



RRPG89120118 (P.P)

法務部法醫研究所

八十九年度專題研究計畫期末報告書

計畫編號：IFM89-B004

計畫名稱	中文：APOAI1 基因頻率在國人分佈之研究		
	英文：The distribution of gene frequency of APOAI1 locus in the Chinese population from Taiwan		
執行期限	中華民國 88 年 7 月 1 日至 89 年 12 月 31 日		
計畫主持人	李俊億	執行機關	中央警察大學
連絡電話	03-3281823	傳真號碼	03-3275907
		E-MAIL 信箱	Jimlee@sun4.cpu.edu.tw

計畫名稱：APOAI1 基因頻率在國人分佈之研究

一、目錄

	頁碼
一、目錄	1
二、中文摘要	2
三、英文摘要	2
四、計畫緣由、目的	3
五、研究方法	5
六、六研究結果與討論	6
七、計畫成果自評	7
八、參考文獻	7
九、附圖表	10

二、中文摘要

本研究提出高變異的 APOAI1 基因位的命名法則與台灣人的基因頻率，在這複雜的基因位中重複序列的變化導致對偶基因型間的差異小到只差一個鹼基。PCR 複製出的基因產物以 SSCP 單股構形多型電泳分離出單股 DNA 後，被切進行第二次相同的 PCR 複製，同質的 DNA 片段被複製出後，經純化與定序再進行統計分析。在一百個樣品中被定出三十個對偶基因型與七十三個基因型，同時提出合乎邏輯的 APOAI1 基因位的命名法則。利用本研究設計的引子可以複製出這個基因位的產物並依其長度定出對偶基因型，這個命名系統可以幫助實驗室間交換這個基因位的數據，提高其應用價值。

關鍵詞：APOAI1 基因、STR 基因、人別鑑定

三、英文摘要

A novel nomenclature for the hypervariable microsatellite DNA, APOAI1 locus, is proposed. The complex nature of the repeat unit in this locus results in alleles separated by a single base. PCR products amplified from this locus were separated by single strand conformation polymorphism (SSCP) electrophoresis. All the single stranded DNA bands on the SSCP gel were removed from the gel and a second amplification performed. Homozygous DNA fragments amplified from single stranded DNA were sequenced. From the 100 individuals studied, 30 alleles and 73 genotypes were found. A system of nomenclature for the APOAI1 locus is provided that is logical and in line with previous models. Using the primers described the locus can be amplified and alleles designated on the basis of size. This system of nomenclature will assist in the exchange of data between laboratories for this locus.

Keywords: APOAI1 locus、STR locus、personal identification

四、計畫緣由、目的

STR 基因(short tandem repeat 短重複序列)最初是在研究人類基因組之連鎖圖時發現的[1-3]，近年來，則被以重複序列探針大量選殖出來[4]，其重要特性有：長度短，平均約從 100 bp 至 400 bp；變異性高；分佈廣，散落在整個基因組中。這些特性應用在人別鑑定上，可以輕易地由 PCR 複製分析，由於數以千計的 STR 基因已被發現，並應用在各種領域上，而鑑識科學之刑事 DNA 分析政策亦受其影響，成為基因檔案重要系統之一，因為 STR 基因長度短複製容易，對裂解 DNA 之鑑定較 AMP-FLP 或 VNTR 靈敏；對偶基因型間長度差異小，PCR 複製時，無 VNTR 之複製偏差缺點；且鑑定方法簡便、精確，未來配合自動化分析儀器，將可快速建立基因檔案。目前應用在鑑識科學之 STR 系統多為肆核酸重複 DNA (tetranucleotide repeat)，如 HUMCD4[5]、HUMF13B[6]、HUMTPOX[7]、HUMvWFA31[8]、HUMFESFPS[9]、HUMF13A01[10]、HUMTH01[11]、HUMRENA4、HUMHPRTB、HUMSTRX1[12]、與 HUMLPL[13]等，目前最常用之鑑定方法為定序膠電泳/螢光偵測法 (fluorescent detection)，以 PCR 將 STR DNA 複製出後，進行電泳分離，並同時偵測螢光染料，分析 STR DNA 之長度及對偶基因型。目前常用的 STR 基因大都是以四個鹼基為重複單位的多型基因，重複單位之變化性不大，所形成的對偶基因型較少，因此，在進行人別鑑定應用時，為提高鑑別能力，通常由數個 STR 基因組成一個組合[14,15]，方能產生較高的鑑別能力。本研究為表現單一 STR 基因，亦具有極高的鑑別能力，因此，選取變異性極高之 APOAII 基因進行分析。HUMAPOAII 基因位於第 11 條染色體，所製造之蛋白質係一種脫輔基脂蛋白 (apolipoprotein)，此蛋白質功能主要是維持脂蛋白 (lipoprotein) 的結構完整。因為此脫輔基脂蛋白會與特定細胞的受體 (receptor) 結合充當配體 (ligand)，因此具有幫助脂蛋白被人體組織吸收的功能[16]。從基因庫查詢所得之 HUMAPOAII 基因內 intron 相關重複序列部分 (Accession number 為 X01392) 為：

ttttcctca cagggccttt gtcaggctgc tgcggcagag atgacagagt tgagactgca

ttctcccag gtccctcctt tctcccggga gcagtcctag ggcgcgccgt tttatccctc

atttccattt tcttttctt tccctttctt tcttttteta tttttttt tttttttt

tttttttt tttttttt tttttttt tttttcttt cttttttcc tttttttt

tttttttt ttttttct ttttttct tttttttt cttttttt tttttttt

cctctctcc tttctctt ttttttct tttttttt ttaatggagt ctcctctgt

caccaggct ggagtcagt ggtgccatc eggctcactg caacctccgt ctcccgggt

由此部分序列可以得知本基因 DNA 序列中有許多 TTTC 重複序列，屬於 STR 多型基因類，可以 PCR 複製分析，作為刑事鑑識上人別鑑定的良好遺傳標記。

五、研究方法

隨機採取本校師生捐獻之血液或唾液樣品一百個，以 salt/chloroform 法萃取 DNA。設計兩條引子 5'- GACAGAGTTGAGACTGCATTCCTC-3' 與 5'- TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG -3'，預期複製長度約 3-400bp，在 25 μ L 之 PCR 反應液(10 mM Tris-HCl pH9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% gelatin 及 0.1% TritonX-100) 中，內含引子各 100 ng、DNA 樣本 10 ng、TAQ DNA Polymerase (Protech Technology Enterprise Co. Ltd.) 1.25 unit 及 100 μ M dNTP，以 DNA Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 480 Perkin Elmer) 複製，熱循環溫度為 94°C 45 秒、60°C 45 秒、72°C 45 秒執行 30 個循環，PCR 產物長度約為 250-300bp。PCR 產物以 SSCP 電泳分析，將 PCR 複製之特異產物，在 SSCP 電泳膠上分離出單股 DNA，使異質結合之基因型的兩個對偶基因型(allele)可以分別被切下，再重複進行上述 PCR 複製，將單純的單一對偶基因型複製出來。將複製出的 PCR 產物進行定序反應實驗，以確認特定對偶基因型之鹼基序列。累積國人之對偶基因型序列、數目、頻率、並分析各對偶基因型特異結構。

六、研究結果與討論

本研究在 100 個人類 APOA1I 基因位樣品中，共發現 64 種 SSCP 特異圖譜，及 30 種對偶基因型（相同長度片段之序列型均相同）與 73 種基因型，其中基因型不同的 2 組樣品（每組代表有相同基因型的全部樣品），但 SSCP 圖譜出現相同者有 3 種，基因型不同的 3 組樣品，但 SSCP 圖譜出現相同者亦有 3 種，另並無發現基因型不同，SSCP 圖譜相同的情形，故 SSCP 特異圖譜僅形成 64 種；在 PCR 引子對設計方面，本研究發現複製人類 APOA1I 基因位之國外文獻上的引子之序列與本研究檢體所定序出的實際序列有數個位置之鹼基出現差異（共 3 種變異情形），因此，本研究依據 NCBI 的基因庫重新設計人類 APOA1I 基因位之 5'端引子，並成功建立最佳之 PCR 引子對。本研究篩檢一百個檢體經定序後以長度為名出現的頻率如表一。

在對偶基因型命名方面，將人類 APOA1I 基因位對偶基因型之序列結構分析後歸納成五種規則，如表二所示，依此規則進行命名可僅由對偶基因型名稱判定其序列結構。但本研究檢體中，發現 299bp 片段序列結構之 C 到 I 區與第 2 種對偶基因型 n.1 相同，但 B 區前側序列結構與其他對偶基因型序列結構並不相同，故以其長度作為對偶基因型名稱，即 allele 299（如表三）；347bp 片段序列結構之 A 區及 C 到 I 區與第 1 種 allele n 相同，但 B 區插入 2 個鹼基 TT，故命名為 allele 19*2（第 5 種序列）。本研究篩檢一百個檢體出現的二十九種對偶基因型(除對偶基因型 299 外)之序列結構如表四。本研究所提供高變異基因鑑定模式，對人別鑑定與大量嫌犯篩檢鑑定工作上，可提供便利、經濟、快速、正確及靈敏的鑑定，同時達到多層檢驗且強化犯罪現場所採取之生物跡證的鑑別能力，在犯罪偵查過程中具有極高的價值。

七、計畫成果自評

由於目前常用的 STR 基因大都是以四個鹼基為重複單位的多型基因，重複單位之變化性不大，所形成的對偶基因型較少，因此，在進行人別鑑定應用時，為提高鑑別能力，通常由數個 STR 基因組成一個組合，方能產生較高的鑑別能力。本研究為表現單一 STR 基因，亦具有極高的鑑別能力，因此，選取變異性極高之 APOA11 基因進行分析，本研究定出合乎邏輯的命名規則，相信往後各實驗室對此基因位的鑑定數據可以依此命名並相互交換，對提高此基因位之應用價值具有重要的貢獻。

八、參考文獻

1. Wyman, A. R., and White, R., "A Highly Polymorphic Locus in Human DNA," *Proceedings of National Academy of Science USA*, Vol. 77, 1980, pp. 6754-6758.
2. de Martinville, B., Wyman, A. R., White, R., et al., "Assignment of the First Random Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Locus (D14S1) to a Region of Human Chromosome 14," *American Journal of Human Genetics*, Vol. 34, 1982, pp. 216-226.
3. Bell G. I., Selby, M. J., and Rutter, W. J., "A Highly Polymorphic Region Near the Human Insulin Gene Is Composed of Simple Tandemly Repeating Sequences," *Nature*, Vol. 295, pp. 31-35.
4. Walder RY, Garrett MR, McClain AM, Beck GE, Brennan TMH, Kramer NA, Kanis AB, Mark AL, Rapp JP, Sheffield VC " Short tandem repeat polymorphic markers for the rat genome from marker-selected libraries." *Mamm Genome* 1998 ;9(12):1013-21
5. Edwards, M. C., Clements, P. R , Tristan, M., and Pizzuti, A., "Pentanucleotide

- repeat length polymorphism at the human CD4 locus," *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, 1991, p. 4791.
6. Nishimura, D. Y., and Murray, J. C., "A tetranucleotide repeat for the F13B locus," *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, 1992, p. 1167.
 7. Anker, R., Steinbrueck, T., and Donis-Keller, H., "Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus," *Human Molecular Genetics*, Vol. 1, 1992, p. 137.
 8. Kimpton, C., Walton, A., and Gill, P., "A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene," *Human Molecular Genetics*, Vol. 1, 1992, p. 287.
 9. Polymeropoulos, M. H., Rath, D. S., Xiao, H., and Merrill, C. R., "Tetranucleotide repeat polymorphism at the human c-fes/fps proto-oncogene (FES)," *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, 1991, p. 4018.
 10. Polymeropoulos, M. H., Rath, D. S., Xiao, H., and Merrill, C. R., "Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (FBA1)," *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, 1991, p. 4306.
 11. Puers, C., Hammond, H. A., Jin, L., and Thomas Caskey, C., Schumm, J. W., "Identification of repeat Sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUM TH01 [AATG]_n and reassignment of allele ladder," *American Journal of Human Genetics*, Vol. 53, 1993, pp. 953-958.
 12. Edwards, A., Ciritello, A., Hammond, H. A., and Thomas Caskey, C., "DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats," *American Journal of Human Genetics*, Vol. 49, 1991, pp. 746-756.
 13. Zuliani, G., and Hobbs, H. H., "Tetranucleotide Repeat Polymorphism in the LPL Gene," *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, 1990, p. 4958
 14. PE Applied Biosystems, AmpFLISTER Profiler Plus and Cofiler PCR

Amplification Kit User Manual, 1998

15. Promega, PowerPlex 16 STR system, 1998.
16. Andrew A . , PROTTER , Beatriz Levy-Wilson , Isolation and Sequence Analysis of the Human Apolipoprotein CIII Gene and the Intergenic Region between the Apo AI and Apo CIII Genes, DNA 1984,Volume3,Number 6,449-456.

九、附圖表

表一 一百個台灣地區中國人在 APOAII 基因位之長度基因型分佈

Genotype(bp)	Count	Genotype(bp)	Count	Genotype(bp)	Count	Genotype(bp)	Count
299,320	1	316,325	1	320,337	1	328,337	2
299,322	1	316,326	2	320,338	1	328,340	1
299,324	1	316,327	1	322,324	1	329,329	2
299,327	1	316,328	1	322,333	2	329,332	1
299,328	1	316,329	2	323,326	2	329,333	1
299,329	2	316,333	1	323,329	1	329,334	3
310,310	1	316,337	1	324,330	2	329,337	5
310,314	1	316,338	1	324,337	3	329,341	1
310,320	1	316,341	1	324,338	1	329,342	1
310,323	1	316,344	1	325,329	1	329,347	1
310,325	1	318,323	1	325,333	2	330,333	2
310,345	1	320,320	2	325,338	1	330,334	2
312,312	2	320,322	2	326,326	1	330,341	1
312,337	1	320,326	1	326,327	1	332,332	1
313,338	1	320,327	1	326,329	3	333,345	1
314,321	1	320,329	2	326,330	1	334,334	1
315,323	1	320,330	1	327,331	1	334,337	1
316,322	2	320,333	1	328,334	1	338,342	2
316,324	1						

表二 APOAII 基因位的五種規則性重複序列結構

Type	Allele	Repeat unit									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	
I	n	TTT--	(CTTT) _n	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--	(CTTT) ₄	C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄					
II	n.1	TTTTT	(CTTT) _{n-1}	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄							
III	n.2	TTT--	(CTTT) _{n+2}	C(CTTT) ₄ -----	TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₅						
IV	n.3	TTT--	CTTT) _{n+1}	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄							
V	n*2	TTT--(CTTT) _{n-1} TT(CTTT)	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--	(CTTT) ₄	C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						

表三 APOAII 基因位之對偶基因型 299 與 10.1 的序列比較

Allele	5' upstream	Repeat unit									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	
299	(CTTT) ₂ CC(CTTT) ₂ CT(CTTT)CTGTTT--	(CTTT) ₄	TT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄								
10.1	(CTTT) ₂ -----	CT(CTTT)CTATTTTT(CTTT) ₆ C-(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄									

表四 本研究篩檢一百個檢體出現的二十九種對偶基因型(除對偶基因型 299 外)之

序列結構

Allele	Size (bp)	Repeat Unit								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
10.1	310	TTTTT	(CTTT) ₉	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
10.3	312	TTT--	(CTTT) ₁₁	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
11.1	314	TTTTT	(CTTT) ₁₀	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
11.2	315	TTT--	(CTTT) ₁₃	C(CTTT) ₄ -----TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₅						
11.3	316	TTT--	(CTTT) ₁₂	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
12.1	318	TTTTT	(CTTT) ₁₁	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
12.3	320	TTT--	(CTTT) ₁₃	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
13	321	TTT--	(CTTT) ₁₃	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--(CTTT) ₄ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
13.1	322	TTTTT	(CTTT) ₁₂	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
13.2	323	TTT--	(CTTT) ₁₅	C(CTTT) ₄ -----TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₅						
13.3	324	TTT--	(CTTT) ₁₄	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
14	325	TTT--	(CTTT) ₁₄	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--(CTTT) ₄ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
14.1	326	TTTTT	(CTTT) ₁₃	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
14.2	327	TTT--	(CTTT) ₁₆	C(CTTT) ₄ -----TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₅						
14.3	328	TTT--	(CTTT) ₁₅	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
15	329	TTT--	(CTTT) ₁₅	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--(CTTT) ₄ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
15.1	330	TTTTT	(CTTT) ₁₄	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
15.2	331	TTT--	(CTTT) ₁₇	C(CTTT) ₄ -----TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₅						
15.3	332	TTT--	(CTTT) ₁₆	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
16	333	TTT--	(CTTT) ₁₆	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--(CTTT) ₄ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
16.1	334	TTTTT	(CTTT) ₁₅	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
17	337	TTT--	(CTTT) ₁₇	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--(CTTT) ₄ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
17.1	338	TTTTT	(CTTT) ₁₆	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
17.3	340	TTT--	(CTTT) ₁₈	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
18	341	TTT--	(CTTT) ₁₈	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--(CTTT) ₄ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
18.1	342	TTTTT	(CTTT) ₁₇	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₄ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
18.3	344	TTT--	(CTTT) ₁₉	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ TCTT(CTTT) ₃ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
19	345	TTT--	(CTTT) ₁₉	C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--(CTTT) ₄ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						
19*2	347	TTT--	(CTTT) ₁₈	TT(CTTT)C(CTTT) ₃ C(CTTT) ₃ -C--(CTTT) ₄ C(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₄						