

10 个半滑舌鳎家系 MHC II B 基因多态性初步研究

牛宝珍¹, 杜 民¹, 陈松林²

(1. 红河学院 云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南 蒙自 661199; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为检测 10 个半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)家系 MHC II B(Cy5e-DAB)基因的多态性水平、MHC II 类 B 位点数目以及平衡选择的作用, 作者利用多聚酶链式反应(PCR)和直接测序的方法对 10 个半滑舌鳎家系 MHC II B 基因位点遗传变异和平衡选择进行了研究。用特异性引物和 PCR 扩增的半滑舌鳎 MHC II B 基因片段大约 397 bp, 包含一部分第一外显子, 全部第一内含子和全部第二外显子。10 个半滑舌鳎家系中, 每家系选取 5 个体, 每个体 5 个克隆序列分析发现 60 个不同序列, 代表 60 个等位基因, 其中有 28 个是新发现的, 已提交到 GenBank。同源分析表明 60 个等位基因相似性为 89.36%。共 50 个个体中, 有 6 个存在 5 个不同等位基因, 表明在半滑舌鳎至少存在 3 个座位。有 9 个家系的 MHC II B 序列多肽结合区(PBR)的非同义替换(d_N)显著高于同义替换(d_S)。

关键词: 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*); 多态性; MHC II B; 平衡选择

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)12-0070-07
doi: 10.11759/hyxx20140803002

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是目前已经研究的脊椎动物基因组最具多态性区域, 它的编码产物在获得性免疫中起着很大的作用^[1-2], 这些编码产物结合抗原肽以及与 T 细胞受体(TCR)相互作用从而激发一个特定的免疫反应^[3-4]。已经报道了鱼类中 MHC 类和类分子, 它们结合不同的 T 细胞而分为两类 MHC 基因编码蛋白^[5]。鱼类上 MHC 基因的研究开始于 Hashimoto 等^[6]1990 年对鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的研究。目前, 许多鱼类 MHC 基因已经被分离出来, 包括鲨鱼(*Carcharodon carcharias*)^[7-8]、丽鱼(*Alticorpus macrocleithrum*)^[9]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[10]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[11]、鲤鱼^[12]等。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎属(*Cynoglossus*), 俗称牛舌、鳎目、鳎米等, 分布于中国黄渤海, 在东海、南海、也有分布^[13]。在鳎类中半滑舌鳎为个体偏大种类, 因其味道优美, 营养丰富受消费者喜爱, 已经成为中国新开发的养殖品种^[14]; 半滑舌鳎的 MHC 类基因^[15]、 $\beta 2m$ 基因^[16]、类 A 和类 B^[17]已经被确定出来。每个 MHC 类 B 基因编码区多态性最高片段是其第二外显子编码的 $\beta 1$ 结构域^[18]; $\beta 1$ 结构域和 MHC 类 A 基因编码的 $\alpha 1$ 结构域一起组成了 MHC 类分子的多肽结合槽,

从而能够锚定外源多肽^[19]。MHC 基因的高度变异使得在一个群体中产生了大量等位基因, 每个等位基因或多或少的具有结合和呈递不同类型多肽的能力^[5]。因此, 一个有机体对特定抗原的反应可能受到 MHC 基因单倍型的影响。鱼类中, 大西洋鲑(*Salmo salar*)MHC 类基因多态性已经被研究^[20-21], Du 等^[22]对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)7 个家系中的 MHC 类基因多态性进行研究并且对大菱鲆的 MHC 的抗迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)与 MHC 类基因的特定基因型的关联性进行了相关研究^[23]。

本实验室于 2008 年采用雄性野生群体与雌性养殖群体生产出 18 个半滑舌鳎家系^[24]。本研究目的是检测 10 个半滑舌鳎家系 MHC II B(Cy5e-DAB)基因的多态性水平、MHC 类 B 位点数目以及平衡选择的作用, 为半滑舌鳎的分子标记辅助育种提供基础性资料。

收稿日期: 2014-08-03; 修回日期: 2014-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31360638); 云南省教育厅科学研究基金重大专项项目(ZD2013009); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才资助项目(2015HB059); 红河学院中青年学术带头人后备人才资助项目(2014HB0203); 红河学院硕博资助项目(14bs11)
作者简介: 牛宝珍(1979-), 女, 湖北枣阳人, 学士, 主要从事水生生物技术与资源研究; 杜民, 通信作者, 副教授, E-mail: du2005min@126.com

1 材料和方法

1.1 实验鱼

2008年9月,在山东省莱州明波水产养殖公司建立半滑舌鲷全同胞家系和半同胞家系,亲本来源、家系建立饲养情况参照陈松林等^[24]的报道。

1.2 取样及DNA提取

从10个普通半滑舌鲷家系中各随机选取5尾鱼,每尾体质量7~8 g,利用MS222(1g/kg)麻醉后剪取尾鳍保存在无水乙醇中。利用酚-氯仿方法^[25],从尾鳍中提取半滑舌鲷总的DNA。用1%的琼脂糖凝胶进行电泳,在凝胶成像仪上进行DNA浓度检测,并将其浓度均调至为100 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C保存。

1.3 引物设计和多聚酶链式反应(PCR)

根据 Xu 等^[15]报道的 cDNA 序列设计的特定引物: hMPN12 (5'-CTCTCTTCTCTTCCTCCTCAC-3') 和 hMPC-12 (5'-ACACTCACCTGATTTAGCCA-3'), 扩增半滑舌鲷 MHC B 第二外显子序列, 上游引物和下游引物分别位于第一外显子和第二外显子的末端。

25 μ L 的 PCR 反应混合物包含 1 μ L 的半滑舌鲷基因组 DNA 模板、2.5 μ L 的 10 \times TaqDNA 多聚酶缓冲液 (TransGen Biotech)、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTPs、0.2 μ mol/L 的特定引物(正向引物和反向引物)、1 U Taq 多聚酶。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min、然后 30 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 40 s、53 $^{\circ}$ C 退火 40 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应在 Peltier 热循环仪(PTC-200)上完成。利用凝胶成像系统(Molecular Imager Gel Doc XR Biorad 美国)检测确认扩增片段。

1.4 克隆和DNA序列测定

切割预期大小 PCR 产物的胶并且利用 QIAEXII 凝胶回收试剂盒(QIAGEN)进行回收纯化。根据操作说明书将纯化产物连接到 PBS-T 载体后,转化到 TOP10 大肠杆菌感受态细胞。利用 M13 的正向和反向引物进行 PCR 筛选阳性克隆; 每个体的扩增产物选 5 个克隆在 ABI3730 自动测序仪上用 M13+/-引物测序。

1.5 基因型、序列分析和统计检验分析

利用 DNAMAN 软件对所有的序列数据进行比对分析。同义替换(d_S)与非同义替换(d_N)的比率用

MEGA4.0 软件^[26]中修正 Nei 和 Gojobori 的成对-距离方法^[27]进行估算。用 DAMBE 软件和 DnaSP5.0 软件用来分析序列核苷酸值^[28]。用 SPSS13.0 软件来进行统计分析。根据 Davies 等^[29]报道的规则命名新发现的等位基因^[30-31]。

2 结果与分析

2.1 10个半滑舌鲷家系中MHC II第二外显子序列的多态性

本研究中从10个家系共选取50个体,每个体选取5个克隆进行克隆及测序,得到250个序列。根据已发表的半滑舌鲷 MHC B cDNA 序列^[17]和内含子-外显子的 GT-AG 剪接规则,共得到 397 bp 片段,包含 35 bp 的第一外显子、整个第一内含子(84 bp, 包含一个 12bp 的 CA 重复序列)以及完整的第二外显子序列(270 bp)。第二外显子编码 MHC B 基因的 β 1 结构域。有些序列仅发现一次,推测可能是由于 PCR 错误所致,如错配、Taq DNA 聚合酶错误等。另外大肠杆菌异源双链修复错误也是可能原因^[32-33]。删除这些序列后得到 60 个不同的序列,有 32 个序列与本实验室已获得序列相同^[34], 本研究中新发现 28 个,代表 28 个不同的等位基因,并递交到 GeneBank 上(表 1)。

10 个家系中每个体选取 5 个克隆进行测序,只发现 1 个等位基因的有 2 个个体,发现 2 个等位基因的有 6 个个体,发现 3 个等位基因的有 21 个个体,发现 4 个等位基因的有 15 个个体,发现 5 个等位基因的有 6 个个体。表 2 显示每个体等位基因数目及对应个体的数目,在 10 个半滑舌鲷家系中 MHC B 基因上,只有 4% 的检测个体是纯合体(所有的家系都是杂合的),亦即在 4#和 19#家系中各出现一个纯合体(所测的序列完全相同)。各个家系等位基因的频率在每个家系中的分布不具有显著性。1#、3#、4#、6#、16#、19#、24#、28#、33#、34#家系中出现的序列和全部序列相似性分别为 89.89%、94.26%、88.24%、92.35%、94.67%、93.7%、90.37%、90.16%、93.22%、88.84%和 89.36%。

在得到的 60 个 MHC B 基因第二外显子序列中没有发现插入、缺失和终止密码子,表明这些序列来自于半滑舌鲷基因组的功能位点。在 60 个序列中,每个位点核苷酸多态性值 P_i (p)和 Theta-W 值分别是 0.14008 和 0.08975; 270 个核苷酸位点中有 113 个变

表 1 等位基因和 Genbank 登录号

Tab.1 Alleles and their GenBank accession number

等位基因	GenBank 登录号	等位基因	GenBank 登录号	等位基因	GenBank 登录号
Cyse-DBB*0502	GU194845	Cyse-DBB*3303	GU194894	Cyse-DBB*4901	GU194925
Cyse-DBB*0601	GU194846	Cyse-DBB*3304	GU194895	Cyse-DBB*5001	GU194926
Cyse-DBB*0802	GU194849	Cyse-DBB*3601	GU194898	Cyse-DBB*5102	GU194930
Cyse-DBB*1101	GU194854	Cyse-DBB*3602	GU194899	Cyse-DBB*5201	GU194931
Cyse-DBB*1401	GU194857	Cyse-DBB*3603	GU194900	Cyse-DBB*5301	GU194933
Cyse-DBB*1603	GU194863	Cyse-DBB*3604	GU194901	Cyse-DBB*5603	GU194938
Cyse-DBB*1901	GU194868	Cyse-DBB*3801	GU194904	Cyse-DBB*6101	GU194946
Cyse-DBB*2001	GU194869	Cyse-DBB*4004	GU194909	Cyse-DBB*6701	GU194957
Cyse-DBB*2804	GU194885	Cyse-DBB*4401	GU194914		
Cyse-DBB*3001	GU194887	Cyse-DBB*4603	GU194920		

表 2 10 个半滑舌鲷家系中每尾鱼的 *Scma-DAB* 等位基因数目和 5 种等位基因情况下的个体数目

Tab.2 The allele number per individual in 10 half-smooth tongue sole families and the individual number in five different allele models

家系编号	5 种等位基因情况下的个体数目(个)				
	1	2	3	4	5
1	—	—	3	2	—
3	—	—	3	1	1
4	1	—	3	1	—
6	—	1	2	1	1
16	—	3	1	1	—
19	1	1	1	1	1
24	—	—	4	1	—
28	—	—	1	4	—
33	—	—	1	1	3
34	—	1	2	2	—
总计	2	6	21	15	6

注: 其中“—”表示相应个数的基因型数目为零

异位点: 其中 91 个是简约信息位点。单倍型多样性值(H)和核苷酸差异平均数目(k)分别为 1 和 37.823。

2.2 半滑舌鲷 MHC II B 基因选择作用

在半滑舌鲷 MHC II B 基因第二外显子多肽结合区(PBR), 23 个氨基酸位点中有 20(86.96%)个是变异位点, 并且在 69 个核苷酸中有 40(57.97%)个是变异位点。在 60 个序列的多肽结合区中, 非同义替换(d_N)和同义替换(d_S)的值分别是 0.285 和 0.127, 非同义替换(d_N)与同义替换(d_S)的比值为 2.2441; 而在非多肽结合区中, 非同义替换(d_N)和同义替换(d_S)的值分别为 0.095 和 0.130, 表明在多肽结合区经历着正向的达尔文选择(表 3)。表 3 列出了每个家系代表序列在多肽结合区的非同义替换和同义替换的比值, 只有 28#家系个体中的多肽结合区的非同义替换与同义替换的比率不具有显著性外, 另外的 9 个家系中的

多肽结合区的非同义替换显著高于同义替换, 表明在这些家系中个体 MHC II B 基因多肽结合区的碱基经历达尔文选择。半滑舌鲷多肽结合区推断和鉴定是根据 Brown 等^[19]对人类 HLA-DRB 基因相应区域的限定。

3 讨论

MHC II B 基因最多态性的区域是由 β 链第二外显子非同义替换造成的。在本研究中, 作者利用 PCR 和直接测序方法揭示了 10 个半滑舌鲷家系中 MHC class II B 基因第二外显子基因多态性和选择作用; 也有其他鱼类的相关报道: Xu 等^[35]在 12 个牙鲆家系 60 个体中发现 76 个等位基因; Rakus 等^[36]在 9 个鲤鱼品系中发现 7 个不同的 MHC class II B 基因单倍型并且这些单倍型的频率也不相同; Stet 等^[37]在 84 个大西洋鲑个体上发现 7 个 *Sasa-DAA* 和 7 个

表 3 10 个半滑舌鲷家系中 MHC II B 基因第二外显子中多肽结合区(PBR)、非多肽结合区(non-PBR)的同义替代率(dS)和非同义替代率的比值及显著性分析

Tab.3 Synonymous(dS) and non-synonymous(dN) substitution rates and significant levels in the putative peptides binding region(PBR) and non-peptides binding region(non-PBR) among half-smooth tongue sole alleles

家系编号	区域	编码子数目	d _N (SE)	d _S (SE)	d _N /d _S	z(p)
1	PBR	23	0.304±0.040	0.152±0.044	2.000	p=0.001
	Non-PBR	67	0.096±0.020	0.125±0.028	0.768	p=1
	总计	90	0.150±0.019	0.132±0.024	1.1364	p=0.251
3	PBR	23	0.203±0.047	0.090±0.032	2.2556	p=0.012
	Non-PBR	67	0.064±0.016	0.077±0.020	0.8317	p=1.0
	总计	90	0.101±0.018	0.080±0.016	1.2625	p=0.172
4	PBR	23	0.344±0.050	0.162±0.064	2.1235	p=0.004
	Non-PBR	67	0.118±0.025	0.166±0.037	0.7108	p=1.0
	总计	90	0.177±0.024	0.165±0.029	1.0727	p=0.374
6	PBR	23	0.216±0.037	0.126±0.046	1.7143	p=0.045
	Non-PBR	67	0.087±0.018	0.120±0.026	0.725	p=1.000
	总计	90	0.121±0.017	0.121±0.024	1.0000	p=1.000
16	PBR	23	0.186±0.044	0.094±0.039	1.9787	p=0.041
	Non-PBR	67	0.065±0.016	0.109±0.024	0.5963	p=1.0
	总计	90	0.096±0.016	0.105±0.020	0.9143	p=1.0
19	PBR	23	0.263±0.037	0.093±0.029	2.8280	p=0.000
	Non-PBR	67	0.063±0.013	0.082±0.018	0.7683	p=1
	总计	90	0.116±0.016	0.084±0.016	1.3810	p=0.069
24	PBR	23	0.297±0.046	0.106±0.044	2.8019	p=0.000
	Non-PBR	67	0.092±0.019	0.129±0.027	0.7132	p=1
	总计	90	0.146±0.020	0.124±0.023	1.1774	p=0.219
28	PBR	23	13.405±2.49	2.357±0.971	5.6873	p=0.054
	Non-PBR	67	14±3.174	8.667±1.902	1.6153	p=1
	总计	90	27.405±3.968	11.24±2.031	2.4382	p=1
33	PBR	23	0.249±0.035	0.082±0.028	3.0366	p=0.000
	Non-PBR	67	0.069±0.013	0.092±0.019	0.75	p=1
	总计	90	0.116±0.015	0.089±0.017	1.3033	p=0.11
34	PBR	23	0.267±0.046	0.115±0.049	2.3217	p=0.004
	Non-PBR	67	0.105±0.021	0.142±0.031	0.7394	p=1
	总计	90	0.148±0.021	0.135±0.027	1.0963	p=0.336
全部	PBR	23	0.285±0.039	0.127±0.042	2.2441	p=0.001
	Non-PBR	67	0.095±0.018	0.130±0.026	0.7308	p=1
	总计	90	0.145±0.019	0.129±0.023	1.124	p=0.001

Sasa-DAB 等位基因; Langefors 等^[38]通过直接测序在 25 个波罗的海大西洋鲑的 22 个限制性片段长度多态单倍型中确认 17 个 MHC class B 基因第二外显子等位基因。作者对 50 个半滑舌鲷家系个体中发现 60 个 MHC B 等位基因表明半滑舌鲷遗传多样性较高。

本研究半滑舌鲷个体中, 有 6 个个体出现 5 个不同等位基因, 从而推测半滑舌鲷的 MHC B 基因至

少存在 3 个位点或者拷贝, 这与 Xu 等^[17]的研究结果相一致。相似的报告也在其他鱼类中发现: 李华等^[39]利用 PCR-SSCP 和直接测序的方法对猪 SLA-DQB 基因第二外显子进行分析后发现有的个体中存在 5 个不同等位基因现象, 从而推断在有些品种猪中具有 3 个 DQA 基因拷贝或位点; 张玉喜等^[40]通过直接测序发现 84 个牙鲈个体中有 59 个体表现 2 种或 2 种以

上不同序列,并且其中有一个个体中发现有5种不同的序列,推测这些个体具有较高的杂合度或者至少存在3个不同的基因位点。本文每个体仅测了5个克隆,是否增加克隆数就可以有发现更多的等位基因呢?这在以后的类似的工作中要作进一步验证。

关于MHC B基因第二外显子多态性的假说有:杂种优势、超显性选择、频率依赖的选择或平衡选择^[41]。目前许多相关研究支持平衡选择假说^[42-43],平衡选择经常通过多肽结合区的非同义替换率(dN)与同义替换(dS)的比率来进行推断。如果dN/dS的比率显著高于1,则表明正向选择在起作用。在本研究的10个半滑舌鲷家系MHC B序列中,除28#家系中的MHC B基因序列多肽结合区(PBR)的非同义替换比率与同义替换比率不具有显著性外(Z检验的 $P=0.054>0.05$),另外9个家系中MHC B基因序列在多肽结合区(PBR)的非同义替换要显著高于同义替换(表3)。据此认为在半滑舌鲷MHC B基因进化过程中受到正向选择的影响,从而产生如此多的等位基因。作者发现在半滑舌鲷MHC B基因的多肽结合区上非同义替换高于同义替换,推测半滑舌鲷MHC B基因可能与人类HLA-DRB基因具有相似的功能^[19]。各等位基因在个体及家系中出现的频率也不同,可能是由于个体对环境的选择压力不同而造成的^[43]。本研究发现的60个等位基因中,有32个等位基因所在实验室已有报道^[34],另外28个等位基因为新发现,表明等位基因也具有个体或者群体差异。

总之,在10个家系50个体中发现了60个序列,表明在半滑舌鲷的MHC B基因第二外显子具有高度多态性,为下一步在半滑舌鲷家系间MHC B等位基因与抗/易感特定病原间的相关性研究提供基础资料。

参考文献:

- [1] Nikolich-Zugich J, Fremont D H, Miley M J, et al. The role of *mhc* polymorphism in anti-microbial resistance[J]. *Microbes and Infection*, 2004, 6: 501-512.
- [2] Klein J. Natural history of the major histocompatibility-complex[M]. New York: John Wiley & Sons, 1986: 1-775.
- [3] Rothbard, J B, Geffer M L. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins[J]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9: 527.
- [4] Srisapoome P, Ohira T, Hirono I, et al. Cloning, characterization and expression of cDNA containing major histocompatibility complex class I, IIa and IIb genes of Japanese flounder. *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish Sci*, 2004, 70: 264-276.
- [5] Rakus K L, Wiegertjes G F, Stet R J M, et al. Polymorphism of major histocompatibility complex class II B genes in different lines of the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquat Living Resour*, 2003, 16: 432-437.
- [6] Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6863-6867.
- [7] Bartl S. What sharks can tell us about the evolution of MHC genes[J]. *Immunol Rev*, 1998, 166: 317-331.
- [8] Ohta Y, Okamura K, McKinney E C, et al. Primitive synteny of vertebrate major histocompatibility complex class I and class II genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 4712-4717.
- [9] Figueroa F, Mayer W E, Sülmann H, et al. Mhc class II B gene evolution in East African cichlid fishes[J]. *Immunogenetics*, 2000, 51(7): 556-575.
- [10] Zhang Y X, Chen S L. Molecular identification, polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class II A and B genes of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Mar Biotechnol*, 2006, 8: 611-623.
- [11] Yu S H, Ao J Q, Chen X H. Molecular characterization and expression analysis of MHC class II a and b genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37: 1295-1307.
- [12] Stet R J M, Kruiswijk C P, Saeij J P, et al. Major histocompatibility genes in cyprinid fishes: theory and practice[J]. *Immunol Rev*, 1998, 166: 301-316.
- [13] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 647-649.
- [14] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11: 243-251.
- [15] Xu T J, Chen S L. Molecular cloning, genomic structure and expression analysis of major histocompatibility complex class I a gene of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2011, 37: 85-90.
- [16] Xu T J, Sha Z X, Chen S L. Unexpected variations of b2-microglobulin gene in the half-smooth tongue sole[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28: 212-215.
- [17] Xu T J, Chen S L. Molecular cloning, genomic structure, polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2009, 27(2): 192-201.
- [18] Klein D, Ono H, O'Uigin C, et al. Extensive Mhc variability in cichlid fishes of Lake Malawi[J]. *Nature*, 1993, 364: 330-334.
- [19] Brown J H, Jardetzky T S, Gorga J C, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1[J]. *Nature*, 1993, 364: 33-39.
- [20] Grimholt U, Olsaker I, de Vries Lindström C, et al. A study of variability in the MHC class II b1 and class I

- a2 domain exons of Atlantic salmon, *Salmo salar* L[J]. *Anim Genet*, 1994, 25: 147-153.
- [21] Langefors Å, Lohm J, von Schantz T. Allelic polymorphism in MHC class II B in four populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Immunogenetics*, 2001, 53: 329-336.
- [22] Du M, Chen S L, Liang Y, et al. Polymorphism and balancing selection of MHC class II DAB gene in 7 selective flounder (*Paralichthys olivaceus*) families[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-10.
- [23] Du M, Chen S L, Liu Y H, et al. MHC polymorphism and disease-resistance to *Edwardsiella tarda* in six turbot (*Scophthalmus maximus*) families[J]. *Chin Sci Bull*, 2012, 57(25): 3262-3269.
- [24] 陈松林, 杜民, 杨景峰, 等. 半滑舌鳎家系建立及其生长和抗病性能测定[J]. *水产学报*, 2010, 34(12): 1789-1794.
- [25] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 9: 173-280.
- [26] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [27] Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions[J]. *Mol Biol Evol*, 1986, 3(5): 418-426.
- [28] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1451-1452.
- [29] Davies C J, Andersson L, Ellis S A, et al. Nomenclature for factors of the BoL A system, report of the ISAG BoLA nomenclature committee[J]. *Anim Genet*, 1997, 28: 159-168.
- [30] Xu R F, Li K, Chen G H, et al. Characterization of genetic polymorphism of novel MHC B-LBII alleles in Chinese indigenous chickens[J]. *J Genet Genomics*, 2007, 34(2): 109-118.
- [31] Xu R F, Li K, Chen G H, et al. Genetic variation within exon 2 of the MHC B-LBII gene in Tibetan chicken[J]. *Acta Genet Sin*, 2005, 32(11): 1136-1146.
- [32] Longeri M, Zanotti M, Damiani G. Recombinant DRB sequences produced by mismatch repair of heteroduplexes during cloning in *Escherichia coli*[J]. *Euro J Immunogenet*, 2002, 29: 517-523.
- [33] Zorn A M, Krieg P A. PCR analysis of alternative splicing pathways: identification of artifacts generated by heteroduplex formation[J]. *Biotechniques*, 1991, 11: 180-184.
- [34] Du M, Chen S L, Liu Y H, et al. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 8 families of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *BMC Genetics*, 2011, 12: 78.
- [35] Xu T J, Chen S L, Ji X S, et al. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* families[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25, 213-221.
- [36] Rakus K.L, Wiegertjes G F, Stet R J M, et al. Polymorphism of major histocompatibility complex class II B genes in different lines of the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquat Living Resour*, 2003, 16: 432-437.
- [37] Stet R J M, Vries B, Mudde K, et al. Unique haplotypes of co-segregating major histocompatibility class II A and class II B alleles in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Immunogenetics*, 2002, 54: 320-331.
- [38] Langefors Å, Lohm J, von Schantz T. Allelic polymorphism in MHC class II B in four populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Immunogenetics*, 2001, 53: 329-336.
- [39] 李华, 张亚平, 邱祥聘. 中国部分猪种 SLA-DQB 外显子 2 遗传多样性[J]. *遗传*, 2005, 27(2): 173-180.
- [40] 张玉喜, 陈松林. 牙鲆 MHC IIB 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的研究[J]. *水产学报*, 2006, 30(5): 633-639.
- [41] Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules[J]. *Science*, 1996, 272(5258): 67-74.
- [42] 徐田军, 陈松林, 田永胜. 日本牙鲆主要组织相容性复合体 DAB 等位基因的多态性[J]. *动物学报*, 2008, 54(5): 910-918.
- [43] 徐田军, 陈松林. 牙鲆 MHC-DAA 结构及其等位基因多态性[J]. *遗传*, 2009, 31(10): 1020-1028.

Polymorphisms and balancing selection in the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*

NIU Bao-zhen¹, DU Min¹, CHEN Song-lin²

(1. Key Lab for Quality, Efficient cultivation and Security Control of Crops in Colleges and University of Yunnan province, Honghe University, Mengzi 661199, China; 2. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Aug., 3, 2014

Key words: half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*; polymorphism; MHC IIB; balancing selection

Abstract: In order to detect the polymorphism, number of alleles, and equilibrium selection of the MHC II B (Cyse-DAB) gene of the half smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*, we measured the genetic variation and balancing selection at MHC IIB loci in 10 half-smooth tongue sole by polymorphism chain reaction and the direct sequence method. We cloned and sequenced a 397bp fragment of the MHC class IIB exon2. An amplified fragment spanned the partial exon1, complete intron1, and exon2. Five clones and five fry per individual ($n = 50$, 10 groups) were selected for MHC IIB sequence analysis. A total of 60 sequences were discovered which revealed 60 alleles, 28 of which were first found in this study and have been submitted to Genbank. The homology similarity was 89.36% among the sixty sequences. Five distinct sequences were presented in each of six individuals which denoted that there were at least three loci in half-smooth tongue sole MHC class IIB genes. Non-synonymous (d_N) substitution was significantly higher than synonymous (d_S) in the peptide-binding region of the MHC IIB gene in nine of the ten half-smooth tongue sole groups.

(本文编辑: 谭雪静)