

文章编号:1000-0615(2006)02-0197-07

中华鳖群体间编码 MHC I 类分子 $\alpha 2$ 结构域基因的克隆及序列分析

刘至治, 蔡完其, 李思发

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:通过主要组织相容性复合体(MHC)基因的分析,探讨了中华鳖5个群体(黄河、淮河、洞庭湖、鄱阳湖、太湖)间的遗传变异与分化。中华鳖编码 MHC I 类分子 $\alpha 2$ 结构域基因的多态性很丰富。主要表现在:(1)中华鳖编码 MHC I 类分子 $\alpha 2$ 结构域的基因序列存在插入或缺失变异,共获得7种不同长度的基因序列,其中222 bp、231 bp 分别在42、23个体出现,为两种主要长度的基因序列;(2)共获得41种不同的核苷酸序列,这些核苷酸序列的相似度在0.386~0.995之间,表明序列间的歧异度较大;(3)在所有核苷酸序列中,共有250个有效位点,其中174个为变异位点,多态位点百分率达69.6%,但群体间存在差异:多态位点百分率大小顺序为鄱阳湖鳖(71.02%)>太湖鳖(58.05%)>淮河鳖(57.69%)>黄河鳖(55.32%)>洞庭湖鳖(48.09%);核苷酸多样性指数(H)大小顺序为鄱阳湖鳖(0.4273)>太湖鳖(0.2872)>洞庭湖鳖(0.2840)>黄河鳖(0.2727)>淮河鳖(0.2463);(4)分子方差分析(AMOVA)表明,太湖鳖与黄河鳖、淮河鳖2群体间,淮河鳖与洞庭湖鳖间有极显著的遗传分化($P<0.001$);(5)根据核苷酸序列的平均遗传距离,用UPGMA和NJ法进行聚类分析,黄河鳖与淮河鳖、洞庭湖鳖与太湖鳖分别先聚在一起,最后再与鄱阳湖鳖聚类,显示鄱阳湖鳖与其它4群体中华鳖在MHC基因上有明显歧化。

关键词:中华鳖;群体;克隆;遗传变异;主要组织相容性复合体(MHC)

中图分类号:Q785;S917 **文献标识码:**A

Cloning and sequencing analysis of the gene encoding MHC class I molecule alpha 2 domain in populations of *Trionyx sinensis*

LIU Zhi-zhi, CAI Wan-qi, LI Si-fa

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract:The major histocompatibility complex (MHC) was used to study the genetic variation and differentiation in five populations (Yellow River population, Huai River population, Dongting Lake population, Poyang Lake population and Taihu Lake population) of *Trionyx sinensis*. The major results indicated that the polymorphism of the gene encoding MHC class I molecule $\alpha 2$ domain in five populations of *T. sinensis* was rich. They were: (1) Some nucleotide sequences showed deletions or insertions. Seven different length sequences were obtained, of which 222 bp and 231 bp sequences were the major ones, existing in 42, 23 individuals respectively. (2) 41 different nucleotide sequences were got from 102 clones. The range of similarities of nucleotides was 0.386 - 0.995, indicating relatively high difference. (3) Totally, there were 250 usable loci, of which 174 ones were polymorphic sites, accounting for 69.6%. But there were some differences among populations as follows: The percentage of polymorphic loci was: Poyang Lake population (71.2%) > Taihu Lake population (58.05%) > Huai River population (57.69%) > Yellow River population

收稿日期:2005-04-27

资助项目:上海市水产办“中华鳖良种筛选和培育”项目(科04-06);上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介:刘至治(1972-),男,湖南新宁人,讲师,博士,从事水产动物医学及鱼类分子生物学的研究。Tel:021-65710211, E-mail:

zzliu@shfu.edu.cn

通讯作者:蔡完其, Tel:021-65710333, E-mail:lsf038@mail.online.sh.cn

(55.32%) > Dongting Lake population (48.09%) . The range of nucleotide diversity index () was : Poyang Lake population (0.4273) > Taihu Lake population (0.2872) > Dongting Lake population (0.2840) > Yellow River population (0.2727) > Huai River population (0.2463) . (4) The results of analysis of molecular variance (AMOVA) showed that there was significantly genetic differentiation between Taihu Lake population and Yellow River population, Huai River population, respectively, also between Huai River population and Dongting Lake population ($P < 0.001$) . (5) Yellow River and Huai River population, Dongting Lake and Taihu lake population clustered first respectively, then they clustered with Poyang Lake population by UPGMA and NJ method according to their nucleotide sequences average genetic distances, indicating an obvious divergence between Poyang Lake population and the other four populations on MHC.

Key words: *Trionyx sinensis*; population; clone; genetic variation; major histocompatibility complex (MHC)

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, 简称 MHC) 是由一组高度多态性基因组成的染色体区域。MHC 编码的细胞表面糖蛋白能与抗原肽结合, 通过与 T 细胞的相互作用, 诱导和调节机体的免疫应答, 激发机体的特异性免疫反应, 在免疫学上具有极为重要的意义^[1,2]。目前已知 MHC 是多态性最丰富的一个基因系统, 拥有极大数量的等位基因, 赋予种群巨大潜力以适应多变的内外环境^[2-4]。运用 MHC 来进行种群遗传学、保护遗传学的研究, 是近年来一个热点和新增长点^[5,6]。Miller 等应用 MHC I 类基因的多态性成功地区分了大鳞大马哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*)、银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 的不同自然群体^[7,8], 蔡完其等^[9]应用 MHC 类₂ 结构域基因探讨了红鲤 4 群体间的遗传差异。但对爬行动物 MHC 基因结构与功能的了解还很有限^[10]。夏春^[11]曾从生物进化的角度探讨过中华鳖 (*Trionyx sinensis*) MHC 类₂ 结构域基因 (*Trsi-BX1*) 与其它脊椎动物的同源性。本研究对中华鳖编码 MHC I 类分子₂ 结构域的基因进行克隆和序列分析, 探讨使用 MHC 基因序列多态性来了解中华鳖群体间的遗传变异与分化, 为进一步认识中华鳖 MHC 基因结构与功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黄河鳖、淮河鳖、洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖和太湖鳖各群体随机取健康鳖 20 只, 体重为每只 350 ~ 550 g。取腿部肌肉, -20℃ 保存备用。Taq DNA 聚合酶购自加拿大 Biostar 公司。

1.2 基因组 DNA 的提取

参照文献^[12]的方法提取 DNA。黄河鳖、淮河鳖、洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖和太湖鳖分别得到 15、11、14、11 和 15 份高质量的基因组 DNA 用于 PCR

扩增。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

引物设计 根据已报道的中华鳖 MHC I 类₂ 结构域基因的部分序列^[11], 设计特异性引物一对, 由上海生工生物工程技术服务有限公司进行合成。正向引物: 5' - CAG CAG ATG TAT GGG TGT GA - 3', 反向引物: 5' - TTT AAG CCA CTC GAT GCA GA - 3'。

PCR 扩增 PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪上进行, 反应混合物中含 3 μL buffer (100 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 9.5, 500 mmol L⁻¹ KCl, 30 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0.01% 明胶, 最后调节 pH 值至 9.0)。1 μL 每种 dNTP (2.5 mmol L⁻¹), 正、反引物各 1 μL (10 μmol L⁻¹), 2 μL 基因组 DNA (约 40 ~ 200 ng), 1.2 U Taq DNA 聚合酶, 16.4 μL 纯净水 (购自华舜生物工程有限公司), 反应总体积为 25 μL, 加入 20 μL 石蜡油。循环程序为: 95℃ 预变性 3 min; 接着 94℃ 1 min, 55.5℃ 1 min, 68℃ 1 min, 40 个循环后, 72℃

延伸 10 min。取 10 μL 扩增产物经 2.0% 进口琼脂糖凝胶 (含适量 EB) 电泳, 电泳缓冲液为 1 × TBE, 电压 4.5 V · cm⁻¹, 电泳 2.5 h 后, 用 Gene-Genius 凝胶成像系统拍照、记录和分析。

1.4 PCR 扩增产物的克隆与测序

PCR 产物经 2.0% 的进口琼脂糖凝胶电泳后, 在手持式紫外分析仪 (ZFP 型) 照射下, 割下含目的 DNA 片段的胶块, 用胶回收试剂盒 (CASpure Gel Extraction Kit) 进行回收纯化。接着用连接试剂盒 [pGEM⁻-T Vector System I] 进行目的片段与载体的连接, 把重组子转入大肠杆菌 DH₅ 感受态细胞, 取 100 μL 转化液涂布于 LB 抗性平板, 采用菌落 PCR 法筛选阳性克隆。对确认含有目的基因片段的阳性克隆, 用接种环挑取少量菌种, 接种于盛有 2 mL LB 液体培养基的试管中, 于 37℃、

250 r·min⁻¹ 摇床培养 16~18 h 后,取 200 μ L 菌液,加入 200 μ L 甘油,混匀,-20^oC 保存,待测序。

所有克隆样品送至联合基因科技(集团)有限公司,用 3700 型全自动 DNA 测序仪测序。每个体测序 1~2 个克隆,并对每一个克隆进行编号。

1.5 数据处理和分析

测序的序列结果用 BioEdit 软件^[13]进行编辑、CLUSTAL W 软件^[14]进行序列重排和同源比较。用 Arlequin 2.0 软件^[15]对重排后的序列进行分子方差分析,通过 Kimura 2P 法计算编码中华鳖 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的群体间平均核苷酸序列遗传距离、核苷酸多样性指数(D)、基因多样性指数(H)和遗传分化指数(F_{st})。根据群体间的遗传距离,用 MEGA 2 软件包^[16]中的“NJ”和“UPGMA”程序对 5 群体进行聚类分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

用自行设计的 1 对特异性引物,对中华鳖 5 群体共 66 个体编码 MHC I 类分子 α_2 结构域的基因进行 PCR 扩增,效果良好,得到 1 条 222 bp 左右大小的扩增带,如图 1 所示。

2.2 编码 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的序列差异

群体内的核苷酸序列差异 共对目的基因

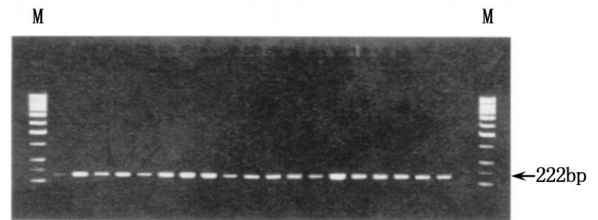


图 1 中华鳖 5 群体部分样品编码 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of the gene encoding MHC class I molecule α_2 domain in some individuals of five populations of *T. sinensis*
M: GeneRuler™ 50bp DNA ladder

片段测序 102 个克隆。结果表明,中华鳖编码 MHC I 类分子 α_2 结构域的基因序列存在插入或缺失变异,获得 214、220、222、229、230、231 和 234 bp 共 7 种不同长度的核苷酸序列,其中分别有 42、23 个体出现长度为 222 bp、231 bp 的核苷酸序列,另外 5 种长度的核苷酸序列却分别只存在 1~2 个体中。各群体分别获得 10~13 种不同的核苷酸序列,每两个群体之间共有 3~5 种序列,而另外的 6~8 种序列为各群体特有,因此,共有 41 种不同的核苷酸序列^[17],序列的相似度在 0.386~0.995(表 1)。

表 1 5 群体中华鳖编码 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的测序结果比较

Tab. 1 Comparison of sequencing results of the gene encoding MHC class I molecule α_2 domain in five populations of *T. sinensis*

	黄河鳖 Yellow R.	淮河鳖 Huai R.	洞庭湖鳖 Dongting L.	鄱阳湖鳖 Poyang L.	太湖鳖 Taihu L.
测序样本数 no. of sequenced individuals	15	11	14	11	15
测序克隆数 no. of sequenced clones	25	17	21	16	23
不同核苷酸序列数 different nucleotide sequences	13	11	10	11	12
特有核苷酸序列 sequence only existed in a population	8	6	6	6	8
核苷酸序列间的相似度 range of similarities of nucleotide sequences	0.491~0.995	0.487~0.995	0.534~0.995	0.386~0.995	0.502~0.995

各群体中华鳖在核苷酸序列转换数和颠换数上的差异如下:鄱阳湖鳖最高,分别为 84、97;洞庭湖鳖最低,分别为 44、51;黄河鳖的转换数(68)高于淮河鳖(59)、太湖鳖(52),但其颠换数(61)与

淮河鳖(62)相当、却低于太湖鳖(70)。

群体间的核苷酸序列差异 5 群体间碱基 T、A 的相对含量接近,但黄河鳖、淮河鳖碱基 G、C 的含量比长江流域的洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖和太

湖鳖高出 2.63% ~ 3.55% (表 2)。经两两配对比较,太湖鳖与黄河鳖、淮河鳖及洞庭湖鳖间的核苷酸转换数(21 ~ 22)和颠换数(26 ~ 27)接近,黄河鳖与淮河鳖间的核苷酸转换数(20)和颠换数(24)

表 2 中华鳖 5 群体间编码 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的核苷酸组成

Tab. 2 Nucleotide composition of the gene encoding MHC class I molecule α_2 domain among five populations of *T. sinensis* %

	C	T	A	G	G+C
黄河鳖 Yellow R.	21.63	21.65	26.21	30.51	53.14
淮河鳖 Huai R.	21.96	20.60	25.81	31.63	53.59
洞庭湖鳖 Dongting L.	21.43	22.90	26.80	28.86	50.29
鄱阳湖鳖 Poyang L.	22.00	23.04	26.54	28.42	50.04
太湖鳖 Taihu L.	21.60	22.68	26.81	28.91	50.51

则较小,而鄱阳湖鳖与其它 4 群体的核苷酸转换数(25 ~ 26)和颠换数(31 ~ 32)都较大(表 3)。

2.3 分子方差分析(AMOVA)与聚类分析

实验分析表明,在所有编码 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的核苷酸序列中,共有 250 个有效位点,其中 174 个为变异位点,多态位点达 69.6%。5 群体中华鳖的多态位点比例(P)为 48.09% ~ 71.02%,鄱阳湖鳖最高、洞庭湖鳖最低,而其它 3 群体则比较接近(表 4)。5 群体中华鳖的核苷酸多样性指数(D)为 0.2463 ~ 0.4273,其中鄱阳湖鳖较高,淮河鳖较低,大小顺序为:鄱阳湖鳖 > 太湖鳖 > 洞庭湖鳖 > 黄河鳖 > 淮河鳖。此外,5 群体中华鳖的基因多样性指数(H)都很高(H = 1.00),说明编码 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的核苷酸序列的变异都较大。

表 3 中华鳖 5 群体间编码 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的核苷酸转换数(右上角)和颠换数(左下角)

Tab. 3 Nucleotide transition numbers (right-upper diagonal) and transversion numbers (left-lower diagonal) of the gene encoding MHC class I molecule α_2 domain among five populations of *T. sinensis*

	黄河鳖 Yellow R.	淮河鳖 Huai R.	洞庭湖鳖 Dongting L.	鄱阳湖鳖 Poyang L.	太湖鳖 Taihu L.
黄河鳖 Yellow R.	-	20	22	25	22
淮河鳖 Huai R.	24	-		25	22
洞庭湖鳖 Dongting L.	26	26	-	26	21
鄱阳湖鳖 Poyang L.	31	32	31	-	25
太湖鳖 Taihu L.	26	27	26	32	-

表 4 中华鳖 5 群体间编码 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的多态位点比例(P)、核苷酸多样性指数(D)和基因多样性指数(H)

Tab. 4 Proportion of polymorphic loci, nucleotide diversity (D) and gene diversity (H) of the gene encoding MHC class I molecule α_2 domain in five populations of *T. sinensis*

	黄河鳖 Yellow R.	淮河鳖 Huai R.	洞庭湖鳖 Dongting L.	鄱阳湖鳖 Poyang L.	太湖鳖 Taihu L.
总位点数 total loci	235	234	235	245	236
多态位点数 number of polymorphic loci	130	135	113	174	137
多态位点比例(P, %) proportion of polymorphic loci (%)	55.32	57.69	48.09	71.02	58.05
核苷酸多样性指数(D) nucleotide diversity (D, mean \pm SE)	0.2724 \pm 0.1355	0.2463 \pm 0.1253	0.2840 \pm 0.1424	0.4273 \pm 0.2171	0.2872 \pm 0.1434
基因多样性指数 (H, 平均值 \pm 标准误) gene diversity (H, mean \pm SE)	1.000 \pm 0.011	1.000 \pm 0.020	1.000 \pm 0.015	1.000 \pm 0.022	1.000 \pm 0.013

AMOVA 分析表明,在遗传差异的总方差中,有 95.75% 的差异来自各群体内部,仅 4.25% 的差异来自群体间(表 5)。5 群体中华鳖间总的遗传分化指数(F_{st})为 0.0425。淮河鳖与洞庭湖鳖的遗传分化指数最高($F_{st} = 0.1538$),太湖鳖与鄱阳湖鳖的遗传分化指数较低($F_{st} = 0.0098$),

黄河鳖与淮河鳖间、洞庭湖鳖与太湖鳖间的遗传分化指数为负数。太湖鳖与黄河鳖、淮河鳖 2 群体间,淮河鳖与洞庭湖鳖之间有极为显著的遗传分化($P < 0.001$),其余群体间的遗传分化不明显($P > 0.05$)(表 6)。

表 5 中华鳖 5 群体间遗传差异的分子方差分析(AMOVA)

Tab. 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) in five populations of *T. sinensis*

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差组分 variance components	方差比例(%) percentage of variance
群体间 among population	4	276.94	1.62	4.25
群体内 within population	97	3538.36	36.48	95.75
总变异 total variation	101	3815.30	38.10	100

表 6 中华鳖 5 群体间的遗传分化指数(F_{st})

Tab. 6 Fixation Index (F_{st}) among five populations of *T. sinensis*

	黄河鳖 Yellow R.	淮河鳖 Huai R.	洞庭湖鳖 Dongting L.	鄱阳湖鳖 Poyang L.	太湖鳖 Taihu L.
黄河鳖 Yellow R.	-				
淮河鳖 Huai R.	- 0.0086 ($P = 0.429 > 0.05$)	-			
洞庭湖鳖 Dongting L.	0.0449 ($P = 0.143 > 0.05$)	0.1538 ($P < 0.001$)	-		
鄱阳湖鳖 Poyang L.	0.0279 ($P = 0.143 > 0.05$)	0.0613 ($P = 0.143 > 0.05$)	0.0117 ($P = 0.289 > 0.05$)	-	
太湖鳖 Taihu L.	0.0416 ($P < 0.001$)	0.146 ($P < 0.001$)	- 0.0464 ($P = 0.857 > 0.05$)	0.0098 ($P = 0.289 > 0.05$)	-

在核苷酸序列的平均遗传距离上,黄河鳖与淮河鳖间最近(0.296),鄱阳湖鳖与其它 4 群体的遗传距离均较远(0.426 ~ 0.433)。根据 5 群体间核苷酸序列的平均遗传距离,用 MEGA 软件包中的 UPGMA 及 NJ 程序进行聚类分析的结果一致,5 群体中华鳖明显分成 3 支,黄河鳖与淮河鳖聚在一起,洞庭湖鳖与太湖鳖另聚在一起,然后这两支再聚在一起,最后才与鄱阳湖鳖聚类(图 2)。这表明黄河流域、淮河流域与长江流域的中华鳖群体间的亲缘关系较远,而鄱阳湖鳖与其它 4 群体在 MHC 基因上存在明显歧化。

3 讨论

关于我国代表性的 5 个中华鳖地方群体间分子水平上的遗传变异与分化,RAPD 分析结果表明^[12],无论群体内还是群体间的遗传变异水平都较高,比较而言,长江流域的 3 群体中华鳖的遗传多样性更为突出。在此基础上,采用变异水平是

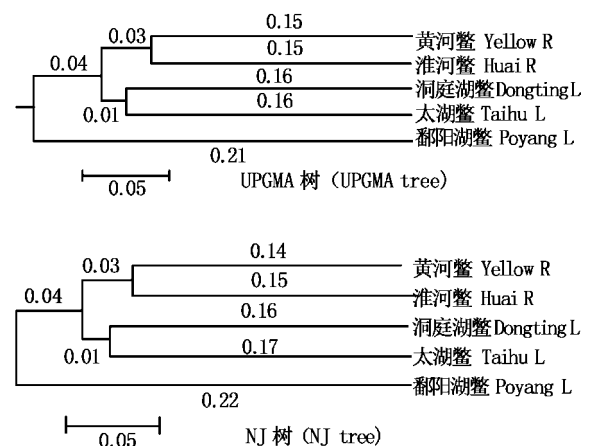


图 2 编码 MHC I 类分子 α_2

结构域基因的核苷酸序列平均遗传距离

在 5 群体中华鳖间的聚类关系(UPGMA 和 NJ 树)

Fig. 2 Dendrograms of five populations of

T. sinensis in average genetic distances

from nucleotide sequences of the gene encoding

MHC class I molecule α_2 domain by UPGMA and NJ method

其它核苷酸或线粒体位点 10 倍的 MHC 基因^[3], 从免疫遗传学的角度探讨中华鳖群体间的遗传变异情况, 了解它们间的遗传背景及相互关系, 可为中华鳖优良种质的筛选提供理论指导。

本研究发现, 5 群体中华鳖编码 MHC I 类分子₂ 结构域基因的变异都很丰富, 比较而言, 北方的黄河鳖、淮河鳖相对于长江流域的 3 群体中华鳖来说变异较小, 这与 RAPD 分析结果相似^[12], 也证实了 Yuhki 和 O'Brien 的观点^[18], 即 MHC 的变异可反应基因组水平的变异, 通过 MHC 基因的变异分析, 可有效的评估种群遗传多样性水平。但鄱阳湖鳖在群体内与群体间核苷酸转换数及颠换数、多态位点比例、核苷酸多样性指数等几方面都较其它 4 群体大, 说明该群体中华鳖在 MHC 基因位点上的变异最大, 这与 RAPD 分析的结果——太湖鳖的遗传变异最大^[12]不一致。鄱阳湖鳖 MHC I 类₂ 结构域基因的变异最大, 可能是由于它的生存环境中病原体含量比其它 4 群体更丰富, 对 MHC 基因产生了更强的选择压力, 以增加 MHC 基因的变异来维持其多样性^[19], 以便递呈种类更为多样的抗原肽来维持机体内外环境的稳定, 最终利于种群的生存和发展。

聚类分析的结果表明(图 2): 黄河鳖与淮河鳖间的亲缘关系较近, 二者最先聚类, 再与其它 3 群体聚类, 而黄河流域、淮河流域与长江流域的中华鳖群体间的亲缘关系较远, 这与 RAPD 分析结果一致^[12], 也与形态判别结果类似^[20]。但对于长江流域的 3 群体中华鳖, 却是洞庭湖鳖与太湖鳖聚在一起, 表明二者的亲缘关系较近; 鄱阳湖鳖为单独的一支, 最后才与前两支聚类, 说明与其它 4 群体间存在明显的歧化, 这与 RAPD 分析及形态判别结果^[12, 20]不一致。事实上, 与已报道的 *Ts1-BX1* 基因序列相比^[11], 鄱阳湖鳖有 2 种高度变异的序列 (*Ts1-UA-PY3C1*、*Ts1-UA-PY11C1*)^[17], 这可能是聚类分析中鄱阳湖鳖单独成为一支的重要原因。

AMOVA 分析表明, 在总遗传变异方差中, 群体间遗传变异的方差贡献率为 4.25%, 而群体内遗传变异的方差贡献率却占 95.75%。RAPD 分析表明^[12], 在 5 群体 100 个体的总遗传变异方差中, 群体间的遗传变异的方差贡献率为 1.35%。可见, 两种研究方法分析的结果相似, 表明中华鳖群体间的遗传变异不及群体内。类似的情况在

Excoffier 等^[21]和 Ge 等^[22]的研究中都出现过。不过, 一些学者认为, 在群体内遗传变异程度较高而又较少发生基因流的群体, 通常 F_{st} 值较小^[23, 24]。那么, 两种研究方法中较小的 F_{st} 值是否表明各群体中华鳖间较少发生基因交流呢? 或者说, 各群体中华鳖的种质比较纯呢? 这是一个很有意义却仍需深入调查研究的问题。由表 5 可知, 太湖鳖与黄河鳖、淮河鳖 2 群体间存在极显著的遗传分化 ($P < 0.001$), 太湖鳖与鄱阳湖鳖间、鄱阳湖鳖与淮河鳖及洞庭湖鳖 2 群体间的分化不明显 ($P > 0.05$), 这些结果与 RAPD 分析一致。但黄河鳖与洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖 2 群体间分化不明显 ($P > 0.05$)、洞庭湖鳖与淮河鳖存在显著的遗传分化 ($P < 0.001$) 等却与 RAPD 分析不一致^[12]。至于黄河鳖与淮河鳖间、洞庭湖鳖与太湖鳖间的遗传分化指数为负数, 可能是由于它们的地理位置相对较近, 这些群体间因种种原因而发生了一定程度的基因交流, 从而掩盖了它们间固有的遗传差异。

本研究的部分结果与 RAPD 分析不一致, 可能是由于两种方法分析了基因组 DNA 的不同基因位点上的差异造成的。RAPD 分子标记属中性分子标记, 中性进化的基因仅由突变和基因重组机制产生多态性。而 MHC 基因属于超显性选择的基因, 与中性进化基因相比, 其核苷酸替换率会大大加强, 且这种变异可反映生物体适应性及种群潜在进化能力的直接信息^[19, 25]。正是由于 MHC 基因的高度多态性, 它已越来越被用于调查种群遗传结构、区分紧密相关物种间的亲缘关系及历史进化关系等多种领域的研究^[24]。

夏春^[11]认为 *Ts1-BX1* 基因可以作为中华鳖群体的分子标记, 但本研究的结果表明, 该基因在各群体中华鳖普遍存在^[17], 因此, 它不适宜作为中华鳖群体的特异性标记。本研究仅对中华鳖编码 MHC I 类分子₂ 结构域的基因的多态性进行了探讨, 已发现了较丰富的多态性。在此基础上, 如果能对编码 MHC I 类分子另两个结构域 (₁、₃) 的基因片段进行研究, 且检测的样本数更大、克隆数更多, 则可能发现更为丰富的多态性。

本研究所的王成辉博士在数据处理过程中提供了很多帮助, 特此致谢!

参考文献:

- [1] Rothbard J B, Gefter M L. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins [J]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9: 527.
- [2] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2000. 1 - 20,63 - 121.
- [3] Nei M, Hughes A L. Polymorphism and evolution of the major histocompatibility complex loci in mammals [A]. In: *Evolution at the molecular level* (Selander R K, Clark A G, Whittam T S, eds) [M]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1991:224 - 247.
- [4] Klein D, Ono H, O'Neil C, *et al.* Extensive MHC variability in cichlid fishes of Lake Malawi [J]. *Nature*, 1993, 364: 330 - 334.
- [5] Hedrick P W. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex [J]. *American Naturalist*, 1994, 143: 945 - 964.
- [6] Haig S H. Molecular contributions to conservation [J]. *Ecology*, 1998, 79(2): 413 - 425.
- [7] Miller K M, Withler R E. Mhc diversity in Pacific salmon: population structure and trans-species allelism [J]. *Hereditas*, 1997a, 127: 83 - 95.
- [8] Miller K M, Withler R E, Beacham T D. Molecular evolution at Mhc genes in two populations of Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. *Molecular Ecology*, 1997b, 6: 937 - 954.
- [9] 蔡完其, 轩兴荣, 王成辉, 等. 红鲤 4 群体间主要组织相容性复合体的差异 [J]. *水产学报*, 2003, 27(2): 113 - 118.
- [10] Grossberger D, Parham P. Reptilian class I major histocompatibility complex genes reveal conserved elements in class I structure [J]. *Immunogenetics*, 1992, 36: 166 - 174.
- [11] 夏春. 中华鳖 MHC I_2 链基因克隆及序列分析 [J]. *中国免疫学杂志*, 1999, 15(2): 77 - 79.
- [12] 刘至治, 蔡完其, 李思发, 等. 中华鳖五群体遗传变异的 RAPD 分析 [J]. *水产学报*, 2004, 28(2): 119 - 126.
- [13] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [M]. *Nucl Acid Symp Ser*, 1998, 41: 95 - 98.
- [14] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 4673 - 4680.
- [15] Excoffier L. Analysis of molecular variance (AMOVA) version 2.00. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2002.
- [16] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1244 - 1245.
- [17] 刘至治. 中华鳖五群体间非特异性免疫功能及主要组织相容性复合体差异 [D]. 上海:上海水产大学博士学位论文, 2004. 58 - 96.
- [18] Yuhki N, O'Brien S J. DNA variation of the major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history [J]. *PNAS*, 1990, 87: 836 - 840.
- [19] Miller K M, Kaukinen K H, Beacham T D, *et al.* Geographic heterogeneity in natural selection on an MHC locus in sockeye salmon [J]. *Genetica*, 2001, 111: 237 - 257.
- [20] 李思发, 蔡完其, 刘至治, 等. 中华鳖七群体体形和腹部黑斑图案差异比较研究 [J]. *水产学报*, 2004, 28(1): 15 - 22.
- [21] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, 1992, 131: 479 - 491.
- [22] Ge S, Oliverira G C X, Schaal B A, *et al.* RAPD variation within and between nature populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil [J]. *Heredity*, 1999, 82: 638 - 644.
- [23] Hedrick P W, Parker K M. MHC variation in the endangered Gila topminnow [J]. *Evolution*, 1998, 52: 194 - 199.
- [24] Hedrick P W. Perspective: highly variable genetic loci and their interpretation in evolution and conservation [J]. *Evolution*, 1999, 53: 313 - 318.
- [25] 潘星华, 傅继良. MHC DQA 基因的分子进化研究 I. 等位基因多态性保持机制及 GC 含量对基因结构的影响 [J]. *遗传学报*, 1997, 24(3): 195 - 205.