

中国汉族群体 D4S111 位点的遗传多态性研究^①

光 炜 郭奕斌 林群娣 杜传书

(中山医科大学医学遗传学研究室; 广州, 510089)

摘要 目的: 研究中国汉族群体中 α -艾杜糖苷酶基因 D4S111 位点的遗传多态性。**方法:** 采用扩增片段长度多态性 (Amp-FLP) 分析技术, 检测了广州地区汉族无血缘关系健康个体 97 名。**结果:** D4S111 位点, 在 97 名无关个体中发现 5 个等位基因和 9 种基因型, 等位基因片段长度为 830~510 bp, 基因频率为 0.0052~0.3608, PIC 为 0.5966, 杂合性为 0.78。**结论:** 中国汉族群体中 D4S111 位点具有高度多态性, 并与其它种族间存在差异性。

主题词 艾杜糖醛酸酶/遗传学; 基因扩增; 多态性, 限制性片段长度

中图分类号 Q 75

POLYMORPHISM ANALYSIS OF THE D4S111 LOCUS IN A CHINESE HAN POPULATION

Guang Wei Guo Yibin Lin Qundi Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To investigate the genetic polymorphism of the locus (D4S111) in Chinese Han population that contains a variable number of tandem repeat (VNTR) within α -L-iduronidase gene. **Method:** 97 unrelated healthy individuals of Han population were analyzed using amplified-fragment-length polymorphism (Amp-FLP). **Results:** Five alleles ranging from 830 to 510 bp in size and nine different genotypes were observed. The allele frequencies were 0.0052 to 0.3608. The PIC of D4S111 locus was 0.5966, and the heterozygosity was 0.78. **Conclusion:** The polymorphism of D4S111 locus in Chinese Han population was high and different from those in other populations.

Subject headings iduronidase/genetics; gene amplification; polymorphism, restriction fragment length

D4S111 位点位于 α -艾杜糖苷酶 (α -L-iduronidase, IDUA) 基因第 2 内含子区内, 是一约 86 bp 为一重复单位的数目可变串联重复 (variable number tandem repeat, VNTR) 序列, 具有高度多态性^[1], 而 IDUA 的缺乏可导致粘多糖贮积症 I 型 (mucopolysaccharidosis I, MPS I 型) 病。此外 D4S111 位点还与 Huntington 舞蹈症基因紧密连锁。因此, 利用该位点多态性, 进行连锁分析, 有助于 MPS I 型和 Huntington 病携带者检出及产前基因诊断。但我国汉族群体中 D4S111 位点的遗传多态性至今尚不清楚, 从而作者应用 Amp-FLP 技术, 对广州地区汉族群体中血缘无关个体的该位点遗传多态性进行了研究, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本 取广州地区无血缘关系的健康中国汉族个体 97 人的静脉血, 其中男性 51 人, 女性 46 人, 用肝素抗凝。

1.1.2 引物及试剂 按文献[2]合成扩增 D4S111 位点 VNTR 的一对引物: ID-53 5'-TAGGT GTCTC CTCAG AGAGG3'; ID-54 5'-AGGAC CTGGT GGACA CCTCA3' dNTPs、Taq DNA 聚合酶 (GENDA, 加拿大), 100 bp 和 123 bp ladder (GIBCO/BRL), SDS、蛋白酶 K (Serva), 其余试剂均为国产分析纯。

^① 美国中华医学基金会 (CMB) 部分资助

1.1.3 仪器 PCR 热循环仪 GC-1 型(PE 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及浓度测定 按我室常规方法进行^[3]。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系为 30 μL, 含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 9), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 g/L Triton X-100, 0.2 mmol/L dNTP, 上下游引物各 20 pmol 以及 0.2~0.5 μg DNA 模板。95 °C 变性 5 min 后, 加 2 U *Taq* 酶, 94 °C 45 s, 66 °C 60 s, 72 °C 75 s, 35 个循环后, 72 °C 延伸 5 min。取 8 μL PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增效果。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 取 8 μL PCR 产物加 1.5 μL 载样缓冲液, 以 100 bp 和 123 bp ladder 作片段长度标准, 进行(60 g/L 聚丙烯酰胺凝胶, 39:1)电泳分离, 按我室常规方法银染检测结果, 照相后干胶保存。

1.2.4 PCR 扩增片段长度的判断 按 Ludwig 等^[4]介绍的方法判断 PCR 扩增片段的长短(bp)。

1.3 多态性信息含量计算及统计学处理

1.3.1 多态性信息含量计算 D4S111 位点多态性信息含量 (polymorphic information contain, PIC, 量符为 y_{PIC}) 和无偏倚估计期望杂合度(h) 分别按下列公式计算^[5]:

$$y_{PIC} = 1 - (\sum_{i=1}^n p_i^2) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

$$h = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

其中 p_i 和 p_j 代表群体中第 i 个和第 j 个等位基因的频率。

1.3.2 统计学处理 采用 χ^2 检验对观察到的基因型数与理论期望值间一致符合率进行统计学处理。

2 结果

2.1 D4S111 位点多态性

在 97 个无关个体中, 发现 5 个等位基因(图 1), 按等位基因片段, 从大到小依次命名为: A₁~A₅, 片段长度为 830~510 bp。重复单元长 80 bp, 最常见的等位基因是 A₂、A₃ 和 A₄。各等位基因片段长度及频率见表 1。

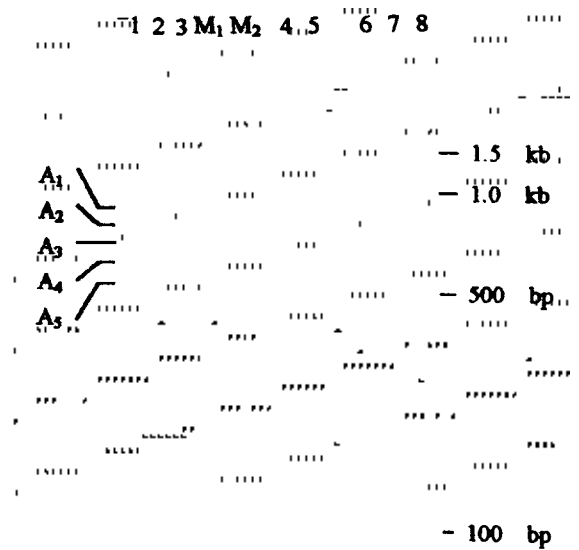


图 1 中国汉族群体中 D4S111 位点扩增片段长度多态性分析结果

Fig.1 Fragment length polymorphism analytical results of D4S111 locus in a Chinese Han population

M₁: 123 bp ladder, M₂: 100 bp ladder, A₁~A₅: alleles, 1~8: unrelated individuals

表 1 中国汉族群体 D4S111 位点的等位基因片段大小及频率

Table 1 The allelic frequencies and fragment length of D4S111 Chinese in Han population

alleles	fragment length (bp)	allelic frequency
A ₁	830	0.0052
A ₂	750	0.3608
A ₃	670	0.3144
A ₄	590	0.3093
A ₅	510	0.0103

表 2 中国汉族群体 97 名无关个体 D4S111 位点基因型分布

Table 2 The distribution of observed and expected genotypes of D4S111 locus in 97 unrelated Chinese individuals

genotypes	n (number)/ f (frequency)	
	observed	expected
A ₁ A ₂	1/0.0103	0.364/0.0038
A ₂ A ₂	11/0.1134	12.627/0.1302
A ₂ A ₃	21/0.2165	22.006/0.2269
A ₂ A ₄	25/0.2577	21.650/0.2232
A ₂ A ₅	1/0.0103	0.721/0.0074
A ₃ A ₃	6/0.0619	9.588/0.0988
A ₃ A ₄	27/0.2784	18.865/0.1945
A ₃ A ₅	1/0.0103	0.628/0.0065
A ₄ A ₄	4/0.0412	9.280/0.0957

在 97 名个体中,观察到 9 种不同的基因型,其中以 A3/A4、A2/A4 和 A2/A3 3 种基因型最常见,而 A1/A2、A2/A5、A3A/A5 最少见(表 2)。经 χ^2 检验,各基因型数的观察值和期望值一致,符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($\chi^2=2.49$, $df=4$, $0.75 > P > 0.50$)。PIC 值为 0.5966,期望杂合性(h)为 0.682,观察杂合性为 0.78。

2.2 家系分析

检测了两代 3 口人家共两个家系的 D4S111 位点基因型,结果表明该位点的等位基因按孟德尔定律呈共显性遗传。

3 讨论

D4S111 位点位于人类第 4 号染色体短臂末端(4p16.3)IDUA 基因第 2 内含子区内,除具有多态性外,还与 MPS I 型病和 Huntington 舞蹈症密切相关^[1,2]。Scott 等^[1,2]对该位点研究发现,D4S111 是由一 86 bp 重复单位的不同拷贝数构成的,呈现出高度的 VNTR 多态性;在对 68 个无血缘关系的健康个体的 D4S111 位点 VNTR 多态性研究中,观察到 3 个等位基因,其大小分别为 800 bp、715 bp 和 630 bp,重复单位的拷贝数分别为 8、7 和 6,各等位基因频率分别为 0.28、0.55 和 0.17,其观察杂合性为 60%。

我们用同样的引物首次在我国华南地区对汉族人群进行研究,结果与 Scott 等的研究结果比较显示,两个群体间存在较大的差异;主要有:①等位基因数目不同:我们在 97 名无血缘关系的健康个体中共发现 5 个等位基因,其中 A1 和 A5 为我国人群中首次发现。②串联重复片段长度不同:我们检测结果显示一个重复单位长约 80 bp。③等位基

因频率及分布不同:中国群体中 3 个主要等位基因频率(A2、A3 及 A4)之和为 0.9845,且 3 者之间的频率大体相等(表 1)。两个群体之间 D4S111 的基因频率有明显的种族差异($P < 0.005$)。④观察杂合性不同:我们检测的观察杂合性显著高于 Scott 等人测定结果($0.010 < P < 0.025$)。这些差异预示,D4S111 位点在不同种族、不同地域间存在异质性。

在进行 D4S111 位点多态性分析中,我们采用 PCR 扩增,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离以及银染显色的方法,证明此法简便、快速、灵敏,不需要探针杂交,适应于基层实验室。如再结合 IDUA 基因内的其他多态标记,如 RFLP 等进行连锁分析,将有助于 MPS I 型病携带者检出和产前基因诊断。有关这方面的应用,我们将另文报告。

参 考 文 献

- 1 Scott H S, Nelson P V, MacDonald M E, *et al*. An 86 bp VNTR within IDUA is the basis of the D4S111 polymorphic locus. *Genomics*, 1992, 14: 1118
- 2 Scott H S, Nelson P V, Hopwood J J, *et al*. PCR of a VNTR linked to mucopolysaccharidosis type I and Huntington disease. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(22): 6348
- 3 光 炜,王 菁,杜传书,等. Wilms 瘤中 p16 基因缺失一例报告. *中华医学遗传学杂志*, 1997, 14(1): 23
- 4 Ludwig E H, Friedl W, McCarthy B J. High-resolution analysis of a hypervariable region on the human apolipoprotein B gene. *Am J Hum Genet*, 1989, 45(2): 458
- 5 Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al*. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314

(1997-12-29 收稿 1998-08-05 修回)

·新成果·

视网膜肽能无长突细胞的研究

课题负责人 李海标

(中山医科大学组织胚胎学教研室: 广州, 510089)

本研究用高压液相色谱分析、放射免疫及免疫组织化学等技术,对几种神经肽在视网膜无长突细胞的定位与分布进行了较系统的研究。在国际上首次发现蝶螈视网膜有生长抑素免疫阳性网间细胞,在人视网膜节细胞层有 LANT-6 免疫阳性神经元,发现鸡视网膜含神经降压素神经元的神经元回路,与以往发现的含脑啡肽的神经元回路有不同。研究了 P 物质、血管肠肽和生长抑素在人视网膜神经元的定位,扩展并修正了国外有关学者的研究,确认和扩展了国外有关胆囊收缩素、神经肽 Y 和 P 物质在两栖类视网膜的定位研究。研究结果对进一步阐明视信息处理和神经系统疾患的发病机理提供新的形态学基础。1997 年获广东省自然科学奖二等奖。

(陈丽芳)