

中国4个民族m tDNA D环多态性研究

陈 伟 陈 峰 薛亚丽
杨焕杰 傅松滨 张贵寅 李 璞

(哈尔滨医科大学医学遗传学研究室, 哈尔滨 150086)

摘 要

本文利用聚合酶链反应限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法, 检测了 36 名汉族、30 名达斡尔族、32 名鄂伦春族、30 名鄂温克族随机选择正常个体 m tDNA D 环 465bp DNA 片段多态性并加以比较。结果表明, m tDNA D 环该片段的 RFLP 分析共产生 27 种限制性类型, 计算出 4 个民族的 m tDNA D 环平均核苷酸歧异频率, 并对 4 个民族的亲缘关系进行了聚类分析。

关键词 m tDNA, D 环, 遗传多态

前 言

分子进化研究表明, 不同人群机体水平上的差异本质上是 DNA 分子水平的差异。线粒体 DNA (m tDNA) 具有进化速率快、群体内变异大、分子结构简单、基本序列完全清楚及严格的母系遗传等特点, 已成为种内种间近缘群体间遗传分化关系研究的有力工具。近年来, m tDNA 的研究不断深入, 其 D 环是 m tDNA 中唯一不编码多态链的核苷酸片段, 无修复系统, 不受选择压力的影响, 因而, 积累了较多的变异。本文首次对中国东北地区汉族、鄂伦春、鄂温克、达斡尔 4 个民族 m tDNA D 环 465bp 的高变区 DNA 片段进行了 PCR 扩增和 6 种限制性内切酶酶谱分析 (RFLP)。

1 材料与amp;方法

1.1 研究对象及基因组 DNA 的提取

汉族样品取自哈尔滨医科大学 36 名健康学生 (均来自黑龙江省); 鄂伦春族样品取自内蒙古鄂伦春自治旗阿里河镇, 共 32 人; 鄂温克族样品取自黑龙江省讷河市兴旺鄂温克民

收稿日期: 1999-04-09

本课题为国家自然科学基金重大项目资助, 课题号: 39392900

族乡，共 30 人；达斡尔族样品取自内蒙古莫力达瓦达斡尔自治旗尼尔基镇，共 30 人。经肘正中静脉取外周血 5—6ml，枸橼酸钠抗凝，应用常规方法 (Sam brook *et al* , 1989) 提取样品外周血基因组 DNA。本实验研究对象均为健康个体，3 代中均系同民族个体。

1.2 mDNA D 环高变区 PCR 扩增

引物位点及序列如下: 引物 1 16081: 5'-ACC GCT ATG TAT TTC GTA CA \3'; 引物 2 16526: 5'-AAC GTG TGG GCT ATT TAG GC-3'。PCR 反应总体系 50 μl: 10× 缓冲液 5μl, 4× dNTP 4μl, 两引物各 1 μl, Tag DNA 聚合酶 0.3 μl (1.5U), 模板 DNA 5μl, ddH₂O 33.7μl。扩增条件: 97 预变性 5 分钟, 变性 95 60 秒, 退火 60 30 秒, 延伸 72 60 秒, 共 30 个循环, 72 延伸 10 分钟。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 溴乙锭 (EB) 染色。

1.3 酶解 PCR 产物

分别采用 A va II, Bam H I, Eco R V、Hae III, R sa I 和 Kpn I 六种限制酶切割 PCR 产物。酶切体系 20μl: 10× 缓冲液 2μl, PCR 产物 10μl, ddH₂O 7.8 μl, 限制酶 0.2μl (U), 37 水浴 12 小时。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染分析

制备 12% (交联比为 29 : 1) 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 酶切产物经 200V 恒压电泳 4 小时。凝胶经过固定 (10% 乙醇+ 0.5% 乙酸, 12 分钟), 染色 (0.2% AgNO₃, 10 分钟), 显色 (1.5% NaOH+ 0.4% 甲醛, 至清晰) 三步处理后, 用凝胶自动成像系统 (Bio-Rad 公司) 进行分析。结果见图 1。

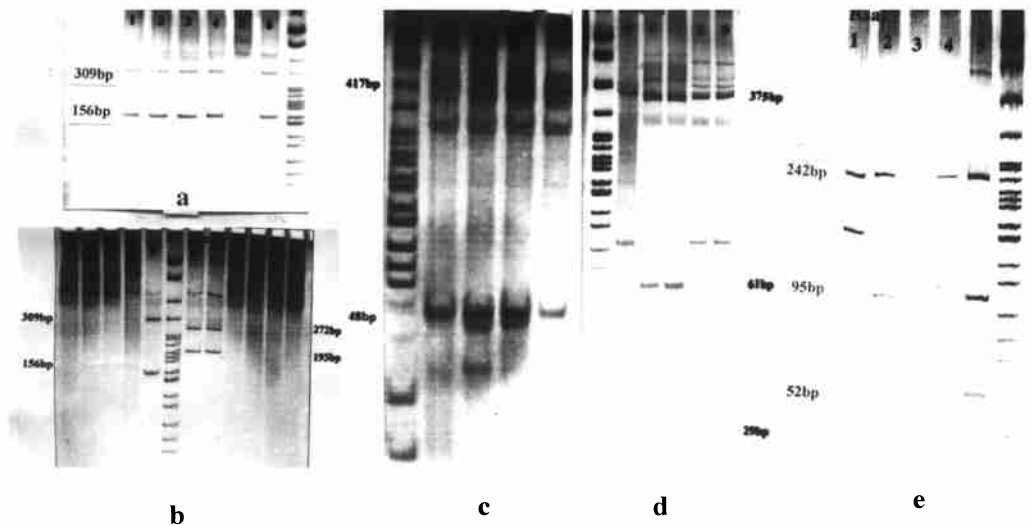


图 1 mDNA D 环 465bp DNA 片段 PCR 产物酶切 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳

12% polyacrylamide gel results of mDNA D loop 465bp DNA fregments

a A va II 酶切阳性 b Bam H I 和 Eco R V 酶切阳性 c Kpn I 酶切阳性 d Hae III 酶切阳性 e R sa I 酶切阳性
Marker: PBR 322/M sp I a restriction endonuclease A va II(+) b Bam H I(+) and Eco R V(+) c Kpn I(+) d Hae III(+) e R sa I(+) Marker: PBR 322/M sp I

2 结 果

1) 4 个民族 128 位个体经 6 种限制酶 10 个位点的 PCR-RFLP 分析共产生 27 种限制性类型 (表 1)。

表 1 中国 4 个民族线粒体 DNA D 环限制性类型及频率分析
M itotypes and frequencies of m DNA D loop of 4 ethnic groups in China

	限制性类型										限制性类型频率 (%)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	汉	鄂伦春	鄂温克	达斡尔	蒙古	俄罗斯
1	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	2.71	3.10	0.00	3.33	0.00	1.64
2	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	5.50	3.10	3.33	6.67	6.46	1.64
3	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	2.71	3.10	3.33	3.33	1.48	0.00
4	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	36.09	21.88	20.03	30.00	27.68	19.67
5	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	2.71	3.10	0.00	0.00	0.00	0.00
6	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	2.71	0.00	0.00	3.33	4.43	4.10
7	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	2.71	0.00	0.00	0.00	0.92	3.27
8	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	2.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.82
9	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	2.71	3.10	0.00	0.00	0.00	0.00
10	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	8.30	43.75	40.00	30.00	25.65	31.97
11	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	2.71	3.10	6.67	3.33	0.74	2.46
12	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	2.71	3.10	0.00	0.00	0.55	0.00
13	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	25.00	3.10	0.00	0.00	0.00	0.00
14	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	0.00	3.10	0.00	3.33	0.18	0.00
15	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	0.00	3.10	0.00	0.00	0.00	0.00
16	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	0.00	3.10	0.00	3.33	0.00	0.00
17	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	0.00	0.00	0.00	3.33	0.00	0.00
18	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	0.00	0.00	0.00	3.33	0.00	0.00
19	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	0.00	0.00	0.00	3.33	0.00	0.00
20	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	0.00	0.00	3.33	3.33	6.83	4.92
21	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	0.00	0.00	3.33	0.00	0.37	0.00
22	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	0.00	0.00	3.33	0.00	0.00	0.00
23	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	0.00	0.00	3.33	0.00	0.55	0.00
24	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	0.00	0.00	3.33	0.00	1.48	0.00
25	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	0.00	0.00	3.33	0.00	0.18	1.64
26	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	0.00	0.00	3.33	0.00	0.00	0.00
27	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	0.00	0.00	3.33	0.00	9.23	3.27

注: 1 A va II-16390, 2 BamH I-16390, 3 EcoRV-16274, 4 Kpn I-16129, 5 Hae III-16254,
6 Hae III-16456, 7 Hae III-16156, 8 R sa F-16156, 9 R sa F-16208 10 R sa F-16303

2) 根据 Nei 和 Tajima (1981) 的位点法公式, 分别计算出 4 个民族 mDNA D 环每个位点平均核苷酸歧异频率为: 汉族 0.0291, 鄂伦春族 0.0477, 鄂温克族 0.0563, 达斡尔族 0.0541。

3) 4 个民族的系统聚类关系 (图中数字表示民族间的遗传距离):

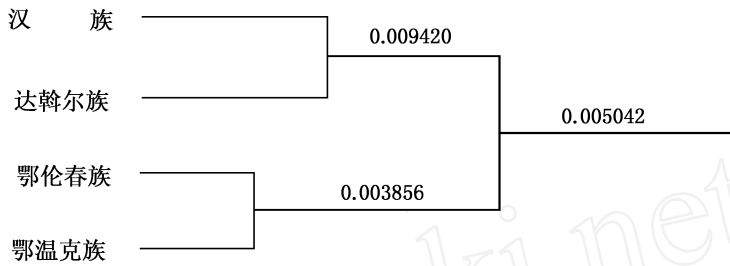


图 2 4 个民族的系统聚类关系图

The relationship of cluster analysis among the four ethnic groups

3 讨 论

自从线粒体DNA 的完整序列被确定为“剑桥序列”(Anderson *et al* , 1981) 以来, 线粒体DNA 作为研究母系遗传的工具, 广泛用于探索人类起源及各民族的进化研究。本文首次对中国汉族和 3 个少数民族进行了 m tDNA D 环 465 bp 高变区 DNA 片断进行了多态性研究。本研究的 4 个民族的 27 个限制性类型频率分布与俄罗斯的俄罗斯族和蒙古族 (Sambuughin *et al* , 1991; Petrichev *et al* , 1993) 比较见表 1。从表 1 我们可以看出, 4 型和 10 型在 6 个民族频率分布都很高, 说明这两个类型在各民族中普遍存在; 2 型和 11 型在 6 个民族都存在, 但频率较 4 型和 10 型低; 其他类型 6 个民族均有不存在的类型。对比 6 个民族的类型分布我们发现, 6 个民族之间存在大部分相同类型, 但各民族都有自己特有的类型。因此, 可以初步得出结论: m tDNA D 环大部分核苷酸位点的歧异比较普遍, 但也有一些位点的歧异随机性很大。

对 m tDNA 核苷酸歧异频率的分析, 学者们在 80 年代就相继进行过报道。贺林等 1987 年报道了我国汉族人全部 m tDNA 核苷酸歧异频率为 0.006; Cann *et al* (1987) 和 Brown *et al* (1980) 报道的美国人分别是 0.004 和 0.0036, 而 Aquado *et al* (1983) 报道的 7 个人的 m tDNA D 环区 900 个核苷酸歧异频率是 0.02, Aquado *et al* (1983) 认为 D 环为非编码区, 积累较多的变异, 故所得的核苷酸歧异频率较大。我们所得到的 4 个民族的 m tDNA D 环平均核苷酸歧异频率分别为: 汉族 0.0291; 鄂伦春族 0.0477; 鄂温克族 0.0563; 达斡尔族 0.0541。再次证实了 Aquado *et al* (1983) 的结果, D 环区较全部 m tDNA 平均核苷酸替换频率明显增高。并且, 系统聚类分析表明, 鄂伦春族和鄂温克族的遗传距离相对较近, 达斡尔族和汉族的遗传距离相对较近, 而鄂伦春族和鄂温克族与汉族、达斡尔族的遗传距离相对较远。

4 小 结

本文首次对中国汉族和 3 个少数民族进行了 m tDNA D 环 465 bp 高变区 DNA 片断进行了多态性研究, 并与国外已有的俄罗斯国家的俄罗斯族和蒙古族人群结果进行比较, 支

持 m tDNA D 环较整个 m tDNA 平均核苷酸歧异频率明显增高的结论。m tDNA D 环平均核苷酸歧异频率的研究对于探讨各民族在人类进化过程中的进化速度及各民族之间的遗传距离有重要意义。

致谢: 本文承蒙哈尔滨医科大学数学教研室郭政教师协助公式及数据处理, 特此感谢。

参 考 文 献

- 贺林, 严明, 王世浚等 1987. 中国汉族人线粒体 DNA RFLP 的初步研究 科学通报, 32 (23): 1826—1828
- Anderson S, Bankier A T, Barrell B G *et al* 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome Nature, 290: 457—465
- Aquado C F, Greenberg B D. 1983 Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals Genetics, 103: 287—312
- Brown W M, Shine J, Goodman H M *et al* 1980 Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonuclease analysis Proc Natn Acad Sci U S A, 77: 3605—3609
- Cann R L, Wilson A C, Vawter L *et al* 1987. Mitochondrial DNA and human evolution Nature, 325: 31—36
- Nei M, Tajima F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases Genetics, 97: 145—163
- Petrichev V N, Kutueva A B. 1993 Polymorphism of mitochondrial DNA in the Russian population of Russia Genetika, 29: 1382—1389 (in Russian).
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al* 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual The second edition Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanbuughin N, Petrichev V N, Pychkov U G *et al* 1991. DNA polymorphism in Mongolian Population Genetika, 27: 2143—2151 (in Russian).

STUDY ON THE m tDNA D LOOP POLYMORPHISM OF FOUR ETHNIC GROUPS IN CHINA

Chen Wei Chen Feng Xue Yali Yan Huanjie Fu Songbin Zhang Guiyin Li Pu
(Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086)

Abstract

The PCR-RFLP techniques were used to study the m tDNA D loop polymorphism in Han (36 testees), Daur (30 testees), Oroqen (32 testees) and Ewenki (30 testees). All testees were randomly selected and healthy. The polymorphisms on 10 sites of a 465bp-long DNA fragment in m tDNA D loop were detected and compared among ethnic groups.

Altogether 27 mitotypes were found by PCR-RFLP. The mean nucleic acid substitute frequency on each site was: Han 0.0291, Daur 0.0541, Oroqen 0.0477 and Ewenki 0.0563, respectively.

Key words m tDNA, D loop, Genetic polymorphism