

应用Y染色体多态标记对汉族 王姓亲缘关系的研究

吴东颖 马素参 刘 明 黄尚志 刘春芸

(中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所, 北京 100005)

摘 要

Y染色体除拟常染色体区外, 其它区域均缺乏重组, 因而可保留其祖先历史上所发生的突变事件。作为研究父系遗传的工具, Y染色体多态具有独特的作用。中国传统上姓氏由父亲传给子女, 遵循父系传递。本实验应用Y染色体的4个微卫星标记(即DYS19、DYS390、DYS391和YCA2), 对50例北京汉族王姓男性DNA样本进行了多态性分析, 并与本实验室对50例汉族男性随机样本应用前3个位点检测的结果相比较, 结果表明: 北京汉族王姓男性携带的Y染色体单体型与对照无差异。王姓有复杂的多起源可能可以解释这一结果。

关键词 Y染色体, 姓氏, DNA多态, 微卫星标记

Y染色体多态作为研究父系遗传的重要工具, 正越来越多地受到人们的重视 (Mathias *et al*, 1994)。本文选择50例汉族王姓男性DNA样本, 应用4个微卫星位点, DYS19、DYS390、DYS391和YCA II进行Y染色体多态的检测。其目的在于通过研究中国大姓之一王姓的不同个体的单体型之间的关系, 初步探究姓氏的起源与发展, 为深入研究中华民族的遗传构成积累资料。同时希望建立起一个研究父系遗传的方法, 为今后更广泛地应用Y染色体DNA多态进行群体研究及个体识别等提供方法学依据。

1 材料与方法

1.1 分析对象

取50例汉族王姓男性血样, 无血缘关系, 由协和医院血库提供, 每例取外周血5毫升。

1.2 方法

1.2.1 DNA 抽提 分别用酚-氯仿法和饱和盐析法提取DNA。

1.2.2 PCR

(1) 引物序列如下 (Jobling *et al*, 1995), 由上海生工公司合成。

DYS19 (H) 5' -CTACTGAGTTTCTGTATA GT-3'

(L) 5' -ATGGCATGTA GTGAGGACA -3'

收稿日期: 1998-09-24

国家自然科学基金 (39570374) 资助

DYS390 (H) 5' -TATA TTTTACACA TTTTGGGCC-3'
 (L) 5' -TGACA GTAAAA TGAACACA TTGC-3'
 DYS391 (H) 5' -CTATTCA TTCAA TCA TACACCCA -3'
 (L) 5' -GATTCTTTGTGGTGGGTCTG-3'
 YCA II (H) 5' -TATA TAAA TA GAA GTA GTGA -3'
 (L) 5' -TA TCGA TGTAATGTTA TATTA -3'

- (2) 反应体系构成 25 微升反应体系中含基因组DNA 50-100ng, 100uM dNTP, 2.5uL 10xTaqDNA 聚合酶缓冲液 (不含Mg²⁺), 1.5mM MgCl₂, 引物除DYS391外, 各为0.2uM (DYS391为0.4uM)。
- (3) 反应条件 95 变性5分钟后, 加入1U TaqDNA 聚合酶, 然后
 DYS19: 94 30秒, 55 30秒, 72 90秒, 30个循环后, 70 10分钟。
 DYS390: 94 30秒, 55 30秒, 72 60秒, 30个循环后, 72 10分钟。
 DYS391: 94 30秒, 55 30秒, 72 60秒, 30个循环后, 70 10分钟。
 YCA II: 94 30秒, 53 60秒, 72 60秒, 10个循环后, 将退火温度改为51 ,
 30个循环后, 72 10分钟。

1.2.3 多重 PCR

- (1) 反应体系构成: 25uL 反应体系中, 含基因组DNA 50-100ng, 200uM dNTP, 2.5uL 10xTaqDNA 聚合酶缓冲液 (不含Mg²⁺), 1.5mM MgCl₂, 引物(DYS19、DYS390和DYS391) 各75ng。
- (2) 反应条件: 95 变性5分钟, 加入2U TaqDNA 聚合酶, 然后94 30秒, 53 30秒, 72 90秒, 30个循环后, 70 10分钟。

1.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (黄尚志等, 1995)

6% 变性聚丙烯酰胺胶, 取PCR产物5uL, 变性后恒压600伏电泳1-2小时, 银染显色。

1.4 杂合度计算

依据公式 $Het = 1 - \sum P_i^2$, 其中n为等位基因数, P_i 为第i个等位基因的频率。

2 结 果

2.1 DYS19、DYS390、DYS391的基因频率

表1 DYS19、DYS390、DYS391 3个位点等位基因情况
 Information of Alleles of DYS19, DYS390 and DYS391 loci

位点	王 姓			对 照		
	等位基因数目	等位基因长度	杂合度	等位基因数目	等位基因长度	杂合度
DYS19	5	186-202	0.6576	6	186-206	0.672
DYS390	5	209-225	0.6336	4	209-221	0.6712
DYS391	5	274-290	0.5024	4	278-290	0.5736

注: 对照为本实验室韩瑞刚所做

表 2 DYS19 等位基因频率
Allele frequency of DYS19 locus

等位基因	王 姓			对 照		
	大小(bp)	例数	频率	大小(bp)	例数	频率
A	186	3	0.06	186	3	0.06
B	190	11	0.22	190	3	0.06
C	194	25	0.50	194	26	0.52
D	198	10	0.20	198	6	0.12
E	202	1	0.02	202	9	0.18
F	206	0	0.00	206	3	0.06

表 3 DYS390 等位基因频率
Allele frequency of DYS390 locus

等位基因	王 姓			对 照		
	大小(bp)	例数	频率	大小(bp)	例数	频率
A	209	1	0.02	209	2	0.04
B	213	17	0.34	213	21	0.42
C	217	24	0.48	217	16	0.32
D	221	7	0.14	221	11	0.22
E	225	1	0.02	225	0	0.00

表 4 DYS391 等位基因频率
Allele frequency of DYS391 locus

等位基因	王 姓			对 照		
	大小(bp)	例数	频率	大小(bp)	例数	频率
A	274	1	0.02	274	0	0.00
B	278	3	0.06	278	2	0.04
C	282	33	0.66	282	27	0.54
D	286	12	0.24	286	18	0.36
E	290	1	0.02	290	3	0.06

2.2 YCA II 单体型

共检测到 YCA II 16 种单体型。

表 5 YCA II 单体型频率
Haplotype frequency of YCA II locus

单体型	例数	频率	单体型	例数	频率
a1b 2	1	0.02	a3b6	4	0.08
a2b2	1	0.02	a3b7	3	0.06
a2b3	1	0.02	a4b5	1	0.02
a2b4	6	0.12	a4b6	3	0.06
a2b5	3	0.06	a5b5	5	0.10
a2b6	3	0.06	a5b6	3	0.06
a3b4	2	0.04	a5b8	1	0.02
a3b5	11	0.22	a6b6	2	0.04

2.3 DYS19+ DYS390+ DYS391 单体型

王姓组共有 21 种 DYS19+ DYS390+ DYS391 单体型，而对照组有 25 种。

表 6 DYS19+ DYS390+ DYS391 单体型频率

Haplotypes frequency of DYS19+ DYS390+ DYS391

王 姓						对 照					
单体型	DYS19	DYS390	DYS391	例数	频率	单体型	DYS19	DYS390	DYS391	例数	频率
1	1	3	2	2	0.04	1	1	2	3	2	0.04
2	1	4	1	1	0.02	2	1	3	2	1	0.02
3	2	2	3	3	0.06	3	2	2	4	1	0.02
4	2	3	3	4	0.08	4	2	4	3	2	0.04
5	2	3	4	2	0.04	5	3	1	4	1	0.02
6	2	4	3	1	0.02	6	3	2	3	6	0.12
7	2	5	2	1	0.02	7	3	2	4	4	0.08
8	3	1	3	1	0.02	8	3	2	5	1	0.02
9	3	2	3	8	0.16	9	3	3	3	5	0.10
10	3	2	4	3	0.06	10	3	3	4	3	0.06
11	3	3	3	7	0.14	11	3	3	5	1	0.02
12	3	3	4	4	0.08	12	3	4	3	2	0.04
13	3	4	3	1	0.02	13	3	4	3	1	0.02
14	3	4	4	1	0.02	14	4	2	3	3	0.06
15	4	2	3	2	0.04	15	4	3	3	1	0.02
16	4	2	5	1	0.02	16	4	4	3	1	0.02
17	4	3	3	4	0.08	17	4	4	5	1	0.02
18	4	3	4	1	0.02	18	5	2	3	1	0.02
19	4	4	3	1	0.02	19	5	2	4	3	0.06
20	4	4	4	1	0.02	20	5	3	3	3	0.06
21	5	4	3	1	0.02	21	5	3	4	1	0.02
						22	5	4	4	1	0.02
						23	6	1	2	1	0.02
						24	6	3	4	1	0.02
						25	6	4	3	1	0.02

3 讨 论

3.1 方法学分析

本文共应用了 4 个微卫星标记: DYS19、DYS390、DYS391 和 YCA II (许丽萍等, 1996)。采用 PCR 及变性聚丙烯酰胺电泳和银染, 在 50 例样本中, DYS19、DYS390 和 DYS391 3 个位点各得到 5 种等位基因, YCA II 位点得到 16 种单体型。其杂合度分别为 0.6576、0.6336、0.5024 和 0.8976。前 3 个位点的杂合度较低, 均小于 70%, 其单独提供的信息量有限。将这 3 个位点结合起来组成单体型, 在所检测的 50 例样本中, 共得到 21 种单体型, 分辨率大大提高。而 YCA II 所检测的单体型的杂合度为 0.8976, 相对较高, 是一个比较好的遗传标记物。

3.2 结果分析

(1) DYS19 在王姓组中共检测到 5 种等位基因, 其中等位基因 C 的频率最高, 为 0.50, 其次为 B 和 D, 频率分别为 0.22 和 0.20, 而对照组共检测到 6 种等位基因, 频率最高的亦为 C, 频率为 0.52, 其次为 E 和 D, 频率分别为 0.18 和 0.12。两组相比较, $\chi^2 = 4.059$, 而 $\chi^2_{5, 0.25} = 6.626$, $p > 0.25$, 因此两者无显著差异。

国内外应用此位点也进行了许多研究。1995 年 Santos 等 (1996) 研究发现不同的地域和种族存在巨大差异, 美洲人几乎均为 A, 亚洲人和非洲人中, C 占主导地位。1996 年刘爱平等 (1996) 对中国湖南地区汉族人, 突尼斯白种人和撒丁岛白种人的研究表明, 中国汉族人以 C (55.9%) 为最多, 撒丁岛白种人以 E (55.9%) 为主, 而突尼斯白种人以 A

(40.3%) 和 B (38.8%) 为主。我们的结果显示, 汉族王姓男性与汉族随机的男性样本比较无明显差异, 以等位基因 C 为主, 这与国内外其他的研究结果是一致的。

(2) DYS390 和 DYS391 都检测到 5 种等位基因, 均以等位基因 C 的频率为最高。与对照组相比较, 分别为 $\chi^2 = 2.42$ ($\chi^2_{4, 0.25} = 5.385$) 和 $\chi^2 = 2.68$ ($\chi^2_{4, 0.25} = 5.385$), 均 $p > 0.25$, 因此两组无显著差异。

(3) YCA II 共检测到 16 种单体型, 其中 a3b5 的比例最高, 占 22%; 其次为 a2b4 和 a5b5, 分别占 12% 和 10%。刘爱平等 (1996) 应用此位点对中国湖南地区汉族人进行研究并与其它种族进行比较, 共得到 15 种单体型 (注: 由于其命名方法不详, 故无法直接与本实验结果相比较)。其中, a4b1、a5b1 和 a3b1 的频率较高, 分别为 0.283、0.188 和 0.188, 白种人 a4b1 的频率最高, 为 0.96; 黑种人以 a4b1 和 a4b2 的频率较高, 均为 0.444。

(4) 单体型分析 在王姓组中, 共检测到 21 种 DYS19+ DYS390+ DYS391 单体型, 323 频率最高, 为 0.16; 其次为 333、233 和 433, 频率分别为 0.14、0.08 和 0.08。对照组中, 共有 25 种单体型, 频率最高的亦为 323, 为 0.12; 其次是 333 和 324, 频率分别为 0.1 和 0.08。两组之间虽然单体型的数量和频率略有差别, 但统计学上无显著差异。

以上结果说明, 虽然中国传统上姓氏一般遵循父系传递, 但几千年历史变迁, 这种方式会因一些特殊的情况而改变, 如入赘、皇帝赐姓、避讳改姓和少数民族采用汉姓等, 因此姓氏来源极为复杂。王姓为汉族大姓, 袁义达、杜若甫 (1996) 所著《中华姓氏大辞典》中就指出王姓有 30 种来源, 而且此次采血地为北京, 人口流动性大, 受地域的限制小, 因此研究结果中出现较多的等位基因和单体型, 且分布较为分散, 与普通人群差异不大, 是完全可以理解的。

4 应用前景

Y 染色体多态作为研究父系遗传的重要手段, 有着广阔的应用前景。例如:

(1) 民族和种族的研究 国内外关于这方面已经进行了很多研究。例如: YAP 是一个较常用的 Y 染色体标记物 (Hammer, 1994; Spurdle, 1995), 是一个 A lu 在 Yq11 插入的结果。研究表明在黑猩猩和大猩猩中未发现 A lu 插入, 提示这一事件可能发生于人猿分离之后。1994 年 Spurdle (1995) 应用 YAP 对非洲、欧洲、亚洲等 23 个人群的分析表明, 非洲人 YAP(+) 的频率最高, 其次为欧洲人, 大多数亚洲人为 YAP(-), 但一部分日本人为 YAP(+) (Hammer, 1995)。这一多态的分布表明了分隔的大的地理区域间研究父系遗传和男性基因流动的可能性。以往应用线粒体 DNA 的研究提示人类的起源在非洲, Y 染色体的研究可以对这一假说进行验证和补充。对不同人群样本的 Y 染色体单体型的研究将对了解民族起源、基因流动、群体迁徙等有所帮助。

(2) 亲子鉴定 Y 染色体多态可用于亲子鉴定, 特别是在不能得到母亲样本的情况下更有实用价值。但应多个位点 (最好结合常染色体标记) 综合考虑。

(3) 法庭调查 这里值得一提的是微卫星 DNA (Deka *et al.*, 1996), 其种类多, 高度多态, 操作快速简便, 所需 DNA 量少, 来自粗血溶解物或滤纸上的一点血迹就可以进行分析, 很适于法庭调查, 但在结果判断时同样应该慎重。

总之, Y 染色体多态是进行遗传学研究的重要手段, 本实验只是其在某一方面的应用。

今后的工作一方面应不断寻找新的多态位点, 另一方面应利用已知的多态位点, 对更大范围的人群样本进行研究, 为研究民族的构成和人类的起源等积累资料。

参 考 文 献

- 刘爱平等 1996 中国湖南地区汉族人 Y 染色体特异性短重复序列多态性的研究 中华医学遗传学杂志, 11(3): 73—75
- 许丽萍等 1996 人类 Y 染色体 DNA 多态性研究进展 国外医学遗传学分册, 19(1): 32—38
- 袁义达, 杜若甫 1996 中华姓氏大辞典 北京: 教育科学出版社, 171, 1215
- 黄尚志, 李辉等 1995 垂直电泳槽凝胶水平灌制法 中华医学遗传学杂志, 12: 179
- Deka R *et al* 1996 Dispersion of human Y chromosome haplotypes based on five microsatellites in global populations *Genome Research*, 6: 1177—1184
- Hammer MF *et al* 1994 A recent insertion of an A lu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies *Mol Bio Evol*, 11: 749—761
- Hammer MF 1995 Y chromosome DNA variation and the peopling of Japan *Am J Genet*, 56: 951—962
- Jobling MA *et al* 1995 Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution *TIG*, 11(11): 449—456
- Mathias N *et al* 1994 Highly informative compound haplotypes for the human Y chromosome *Hum Mol Genet*, 3(1): 115—123
- Santos R *et al* 1996 Geographic differences in the allele frequencies of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19 *Hum Genet*, 97: 309—313
- Spurdle AB 1995 The Y A lu polymorphism in Southern African populations and its relationship to other Y-specific polymorphism. *Am J Hum Genet*, 4: 319—330

APPLICATION OF Y-CHROMOSOME POLYMORPHISMS TO STUDYING THE KINSHIP OF THE MALES WITH FAMILY NAME WANG FROM HAN NATIONALITY

Wu Dongying Ma Suncan Liu Ming Huang Shangzhi Liu Chunyun

(*Institute of Basic Medical Science, The Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005*)

Abstract

Y chromosome does not recombine at meiosis except its pseudoautosomal region, so it keeps a record of its ancestor's mutations in the history. As a marker for the study of paternal heredity, Y chromosome polymorphisms play a special role. Using four Y specific microsatellite markers, we carried out a DNA polymorphism analysis of fifty unrelated males randomly picked up from the Han nationality with the family name Wang. There were no difference between the results above and the result of another study, which used the same 3 markers (DYS19, DYS390, DYS391) to investigate 50 males with different family names randomly chosen from Han nationality. It is concluded that there are no significant difference between haplotypes of the males with family name Wang in Beijing and those of random sample of males from Han nationality, which can be explained by the complex origins of family name Wang.

Key words Y chromosome, DNA polymorphism, Microsatellite, Family name