微卫星复杂结构对分型的影响:以熊 UamD116 和 UamB1 为例*

张小芳^{1,2} 杨淑慧¹ 马 跃^{1,2} 徐艳春^{1,2△} 宋伟杰¹

(1东北林业大学野生动物资源学院 黑龙江 哈尔滨 150040 2 国家林业局野生动植物检测中心 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的 微卫星是基因组上的短串联重复序列 具有高度多态性 表现为核心序列中重复单位的重复次数的变化 这种变化造成不同等位基因核心序列的长度不同。因此 其基因型主要依靠 PCR 扩增片段长度来判定。在各类研究中 人们更倾向于使用 4 碱基重复的微卫星以减少 2 碱基微卫星的 stutter 等问题的影响。但是 4 碱基微卫星核心序列结构复杂时 就会对分型的正确性产生影响 从而影响到下游分析的正确性。在很多野生动物的研究中 这一问题常常被忽略。本文以亚洲黑熊(Ursus thibetanus)的 2 个四碱基微卫星位点 UamD116 和 UamB1 为例 ,揭示内部结构对分型的影响。方法:我们选用 96 份亚洲黑熊样品(包括血液、肌肉组织和毛发等样品)进行微卫星分型研究 通过荧光标记的 PCR 扩增和毛细管电泳分型 ,比较了基于扩增片段长度的分型和基于序列核心结构的分型效果的差异。结果:UamD116 核心序列结构除了含有多种不同的重复单位外 ,还在重复单位之间有碱基插入,出现单碱基 T、二碱基 TC 和三碱基 AAG 插入,并在一类等位基因下游侧翼序列有 1 个 GA 缺失。基于序列结构的分型 中可以将不同的等位基因分开,而在基于片段长度的分型中,容易将不同的等位基因合并为 1 个等位基因。在位点 UamB1 共发现两种类型的等位基因,在一类等位基因中出现一个 3bp 的插入,使等位基因之间的差异不再是 4bp ,而是 1bp。在仅依据片段长度分型时 相差 1bp 的等位基因被认定为 1 个。此外,还有不同等位基因核心序列不同,但是二者长度完全一致。依据片段长度分型共发现 8 个等位基因,而经过序列分型确定的等位基因数为 12 个 相应地基因频率及其他遗传学参数都发生相应的改变。结论:对于核心序列结构复杂的微卫星必须通过等位基因测序来矫正片段长度分型的结果,才能得到可靠的群体遗传学结论。关键词 微卫星,分型,等位基因结构,亚洲黑熊;Ursus thibetanus

中图分类号 Q-33 Q95-3 Q75 Q78 文献标识码: A 文章编号:1673-6273(2012)20-3812-05

The Impacts of Complex Allele Structure on Genotyping Accuracy of Microsatellite: a Lesson from Bear Microsatellites UamD116 and UamB1*

ZHANG Xiao-Fang^{1,2}, YANG Shu-Hui¹, MA Yue^{1,2}, XU Yan-Chun^{1,2,Δ}, SONG Wei-Jie¹

(1 College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, China;

2 State Forestry Administration Detecting Center of Wildlife, Harbin, 150040, China)

ABSTRACT Objective: Microsatellite refers to a kind of polymorphic DNA fragments on the genome which contains variable number of tandem repeats of a short specific sequence of nucleotides (motif). The polymorphism of micorsatellite is reflected by variation of repeating number of motifs resulting in variation of fragment length among alleles. Therefore, routine genotyping approach is based on the fragment length of amplified alleles using polymerase chain reaction (PCR) method. Tetra-nucleotide microsatellites are preferable than di-nucleotide ones because of the influence of stutters on genotyping of the later. However, tetra-nucleotide microsatellites often contain complex motif structure potentially impacting genotyping and such problem is usually ignored in studies. To address the impacts of complex allele structure on the genotyping, we genotyped two tetra-nucleotide loci of the Asiatic black bear (Ursus thibetanus), UamD116 and UamB1, using fragment length based approach and sequence based approach, and compared the results. Methods : A total of 96 samples including muscle, blood and hair were used in the experiments. PCR using fluorescently labeled upper primers were performed for each sample. PCR products were isolated using capillary electrophoresis on an automated DNA sequencer. Results: UamD116 contained multiple types of motifs, and mono-, di- tri-nucloetide insertions between motifs. Meanwhile, a 1-bp deletion occurred in the downstream flanking region of some alleles. Fragment length based genotyping was not able to discriminate the differences and sorted different alleles with similar length as a single one. UamB1 contained 2 types of alleles, one type contained a 3-bp insertion resulting in the shifts of size difference between the two types of alleles from 4 bp to 1 bp. In addition, alleles with different motifs had similar size. Fragment length based genotyping identified 8 alleles, while sequence based approach identified 12 ones. Conclusion: For complex tetra-nucleotide microsatellites, structural analysis of alleles by sequencing is necessary for correcting errors occurring in fragment based genotyping so as to access population genetic features accurately.

Key words: Microsatellite; Genotyping; Allele structure; Asiatic black bear; *Ursus thibetanus* Chinese Library Classification(CLC): Q-33, Q95-3, Q75, Q78 Document code: A Article ID:1673-6273(2012)20-3812-05

* 基金项目 国家林业局野生动物保护与繁育项目(2008) ,中央高校基本科研业务费专项资金项目(04004);
黑龙江省青年科学基金项目(QC05C72)
作者简介 张小芳(1985-) ,女 ,硕士研究生,研究方向 :分子遗传学
△通讯作者 徐艳春 教授,电话 :0451-82190390 ,E-mail: xu_daniel@163.com
(收稿日期 2011-12-07 接受日期 :2011-12-30)

前言

微卫星又称为短串联重复序列 (Short tandem repeats; STR),是指以 1~10 个核苷酸(多数为 2~4 个)为基本单位串联 组成的多次重复 DNA 序列。微卫星位点具有数量多、在基因组 内分布均匀、多态性信息丰富等特点^[1],兼备扩增片段短、扩增 效率高、灵敏度高、检测方法简单、容易实现自动化标准化等优点^[2]。 因此,微卫星作为优良的遗传标记在群体遗传学、法医科学、遗 传作图等研究领域得到广泛应用。

在利用微卫星标记进行群体遗传学研究过程中,分型是关 键的技术环节,分型的准确性直接影响到数据的真实性以及后 续分析结果。传统的微卫星分型采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 技术,即在含有高浓度变性剂(如尿素等)聚丙烯酰胺凝胶电, 使微卫星的扩增产物在单链状态下电泳,凝胶经过银染法显 色利用凝胶成像系统和分析软件获得微卫星位点等位基因片 段大小,然后根据片段大小来划分不同的等位基因^[3]。近年来出 现的荧光标记电泳技术提高了电泳的精确度,减少了片段长度 测量的系统误差。具体策略是扩增时,一条引物用荧光分子标 记,使扩增产物上带有特定颜色的荧光标记。片段分离采用液 态变性聚丙烯酰胺毛细管电泳技术,片段大小的测量通过已知 大小的内标和 PCR 产物在同一根毛细管中进行电泳来实现, 大大提高了测量精度,而且实现了自动分型^[46]。

无论是哪一种策略 影响微卫星扩增片段长度测量的因素 对正确分型都会产生影响。为了减少分型的错误,人们在研究 中倾向于使用重复单位为 3bp 或 4bp 的微卫星,因为不同的等 位基因之间有至少 3bp 或 4bp 的差异。但是,当微卫星内部结 构非常复杂时,等位基因之间的差异性就会减小,甚至在等位 基因之间发生混淆。微卫星所定义的等位基因是指重复单位次 数发生变化而产生的片段长度的差异^[7]。这样,如果在重复单位 内部或之间出现碱基插入或缺失时,新形成的突变序列也被认 定为等位基因,并采用特别的命名规则^[8-12]。

在群体遗传学研究中,由于对等位基因结构的分析十分繁 琐,绝大多数报道中均不分析等位基因的序列结构,分型依据 仅仅是片段长度^[13-16]。这种方法带来两种风险:第一,当电泳条 件不够严格时,DNA分子在凝胶或液体胶中泳动时是存在一 定构象的,不同的构象引起分子体积的变化,从而造成同样碱 基数但碱基组成不同的DNA片段测定的长度不同^[17];第二,如 果微卫星在重复单位之间、之内以及重复区以外出现多个不同 的插入或缺失,最终可能导致长度相同或相近扩增片段含有不 同的等位基因^[18,19],最终形成错误分型。这两种风险在估计微卫 星多态性或分析种群的遗传多样性时,都会造成等位基因数量 的错误判定,进而影响基因频率的统计,尤其是在法医学应用 中会使同一性认定、亲子鉴定中出现严重错误。

我们在研究熊类微卫星结构时发现,有些位点的核心序列 非常复杂,不仅含有点突变,而且还在在重复单位之间、之内以 及重复区以外出现多个不同的插入或缺失。在缺少序列结构信 息的条件下,仅根据片段长度的分型存在很大的误差。本文报 道这些误差产生的根源,以便在微卫星研究中提示注意。

1 材料与方法

1.1 微卫星位点的 PCR 扩增

本实验选用亚洲黑熊(Ursus thibetanus)肌肉组织、毛发和 血液样品共计 96 份 从已公开发表的文献中^[12] 选用 UamD116 和 UamB1 两个微卫星位点,用 PCR 的方法进行扩增和分型。 两个位点的引物序列如表 1。上游引物的 5' 端都加上了一段 M13 序列(5'-GGAAACAGCTATGACCAT-3'),另用 FAM 标记 单独的 M13 接头 fAM-5'-GGAAACAGCTATGACCAT-3'。引 物和标记的 M13 接头均在上海英俊生物技术有限公司合成。 PCR 反应时 M13 荧光接头和上游引物 M13 序列的互补链结 合 而使扩增产物加上荧光标记。PCR 反应体系为 10µL ,含有 1×PCR buffer、2.5 mMol/L MgCl₂、4 种dNTP(Toyobo Co. LTD,日 本) 各 0.2mMol/L、上下游引物各 0.2 µMol/L、FAM-M13 序列 0.1 µMol/L、0.25 U Ex TaqTM DNA 聚合酶、基因组 DNA 模板 约 10 ng。反应条件为 95℃ /5 min ;(94℃/30 s; 57℃/60 s; 72℃ /30 s)× 10 ;94℃/30 s; 55℃/60 s; 72℃/30 s)× 22 ;72℃ /10 min。

Table 1 Primer sequences and florescent labeling for two microsatellite of Asiatic black bear							
	引物序列 (5'-3')						
Locus and Dye labeling	Primer sequences						
FAM-UamD116	F: GGAAACAGCTATGACCATTGCTCACTCTCCACT						
	R: ACCTCTCACCCTGTTTGTG						
FAM-UamB1	F: GGAAACAGCTATGACCATGGCACCAATGTTACTTTCCTAC						
	R: GTGGGTGGAGAGAAGTTTAGAA						

表1 微卫星位点引物序列及荧光标记

1.2 微卫星位点的毛细管电泳

1.3 等位基因分型

取 2 μL PCR 产物, 与 10 μL Hi-Di 甲酰胺 (ABI 公司 ,美 国)、0.1 μL GeneScan-500 [ROX] 内标(ABI 公司 ,美国)混合。 98℃变性 5min,冰上迅速冷却后上样于 ABI 3730xl 遗传自动 分析仪(ABI 公司 ,美国),电泳采用 POP-7TM 胶(ABI 公司 ,美 国),14 KV 下电泳 45min。电泳结果用 GeneMapperTM 软件 (ABI 公司 ,美国)读取并人工校对。 毛细管电泳获得微卫星等位基因片段长度的观测值,首先 根据微卫星片段的长度变化进行等位基因分型。文献报道中指 出 UamD116和 UamB1都是四碱基重复的微卫星位点^[8],而微 卫星等位基因间的差异来自于重复单元重复数的不同,因此这 两个位点不同等位基因间理论上都应该相差 4bp 的整数倍。分 型时以 4bp 的整数倍为参考,分型得到的等位基因按片段长度 从小到大的顺序,分别用字母 A、B、C、D 表示。 1.4 等位基因测序和等位基因标准分型 为了进一步了解微卫星位点核心序列结构及等位基因的 实际大小,位点UamD116 筛选3个纯合子等位基因直接进行 测序,位点UamB1全部等位基因都进行克隆测序。直接测序过 程中,将纯合子个体50μL体系重扩增。扩增体系除未加M13 荧光接头外,其它试剂和10μL体系相同。扩增产物经1.5%的 琼脂糖凝胶电泳后,每个等位基因片段采用AxyPrepTM纯化 回收试剂盒(爱思进,杭州)纯化、回收目的片段。回收产物用 pMDTM18-T Vector 试剂盒(TaKaRa,大连)连接到T载体。然 后将T载体转化到感受态细胞JM109 (天根生化科技有限公 司,北京)中,平板LB培养基中进行培养。最后每个等位基因 筛选8个阳性克隆,利用引物M13+进行单向测序。3个以上 克隆完全一致的序列被认为是该等位基因的真实序列。

用软件 DNAStar 进行分析和比对,确定等位基因的序列 结构和真实片段长度,然后再根据等位基因真实长度及其所对 应的观测长度,对每个个体进行重新分型,并按照国际法医遗 传学会(ISFG)对人类微卫星系统的命名标准^[10-12],对分型得到 的等位基因进行命名。

2 结果

本研究对位点 UamD116 的 3 个纯合子等位基因进行直接 测序,对 UamB1 的全部等位基因都进行了克隆测序,得出每个 等位基因的核心序列结构和实际序列长度。部分等位基因测序 结果见表 2。从 3 个等位基因的序列可知,UamD116 核心序列 结构相当复杂,除了含有多个重复单位外,还在重复单位之间 有碱基插入,并在侧翼序列出现碱基缺失的情况。例如,等位基 因 16.2 重复序列间出现单碱基 T、二碱基 TC 和三碱基 AAG 插入;等位基因 18.2 和 19 在重复单位间只出现单碱基 T 和三 碱基 AAG 的插入,而二碱基 TC 的插入没有出现,说明与 16.2 属于不同类型的等位基因。但是它们与 16.2 相差 4bp 的倍数, 在分型中会被混淆为同一类型。从表 2 的序列可以看出,18.2 和 19 具有完全相同的核心序列,应属于同一个等位基因,但 是,18.2 下游侧翼序列有 1 个 GA 缺失,导致其长度比 19 短 2bp。在依靠片段大小分型时,就将其划分为两个等位基因,并 与 16.2 混为同一类。

	表 2 亚洲黑熊微卫星位点 UamD116 和 UamB1 部分等位基因的测序结果
Table 2	Structure and character of alleles on locus LiamD116 and LiamB1 of the Asiatic Black he

位点	等位基因	实际值(bp)	观测值(bp)	微卫星核心序列结构	
Locus	Alleles	Actual size (bp)	Observed size (bp)	Motif structure	
UamD116	16.2	245	246.80	$(GCTC)_2(TATC)_9TC(TTTC)AAG(ATTT)T(ATTT)_2$	
UamD116	18.2 ª	253	254.87	(GCTC) ₃ (TATC) ₃ (TGTC)(TATC) ₄ (TCTA)(TCTC)	
				(TTTC)AAG(ATTT)T(ATTT) ₃	
UamD116	19	255	256.93	(GCTC) ₃ (TATC) ₃ (TGTC)(TATC) ₄ (TCTA)(TCTC)	
				(TTTC)AAG(ATTT)T(ATTT) ₃	
UamB1	18	264	265.14	(ATCT) ₁₂ (ATCC) ₃ (ATAA)(TTTC) ₂	
UamB1	18*	264	264.68	(ATCT) ₁₁ (ATCC) ₄ (ATCA)(TTTC) ₂	
UamB1	20	272	272.47	(ATCT) ₁₂ (ATCC) ₅ (ATAA)(TTTC) ₂	
UamB1	18.3	267	267.10	(ATCT) ₃ ACT(ATCC) ₁₂ (ATAA)(TTTC) ₂	

注 a 下游侧翼序列有一个两碱基 GA 的缺失。

Note: a A GA deletion occurred in the downstream flanking region.

在 UamB1 共发现两种类型的等位基因,表 2 中代表性的 列出了每类等位基因的测序结果。UamB1 核心序列的基本结 构是 (ATCT)m (ATCC)n (ATAA)(TTTC)₂,含两个可变重复 ATCT、ATCC 和一段共有序列(ATAA)(TTTC)₂。比较该位点4 个已测序等位基因,共有序列(ATAA)在等位基因 18* 突变为 (ATCA),出现一个 A→C 的点突变;而等位基因 18.3 在两个可 变重复 ATCT 和 ATCC 之间出现一个 ACT 的插入。这个 3bp 的插入使等位基因之间的差异不再是 4bp,而使得等位基因 15.3 和 16 之间、16.3 和 17 之间、17.3 和 18 之间、18.3 和 19 之 间仅差 1bp。而在仅依据片段长度分型时,上述各组的 2 个等 位基因被认定为 1 个。此外,等位基因 18 含 12 个(ATCT)重复 和 3 个(ATCC)重复;而等位基因 18* 含 11 个(ATCT)重复和 4 个(ATCC)重复。虽然二者的核心序列不同,但是扩增片段长度 是完全相同的。

这种情况从在表 3 可以清楚地显示出来。测序前 UamB1

分型共确定 8 个等位基因。其中,等位基因 G、H和A为群体中的稀有等位基因,频率分别为 0.52%、1.04%和 1.56%,等位基因 D为群体中的优势等位基因,频率为 48.96%。等位基因测序后 重新分型,该位点共确定 12 个等位基因,增加了 4 个。其中,等 位基因 16 和 21 在群体中的频率为 0.52%,等位基因 22 和 15 的频率分别为 1.04%和 1.56%,这 4 个等位基因均为群体中的 稀有等位基因,等位基因 17.3 为群体中的优势等位基因,频率 为 42.71%。

3 讨论

微卫星核心序列的结构有的非常简单,但有的却十分复杂。微卫星的分型依据扩增片段长度,其核心意义是片段长度 忠实地反映重复单位的重复次数。但是,当核心序列因积累点 突变、插入和缺失而变得复杂化后,单纯的长度就不能忠实地 反映重复单位的重复次数,反而会掩盖一些信息。位点 UamB1

测序前等位基因 (n=8) Alleles before sequencing (n=8)	等位基因观测长度 (bp) Mean± SD Observed size of alleles (bp) Mean± SD	测序前等位基因数 Alleles number before sequencing	测序后等位基因 (n=12) Alleles (n=12)	等位基因实际长度(bp) Mean± SD Actual size of alleles (bp) Mean± SD	测序前等位基因数 Alleles number after sequencing
А	252.03± 0.35	3	15	252	3
В	255.85± 0.59	6	15.3	255	5
С	259.95± 0.75	33	16	256	1
D	263.27± 0.14	94	16.3	259	23
Е	267.65± 0.83	47	17	260	10
F	272.63± 0.2	6	17.3	263	82
G	276.29	1	18	264	12
Н	280.38± 0.02	2	18.3	267	32
			19	268	15
			20	272	6
			21	276	1
			22	280	2
Total		192			192

表 3 微卫星位点 UamB1 测序前后等位基因分型结果

Table 3 Genotyping result of locus UamB1 before and after sequence verification

就出现了这种情况,等位基因 18 含 12 个(ATCT)重复和 3 个 (ATCC) 重复;而等位基因 18* 含 11 个 (ATCT) 重复和 4 个 (ATCC)重复,但二者的长度完全一致,在基于片段长度的分型 中就会被合并成 1 个等位基因。

另一种情况是,在核心序列出现插入或缺失,同时侧翼序 列出现相同长度的缺失或插入结果造成两类核心序列不同的 等位基因在片段长度上可能完全一致,位点UamD116提供了 一个例子:等位基因16.2和等位基因18.2实际上是两类不同 类型的等位基因,核心序列结构上有很大的差异,但两类等位 基因在序列长度上刚好相差4bp的整数倍,仅从长度上来看就 会将其混淆起来。此外,18.2和19具有相同的核心序列,属于 一个等位基因,但是18.2的侧翼序列出现2bp的缺失,依靠片 段长度分型就将同一个等位基因分为两个。因而单纯依靠片段 长度来分型就会严重影响种群参数的估计。

重复单位插入、缺失和突变等遗传学事件在基于片段长度 的分型中是无法有效显示的,这种风险直接影响群体分析结论 的真实性。我们发现在以往的文献中,使用上述两个位点进行 种群分析时均没有对等位基因进行结构分析^[13-16],因而无论对 所研究的种群得出什么结论都将是不准确的,甚至可能是错误 的。因此,我们强烈建议在应用微卫星进行群体研究时,必须对 等位基因进行测序和结构分析,然后再根据序列和片段长度进 行分型,或者通过构建等位基因梯(allelic ladder)作为分型的客 观标准^[20]。

参考文献(References)

[1] 薛辉, 吴孝兵, 晏鹏. 微卫星标记在分子生态学中的应用及其位点 的分离策略[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2): 385-389 Xue Hui, Wu Xiao-bing, Yan Peng. Application of microsatellite DNA in molecular ecology and strategies for loci isolation [J]. Chin J Appl Ecol, 2005, 16(2): 385-389

[2] 宣之兴,张守纯. DNA 分子标记在动物亲子鉴定中的研究进展[J].畜牧业, 2009, 242: 16-17

Xuan Zhi-xing, Zhang Shou-chun. The research progress of DNA molecular markers on paternity verification of animals [J]. Livest Poultry Ind, 2009, 242: 16-17

- [3] Wang D, Shi J, Carlson SR, et al. A Low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers [J]. Crop Sci, 2003, 43: 1828-1832
- [4] 裴黎. 现代 DNA 分析技术理论与方法[M].北京 :中国人民公安大 学出版社, 2002

Pei Li. Theory and Method in Modern DNA Analysis Technology [M]. Beijing: People's Public Security University Press, 2002

- [5] Vemireddy LR, Archak S, Nagaraju J. Capillary electrophoresis is essential for microsatellite marker based detection and quantification of adulteration of basmati rice (Oryza sativa) [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 8112-8117
- [6] Butler JM. The Use of Capillary Electrophoresis in Genotyping STR Loci [J]. Meth Mol Biol: Forensic DNA Prof Prot, 1998, 98: 279-289
- [7] Miścicka-Śliwka D, Gnybowski T, Czarny J, et al. Screening of a highly polymorphic microsatellite for microheterogeneity in human identification[J]. Electrophoresis, 1998, 19: 667-670
- [8] Olaisen B, Bar W, Brinkmann B, et al. DNA Recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics [J]. Vox Sang, 1998, 74: 61-63
- [9] Gusmão L, Butler JM, Carracedo A, et al. DNA Commission of the In-

ternational Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis [J]. Int J Legal Med, 2006, 120: 191-200

- [10] Bär W, Brinkmann B, Lincoln P, et al. DNA recommendations-1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems [J]. Int J Legal Med, 1994, 107: 159-160
- [11] Gill P, Brinkmann B, d'Aloja E, et al. Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature [J]. Forensic Sci Int, 1997, 87: 185-192
- [12] Gill P, Brenner C, Brinkmann B, et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs [J]. Int J Legal Med, 2001, 114: 305-309
- [13] Kitahara E, Isagi Y, Ishibashi Y, et al. Polymorphic microsatellite D-NA markers in the Asiatic black bear Ursus thibetanus [J]. Mol Ecol, 2000, 9: 1661-1686
- [14] Paetkau D, Strobeck C. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations [J]. Mol Ecol, 1994, 3: 489-495

- [15] Meredith EP, Rodzen JA, Banks JD, et al. Characterization of 29 tetranucleotide microsatellite loci in black bear(Ursus americanus) for use in forensic and population applications [J]. Conserv Genet, 2009, 10: 693-696
- [16] Shih C-C, Huang C-C, Li S-H, et al. Ten novel tetranucleotide microsatellite DNA markers from Asiatic black bear, Ursus thibetanus [J]. Conserv Genet, 2009, 10(6): 1845-1847
- [17] Han F, Lin B, Xu Q, et al. Gene diagnosis of phenylketonuria by capillary electrophoresis in a novel nongel sieving polymer solution [J]. Chromatographia, 1999, 49(3-4):179-184
- [18] Park MJ, Shin K-J, Kim NY, et al. Characterization of Deletions in the DYS385 Flanking Region and Null Alleles Associated with AZFc Microdeletions in Koreans [J]. J Forensic Sci,2008,53(2): 331-334
- [19] Hering S, Nixdorf R, Edelmann J, et al. Further sequence data of allelic variants at the STR locus ACTBP2 (SE33): Detection of a very short off ladder allele [J]. Int Congr Ser, 2006, 1288: 810-812
- [20] Griffiths RAL, Barber MD, Johnson PE, et al. New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system [J]. Int J Legal Med, 1998, 111(5): 267-272

(上接第 3811 页)

- [15] Li WJ, Tuli R, Okafor C, et al. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using mesenchimal stem cells [J]. Biomaterials, 2005, 26(6):599-609
- [16] Venugopal J, Ma LL, Yong T, Ramakrishna S. In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices [J]. Cell Biol Int, 2005, 29(10):861-867
- [17] George J; Goldstein E; Abashidze A, et al. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner [J]. Cardiovascular Research, 2005, 68 (2):299-306
- [18] Bianco A, Bertarelli C, Frisk S, et al. Electrospun polyalkylthiophene/ polyethyleneoxide fibers: Optical characterization [J]. Synthetic Metals, 2007, 157(6-7):276-281
- [19] Han XJ, Huang ZM, He CL, et al. Coaxial electrospinning of PC (shell)/PU(core) composite nanofibers for textile application [J]. Polymer Composites, 2008, 29(5):579-584
- [20] Nandana Bh, Subhas CK. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique [J]. Biotechnology Advances, 2010, 28:325-347
- [21] Xu XL, Zhuang XL, Chen XS, et al. Preparation of core-sheath composite nanofibers by emulsion electrospinning [J].Macromolecular Rapid Communications, 2006, 27(19):1637-1642