

• 调查报告 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.33.031

贵州省 3 个少数民族线粒体 DNA 9 bp 序列缺失频率的分析研究*

国学红,何燕[△],张旺德,王婵娟,张婷,官志忠

(地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室/贵州医科大学分子生物学重点实验室,贵阳 550004)

[摘要] **目的** 探讨贵州省 3 个少数民族线粒体 DNA(mtDNA)9 bp 序列缺失频率情况。**方法** 随机选取贵州省雷山县苗族(69 例)、荔波县布依族(70 例)、荔波县水族(44 例)共 183 例男性血液标本,应用 PCR 及直接测序检测线粒体 DNA 9 bp 序列缺失情况。**结果** 在贵州省 3 个少数民族样本中发现标准型、缺失型、3 型,缺失频率最高为荔波县水族(40.91%),雷山县苗族中检出 3 型 1 例,3 个少数民族群体间 mtDNA 9 bp 缺失频率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 3 个世居少数民族 mtDNA 9 bp 缺失频率不同,水族的遗传变异较大,水族与苗族的亲缘关系相比水族与布依族较近。

[关键词] 贵州;布依族;水族;苗族;mtDNA

[中图法分类号] Q987

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)33-4702-03

Study on frequency of 9 bp sequence deletion of mitochondrial DNA in three ethnic nationalities of Guizhou Province*

Guo Xuehong, He Yan[△], Zhang Wangde, Wang Chanjuan, Zhang Ting, Guan Zhizhong

(Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education/Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To study the frequency of 9 bp sequence deletion of mitochondrial DNA in three ethnic nationalities of Guizhou Province. **Methods** A total of 183 male blood samples were randomly extracted from Miao nationality (69 cases) in Leishan County, Shui nationality (44 cases) and Buyi nationality (70 cases) in Libo County. Polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing were used to detect the mitochondrial DNA 9 bp sequence deletion. **Results** The standard type, deleting type and 3 type were found in the samples of 3 ethnic nationalities in Guizhou Province, the highest deletion frequency was Shui nationality (40.91%) in Libo County, 1 cases of 3 type was detected in Miao nationality of Leishan County, and the mtDNA 9 bp deletion frequency had no statistical difference among 3 ethnic nationalities ($P>0.05$). **Conclusion** The frequency of mtDNA 9 bp deletion is different among three native minorities, the genetic variation in Shui nationality is larger, compared with Miao nationality genetic relationship, Shui nationality has a relatively closer affinity with Buyi nationality.

[Key words] Guizhou; Buyi nationality; Shui nationality; Miao nationality; mtDNA

近年来,国内外学者利用分子生物学技术对线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 9 bp 序列缺失标记做了一系列研究,结果发现该遗传标记有助于了解人群的亲缘关系和迁徙路线。mtDNA 9 bp 序列缺失是指位于 mtDNA CO II /tRNA^{Lys} 基因间小非编码区 Region V 的 2 个串联重复序列随机发生一个拷贝序列丢失的现象,可能与 DNA 复制过程中滑链错配有关,致使该区域核苷酸长度发生变化,最终形成 4 种多态:标准序列为 2 个串联重复的 9 bp 序列,长型为标准序列前加 4 个 CCCC,缺失型为 1 拷贝 9 bp 序列,3 型为 3 个重复拷贝 9 bp 序列^[1]。缺失型是一种最常见的多态,在不同人群中分布比例不同。研究表明,mtDNA 9 bp 序列缺失具有多重源性,在亚洲人、非洲人、欧洲人等均发现了 mtDNA 9 bp 序列缺失现象^[2]。本文旨在通过对贵州省雷山县苗族、荔波县布依族、荔波县水族的 mtDNA 9 bp 序列缺失频率分布情况进行研究,并结合已报道的其他民族群体来分析该地区人群的母系遗传结构特点,为相关的民族群体的起源和迁徙路线提供遗传学数据。

1 资料与方法

1.1 标本采集 根据知情同意原则,随机选取贵州省雷山县苗族(69 例)、荔波县布依族(70 例)、荔波县水族(44 例)共 183

例男性血液标本,采血对象均 3 代内无族外通婚,彼此之间无直系亲缘关系,每人取 2 mL 静脉血,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝。

1.2 试剂 本试验所用试剂均为国产分析纯。血液基因组提取试剂盒、2×PCR Master Mix、96 孔 PCR 反应板等购自北京天跟生化科技有限公司。PCR 扩增引物合成和 DNA 序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3 仪器 2720 Thermal Cycler PCR 仪(美国 ABI 公司)扩增目的基因片段,DU-640 核酸蛋白分析仪(美国 Beckman 公司)检测核酸的纯度和浓度。电泳仪 DYY-6C(北京六一仪器厂)和凝胶显像仪(英国 Syngene 公司,G:BOX)用来分辨 DNA 片段长度大小。

1.4 方法

1.4.1 模板 DNA 提取 外周血提取试剂盒提取基因组 DNA,每个 DNA 样本取 2 μL 加入 48 μL 无菌双蒸水进行 25 倍稀释,紫外分光光度计进行核酸定量,由 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 计算出 DNA 母液的浓度和纯度,取少量的 DNA 进行模板标化至 30 μL,标化浓度为 30 ng/μL 作为 PCR 的模板,于 -20 °C 保存。

1.4.2 mtDNA 9 bp 的 PCR 扩增 根据文献设计 PCR 引物序列,上游引物:5'-GCC CGT ATT ACC CTA TA-3',下游引

* 基金项目:贵州省“2011 协同创新中心”项目(黔教合协同创新中心[2014]06 号);贵州省科技厅基金资助项目(黔科合 J 字[2011]2119 号)。
作者简介:国学红(1981—),在读硕士,主要从事疾病分子生物学研究。△ 通信作者,E-mail:annieheyan@gmc.edu.cn。

物:5'-GTA AAG AGG TGT TGG TTC-3'。PCR 总反应体系为 20 μ L, 无菌双蒸水 11.0 μ L, 2 \times PCR master mix 6.0 μ L, 上下游引物各 1 μ L, DNA 模版 1 μ L。PCR 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 终止。PCR 产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色, 电压 120 V, 时间 80 min。结果发现标准型、缺失型、3 型, 与之相对应的 PCR 产物片段长度为 121、112、130 bp。

1.4.3 mtDNA 9 bp 的 PCR 产物测序 随机选取标准型、缺失型、3 型 PCR 扩增产物各 6 例交由上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定, 测序结果与 mtDNA 修订的剑桥标准序列进行比对。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行处理。计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基本情况 贵州 3 个少数民族群体 mtDNA 9 bp 发现 3 种基因型: 标准型、缺失型、3 型, 见图 1。本次研究的 3 个少数民族群体标准频率依次为 66.67%、75.71%、59.09%, 缺失频率依次为 31.88%、24.29%、40.91%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 仅在苗族中发现 3 型, 频率为 1.45%。

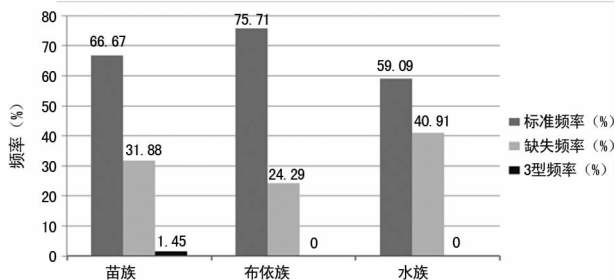
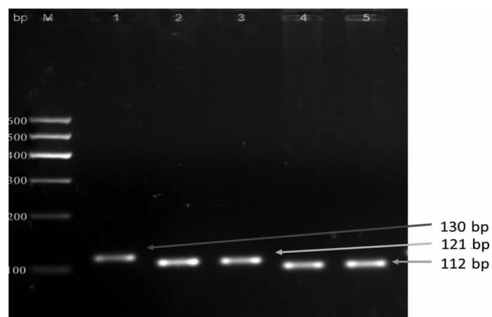


图 1 贵州 3 个少数民族 mtDNA 9 bp 3 种基因型频率的分布

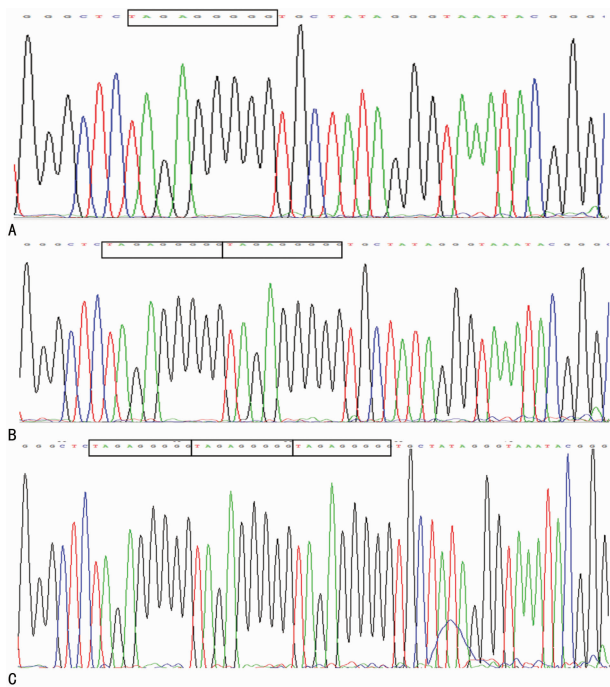
2.2 mtDNA 9 bp PCR 产物电泳图谱 在 PCR 检测中未发现非特异扩增, 183 例受检者的电泳图谱发现标准型 125 例, 缺失型 57 例, 3 型 1 例, 见图 2。被检测的贵州 3 个少数民族群体样本数依次为苗族 69 例、布依族 70 例、水族 44 例 mtDNA 9 bp 缺失个数分别为 22、17、18 个。



M: DNA 标准分子量参照物; 1: 3 型扩增产物; 2, 3: 标准型扩增产物; 4, 5: 缺失型扩增产物

图 2 mtDNA 9 bp PCR 产物电泳结果

2.3 序列测定结果 检测的 6 例标准型 PCR 扩增产物的核苷酸序列与 mtDNA COII / tRNALys 基因区的小非编码区的剑桥序列一致, 存在 2 个重复拷贝的 9 bp 序列, 5 例缺失型 1 拷贝 9 bp 序列和 1 例 3 型 3 个拷贝的 9 bp 序列。见图 3。



A: 缺失型; B: 标准型; C: 3 型

图 3 mtDNA 9 bp 序列分析结果

3 讨 论

人类 mtDNA 9 bp 序列缺失标记由于具有母系遗传特点, 能够忠实地记录母系进化历史, 因此对于研究人类的起源、迁徙、亲缘关系等具有重要价值。有研究通过对伊朗人群的 mtDNA 9 bp 序列缺失频率的分析^[3], 提示该人群的母系遗传结构与巴基斯坦人群、新几内亚人群较为相近, 而与我国人群 32%、中国台湾人群 18%~40% 的母系遗传结构差异较大 ($P < 0.05$)^[4-5]。mtDNA 9 bp 缺失频率分布所呈现的地理趋势能够较好地描述出史前该地区人类的迁徙路线。姚永刚等^[6]对国内多个地区的少数民族和汉族群体的 mtDNA 9 bp 缺失频率进行研究, 发现南方人群的遗传多态性高于北方人群, 沿海人群高于内陆人群, 提示自我国的南方进入, 随后由南向北迁徙, 这与柯越海等^[7]得出中华民族南方起源的结论是相符的。于恩艳等^[8]对我国新疆塔吉克族和柯尔克孜族人群 mtDNA 9 bp 多态分析发现, 塔吉克族 1.43%、柯尔克孜族 2.86% 与维吾尔族 3.3%、高加索人群 mtDNA 9 bp 缺失频率较近; 这与严江伟等^[9]通过对新疆喀什地区维吾尔族 mtDNA D 环高变 I 区序列研究得出维吾尔族人群与高加索人群基因发生了融合结论相一致。本次研究的贵州 3 个世居少数民族为不同原始部落起源的民族群体, 苗族是一个有着悠久历史的并且发源于我国的国际性民族, 水族、布依族起源于古代百越。研究发现, 地理位置相近的苗族与百越起源的布依族、水族的 mtDNA 9 bp 缺失频率分布不同, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其中布依族的 mtDNA 9 bp 缺失频率最小, 苗族次之, 水族的 mtDNA 9 bp 缺失频率最高, 提示苗族的母系遗传结构变异小于水族和布依族。

国内外学者通过对不同地域、不同民族的 mtDNA 9 bp 缺失频率分布状况进行分析, 结果显示其分布具有明显的地域特异性和种族差异性。不同民族起源的民族群体 mtDNA 9 bp 缺失频率分布情况表现不一。本次研究的 3 个世居少数民族群体 mtDNA 9 bp 缺失频率均高于北方民族起源的新疆蒙古族 4.0%、朝鲜族 9.43%、藏族 5.52%^[6, 10-11], 差异有统计学意义。

义($P < 0.05$);这符合起源于百越、苗瑶支系的民族群体 mtDNA 9 bp 缺失频率高于北方民族起源的民族群体的结论。荔波水族人群 mtDNA 9 bp 缺失频率与中国台湾高山族 41.46%、汉族 40% 相近^[12-13],提示亲缘关系较近。笔者分析可能的原因有,高山族来源是多源性的,但主要是来自我国大陆东南沿海的古越的一支,因此与同为古越起源的水族有着相似的遗传结构;另一个原因为汉族与高山族混杂居住,民族间基因发生了交流。同一民族起源的不同民族群体 mtDNA 9 bp 缺失频率分布情况也是不同的,本研究的荔波布依族的 mtDNA 9 bp 缺失频率与广西壮族 20.83% 相近^[14],与荔波水族的缺失频率相比差异较大,提示该人群与广西壮族的亲缘关系较近,与荔波水族的亲缘关系较远。究其原因可能是这些具有共同史载起源的民族群体在迁徙过程中与其他民族基因融合的概率不同,也有可能群体间本身就存在遗传结构差异。

本课题组前期对贵州多个世居少数民族人群的 mtDNA 9 bp 的遗传多态性进行研究,结果均未发现 3 拷贝 9 bp 序列,而本次研究在雷山苗族人群中发现。3 拷贝 9 bp 序列在国内外均有报道,研究发现伊朗人群^[3]的 3 个 9 bp 拷贝的重复频率很低并且分布分散,与我国的内蒙古蒙古族、广东汉族、辽宁汉族、武汉汉族、云南汉族、新疆维吾尔族人群接近^[6,15],与葡萄牙人群相比要低,提示这种长度变异的起源在伊朗人群与我国人群中可能是各自独立起源,在葡萄牙人群中可能是共同起源。

综上所述,研究 mtDNA 9 bp 的遗传多态性标记,不仅有助于了解不同民族群体的母系遗传结构,而且为研究人类的起源、迁徙路线、亲缘关系提供了一定的遗传背景资料。

参考文献

- [1] 任凌雁,何燕,张婷,等. 贵州 3 个地域苗族人群 mtDNA 9 bp 序列缺失频率[J]. 重庆医学, 2013, 42(22): 2586-2587.
- [2] 李琦,谷志远,赵亚力. 北京地区汉族人群线粒体 DNA 9bp 序列缺失频率检测[J]. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17(2): 141-142.
- [3] Alemohammad SA, Farhud DD, Hooshmand M, et al. Distribution of Mitochondrial DNA Intergenic COII/tRNALYS 9 bp Deletion in Iranian Populations[J]. Iran J Public Health, 2003, 32(2): 1-5.
- [4] Yao G, Watkins S, Zhang P. 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.

- [5] Fucharoen G, Fucharoen S, Horai S. Mitochondrial DNA polymorphisms in Thailand[J]. J Hum Genet, 2001, 46(3): 115-125.
- [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): 343-359.
- [7] 柯越海,宿兵,肖君华,等. Y 染色体单倍型在中国汉族人群中多态性分布与中国人群的起源及迁移[J]. 中国科学, 2000, 30(6): 614-620.
- [8] 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.
- [9] 严江伟,唐晖,高俊薇,等. 中国新疆喀什维吾尔族群体 mtDNA D 环区多态性[J]. 中国法医学杂志, 2003, 18(1): 39-39.
- [10] 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): 124-126, 129.
- [11] 刘永,温有锋,席焕久. 西藏藏族 mtDNA CO II /tRNA-(Lys)基因间区 9 bp 缺失多态性[J]. 武警医学, 2007, 18(2): 100-103.
- [12] 任凌雁,何燕,王婵娟,等. 贵州 6 个少数民族线粒体 DNA 9bp 序列缺失频率研究[J]. 生物技术, 2012, 22(5): 51-54.
- [13] 任凌雁,何燕,张婷,等. 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[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2013, 52(4): 121-124.
- [14] 季米娜,胡启平,窦霄云,等. 广西壮族线粒体 DNA 9-bp 缺失频率的分析[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(1): 38-39.
- [15] Alves-Silva J, Guimarães E, Rocha J, et al. Identification in Portugal and Brazil of a mtDNA lineage containing a 9-bp triplication of the intergenic COII/tRNALys region [J]. Hum Hered, 1999, 49(1): 56-58.

(收稿日期:2017-05-06 修回日期:2017-08-04)

(上接第 4701 页)

- [8] 于青青,王跃建,唐隽,等. 佛山市禅城区小学生变应性疾病的流行病学调查分析[J]. 中国医药科学, 2016, 6(13): 40-44.
- [9] 王媛,曹春婷,漆可,等. 北京市中小学生变应性鼻炎患病率调查[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2015, 22(9): 465-469.
- [10] 罗嘉莹,郭欣瑜,陈涓涓,等. 学龄前儿童支气管哮喘合并变应性鼻炎的环境因素调查[J]. 广东医学, 2015, 36(21): 3381-3384.

- [11] Batllés-Garrido J, Torres-Borrego J, Rubí-Ruiz T, et al. Prevalence and factors linked to atopy in 10- and 11-year-old children in Almería, Spain[J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2010, 38(1): 13-19.
- [12] Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(3): 466-476.

(收稿日期:2017-05-08 修回日期:2017-08-06)