

# 广东汉族群体 Y 染色体 DYF155S1 基因座 3' 端多态性研究

黄艳梅, 伍新尧, 曾艳红, 庾 蕾, 童大跃, 区敬华  
(中山大学中山医学院法医系物证教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】揭示广东汉族人群 Y 染色体小卫星 DYF155S1 基因座 3' 端多态性。【方法】采用 Amp-FLP 和荧光 MVR-PCR 方法扩增, PCR 产物用 ABI377 电泳或中性聚丙烯酰胺凝胶电泳 - 银染方法分析。【结果】155 例无关男性个体的 4 型核心序列 MVR 图谱第 1 条 DNA 片段大小均为 133 bp。155 例共检出有 24 种等位基因, 有 7 个等位基因仅出现 1 次, 频率最高的为 9 号等位基因, DNA 条带数为连续的 13 个, 频率为 0.135 5; 基因多样性( $h$ )为 0.922 6。155 人中有 3 人表现为连续 DNA 谱带中有 1 个 DNA 条带的缺失 (null repeat), 序列分析证明缺失的 DNA 条带位置对应于 3 型核心序列。【结论】揭示了 DYF155S1 位点 3' 端多态性及其等位基因频率, 为群体遗传学研究及法医学应用提供了基础资料。

关键词: 小卫星重复; DYF155S1; 多态现象(遗传学); Y 染色体

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)05-0435-04

## Study on the Diversity of 3' end at Locus DYF155S1 of Y-chromosome among Han Population in Guangdong

HUANG Yan-mei, WU Xin-yao, ZENG Yan-hong, YU Lei, TONG Da-yue, OU Jing-hua

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

**Abstract:** 【Objective】To reveal the diversity at 3' end of DYF155S1 locus of Y-specific minisatellite among Han population in Guangdong. 【Methods】Amp-FLP method was used to amplify DYF155S1 fragments and retrieved DNA from agarose gel. The allele of type 4 core sequence from the 3' end at DYF155S1 locus was amplified by using MVR-PCR (minisatellite variant repeat by PCR). PCR products were analyzed by ABI377 sequencer or polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver staining. 【Results】155 unrelated males among Chinese Han population in Guangdong were genotyped. The size of the first DNA fragment of type 4- MVR mapping of all individuals was 133 bp. Among 155 samples 24 alleles were found, 7 out of them were observed once only. The most frequent allele was No. 9, at frequency 0.135 5. The gene diversity ( $h$ ) was 0.922 6. Out of 155 samples, 3 samples had one band lost (null repeat) among the successive bands. It was demonstrated by sequencing that the lost band was type 3 repeats. 【Conclusion】We reveal the minisatellite variant repeat of 3' end diversity of DYF155S1 locus by fluorescent detection and provide the frequency data of DYF155S1 locus in Han population in Guangdong for studying the population genetics and for forensic practices.

**Key words:** minisatellites; DYFS155S1; polymorphism (genetics); Y chromosome

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(5):435 ~ 438]

Jobling 等<sup>[1]</sup>(1998 年)报道了 Y 染色体特异的小卫星基因座 MSY1(DYF155S1) 具有高度的多态

性, 此基因座获得的多态性信息比 10 个 STR 基因座组成的单倍型还多, 因此在法医检案实践中具有

收稿日期: 2003-01-17

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(97-128); 中山医科大学“211 工程”重点学科建设课题基金资助项目(4209008)

作者简介: 黄艳梅(1971-), 女, 河南新乡人, 硕士生, 讲师, 现工作单位: 河南新乡医学院基础部。伍新尧, 教授, 通讯作者。电话: 020-87330557, Email: xyao@gzsums.edu.cn

很好的应用前景,特别是在解决轮奸案混合斑中嫌疑人的个人认定中具有突出的优势性。DYF155S1 基因座是由核心序列串联重复 48~114 次排列构成,核心序列大小为 25 bp。核心序列间存在变异,变异位置通常位于第 3nt、13nt 和 21nt 等。截至目前为止,已发现有 10 种类型核心序列<sup>[1-3]</sup>,但以 1、3、4 类型多见。5' 端以 1 型核心序列多见,3' 端以 4 型核心序列多见,介于 1 型和 4 型之间常为 3 型核心序列。这种内部序列的差异可采用 MVR-PCR(minisatellite variant repeat by PCR)<sup>[4]</sup>方法揭示。庾蕾<sup>[2,5]</sup>(2003 年)已经对广东汉族群体 DYF155S1 基因座等位基因结构进行了研究并调查了该基因座 5' 端多态性。本文是在上述研究基础上对广东汉族群体 DYF155S1 基因座 3' 端多态性进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品来源

155 份无关男性个体血样品取自亲子鉴定案家系父亲的血样,由中山医学院法医物证教研室提供,与庾蕾<sup>[5]</sup>调查 DYF155S1 基因座 5' 多态性所用样本一致。

### 1.2 模板 DNA 的抽提

采用饱和酚/氯仿法抽提血样品基因组 DNA。

### 1.3 DYF155S1 基因座长度片段扩增及其回收

Y1A+ 和 Y1B+ 引物序列参见文献 [1], 由上海生工合成。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 含有人类基因组 DNA 50~100 ng, 10 $\times$  Buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2  $\mu$ L, Taq Plus 酶 1 U, 0.25 mmol/L dNTPs 及引物各 1  $\mu$ 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 10 g/L 琼脂糖凝胶水平电泳 120 V、1 h, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察, 将大约 1 405~2 505 bp 片段切割下来加 300  $\mu$ L 0.1 $\times$ TE 缓冲液浸泡 24 h。

### 1.4 MVR-PCR 扩增

以 1.3 项浸泡液中 DNA 为模板, 选择 3' 端侧翼区引物 Y1B+ 和 4 型核心序列特异性引物 TAG4R<sup>[1]</sup> (5' 端标记 6-FAM (6-carboxyfluorescein) 荧光染料, 由上海博亚合成) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 10  $\mu$ L, 含有浸泡液 DNA 2  $\mu$ L, 10 $\times$

PCR Buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 1  $\mu$ L, BioStar Taq 酶 0.8 U, 0.2 mmol/L dNTP 及引物各 1  $\mu$ mol/L。样品混合后置 Eppendorf-PCR 仪热循环: 94  $^{\circ}$ C 10 s, 64  $^{\circ}$ C 1 min, 68  $^{\circ}$ C 3.5 min 循环 28 次。扩增产物采用 60 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳-银染显色分离, 或者变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(ABI377 测序仪), ABI Prism<sup>TM</sup> 377 Collection 软件收集信号, GeneScan<sup>®</sup> 2.0 软件分析数据, 自动读出结果。

### 1.5 序列分析

用重复序列两翼的 1 对引物(Y1A+ 和 Y1B+) 进行 PCR, 用低熔点琼脂糖凝胶回收等位基因 DNA 片段<sup>[2]</sup>。采用荧光标记 ddNTPs 的循环测序法(ABI prism BigDye<sup>TM</sup> terminator cycle sequencing ready reaction kits, PE), 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。

### 1.6 计算

$$h = n(1 - \sum x^2) / (n - 1)$$

$h$  为基因多样性 (gene diversity),  $n$  表示样本数,  $x$  为群体中每一种等位基因的频率<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 DYF155S1 基因座 3' 端多态性调查

155 例无关男性个体中 148 人表现为连续的类型阶梯 (ladder) 的 DNA 谱带, 两个相邻的 DNA 片段之间相差 25 bp, 有 3 人表现为连续 DNA 谱带中有 1 个 DNA 条带的缺失 (null repeat)。所有个体第 1 条 DNA 条带位置相同, 大小均为 133 bp, 故人群中多态性主要表现为该个体图谱中总 DNA 条带数目的不同、有无 DNA 条带的缺失及缺失的位置(图 1, 表 1)。155 人共分出有 24 种等位基因, 根据图谱中 DNA 条带数从少至多命名, 频率最高的等位基因是 9 号, DNA 条带数为连续的 13 个, 暂命名为 (type 4)13, 频率为 0.1355(表 1)。有 7 个等位基因在本群体中仅出现 1 次。基因多样性 ( $h$ ) 为 0.922 6。

### 2.2 DYF155S1 基因座 3' 端模块结构

对 3 例 DYF155S1 基因座 3' 端 4 型核心序列 MVR 图谱中有缺失片段的个体进行测序, 序列分析 3 例 DYF155S1 基因座 3' 端均为 4343 核心序列排列, 同时结合庾蕾<sup>[2]</sup> 测序结果, 广东汉族群体 DYF155S1 基因座 3' 端有 43 和 4343 两种类型模块结构(图 2)。

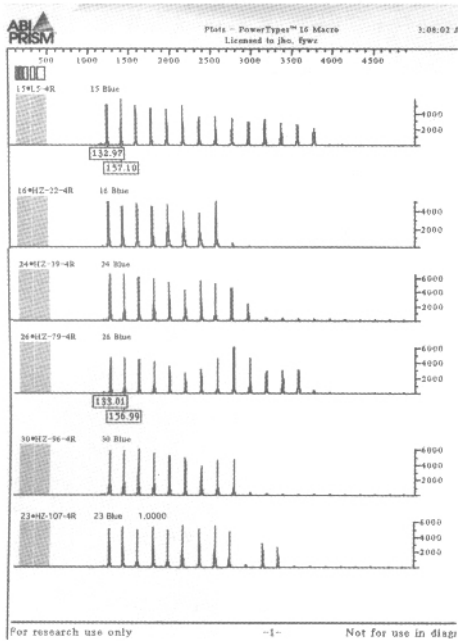


图 1 DYF155S1 基因座 3'端等位基因 MVR 图谱

Fig.1 MVR mapping of alleles at 3' end of locus DYF155S1

The first fragment was 133 bp. Sample L5, 22, 39, 79, 96 showed successive bands. Sample 107 lost one band (null repeat) among the successive bands



图 2 DYF155S1 基因座 3'端模块结构类型

Fig.2 Types of the modular structure of locus DYF155S1 at 3' end

a:4 3;b:4 3 4 3

### 3 讨论

Jobling 等<sup>[1]</sup>首次报道了 DYF155S1 基因座具有较高的多态性,其采用放射性同位素标记方法,操作过程复杂繁琐。国内王保捷<sup>[3]</sup>主要报道了该基因座的模块结构,庾蕾等<sup>[2,5]</sup>采用 Amp-FLP 及序列分析方法对广东汉族人群 DYF155S1 基因座等位基因结构进行了研究,建立荧光 MVR-PCR 方法,仅选择 5'端侧翼引物 Y1A+ 和 1 型核心序列特异引物 TAG1 进行 PCR 扩增并调查了广东汉族 155 例该基因座的 5'端多态性。本实验则在以上研究基础上选择 3'端侧翼区引物 Y1B+ 和 4 型核心序列特异引物 TAG4R 进行 PCR 扩增以揭示该基因座 3'端多态性。

我们用荧光标记 MVR-PCR 方法对中国汉族 155 个无关男性个体 DNA 进行分型,155 人共分

表 1 广东地区 155 例汉族群体 DYF155S1 基因座 3' 端 4 型核心序列等位基因

Table 1 The alleles of type 4 at 3' end of locus DYF155S1 among 155 Han population in Guangdong

Allele	Repeat	Observed number	Frequency
1	(type4)5 <sup>1)</sup>	3	0.0193
2	(type4)6	3	0.0193
3	(type4)7	9	0.0580
4	(type4)8	18	0.1161
5	(type4)9	16	0.1032
6	(type4)10	12	0.0774
7	(type4)11	3	0.0193
8	(type4)12	18	0.1161
9	(type4)13	21	0.1355
10	(type4)14	14	0.0903
11	(type4)15	4	0.0258
12	(type4)16	9	0.0580
13	(type4)17	4	0.0258
14	(type4)18	6	0.0387
15	(type4)19	1	0.0065
16	(type4)20	3	0.0193
17	(type4)21	3	0.0193
18	(type4)22	1	0.0065
19	(type4)23	1	0.0065
20	(type4)25	2	0.0130
21	(type4)26	1	0.0065
22	(type4)9-(1)-(type4)2 <sup>2)</sup>	1	0.0065
23	(type4)14-(1)-(type4)2	1	0.0065
24	(type4)17-(1)-(type4)1	1	0.0065

1) indicated 5 successive fragments displayed; 2) indicated that there are 9 successive fragments following the first band, then lost 1 fragment and followed by 2 fragments. On the analogy of this

出有 24 种类型等位基因,但所有个体第一条 DNA 带位置相同,大小为 133 bp。DYF155S1 基因座 3'端基因多样性(*h*)为 0.922 6,与该基因座 5'端多态性及其分型略有差异,庾蕾等<sup>[5]</sup>报道 5'端多态性除了 3'端所具有的特点外还表现为图谱中第 1 条 DNA 片段位置的不同,调查得出该基因座 5'端基因多样性(*h*)为 0.978 9;因此,广东汉族群体 DYF155S1 基因座 3'端多态性相对 5'端多态性低;另外,群体调查中发现有些个体表现为在连续的 DNA 谱带中有 1 个 DNA 条带缺失,经序列分析证明缺失的 DNA 条带位置对应于 3 型核心序列,增加了 DYF155S1 基因座 3'端多样性。在 1 个基因座

上有几种不同的核心序列,并按一定的规律串联排列,这种排列模式称为模块结构(modular structure)<sup>[7]</sup>。序列分析表明广东汉族人群 DYF155S1 基因座 3'端模块结构有 2 种: 43 和 4343, DYF155S1 基因座 5'端则有 3 种: 13、313、31313<sup>[5]</sup>,进一步说明了 DYF155S1 基因座 3'端变异较 5'端较低。与 Y-STR 基因座多态性比较: DYF155S1 基因座 3'端多态性比单个 Y-STR 基因座多态性高<sup>[8]</sup>,比多个 Y-STR 基因座组成的单倍型多态性略低<sup>[5, 8]</sup>;本实验将同 1 个人的 DYF155S1 基因座 3'端等位基因与庾蕾等<sup>[5]</sup>调查的 5'端等位基因结合起来分析,发现有 142 种等位基因,其中 127 种等位基因只出现 1 次,基因多样性( $h$ )为 0.9960,因此将 DYF155S1 基因座 3'端多态性与 5'端多态性结合起来,将会进一步提高该基因座的基因多样性,在法医实践有较好的应用前景。

本实验在引物 5'端用 6-FAM (6-carboxyfluorescein) 标记即荧光标记 MVR-PCR 方法获得相应男性个体的 DYF155S1 基因座分型图谱,而且同时采用银染方法获得与荧光标记 MVR-PCR 方法一致的分型结果。另外,本实验采用普通、经济的 Taq Plus 酶和 BioStar Taq 酶即可扩增出目的片段。本方法简便,经济, DNA 分型清晰,利于在法医学实践中应用和推广。

本方法采用荧光标记 MVR-PCR 方法不需要等位基因分型标准物作对照,更简便;同时,若将 1 型和 4 型核心序列特异引物标记不同颜色的荧光,在 ABI377 测序仪或其他的 DNA 自动分析上同一

泳道上电泳,将会提高工作效率和本基因座基因多态性的揭示能力。

#### 参考文献:

- [1] Jobling M A, Bouzekri N, Taylor P G. Hypervariable digital DNA codes for human paternal lineages: MVR-PCR at the Y-specific minisatellite, MSY1 (DYF155S1) [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(4): 643.
- [2] 庾蕾,黄艳梅,伍新尧. 中国汉族人群 DYF155S1 位点等位基因结构研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 24(1): 42.
- [3] 王保捷,丁梅,赵东,等. 中国汉族与日本群体 DYF155S1 基因座的遗传多态性[J]. *中国法医学杂志*, 2002, 17(2): 67.
- [4] Jeffreys A J, Macleod A, Tamaki K, *et al*. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing[J]. *Nature*, 1991, 354(350): 204.
- [5] 庾蕾,伍新尧,黄艳梅,等. 用荧光标记 MVR-PCR 方法研究中国汉族人群 DYF155S1 基因座多态性[J]. *遗传学报*, 2003, 30(1): 15.
- [6] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 1239 (3): 585.
- [7] Dupuy B M, Andreassen R, Frones A G, *et al*. Y-chromosome variation in a Norwegian population sample [J]. *Forensic Sci Int*, 2001, 117 (3): 163.
- [8] 郑秀芬,程俊峰,叶健,等. 4 个 Y-STR 基因座的多态性及其法医学应用的研究 [J]. *遗传学报*, 2002, 29 (2): 95.

(编辑 黄小延)

(上接第 434 页 form page 434)

现在不同的外显子上。由于不同民族不同地区的人群,其遗传物质本身存在差异或长期地理隔离造成的生存环境的差异导致遗传物质的差异,其多态性可能会存在着民族间、地域间的差异<sup>[5]</sup>。这对于研究不同民族的亲缘关系以及民族起源问题都有重要的科学价值。因此,进一步研究不同民族不同地区人群的 PARP-1 基因多态性分布的性质和特点,对明确其功能具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 任泽航,庄志雄. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶、细胞凋亡与肿瘤[J]. *肿瘤防治研究*, 2000, 27(3): 236.

(编辑 黄小延)

- [2] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999. 108 ~ 109.
- [3] Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations[J]. *GATA*, 1992, 9(3): 73.
- [4] Chandler L J, Nordoff N G. Identification of genetic variation among St. Louis encephalitis virus isolates, using single-strand conformation polymorphism analysis[J]. *J Virol Methods*, 1999, 80(2): 169.
- [5] 郭奕斌,杜传书. 中国汉族群体 MPSIV A 型 Stu I 位点的遗传多态性 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 24(1): 23.