

# 人类 DNA 指纹分析

生物信息班 李泽华 320210928501

2023 年 11 月 22 日

## 目录

<b>1 实验目的</b>	<b>2</b>
<b>2 实验原理</b>	<b>2</b>
2.1 遗传标记和 DNA 指纹技术 . . . . .	2
2.2 人类 DNA 指纹分析 . . . . .	2
2.3 基因座选择 . . . . .	3
<b>3 实验用品</b>	<b>3</b>
3.1 实验材料 . . . . .	3
3.2 实验试剂 . . . . .	3
3.3 实验仪器 . . . . .	4
<b>4 实验步骤</b>	<b>4</b>
4.1 可变数目串联重复序列 (VNTR) . . . . .	4
4.2 短串联重复序列 (STR) . . . . .	6
<b>5 实验结果</b>	<b>8</b>
<b>6 讨论</b>	<b>8</b>
<b>7 参考文献</b>	<b>8</b>

## abstract

...

## 摘要

...

## 1 实验目的

- 了解 DNA 指纹分析技术的原理和应用。
- 级悉可發效国事联正复序 3 YNTB) 列知事联重复序列 (SPR) 多态性的含义。
- 掌握可变数目串联重复序列和短串联重复序列多态性的检测和分析方法。

## 2 实验原理

### 2.1 遗传标记和 DNA 指纹技术

遗传标记在遗传学的建立和发展过程中有着举足轻重的作用,随着遗传学的进一步发展和分子生物学的异军突起,遗传标记先后相应地经历了形态标记、细胞学标记、生化标记和 DNA 分子标记四个发展阶段。DNA 分子标记本质上是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性 DNA 片段。DNA 分子标记大多以电泳谱带的形式表现生物个体之间的 DNA 差异,通常也称为 DNA 的指纹图谱。产生 DNA 指纹图谱的过程叫作 DNA 指纹分析。DNA 指纹技术的发展日新月异,第一代的分子标记是以 Southern 杂交为基础的限制性片段长度多态 (restriction fragment length polymorphism,RFLP),第二代分子标记是以 PCR 为基础的各种 DNA 指纹标记,如 RAPD、AFLP、短串联重复序列 (short tandem repeats,STR) 和可变数目的重复序列 (variable number of tandem repeat, VNTR),第三代分子标记是以单核苷酸多态性为基础的 SNP。一种理想的分子标记应具有以下特点:多态性高,重复性和稳定性好,带型清晰,容易统计,在染色体上均匀分布,共显性,简单快速,易自动化,开发和使用成本低廉等。

### 2.2 人类 DNA 指纹分析

人类基因组 DNA 中存在一类串联重复序列,其核心序列的长度为 10~70bp,该串联重复单位 (核心序列) 数目在人群中存在较大差异,具有高度多态性,称为可变数目串联重复序列 (VNTR) 或小卫星 (mini-satellite) DNA。短串联重复序列 (STR) 形成多态性的原理与 VNTR 基本相同。

STR 的核心序列短，为 2 7bp，片段长度为 100 500bp。STR 位点广泛地分布在人类基因组中。据估计，在人类基因组中，每 20kb 就有一个包含 3 或 4 个核苷酸重复序列的 STR 位点。因 STR 具有高度多态性及遗传稳定性，已逐渐取代 RFLP、VNTR 而被广泛应用于遗传疾病的诊断和法医学个人识别。

## 2.3 基因座选择

本实验选择人类基因组中的三个 VNTR 基因座（D1S80, D17S30 和 ApoB3'）和 21 号染色体上的四个 STR 基因座（D21S11, D21S1432, D21S2054 和 D21S1446）作为研究对象，通过对人基因组 DNA 的提取、多态性片段的 PCR 扩增以及电泳检测，了解串联重复序列多态性的含义和原理，掌握其检测和分析方法。

# 3 实验用品

## 3.1 实验材料

参试者口腔上皮细胞

## 3.2 实验试剂

### 1. 口腔上皮细胞 DNA 提取

- 0.4% 生理盐水。
- 裂解液：25 mmol/L NaOH, 0.2 mmol/L EDTA（乙二胺四乙酸）。
- Tris-HCl（40 mmol/L, pH 5.0）。
- 无水乙醇。
- TE: 7 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 1 mmol/L EDTA.

### 2. 全血 DNA 提取

- 5% Chelex100 溶液：
- Chelex 100 (Bio-Rad) 0.5 g, 50 mmol/L Tris-HCl 10 mL, 用 4 mol/L NaOH 调 pH 至 11.0, 室温可保存 3 个月，使用前充分混匀。

### 3. PCR 试剂

- 2×Taq PCR Master Mix, ddH<sub>2</sub>O, 上下游引物，模板 DNA。

### 4. 电泳检测试剂

- 2.0% 琼脂糖凝胶：称取 2.0g 琼脂糖放入 250 mL 三角烧瓶，加入 1XTAE 溶液 100mL 微波炉加热溶解，冷却至 60°C 左右加入终浓度为 1wg/mL 溴化乙锭（EB），缓慢混匀后倒胶板。
- 10×TAE 电泳缓冲液：Tris 48.4g，冰醋酸 11.42 mL，0.5 mol/L EDTA（pH8.0）20mL，蒸馏水定容至 1000 mL，室温保存。
- 0.5 mol/L EDTA（pH8.0）：Na<sub>2</sub> EDTA 18.61 g，NaOH 2.0g，蒸馏水定容至 100mL。
- 溴化乙锭（EB）：用无菌水配制 5 mg/mL 储藏液，工作浓度 1 wg/mL。
- 10x 上样缓冲液（Loading dye）：溴酚蓝 0.25g，二甲苯腈蓝 0.25g，蔗糖 50.0g（或甘油 50mL），用无菌水 60mL（用甘油时 49mL）溶解上述试剂，定至 100mL，室温保存。
- 0.16 mol/L 硝酸溶液。
- 10 mmol/L 硝酸银溶液。
- 0.28 mol/L 碳酸钠溶液。
- 1.67 mol/L 乙酸。
- 聚丙烯酰胺，DNA 相对分子质量标记。

### 3.3 实验仪器

微量移液器、高速冷冻离心机、恒温水浴锅、旋涡振荡器、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、冰箱、制冰机、无菌枪头、无菌离心管（1.5 mL, 0.5 mL）、无菌棉签、离心管盒、枪头盒、纸杯等。

## 4 实验步骤

### 4.1 可变数目串联重复序列 (VNTR)

#### 1. 基因组 DNA 的提取

- (a) 漱口，用无菌棉签刮取口腔脱落上皮细胞
- (b) 将富集口腔脱落细胞的拭子放入 1.3mL 离心管中。
- (c) 将拭子置于振荡器上，振荡 1min 左右，小心地取出拭子，再用适量的生理盐水冲洗。
- (d) 13000rpm 离心 1min，小心地将上清液全部取出。沉淀物即为口腔上皮细胞，
- (e) 在沉淀物中加入 25~50μL 裂解液，振荡 10s。
- (f) 98°C 孵育 20min，振荡后加入等体积 Tris-HCl（40 mmol/L, pH5.0）。

- (g) 13 000 t/min 离心 10 min，取上清液。
- (h) 加入无水乙醇，-20℃ 放置 15 min。
- (i) 13000 r/min 离心 15 min
- (j) 弃上清，晾干后即得到口腔脱落上皮细胞 DNA。
- (k) 加入适量 TE 溶解 DNA，4℃ 或-20℃ 保存待用。
- 为提高 DNA 的产率和纯度，可选用 TANamp SwabDNA Kit（口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒，离心柱型，目录号：DP322）。

2. PCR 扩增

3 个 VNTR 基因座的引物序列和 PCR 扩增体系及扩增参数分别见表1和表2。

位点	引物序列	变性	退火	延伸	循环数
DIS80	5'-GAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCGCCG-3' 5'-GTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCTTGC-3'	95 °C, 60 s	65 °C, 60 s	72 °C, 60 s	30
D17S30	5'-GGAAGAGTGAAGTGCACAGG-3' 5'-CACAGTCTTTATTCTTCAGCG-3'	94 °C, 30 s	55 °C, 30 s	72 °C, 80 s	30
ApoB3'	5'-ATGGAAACGGAGAAATTATG-3' 5'-CCTTCTCACTTGGCAAATAC-3'	94 °C, 60 s	63 °C,60 s	72 °C,120 s	26

表 1: 3 个 VNTR 基因座的引物序列和 PCR 扩增条件

名称	体积/微升
上游引物（5wm）	1.0
下游弓物（5wm）	1.0
2xTaq PCR Master Mix	12.5
ddH <sub>2</sub> O	0.5
模板 DNA	10.0
总体积	25.0

表 2: 3 个 VNTR 位点 PCR 扩增体系

3. 电泳与检测

采用 2% 琼脂糖凝胶 60V 电泳，30 40 min 后取出凝胶用清水漂洗 5~10 min。凝胶成像系统观察和记录每个个体的 DNA 条带数目及其位置

4. 数据记录与分析

读取各个体样本的基因型，计算基因型频率及等位基因频率，用  $\chi^2$  检验进行 Hardy-Neinberg 平衡吻合度检验。

4.2 短串联重复序列 (STR)

1. 基因组 DNA 的提取

- (a) 取 3-10mL 全血加入 1.5 mL 离心管中，再加入 500wL 纯水，剧烈振荡，室温下放置 15 min。
- (b) 13000 t/min 离心 3min，弃上清，收集沉淀。（必要时可用蒸馏水反复清洗沉淀物，直至无色或血色素很少）。
- (c) 沉淀中加入 200 wL 5% Chelex-100 溶液（5% Chelex-100 为悬浊液，使用前要充分振荡，使 Chelex-100 颗粒悬浮），在振荡器上反复振荡后，放入 56°C 水浴保温 30min 以上。
- (d) 取出后振荡，100°C 保温 8 min，再振荡后，13000 t/min 离心 3min，上清用于 PCR 扩增，或放 4°C 保存备用。（此 DNA 样本可在 4°C 或 -20°C 保存，必要时在使用前再次加热并离心，使管内物质分层）

2. 位点选择及其特性 (表3)

位点	重复序列	片段大小 (bp)	染色体位置 (Mb)
D21S11	TCTG	202~260	21q22.11
D21S1432	ATAG/TAGA	127~155	21q22.2
D21S2054	TCTA	162~182	21q22.11
D21S1446	TCTA/ATCT	160~187	21q22.3

表 3: 4 个 21 号染色体 STR 位点的基本参数

3. PCR 扩增

3 个 VNTR 基因座的引物序列和 PCR 扩增体系及扩增参数分别见表4和表5。

位点	引物序列	变性	退火	延伸	循环数
D21S11	5'-TATGTGAGTCAATCCCAAG-3' 5'-GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC-3'	95°C,15s	58°C,60s	60°C,60s	30
D21S1432	5'-CTTAGAGGGACAGAACTAATAGGC-3' 5'-AGCCTATTGTGGGTTTGTGA-3'	95°C,15s	60°C,60s	60°C,60s	30
D21S2054	5'-GAGTAAATGTCATGAAACAAGG-3' 5'-ATGATAGGTAGATGGATCAATTAGA-3'	95°C,40s	56°C,40s	72°C,30s	32

D21S1446	5'-ATGTACGATACGTAATACTTGAGAA-3' 5'-GTCCCAAAGGACCTGCTC-3'	94°C,40s	56°C,50s	72°C,50s	35
----------	---	----------	----------	----------	----

表 4: 4 个 VNTR 基因座的引物序列和 PCR 扩增条件

名称	体积/微升
上游引物 (S wm)	2.2
下游引物 (S wm)	1.2
2XTaq PCR MasterMix	6.0
ddH <sub>2</sub> O	2.1
模板 DNA	2.0
总体积	12.5

表 5: 4 个 21 号染色体 STR 位点 PCR 扩增体系

4. 变性凝胶电泳

取扩增产物 2.0wL 与 2.0wL 变性加样缓冲液混合均匀，95°C 变性 2 min，立即置于冰浴，采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳，先预电泳 1h，上样后恒功率 40W，电泳 3h。完毕后  
将凝胶取下，用双蒸水冲洗 1 次，置于 0.16 mol/L 硝酸溶液中，轻摇反应 10min，双蒸水冲  
洗，再置于 10 mmol/L 硝酸银溶液中，轻摇反应 20 min，双蒸水冲洗，然后置于 0.28 mol/L  
碳酸钠溶液中，轻摇反应，至条带清晰后加入 1.67 mol/L 乙酸终止反应并固定显色。

5. DNA 序列的测定

挑选每个 STR 位点中至少 2 个以上不同片段长度的纯合子样本，经 PCR 扩增及纯化试剂盒  
纯化后进行 DNA 序列测定，根据测序结果推测其余不同片段长度等位基因的重复数。

6. 统计学分析

运用直接计数法观察位点的基因频率，通过 PowerStats 软件进行数据统计分析，计算杂合  
度 (heterozygosity, H)、多态信息量 (polymorphism information content, PIC) 及个体识别  
率 (average power of discrimination, PD)。用 x 进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验。

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

其中: n 为等位基因的数目,  $p_i$  为等位基因的频率。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

其中:  $n$  为等位基因的数目,  $p_i$  为第一个等位基因在群体中的频率。

## 5 实验结果

## 6 讨论

## 7 参考文献