

贵州9个少数民族线粒体 DNA Region V 及 Y 染色体 DYS287 位点多态性研究*

任凌雁, 何燕, 张婷, 王婵娟, 官志忠, 单可人
(贵阳医学院分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 调查贵州9个世居少数民族线粒体 DNA Region V 以及 Y 染色体 DYS287 位点多态性情况, 为贵州相关少数民族的遗传背景研究提供可参考的分子遗传学数据。采用 PCR-聚丙烯酰胺凝胶 (PCR-SDS PAGE) 技术和 PCR-琼脂糖凝胶电泳技术检测线粒体 Region V 9 bp 序列的缺失、Y 染色体 DYS287 位点多态性。结果显示在本次研究的9个少数民族中线粒体 DNA 的 Region V 发现2种多态性, 即标准型和缺失性, 仡佬族、畲族、壮族、仫佬族、毛南族、蒙古族、回族、羌族、满族线粒体 DNA Region V 9 bp 缺失频率分别为: 26.6%、25%、20%、18.3%、13.3%、10%、8.3%、6.7%、5%; Y 染色体 DYS287 多态显示: 仡佬族、仫佬族 YAP⁺ 携带率分别为 20%、1.67%, 其余民族全部显示为 YAP⁻。研究获得贵州9个民族人群线粒体 DNA Region V 及 Y 染色体 DYS287 位点多态数据, 为各民族群体遗传分析及起源等提供相关遗传背景资料。

关键词: 贵州; 少数民族; 线粒体 DNA; DYS287; 多态性

中图分类号: Q39 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2013) 04-0121-04

An Analysis on the Polymorphism of Region V of Mitochondrial DNA and Y-chromosome DYS287 Sites in 9 Ethnic Groups of Guizhou

REN Lingyan, HE Yan, ZHANG Ting, WANG Chanjuan, GUAN Zhizhong, SHAN Keren

(The Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract: This study investigated the polymorphism of Region V of the mitochondrial DNA and Y-chromosome DYS287 sites in 9 ethnic groups of Guizhou to provide the referable molecular genetics data with related ethnic groups of Guizhou. Polymerase chain reaction-polyacrylamide SDS gel electrophoresis and Polymerase chain reaction-agarose gel electrophoresis were applied to detect the polymorphism of 9bp deletion of mitochondrial DNA noncoding region and Y-chromosome DYS287 sites. Two type of polymorphism in mitochondrial DNA were discovered: standard form and deletion form; the frequency of 9bp deletion of mtDNA in Gelao, She, Zhuang, Mulao, Maonan, Menggu, Hui, Qiang, Man people were: 26.6%, 25%, 20%, 18.3%, 13.3%, 10%, 8.3%, 6.7%, 5%, respectively; two type of polymorphism in Y-chromosome DYS287: YAP⁺ and YAP⁻, the frequency of YAP⁺ in Gelao, Maonan were: 20%, 1.67%, respectively, others were 0. The data of polymorphism of Region V of mitochondrial DNA and Y-chromosome DYS287 sites were obtained in 9 ethnic groups of Guizhou and the genetic information were provided for ethnic groups.

Key words: Guizhou; ethnic groups; mitochondrial; DNA; polymorphism

* 收稿日期: 2012-12-05

基金项目: 贵州省科技计划资助项目 (黔科合 J [2011] 2119、黔科合 SY [2010] 3001、黔科合 SY [2012] 3135 号)

作者简介: 任凌雁 (1987 年生), 女; 研究方向: 少数民族遗传多样性; 通讯作者: 何燕; E-mail: annieheyan@aliyun.com

近年来, 利用线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 和 Y 染色体多态位点对不同人群进行比较, 从而使人类进化和群体遗传研究得到较大发展。人类 mtDNA 极少发生重组, 有效群体小, 能严格的执行母系遗传。单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 是人类变异最常见的一种, 由于其密度高, 遗传稳定等特点, SNP 被认为是第三代遗传标记而广泛应用^[1]。mtDNA 上 CO II/tRNA^{Lys} 基因间的非编码区 V 中存在一个 9 bp 序列 (CCCCCTCTA) 缺失的多态位点^[2], 研究显示不同地域人群 mtDNA 9 bp 缺失频率有很大差别, 是检测人类群体多态性的主要标志之一。Y 染色体是父系遗传, 并且大部分不发生重组, 是分析人类起源、迁徙的重要工具。其中 Y 染色体 DYS287 位点是一个应用广泛, 具有较高研究价值的多态位点, 检测其阳性率可以研究不同民族群体的遗传关系。贵州是一个多民族省份, 世居少数民族达 17 个, 本次研究就 17 个世居少数民族中的毛南族、畲族等 9 个民族作 mtDNA Region V 以及 Y 染色体 DYS287 位点的多态性检测, 分析这 9 个民族群体的遗传多态性。

1 材料与方法

1.1 样本采集

根据知情同意原则, 分别采集贵州平塘毛南族、麻江畲族、黔西仡佬族、麻江仡佬族、威宁回族、刚边壮族、黔西满族、石阡蒙古族、江口羌族各 60 份血液标本, 采血对象均 3 代内无族外通婚, 彼此间无亲缘关系男性, EDTA · K₂ 抗凝。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 按照酚氯仿法提取外周血白细胞 DNA, 定量标化至 100 ng/μL 后于 -20 °C 保存。

1.2.2 mtDNA Region V 的扩增及序列测定 引物序列: F 5'-ACTTTCACCGCTACACGA-3', R 5'-ATTTAGTTGGGGCATTTC-3', PCR 反应体系为 25 μL, 包括: 10 × PCR Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 0.4 μL, TaqDNA 聚合酶 0.4U (北京天根生化有限公司), DNA 模板 100 ng。PCR 循环参数为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 5 min。扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶检测。序列测定交由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2.3 Y 染色体 DYS287 位点的扩增及琼脂糖凝胶电泳检测 YAP 引物序列 F: 5' -CAG GGG AAG

ATA AAG AAA TA-3', R: 5' -ACT GCT AAA AGG GGA TGG AT-3', 25 μL PCR 反应体系组成为: 10 × PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 4 × dNTP (每种 10 mmol/L) 2 μL, 引物各 0.5 μL, DNA 聚合酶 1.0U (北京天根生化有限公司), 模板 DNA 100 ng。PCR 循环条件: 94 °C 变性 40 s, 51 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 30 次。PCR 产物用 w = 2% 琼脂糖凝胶电泳分离。

2 结果

2.1 mtDNA Region V 缺失多态类型检测与分析

在 PCR 检测中未见非特异扩增, 并且获得 2 种带型, 即 258 (双拷贝 9 bp 型) 和 249 bp (9 bp 缺失型), 结果见图 1。扩增产物测序结果与相对应的剑桥序列一致, 结果见图 2。检测的 9 个民族 (各 60 份): 仡佬族、畲族、壮族、仡佬族、毛南族、蒙古族、回族、羌族、满族 mtDNA 9 bp 缺失个数分别为: 16、15、11、8、6、5、4、3。

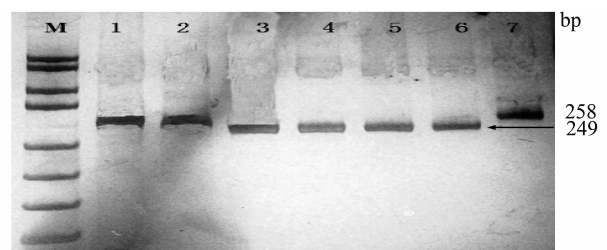
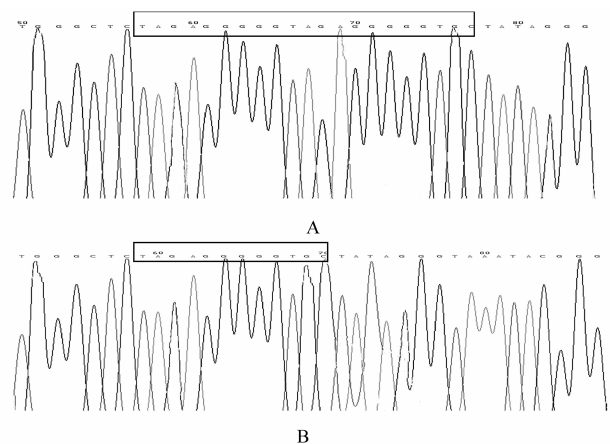


图 1 mtDNA Region V PCR 产物电泳结果

Fig. 1 The results of electrophoresis of PCR products of region V in mtDNA

M: DNA 标准相对分子质量参照物, Puc18DNA/Msp I (501、489、404、353、242、190、147 bp); 1、2、7: 标准型扩增产物; 3、4、5、6: 缺失型扩增产物



A: 标准型 B: 缺失型

图 2 mtDNA Region V 序列分析结果
Fig. 2 The sequence of region V in mtDNA

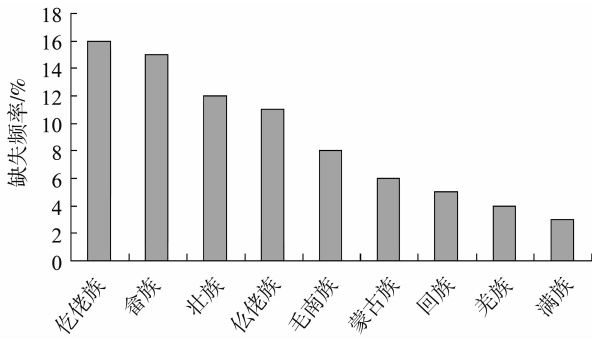


图 3 贵州 9 个少数民族 mtDNA Region V 缺失频率比较

Fig. 3 The comparison of mtDNA Region V deletion in 9 ethnic groups of Guizhou

2.2 Y 染色体 DYS287 多态类型

在 PCR - 琼脂糖凝胶电泳检测中, 未见非特异扩增, 获得 2 种带型, 455 bp (YAP⁺) 和 150 bp (YAP⁻) 见图 4, 即发现仡佬族、毛南族分别有 12 例、1 例 YAP⁺, 其余民族均为 YAP⁻。

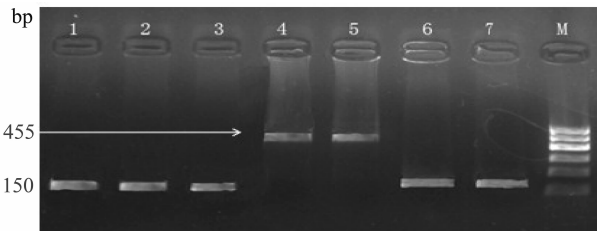


图 4 Y 染色体 DYS287 位点 PCR 产物电泳结果

Fig. 4 The results of electrophoresis of PCR products of Y-chromosome DYS287 sites

M: DNA 标准相对分子质量参照物, Marker I (600、500、400、300、200、100 bp); 1、2、3、6、7: YAP⁻; 4、5: YAP⁺

3 讨论

3.1 贵州 9 个民族 mtDNA 的 Region V 区 9 bp 分布特点

mtDNA 的 Region V 区是位于 8 272 - 8 289 核苷酸之间 2 个串联的重复序列, 其中一个由于 DNA 复制过程中滑链错配而丢失。学者认为 9 bp 序列的缺失起源于亚洲并且是亚洲人群的特征^[3], 并且其分布与种群、地域有关。就我国民族 9 bp 缺失频率分析, 台湾汉族 9 bp 缺失频率高达 40%^[4], 均高于本次研究的 9 个民族, 而广州汉族的缺失频率 (20.8%)^[5] 与本次研究的蒙古族、回族、羌族、满族相差较大; 西北边的一些少数民族, 如朝鲜族 (9.43%)、维吾尔族 (3.3%)、塔

吉克族 (1.43%)、现代罗布人 (8.3%)^[6-9] 与本次研究的回族、羌族、满族、蒙古族的缺失频率相近, 与仡佬族等相差较大。这与姚永刚得出的结论是一致的。

从贵州世居民族的支系划分来看, 畲族据记载是属于瑶族的一个分支, 壮族、仡佬族、侗族、毛南族来源于古老的百越部落, 其中仡佬族是贵州特有的少数民族, 自商周时期就有记载。而蒙古族、回族、羌族、满族则是属于北方部落的民族。本次研究发现, 起源于百越、苗瑶支系的民族 9bp 缺失频率是高于北方起源的民族的。但是同为北方民族的西北蒙古族的缺失频率 (4%)^[4] 低于贵州蒙古族, 而贵州的满族与辽宁的满族 (6.67%)^[4] 缺失频率相接近, 究其原因可能是这些民族群体在迁徙过程中与其他群体发生基因融合造成的。

从中国民族的语系划分来看, 壮语、侗语、毛南语、仡佬语属于壮侗语系; 畲语属于苗瑶语系; 蒙古语、满语属于阿尔泰语系; 羌语属于汉藏语系; 而回语属于印欧语系。本次研究中, 壮族、侗族、毛南族、仡佬族 9 bp 缺失频率是接近的, 畲族与苗瑶语系的苗族如雷山苗族 (25.27%)^[10] 的缺失频率也相近, 但是同为阿尔泰语系的蒙古族与满族、同为汉藏语系的羌族与贵州汉族 (11.43%)^[4] 的缺失频率较大, 尽管差异没有达到显著水平。

3.2 贵州 9 个民族 Y 染色体 DYS287 多态类型分析

DYS287 位点是位于 Y 染色体长臂 q11 的一个 Alu 序列插入多态, 是 Y 染色体特异区的双等位基因位点, 由于 Alu 插入事件在进化史中仅发生过一次, 故 YAP⁻ 被认为是祖先型^[11], 可以用于鉴定稳定的遗传谱系关系。DYS287 位点也是具有地理、种群分布的特异性, 不同地区或者不同民族其 DYS287 位点的 YAP⁺ 频率不同。在我国藏族人群的 YAP⁺ 频率为 41.5%^[12], 普米族更是高达 72.3%^[13], 均远高于本次研究。不同地区的同一个民族其 YAP⁺ 表现也是有差异的, 如蒙古族、回族。内蒙古的蒙古族和甘肃回族 YAP⁺ 频率分别为 4.3%^[13]、3.23%^[14], 而云南和贵州的蒙古族和回族 YAP⁺ 频率均为 0。

从民族起源来看, 属于北方部落的蒙古族、回族、羌族、满族, 他们中回族和满族在其主要居住地发现 YAP⁺, 但是可能在迁徙过程中 YAP⁺ 被稀释以致于迁徙到贵州的民族群体中没有发现 YAP⁺; 同属百越系统的壮族、仡佬族、侗族、毛南族中, 本次研究发现了仡佬族和毛南族携带

YAP⁺, 其余民族 YAP⁺ 均为零, 分析其原因可能是仡佬族和毛南族作为一个独立的群体与当时迁入的南方的汉族群体发生了基因交流所致, 而其他百越系统的民族群体由于其古代部落没有携带 YAP⁺, 加上地理环境与周围隔绝造成了奠基者效应。从语言学分类上看, 蒙古族、满族的 YAP⁺ 携带率与同属阿尔泰语系的鄂伦春族^[15]、哈萨克族的频率一样均为零; 毛南族和仡佬族都属于壮侗语系侗水语支, 其亲缘关系应该很近, 本次研究中毛南族 YAP⁺ 的频率为 1.67%, 仡佬族未发现 YAP⁺, 可能是由于实验中抽样误差所致。畲族虽然与苗族同属苗瑶语系, 但是各自的 YAP⁺ 携带率是有较大差异的, 苗族 YAP⁺ 频率为 11.8%^[13], 畲族为零, 推测由于奠基者效应在本次研究的畲族群体中起到了作用。

总之, 通过本次实验, 获得了贵州 9 个世居少数民族 mtDNA Region V 以及 Y 染色体 DYS287 位点多态型数据, 为我省少数民族的起源及迁徙提供了一定的遗传背景资料。

参考文献:

- [1] 于冰峻, 胡丽莉. 华南地区汉族人群 MDR1 基因单核苷酸多态性研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2011, 50(2): 93 - 98.
- [2] ANDERSON S, BANKIER A T, BARRELL B G, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. Nature, 1981, 290(5806): 457 - 465.
- [3] HORAI S, MAROGAMA K, HAYASKA K, et al. mtDNA polymorphism in east Asian population with special reference to the people of Japan[J]. Am J Hum Genet, 1996, 59(3): 579 - 590.
- [4] 姚永刚, 袁志刚, 周曾娣, 等. 中国民族线粒体 DNA9 bp 序列缺失的分布[J]. 自然科学进展, 2001, 11(4): 353 - 359.
- [5] 李彬彬, 龙燕, 罗世英, 等. 广东地区汉族群体线粒体 DNA9bp 序列缺失频率研究[J]. 生物技术通报, 2009, 5(12): 112 - 114.
- [6] 张永吉, 李哲, 徐京男, 等. 中国朝鲜族线粒体 DNA 编码区序列多态性[J]. 中国法医学杂志, 2011, 26(2): 124 - 129.
- [7] 木耶塞尔·伊斯马依力, 古丽娜·艾山, 马合木提·哈力克, 等. 新疆 8 个地域维吾尔族群线粒体 DNA V - 区 9bp 缺失频率与 Y - 染色体 DYS287 位点多态性研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2011, 50(4): 100 - 105.
- [8] 塔吉古丽·阿布里克木, 吐尔孙江·努尔麦麦提, 阿迪力江·卡地尔, 等. 现代罗布人 mtDNA 9bp 序列缺失频率与 DYS287 位点多态性研究[J]. 生物技术, 2008, 18(6): 9 - 10.
- [9] 于恩艳, 张艺, 董晓宇, 等. 新疆两个民族人群线粒体 DNA V 区缺失多态性[J]. 生物技术, 2008, 18(3): 18 - 20.
- [10] 何燕, 张婷, 单可人, 等. 贵州省苗族、水族线粒体 Region V 遗传多态性分析[J]. 贵阳医学院院报, 2007, 32(6): 583 - 585.
- [11] SPURDLE A B, HAMMER M F, JENKINS T. The Y-Alu polymorphism in southern African populations and its relationship to other Y-specific polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1994, 54(2): 319 - 330.
- [12] 文普帅, 温有锋, 席焕久, 等. 西藏藏族 DYS287 位点多态性研究[J]. 武警医学, 2007, 18(2): 89 - 90.
- [13] 石宏, 董永利, 李卫翔, 等. 中国云南 25 个少数民族 Y 染色体 DYS287 位点的地理多态性[J]. 中国科学, 2002, 32(4): 373 - 378.
- [14] 周瑞霞, 安黎哲, 伊琳, 等. 甘肃 3 个特有少数民族回族和汉族 DYS287 DYS19 的遗传多态性研究[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2006, 42(2): 38 - 42.
- [15] 张勇, 张贵寅, 孙艳阳, 等. 中国东北汉族及 3 个少数民族 DYS19 和 DYS287 多态性研究[J]. 人类学学报, 1998, 17(3): 237 - 241.