

黄鹿 *Mhc-DRB* 基因多态性及其维持机制

虞健 梁文明 朱飞虎 徐思 吴海龙*

(安徽师范大学生命科学学院, 安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室, 芜湖 241000)

摘要: 利用牛 DRB3 特异性引物 (LA31 和 LA32), 通过聚合酶链式反应 (PCR)、单链构象多态性 (SSCP) 以及克隆测序技术, 从 12 只黄鹿个体中共获得 20 个 DRB 第二外显子等位基因, 其中 6 个个体具有 3~4 个等位基因, 提示利用该引物从黄鹿中至少可以扩增出 2 个 DRB 位点。所有序列均无插入、缺失和终止密码子。基于序列比对 (与牛 DRB3 和鹿科 DRB 基因同源性非常高), 以及所检测到的氨基酸变异位点主要位于抗原结合区, 推测本文所获得的黄鹿序列为表达的、且具有重要功能的 DRB 位点。抗原结合区氨基酸位点的非同义替换 (d_N) 显著大于同义替换 (d_S) ($P < 0.01$), 说明历史上黄鹿 DRB 基因经历过正选择作用。CODMEL 程序中的模型 M7 和 M8 似然比检测 (Likelihood ratio test, LRT) 结果同样支持上述推论。进一步利用经验贝叶斯法准确地检测出 6 个受正选择作用的氨基酸位点 (位点 11、37、61、67、71、86), 其中的 5 个位点位于 PBR 区。因此, 正选择作用可能是维持黄鹿 DRB 基因多态性的主要机制之一。基于 DRB 外显子 2 序列利用邻接法 (NJ) 构建了部分偶蹄动物系统发生关系, 在 NJ 树上, 黄鹿 DRB 基因与其它鹿科动物 DRB 基因呈镶嵌式分布, 提示跨物种进化是维持黄鹿 DRB 基因多态性的另一重要机制。此外, 黄鹿两个等位基因 (*Mure-DRB1* 和 *Mure-DRB11*) 和马鹿的两个等位基因 (*Ceel-DRB34* 和 *Ceel-DRB46*) 与牛科的等位基因构成一个独立的进化枝, 说明黄鹿和马鹿的某些 DRB 基因具有非常古老的谱系。

关键词: 黄鹿; *Mhc-DRB*; 多态性; 正选择; 鹿科

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2010) 01 - 0051 - 07

Maintenance of polymorphism of Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*) *Mhc-DRB* gene

YU Jian, LIANG Wenming, ZHU Feihu, XU Si, WU Hailong*

(College of Life Sciences, the Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety in Anhui Province, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: A pair of primers (LA31 and LA32) specific to *BoLA-DRB3* were used to amplify genomic DNA of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). Twenty distinct DRB exon 2 alleles were obtained from 12 individuals through polymerase chain reaction (PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP), and sequencing. At least two DRB loci could be discerned taking into account the fact that three to four alleles were identified from six of 12 individuals analyzed in this study. No insertion, deletion or stop codons within the nucleotide sequences were detected. Multiple sequence alignments demonstrated that the Chinese muntjac DRB alleles showed high similarity to that of the expressed *BoLA-DRB3* locus. The amino acid mutation sites were mainly present in the putative peptide binding region (PBR). These results evidenced that the loci isolated in this study were probably expressed and functioning. The frequency of nonsynonymous substitutions (d_N) was significantly greater than that of synonymous substitutions (d_S) ($P < 0.01$) in the peptide binding region (PBR) suggesting that the DRB gene of the Chinese muntjac had historically undergone positive selection. This inference was further confirmed through likelihood ratio test (LRT) from model M7 and M8 of program CODEML. Six robust positive selection amino acid sites (position 11, 37, 61, 67, 71 and 86) were detected by a Bayesian method, of which 5 sites located in PBR. These results provide evidence that positive selection is one of the main mechanisms in maintaining DRB gene polymorphism of the Chinese muntjac. A neighbor-join (NJ) tree was constructed based on DRB gene exon 2 sequences of several deer. In the NJ tree, the Chinese muntjac DRB alleles showed a mosaic pattern with that of other deer, implying a trans-species evolution pattern in maintaining DRB allele polymorphism. Moreover, two DRB alleles of Chinese muntjac (*Mure-DRB1* and *Mure-DRB11*) and two DRB alleles of red deer (*Ceel-DRB34* and *Ceel-DRB46*) were closely clustered with DRB3 alleles of cattle, suggesting some DRB alleles of Chinese muntjac and red deer might share an ancient lineage.

Key words: Cervidae; Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*); *Mhc-DRB*; Polymorphism; Positive selection

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30970433); 安徽省自然科学基金资助项目 (070413135)

作者简介: 虞健 (1986 -), 女, 硕士研究生, 主要从事动物保护遗传学研究。

收稿日期: 2009 - 09 - 07; 修回日期: 2009 - 11 - 24

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: whlong@mail.ahnu.edu.cn.

主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) 是脊椎动物特有的、与机体免疫应答密切相关的一类高度连锁的多基因家族 (Klein, 1986)。MHC 基因编码细胞表面受体蛋白, 其主要功能是识别、结合加工过的病原体, 并呈递给相应的 T 细胞, 进而诱发一系列的免疫反应 (Ploegh and Watts, 1998)。从进化的角度来看, MHC 基因最显著的特点是其表达位点具有非常高的多态性 (Piertney and Oliver, 2006), 而且这种多态性主要集中在抗原结合区 (peptide-binding region, PBR) (Hughes and Yeager, 1998; 杨光等, 2002), 因此, MHC 基因多态性被认为是由某种形式的平衡选择来维持的, 具有重要的进化适应意义 (Potts and Wakeland, 1990; Hedrick, 1994)。

大量的研究显示, MHC II 类 DRB 基因通常具有高水平的多态性, 因而在野生动物自然种群中的应用最受关注 (Schaschl *et al.*, 2006; Radwan *et al.*, 2007; Mona *et al.*, 2008)。Robinson 等 (2003) 报道了人类 MHC II 类 DRB1 基因具有 360 个等位基因。对其它非模式动物的研究表明, DRB 基因的多态性不仅仅局限于等位基因数的多寡, 还存在于基因结构的多样性上。加利福尼亚海狮 (*Zalophus californianus*) DRB 基因亚族至少有 7 个座位, 虽然每个座位 DRB 基因的多态性都不高, 但不同个体的 DRB 基因座位的结构呈现出较高的多样性 (Bowen *et al.*, 2004)。类似的情形在人类 (Khazand *et al.*, 1999) 以及恒河猴 (*Macaca mulatta*) (Andersson *et al.*, 1994) 等动物中都有报道。

有关偶蹄动物 (Artiodactyla) MHC 基因结构、拷贝数、基因多态性及其进化机制的研究报道很多, 但对鹿科动物 MHC 的相关研究却很少 (Van Den Bussche *et al.*, 1999)。Mikko 和 Andersson (1995) 在北美和欧洲驼鹿 (*Alces alces*) 种群中仅发现 10 个 DRB 第 2 外显子等位基因; Swarbric 等 (1995) 在一个圈养种群非近亲的 50 头马鹿 (*Cervus elaphus*) 中分离出 34 个 DRB 等位基因; Van Den Bussche 等 (1999) 从美国南部俄克拉何马州的 150 头白尾鹿 (*Odocoileus virginianus*) 中筛选出 15 个 DRB 等位基因。基于系统发生分析, 这些研究都认为 DRB 基因多态性主要是由跨物种 (trans-species) 进化以及正选择作用 (positive selection) 来维持的。此外, 前两个研究还发现了外显子之间的重组现象 (intra-exonic recombination), 但在白尾鹿中并没有检测到这种机制。根据鹿科两个亚科

(真鹿亚科和空齿鹿亚科) 4 种动物 DRB 等位基因的系统发生关系, Van Den Bussche 等 (1999) 进一步分析了鹿科动物 DRB 基因多态性进化机制, 认为跨物种现象是鹿科动物 DRB 基因共享的多态性维持机制。由于该研究没有包括麂亚科动物, 而且, 麂亚科动物的生态和行为习性 (麂类多喜独栖) 与其它集群生活的鹿类存在很大差别, 因此, 其结果尚不能完全代表鹿科动物 DRB 基因的进化模式。进一步对麂亚科动物 MHC II 类 DRB 基因组成、多态性维持机制进行研究, 将有助于更深入地理解鹿科动物 DRB 基因进化模式。

黄麂 (*Muntiacus reevesi*) 在动物分类学上属于鹿科 (Cervidae), 麂亚科 (Muntiacinae), 麂属 (*Muntiacus*), 广泛分布于我国亚热带地区, 不仅具有较高的经济价值, 在研究鹿科动物核型进化机制和系统发生关系上也具有重要的科研价值 (盛和林, 1992)。

本文拟利用牛 DRB3 基因第二外显子特异性, 扩增黄麂 DRB 基因第二外显子, 结合 SSCP 和测序技术, 初步分析黄麂的 DRB 基因结构及其多态性, 为鹿科动物 MHC 基因多态性进化机制补充来自麂亚科的证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及 DNA 的提取

本文共检测了 12 只黄麂, 样品 (均为黄麂皮张) 分别采自江西彭泽 (4 个体)、浙江临化 (4 个体) 以及安徽黄山 (4 个体), 个体间没有直接的亲缘关系 (随机取样)。按照 Wu 等 (2006) 的方法提取基因组 DNA。

1.2 PCR 扩增及 DNA 克隆测序

利用 Sigurdardottire 等 (1991) 的引物: LA 31: 5' GAT GGA TCC TCT CTC TGC AGC ACA TTT CCT 3' 和 LA32: 5' CTT GAA TTC GCG CTC ACC TCG CCG CTG 3', 扩增黄麂 DRB 基因第二外显子。PCR 反应体系为 40 μ L, 包含 40 ng 基因组 DNA, 引物 LA31、LA32 各 0.2 μ M, 200 μ M 的 dNTP, 2 mM MgCl₂, 1 U 的 Ex Taq 聚合酶。PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环后; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。PCR 结束后, 取 2 μ L 产物用于 1.2% 琼脂糖凝胶检测、拍照。余下的产物经 DNA 凝胶回收试剂盒 (X-gene) 回收, 与 pMD18-T 克隆载体 (宝生物工程公司) 连接, 转入 DH5 α 菌株, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。每个个体挑取 40 个克隆, 以菌液为模板, 利用

上述引物进行 PCR 扩增(反应体系 15 μ L),取 5 μ L PCR 产物,与加样缓冲液混合,95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 转置冰上冷却,加入 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(含 10% 的甘油),在 8 $^{\circ}$ C、300 V 电压下电泳 11 h。电泳结束后,硝酸银染色,用尼康(Nikon) D80 单镜头数码相机在自然光下拍照。根据 SSCP 结果挑选不同带型的克隆,送交上海英骏生物技术有限公司测序(每种带型不少于 3 个克隆)。本文每条序列都得到不同个体或同一个体至少两次独立 PCR 产物克隆的验证,根据 Klein 等(1990)的方法对获得的 DRB 序列进行命名。

1.3 序列分析

利用 Clustal X 软件(Thompson *et al.*, 1997)进行序列比对,应用 MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version) (Tamura *et al.*, 2007)将核酸序列翻译成氨基酸序列,并进行核酸位点和氨基酸位点变异检测,同时根据 Nei 和 Gojabori (1986)的方法,分别计算抗原结合位点(Brown *et al.*, 1993)与非抗原结合位点同义替换率(synonymous substitution rate, d_s)和非同义替换率(non-synonymous substitution rate, d_n)。

利用 PAML4.0 b (Yang, 1997)软件包中的 CODEML 程序检测氨基酸水平上的选择压力。该软件根据选择参数 ω ($\omega = d_n/d_s$) 的大小,推测目标序列是否经受选择压力,如果 ω 显著大于 1,则表明存在正选择作用。研究表明,这两个模型较其它模型抗重组干扰的能力更强 (Anisimova *et al.*, 2003),因此,本文主要比较 M7 和 M8 模型对数据组的计算结果。首先,计算出每个模型的最佳似然值,由于最佳似然值差异的 2 倍 ($2\Delta L$) 基本遵循卡方分布,然后根据卡方检验,即似然比检测(Likelihood ratio test, LRT) (Yang *et al.*, 2000) 本文数据组更适合哪个模型。如果结果显

示 M8 比 M7 更适合,则表明存在显著的正选择作用。此外,本文使用 CODEML 软件中的经验贝叶斯方法(empirical Bayes method)准确检测出哪些位点经历了正选择作用(Nielsen and Yang, 1998; Wong *et al.*, 2004)。

为了比较鹿科动物 DRB 基因第二外显子的变异,进而探讨鹿科动物 DRB 基因的进化关系,利用 GenBank 数据库中的 BLASTN 引擎搜索现有发表过的鹿科动物 DRB 基因,最终选择:驼鹿(*Alces alces*, X83279, X83280, X83285),马鹿(*Cervus elaphus*, U11216, U11219, U11227, U11230, U11231, U11233),白尾鹿(*Odocoileus virginianus*, AF082163, AF082166, AF082171),驯鹿(*Rangifer tarandus*, AF012720, AF012721, AF012724),黇鹿(*Cervus dama*, AF012725, AF012726),狍(*Capreolus capreolus*, U90923 - U90925)。利用 MEGA 软件中的邻接法(Neighbour-joining, NJ)基于 Kimura 双参数模型构建鹿科动物 DRB 基因系统发生关系,以牛(*Bos taurus*, AY847721, AY847723)和猪(*Sus scrofa*, EU087428, EU432075)的 DRB 第二外显子序列作为外类群。

2 结果

2.1 扩增结果及黄鹿 DRB 基因多态性

利用牛 DRB 基因第二外显子引物,从 12 个黄鹿样品中均得到单一的扩增产物,产物大小约 300 bp。PCR 回收产物克隆经 SSCP 分型共获得 20 个不同的等位基因,每个等位基因都得到了来自不同个体或同一个体至少两次独立 PCR 产物克隆的验证,所有等位基因已提交至 GenBank,其序列号为 GQ871791 - GQ871810。根据 Klein 等(1990)的方法对 DRB 第二外显子等位序列(GenBank accession number)的命名如表 1。

表 1 个体编号及其所扩增得到的等位基因

Table 1 Code of individuals and corresponding alleles

个体编号 Code of individual	序列代码 Code of sequences
1	<i>Mure-DRB</i> [*] 01、 <i>Mure-DRB</i> [*] 02、 <i>Mure-DRB</i> [*] 03、 <i>Mure-DRB</i> [*] 04
2	<i>Mure-DRB</i> [*] 02、 <i>Mure-DRB</i> [*] 05、 <i>Mure-DRB</i> [*] 06
3	<i>Mure-DRB</i> [*] 07
4	<i>Mure-DRB</i> [*] 14、 <i>Mure-DRB</i> [*] 15、 <i>Mure-DRB</i> [*] 16、 <i>Mure-DRB</i> [*] 17
5	<i>Mure-DRB</i> [*] 11
6	<i>Mure-DRB</i> [*] 01、 <i>Mure-DRB</i> [*] 03、 <i>Mure-DRB</i> [*] 04
7	<i>Mure-DRB</i> [*] 03、 <i>Mure-DRB</i> [*] 04、 <i>Mure-DRB</i> [*] 13
8	<i>Mure-DRB</i> [*] 06、 <i>Mure-DRB</i> [*] 09
9	<i>Mure-DRB</i> [*] 08、 <i>Mure-DRB</i> [*] 09
10	<i>Mure-DRB</i> [*] 10、 <i>Mure-DRB</i> [*] 04
11	<i>Mure-DRB</i> [*] 18、 <i>Mure-DRB</i> [*] 19、 <i>Mure-DRB</i> [*] 20
12	<i>Mure-DRB</i> [*] 12

在所扩增的 12 个黄麂个体中，有 6 个个体出现了 3~4 条序列（表 1），表明利用该引物从这些黄麂个体中至少扩增出了两个 DRB 座位。序列总长 307 bp，去掉引物序列之后，长度为 270 bp，通过同源序列比对，得到完整的第二外显子序列 249 bp。利用 MEGA 软件，将目标序列翻译成具有 83 个氨基酸的肽链。序列经对位排列和变异检测后，没有发现任何插入、缺失或异常的终止密码

子，因此，可以排除本文所扩增的 DRB 基因是假基因。在长 249 bp 的序列中，共检测到 84 个核苷酸变异位点，核苷酸变异位点的比例为 33.7%，而氨基酸变异位点的比例则高达 48.8%（41/84）（图 1）。序列间的碱基变异范围为 0.4%~18.9%，平均 11.6%；氨基酸变异范围为 1.2%~33.7%，平均 21.5%。

Label	+++	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	++	+		
<i>Mure-DRB*01</i>	EYYKSECHFF	NGTERVRF	FLD	RCFSNGE	ETL	RFDSDW	GEYR	ALTELGRP	DA	EYWN	SQKEYM	EQKRA	AVD	TY	
<i>Mure-DRB*02</i>	.HP.A...	S	Q.A	.YIY...	YVN....	S	K.Y....	A	IL...T	
<i>Mure-DRB*03</i>	L.TT....	S	...	Q.Q	..Y.Y....	V.....	K.Y....	FL	..R....	..Y...	GE..T	
<i>Mure-DRB*04</i>	..A.....	S	Q.L	.Q.YIY.R	.YV	F..V....	K.Y..	RT.LL	..EL....	AR.GE..T	
<i>Mure-DRB*05</i>	..A.....	S	Q.Q	.YIY.R	.YV	F..V....	P....	..Y....	FL	..EL..Y	IL...T	
<i>Mure-DRB*06</i>	..V.....	S	Q.K	.Y.C...YV	V..F..	V....	K....	ILN....	R.GE..T	
<i>Mure-DRB*07</i>	..A.....	S	Q.Q	.Q.YIY.R	.YV	F..V....	K.Y....	IL	..EL....	RFGVE...	
<i>Mure-DRB*08</i>	..H.G....	S	...	Q.Q	.Q.YIY.Q	.YV	V.....	S	K.Y....	VL	..E.....	
<i>Mure-DRB*09</i>	QHF.....	S	L	..YVY.R	.LV	.Y	V.....	I	KH....	IL	..DN....	FGE..T
<i>Mure-DRB*10</i>	L.TT....	S	...	Q.Q	..Y.Y....	V.....	K.Y....	FL	..R....	..Y...	VE..T	
<i>Mure-DRB*11</i>R	RAIL...T	
<i>Mure-DRB*12</i>	..V.....	S	...	Q.K	.Y.C...YV	V..F..	V....	W...	K....	T.VLN....	R.GE..T	
<i>Mure-DRB*13</i>	..V.....	S	...	Q.K	.Y.C...YV	V..F..	V....	K....	T.VLN....	R.GE..T	
<i>Mure-DRB*14</i>	..H.G....	S	...	Q.Q	.Q.YIY.Q	.YV	F..V....	S	K.Y....	VL	..E.....	
<i>Mure-DRB*15</i>	.HP.A...	S	Q.A	.YIY...	Y	V.....	S	K.Y....	A	IL...T	
<i>Mure-DRB*16</i>	QHF.....	S	L	..YVF.R	.YV	.Y	V.....	KH....	VL	..DN....GE..T	
<i>Mure-DRB*17</i>	..A.....	S	Q.Q	.YIY.R	.FV	F..V....	K.L....	LL	..R..Y	Y.....	
<i>Mure-DRB*18</i>	.HP.A...	S	Q.A	.YIY...	Y	F..V....	S	K.Y....	A	IL...T	
<i>Mure-DRB*19</i>	..H.G....	S	...	Q.Q	.Q.YIY.Q	.YV	V.....	S	K....	IL	..E.....	
<i>Mure-DRB*20</i>	L.TTK....	S	...	Q.Q	..Y.Y....	F	V.....	K.L....	LL	..R..Y	GE..T	
Sites	10	20	30	40	50	60	70	80	90						

图 1 黄麂 *Mhc-DRB* 基因第二外显子对应的氨基酸序列。圆点表示氨基酸在相应的位点与 *Mure-DRB*01* 一致；+ 表示根据人类 HLA II 类分子推断出的抗原结合位点（Brown *et al.*, 1993）。

Fig. 1 Alignment of Amino acid sequences for 20 Reeves' muntjak (*Muntiacus reevesi*) DRB alleles based on the standard one-letter code. A dot indicates that the amino acid at the position is the same as in *Mure-DRB*01*. Amino acid residues forming the putative peptide binding region are identified by a cross, numbering of amino acid position was based on *HLA-DRB* sequences (Brown *et al.*, 1993).

2.2 平衡选择检测

参照人类 HLA II 类分子的晶体三维结构 (Brown *et al.*, 1993)，对本文所获得的 DRB 序列抗原结合位点 (PBR) 进行了界定 (图 1)，PBR 区 24 个氨基酸位点中有 20 个存在变异，变异率高达 83.8%，而非 PBR 区，共有 21 个变异位点，变异率为 35.6% (图 1)。表明 DRB 基因的变异主要存在于 PBR 区域。而且，PBR 区非同义替换率 (d_N) 显著大于同义替换率 (d_S) ($P < 0.01$; 表 2)。

表 2 同义替换率和非同义替换率在 PBR 和非 PBR 区的分布
Table 2 Relative frequency of synonymous (d_S) and nonsynonymous (d_N) substitutions in the putative peptide binding region (PBR) and non-peptide binding region (non-PBR) among founder alleles

位点 Sites	d_N , %	d_S , %	d_N/d_S	P
PBR	38.3 ± 9.1	9.6 ± 3.7	3.99	0.001
Non-PBR	7.6 ± 1.9	6.4 ± 2.0	1.19	0.046

利用 CODEML 程序中的 M7 和 M8 模型对本文的数据进行了检测，结果发现模型 M8 比 M7 更适合本数据组，表明黄麂 DRB 基因经历了显著的正选择作用 ($P < 0.001$) (表 3)。为了更准确地检测正选择位点，进一步利用经验贝叶斯法，共检测到 6 个氨基酸位点受正选择作用 (位点 11、37、61、67、71、86)，除第 67 号氨基酸位点外，其它受选择作用的位点均位于 PBR 区 (表 3)。

表 3 模型 M7 和 M8 的似然率检验正选择的结果比较及估计的相关参数
Table 3 Likelihood ratio test (LRT) comparing the models M7 - M8 for evidence of positive selection and model parameters estimates

模型 Model	似然值 LnL	估计参数 Estimate parameters	似然率检验值 (LRT 值) $2\Delta L$
M7	-175.94	$P = 0.14$ $q = .22$	86.14
M8	-1232.895	$p_0 = 0.903$ ($p_1 = 0.097$) $P = 0.023$	($P < 0.001$)
		$q = 0.028$	
		$\omega = 8.459$	

2.3 鹿科动物 DRB 基因系统发生分析

以牛 (*Bola-DRB*) 和猪 (*Sla-DRB*) 的同源序列为外类群, 构建了代表鹿科 3 个亚科, 包括白尾鹿 (*Odvi-DRB*)、马鹿 (*Ceel-DRB*)、驼鹿 (*Alal-DRB*)、驯鹿 (*Rata-DRB*)、黧鹿 (*Ceda-DRB*)、狍 (*Caca-DRB*), 以及本文所获得的黄鹿 20 条序列在内的 7 种鹿 DRB 等位基因之间的系统发生关系 (图 2)。

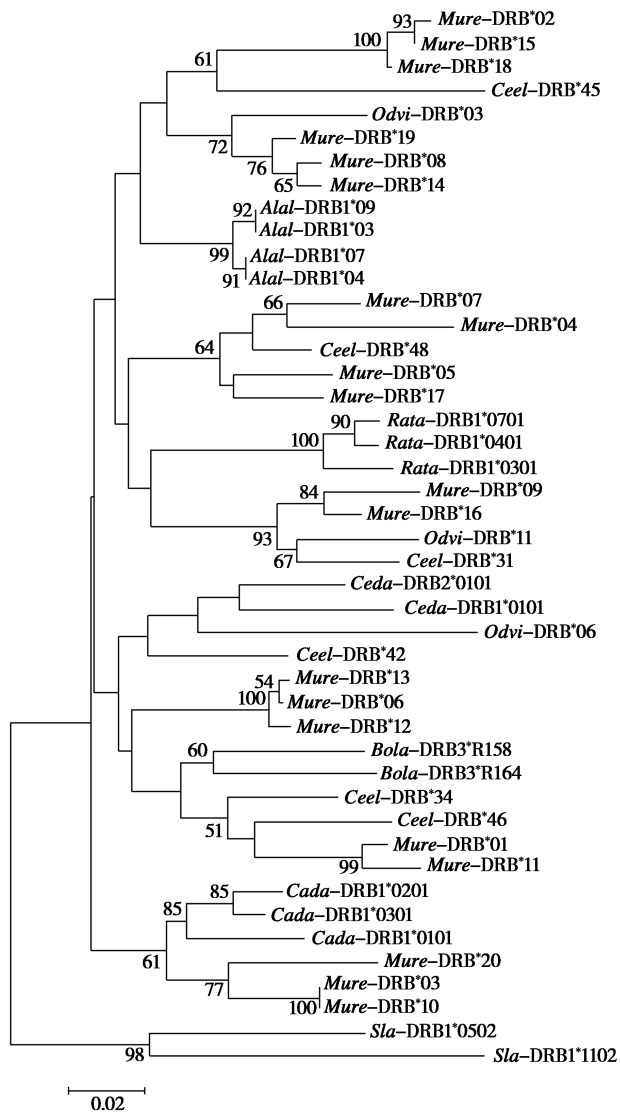


图 2 利用邻接法 (NJ) 基于 DRB 基因第二外显子序列构建的几种鹿科动物 DRB 等位基因系统发生关系。

Fig. 2 The phylogenetic relationship among DRB alleles of several deer was reconstructed based on *Mhc-DRB* gene exon 2 partial sequences using neighbor-joining (NJ) method. *Bola*: *Bos taurus*; *Sla*: *Sus scrofa*; *Mure*: *Muntiacus reevesi*; *Odvi*: *Odocoileus virginianus*; *Ceel*: *Cervus elaphus*; *Alal*: *Alces alces*; *Rata*: *Rangifer tarandus*; *Ceda*: *Cervus dama*; *Caca*: *Capreolus capreolus*.

从 NJ 树上可以看出, 除空齿鹿亚科的驼鹿和驯鹿 DRB 等位基因分别构成单系群外, 黧鹿和狍

的序列相对集中分布, 而黄鹿和马鹿 DRB 等位基因在系统树中最为分散, 呈镶嵌状排列, 黄鹿 DRB 序列多以几个序列构成小的分支与其他鹿类序列构成并系关系。值得指出的是, 黄鹿的 *Mure-DRB8*、*Mure-DRB14* 和 *Mure-DRB19* 与空齿鹿亚科的大部分白尾鹿序列构成一个独立的分支, 此外, *Mure-DRB1* 和 *Mure-DRB11* 分别与马鹿的 *Ceel-DRB46* 和 *Ceel-DRB34* 以及牛的 2 个等位基因构成一个独立的分支。

3 讨论

本文利用牛科 DRB3 基因特异性引物 LA31 和 LA32, 从 12 个黄鹿样品基因组 DNA 中分离出 20 个 *Mhc-DRB* 等位基因。此前的研究表明, 该引物在其他鹿科动物中同样具有良好的扩增效果 (Mikko and Anderson, 1995; Mikko *et al.*, 1999; Van Den Bussche *et al.*, 1999, 2002)。尽管扩增模板不是 cDNA, 但本文所得序列经与牛 DRB3 以及鹿科其它动物 DRB 表达位点比对, 序列间同源性极高, 且没有发现任何插入、缺失或终止密码子, 提示本文所扩增的位点是与牛 DRB3 同源的表达位点 (Mikko *et al.*, 1999)。

无论是等位基因序列间的变异, 等位基因数, 还是扩增出的位点数, 均显示黄鹿 *Mhc-DRB* 基因具有非常高的多样性 (表 1, 图 1)。首先, 12 个个体中有 6 个个体具有 2 个以上的等位基因, 表明利用该引物从黄鹿中至少扩增出 2 个 DRB 位点。据文献报道, 迄今, 仅马鹿和黧鹿具有两个 DRB 位点, 其中黧鹿两个位点都是单态的, 而其它被研究过的鹿类均只有单一的位点。由于种群历史瓶颈效应等种群或生态的因素, 驼鹿、黧鹿和驯鹿都表现出较低的 DRB 基因多态性, 白尾鹿和马鹿则具有较高的 DRB 基因多态性 (Swarbrick *et al.*, 1995; Mikko and Anderson, 1995; Mikko *et al.*, 1999; Van Den Bussche *et al.*, 1999, 2002)。Van Den Bussche 等 (1999) 从 150 头白尾鹿中仅获得 DRB 基因 1 个位点的 15 个等位基因, 而 Swarbrick 等 (1995) 从 50 头马鹿中分离出代表 2 个 DRB 位点的 34 个等位基因。本文从 12 个样品中扩增出至少两个 DRB 位点的 20 个等位基因, 因此, 与白尾鹿和马鹿相比, 黄鹿 DRB 基因具有较高的多态性。通常认为, MHC 基因多态性与种群历史、选择压力、社群结构以及交配机制等因素相关。一般而言, 经历过瓶颈效应的动物 MHC 多态性较低; 群

体生活的动物较独栖动物具有较高的 MHC 多态性, 因为独居的宿主种群不需要高水平的 MHC 多态性来对抗种群内蔓延的病原体 (Wills and Green, 1995); 环境病原体种类多的动物较环境病原体稀少的动物具有较高的 MHC 多态性 (Hoelzel *et al.*, 1999; Westerdahl *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2005)。没有资料显示黄麂经历过历史瓶颈效应, 该物种多独栖, 在我国广泛分布于亚热带森林中。黄麂虽然不具有复杂的社群结构, 却拥有非常高的 DRB 基因多态性, 因此, 独栖动物 MHC 多态性不一定就低, 而环境选择压力可能是维持黄麂 DRB 基因多态性的重要因素。

黄麂 DRB 第二外显子序列核苷酸变异位点的比例为 33.7%, 氨基酸变异位点的比例高达 48.8%, 与白尾鹿 DRB 基因序列变异水平大致相似 (Van Den Bussche *et al.*, 1999)。抗原结合区氨基酸变异位点的比例高达 83.8%, 而非 PBR 区域的比例仅为 35.6%, 而且, 抗原结合区 (PBR) 同义替换率 (d_s) 显著地小于非同义替换率 (d_n) ($P < 0.01$)。说明黄麂 DRB 基因第二外显子的氨基酸变异主要集中在抗原结合区, 抗原结合区氨基酸位点经历了明显的正选择作用。这些结果进一步得到来自 CODEML 程序中模型 M7 和 M8 检测结果的印证 (表 3)。利用经验贝叶斯法准确检测出 6 个受正选择作用的氨基酸位点 (位点 11、37、61、67、71、86), 而且其中的 5 个位点位于 PBR 区 (表 3)。因此, 正选择作用是维持黄麂 DRB 基因多态性的主要维持机制, 本文结果同时支持正选择作用也是鹿科动物 DRB 基因进化的重要机制之一 (Mikko *et al.*, 1999; Van Den Bussche *et al.*, 1999)。

Mikko 等 (1999) 对部分反刍动物 (包括鹿科和牛科部分动物) DRB 基因进化关系进行了研究, 认为反刍类 DRB 基因的进化机制与灵长类的差别较大, 牛科 DRB 序列和鹿科 DRB 序列几乎不重叠, 同种或近缘种 DRB 基因优先聚类。Van Den Bussche 等 (1999) 对鹿科 (包括真鹿亚科和空齿鹿亚科) 动物 DRB 基因的系统进化关系进行了分析, 认为跨物种 (trans-species) 现象是鹿科动物 DRB 基因共享的多态性维持机制, 但这些研究均没有包含鹿科麂亚科动物。本文 DRB 基因系统关系分析包括了代表鹿科 3 个亚科的 7 种鹿科动物的序列, 此外, 加入了牛和猪的部分 DRB 序列作为对照。NJ 树上序列的排列方式最显著的特点是鹿

科 3 个亚科 DRB 基因并未分别形成独立的进化枝, 虽然空齿鹿亚科的驼鹿 DRB 序列构成独立的分支, 但白尾鹿、狍及驯鹿的 DRB 等位基因却与鹿亚科和麂亚科的序列呈复系关系。显然, 鹿科 DRB 基因存在明显的跨物种进化现象, 与此前的研究结果是一致的 (Mikko *et al.*, 1999; Van Den Bussche *et al.*, 1999)。值得提出的是黄麂两个等位基因 (*Mure-DRB1* 和 *Mure-DRB11*) 和马鹿的两个等位基因 (*Ceel-DRB34* 和 *Ceel-DRB46*) 与牛科的 2 个等位基因构成一个独立的进化枝。实际上, Mikko 等 (1999) 在对反刍类 DRB 等位基因系统关系进行分析时, 观察到在所有鹿科 DRB 序列中仅马鹿的这两个序列与牛科 DRB 等位基因聚类, 由于这两条序列与其它鹿科同源序列间的变异远大于与羊同源序列之间的变异, 而马鹿与羊之间的分歧时间距今约 2~5 千万年前, 作者因此怀疑马鹿这两个等位基因的真实性。本文结果证实 Mikko 等 (1999) 所观察到的 DRB 等位基因谱系是真实的, 而非序列问题。科间跨物种进化在其它类似的研究中也有报道, 如大熊猫 (*Ailuropoda melannoleuca*) DRB 等位基因中同样存在 (Wan *et al.*, 2006), 大熊猫 7 个 DRB 等位基因中, 有 2 个与猫科动物 DRB 基因的关系比与本种其他 5 个等位基因的关系更近。Xu 等 (2008) 认为大多数跨物种进化主要存在于属内或科内, 科间物种序列共享现象也可能源于趋同进化, 即不同的物种具有相似的环境选择压力 (共享相似的环境病原体)。这种解释并不适合本文所观察到的结果, 因为黄麂与牛、马鹿以及白尾鹿的栖息环境、行为模式等差别很大, 很难想象这些物种共享相同的环境选择压力。因此, 本文所检测到的黄麂部分 DRB 等位基因具有非常古老的谱系, 其保留的时间距今约千万年以上, 与灵长类 DRB 基因多态性维持机制类似 (Gyllensten *et al.*, 1991)。因此, 跨物种现象是维持黄麂 DRB 基因多态性的另一重要机制。

参考文献:

- Andersson G, Andersson L, Larhammar D, Rask L, Sigurdardottis S. 1994. Simplifying genetic locus assignment of HLA-DRB genes. *Immunol Today*, **15**: 58-62.
- Anisimova M, Nielsen R, Yang Z. 2003. Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. *Genetics*, **164**: 1229-1236.
- Bowen L, Aldridge B M, Gulland F, Van Bonn W, DeLong R, Melin S, Lowenstine L J, Sott J F, Johnson M L. 2004. Class II multifunctionality generated by variable MHC-DRB region configurations in the Cali-

- fomia sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics*, **56**: 12–27.
- Brown J H, Jardetzky T S, Gorga J C, Gorga J C, Stern L J, Urban R G, Stominger J L, Wiley D C. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, **64**: 33–39.
- Gyllenstein U, Sundvall M, Ezcurra I, Erlich H A. 1991. Genetic diversity at class II DRB loci of the primate MHC. *J Immunol*, **146** (12): 4368–4376.
- Hedrick P W. 1994. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *Am Nat*, **143**: 945–964.
- Hoelzel A R, Stephens J C, O'Brien S J. 1999. Molecular genetic diversity and evolution at the MHC DQB locus in four species of pinnipeds. *Mol Bio Evol*, **16** (5): 611–618.
- Hughes A L, Yeager M. 1998. Natural selection and the evolutionary history of major histocompatibility complex loci. *Front Biosci*, **3**: 509–516.
- Khazand M, Peiberg C, Nagy M, Saueremann U. 1999. Mhc-DQ-DRB haplotype analysis in the rhesus macaque: evidence for a number of different haplotypes displaying a low allelic polymorphism. *Tissue Antigens*, **54**: 615–624.
- Klein J. 1986. Natural History of the Major Histocompatibility Complex. 1st ed. John Wiley, Sons: New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Klein J, Bontrop R E, Dawkins R L, Erlich H A, Gyllenstein U B, Heise E R, Jones P P, Parham P, Wakeland E K, Watkins D I. 1990. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. *Immunogenetics*, **31**: 217–219.
- Mikko S, Andersson L. 1995. Low major histocompatibility complex class II diversity in European and North American moose. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 4259–4263.
- Mikko S, Roed K, Schmutz S, Andersson L. 1999. Monomorphism and polymorphism at Mhc DRB loci in domestic and wild ruminants. *Immunol Rev*, **167**: 169–178.
- Mona S, Crestanello B, Bankhead-Dronnet S, Pecchioli E, Ingrosso S, D'Amelio S, Rossi L, Meneguz P G, Bertorelle G. 2008. Disentangling the effects of recombination, selection and demography on the genetic variation at a major histocompatibility complex class II gene in the alpine chamois. *Mol Ecol*, **17**: 4053–4067.
- Nei M, Gojobori T. 1986. Simple method for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol*, **3**: 418–426.
- Nielsen R, Yang Z. 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics*, **148**: 929–936.
- Piertney S B, Oliver M K. 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, **96**: 7–11.
- Ploegh H, Watts C. 1998. Antigen recognition. *Curr Opin Immunol*, **10**: 57–58.
- Potts W K, Wakeland E K. 1990. Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. *Trends Ecol Evol*, **5**: 181–186.
- Radwan J, Kawalko A, Wojeik J M, Babik W. 2007. MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Mol Ecol*, **16**: 531–540.
- Robinson J, Waller M J, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy L J, Stoehr P, Marsh S G. 2003. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res*, **31**: 311–314.
- Schaschl H, Wandeler P, Suchentrunk F, Obexer-Ruff G, Goodma S J. 2006. Selection and recombination drive the evolution of MHC class II DRB diversity in ungulates. *Heredity*, **97**: 427–437.
- Sigurdardottir S, Borsch C, Gustaffson K, Andersson L. 1991. Cloning and sequencing analysis of 14 DRB alleles of bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. *Anim Genet*, **22**: 199–209.
- Swarbrick P A, Schwaiger F W, Epplen J T, Buchan G S, Griffin F T, Crawford A M. 1995. Cloning and sequencing of expressed DRB genes of the red deer (*Cervus elaphus*) Mhc. *Immunogenetics*, **42**: 1–9.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, **24**: 1596–1599.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **24**: 4876–4882.
- Van Den Bussche R A, Hooper S R, Lochmiller R L. 1999. Characterization of Mhc-DRB allelic diversity in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) provides insight into Mhc-DRB allelic evolution within Cervidae. *Immunogenetics*, **49**: 429–437.
- Van Den Bussche R A, Ross T G, Hooper S R. 2002. Genetic variation at a major histocompatibility locus within and among populations of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Mammal*, **83** (1): 31–39.
- Wan Q H, Zhu L, Wu H, Fang S G. 2006. Major histocompatibility complex class II variation in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Mol Ecol*, **15**: 2441–2450.
- Westerdahl H W, Itzell H, Schantz T V. 2000. MHC diversity in two passerine birds: no evidence for a minimal essential MHC. *Immunogenetics*, **52**: 92–100.
- Wills C, Green D R. 1995. A genetic herdimmunity model for the maintenance of MHC polymorphism. *Immunol Rev*, **143**: 263–292.
- Wong W S, Yang Z, Goldman N, Nielsen R. 2004. Accuracy and power of statistical methods for detecting adaptive evolution in protein coding sequences and for identifying positively selected sites. *Genetics*, **168**: 1041–1051.
- Wu H L, Wan Q H, Fang S H. 2006. Population structure and gene flow among wild populations of the black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) based on mitochondrial DNA control region sequences. *Zool Sci*, **23**: 333–340.
- Xu S X, Chen B Y, Zhou K Y, Yang G. 2008. High similarity at three MHC loci between the baiji and finless porpoise: Trans-species or convergent evolution? *Mol Phylogenet Evol*, **47**: 36–44.
- Yang G, Yan J, Zhou K, Wei F. 2005. Sequence variation and gene duplication at MHC DQB Loci of Baiji (*Lipotes vexillifer*), a Chinese River Dolphin. *J Hered*, **96** (4): 310–317.
- Yang Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci*, **13**: 555–556.
- Yang Z H, Swanson W J, Vacquier V D. 2000. Maximum-likelihood analysis of molecular adaptation in abalone sperm lysin reveals variable selective pressures among lineages and sites. *Mol Biol Evol*, **17**: 1446–1455.
- Yang G, Chen X Y, Ren W H, Yan J. 2002. MHC and its application in the population and conservation genetics. *Hereditas*, **24** (6): 712–714. (in Chinese)
- 盛和林. 1992. 中国鹿类动物. 上海: 华东师范大学出版社.
- 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.