

## 白鬻豚 MHC 基因类 DQB1 座位第二外元的 序列变异分析\*

严洁<sup>①</sup> 杨光<sup>①\*\*</sup> 周开亚<sup>①</sup> 魏辅文<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所, 南京 210097)

(<sup>②</sup> 中国科学院动物研究所, 北京 100080)

Q95 A

**摘要** 测定了 45 个克隆的白鬻豚 (*Lipotes vexillifer*) MHC II 类基因 DQB 座位第二外元 172 bp 的核苷酸序列, 共获得 15 种序列, 发现了 22 个变异位点。核苷酸的非同义替换明显多于同义替换, 并造成了 15 个氨基酸的改变。氨基酸的替换趋于集中在假定的与抗原的选择性识别相关的位点附近。白鬻豚 DQB 基因的核苷酸和氨基酸序列与文献报道的白鲸 (*Delphinapterus leucas*) 和一角鲸 (*Monodon monoceros*) DQB1 序列具有较高的同源性。氨基酸序列不具备人及其它一些灵长类动物 DQB2 基因所共有的基序 (Motif), 而与牛 DQB1 基因的基序相近, 说明本研究得到的白鬻豚 MHC 序列应属于类 DQB1 基因。同一个体出现了多种序列的情况, 提示白鬻豚的 DQB 基因可能存在着座位重复。白鬻豚的类 DQB1 座位的序列中存在多种基序的不同组合, 推测是由于基因转换造成的 [动物学报 49 (4): 501~507, 2003]。

**关键词** 白鬻豚 MHC 类 DQB1 (DQB1-like) 座位 基因重复 基因转换

### Sequence variation at exon 2 of the major histocompatibility complex DQB1-like locus in the Baiji (*Lipotes vexillifer*)

YAN Jie<sup>①</sup> YANG Guang<sup>①\*\*</sup> ZHOU Kai-Ya<sup>①</sup> WEI Fu-Wen<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(<sup>②</sup> Institute of Zoology, The Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

**Abstract** We investigated genetic variation at exon 2 (including part of the putative peptide-binding region, PBR) of the class II major histocompatibility complex (MHC) DQB locus in the Baiji (*Lipotes vexillifer*). PCR products were cloned into a pMD-18T vector after purification. Almost 15 recombinant plasmids for each individual were screened out, isolated, purified, and then sequenced. Within the 172 bp nucleotide sequences of 45 clones from three individuals, 22 variable sites were determined and 15 sequences were attained. All 15 sequences did not show deletions, insertions, or stop codons, and therefore could be assumed functional *in vivo*. Phylogenetic trees reconstructed using the neighbor joining (NJ) method contained in the MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software package divided the 15 sequences into two monophyletic clades. Seven nucleotide acid and four amino acid diagnostic sites were found between these two clades. Within the four diagnostic amino acid sites, non-conservative amino acid substitution was found at site 28, suggesting that the variation at this site would be responsible for recognition and presentation of different kinds of peptides. The ratio of nonsynonymous substitutions was much higher than that of synonymous substitutions ( $d_N/d_S = 6.59/2.57$ ), which caused 15 amino acid differences. Substitutions of amino acid tended to be clustered around sites postulated to be responsible for selective peptide recognition. Nucleotide acid and amino acid sequences both showed high level of similarity (nucleotide acid: 90.7%; amino acid: 80.6%) to DQB1 alleles of the beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and narwhal (*Monodon monoceros*). Amino acid sequences did not share motifs with human and some other primates, but showed sim-

2002-12-02 收稿, 2003-03-18 修回

\* 国家自然科学基金 (No. 30270212 和 No. 30070116)、国家杰出青年科学基金 (No. 30125006)、国家“211 工程”“十五”建设项目及江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人科研基金资助 [This study was supported by NSFC (No. 30270212 and 30070116), NSFC Project for Distinguished Scholars (No. 30125006), National “211 Project” for the Tenth Five Years, and “Qinglan Project” Funding for the Young Academic Leader of Jiangsu Province]

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). gyang@njnu.edu.cn

第一作者简介 严洁, 女, 25 岁, 硕士研究生。专业方向: 动物分子生物学。

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

ilarity to that of BoLA-DQB1. Therefore, the present sequences were all identified as DQB1-like locus. More than two sequences were found in each individual, suggesting duplication in the locus examined. Different motif recombination among sequences were also found and could be explained as gene conversion. Locus duplication, in combination with the polymorphism in each DQB sequence, will markedly increase variation of MHC molecules. The high level of MHC polymorphism in Baiji was incongruent with those found in other marine mammals, but probably correlates with the evolutionary adaptation of small Baiji population to fresh waters with relatively high level of pathogens [*Acta Zoologica Sinica* 49 (4): 501-507, 2003].

**Key words** Baiji (*Lipotes vexillifer*), MHC, DQB1-like locus, Gene duplication, Gene conversion

白鱔豚 (*Lipotes vexillifer*) 是世界现存的 5 种淡水豚之一, 仅分布于我国的长江中下游。由于受到长江中船舶航运、渔具作业、渔业资源的减少和水体污染等威胁, 白鱔豚的栖息地遭到了严重破坏, 种群数量锐减至现在的不足 100 头 (Zhou *et al.*, 1998)。迄今为止, 对白鱔豚的种群结构和遗传多样性知之甚少, 仅刘珊等 (2001) 通过 mtDNA 控制区的序列分析, 发现白鱔豚种群的遗传多样性水平较低。

主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) 基因是脊椎动物体内与机体免疫功能密切相关的一个基因家族, 是基因组中多态性最丰富的区域之一 (Yuhki *et al.*, 1990)。它的表达产物广泛参与各种外源抗原的识别, 其多态性水平的降低可导致种群内的个体对突发性传染病病原体的易感性增高, 导致种群抗病能力单一, 生存力下降 (O'Brien *et al.*, 1999)。运用 MHC 分析来进行种群遗传学和保护遗传学研究, 是近年来一个热点和新增长点 (Hedrick, 1994; Haig, 1998; 杨光等, 2002)。

本研究测定白鱔豚 DQB 基因的第二外元 (Exon 2) 序列, 包括部分假定的抗原肽结合区 (Peptide binding region, PBR), 目的在于初步了解白鱔豚 MHC 基因的变异特征及与种群遗传多样性和进化适应的关系。

## 1 材料与方 法

本研究所用的 3 头白鱔豚样品 (NJNU 0359、0381 和 0388) 均为  $-20^{\circ}\text{C}$  冻藏的肌肉组织。用标准蛋白酶 K 消化和酚/氯仿抽提方法 (Sambrook *et al.*, 1989) 提取总 DNA。用于扩增白鱔豚 MHC II 类基因 DQB 座位的引物对为 5'-CTG-GTAGTGTGTCTGCACAC-3' 和 5'-CATGTGC-TACTTCACCAACGG-3' (Murray *et al.*, 1995), 使用的 Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司。扩增产物经 PCR 产物直接纯化试剂盒 (上海华舜公司) 纯化后, 与 T-A 克隆载体 (pMD-18T 载体, 大连

Takara 公司) 连接, 再将重组质粒转化入大肠杆菌的 DH5 $\alpha$  菌株进行扩增。通过氨苄抗性及菌落 PCR 来筛选阳性克隆。提取质粒, 用 M13 正向引物 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') 在 ABI 310 遗传分析仪 (Perkin Elmers) 上进行序列测定。

所得序列用 Clustal X 软件 (Jeanmougin *et al.*, 1998) 进行比对, 并辅以人工校对, 确定变异位点及不同序列。用 MEGA 软件 (Kumar *et al.*, 2001) 中基于 Kimura 双参数模型的邻接法 (Neighbor joining, NJ) 构建系统发生树。

## 2 结 果

共测定了 45 个阳性克隆质粒中 172 bp 的外源序列。这些序列中包括 22 个变异位点, 占 12.8%, 共获得 15 种序列 (图 1)。这些序列已全部存入 GenBank, 查询号为 AY177150~177153 和 AY177283~177293。3 个白鱔豚个体中, NJNU0359 测了 14 个克隆, 得到 7 种序列 (Live-DQB \* 2~4、7~8、10 和 12); NJNU0380 测了 16 个克隆, 获得 6 种序列 (Live-DQB \* 1、4~5、8~9 和 14); NJNU0388 测了 15 个克隆, 获得 6 种序列 (Live-DQB \* 4、6、8、11、13 和 15)。22 个变异位点中, 替换发生在密码子的第 1、2 和 3 位点的分别有 8、9 和 5 个, 各占 36%、41% 和 23%。变异位点包括 15 个转换, 6 个颠换, 另有 1 个位点既有转换又有颠换。没有发现任何插入、缺失和异常的终止密码子。非同义替换共 17 个, 造成了 15 个氨基酸的替换。

基于 NJ 法的系统发生分析把 15 种序列分为两支, 分别由 Live-DQB \* 1~7 (分支 1) 和 Live-DQB \* 8~15 (分支 2) 组成 (图 2: a)。两支之间有 7 个核苷酸鉴别位点, 分别为位点 18~20、23~25 和 29。分支 1 的序列之间, 碱基差异从 0.58% 到 2.91%, 平均为 1.63%。分支 2 的序列之间, 碱基差异从 0.58% 到 5.23%, 平均为 2.30%。而两支之间的核苷酸歧异度则相当高, 从

变异位点	等位基因
	11111
	1122222455556778923567
	8903459913492244125322
Live-DQB*1	TTGGAGTGTACTGCGGCTAATG
Live-DQB*2	..... T. A. ....
Live-DQB*3	..... C. T. ....
Live-DQB*4	..... T. ....
Live-DQB*5	..... T. .... A
Live-DQB*6	..... T. .... GAT
Live-DQB*7	..... T. G. GAC
Live-DQB*8	ACAACCCAAGT. T. G. GAC
Live-DQB*9	ACAACCCAAGT. TA. G. GAC
Live-DQB*10	ACAACCCAAGT. T. GC. GGC
Live-DQB*11	ACAACCCAAGT. T. G. GAT
Live-DQB*12	ACAACCCAAGT. AT. G. G. C
Live-DQB*13	ACAACCCAAGT. T. G. ....
Live-DQB*14	ACAACCCAAGT. T. G. GGAC
Live-DQB*15	ACAACCC..... T. .... *****

图 1 白 暨豚 DQB 序列的核苷酸变异位点  
**Fig.1 Variable sites of Live-DQB sequences in three baiji individuals**

左边为 15 种序列的编号，上方的数字表示变异碱基的对应位置，圆点 (·) 表示与第一种序列有相同的碱基组成，星号 (\*) 表示序列 Live-DQB\*1~7 与 Live-DQB\*8~15 之间的核苷酸鉴别位点，阴影部分表示基序的位置 [ Sequence codes are shown on the left. Site numbers are on the above. A dot indicates identity and asterisks indicate diagnostic sites between sequences Live-DQB\*1~7 and Live-DQB\*8~15. Shaded boxes indicate the position of polymorphic motifs ]

4.07%到 9.88%，平均 8.22%。基于氨基酸序列的 NJ 树与核苷酸序列的分析结果基本一致，也把 15 种序列分为两个独立的分支 (图 2 : b)。两支之间有 4 个氨基酸鉴别位点，分别为位点 26~28 和 30。

本研究得到的白 暨豚 DQB 核苷酸序列与白鲸 (*Delphinapterus leucas*) 及一角鲸 (*Monodon monoceros*) DQB1 序列 (Murray *et al.*, 1995) 的同源性达 88.4%~94.2%，平均为 90.7%，氨基酸序列的同源性从 75.4% 到 87.7%，平均为 80.6%。把白 暨豚的 DQB 基因的氨基酸序列与人及其它一些动物的 DQB 氨基酸序列进行比对时，发现它并不具备人和其它灵长类动物的 DQB2 基因

共有的基序，而与牛 DQB1 基因的基序相近 (图 3)。

### 3 讨 论

在本研究中，从 3 个白 暨豚个体中共获得了 MHC II 类 DQB 座位第二外元的 15 种序列。NJNU 0359 个体中出现的 7 种序列中，Live-DQB\*2~4、7 属于分支 1，Live-DQB\*8、10、12 属于分支 2。类似的情况也出现在个体 NJNU0380 和 NJNU0388。换言之，不同个体中均同时有分属于图 2 中的分支 1 和分支 2 的序列。这些序列中没有发现任何插入、缺失和异常的终止密码子，推测它们在体内应该具有生物学功能，而不是假基因拷贝。3 个白 暨豚个体中都出现了多种序列，提示这些序列不是来自单一的基因座位，即存在基因座位的重复现象。虽然如此，本文仍然参照近年来国际上同类研究的先例 (如 Nino-Vasque *et al.*, 2000)，将这些序列命名为 Live-DQB 序列。基因座位的重复现象在夜猴 (*Aotus nancymaae*) 的 DRB 座位 (Nino-Vasquez *et al.*, 2000)、牛 (*Bos taurus*) 的 DQ 座位 (Elizabeth *et al.*, 2000) 以及其他一些报道 (Rosal-Sanchez *et al.*, 1998; Knapp *et al.*, 1997) 中也有发现。如 Elizabeth *et al.* (2000) 发现牛的 DQA 和 DQB 座位均出现了 3 次重复，并认为这种座位的重复，加上单个座位内的多态性，使得基因产物及产物二聚体的多样性大大增加，由此牛能够表达产生多种 MHC 基因产物，并可能在特定抗原引起的免疫应答中发挥作用。

通过与白鲸的同源序列比对，确定本研究所得的白 暨豚 DQB 基因的氨基酸区段对应位点为 21~77。在这段区域中，参与抗原结合的位点为 28、30、32、37、38、47、56、60、61、65、68、70、71 和 74，共 14 个 (Brown *et al.*, 1993; 图 3)。对核苷酸替代的类型及位点进行分析，发现非同义替代 ( $d_N = 6.59$ ) 明显多于同义替代 ( $d_S = 2.57$ )，由此造成的氨基酸替换集中出现在抗原结合区附近 (图 3)。这表明正向选择起到了促进其多态性增加的作用，而这也是具有抗原呈递作用的蛋白质基因的典型特征 (Bergstrom *et al.*, 1995)。在发生替换的 15 个氨基酸位点中，有 3 个位点 (28、61 和 74) 的替换导致氨基酸残基的理化性质不保守。它们可能是 PBR 中引起抗原的选择性识别发生变化的重要位点 (图 3)。在分支 1 和分支 2 的鉴别位

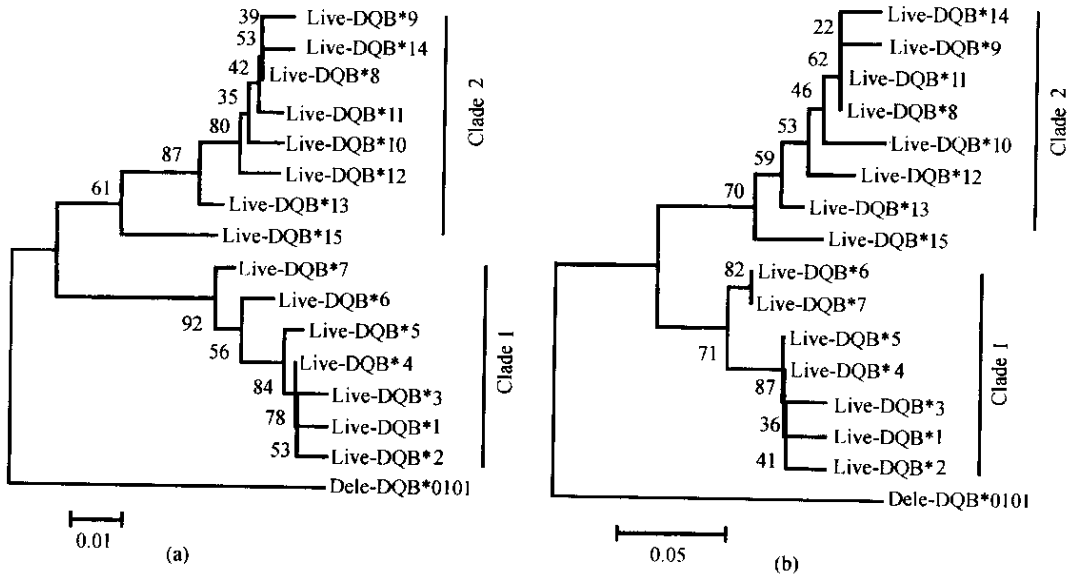


图2 NJ法构建的白豚DQB基因的系统发生树，以白鲸的Dele-DQB\*0101 (Murray *et al.*, 1995) 作外群

Fig. 2 Phylogenetic relationship of Baiji DQB sequences reconstructed by neighbor-joining method in computer program MEGA, with a beluga DQB allele (Dele-DQB\*0101) as outgroup

(a) 基于核苷酸序列 (Based on nucleotide acid sequences) (b) 基于氨基酸序列 (Based on amino acid sequences) 分支上方的数字为自引导值, 重复次数为1 000次 [Bootstrap values from 1 000 iterations were indicated above the branches]

点 (26~28 及 30) 中, 发生在位点 26、27 和 30 上的替换在理化性质上是保守的, 而在位点 28, 由带负电的谷氨酸替换为极性不带电荷的苏氨酸, 提示这两支序列的产物可能会有不同的抗原识别模式。类似的情况也出现在 Live-DQB\*10 中: 位点 61 的色氨酸 (非极性) 替换成了精氨酸 (极性带正电), 位点 74 的谷氨酸 (极性带负电) 替换成了甘氨酸 (非极性)。

本研究测得的序列与白鲸及一角鲸的 DQB1 基因有较高的同源性 (核苷酸: 90.7%, 氨基酸: 80.6%)。将这些序列与人及其它动物的 DQB 序列进行比对时, 发现它们不具备人和其它一些灵长类动物的 DQB2 基因共有的基序, 而与牛的 DQB1、DQB2 基因的基序相近。但考虑到牛 DQB2 座位的确定不及人和其它灵长类动物的准确和规范, 而是在有重复的单元型中, 将 DQB1 以外的那个座位称为 DQB2, 使得牛的 DQB2 与 DQB1 座位仅从序列差异上无法区分 (Marello *et al.*, 1995)。因此, 我们认为本研究得到的白豚的 MHC 序列应来自与 DQB1 基因相关的座位, 我们暂时统称为类 DQB1 座位 (DQB1-like locus)。不过, 它们究竟是否仅属于 DQB1 座位, 抑或还包括了与 DQB1 不同的其它座位, 需要今后进一步研究。

在白豚的类 DQB1 序列中, 似乎存在多个基序, 如 TTGTGGAGAGAT/ACATGACCAGAC (位点 18~29)、GTTTAC/ATACGT (位点 49~54) 及 AAA/AGA (位点 152~154) 的不同组合。序列 Live-DQB\*15 在位点 18~29 上的基序与 Live-DQB\*8 相同, 在位点 49~54 和 152~154 上的基序与 Live-DQB\*1 相同; 而序列 Live-DQB\*13 在位点 18~29、49~54 上的基序与 Live-DQB\*8 相同, 在位点 152~154 上的基序与 Live-DQB\*1 相同, 类似的情况在 Live-DQB\*6、Live-DQB\*7 中也有出现。这种情况可能是由基因转换 (Gene conversion) 造成的。基因转换又称座位间重组 (Inter-locus recombination), 指同一基因家族不同基因座位之间的序列片段的交换。它一方面可以产生等位基因的多样性, 另一方面也可能增加座位间基因的同源性。已有报道指出类似基因转换的事件在同一座位上的不同等位基因之间发生 (Wakeland *et al.*, 1990; Gyllensten *et al.*, 1991), 也可发生在关系较近的不同的 II 类座位 (如 DRB 座位) 的非等位基因之间 (Gorski *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1986), 甚至在关系较远的 II 类座位 (如 DQB 和 DRB) 的非等位基因之间也有发生 (Denaro *et al.*, 1984; Sigurdardottir *et al.*, 1992)。座位之间

白暨豚 DQB 基因的氨基酸序列 (Live-DQB amino acid sequences)

222222223333333333334444444444555555555566666666667777777777  
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567  
\*\*\*\*\*:!\*:\*\*\*\*\*:°\*:\*\*°\*:\*\*\*\*\*e\*\*\*\*:\*\*\*\*:\*e\*\*\*\*

Live-DQB*1	TERVRFVERYIYNREEFTRFSDAGEYRAVTELGRRTAEYWNSQKDLLEQKRAVVDT
Live-DQB*2	..... V. . . Q. ....
Live-DQB*3	..... L. . . V. ....
Live-DQB*4	..... V. ....
Live-DQB*5	..... V. ....
Live-DQB*6	..... V. .... R. E. . .
Live-DQB*7	..... V. .... R. E. . .
Live-DQB*8	.... YMT. H. .... YV. .... V. .... R. E. . .
Live-DQB*9	.... YMT. H. .... YV. .... VS. .... R. E. . .
Live-DQB*10	.... YMT. H. .... YV. .... V. .... R. .... R. G. . .
Live-DQB*11	.... YMT. H. .... YV. .... V. .... R. E. . .
Live-DQB*12	.... YMT. H. .... YV. N. V. .... R. ....
Live-DQB*13	.... YMT. H. .... YV. .... V. ....
Live-DQB*14	.... YMT. H. .... YV. .... V. .... R. .... R. E. . .
Live-DQB*15	.... YMT. H. .... V. ....

# # #    ##            #            #    ##    # # ##    #

牛 (Bos taurus) DQB1\DQB2 的氨基酸序列 (BoLA-DQB1\DQB2 amino acid sequences)

BoLA-DQB1	..... Y. T. .... Q. YV. .... V. .... P. . . PP. H. .... F. . . T. . E. . S
BoLA-DQB2	..... Y. T. .... Q. YA. .... W. .... L. P. . . PA. .... I. . . TW. E. . R

人和其它一些灵长类动物 DQB2 的氨基酸序列

(DQB2 amino acid sequences of huamn and some other primates)

人 (Homo sapiens)	.... GVA. Y. .... G. .... FQ. .... <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">-SI. D. . NY.</span> F. . . E. . A. . K
黑猩猩 (Pan troglodytes)	.... GVA. Y. .... G. .... FQ. .... <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">-SI. D. . NY.</span> F. . . E. . A. . K
倭黑猩猩 (Pan paniscus)	.... GVA. Y. .... GG. .... FQ. .... <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">-SI. D. . NY.</span> F. . . E. . A. . K
大猩猩 (Gorilla gorill)	.... GVA. Y. .... GG. . . . GW. FQ. .... <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">-SI. D. . NY.</span> F. . . E. . A. . K

图 3 白 暨豚、牛、人及其它一些灵长类动物 DQB 基因的氨基酸序列

Fig.3 DQB amino acid sequences of baiji , cattle , human and some other primates

图上方的数字表示相应氨基酸的位置 (Murray et al. , 1995) , 圆点 (·) 表示与 Live-DQB \* 1 有相同的氨基酸组成, 图上方的 (:)(°)(·) 分别表示氨基酸残基的理化性质高度保守、轻度保守和不保守, 星号 (\*) 表示 15 种氨基酸序列在该位点均一致, (#) 表示 PBR 所在位置 (Brown et al. , 1993) [The number above the sequences represents the amino acid position based on beluga DQB sequences (Murray et al. , 1995). As shown in figure 1 , identity to the first sequence is indicated by a dot (·). Amino acid substitutions leading to strong , weak , and no conservation of physiochemical properties of amino acid are indicated by (:), (°), and (·), respectively. Asterisk indicates the fully conserved residue of the amino acid. # indicates the site postulated to be responsible for selective peptide recognition (Brown et al. , 1993)]

的遗传交换被认为是猪 DRB1、DRB2 和 DRB3 等位基因之间出现多态基序共享现象的最合理的解释 (Brunsberg et al. , 1996)。

已有的研究结果显示, 海兽的 MHC 多态性水

平普遍低于陆生哺乳动物 (Slade , 1992) 。如 Murray et al. ( 1995 ) 发现白鲸 MHC DQB 座位的多态性水平比灵长类低得多。在鳍脚类的研究中也得到类似的结论 (Hoelzel et al. , 1999) 。海兽中较低

的 MHC 多态性被认为与其生活环境相关。因为与陆地环境相比,海洋环境中的病原微生物种类要少得多 (Slade, 1992)。但本研究却在白豚种群中检测出较为明显的 DQB 基因座位的重复现象,并有较丰富的序列多样性,这与其它海兽中相对较低的 MHC 基因多样性 (Murray *et al.*, 1995; Slade, 1992; Trowsdale *et al.*, 1989) 不一致。众所周知,白豚栖息于淡水环境中,种群数量急剧下降。随着长江流域经济的发展,长江中环境衰退,病原微生物多样性增加,从而使白豚面临了更高的平衡选择 (Balancing selection) 压力。白豚中存在较丰富的 DQB 序列和基因座位的重复,以及不同座位的非等位基因之间存在的基因转换等,是否与白豚在小种群状态下对淡水环境中相对较高的病原微生物多样性的进化适应相关,值得进行进一步的研究。

## 参考文献 (References)

- Bergstrom, T. and U. Gyllensten 1995 Evolution of MHC class II polymorphism: the rise and fall of class II gene function in primates. *Immunol. Rev.* **143**: 13 ~ 31.
- Brown, J. H., T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger and D. C. Wiley 1993 Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **332**: 845 ~ 850.
- Brunsborg, U., I. Edfors-Lija, L. Andersson and K. Gustafsson 1996 Structure and organization of pig MHC class II DRB genes: evidence for genetic exchange between loci. *Immunogenetics* **44**: 1 ~ 8.
- Denaro, M., U. Hammerling, L. Rask and P. A. Peterson 1984 The E<sup>b</sup>β gene may have acted as a donor gene in a gene conversion-like event generating the A<sup>bm12</sup>β mutant. *EMBO J.* **3**: 3 745 ~ 3 753.
- Elizabeth, J. G., R. A. Oliver and G. C. Russell 2000 Duplicated DQ haplotypes increase the complexity of restriction element usage in cattle. *J. Immunol.* **165**: 134 ~ 138.
- Gorski, J. and B. Mach 1986 Polymorphism of human Ia antigens: gene conservation between two Drβ loci results in a new HLA-D/DR specificity. *Nature* **322**: 67 ~ 69.
- Gyllensten, U. B., M. Sundvall and H. A. Ehrlich 1991 Allelic diversity is generated by intraexon sequence exchange at the DRB1 locus of primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3 686 ~ 3 690.
- Haig, S. H. 1998 Molecular contributions to conservation. *Ecology* **79**(2): 413 ~ 425.
- Hedrick, P. W. 1994 Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *American Naturalist* **143**: 945 ~ 964.
- Hoelzel, A. R., J. C. Stephens and S. J. O'Brien 1999 Molecular genetic diversity and evolution at the MHC DQB locus in four species of pinnipeds. *Mol. Biol. Evol.* **16**(5): 611 ~ 618.
- Jeanmougin, F., J. D. Thompson, M. Gouy, D. G. Higgins and T. J. Gibson 1998 Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 403 ~ 405.
- Knapp, L. A., L. F. Cadavid, M. E. Eberle, S. J. Knechtle, R. E. Bontrop and D. I. Watkins 1997 Identification of new mam-DRB alleles using DGGE and direct sequencing. *Immunogenetics* **45**(3): 171 ~ 179.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen and M. Nei 2001 MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1 244 ~ 1 245.
- Liu, S., G. Yang, G. Q. Ji and K. Y. Zhou 2001 Genetic diversity of Baiji population: evidence from mtDNA. *Biological Diversity* (Hong Kong) **9**: 92 ~ 95. [刘珊, 杨光, 季国庆, 周开亚 2001 白豚种群的遗传多样性分析: mtDNA 证据. 生物多样性 (香港) **9**: 92 ~ 95.]
- Marello, K. L., A. Gallagher, D. J. McKeever, R. L. Spooner and G. C. Russell 1995 Expression of multiple DQB genes in *Bos indicus* cattle. *Anim. Genet.* **26**: 345 ~ 349.
- Murray, B. W., S. Malik and B. N. White 1995 Sequence variation at the major histocompatibility complex locus DQB in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Mol. Biol. Evol.* **12**(4): 582 ~ 593.
- Nino-Vasquez, J. J., D. Vogel, R. Rodriguez and A. Moreno 2000 Sequence and diversity of DRB genes of *Aotus nancymae*, a primate model for human malaria parasites. *Immunogenetics* **51**: 219 ~ 230.
- O'Brien, S. J. and N. Yuhki 1999 Comparative genome organization of the major histocompatibility complex: lessons from the Felidae. *Immunology Review* **167**: 133 ~ 44.
- Rosal-Sanchez, M., E. Paz-Artal, M. A. Moreno-Pelayo, N. Martinez-Quiles, J. Martinez-Laso, J. M. Martin-Villa and A. Arnaiz-Villena 1998 Polymorphism of Mhc-DRB alleles in *Cercopithecus aethiops* (green monkey): generation and functionality. *Tissue Antigens* **51**(5): 541 ~ 548.
- Saitou, N. and M. Nei 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406 ~ 425.
- Sambrook, J., E. Fitch and T. Maniatis 1989 Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sigurdardottir, S., C. Borsch, K. Gustafsson and L. Andersson 1992 The exon encoding the antigen recognition site of class II β-chain is divided into two subregions with different evolutionary histories. *J. Immunol.* **148**: 968 ~ 973.
- Slade, R. W. 1992 Limited MHC polymorphism in the southern elephant seal: implications for MHC evolution and marine mammal population biology. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **249**: 163 ~ 171.
- Trowsdale, J., V. Gorves and A. Arnason 1989 Limited MHC polymorphism in whales. *Immunogenetics* **29**: 19 ~ 24.
- Wakeland, E. K., S. Boehme and J. X. She 1990 The generation and maintenance of MHC class II gene polymorphism in rodents.

*Immunol. Rev.* **113** :207 ~ 226.

Wu ,S. , T. L. Saunders and F. H. Bach 1986 Polymorphism of human Ia antigens generated by reciprocal intergenic exchange between two Dr $\beta$  loci. *Nature* **324** :676 ~ 679.

Yang , G. , X. Y. Chen , W. H. Ren and J. Yan 2002 MHC and its application in the population and conservation genetics. *Hereditas* ( Beijing ) **24** ( 6 ) : 712 ~ 714. [ 杨 光 , 陈旭衍 , 任文华 , 严 洁 2002 MHC 及其在种群遗传学和保护遗传学中的应

用. *遗传* **24** ( 6 ) : 712 ~ 714. ]

Yuhki , N. and S. J. O 'Brien 1990 DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** :836 ~ 840.

Zhou K. , J. Sun , A. Gao and B. Würsig 1998 Baiji ( *Lipotes vexillifer* ) in the lower Yangtze River : movements , numbers , threats and conservation needs. *Aquat. Mamm.* **24** :123 ~ 132.