区、本实验室的人群数据基础和适合本地区人群的反应体系,为性染色体数目异常的基因诊断及产前基因诊断提供了实验数据。

参考文献:

- [1] Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience[J]. Prenat Diagn, 2009,29(1):40
- [2] Hills A, Donaghue C, Waters J, et al. QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region[J]. Prenat Diagn, 2010,30(6):509
- [3] Nasiri H, Noori-Dalooi M R, Dastan J, et al. Investigation of QF-PCR application for rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies in iranian population[J]. Iran J Pediatr, 2011,21(1):15
- [4] Jain S, Panigrahi I, Sheth J, et al. STR markers for detecting heterogeneity in Indian population[J]. Mol Biol Rep, 2012,39(1):461
- [5] Jain S, Panigrahi I, Sheth J, et al. STR markers for detecting heterogeneity in Indian population[J]. Mol Biol Rep, 2012,39(1):461
- [6] Plaseski T, Noveski P, Trivodalieva S. Quantitative fluorescent-PCR detection of sex chromosome aneuploidies and AZF deletions/duplications[J]. Genet Test, 2008, 12(4):595
- [7] Miesfeld R, Krystal M, Arnheim N. A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes[J]. Nucleic

(下转第 34 页)

到了刺激响应性可控释放的目的。MTT 结果表明,当细胞培养环境中 FSMP-NPs 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时并不表现出明显细胞毒性,可以此浓度进行后续实验(图 6A)。为了更有效地杀伤肿瘤细胞,我们将化疗和光动力治疗结合,并通过 MTT 法对治疗效果进行体外评价。由图 6B 可知,实验采用 60 $\mu\text{g/mL}$ DOX-FSMP-NPs+Light(DOX 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$)为实验组,通过与 DOX-FSMP-NPs 组、FSMP-NPs+Light 组以及纯 DOX 组的细胞存活率对比可以发现,采用化疗和光动力联合治疗,其肿瘤细胞生存率明显低于单独进行光动力治疗或化疗,具有更好的肿瘤治疗效果。

综上,本实验合成了一种基于磁性介孔二氧化硅的温度/pH 双重响应性的药物载体,通过在其中掺杂光敏剂 ZnPc,有望实现针对肿瘤靶向性药物和光动力的协同治疗。

参考文献:

- [1] Kresge C T, Leonowicz M E, Roth W J, et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism[J]. *Nature*, 1992, 359(6397): 710
- [2] Slowing I I, Vivero-Escoto J L, Wu C W, et al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(11): 1278
- [3] Chen Y Y, Ma P A, Yang D M, et al. Multifunctional core-shell structured nanocarriers for synchronous tumor diagnosis and treatment in vivo[J]. *Chem Asian J*, 2014, 9(2): 506
- [4] Liu J L, Li C Y, Li F Y, et al. Fluorescence turn-on chemodosimeter-functionalized mesoporous silica nanoparticles and their application in cell imaging[J]. *J Mater Chem*, 2011, 21(20): 7175
- [5] Kang X J, Cheng Z Y, Yang D M, et al. Design and synthesis of multifunctional drug carriers based on luminescent rattle-type mesoporous silica microspheres with a thermosensitive hydrogel as a controlled switch[J]. *Adv Funct Mater*, 2012, 22(7): 1470
- [6] Teng I T, Chang Y J, Wang L S, et al. Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(30): 7462
- [7] Wu S H, Hung Y, Mou C Y, et al. Mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers[J]. *Chem Commun*, 2011, 47(36): 9972
- [8] Celli J P, Spring B Q, Rizvi I, et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization [J]. *Chem Rev*, 2010, 110(5): 2795
- [9] Verma S, Watt G M, Mai Z M, et al. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects[J]. *Photochem Photobiol*, 2007, 83(5): 996
- [10] Tu J, Wang T X, Shi W, et al. Multifunctional ZnPc-loaded mesoporous silica nanoparticles for enhancement of photodynamic therapy efficacy by endolysosomal escape[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(31): 7903
- [11] Hilger I, Kaiser W A. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia[J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(9): 1443
- [12] Vallet-Regi M, Ramila A, del Real R P, et al. A new property of MCM-41: Drug delivery system[J]. *Chem Mater*, 2001, 13(2): 308
- [13] Gerweck L E, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(6): 1194
- [14] 刘聪颖, 胡建华, 杨东, 等. 多重响应性介孔二氧化硅纳米微球的制备及载药研究[J]. *化学学报*, 2009, 67(8): 843
- [15] Wu H X, Tang L H, An L, et al. pH-responsive magnetic mesoporous silica nanospheres for magnetic resonance imaging and drug delivery[J]. *React Funct Polym*, 2012, 72(5): 329

(2014-09-12 收稿)

.....

(上接第 24 页)

- Acids Res, 1981,9(22):5931
- [8] Cooke H. Repeated sequence s specific to human males[J]. *Nature*, 1976,262(5565):182
- [9] White P S, Tatum O L, Deaven L L, et al. New, male-specific microsatellite markers from the human Y chromosome[J]. *Genomics*, 1999, 57(3):433
- [10] Xu A Q, Xia M, Liu J T. Validation of quantitative fluorescent-PCR for rapid prenatal diagnosis of common aneuploidies in the Chinese population[J]. *Genet Mol Res*, 2013,12(4):6379
- [11] Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, et al. Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes [J]. *Forensic Sci Int*, 2001,118(2/3):106
- [12] Armstrong R N, Colyer H A, Mills K I. Screening for miRNA expression changes using quantitative PCR (Q-PCR)[J]. *Methods Mol Biol*, 2012,863(3):293
- [13] Kayser M, Kittler R, Erler A, et al. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites[J]. *Am J Hum Genet*, 2004,74(6):1183
- [14] 葛建业, 严江伟, 谢群, 等. 中国 Y-STR 数据库建设相关问题探讨[J]. *法医学杂志*, 2013,29(3):212
- [15] 张玉红, 贾东涛, 韩海军, 等. 南通汉族群体 16 个 Y-STR 基因座遗传多态性[J]. *中国法医学杂志*, 2008,23(3):197
- [16] 宋兴勃, 范红, 应斌武, 等. 成都地区汉族人群 17 个 Y 短串联重复序列基因座遗传多态性分析[J]. *南方医科大学学报*, 2009,29(10):1973
- [17] Brown L, Abigania M, Warburton D. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States[J]. *Prenat Diagn*, 2006,26(11):1068

(2014-07-09 收稿)