

中国汉族人群 DYF155S1 位点等位基因结构研究

庾 蕾, 黄艳梅, 伍新尧

(中山大学法医系, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】为建立一种简便、实用的 DYF155S1 位点多态性分析技术提供依据。【方法】采用扩增片段长度多态性(Amp-FLP)方法,调查中国汉族人群 155 个无关男性个体 DYF155S1 位点长度的变异情况。PCR 扩增产物用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显示条带。用循环测序法对该位点的 10 个等位基因进行正向和反向序列分析。【结果】以基因组 DNA 为模板,用一对引物可同时扩增出 DYF155S1 和 DYF155S2 2 个位点的等位基因。DYF155S1 位点表现出有长度多态性,这些等位基因约 1 500~2 500 bp。DYF155S2 位点表现出有或缺失的二态现象,缺失率约为 7.1%。发现有 4 种变异的核心序列,其中 3 种与文献报道一致,被命名为 1 型、3 型和 4 型,另一种为新发现的变异核心序列,暂命名为 7 型。10 个等位基因具有相同的模块结构,在 5'端表现为 3 型-1 型-3 型排列,在 3'端则表现为 4 型-3 型排列。【结论】中国汉族人群 DYF155S1 位点 5'端序列较 3'端的多态性高。

关键词: 中国汉族人; MSY1(DYF155S1); 序列分析; 小卫星重复

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2003)01-0042-04

Study of Allele Structure of MYF155S1 Locus in Chinese Han Population

YU Lei, HUANG Yan-mei, WU Xin-yao

(Department of Forensic Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To establish a simple and useful method for polymorphism analysis of DYF155S1 locus(NSY1 locus). 【Methods】 The allele length variation of DYF155S1 locus from 155 unrelated males in Chinese Han population was studied by using amplified fragment length polymorphism (Amp-FLP) method. PCR products were detected by using 6% polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver staining. Ten alleles at DYF155S1 locus were sequenced from 5' and 3' ends by Cycle Sequencing. 【Results】 DYF155S1 and DYF155S2 loci could be amplified simultaneously from genomic DNA by using a couple of primers. The alleles at DYF155S1 locus showed length polymorphism and their sizes ranged from 1500 to 2 500 bp. While the alleles at DYF155S2 locus showed yes/no deletion polymorphism and the rate of deletion was 7.1%. Four types of variant repeats were identified, including three types, designated Type 1, 3 and 4 that reported before whereas one type, named Type 7, was a new found. Ten alleles sequenced had the same modular structure, starting with a repeat block of Type 3 followed by a block of Type 1 before the central block of Type 3 at 5'end, and starting with a repeat block of Type 4 followed by the central repeat block of Type 3 at 3'end. 【Conclusion】 The polymorphism of DYF155S1 locus at 5'end in Chinese Han population is higher than at 3'end. Our results provide the basis for analyzing the polymorphism of DYF155S1 locus.

Key words: Chinese Han; MSY1(DYF155S1); sequence analysis; minisatellites

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):42~45]

小卫星 DNA(minisatellite)是人类 DNA 多态性遗传标记中变异度很高的序列。这类多态性已

被广泛应用于各种遗传分析及法医学领域。目前常染色体小卫星位点研究较多,如 MS32(D1S8)^[1]、

收稿日期:2002-08-11

基金项目:中山医科大学“211”工程科研基金资助项目(98022)

作者简介:庾 蕾(1964-),女,安徽马鞍山人,博士生,讲师。

MS31A(D7S21)和 MS205(D16S309)等^[2,3]。Y 染色体上已报道了 2 个小卫星位点即 MSY1 (DYF155S1)^[4]和 MSY2^[5]。其中 DYF155S1 位点以其高度多态性、呈父系单倍型遗传等特点而成为突变研究及追溯人类父系发展的一个很好的遗传标记^[6]。DYF155S1 位点高度的多态性可由 MVR-PCR(minisatellite variant repeat-PCR)^[1]方法揭示。我们采用 Amp-FLP (amplified fragment length polymorphism)及序列分析方法对中国汉族人群 DYF155S1 位点等位基因结构进行了研究,为下一步寻找此类序列多态性分析的简便、实用技术提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

155 份男性无关个体血样品取自做亲子鉴定家系父亲的血样,由中山大学法医学物证教研室提供。

1.2 模板 DNA 的抽提

采用碱性裂解法抽提血样品基因组 DNA。

1.3 DYF155S1 位点等位基因扩增

1.3.1 PCR 扩增 Y1A+ 和 Y1B+ 引物序列参见文献^[4],由上海生工合成。PCR 反应体系为 20 μ L,含有人类基因组 DNA 50~100 ng,10 \times LA PCR Buffer II 2 μ L,TaKaRa LA Taq 酶 1 u,0.25 mmol/L dNTPs 及引物各 1 μ mol/L。样品混合后置 PCR 仪(Primus 96 plus,MWGAG)热循环:95 $^{\circ}$ C 1 min,66 $^{\circ}$ C 3.5 min,循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,扩增产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 PCR 产物检测 采用 60 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离 PCR 产物,银染显色。

1.4 等位基因序列分析

1.4.1 模板 DNA 准备 从低熔点琼脂糖凝胶中回收等位基因 DNA 片段。

1.4.2 序列分析 采用荧光标记 ddNTPs 的循环测序法(BigDye 试剂盒,PE)^[7],电泳、荧光信号收集及结果分析在 377 DNA 测序仪(PE 公司)上进行。

2 结果

2.1 DYF155S1 位点等位基因扩增

以基因组 DNA 为模板,用 DYF155S1 位点两翼保守区一对引物(Y1A+ 和 Y1B+)进行 PCR 扩

增,在男性个体可扩增出大、小 2 个 DNA 片段,而女性个体无任何扩增产物。其中大片段在男性群体中表现出有长度多态性。小片段则表现为有或缺失的二态现象(图 1)。共调查了中国汉族 155 个男性无关个体,扩增的大片段大小约为 1 500~2 500 bp(图 2)。155 个男性中有 11 个个体表现小片段缺失。

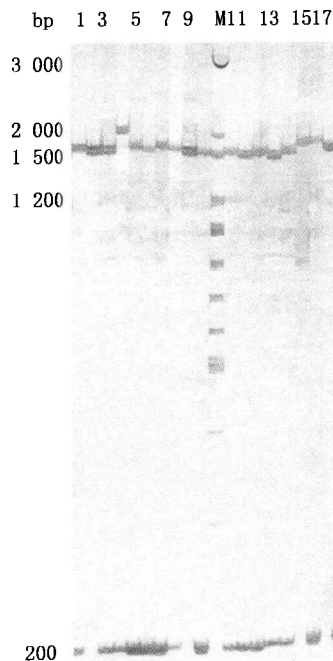


图 1 DYF155S1 位点等位基因的扩增片段

Fig.1 Amplified fragments of locus DYF155S1

M: Marker; Lane 1~18: Amplification results from genomic DNA of eighteen unrelated males; Lane 2,9,16,18 showed the small fragments lost

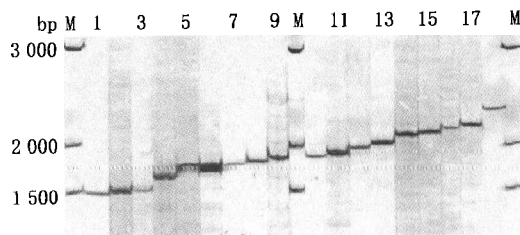


图 2 DYF155S1 位点等位基因大小

Fig.2 Allele size at locus DYF155S1

M: Marker; Lane 1~18: Alleles at locus DYF155S1

2.2 等位基因序列分析

选择 10 个等位基因的大片段及 1 个小片段的扩增产物进行正向和反向序列分析,与 GeneBank 中 DYF155S1 和 DYF155S2 位点的序列进行比较。大片段序列除在 389 nt 有 9 个等位基因为 T 碱基,1 个等位基因为 A 碱基(与 Genebank 序列一

致),其余碱基序列一致。小片段在418 nt为G碱基,其余碱基序列与Genebank DYF155S2位点序列一致,大小为230 bp。对这10个DYF155S1位点等位基因序列分析,得到从5'端及3'端开始约20个核心序列的序列(图3)。发现有4种变异的核心序列(图4),其中3种与文献^[8]报道一致,被命名为1型(type 1)、3型(type 3)和4型(type 4),另1种为新发现的变异核心序列,为1个等位基因5'端的第1个核心序列,暂命名为7型(type 7)。

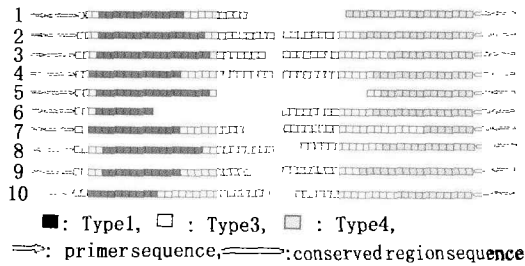


图3 DYF155S1位点等位基因结构

Fig.3 Allelic structure of locus DYF155S1

Type1	C A C A A T A T A C A T C A T G T A T A T T A T A
Type3	C A C A A T A T A C A T C A T G T A T A T T A T A
Type4	C A A A A T A T A C A T C A T G T A T A T T A T A
Type7	C A C A A T A T A C A T C A T G T A T A T T A T A

图4 4种变异的核心序列

Fig.4 Four variant repeats

3 讨论

3.1 DYF155S1位点等位基因扩增

小卫星MSY1(DYF155S1)是由大小为25 bp,重复次数为48~114的核心序列串联排列构成,与其他小卫星DNA不同,其富含AT^[4]。本文用重复序列两翼保守区的一对引物从男性个体基因组DNA中成功扩增出DYF155S1和DYF155S2 2个位点的等位基因,并经序列分析得到证实。而以女性个体的DNA为模板则无扩增产物,表明DYF155S1位点为Y染色体特异,为男性所特有。DYF155S1位点在男性个体间存在长度多态性。根据报道的核心序列大小及重复次数,可推算出其等位基因大小在1 405~3 055 bp之间。我们共调查了中国汉族155个男性无关个体,发现其等位基因大小在1 500~2 500 bp之间。表明中国汉族人群DYF155S1位点等位基因大小分布相对集中。

DYF155S2则表现为有或缺失的二态现象。Jobling等(1998年)报道用50f2(DYS7)探针检出5个Y特异的EcoR I DNA片段,其中位于Y染色体长臂(Yq)的第三大DNA片段(50f2/C)在男性个体表现出有或缺失二态现象。世界范围群体调查其缺失率约为6%,表现50f2/C缺失的主要在亚洲、澳大利亚和东、西欧群体,其中芬兰人缺失率最高,为55%^[8]。在50f2/C缺失的男性个体DYF155S2位点等位基因也表现缺失,Jobling MA认为DYF155S2位点与50f2/C位点邻近,可通过检测DYF155S2位点的缺失来推测50f2/C缺失^[4]。我们共调查了中国汉族155个男性无关个体,缺失率约为7.1%。

3.2 等位基因序列分析

我们对DYF155S1位点10个等位基因从5'端及3'端进行了序列分析。在DYF155S1位点5'端保守区389 nt发现一个多态性位点,该位点碱基为A或T。在常染色体的小卫星位点有类似发现,如MS32(D1S8)^[9],等位基因特异的MVR-PCR方法的设计即以此为基础。发现有4种变异的核心序列,表现在第3 nt、第13 nt碱基不同(图4),新发现的变异核心序列在第21 nt由T→A。从序列上看,这4种变异核心序列均以3型为基础,其他3种与其相比只有1个碱基的差异,这是否预示着新的核心序列是从3型核心序列变异而来,有待进一步证实。从图3可见,这4种变异核心序列并不是随机散在分布,而是一定数量相同的核心序列串联排列,并有一定的分布规律,在5'端表现为3型-1型-3型排列,这种排列被冠以一个名称模块结构(modular structure)^[10]。3'端与5'端不同,表现为4型-3型排列。可见5'端表现出更高的变异。其它小卫星位点如D16S309也有类似报道^[2]。目前为止,大多数研究的小卫星位点的突变表现为极性,即在小卫星重复结构的一端发生突变的几率高^[4]。DYF155S1位点5'端较3'端高的变异可能预示着5'端具有较高的突变几率。Jobling MA等报道DYF155S2位点含有1个4型核心序列,本实验DYF155S2位点等位基因序列分析表明含有1个新型核心序列,与4型核心序列相差1个碱基(第20 nt A→G)。

我们首次采用Amp-FLP及序列分析方法对中国汉族人群DYF155S1位点等位基因结构进行了研究,为建立简便、实用的分析该位点多态性的技术奠定了基础。

