

# STR分型技术在马亲子鉴定中的应用

黄娅琳<sup>1,2</sup>

(1. 南京森林公安高等专科学校, 江苏 南京 210046; 2. 国家林业局 野生动植物物证鉴定中心, 江苏 南京 210046)

**摘要:** 利用 STR 分型技术进行马亲子鉴定。取 VHL20、HTG4、AHT4、HMS7、HTG6、HMS6、AHT5、ASB2、HTG7、HMS3、HMS2 共 11 个 STR (短串联重复序列) 基因座, 运用 PCR 技术对争议小马、嫌疑母马以及无关对照马的 DNA 进行扩增, 扩增产物经遗传分析仪检测, 用 GeneMapper 片段分析软件对检测结果进行分析。结果表明, 争议小马与嫌疑母马无亲子关系, STR 基因分型技术能够准确、快速地进行马亲子鉴定, 所用的 STR 位点具有较高的鉴别效率。

**关键词:** STR 分型; 马; 亲子鉴定

中图分类号: S821 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2010)07-0100-04

## Application of STR Loci Analysis in Parentage Identification of Horse

HUANG Ya-lin<sup>1,2</sup>

(1. Nanjing Forest Police College, Nanjing 210046, China; 2. Wildlife Material Evidence Appraisal Center of the State Forestry Administration, Nanjing 210046, China)

**Abstract:** To apply short tandem repeat (STR) loci in the parentage identification of horse, eleven short tandem repeat (STR) loci including VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, HMS6, AHT5, ASB2, HTG7, HMS3, and HMS2 on DNA of three horses were amplified by PCR. The PCR products were further separated and analyzed in a genetic analyzer (AB 3130xl). The results showed that the paternity probability between the young horse and the mare was ruled out. This indicates that most of the STR locus used presently is high performance and STR loci analysis was a validation method for parentage identification in horse.

**Key words:** Short tandem repeat (STR) loci; Horse; Parentage identification

在动物育种中, 自然交配、混合授精等因素常常影响动物亲缘关系的准确认定。此外, 随着人们维权意识的增强, 因家畜归属问题引起的民事纠纷日趋增多。因此, 亟需通过准确、快速的方法来确定动物间亲缘关系以解决此类问题。传统的亲子鉴定方法有标准抗血清法、多价抗血清法、蛋白电泳区分法、DNA 指纹法 4 种方法, 但这些方法在亲子关系的认定上准确率较低。随着微卫星 DNA 研究的深入, 其在亲子鉴定中的应用逐渐增多。STR (短串联重复序列) 位点又称微卫星, 核心重复单位小, 具有

高度遗传多态性, 遵循孟德尔遗传规律, 适合生物学检测<sup>[1]</sup>。目前, STR 复合扩增分型技术已逐步取代传统的血清学方法, 成为人类亲缘关系鉴定的主要方法。由于 STR 具有数量大、分布广且均匀、多态信息含量高、共显性遗传、分析方便、适合进行自动化和半自动化检测、服从孟德尔遗传规律等优点, 在亲缘关系分析、个体认定、亲子鉴定等方面得到了广泛应用<sup>[2]</sup>。有关人的亲子鉴定、个体认定已经形成了一套稳定的 STR 检测方法, 而动物的此类相关研究相对滞后, 可利用的 STR 位点较少。近年来, 美

收稿日期: 2010-02-04

基金项目: 南京森林公安高等专科学校教研基金资助课题 (ZD09202)

作者简介: 黄娅琳 (1976-), 女, 四川内江人, 讲师, 博士, 主要从事野生动植物物证鉴定工作。

E-mail: huangyalin228@yahoo.com.cn

国应用生物系统公司(ABI)开发了牛、马、犬的亲子鉴定试剂盒,本研究利用 ABI 的马亲子鉴定试剂盒,鉴定了一例马亲子鉴定案,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试样本及试剂

供试样本为四川甘孜州康定县人民法院送检的唾液拭子(分别取自争议小马和嫌疑母马)。DNA 提取试剂盒购自上海华舜生物技术公司,马亲子鉴定试剂盒、GS-500 ROX 分子量内标均购自 ABI。

### 1.2 方法

唾液拭子 DNA 提取参照试剂盒说明书,采用微柱法提取。PCR 扩增采用 ABI 生产的马亲子鉴定试剂盒,操作方法按试剂盒说明,并设空白对照管(阴性对照)和阳性对照(无关对照马)管。选取 VHL20、HTG4、AHT4、HMS7、HTG6、HMS6、AHT5、ASB2、HTG7、HMS3、HMS2 共 11 个 STR 基因座,分别用 JOE、FAM、TAMRA 3 种荧光染料标记 11 个不同的 STR 位点,GS-500 ROX 标记内标,11 个 STR 位点的 PCR 在一个反应管内扩增。PCR 产物用美国 AB3130xl 遗传分析仪进行毛细管电泳分离、收集荧光信号、自动分析 PCR 产物的长度,并运用该公司的 GeneMapper 软件自动分析各等位基因的基因型。

## 2 结果与分析

在争议小马、嫌疑母马、无关对照马样本的 VHL20、HTG4、AHT4、HMS7、HTG6、HMS6、AHT5、ASB2、HTG7、HMS3、HMS2 基因座中,均检出基因型。由于遗传分析仪在检测荧光信号时会出现误差,因此将数值相差在 1 以内的基因型视为同一基因型。争议小马、嫌疑母马、无关对照马的 11 个 STR 位点基因分型见表 1。由表 1 可见,在所检测的 11 个 STR 基因座中,争议小马与嫌疑母马有 7 个 STR 位点均具有不同的遗传因子。根据孟德尔遗传规律,子代全部染色体上的遗传因子,各有一半来自其亲生母亲和父亲。而本研究中只涉及母、子单亲的亲缘关系认定,仅能排除亲子关系,而不能进行认定。通常在子代和亲代之间,有 3 个位点不符合孟德尔遗传规律即可排除亲子关系。据此,由于本研究中的嫌疑母马有 7 个位点的基因型未出现在争议小马基因型中,不符合孟德尔遗传规律,故排除争议小马与嫌疑母马间的亲子关系。

图 1 为争议小马、嫌疑母马、无关对照马各

STR 位点毛细管电泳图谱。图 1-A 为未加 DNA 样本的阴性对照,由图 1-A 可见,阴性对照除内标峰外,未见其他峰值,表明所用试剂中无外源 DNA 污染;图 1-B 为加对照马 DNA 样本的阳性对照,可见阳性对照样本的 VHL20、HTG4、AHT4、HMS7、HTG6、HMS6、AHT5、ASB2、HTG7、HMS3、HMS2 基因座中,均检出基因型,表明试验过程正常;图 1-C、图 1-D 分别为争议小马和嫌疑母马 DNA 样本的 STR 位点毛细管电泳图谱,由图 1-C、图 1-D 可见,争议小马和嫌疑母马样本的 VHL20、HTG4、AHT4、HMS7、HTG6、HMS6、AHT5、ASB2、HTG7、HMS3、HMS2 基因座中,均检出基因型,基因型数值如表 1 所示。

表 1 争议小马、嫌疑母马及对照马 11 个 STR 位点基因分型

STR 位点	序列大小/ bp		
	争议小马	嫌疑母马	无关对照马
VHL20	104.56	88.07/94.32	95.85
HTG4	131.30	130.78	127.00
AHT4	157.82	149.25/159.42	144.97/159.42
HMS7	181.50	181.40	177.18/187.71
HTG6	80.28	94.77	80.17
HMS6	161.24	163.30/169.57	159.12/169.56
AHT5	132.80/139.34	139.33	130.68
ASB2	250.00	244.72/257.05	258.14
HMS2	221/231	219.93/228.05	226.08
HTG7	118.41/124.68	117.18	126.90
HMS3	159.41/165.62	159.23/165.55	159.32/165.60

## 3 讨论

亲子关系的认定是法医学鉴定的重要内容之一。长期以来,国内多数实验室采用传统的红细胞血型鉴定方法,但鉴别效率不高,易造成错误的鉴定结果。近年来,由于 DNA 技术的飞速发展,RFLP(限制性片段长度多态性)和 STR 等新的基因分型方法在法医学个体识别和亲子鉴定中的应用越来越广泛,基于 PCR 的 STR 基因分型技术具有高度的灵敏性和可靠性,所需样品用量少且结果快速、稳定,是目前国内外权威机构进行人类亲子鉴定最常用的方法之一<sup>[3]</sup>。相对人类亲子鉴定,STR 分型技术在动物亲子鉴定上的应用起步较晚,且仅限于用较少的 STR 位点,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳对 PCR 产物进行分离、检测<sup>[4-6]</sup>。本研究首次用 ABI 开发的马亲子鉴定试剂盒同时扩增 11 个 STR 位点,并利用遗传分析仪进行毛细管电泳分离、检测,

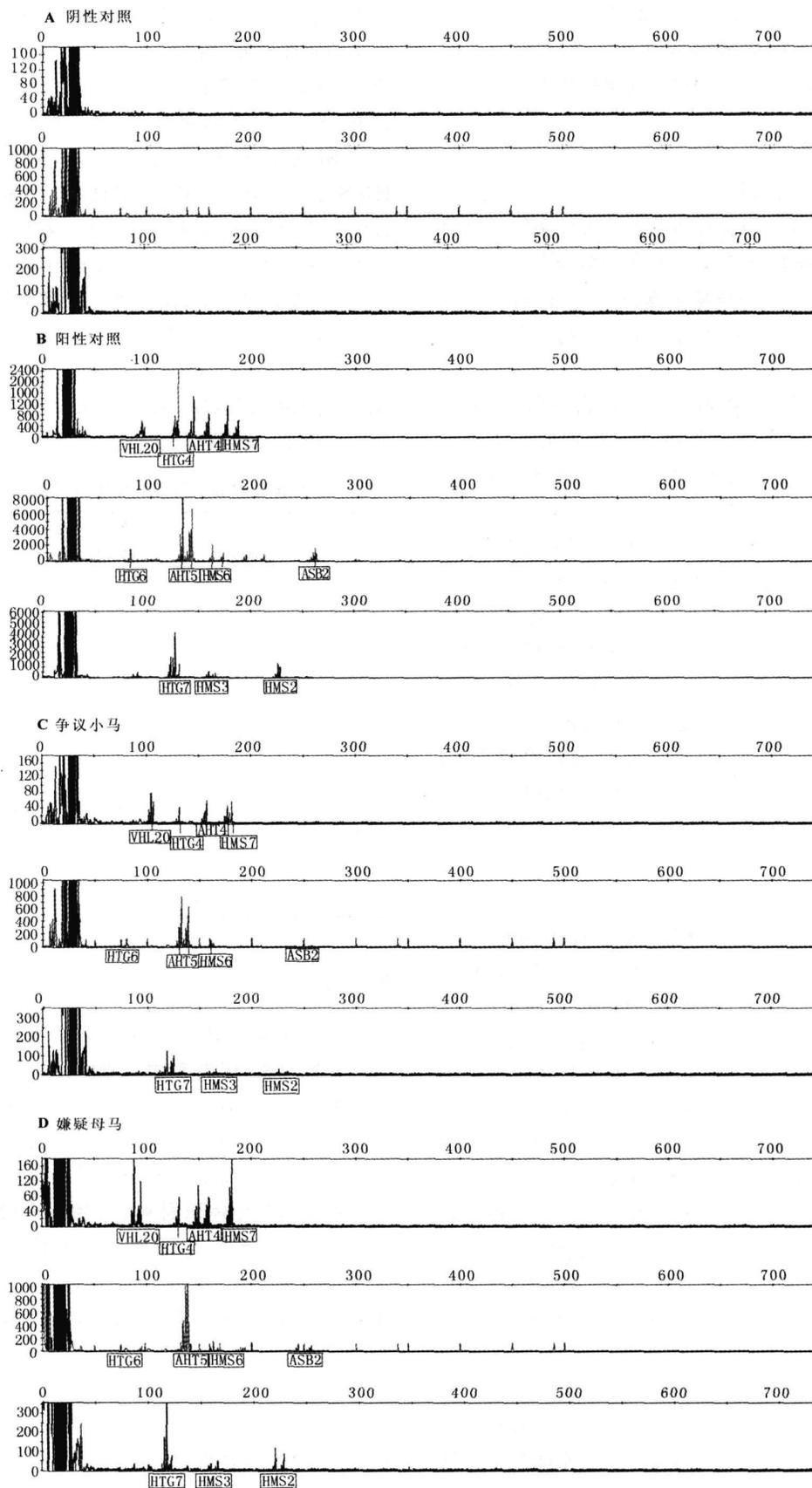


图1 争议小马、嫌疑母马、无关对照马在11个STR位点的基因分型毛细管电泳图谱

完成了一起马的单亲母权鉴定。动物亲子鉴定案件几乎都是涉及单亲鉴定的,而单亲鉴定在确定等位基因的基因型时,将另一亲本传递必须基因的机会按随机个体方式处理。因此,鉴定的准确性较双亲鉴定大大降低,仅能用于排除亲子关系,而不能用于认定。在子代和亲代之间,通常有3个位点不符合孟德尔遗传规律即可排除亲子关系。本研究中所检测的11个STR位点,嫌疑母马有7个位点的基因型未出现在争议小马基因型中,不符合孟德尔遗传规律,即排除争议小马与嫌疑母马间的亲子关系。

试验结果表明,除位点HMS3外,VHL20、HTG4、AHT4、HMS7、HTG6、HMS6、AHT5、ASB2、HTG7、HMS2基因座在所检测的3个样本间具有很高的遗传多态性。在同一模板浓度下,位点VHL20、HTG4、AHT4、HMS7、HTG7、AHT5的PCR扩增产物经遗传分析仪分析,得到的检测峰信号较强,且峰形较好。与传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测法相比,本研究中所用方法简便、快速、准

确,在遗传学研究中具有较强的实用性,可以用于马亲子鉴定,并为其他动物的亲子鉴定或亲缘关系研究提供了思路。

#### 参考文献:

- [1] 辛晓玲,徐照学,闫祥洲,等. 微卫星标记在家畜遗传育种上的应用[J]. 河南农业科学, 2003(7): 63-64.
  - [2] 程大霖. 个体识别和亲子鉴定理论与实践[M]. 北京: 中国检察出版社, 2001: 24-27.
  - [3] 张阮章,王沙燕,戴勇,等. 用STR位点进行亲子鉴定一例报告[J]. 暨南大学学报, 2002, 23(4): 74-75.
  - [4] 贾名威,杨利国,管峰,等. 应用6个STR基因座进行奶牛亲子鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(1): 74-77.
  - [5] 孙业良,谢庄,刘国庆,等. 利用微卫星DNA技术进行绵羊亲子鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32(3): 301-305.
  - [6] 张于光,李迪强,饶力群,等. 东北虎微卫星DNA遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用[J]. 动物学报, 2003, 49(1): 118-123.
- 
- (上接第99页) 研究发现,肌内脂肪对肉的风味、多汁性和嫩度有显著的影响,它们之间呈正相关关系。肌内脂肪含量与肌肉水分和烹调损失存在负相关,提高肌内脂肪含量,降低皮下脂肪和腹脂是当今乃至今后禽类育种的主攻目标之一,这已是商业育种者追求利益最大化的根本之路。本研究结果提示,T290C位点可能是白羽番鸭脂肪沉积的标记性位点,但有待于扩大样本数及在其他番鸭品种中进一步验证。同时,还应筛查番鸭脂联素基因编码区及其两翼序列的多态性是否对肉质和其他生产性状也存在显著效应,最终获得真实可靠的分子遗传标记,以期用于番鸭性状标记辅助选择的育种实践。
- 参考文献:
- [1] Senay A, Mithat B, Alpaslan T, *et al.* Serum resistin and adiponectin levels in young non-obese women with polycystic ovary syndrome[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2009, 15(9): 1-6.
  - [2] Bonnard C, Durand A, Vidal H, *et al.* Changes in adiponectin, its receptors and AMPK activity in tissues of diet-induced diabetic mice[J]. *Diabetes & Metabolism*, 2008, 34(1): 52-61.
  - [3] 郭志新,吴苏豫,孙英姿. 脂联素基因276位点多态性与2型糖尿病肾病的关系[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(6): 507-510.
  - [4] 董飏,龚道清,孟和,等. 鸭脂联素基因单核苷酸多态性检测及群体遗传分析[J]. *遗传*, 2007, 29(8): 995-1000.
  - [5] 刘大林,俞亚波,魏岳,等. 脂联素基因对京海黄鸡体重及屠体性状的遗传效应[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2009, 30(1): 31-34.
  - [6] 包文斌,周群兰,吴信生,等. 藏鸡和萧山鸡体尺及屠宰性能的比较分析[J]. *中国家禽*, 2005, 27(7): 17-19.
  - [7] 王遂军,贾伟平,包玉倩,等. 脂联素基因多态性与肥胖、血清脂联素水平的相关性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(7): 1295-1299.
  - [8] Lee Y Y, Lee N S, Cho Y M, *et al.* Genetic association study of adiponectin polymorphisms with risk of type 2 diabetes mellitus in Korean population[J]. *Diabet Med*, 2005, 22(5): 569-575.
  - [9] Qi Y, Takahashi N, Hileman S M, *et al.* Adiponectin acts in the brain to decrease body weight[J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(5): 524-529.
  - [10] Chambers J R, Fortin A, Mackie D A, *et al.* Comparison of sensory properties of meat from broilers of modern stocks and experimental strains differing in growth and fatness[J]. *Canad Instit Food Sci Technol J*, 1989, 22: 353-358.