

# 贵州四个民族人群线粒体 DNA Region V 的遗传多态性

李彬彬<sup>1</sup>, 钟复光<sup>2</sup>, 易红生<sup>2</sup>, 王先然<sup>3</sup>, 李良芳<sup>4</sup>,  
王丽兰<sup>5</sup>, 齐晓岚<sup>2</sup>, 吴立甫<sup>2</sup>

(1. 广东医学院病理生理学教研室, 湛江 524023; 2 贵阳医学院医学科学研究所, 贵阳 550004;  
3. 贵州省天柱县人民医院, 天柱 556700; 4 贵州省赫章县人民医院, 赫章 553200;  
5. 贵州省务川县人民医院, 务川 564300)

**摘要:** 目的 研究世居贵州的侗族、仡佬族、土家族和彝族人群线粒体 DNA Region V 的遗传多态性。方法 采用 PCR-PAGE 和克隆测序法对 4 个群体 108 份样本的 mtDNA Region V 进行序列分析。结果 只检测到标准型和短型(即 9 bp 缺失)两种多态。贵州四个民族人群的平均 9 bp 缺失频率为 22.2%, 在侗族、仡佬族、土家族和彝族人群中依次为 32.1%、22.6%、17.2% 和 15.0%。结论 贵州四个民族 mtDNA 9 bp 缺失频率均较高, 这与其地域分布相一致; 贵州彝族和土家族显示了相似的缺失频率, 提示两者可能有共同的祖先。

**关键词:** 贵州民族人群; 线粒体 DNA; 遗传多态性

中图分类号: Q987 文献标识码: A 文章编号: 1000-3193(2006)03-0258-05

人类线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是位于细胞核外的唯一遗传物质, 由于其独有的遗传特性如呈严格的母系遗传、进化速率快、群体内变异大、拷贝数多、分子结构简单等, 已成为人类群体遗传学以及人种群演化研究中一个非常有用的遗传标记。

MtDNA CO II/tRNA<sup>lys</sup> 基因间的小非编码区 V (region V) 是一个很有价值的多态性位点。其标准序列<sup>[1]</sup> 是 2 个串联重复的 9bp 序列 (CCCCCTCTA), 有三种突变型: (1) 长型 标准序列前 4 个 C 加入。(2) 短型 仅有单拷贝 9bp 序列, 即存在 9bp 缺失。(3) 3 型 有 3 拷贝 9bp 重复序列。在东亚以及东亚起源的人种群中, 长型未见报道, 3 型仅有少量报道<sup>[2]</sup>, 较多见的为 9bp 缺失。不同人种群 9bp 缺失频率及分布不同<sup>[3-6]</sup>, 使其成为研究人种群遗传分化的重要靶点。本研究应用 PCR 及序列分析方法对中国贵州世居侗族、土家族、仡佬族和彝族人群的 mtDNA Region V 9bp 缺失情况进行了检测, 试图从其频率分布趋势方面为各民族的起源、迁徙等提供一些新的证据。

## 1 材料和方法

### 1.1 样本来源

随机选择 108 份健康妇女所生胎儿的胎盘标本, 其中侗族 28 份, 仡佬族 31 份, 土家族

收稿日期: 2005-08-24; 定稿日期: 2005-12-29

基金项目: 本课题为国家自然科学基金资助项目(39560035)。

作者简介: 李彬彬(1976-), 女, 汉族, 湖南娄底人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事分子遗传学方面研究。

通讯作者: 钟复光, E-mail: zhongfuguang@hotmail.com

29 份, 彝族 20 份, 分别采自贵州省天柱、道真、沿河、赫章等县市的少数民族聚居地。各样本家庭内部三代均为同一民族, 彼此间无直接血缘关系。

### 1.2 mtDNA 的制备

按王文等<sup>[7]</sup>的碱变性法从胎盘组织中提取 mtDNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带 (图 1)。

### 1.3 mtDNA Region V 的 PCR 扩增

依据 Wrischnik 等<sup>[8]</sup>的报道设计并合成引物, 引物位点及序列: P1 8196-5' ACA GTT TCA TGC CCA TCG TC 3'-8215; P2 8316-5' ATG CTA AGT TAG CTT TAC AG 3'-8297。循环参数为 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 57℃ 退火 40s、72℃ 延伸 40s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 充分延伸 5min。扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶 130V 恒压电泳 3 小时后, 银染检测。根据 Region V 的插入-缺失多态性, 相应的 PCR 产物有 121、125、112 和 130bp 四种片段。

### 1.4 序列测定

PCR 产物用 2% 的琼脂糖经小量胶回收试剂盒 (大连宝生物工程有限公司) 回收后连接到 pUCmrT vector (上海生工生物工程技术有限公司) 上, 取 5ul 连接产物转化 E. coli DH5α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选后选取阳性克隆进行测序。

### 1.5 数据处理

统计贵州四个民族人群 mtDNA 的 9-bp 缺失频率。

## 2 结 果

### 2.1 PCR 检测结果

电泳图谱上只检测到两种带型, 分别为 112bp 和 121bp (图 2), 依次对应为有 9bp 缺失 (短型) 和无 9bp 缺失 (标准型)。

### 2.2 序列测定结果

对 20 例呈现 112bp 的 PCR 扩增产物和随机选取的 3 例呈现 121bp 的 PCR 扩增产物进一步测序分析。参照 mtDNA 剑桥标准序列<sup>[1]</sup>分析测序结果 (图 3): 121bp PCR 产物在 Region V 的核酸序列与对应的 mtDNA 标准序列是一致的, 即存在 2 个串联重复的 9bp 序列

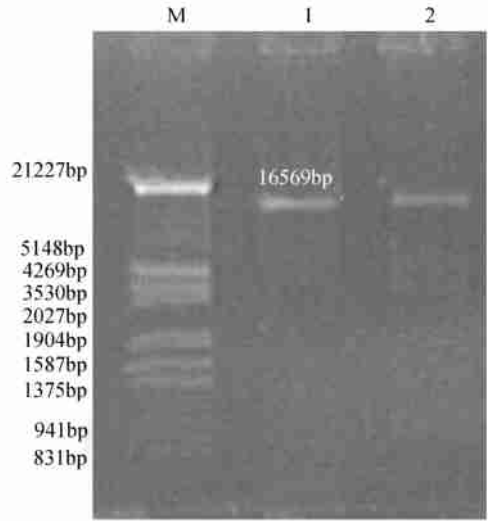


图 1 人 mtDNA 的电泳图谱  
Electrophoresis of mtDNA of human  
M: 标准分子量 (DNA Marker):  
(ADNA EcoRI + Hind III);  
1, 2: 胎盘 (Placenta) mtDNA

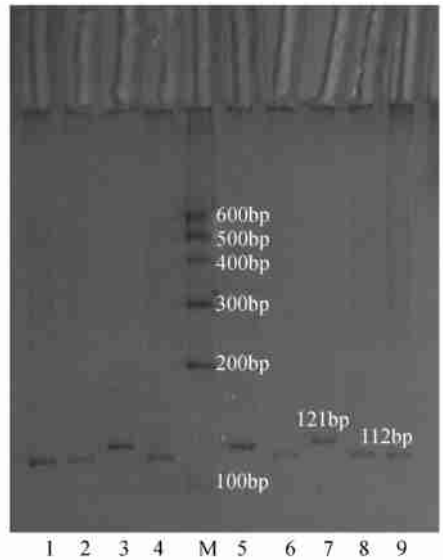
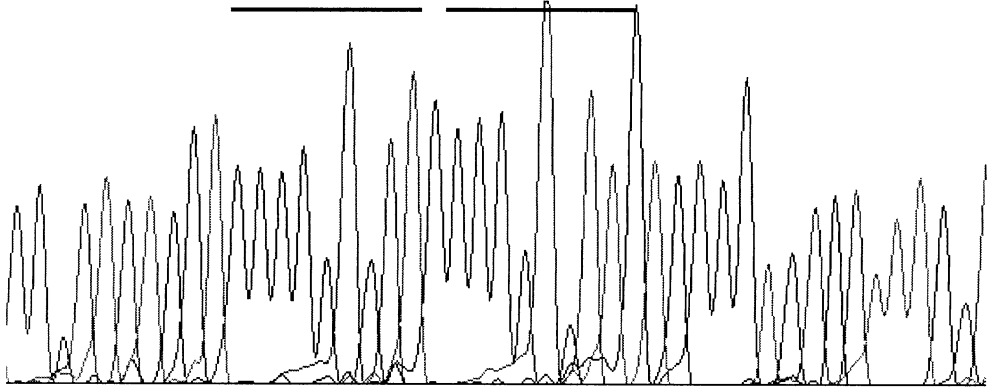


图 2 mtDNA regionV PCR 产物的 PAGE 结果  
The PCR PAGE results of mtDNA region V  
M: 标准分子量; 3, 5, 7: 标准型 PCR 产物 (121bp);  
1, 2, 4, 6, 8, 9: 短型 PCR 产物 (112bp)  
M: DNA marker; 3, 5, 7: standard patter;  
1, 2, 4, 6, 8, 9: short patter

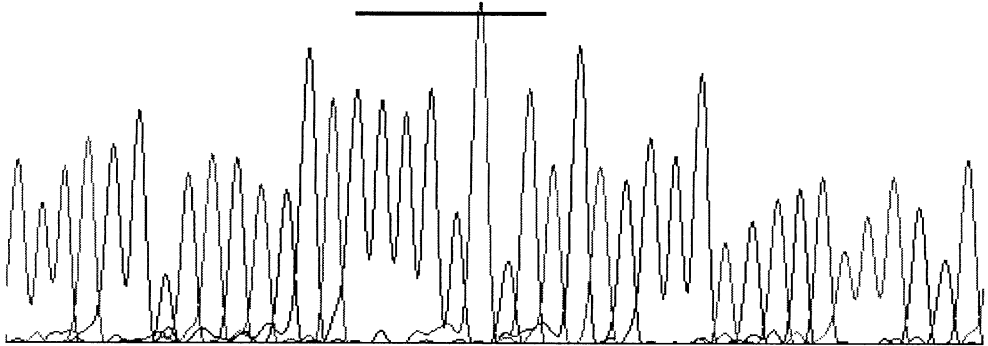
(CCCCCTCTA CCCCCTCTA); 而 112bp PCR 产物在 Region V 只有单拷贝的 9bp 序列 (CCCCCTCTA), 即存在 9bp 缺失。

CCCTATAGCACCCCCTCTACCCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCT



A

TTTACCCTATAGCACCCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCT.



B

图 3 mtDNA Region V 序列分析结果 Sequence of mtDNA region V

A: 标准型(双拷贝 9bp 序列); B: 短型(单拷贝 9bp 序列)

A: standard patten(two copies of 9 bp repetition); B: short patten (single copy of 9 bp sequence)

### 2.3 贵州四个民族人群 mtDNA Region V 的 9-bp 缺失频率(表 1)

表 1 mtDNA 9bp 缺失频率在贵州四个民族人群中的分布

The frequency distribution of mtDNA 9 bp deletion in four ethnic populations from Guizhou

贵州民族人群 Ethnic populations in Guizhou	采样地点 Sampling areas	人数 Numbers	缺失个体 Numbers of 9 bp deletion	缺失频率(%) Frequencies of 9 bp deletion
侗族(Dong)	贵州天柱	28	9	32.1
仡佬族(Gelao)	贵州道真、务川	31	7	22.6
土家族(Tujia)	贵州沿河	29	5	17.2
彝族(Yi)	贵州赫章	20	3	15.0
总计(total)		108	24	22.2

### 3 讨 论

近年来,通过对现今亚太地区及太平洋岛屿沿线人群 mtDNA 9-bp 缺失的检测<sup>[5, 9-10]</sup>,发现其缺失频率呈现的地理趋势能很好的与史前该地区人类迁移路线相符;对国内各民族群体的研究<sup>[5, 6]</sup>发现其缺失频率由南向北呈现一个递减的梯度分布,这与当前中华民族南方起源的观点比较吻合<sup>[11, 12]</sup>,提示该缺失标记可能对追踪一些民族人群或某些隔离人群的亲缘关系和迁移路线有所帮助。

本次研究的 4 个民族群体均来自贵州边远山区,山岭阻隔,地形相对封闭,各民族之间隔离程度较高,民族特异性保存较好。通过对其 mtDNA 9-bp 缺失情况的分析,我们可以发现:(1) 贵州四个民族人群的平均 9-bp 缺失频率为 22.2%,高于姚永刚等<sup>[6]</sup>综合报道的中国 30 个民族人群的平均缺失频率(17.2%);四个民族的缺失频率范围为 15%~32%,与已报道的<sup>[6, 13]</sup>我国西南地区苗族(32.4%)、傣族(23.5%)和白族(16.7%)等群体较接近,但明显高于北方的蒙古族(4.0%)、维吾尔族(3.3%)和哈萨克族(0.0%)等,这与目前认为的南方民族人群的缺失频率要高于北方民族人群是相一致的。(2) 从历史记载的民族群体的起源来看,百越部落起源的侗族(32.1%)和仡佬族(22.6%)均要高于北方氏羌部落起源的彝族人群(15.0%)。在四个民族人群中,彝族和土家族显示了相似的缺失频率。在杜若甫等<sup>[14]</sup>根据 38 个基因座的基因频率对我国 14 个少数民族进行的聚类分析中,彝族和土家族聚在一起。两者在语言上均属于汉藏语系藏缅语族,而且部分风俗习惯也非常相似。这是否提示两者在起源上有共同的祖先,还有待进一步探讨。(3) 在姚永刚等<sup>[6]</sup>和李永念等<sup>[15]</sup>的报道中,贵州苗族和布依族群体都呈现了较高的 9-bp 缺失频率(>30%),而本次研究的贵州侗族群体也出现了类似的较高频率(32.1%),我们推测贵州部分民族的这一特征可能与迁入时其祖先即有较高的 9-bp 缺失频率,而且在迁移过程中较少与沿途民族发生基因交流有关。

#### 参考文献:

- [1] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. *Nature*, 1981, 290: 457-465.
- [2] Alves-Silva J, Guimaraes PE, Rocha J, *et al.* Identification in Portugal and Brazil of a mtDNA lineage containing a 9-bp triplication of the intergenic COI/tRNA<sup>Lys</sup> region[J]. *Hum Hered*, 1999, 49(1): 56-58.
- [3] Ivanova R, Astrinidis A, Lepage V, *et al.* Mitochondrial DNA polymorphism in the Vietnamese population[J]. *Eur J Immunogenet*, 1999, 26(6): 417-422.
- [4] Torroni A, Petrozzi M, Santolamazza P, *et al.* About the "Asian"-specific 9-bp deletion of mtDNA[J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57(2): 507-508.
- [5] Yao YG, Watkins WS, Zhang YP. Evolutionary history of the mtDNA 9-bp deletion in Chinese populations and its relevance to the peopling of east and southeast Asia[J]. *Hum Genet*, 2000, 107(5): 504-512.
- [6] 姚永刚,袁志刚,周曾娣,等. 中国民族人群线粒体 DNA 9bp 序列缺失的分布[J]. *自然科学进展*, 2001, 11(4): 353-359.
- [7] 王文,施立明. 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法[J]. *动物学研究*, 1993, 14(2): 197-198.
- [8] Wrishnick LA, Higuchi RG, Stoneking M, *et al.* Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15: 529-542.

- [ 9 ] Melton T, Peterson R, Redd AJ, *et al.* Polynesian genetic affinities with Southeast Asian populations as identified by mtDNA analysis [J]. *Am J Hum Genet.* 1995, 57(2): 403—414.
- [ 10 ] Lum JK and Cann RL. mtDNA and language support a common origin of Micronesians and Polynesians in Island Southeast Asia [J]. *Am J Phys Anthropol.* 1998, 105(2): 109—119.
- [ 11 ] Chu JY, Huang W, Kuang SQ, *et al.* Genetic relationship of populations in China [J]. *PNAS.* 1998, 95: 11763—11768.
- [ 12 ] Su B, Xiao J, Underhill P, *et al.* Y Chromosome evidence for a northward migration of modern humans into Eastern Asia during the last Ice Age [J]. *Am J Hum Genet.* 1999, 65(6): 1718—1724.
- [ 13 ] Harihara S, Hirai M, Suutou Y, *et al.* Frequency of a 9-bp deletion in the mitochondrial DNA among Asian populations. *Hum Biol.* 1992, 64(2): 161—166.
- [ 14 ] 杜若甫, 肖春杰, Cavalli-Sforza LL. 用 38 个基因座的基因频率计算中国人群间遗传距离 [J]. *中国科学 C 辑.* 1998, 28(1): 83—89.
- [ 15 ] 李永念, 左丽, 柯越海, 等. 中国布依族、苗族人群线粒体 DNA Region V 区的遗传多态性 [J]. *中华医学遗传学杂志.* 2002, 19(2): 138—140.
- [ 16 ] 贵州省地方志编纂委员会. 贵州省志·民族志 [M]. 贵州: 贵州民族出版社, 2002.

## Polymorphism of Mitochondrial DNA Region V in Four Ethnic Populations from Guizhou

LI Binbin<sup>1</sup>, ZHONG Fuguang<sup>2</sup>, YING Hongsheng<sup>2</sup>, WANG Xiaran<sup>3</sup>,  
LI Liangfang<sup>4</sup>, WANG Lilan<sup>5</sup>, QI Xiaolan<sup>2</sup>, WU Lifu<sup>2</sup>

- (1. *Department of pathophysiology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023*; 2. *Institute of medicine science, Guiyang Medical College, Guiyang 550004*; 3. *The People's Hospital of Tianzhu Country, Tianzhu 556700*;  
4. *The People's Hospital of Hezhang Country, Hezhang 553200*; 5. *The People's Hospital of Wuchuan Country, Wuchuan 564300*)

**Abstract: Objective** To study the polymorphism of mitochondrial DNA (mtDNA) region V in Dong, Gelao, Tujia and Yi ethnic population from Guizhou. **Method** The region V sequences in total of 108 samples from four ethnic populations were analyzed by polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis (PCR-PAGE) and clonal sequencing. **Result** Only two kinds of polymorphism were found in these populations. One was standard patten, the other was short patten (namely 9bp deletion). The average frequency of 9bp deletion in four ethnic populations from Guizhou was 22.2%, and the frequencies of 9bp deletion in Dong, Gelao, Tujia and Yi population were 32.1%, 22.6%, 17.2% and 15.0% respectively. **Conclusion** The frequencies of 9bp deletion are higher in four ethnic populations from Guizhou, which is consistent with their regional distribution, the frequencies of deletion in Tujia and Yi population are similar, this suggests they might originate from a common ancestry.

**Key words:** Ethnic populations in Guizhou; Mitochondrial DNA; Genetic polymorphism