

# 江浙沪和哈尔滨地区汉族 D17S30 位点的多态性分布

冯 哲 冯明亮 嵇月华 张雁征  
杨 颖 陆 琼 张工梁

(上海市血液中心, 上海输血研究所免疫遗传室, 上海 200051)

杜庆田

(黑龙江省医院, 哈尔滨 150006)

陈仁彪

(上海第二医科大学生物学教研室和医学遗传教研室, 上海 200025)

## 摘 要

D17S30 是位于人类染色体 17p13.3、以 70bp 为重复单位的、具有高度多态性的 VNTR 位点。本文采用作者报道的微量快速 Amp-FLP 分型技术, 对 100 名哈尔滨市北方汉族人和 110 名江浙沪南方汉族人作了 D17S30 位点分型, 发现在北方汉族与江浙沪南方汉族之间等位基因频率分布并无显著差异, 但可见 A1 和 A7 基因频率北高南低, A4 基因频率则为南高北低, 提示存在南北汉族之间的分化。D17S30 位点南北方汉族观察杂合性均为 0.88, 个体鉴别力均为 0.97, 多态性信息含量均为 0.86。本文结果提示, 采用微量快速 Amp-FLP 分型技术分析 D17S30 位点多态性, 具有较高的灵敏度与准确性, 可在我国作为一种高效的遗传标记应用于民族演变、法医学个体指认与亲子鉴定、遗传病基因连锁分析等研究领域。

关键词 D17S30 位点, 微量快速 Amp-FLP, VNTR

遗传学研究发现人类基因组 DNA 的某些部位含有重复数目可变的非编码核心单元, 称为可变数串联重复序列 (variable number of tandem repeats, VNTR)。VNTR 的高度多态性可为人类基因组 DNA 的识别提供重要的标记, 适用于民族演变、法医学个体指认与亲子鉴定以及遗传病基因连锁分析等研究领域。D17S30 是一个位于人类染色体 17p13.3、以 70bp 为核心单元的 VNTR 位点 (Batanian *et al.*, 1990)。1989 年, Horn 等率先用采用扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, Amp-FLP) 技术证实 D17S30 位点的多态性 (Horn *et al.*, 1989)。此后, Batanian 等、陈林等和欧炯文等分别在美国白人、成都汉族人和云南汉族人中对 D17S30 位点进行了研究 (Batanian *et al.*, 1990; 陈林等, 1995; 欧炯文等, 1997)。本文采用作者报道的微量快速 Amp-FLP 分型技术, 分析

了 100 例哈尔滨市随机北方汉族人和 110 例江浙沪随机南方汉族人 D17S30 位点的遗传多态性。现将结果报道如下。

### 1 材料与方法

样本 采集 100 例哈尔滨市随机北方汉族人 ( 祖籍为东北地区 ) 和 110 例上海市随机南方汉族人 ( 祖籍为江浙沪地区 ) 外周静脉血每例 1ml, EDTA 抗凝。

试剂 D17S30 位点 PCR 扩增特异性引物

1: 20bp 5 -GGAAGAGTGAAGTGCACAGG-3

2: 21bp 5 -CACAGTCTTTATTCTTCAGCG-3 ,

由上海植物生理研究所合成 ( 陈林等, 1995)。Taq DNA 聚合酶等试剂及 PCR Marker 均购自华美公司, 123bp Marker 购自 Gibco BRL 公司, 螯合树脂 ( chelating resin) Chelex<sup>R</sup> 100 购自 Sigma 公司 ( Chelex 是 Bio-Rad 实验室注册商标)。

方法 微量快速 Amp-FLP 分型技术

#### 1. 1 Chelex<sup>R</sup> 100 树脂抽提 DNA

1) 2ul 血样溶于 1000ul ddH<sub>2</sub>O, 混匀后静置 15 分钟。

2) 15 000 转/ 分离心 2 分钟, 弃上清液后加入 100ul 混匀的 20% 的 Chelex<sup>R</sup> 100 混合液, 混匀后静置 2 分钟

3) 100 水浴 8 分钟

4) 激烈振荡后 15 000 转/ 分, 离心 1 分钟

#### 1. 2 热启动 PCR 扩增

1) 吸取 Chelex<sup>R</sup> 100 上清液 1- 5ul, 加入 ddH<sub>2</sub>O 至 15ul, 混匀后加入 2 滴石蜡油

2) 95 10 分钟

3) 93 下快速加入引物、dNTP、Taq 酶、10× Buffer 和 MgCl<sub>2</sub> 的混合物 10ul。反应总体积为 25ul, 终浓度为每种引物 1uM、dNTP 200uM、Mg<sup>2+</sup> 1.0mM, Taq 酶 0.06 U/ ul。

4) 立即进行 PCR 扩增。PCR 程序: 94 1 分钟; 55 1 分钟; 70 6 分钟, 30 次循环后 72 延伸 10 分钟。

#### 1. 3 电泳

使用 2% 琼脂糖凝胶以 PCR Marker 和 123bp ladder Marker 作指示判型。

统计分析 基因频率按基因计数法测定。用  $\chi^2$  检验比较观察值和期望值以验证样本是否符合 Hardy-Weinberg 平衡法则。用个体鉴别力 ( power of discrimination, DP) ( Fisher, 1951)。

$$DP = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (P_i \text{ 为基因型频率})$$

无偏倚估计期望杂合性 h ( Nei 等, 1974)

$$h = n \times \left[ 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \right] / (n - 1) \quad (P_i \text{ 为等位基因频率})$$

及多态性信息含量 ( polymorphism information content, PIC 值) ( Nei *et al.*, 1974) <http://>

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

评估样本多态性程度。人群之间的差异用  $2 \times c$  表作  $\chi^2$  检验。

## 2 结果与分析

采用微量快速 Amp-FLP 分型技术, 在 100 例哈尔滨市随机北方汉族样本和 110 例江浙沪随机南方汉族样本中共发现 16 种等位基因和 55 种基因型 (表 1- 3), 片段大小在 168 - 1358bp 之间 (图 1)。在哈尔滨市北方汉族中最常见的等位基因是 A1 和 A4。在江浙沪汉族中最常见的等位基因是 A4 和 A5, 并首次发现重复单元为 15 和 18 的大片段等位基因 (图 2)。在理论上, 对于 D17S30 位点, 16 种等位基因应构成 136 种基因型, 本文仅发现其中 55 种, 可见基因型分布并不均一。为检验样本的随机性, 本文将基因型观察数小于 3 的样本进行了合并, 基因型观察数符合 Hardy-Weinberg 平衡法则 (哈尔滨地区北方汉族群体

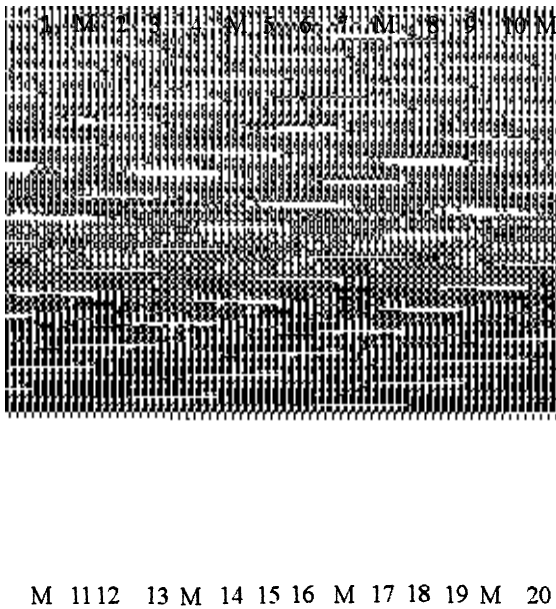


图 1 D17S30 位点微量快速 Amp-FLP 技术分析结果

Typing results of D17S30 locus by rapid and miniature Amp-FLP technique

- 1: 5- 5; 2: 1- 5; 3: 4- 5; 4: 1- 4; 5: 1- 4;
  - 6: 5- 6; 7: 4- 5; 8: 6- 7; 9: 5- 6; 10: 1- 4;
  - 11: 1- 12; 12: 4- 8; 13: 3- 5; 14: 1- 15; 15: 4- 8;
  - 16: 3- 4; 17: 2- 3; 18: 3- 13; 19: 5- 10; 20: 4- 6
- M: PCR Marker (bp: 237, 377, 515, 695, 994, 1543)

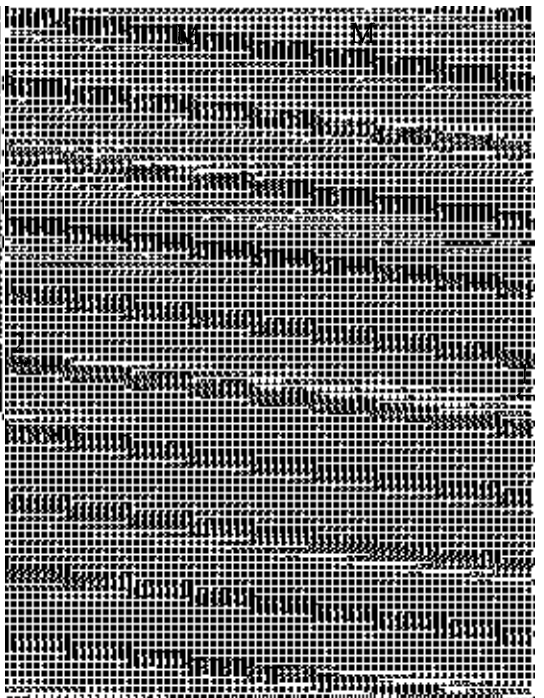


图 2 D17S30 位点新的等位基因 A15 和 A18  
New alleles of D17S30 locus, A15 and A18

箭头 1: A15 (1148bp) 箭头 2: A18 (1358bp)  
Arrow 1: A15 (1148bp)  
Arrow 2: A18 (1358bp)  
M: 123bp Marker (bp: 123, 246, 369, .....123 × n)

$\chi^2 = 5.68$ ,  $df = 7$ ,  $P > 0.05$ ; 江浙沪地区汉族群体  $\chi^2 = 4.00$ ,  $df = 4$ ,  $P > 0.05$ )。D17S30 位点杂合性、多态性信息含量和个体鉴别力两地区均十分接近, 见表 4。

表 1 我国哈尔滨地区北方汉族和江浙沪地区南方汉族 D17S30 位点等位基因频率

The allele frequency of D17S30 locus in Harbin northern and Jiangsu-Zhejiang-Shanghai southern Hans

D17S30 等位基因 D17S30 allele	哈尔滨地区北方汉族 Harbin northern Hans (n= 100)	江浙沪地区南方汉族 Jiangsu-Zhejiang-Shanghai southern Hans (n= 110)
A1	0.1950	0.1091
A2	0.0550	0.0591
A3	0.0600	0.0818
A4	0.1900	0.2454
A5	0.1500	0.1409
A6	0.0700	0.1273
A7	0.1250	0.0818
A8	0.0500	0.0227
A9	0.0200	0.0136
A10	0.0300	0.0500
A11	0.0300	0.0318
A12	0.0200	0.0227
A13	0.0000	0.0046
A15	0.0000	0.0046
A16	0.0050	0.0000
A18	0.0000	0.0046
合计 Total	1.0000	1.0000

表 2 哈尔滨地区北方汉族 D17S30 位点基因型分布 (n= 100)

The genotype distribution of D17S30 locus in Harbin northern Hans (n= 100)

基因型 genotype	频率 frequency	基因型 genotype	频率 frequency
1- 1	0.040	4- 5	0.060
1- 2	0.030	4- 6	0.040
1- 3	0.030	4- 7	0.040
1- 4	0.070	4- 8	0.020
1- 5	0.060	4- 9	0.010
1- 6	0.030	4- 10	0.010
1- 7	0.030	4- 11	0.010
1- 8	0.020	4- 12	0.010
1- 9	0.010	4- 16	0.010
1- 10	0.010	5- 5	0.030
1- 11	0.010	5- 7	0.040
1- 12	0.010	5- 8	0.020
1- 15	0.010	5- 10	0.010
2- 4	0.020	5- 11	0.010
2- 5	0.020	6- 6	0.010
2- 7	0.020	6- 7	0.020
2- 10	0.010	6- 9	0.010
2- 11	0.010	6- 10	0.010
3- 4	0.020	7- 7	0.010
3- 5	0.020	7- 8	0.020
3- 6	0.010	7- 9	0.010
3- 7	0.020	7- 10	0.010
3- 8	0.010	7- 12	0.010
3- 12	0.010	8- 11	0.010
4- 4	0.030		
合计 Total			1.000

表 3 江浙沪地区南方汉族人 D17S30 基因型分布 (n= 110)

The genotype distribution of D17S30 locus in Jiangsu-Zhejiang-Shanghai southern Hans (n= 110)

基因型 genotype	频率 frequency	基因型 genotype	频率 frequency	基因型 genotype	频率 frequency
1- 1	0. 009	3- 3	0. 009	5- 6	0. 036
1- 2	0. 009	3- 4	0. 036	5- 7	0. 018
1- 3	0. 018	3- 5	0. 018	5- 8	0. 009
1- 4	0. 055	3- 6	0. 018	5- 9	0. 009
1- 5	0. 036	3- 7	0. 009	5- 10	0. 018
1- 6	0. 027	3- 10	0. 009	5- 11	0. 009
1- 7	0. 018	3- 11	0. 009	5- 18	0. 009
1- 8	0. 009	3- 12	0. 009	6- 6	0. 018
1- 10	0. 009	3- 13	0. 009	6- 7	0. 018
1- 12	0. 009	4- 4	0. 064	6- 10	0. 018
1- 15	0. 009	4- 5	0. 064	6- 11	0. 009
2- 3	0. 009	4- 6	0. 064	6- 12	0. 009
2- 4	0. 027	4- 7	0. 036	7- 7	0. 009
2- 5	0. 018	4- 8	0. 009	7- 8	0. 009
2- 6	0. 018	4- 9	0. 009	7- 10	0. 009
2- 7	0. 009	4- 10	0. 027	7- 11	0. 009
2- 8	0. 009	4- 11	0. 027	7- 12	0. 009
2- 9	0. 009	4- 12	0. 009		
2- 10	0. 009	5- 5	0. 018		
合计 Total					1. 000

表 4 哈尔滨地区北方汉族和江浙沪地区南方汉族的 D17S30 位点杂合性、多态性信息含量和个体鉴别力值

Heterozygosity, polymorphism information content, power of discrimination between Harbin northern and Jiangsu-Zhejiang-Shanghai southern Hans

	期望杂合性 expected heterozygosity	观察杂合性 observed heterozygosity	多态性信息含量 polymorphism information content	个体鉴别力 power of discrimination
哈尔滨地区北方汉族 northern Hans (n= 100)	0. 9437	0. 88	0. 86	0. 97
江浙沪地区南方汉族 Jiangsu-Zhejiang-Shanghai southern Hans (n= 110)	0. 9322	0. 88	0. 86	0. 97

哈尔滨地区北方汉族与江浙沪南方汉族相比, D17S30 基因频率总体分布无显著差异 ( $\chi^2 = 20.05$ ,  $df = 15$ ,  $P > 0.05$ ), 与云南汉族相比有显著差异 ( $\chi^2 = 24.27$ ,  $df = 13$ ,  $P < 0.05$ )。江浙沪南方汉族与云南汉族相比无显著差异 ( $\chi^2 = 23.46$ ,  $df = 15$ ,  $P > 0.05$ )。哈

尔滨市北方汉族和江浙沪南方汉族与美国白人 (Batanian *et al.*, 1990) 相比都有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨 论

VNTR 分型一般采用经典的酚-氯仿法抽提 DNA, PCR 扩增及电泳染色 3 个步骤, 分析扩增片段长度多态性, 即 Amp-FLP 技术。研究发现 (Deka *et al.*, 1992; 孙光云等, 1994; 陈林等, 1995), 由小片段等位基因和较大片段等位基因构成的 VNTR 杂合子个体在用常规的 Amp-FLP 技术分型时会出现小片段比大片段扩增效率高, 片段长度差异越大, 扩增效率差异越显著, 甚至会出现大片段等位基因漏检的情况。调整 PCR 条件不能改善这个缺陷。使用聚丙烯酰胺电泳和银染检测技术能降低大片段等位基因的漏检率。Deka 用 Southern 杂交的方法检测出常规的 Amp-FLP 漏检的 D17S30 位点含 24 或 25 个重复单元的大片段等位基因 (Deka *et al.*, 1992)。但这些技术操作复杂, 实验时间长, 不能满足常规分析所需简便、快速、准确的要求, 本文采用作者的微量快速 Amp-FLP 分型技术以检测 D17S30 位点多态性, 大小片段等位基因扩增效率几无差异。在 100 例北方汉族人和 110 例江浙沪南方汉族人中发现了 2 个新的等位基因 A15 和 A18, 北方汉族和江浙沪南方汉族人群样本观察杂合性均为 0.88。结果提示, 本文采用的这种微量快速的 Amp-FLP 技术可作为 D17S30 乃至其他 VNTR 位点的一种常规分型技术而加以推广。

北方汉族与云南汉族相比, D17S30 基因频率总体分布有显著差异, 但江浙沪汉族与北方汉族及云南汉族相比, D17S30 基因频率总体分布并无显著差异, 这可能是由于江浙沪汉族处于中华民族南北两大群体交界线——北纬 30 线周围 (陈仁彪等, 1993), 人群组成较为混杂, 比云南汉族更接近北方汉族的缘故。A1 和 A7 的基因频率呈北高南低分布, A4 基因频率则呈南高北低分布, 提示南北汉族之间有分化。

本文研究结果再次证实: 在不同地区、不同种族人群中, D17S30 位点大多以等位基因 A1 或 A4 的频率为最高, 小片段等位基因 ( $< 700\text{bp}$ ) 频率比大片段等位基因频率为高, 这些共有的高频率等位基因很可能是人类进化过程中较为古老的基因 (Deka *et al.*, 1992)。

综上所述, 采用微量、快速 Amp-FLP 技术分析 D17S30 位点多态性, 具有较高灵敏度, 完全可以推广应用于人类学民族演变、法医学亲子鉴定和个体识别、遗传病基因连锁分析等研究领域。

### 参 考 文 献

- 孙光云, 陈林, 吴梅筠. 1994. 用 PCR 扩增分析中国汉族人 D1S80 位点的遗传多态性. 中华医学遗传学杂志, 11 (3): 148-152.
- 陈仁彪, 叶根跃, 庚镇城等. 1993. 我国大陆主要少数民族 HLA 多态性聚类分析和频率分布对中华民族起源的启示. 遗传学报, 20 (5): 389-398.
- 陈林, 孙光云, 吴梅筠. 1995. 用 PCR 法分析中国汉族群体 D17S30 位点遗传多态性. 中华医学遗传学杂志, 12 (2): 85-88.

欧炯文, 邹浪萍, 李建京等. 1997. 云南汉族人群 D17S30 位点扩增片段长度多态性. 遗传, 19 (2): 11-14.

Batanian JR, Ledbetter SA, Wolff RK *et al.* 1990. Rapid diagnosis of Miller - Dieker syndrome and isolated lissencephaly sequence by the polymerase chain reaction. Hum Genet, 85: 555-559.

- Deka R, Croo SD, Yu LM *et al.* 1992. Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (yinz22) in four ethnically defined human populations. *Hum Genet*, 90: 86– 90.
- Fisher RA. 1951 Standard calculations for evaluating a blood group system. *Heredity*, 5: 95– 102
- Horn GT, Richards B, Klinger KW. 1989. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 17: 2140
- Nei M, Roychoudhury AK. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379– 390.

## DISTRIBUTION OF D17S30 LOCUS POLYMORPHISM OF CHINESE HANS FROM JIANGSU-ZHEJIANG-SHANGHAI AND HARBIN

Feng Zhe Feng Mingliang Ji Yuehua Zhang Yanzheng  
Yang Ying Lu Qiong Zhang Gongliang

(*Immunogenetics Laboratory, Shanghai Institute of Blood Transfusion,  
Shanghai Blood Center, Shanghai 200051*)

Du Qingtian

(*Heilongjiang Provincial No.1 Hospital, Harbin 150006*)

Chen Renbiao

(*Department of Biology and Department of Medical Genetics,  
Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025*)

### Abstract

D17S30 is a highly polymorphic variable number of tandem repeats (VNTR) locus with repeat unit being a segment of 70bp, which is located on human chromosome 17p13.3. Using a miniature and rapid amplified fragment length polymorphism (Amp-FLP) technique reported by this paper's authors, we typed the D17S30 loci in 100 northern Chinese Hans from Harbin and 110 southern Chinese Hans from Jiangsu-Zhejiang-Shanghai areas, and discovered that there is no significant difference of D17S30 allele frequencies between northern and southern Hans with A<sup>1</sup> and A<sup>7</sup> having frequencies higher in northerners and lower in southerners, and with A<sup>4</sup> vice versa suggesting differentiation between northern and southern Chinese Hans. The observed heterozygosity, power of discrimination and polymorphism information content of the D17S30 locus are 0.88, 0.97 and 0.86 respectively for both northern and southern Hans. The results obtained indicate that analysis of D17S30 locus polymorphism with the miniature and rapid Amp-FLP technique has higher sensitivity and accuracy and can be used as an efficient genetic markers in the studies of ethnic evolution, individual recognition and paternity test in forensic diagnosis, and linkage analysis of genetic disease genes.