

中国 6 个群体线粒体 DNA Region V 的缺失多态性

孙宏钰, 黄艳梅, 伍新尧, 陆惠玲, 蔡贵庆, 陈丽娴
(中山大学法医物证学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究中国广东地区汉族、华东地区汉族、内蒙古汉族、云南白族、内蒙古蒙古族、新疆维吾尔族等 6 个群体在线粒体 DNA Region V 的多态性。【方法】PCR 扩增后采用变性高效液相色谱技术分离片段, 检测线粒体 DNA Region V 9 bp 缺失的频率。【结果】在中国 6 个群体中发现标准型、缺失型和 3 型 3 种多态类型, 9 bp 缺失频率在 6 个群体分别为 21.4%、18.0%、14.0%、16.9%、7.0%、10.4%。【结论】中国 6 个群体在线粒体 DNA Region V 均存在 9 bp 缺失的多态性, 6 个群体间的缺失频率存在差异。

关键词: 线粒体 DNA; 遗传多态性; 缺失

中图分类号: Q987

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)04-0308-03

Polymorphism of Deletion in Mitochondrial DNA Region V Among 6 Populations in China

SUN Hong-yu, HUANG Yan-mei, WU Xin-yao, LU Hui-ling, CAI Gui-qing, CHEN Li-xian
(Department of Forensic Biology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the polymorphism of mitochondrial DNA Region V among Guangdong Han, East China Han, Neimenggu Han, Yunnan Bai, Menggu, Weiwuer populations. 【Methods】Denaturing high-performance liquid chromatography was used to analyze PCR products of mtDNA Region V. 【Results】Three types of amplicon fragments were observed in 6 populations, including standard type, deletion type, and 3-repeat type. The frequencies of 9 bp deletion among 6 populations were 21.4%, 18.0%, 14.0%, 16.9%, 7.0%, and 10.4% respectively. 【Conclusion】The 9 bp deletion in mtDNA Region V is discovered in all 6 populations and there is difference among the frequencies of 9 bp deletion of 6 populations.

Key words: mitochondrial DNA; genetic polymorphism; deletion

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(4): 308-310, 314]

人类线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 位于细胞质的线粒体中, 是细胞核外唯一存在的 DNA。它由 16 569 个碱基对组成, 呈双链环状。由于其不发生遗传重组和具有碱基的高突变频率, 对群体遗传学、分子进化、法医学、考古学研究都具有重要的意义。1981 年, Anderson 等^[1]发现 mtDNA COII/tRNA^{Lys} 基因间的非编码区 V 含有 2 个 9 bp 串联重复序列 (CCCCCTCTA), 之后的研究表明该区可以由于 9 bp 重复序列中 1 个拷贝的缺失而产生长度的变化^[2,3]。近年来的研究表明, 不同地域人群 mtDNA 9 bp 缺失频率有很大差别, 是检测人类

群体多态性的主要指标^[4,5]。本研究运用变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC) 技术, 对广东地区汉族、华东地区汉族、内蒙古汉族、云南白族、蒙古族、新疆维吾尔族等 6 个群体 mtDNA V 区 9 bp 缺失频率进行了检测。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 样本来源

广东地区汉族无关个体的血痕样本由本教研

收稿日期: 2003-09-26

基金项目: “211”工程科研基金资助项目 (中山医科大学 98022)

作者简介: 孙宏钰 (1972-), 女, 贵州清镇人, 在职博士生, 讲师; 伍新尧, 教授, 导师, 通讯作者. E-mail: xyaw@gzsums.edu.cn

室日常检案筛选获得;华东地区汉族无关个体血痕样本由司法部司法鉴定科学研究所(上海市)提供;内蒙古汉族、蒙古族无关个体血痕标本采自内蒙古呼伦贝尔盟;新疆维吾尔族无关个体血痕样本采自新疆喀什地区;云南白族无关个体血痕样本采自云南大理地区。

1.2 DNA 提取

采用 Chelex-100 快速提取法提取基因组 DNA^[6]。

1.3 PCR 扩增

采用 Wrishnik 等^[3]报道的引物:MT8195 5' ACAGTTTCATGCCCATCGTC3'; MT8315 5' ATGCTAAGTTAGCTTTACAG3'。反应体系为 10 μ L, 内含 1 \times PCR Buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1.25 mmol/L dNTP, 0.1 U Taq DNA 聚合酶 (Biostar, Canada), 0.1 μ mol/L 每种引物以及 1~10 ng 模板 DNA。PCR 热循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 62 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 DHPCC 分析

将 PCR 产物直接放入 WAVETM 核苷酸片段分析系统 (Transgenomic 公司, 美国) 的 96 孔板上, 选择 "Double Stranded-Multiple Fragments" 模式, 柱温设为 50 $^{\circ}$ C, 进样 5 μ L PCR 产物, 于 DNASep[®] 分离柱 (Transgenomic 公司, 美国) 用缓冲液 A (0.1 M TEAA 溶液) 和缓冲液 B (0.1 M TEAA, 25% acetonitrile) 梯度洗脱, 起始梯度为 45% B, 终止梯度为 65% B, 流速为 0.9 mL/min, 从分离柱洗脱的 DNA 溶液用紫外检测仪检测 A₂₆₀ 波长的吸收峰。采用 WaveMaker[®] 4.1 软件对洗脱图谱进行分析。

1.5 扩增产物的测序

随机挑选变性高效液相色谱洗脱图谱不同的样品, 采用 BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready 试剂盒 (PE 公司, 美国) 进行序列测定。

1.6 数据分析

直接计数各种分型, 采用 SAS 软件 (SAS Institute Inc.) 作差异显著性检验 (Fisher's exact test)。

2 结果

2.1 线粒体 DNA Region V 9 bp 缺失的 DH-PCC 洗脱图谱

采用 DHPCC 技术分析, 以洗脱时间为指标,

得到 3 种类型的洗脱图谱 (图 1)。

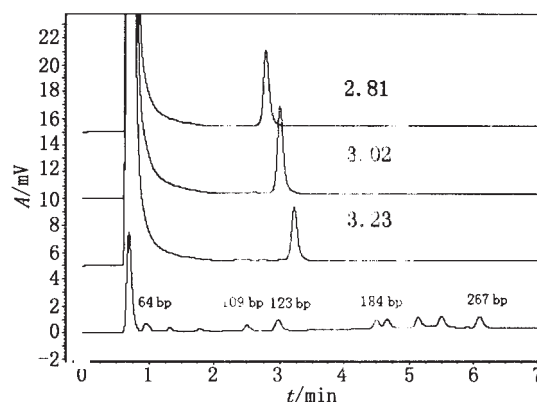


图 1 线粒体 DNA Region V 的 3 种多态性的 DHPLC 洗脱图谱

Fig. 1 Elution profiles of DHPLC of 3 kinds of polymorphisms in mtDNA region V

From up to below: sample D 1; sample D 2; sample D 3; pBR322 DNA/HaeIII markers; x-axis stands for the elution time; y-axis stands for the intensity of absorbance

2.2 序列测定结果

3 种洗脱图谱所对应的样本的序列测定结果证实: 3 种多态类型的片段长度分别为 112 bp、121 bp 和 130 bp。其中 121 bp 的样本的序列与 Anderson 序列一致, 存在 2 个拷贝的 9 bp (CCCCCTCTA) 重复序列; 112 bp 的样本的序列只有 1 个 9 bp 重复序列, 缺失了 1 个拷贝; 130 bp 的 PCR 产物则存在 3 个拷贝的 9 bp 重复序列。

D1 (112 bp): ACAGTTTCATGCCCATCGTCAGAAATTAATTCCTTAAAAAATCTTGAATAGGGCCCGT
TAITTTACCCCTATAGCACCCCTCTAGAGCCCACTGTAAGCTAACTTAGCAT
D2 (121 bp): ACAGTTTCATGCCCATCGTCAGAAATTAATTCCTTAAAAAATCTTGAATAGGGCCCGT
ATTTACCCCTATAGCACCCCTCTAGAGCCCACTGTAAGCTAACTTAGCAT
D3 (130 bp): ACAGTTTCATGCCCATCTCCAGAAATTAATTCCTTAAAAAATCTTGAATAGGGCCCGT
ATTTACCCCTATAGCACCCCTCTAGCCCTCTAGAGCCCACTGTAAGCTAACTTAGCAT

2.3 6 个群体 mtDNA 9 bp 缺失多态性

6 个群体 mtDNA 9 bp 缺失多态性的分布情况见表 1, 6 个群体 mtDNA 9 bp 缺失多态性分布的比较见表 2。

3 讨论

线粒体 DNA 9 bp 缺失在人类学研究上是一个非常价值的多态性位点, 已报道共有 4 种多态^[7]: ①标准型: 即有 2 个串联重复的 9 bp 序列 (CCCCCTCTA), 位于 mtDNA 第 8 272 ~ 8 289 位核苷酸; ②缺失型: 仅有单拷贝 9 bp

表 1 中国 6 个群体 mtDNA Region V 9 bp 缺失多态性的分布情况

Table 1 Polymorphism of mtDNA region V 9 bp deletion among 6 Chinese populations (%)

Population	<i>n</i>	1 copy 9 bp (112 bp)	2 copies 9 bp (121 bp)	3 copies 9 bp (130 bp)
Guangdong Han	212	21.4	78.1	0.5
East China Han	100	18.0	82.0	0
Neimeng Han	100	14.0	86.0	0
Bai (Yunnan)	106	16.9	83.1	0
Meng Gu (Neimeng)	100	7.0	93.0	1.0
Weiwuer (Xinjiang)	106	10.4	89.6	0

重复,即 9 bp 缺失;③ 3 型:有 3 拷贝 9 bp 重复;④ 长型:标准序列前加入 4 个 C。长型在东亚及东亚起源的人群未见报道,3 型仅有少量发现,缺失型在不同人群中出现的比例不同。曾经认为缺失是亚洲人及起源于亚洲的人种的特征,但后来的研究表明该缺失在非洲人、欧洲人和澳洲人中同样存在。在现今亚太地区及太平洋岛屿沿线人群中的缺失频率呈现地理趋势,且与史前该地区人类迁移路线相符^[8-11]。Yao 等人^[11]对中国 25 个群体的缺失频率研究结果显示总体上南方高、北方低的递减分布趋势,从此角度进一步支持了中华民族南方起源的

表 2 中国 6 个群体 mtDNA 9 bp 缺失多态性分布的两两比较

Table 2 Pairwise comparison of the polymorphism of mtDNA region V in 6 Chinese populations (*P* value)

	Guangdong Han	East China Han	Neimeng Han	Bai	Menggu	Weiwuer
Guangdong Han	-	0.625 3	0.197 2	0.603 7	0.006 4 ¹⁾	0.070 7 ¹⁾
East China Han	-	-	0.439 9	0.988 7	0.040 5 ¹⁾	0.174 4
Neimeng Han	-	-	-	0.174 4	0.170 7	0.562 8
Bai	-	-	-	-	0.038 6 ¹⁾	0.173 6
Menggu	-	-	-	-	-	0.338 9

Comparising between populations using Fisher's Exact test, 1): *P* < 0.05

观点。本研究获得的 6 个群体缺失资料与前面的研究结果接近,6 个群体间缺失频率存在差异,同时在广东汉族和蒙古族群体中观察到较少频率的 3 拷贝 9 bp 型。

变性高效液相色谱是近年来出现的一种核苷酸分析技术,利用离子对反向液相色谱的原理,通过独特的 DNA 分离基质,在特定的反应温度下对目的片段的 PCR 产物进行分离检测。在柱温 50 °C 条件下,长的 DNA 片段比短片段有更多的磷酸基通过三乙基醋酸(riethylammonium acetate, TEAA)与柱基质结合,因此长片段 DNA 与柱子的结合更牢固。随着洗脱液中乙腈浓度增加, DNA 片段从小到大依次被洗脱下来。使用已知大小的 DNA 片段作为对照,可分离长度相差 1% 的片段。运用这种方法进行 DNA 片段大小检测, PCR 产物扩增后不需特殊处理,不需凝胶电泳,直接通过 DHPLC 检测,操作简便经济。同时,该区段扩增片段很短,对于法医实践中腐败降解检材的检验也会很有优势,可作为筛选方法,提高 mtDNA 分析的效率。

参考文献:

[1] Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, *et al.* Sequence

and organization of the human mitochondrial genome[J]. *Nature*, 1981, 290(9): 457-65.

- [2] Cann R L, Wilson A C. Length mutations in human mitochondrial DNA[J]. *Genetics*, 1983, 104(4): 699 - 711.
- [3] Wrischnik L A, Higuchi R G, Stoneking M, *et al.* Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(2): 529-42.
- [4] Soodyall H, Vigilant L, Hill A V, *et al.* mtDNA control-region sequence variation suggests multiple independent origin of an "Asian-Specific" 9-bp deletion in Sub-Saharan Africans[J]. *Am J Hum Genet*, 1996, 58(3): 595-608.
- [5] Chen Y S, Torroni A, Excoffier L, *et al.* Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups[J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57(1): 133-49.
- [6] 孙宏钰, 吕德坚, 曾艳红, 等. 荧光标记 STR 复合扩增技术用于造血干细胞移植植入存活检定研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2003, 26(3): 169-71.
- [7] 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*

(下转第 314 页 to page 314)

大量 $A\beta_{1-40}$ 免疫阳性反应物质。我们的实验虽然没有证实此点,但是观察到的激活状态的星形胶质细胞可能也是为了吞噬 $A\beta_{1-40}$ 的一个正常反应,也和 Matsunaga 等观点相一致^[11]。

小胶质细胞是中枢神经系统中具有免疫活性的细胞,在中枢神经系统的免疫调节过程中发挥核心作用。小胶质细胞的形态和功能具有可塑性,在静止状态为分枝状,病理状态下或损伤刺激后细胞体积增大,突起增多,成为高度分化的小胶质细胞。高度分化的小胶质细胞是介于静止与激活之间的一种中间状态,他们很快演变为激活的小胶质细胞和脑巨噬细胞^[12]。在 AD 患者,成熟的老年斑周围有着大量的小胶质细胞聚集。在本实验中,也可以看到 $A\beta_{1-40}$ 注射组有很多活化的小胶质细胞分布于大脑白质中,此激活状态的小胶质细胞可能也是为了吞噬进入脑实质的 $A\beta_{1-40}$ 。本实验中,注入血液中的 $A\beta_{1-40}$ 不可能直接作用于位于脑实质内的小胶质细胞,必须透过 BBB 与小胶质细胞作用后才能产生作用。由此可以推测,血液循环中 $A\beta_{1-40}$ 可能对 BBB 有着毒性作用,破坏 BBB 正常结构,导致 BBB 渗透性增高,血液中的某些成份和 $A\beta_{1-40}$ 进入脑实质,进入脑实质内的 $A\beta$ 等物质可以激活小胶质细胞,从而在 AD 的发病中起到重要的作用。

参考文献:

- [1] Golde T E, Eckman C B, Younkin S G, *et al.* Biochemical detection of $A\beta$ isoform: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1502(1): 172-87.
- [2] Scheuner D, Eckman C, Jensen M, *et al.* Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease [J]. *Nature Med*, 1996, 2(8): 864-70.
- [3] 申洪. 免疫组织化学定量方法研究 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4(1): 89-91.
- [4] 盛树力, Cheng LY, 裴进京, 等. 老年性痴呆: 从分子生物学到临床诊治 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999. 232-33.
- [5] 许长庆, 钱采韵, 张宗明, 等. β -淀粉样肽对海马 CA1 区神经元的短暂性外向 K^+ 电流的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(1): 18-22.
- [6] Vehmas A K, Kawas C H, Steward W F, *et al.* Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiology of Aging*, 2003, 24(2): 321-31.
- [7] Suman Deb J, Zhang W J, Gottschall P E. β -Amyloid induces the production of active, matrix-degrading protease in cultured rat astrocytes [J]. *Brain Res*, 2003, 970(1-2): 205-13.
- [8] Cullen K M. Perivascular astrocyte within Alzheimer's disease plaques [J]. *Neuro Report*, 1997, 8(8): 1961-6.
- [9] Ghazanfari F A, Stewart R R. Characteristic of endothelial cells derived from the blood-brain barrier and of astrocytes in culture [J]. *Brain Res*, 2001, 890(1): 49-65.
- [10] Funato H, Yoshimura M, Yamazaki T, *et al.* Astrocytes containing amyloid β -positive granules are associated with $A\beta_{40}$ -positive diffuse plaques in the aged human brain [J]. *Am J Pathol*, 1998, 152(4): 983-92.
- [11] Matsunaga W, Shirokawa T, Isobe K. Specific uptake of $A\beta_{1-40}$ in rat brain occurs in astrocyte, but not in microglia [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 342(1-2): 129-31.
- [12] Banati R B, Gehrmann J, Schubert P, *et al.* Cytotoxicity of microglia [J]. *Glia*, 1993, 7(1): 111-8.

(编辑 刘清海)

(上接第 310 页 from page 310)

遗传学杂志 2002, 19(2): 138-40.

- [8] Torroni A, Petrozzi M, Santolamazza P, *et al.* About the "Asian"-specific 9-bp deletion of mtDNA [letter] [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57(2): 507-8.
- [9] Hertzberg M, Micklethorn K N, Serjeantson S W, *et al.* An Asian-specific 9-bp deletion of mitochondrial DNA is frequently found in polynesians [J]. *Am J Hum Genet*, 1989, 44(4): 504-10.
- [10] Melton T, Peterson R, Redd A J, *et al.* Polynesian ge-

netic affinities with southeast Asian populations as identified by mtDNA analysis [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57(2): 403-14.

- [11] Yao Y G, Watkins W S, Zhang Y P, *et al.* Evolutionary history of the mtDNA 9-bp deletion in Chinese population and its relevance to the pooling of East and Southeast Asia [J]. *Hum Genet*, 2000, 107(5): 504-12.

(编辑 黄小延)