

珠江口 3 种鲸豚的 *MHC-I* 基因多态性研究

余新建^{1,2,3,4}, 张西阳^{1,2,3,4}, 林文治^{1,2,3,4}, 周蕊莲^{1,2,3,4}, 吴玉萍^{1,2,3,4}

(1. 南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东 珠海 519082; 2. 广东省海洋资源与近岸工程重点实验室, 广东 珠海 519082; 3. 珠海市海洋生物资源与环境重点实验室, 广东 珠海 519082; 4. 中山大学 海洋科学学院, 广东 珠海 519082)

摘要: 旨在了解珠江口栖息的中华白海豚(*Sousa chinensis*)、宽脊江豚(*Neophocaena phocaenoides*)和点斑原海豚(*Stenella attenuate*)免疫相关基因 *MHC-I*(*Major Histocompatibility Complex*)的多态性及其表达情况, 以期为这 3 种鲸豚的保育工作提供基础资料。通过克隆测序的方法, 首次证实 *MHC-I* 基因在这 3 种鲸豚体内表达。选择压力分析, 表明 *MHC-I* 基因在这 3 种鲸豚中均受到强烈的正选择作用, 提示其具有重要的免疫功能。3 种鲸豚的 *MHC-I* 基因在系统发育树上相互混杂在一起, 表明 *MHC-I* 基因存在跨物种多态性。结合选择压力分析和跨物种多态性, 发现 *MHC-I* 基因受到平衡选择作用。珠江口 3 种鲸豚 *MHC-I* 基因多态性可能由平衡选择维持。

关键词: 鲸豚; *MHC*(*Major Histocompatibility Complex*); 表达; 平衡选择

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)10-0126-08

doi: 10.11759/hyxx20160424001

主要组织相容性复合体(*Major Histocompatibility Complex*, *MHC*)是存在于大部分脊椎动物基因组中与免疫功能密切相关的一个基因家族。*MHC* 基因通过编码不同的细胞表面受体, 识别并结合抗原, 并将其递呈到效应细胞, 从而激发一系列的免疫应答反应。根据其结构组成、组织表达类型及进化史的差异, *MHC* 基因家族又可分为 I 类、II 类和 III 类 3 个亚家族。其中, *MHC-I* 类分子多表达在有核细胞表面, 在对细胞内病原体(主要是病毒)的免疫防御中扮演着重要角色。*MHC* 基因是脊椎动物中最具多态性的功能基因, 其中病原体介导的平衡选择被认为是维持 *MHC* 基因家族的等位基因多样性的主要原因^[1]。*MHC* 基因多样性水平的降低会削弱种群对突发性传染性病原体的抵抗力和生存力^[2]。因此, 对野生动物尤其是保护物种的 *MHC* 基因多样性研究已成为近年来的热点。

目前, 国内有关脊椎动物 *MHC* 基因的研究比较多, 如应用在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)的辅助育种研究中^[3]。哺乳动物 *MHC* 基因的研究主要集中在陆生动物, 如大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)、恒河猴(*Macaca mulatta*)等^[4-5]。然而有关海洋哺乳动物, 如鲸豚类 *MHC* 基因的研究则较少。目前中国有关中华白海豚(*Sousa chinensis*)、宽脊江豚(*Neophocaena phocaenoides*)、点斑原海豚(*Stenella attenuata*)

MHC-I、*MHC-II* 类基因的研究涉及多个水域^[6-8]。张西阳等^[9]对珠江口中华白海豚 *MHC-I* 基因的研究发现其基因多样性较低, 推测原因可能是该种群历史上经历了长期的瓶颈效应。但尚未发现有关珠江口水域这 3 种鲸豚 *MHC-I* 基因研究的报道。

近年来, 珠江口鲸豚感染病原体的情况时有报道。香港的中华白海豚、宽脊江豚和宽吻海豚(*Tursiops truncatus*)中, 64 头鲸豚中有 29% 的个体发现病原体感染的情况^[10]。另有研究发现 2 头中华白海豚受病原体感染^[11]。遗传多样性降低会造成中华白海豚对环境的适应力下降^[12], 可能导致其易感染病原体。病原体具有引起动物大规模死亡的风险^[13-14]。因此, 对濒危物种的 *MHC-I* 基因多态性的研究, 对于探讨环境中的病原体对该物种的威胁及该物种在抵抗疾病

收稿日期: 2016-04-24; 修回日期: 2016-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(41276147, 41576128); 农业部中华白海豚保护行动计划(2015); 香港海洋公园保育基金(2013)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.41276147, No.41576128; Chinese White Dolphin Conservation Action Plan of the Ministry of Agriculture, No.2015; Ocean Park Conservation Fund Hong Kong, No.2013]

作者简介: 余新建(1991-), 男, 江西抚州人, 硕士研究生, 主要从事海洋鲸豚保护遗传学研究, 电话: 15820590518, E-mail: earthclean@163.com; 张西阳, 与第一作者同等贡献, 博士研究生, 主要从事海洋鲸豚保护遗传学研究; 吴玉萍, 通信作者, 教授, E-mail: exwyp@mail.sysu.edu.cn

和适应环境变化等方面的能力具有重要意义。

本研究通过对珠江口水域的中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚的 *MHC-I* 基因进行表达分析和克隆测序,以探究这3种常见鲸豚的 *MHC-I* 基因是否表达及基因多态性,并通过选择压力分析和系统发育树分析,初步探讨形成这种基因多态性特征的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究选用搁浅死亡于珠江口的中华白海豚、宽脊江豚、点斑原海豚新鲜肌肉样本。样本取得后立即保存于 Trizol 中及 -80°C 中。

1.2 实验方法

总 RNA 的提取参照 RNAisoTMPlus(TaKaRa),经琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检测其完整性和浓度,用 PrimeScript RT-PCR Kit(TaKaRa)将提

取的 RNA 用 Oligo(dT)引物逆转录为互补链 DNA (Complementary DNA, cDNA)。采用经典酚-氯仿法提取基因组 DNA(Genomic DNA, gDNA)。

1.3 PCR 扩增、产物的纯化、克隆及测序

使用 2 对引物 DoLA-F/R 和 I2F/R 分别扩增 3 种鲸豚的 *MHC-I* 基因表达序列及其外显子 2 序列,产物经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检验目的片段。引物信息见表 1。PCR 反应体系包含 6.88 μL ddH₂O, 2 \times GC buffer I 12.5 μL , dNTP(10 mmol/L)2 μL , BSA(200 mg/L) 1.50 μL , 正、反引物(20 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , LA Taq 0.12 μL , 模板 DNA(约 100 mg/L) 1.00 μL 。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 1 min, $55/50^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72°C 延伸 4 min, 共 35 个循环; 然后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2%琼脂糖电泳检测后,用 Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒(TaKaRa)纯化回收。

表 1 *MHC-I* 表达片段及外显子 2 片段的扩增所用引物

Tab. 1 Primers for *MHC-I* genes and exon 2

引物名称	序列(5'到 3')	位点	产物长度	参考文献
DoLA-F	GCTCCCACTCCATGAGGTAT	<i>MHC-I</i>	822	[15]
DoLA-R	CCCATCTCAGGGTGAGGGGC	<i>MHC-I</i>	822	[15]
I2F	TACGTGGACGACACGCAGTTC	<i>MHC-I</i> Exon 2	147	[16]*
I2R	CTYGCTCTGGTTGTAGTAGCS	<i>MHC-I</i> Exon 2	147	[16]*

*: 引文的引物为简并引物,本研究根据表达序列对引物有所修改

纯化后的 DNA 连接上 pMD-19 载体(TaKaRa),转化感受态大肠杆菌 DH5 α 菌株。待平板上长出菌落,利用蓝白斑筛选的方法挑出至少 15 个白色阳性菌落,送至北京六合华大基因科技股份有限公司广州测序部进行双向测序。

1.4 数据分析

采用 BioEdit 软件^[17]进行序列比对,以确定变异位点及等位基因。*MHC-I* 等位基因的命名参照家猫的命名原则:一个新的等位基因的确定,需要在同一个体的至少两个克隆中出现,或者在不同个体中出现^[18]。为了分析物种间 *MHC-I* 基因的系统发育关系,使用 Modeltest 3.7 确定最合适的核酸替代模型^[19],以家牛(*Bos taurus*)作为外群,使用 MrBayes3.2 软件构建系统发育树^[20]。使用 MEGA6 计算平均核苷酸差异。使用 DNAsp 软件和 MEGA 6 软件对 *MHC-I* 基因外显子 2 及其肽结合区(Peptide Binding Region, PBR)进行选择压力分析^[21-22]。

2 结果与分析

2.1 *MHC-I* 基因的表达和序列变异

本研究从中华白海豚(1例)、宽脊江豚(2例)和点斑原海豚(1例)肌肉组织中均成功提取高质量的 RNA 和 DNA。通过使用特异性引物 DoLA-F 和 DoLA-R 对 cDNA 进行扩增,证实 *MHC-I* 基因在 3 种鲸豚肌肉组织中的表达。中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚肌肉组织中分别检测到 5、4 和 6 条 cDNA 序列(822 bp)(GenBank: KU757454-KU757468),均包含完整的外显子 2(1~271 bp)、外显子 3(272~546 bp)和外显子 4(547~822 bp)。所有序列均未检测到插入、缺失和终止子,表明所有的序列都来源于基因组中的功能性分子。使用 I2F 和 I2R 引物从相同个体基因组 DNA 中扩增 *MHC-I* 基因外显子 2 序列。这些 cDNA 序列与 gDNA 序列均完全配对。

从中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚基因组

中分别扩增得到 6、5 和 6 个 *MHC-I* 等位基因(147 bp), 变异位点数分别为 32(21.8%)、23(15.6%)和 28 个(19.0%), 相应的氨基酸序列变异位点数为 18(36.7%)、16(32.7%)和 17 个(34.7%), 大部分变异位点集中在 *MHC-I* 基因的功能区, 如 PBR 区(表 2)。珠江口中华白海豚有 4 个等位基因与其他水域中华白海豚一致^[8] (GenBank: EF375575, EF375576, EF375579, EF375580)。珠江口宽脊江豚中有 2 个等位基因与其他水域宽脊江豚一致(GenBank: DQ843624, DQ843625)^[7]。新发现的 *MHC-I* 基因命名如下: 中华白海豚为 *Soch-I*08-09* (GenBank: KU759499、KU759500); 宽脊江豚为 *Neph-I*35-37* (GenBank: KU759501- KU759503); 点斑原海豚为 *Stat-I*03-08* (GenBank: KU759504- KU759509)。

2.2 MHC-I 系统发育

对 *MHC-I* 基因核苷酸替代模型进行分析后, 采

用 AIC(Akaike Information Criterion)分析结果中的 TVM+I+G 模型构建系统发育树。珠江口 3 种鲸豚与灰鲸(*Eschrichtius robustus*)、印度-太平洋瓶鼻海豚(*Tursiops aduncus*)、条纹原海豚(*Stenella coeruleoalba*)、赫氏海豚(*Cephalorhynchus hectori*)等序列相似度都在 90%以上。灰鲸作为须鲸, 其 *MHC-I* 基因单独聚为 1 支(Mysticeti)(图 1)。其他齿鲸 *MHC-I* 基因主要聚为 5 支(Odontoceti I~V), 但并没有明显的种属聚类趋势, 不同物种的等位基因分散聚合, 表现出明显的跨物种多态性。例如其中 1 支为宽脊江豚(), 另外 4 支中均有宽脊江豚 *MHC-I* 基因存在(图 1)。分支 中均发现中华白海豚、宽脊江豚、点斑原海豚和赫氏海豚 *MHC-I* 基因相互交叉(如 *Soch-I*06*、*Cehe-I*01* 与 *Stat-I*07*、*Stat-I*08*、*Neph-I*32* 分别聚合后形成 1 支); 分支 和 中也与此类似(图 1)。

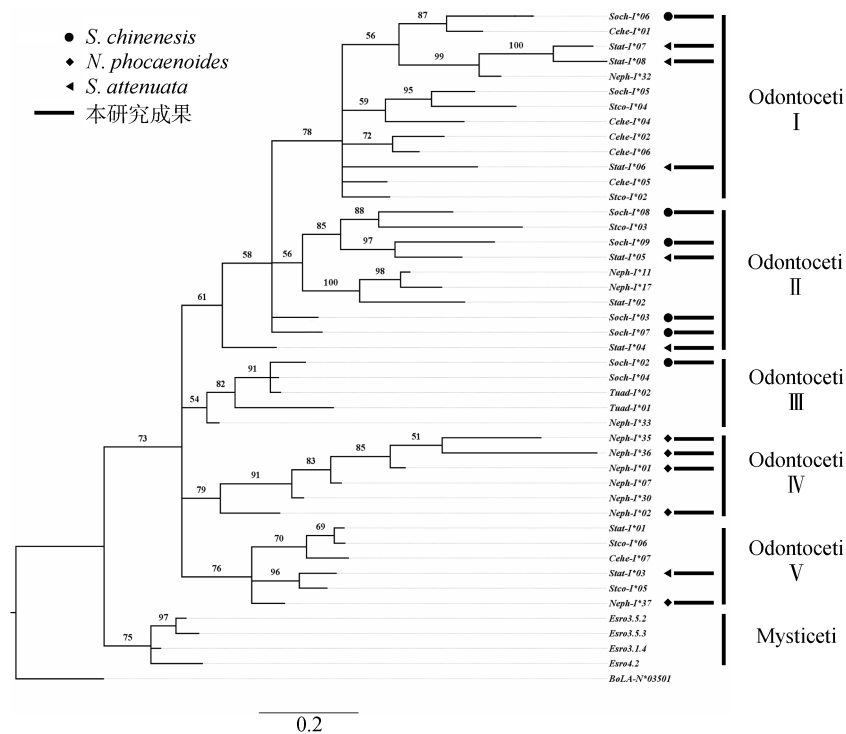


图 1 珠江口中华白海豚、宽脊江豚、点斑原海豚及其他物种 *MHC-I* 基因系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of *Sousa chinensis*, *Neophocaena phocaenoides*, and *Stenella attenuata* and other species in the Pearl River Estuary (PRE)

*BoLA-N*03501*: DQ190936; *Cehe-I*01-07*: EU024810~EU024816; *Esro 3.1.4*: AF149216; *Esro 3.5.2*: AF149219; *Esro 3.5.3*: AF149220; *Esro 4.2*: AF188615; *Neph-I*01*: DG843624; *Neph-I*02*: DG843625; *Neph-I*07*: DQ843630; *Neph-I*11*: DQ843634; *Neph-I*17*: DQ843640; *Neph-I*30*: DQ843653; *Neph-I*32*: DQ843655; *Neph-I*33*: DQ843656; *Soch-I*02-07*: EF375575 ~EF375580; *Stat-I*01*: EU698989; *Stat-I*02*: EU698990; *Stco-I*02-06*: EU698992 ~EU698996

2.3 选择作用

使用 DNAsp 软件对中华白海豚、宽脊江豚和点

斑原海豚的 *MHC-I* 基因外显子 2 分析 Tagima'D 值, 发现中华白海豚(0.114 14, $P>0.10$)、宽脊江豚(0.376 64,

表 2 珠江口中华白海豚、宽脊海豚、点斑原海豚 *MHC-I* 基因外显子 2 预测氨基酸序列
 Tab. 2 Alignment of predicted amino acid sequences of *MHC-I* genes and exon 2 in *S. chinensis*, *N. phocaenoides*, and *S. attenuata* in the PRE

基因	氨基酸残基																																																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49							
<i>Soch-I*08</i>	V	R	F	D	S	D	A	P	N	P	R	C	E	P	R	T	P	W	V	E	Q	E	G	P	E	Y	W	D	R	N	T	R	N	L	K	D	A	A	Q	M	Y	R	A	G	L	D	T	L	R							
<i>Soch-I*09</i>	A	S	.	.	.	Q	E	E		
<i>Soch-I*02</i>	.	W	A	.	M			
<i>Soch-I*03</i>	A			
<i>Soch-I*06</i>			
<i>Soch-I*07</i>	G	A			
<i>Neph-I*01</i>	A		
<i>Neph-I*02</i>	A	.	M	
<i>Neph-I*35</i>	M	
<i>Neph-I*36</i>	E	G	
<i>Neph-I*37</i>	K	
<i>Stat-I*03</i>	K
<i>Stat-I*04</i>	M
<i>Stat-I*05</i>
<i>Stat-I*06</i>	G
<i>Stat-I*07</i>
<i>Stat-I*08</i>

*表示 PBR(肽结合区)位点; 数字表示第 1 至第 49 个氨基酸残基的序号; 每个英文大写字母代表一个氨基酸残基; · 表示与第一个基因对应位点有相同的氨基酸残基

$P > 0.10$)和点斑原海豚(1.06748, $P > 0.10$)的 D 值均大于 0(表 3), 但是统计学差异并不显著, 不能排除无正选择作用存在的零假设。而使用 MEGA 6.0 软件的 Z 检验对 3 种鲸豚的 $MHC-I$ 外显子 2 及其肽结合区(PBR)进行选择压力分析(表 4), 发现中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚 $MHC-I$ 基因外显子 2 及其 PBR

区的非同义替代率(d_N)显著高于同义替代率(d_S), 均达到显著水平($P < 0.05$)甚至极显著水平($P < 0.01$), 提示正选择作用的存在^[23]。而点斑原海豚 $MHC-I$ 基因外显子 2 非 PBR 区也显示出较高的 d_N/d_S 值, 且达到极显著水平($P < 0.01$), 提示其整个外显子 2 区都受到正选择作用。

表 3 珠江口中华白海豚、宽脊江豚、点斑原海豚 $MHC-I$ 基因的多态性和选择作用参数

Tab. 3 Polymorphism and selection parameters of $MHC-I$ genes for three cetaceans from the PRE waters

物种	N	A_R	S	$R_1(\%)$	S_A	$R_2(\%)$	$d(\%)$	D
<i>S. chinensis</i>	1	6	32	21.8	18	36.7	10.5	0.11414
<i>N. phocaenoides</i>	2	5	23	15.6	16	32.7	8.4	0.37664
<i>S. attenuata</i>	1	6	28	19.0	17	34.7	10.5	1.06748

N : 个体数量; A_R : 等位基因丰度; S : 差异的碱基位点数; R_1 : S 占总碱基数的比例; S_A : 差异的氨基酸位点数; R_2 : S_A 占总氨基酸残基数的比例; d : 平均核苷酸差异; D : Tajima 检测统计值

表 4 珠江口 3 种鲸豚 $MHC-I$ 基因、PBR 区和非 PBR 区非同义替代与同义替代的估计值

Tab. 4 The estimated rates of nonsynonymous (d_N) and synonymous (d_S) substitutions and their ratio for $MHC-I$ genes, PBR, and non-PBR in the three cetaceans from the PRE waters

物种	位点	密码子数	d_N	E_1	d_S	E_2	ω	p
<i>S. chinensis</i>	All	49	0.127	0.032	0.037	0.018	3.43	0.006**
	PBR	14	0.370	0.097	0.114	0.079	3.25	0.021*
	Non-PBR	35	0.046	0.016	0.027	0.020	1.70	0.240
<i>N. phocaenoides</i>	All	49	0.090	0.023	0.031	0.020	2.90	0.019*
	PBR	14	0.261	0.072	0.036	0.040	7.25	0.000 9**
	Non-PBR	35	0.032	0.012	0.029	0.023	1.10	0.447 6
<i>S. attenuata</i>	All	49	0.123	0.029	0.016	0.010	7.69	0.000 1**
	PBR	14	0.331	0.088	0.072	0.066	4.60	0.000 5**
	Non-PBR	35	0.053	0.021	0.005	0.005	10.60	0.007**

d_N 、 d_S 均根据 Nei-Gojobori 方法计算; d_N : 非同义替代率的估计值; d_S : 同义替代率的估计值; E_1 、 E_2 : 1 000 次重复计算 d_N 、 d_S 的标准误差; ω 为 d_N/d_S ; P 为使用 Z 检验时接受零假设的可能性; *: $p < 0.05$, 显著水平; **: $p < 0.01$, 极显著水平

3 讨论

3.1 基因表达

本研究通过从新鲜样本肌肉中获取 cDNA 和 gDNA, 扩增测序后发现这些 cDNA 序列与对应的 gDNA 外显子序列完全匹配, 排除假基因的可能性, 确认 $MHC-I$ 基因在珠江口 3 种常见鲸豚体内表达。一般来说, 脊椎动物均表达 $MHC-I$ 基因。目前, 关于鲸豚 $MHC-I$ 基因表达的研究还比较少。例如赫氏海豚^[24], 在 2 个个体中仅发现 1 个共同的 $MHC-I$ 基因 cDNA。有趣的是多种海豚中仅发现 1~2 条 cDNA^[15, 24], 而本研究中 3 种鲸豚均表达 4 条以上 $MHC-I$ 基因 cDNA。这可能与珠江口生存的海豚接触病原体机会较高有关^[25]。

3.2 基因位点数及基因变异

本研究的中华白海豚、点斑原海豚每个个体含有 6 个 $MHC-I$ 等位基因, 估计中华白海豚、点斑原海豚均至少有 3 个 $MHC-I$ 基因座位。这与 Xu 等人对中华白海豚 $MHC-I$ 基因座位估计的数目一致^[8]。目前鲸豚中只有窄脊江豚(*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*) $MHC-I$ 基因座位数被确定为 4 个, 然而各基因座位序列之间相似度较高^[26]。

将珠江口中华白海豚种群与厦门等水域种群相比, 本研究发现有 2 个独有的等位基因, 但未发现厦门等水域共有的 1 个等位基因 *Soch-I*01* (GenBank: EF375574)^[8]。 *Soch-I*01* 与其他等位基因差异较大。

3.3 平衡选择

平衡选择作用于珠江口 3 种鲸豚 $MHC-I$ 基因主

要有以下两方面的依据^[27]。一方面是本研究的中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚的 *MHC-I* 基因外显子 2 和 PBR 区均检测到正选择作用。另一方面是本研究中的 3 种鲸豚 *MHC-I* 基因存在跨物种多态性。一般来说平衡选择趋向于提高种群杂合度和在维持 *MHC-I* 基因较高多样性中扮演重要角色^[28-29]。中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚均检测到多个 *MHC-I* 等位基因, 结果与之吻合。PBR 区具有重要功能是其检测到强烈平衡选择作用的原因, 而处于其毗连区的非 PBR 区的突变位点也可能更容易被保留^[30]。这可能是导致在点斑原海豚的 *MHC-I* 基因的非 PBR 区也检测到选择作用的原因。

3.4 跨物种多态性

系统发育树显示中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚的 *MHC-I* 基因外显子 2 序列并不按照物种分开, 而是与其他的鲸豚混杂在一起, 提示跨物种多态性的存在。跨物种多态性是指一些相同的或相似的等位基因在不同物种中同时存在。一般有 3 种可能的机制来解释这个现象。第一种机制是亲缘关系较近的物种具有相似的等位基因被认为是来自于共同祖先, 这种跨物种等位基因在物种形成之前就存在不同物种世系中^[31]。本研究的 3 种鲸豚都隶属于齿鲸亚目, 它们亲缘关系较近, 所以跨物种多态性有可能是共同祖先造成。同样的机制也在其他鲸豚中发现^[7]。第二种机制是趋同进化, 生物在应对相同的环境压力而产生相同的适应性变化^[32]。尽管本研究的中华白海豚、宽脊江豚、点斑原海豚均为近岸型鲸豚, 但它们生存环境的特性并不相同, 因而面临不同的病原体压力。然而赫氏海豚、条纹原海豚为远洋性齿鲸, 其生存环境与近岸环境可能有较大差别。因而趋同进化并不适用于解释其 *MHC-I* 基因跨物种多态性。第三种机制是渗透杂交。海豚较其他哺乳动物容易产生可育后代^[33], 例如宽吻海豚和长吻真海豚 (*Delphinus capensis*)^[34]。但通过多年对珠江口中华白海豚的监测, 我们并没有发现任何潜在的杂交后代。

综上所述, 珠江口水域的中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚均生活在具有较大的病原体压力的近海环境中, *MHC-I* 基因的表达对于其抵抗病原体感染具有重要作用。珠江口的中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚 *MHC-I* 基因受到病原体介导的平衡选择作用, 对于维持基因多态性具有重要意义。3 种鲸豚之间的 *MHC-I* 基因存在跨物种多态性, 可能来源于

它们的共同祖先。考虑到日益严峻的环境趋势^[35-36], 珠江口水域的中华白海豚、宽脊江豚和点斑原海豚的保育工作仍然任重道远。

致谢: 感谢香港海洋公园保育基金(OPCFHK)和广东珠江口中华白海豚国家级自然保护区管理局的大力支持。

参考文献:

- [1] Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, et al. Pathogen-driven selection and worldwide *HLA* class I diversity[J]. *Current Biology*, 2005, 15(11): 1022-1027.
- [2] Radwan J, Biedrzycka A, Babik W. Does reduced *MHC* diversity decrease viability of vertebrate populations?[J]. *Biological Conservation*, 2010, 143(3): 537-544.
- [3] 牛宝珍, 杜民, 陈松林. 10 个半滑舌鳎家系 *MHC IIB* 基因多态性初步研究[J]. *海洋科学*, 2015, 39(12): 70-76.
Niu Baozhen, Du Min, Chen Songlin. Polymorphisms and balancing selection in the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Marine Sciences*, 2015, 39(12): 70-76.
- [4] 万玉玲, 季芳, 饶军华, 等. 中国不同地域恒河猴 *MHC-I* 型部分等位基因的调查[J]. *动物学杂志*, 2007, 42(2): 1-5.
Wan Yuling, Ji Fang, Rao Junhua, et al. Typing of several *MHC-I* alleles of rhesus monkeys derived from different regions of China[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2007, 42(2): 1-5.
- [5] Zhu Ying, Sun Dandan, Ge Yunfa, et al. Isolation and characterization of class I *MHC* genes in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(18): 2140-2147.
- [6] Xu Shixia, Sun Peng, Zhou Kaiya, et al. Sequence variability at three *MHC* loci of finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*)[J]. *Immunogenetics*, 2007, 59(7): 581-592.
- [7] Xu Shixia, Ren Wenhua, Li Shuzhen, et al. Sequence polymorphism and evolution of three cetacean *MHC* genes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2009, 69(3): 260-275.
- [8] Xu Shixia, Zhang Peng, Li Shuzhen, et al. A preliminary analysis of genetic variation at three *MHC* loci of the Indo-Pacific humpback dolphin (*Sousa chinensis*)[J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2009b, 29(4): 372.
- [9] Zhang Xiyang, Lin Wenzhi, Zhou Ruilian, et al. Low major histocompatibility complex class II variation in the endangered Indo-pacific humpback dolphin (*Sousa chinensis*): inferences about the role of balancing selection[J]. *Journal of Heredity*, 2016, 107(2): 143-152.
- [10] Parsons E, Jefferson T. Post-mortem investigations on stranded dolphins and porpoises from Hong Kong wa-

- ters[J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2000, 36(2): 342-356.
- [11] Jefferson T, Hung S, Lam P. Strandings, mortality and morbidity of Indo-Pacific humpback dolphins in Hong Kong, with emphasis on the role of organochlorine contaminants[J]. *Journal of Cetacean Research and Management*, 2006, 8(2): 181-193.
- [12] Lin Wenzhi, Chang Lihong, Frère C H, et al. Differentiated or not? An assessment of current knowledge of genetic structure of *Sousa chinensis* in China[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2012, 416: 17-20.
- [13] 宋微波, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. *海洋科学*, 2001, 25(12): 23-26.
Song Weibo, Wang Congming, Wang Xiuhua, et al. New research progress on massive mortality of cultured scallop *Chlamys farreri*[J]. *Marine Sciences*, 2001, 25(12): 23-26.
- [14] Van Bresselem M F, Duignan P J, Banyard A, et al. Cetacean morbillivirus: current knowledge and future directions[J]. *Viruses*, 2014, 6(12): 5145-5181.
- [15] Shirai K, Sakai T, Oike T. Molecular cloning of bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) MHC class I cDNA[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1998, 60(10): 1093-1096.
- [16] Floresramirez S, Urbanramirez J, Miller R. Major histocompatibility complex class I loci from the gray whale (*Eschrichtius robustus*)[J]. *Journal of Heredity*, 2000, 91(4): 279-282.
- [17] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98.
- [18] Kennedy L J, Ryvar R, Gaskell R M, et al. Sequence analysis of MHC DRB alleles in domestic cats from the United Kingdom[J]. *Immunogenetics*, 2002, 54(5): 348-352.
- [19] Posada D, Crandall K. MODELTEST: testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817-818.
- [20] Ronquist F, Teslenko M, Van d M P, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. *Systematic Biology*, 2012, 61(3): 539-542.
- [21] Bjorkman P J, Saper M A, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2[J]. *Nature*, 1987, 329(6139): 506-512.
- [22] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2013, 30(4): 576-577.
- [23] Figueroa F, Günther E, Klein J. MHC polymorphism pre-dating speciation[J]. *Nature*, 1988, 335(6187): 265-267.
- [24] Heimeier D, Baker C S, Russell K, et al. Confirmed expression of MHC class I and class II genes in the New Zealand endemic Hector's dolphin (*Cephalorhynchus hectori*)[J]. *Marine Mammal Science*, 2008, 25(1): 68-90.
- [25] 闫冬, 陈加林, 郑锐强, 等. 珠江口中华白海豚主要栖息地的细菌菌群结构[J]. *海洋环境科学*, 2013, 32(1): 49-53.
Yan Dong, Chen Jialin, Zheng Ruiqiang, et al. Bacterial community structure of main habitat for *Sousa chinensis* in the Zhujiang Estuary[J]. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(1): 49-53.
- [26] Ruan Rui, Wan Xiaoling, Zheng Yang, et al. Assembly and characterization of the MHC class I region of the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaorientalis asiaorientalis*)[J]. *Immunogenetics*, 2016, 68(1): 77-82.
- [27] Hughes A L, Nei M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection[J]. *Nature*, 1988, 335(6186): 167-170.
- [28] Hedrick P W. Balancing selection and MHC[J]. *Genetica*, 1998, 104(3): 207-214.
- [29] Muirhead C A. Consequences of population structure on genes under balancing selection[J]. *Evolution*, 2001, 55(8): 1532-1541.
- [30] Charlesworth D. Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions[J]. *PLoS Genet*, 2006, 2(4): e64.
- [31] Klein J. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis[J]. *Human Immunology*, 1987, 19(3): 155-162.
- [32] Kriener K, O'hUigin C, Tichy H, et al. Convergent evolution of major histocompatibility complex molecules in humans and New World monkeys[J]. *Immunogenetics*, 2000, 51(3): 169-178.
- [33] Amaral A, Sequeira M, Martínez-Cedeira J, et al. New insights on population genetic structure of *Delphinus delphis* from the northeast Atlantic and phylogenetic relationships within the genus inferred from two mitochondrial markers[J]. *Marine Biology*, 2007, 151(5): 1967-1976.
- [34] Zornetzer H R, Duffield D A. Captive-born bottlenose dolphin × common dolphin (*Tursiops truncatus* × *Delphinus capensis*) intergeneric hybrids[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2003, 81(10): 1755-1762.
- [35] 周涛, 韩彬, 刘新民, 等. 南中国海海水中多环芳烃的分布特征及源分析[J]. *海洋科学*, 2014, 38(8): 39-45.
Zhou Tao, Han Bin, Liu Xinmin, et al. Distribution and

origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sea water of the South Sea[J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(8): 39-45.

[36] Gui Duan, Yu Riqing, He Xuan, et al. Bioaccumulation

and biomagnification of persistent organic pollutants in Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) from the Pearl River Estuary, China[J]. *Chemosphere*, 2014, 114(22): 106-113.

Study of *MHC-I* polymorphism in three cetaceans from the Pearl River Estuary, China

YU Xin-jian^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Xi-yang^{1, 2, 3, 4}, LIN Wen-zhi^{1, 2, 3, 4}, ZHOU Rui-lian^{1, 2, 3, 4},
WU Yu-ping^{1, 2, 3, 4}

(1. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Zhuhai 519082, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Resources and Coastal Engineering, Zhuhai 519082, China; 3. Zhuhai Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Zhuhai 519082, China; 4. School of Marine Sciences, Sun Yat-Sen University, Zhuhai 519082, China)

Received: Apr. 24, 2016

Key words: cetaceans; *MHC* (*Major Histocompatibility Complex*); expression; balancing selection

Abstract: To gain the basic knowledge about cetacean conservation, we assessed the polymorphism and expression of the immunologic gene *MHC-I* (*Major Histocompatibility Complex class I*) in three cetaceans (*Sousa chinensis*, *Neophocaena phocaenoides*, and *Stenella attenuata*) around the Pearl River Estuary. We first confirmed the expression of *MHC-I* genes in the three cetaceans by cloning and sequencing. After selection pressure analysis, we found that relatively strong positive selections have acted on *MHC-I* genes in these three cetaceans, suggesting their important immunologic function. Phylogenetic analysis showed that the *MHC-I* genes of the three cetaceans did not cluster to three branches according to species but were mixed up, which implies the existence of trans-species polymorphism (TSP). Together with the results of selection pressure analysis and TSP, we suggest that intense balancing selection has acted on *MHC-I* genes in these three cetaceans, which further maintained the polymorphism of *MHC-I* genes.

(本文编辑: 刘珊珊)