

文章编号: 1000-0615(2003)02-0113-06

红鲤 4 群体间主要组织相容性复合体的差异

蔡完其, 轩兴荣, 王成辉, 邹曙明

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

摘要:应用鱼类主要组织相容性复合体(MHC)基因来探讨鱼类种群间遗传结构,寻找分子遗传标记。根据已报道的鲤鱼 MHC I 类基因序列,设计了一对特异性引物,从兴国红鲤、荷包红鲤、玻璃红鲤及瓯江彩鲤基因组 DNA 中扩增了编码 MHC I 类分子 α_2 链的基因片段,并进行克隆、测序。结果表明,(1)编码 MHC I 类分子 α_2 链的基因多态性较为丰富,234bp 长度中有 106 个变异位点,多态位点百分率达 45.3%;荷包红鲤的基因序列与其它 3 群体红鲤有显著差异;(2)由编码 MHC I 类分子 α_2 链的基因和氨基酸序列构建的系统进化树一致,兴国红鲤与瓯江彩鲤关系较近,属于同一进化支,玻璃红鲤和荷包红鲤分别属于另外两个不同的进化支,荷包红鲤是较为特化的群体;(3)多态性丰富的编码 MHC I 类分子 α_2 链的基因,适宜作为鲤鱼不同群体的分子遗传标记。

关键词:兴国红鲤;荷包红鲤;玻璃红鲤;瓯江彩鲤;主要组织相容性复合体;遗传差异

中图分类号:S917;Q343.1⁺7 文献标识码:A

The variations of major histocompatibility complex in four populations of red common carp

CAI Wan qi, XUAN Xing-rong, WANG Cheng-hui, ZOU Shu-ming

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

Abstract: The major histocompatibility complex (MHC) of fish was used to study the genetic structure as a molecular genetic marker of four populations of red common carp. Based on reported common carp MHC class I gene sequences, a pair of specific primers was designed, MHC class I molecular α_2 gene fragments were amplified from Xingguo red common carp (*Cyprinus carpio* var. *singguonensis*), purse red common carp (*C. carpio* var. *wuyuanensis*), glass red common carp (*C. carpio* var. *wananensis*), and Oujiang color common carp (*C. carpio* var. *color*), then cloned and sequenced. The polymorphism of encoded MHC class I molecular α_2 chain gene was rich, with 106 variable loci in 234bp in length. The percentage of polymorphism was 45.3%, among the four populations, purse red common carp was significantly different from the other red common carps. The phylogenetic trees constructed by encoded MHC class I molecular α_2 chain gene and its amino acid sequences indicated identically, and the relationship between Xingguo red common carp and Oujiang color common carp was

收稿日期: 2002-07-16

资助项目: 上海水产大学与浙江龙泉市水利局合作项目“瓯江彩鲤种质研究和开发利用”(技 99-12)

作者简介: 蔡完其(1939-), 女, 浙江鄞县人, 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物抗逆性和育种研究。E-mail: lisifak@online.sh.cn

closer, belonging to one evolutionary branch, whereas glass red common carp and purse red common carp belonged to the other two different evolutionary branches respectively. The purse red common carp is a more specialized group. The rich polymorphism of encoded MHC class I molecular α_2 chain gene is suitable as a molecular genetic marker for different populations of common carp.

Key words: *Carassius carpio* var. *singguonensis*; *C. carpio* var. *wananensis*; *C. carpio* var. *wuyuanensis*; *C. carpio* var. *color*; major histocompatibility complex(MHC); genetic variation

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC), 为一个免疫调节基因区, 编码的糖蛋白能与抗原肽结合, 通过与 T 细胞的相互作用, 形成一个三元复合体, 诱导和调节机体的免疫应答, 激发机体特异性免疫反应, 在免疫学上具有极为重要的意义, 它是目前已知多态性最丰富的一个基因系统^[1]。自 1990 年 Hashimoto 等^[2]报道鱼类 MHC 基因序列以来, 已对 30 多种鱼类的 MHC 基因序列进行了研究^[3]。已有研究表明, 鱼类的 MHC 基因与其它脊椎动物的 MHC 基因, 在结构与功能上相似, 而且同样存在广泛的多态性^[4-10]。不过, 对鱼类 MHC 基因的研究, 多集中在鱼类与其它较高等脊椎动物的相对应基因的种间比较分析^[5,9-11], 用于鱼类群体遗传结构研究的报道较少, 即使有, 也多集中在鲑科鱼类^[7,12-16]。红鲤是鲤中特有的类群, 是重要的种质资源, 主要包括“江西三红”(兴国红鲤、荷包红鲤和玻璃红鲤)和瓯江彩鲤。它们具有生长快、繁殖力强、抗逆性强、耐低氧、食性广和适应性强等优点, 颇受人民群众的喜爱。迄今对“江西三红”的研究较多, 但报道多集中在生物学、养殖学及杂交利用上; 对瓯江彩鲤的研究甚少。本研究以 4 群体红鲤为材料, 通过编码 MHC I 类分子 α_2 链的基因序列分析, 探讨使用 MHC 基因序列多态性来研究红鲤群体间的遗传变异与分化, 并试图寻找分类学上种以下的分子遗传标记。

1 材料和方法

1.1 试验材料

兴国红鲤、玻璃红鲤、荷包红鲤和瓯江彩鲤均取自上海水产大学种质资源试验站。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

采用蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿法^[17]从新鲜或 -20°C 保存的鱼尾鳍提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增

引物序列:

Cycar α_2 (正向): 5' - GTC CAG CTG ATG TAC GGT TG - 3'

Cycar α_2 (反向): 5' - CTT CTG CAG CCA CTC AAT GC - 3'

PCR 反应总体积为 25 μL , 内含 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris HCl, pH 9.0, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 1.5~2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.001% 明胶, 每种 dNTP 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 约 100~200ng 基因组 DNA, 2 单位 Taq 酶(Biostar 公司), 离心后, 加入 30 μL 石蜡油防止挥发。于 Eppendorf Mastercycler gradient PCR 仪上反应。扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3min, 35 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1min, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1min, 循环结束, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。每个群体各取 10 个样品进行试验。

1.2.3 DNA 序列测定及数据分析

扩增产物经 2.0% 低熔点琼脂糖回收纯化, 克隆于 M13 载体, 于 3700 型 BigDye Terminator 全自动测序仪上进行测序。每个群体各测序 4 个样本。测序的序列结果用 BioEdit 软件^[18]进行编辑, 用 CLUSTALW 软件^[19]进行序列重排和同源比较。用 MEGA2 软件^[20]的 Tamura Nei 法计算遗传距离和序

列多样性指数;用邻接法(neighbor joining, NJ)^[20]构建分子系统树(Kimura Two-Parameter 法)估算遗传距离;Bootstrap 法 1000 次检验各分支的置信度;同义碱基替换率和非同义碱基替换率的差异用 t 检验^[20]。

2 结果

2.1 编码 MHC I 类 α_2 链基因序列差异

2.1.1 群体间

序列差异:对4种群红鲤,在234bp的序列长度中,共发现106个变异位点,多态位点百分率达45.30%,荷包红鲤在36~38位核苷酸序列处插入了GAC 3个碱基,在169位核苷酸序列处缺失了1个G,在196~197位核苷酸处缺失了GG(或GC)碱基。若只比较兴国红鲤、玻璃红鲤和瓯江彩鲤的序列差异,234bp的序列长度中只有45个变异位点,多态位点百分率仅为19.23%。将 α_2 链的基因演绎成相应的氨基酸进行比较分析,在78个氨基酸位点中有44个位点发生变异,氨基酸变异位点百分率高达56.41%。在44个变异位点中,有39个变异位点显示出荷包红鲤群体有异于红鲤其它3个群体。

核苷酸转换数和颠换数:经两两配对比较,在4群体红鲤间,兴国红鲤与瓯江彩鲤间 α_2 链的基因核苷酸转换数和颠换数接近,荷包红鲤与其它3群体红鲤间的核苷酸转换数与颠换数均较大(表1)。

碱基组成:荷包红鲤与其它3群体红鲤在 α_2 链基因的碱基组成上存在一定差异,荷包红鲤的T含量高于其它3群体红鲤,而C含量明显低于其它3群体红鲤,但A+T含量差异不大(表2)。

核苷酸序列多样性指数和氨基酸序列多样性指数:荷包红鲤与瓯江彩鲤这两个指数较高,两群体的序列歧异度也较大。兴国红鲤与瓯江彩鲤的这两个指数最低,两群体的序列歧异度也较小(表3)。

核苷酸序列遗传距离和氨基酸序列遗传距离:兴国红鲤与瓯江彩鲤的平均核苷酸遗传距离和氨基酸序列遗传距离最近,荷包红鲤与其它3群体红鲤的遗传距离均较远(表4)。

表1 红鲤4群体间编码 MHC I 类分子 α_2 链基因的核苷酸转换数(右上角)和颠换数(左下角)

Tab. 1 Nucleotide transition numbers (right upper diagonal) and transversion numbers (left lower diagonal) of encoded MHC class I molecular α_2 chain gene among four populations of red common carp

	兴国红鲤 <i>C. c. var. singuonensis</i>	玻璃红鲤 <i>C. c. var. wananensis</i>	荷包红鲤 <i>C. c. var. wuyuanensis</i>	瓯江彩鲤 <i>C. c. var. color</i>
兴国红鲤 <i>C. c. var. singuonensis</i>	-	6	23	4
玻璃红鲤 <i>C. c. var. wananensis</i>	8	-	21	3
荷包红鲤 <i>C. c. var. wuyuanensis</i>	30	31	-	22
瓯江彩鲤 <i>C. c. var. color</i>	5	6	29	-

表2 红鲤4群体间编码 MHC I 类分子 α_2 链基因的核苷酸组成

Tab. 2 Nucleotide composition of sequences of encoded MHC class I molecular α_2 chain gene among four populations of red common carp

群体 population	T	C	A	G	A+ T
兴国红鲤 <i>C. c. var. singuonensis</i>	22.5	19.9	30.4	27.3	52.9
玻璃红鲤 <i>C. c. var. wananensis</i>	23.1	19.7	30.2	27	53.3
荷包红鲤 <i>C. c. var. wuyuanensis</i>	26.8	15.2	28.1	29.9	54.9
瓯江彩鲤 <i>C. c. var. color</i>	22.6	19.9	29.9	27.6	52.5

表3 红鲤4群体间编码MHC I类分子 α_2 链基因的

平均核苷酸序列多样性指数(右上角)和氨基酸序列多样性指数(左下角)

Tab. 3 Mean diversity from nucleotide sequence (right upper diagonal) and amino acid sequence (left lower diagonal) of encoded MHC class I molecular α_2 chain gene among four populations of red common carp

	兴国红鲤 <i>C. c. var. singguonensis</i>	玻璃红鲤 <i>C. c. var. wananensis</i>	荷包红鲤 <i>C. c. var. wuyuanensis</i>	瓯江彩鲤 <i>C. c. var. color</i>
兴国红鲤 <i>C. c. var. singguonensis</i>	—	0.0114	0.2927	0.0007
玻璃红鲤 <i>C. c. var. wananensis</i>	0.0109	—	0.1970	0.0250
荷包红鲤 <i>C. c. var. wuyuanensis</i>	0.2510	0.2542	—	0.3149
瓯江彩鲤 <i>C. c. var. color</i>	0.0024	0.0219	0.2807	—

表4 红鲤4群体间MHC I类分子 α_2 链基因核苷酸序列(右上角)和氨基酸序列(左下角)的平均遗传距离Tab. 4 Average genetic distances from nucleotide sequence (right upper diagonal) and amino acid sequence (left lower diagonal) of MHC class I molecular α_2 chain gene among four populations of red common carp

	兴国红鲤 <i>C. c. var. singguonensis</i>	玻璃红鲤 <i>C. c. var. wananensis</i>	荷包红鲤 <i>C. c. var. wuyuanensis</i>	瓯江彩鲤 <i>C. c. var. color</i>
兴国红鲤 <i>C. c. var. singguonensis</i>	—	0.0638	0.5399	0.0408
玻璃红鲤 <i>C. c. var. wananensis</i>	0.1232	—	0.4333	0.1494
荷包红鲤 <i>C. c. var. wuyuanensis</i>	0.4964	0.4913	—	0.5518
瓯江彩鲤 <i>C. c. var. color</i>	0.0688	0.1015	0.5069	—

2.1.2 群体内

序列差异:核苷酸序列变异位点百分率大小依次为兴国红鲤—14.10%,玻璃红鲤—8.12%,瓯江彩鲤—1.71%,荷包红鲤—0.00%;氨基酸序列变异位点百分率大小依次为兴国红鲤—24.36%,玻璃红鲤—14.10%,瓯江彩鲤—5.13%,荷包红鲤—0.00%。

碱基序列转换数目和颠换数目:碱基序列转换数目大小依次为兴国红鲤—7,玻璃红鲤—4,瓯江彩鲤—1,荷包红鲤—0;碱基序列颠换数目大小依次为兴国红鲤—8,玻璃红鲤—7,瓯江彩鲤—1,荷包红鲤—0。

核苷酸序列多样性指数和氨基酸序列多样性指数:平均核苷酸序列多样性指数大小依次为兴国红鲤—0.0736,玻璃红鲤—0.0491,瓯江彩鲤—0.0102,荷包红鲤—0.0000;氨基酸序列多样性指数大小依次为兴国红鲤—0.1182,玻璃红鲤—0.0965,瓯江彩鲤—0.0314,荷包红鲤—0.0000。

同义碱基替换(ds)和非同义碱基替换率(dn):兴国红鲤、瓯江彩鲤和玻璃红鲤的非同义碱基替换率(dn)大于同义碱基替换率(ds)。经t检验,这两个指标在瓯江彩鲤和玻璃红鲤间的差异显著($P < 0.05$),而在玻璃红鲤与兴国红鲤间的差异不显著;荷包红鲤的核苷酸序列无碱基替换(表5)。

表5 红鲤4群体编码MHC I类 α_2 链基因的同义碱基(ds)和非同义碱基替换(dn)率Tab. 5 The rate of synonymous(ds) and nonsynonymous(dn) substitutions of encoded MHC class I molecular α_2 chain gene sequences in four populations of red common carp

群 体	population	同义碱基替换率 ds (均值±标准误, mean±S.E)	非同义碱基替换率 dn (均值±标准误, mean±S.E)	dn/ds
兴国红鲤	<i>C. c. var. singguonensis</i>	0.0385±0.0154	0.1410±0.0334	3.66223
玻璃红鲤	<i>C. c. var. wananensis</i>	0.0342±0.0150	0.1004±0.0303	2.9357
荷包红鲤	<i>C. c. var. wuyuanensis</i>	0.0000±0.0000	0.0000±0.0000	
瓯江彩鲤	<i>C. c. var. color</i>	0.0000±0.0000	0.0299±0.0149	∞

注: S.E 为标准误

Notes: S.E means standard error

2.2 系统进化分析

采用邻接法(neighbor joining, NJ),对编码 MHC I 类分子 α_2 链基因的核苷酸序列、遗传距离及氨基酸序列3类数据,分别构建4群体红鲤的分子系统树,并予以比较。

核苷酸序列分子系统树:构建的4群体红鲤核苷酸序列的分子系统树(图1)表明,荷包红鲤与其它3群体红鲤的分化程度十分显著。

遗传距离分子系统树:构建的4群体红鲤遗传距离的分子系统树(图2)表明,4群体明显地分为2支,荷包红鲤为单独一支,其它3群体红鲤为一支。

氨基酸序列分子系统树:构建的4群体红鲤氨基酸序列的分子系统树(图3)表明,荷包红鲤与其它3群体红鲤的分歧十分明显。

以上3个分子系统树的结果一致,表明荷包红鲤是比较特化的群体。

3 讨论

对4群体红鲤编码 MHC I 类分子 α_2 链基因的序列分析发现,群体内 α_2 链基因的平均核苷酸多样性指数和氨基酸多样性指数大小均依次是:兴国红鲤 > 玻璃红鲤 > 瓯江彩鲤 > 荷包红鲤。这一方面表明,荷包红鲤与其它3群体红鲤在 α_2 基因序列上的趋异性最大。荷包红鲤群体内基因序列无个体间差异、群体内遗传多样性指数为零,遗传多样性指数最低,推测荷包红鲤由于地理隔离或其它因素的作用,可能存在某种奠基者效应或遗传瓶颈效应。

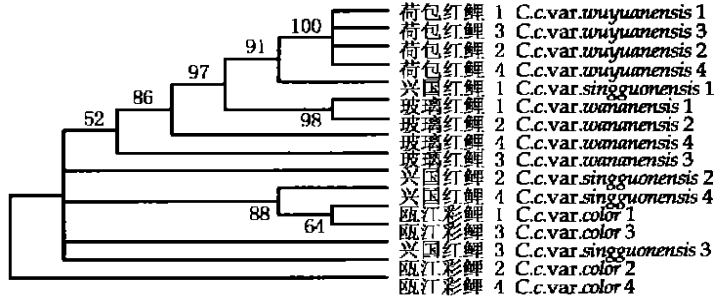


图1 红鲤4群体间的编码 MHC I 类分子 α_2 链核苷酸序列分子系统树

Fig.1 Molecular phylogenetic tree of encoded MHC class I molecular α_2 chain gene of four populations of red common carp based on nucleotide sequences

注:1、2、3、4 分别表示四群体红鲤样品编号

Notes 1, 2, 3 and 4 denotes the sample number in four populations of red common carp

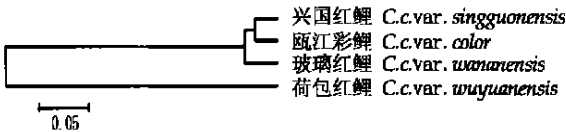


图2 4群体红鲤编码 MHC I 类分子 α_2 链基因遗传距离分子系统树

Fig.2 Molecular phylogenetic tree of encoded MHC class I molecular α_2 chain gene genetic distance of four populations of red common carp based on genetic distance

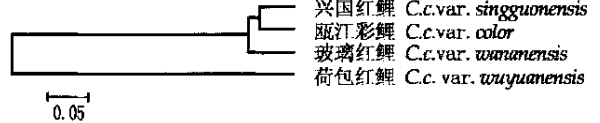


图3 4群体红鲤编码 MHC I 类分子 α_2 链基因氨基酸序列分子系统树

Fig.3 Molecular phylogenetic tree of encoded MHC class I molecular α_2 chain gene amino acid sequence of four populations of red common carp based on amino acid sequences

通常,功能基因进化速率较慢。然而,由于 MHC 基因为免疫相关基因,其功能主要是编码糖蛋白,结合自然界变化多样的病原体,诱发机体的免疫反应,从而保护机体免受侵害。生境的变迁和病害的侵袭等,均会诱发机体的免疫反应。由于 MHC 基因在机体免疫反应中的关键作用,它们变异最为活跃,是多态性最丰富的基因序列之一。在哺乳动物中, MHC I 类和 II 类蛋白结合位点的核苷酸变异是其它核苷酸或线粒体位点的 10 倍,是研究生物进化的良好遗传标记^[21]。

本研究对4群体红鲤编码 MHC I 类分子 α_2 链的基因分析表明,荷包红鲤的 α_2 链基因与其它3种群红鲤有很大差异。 α_2 链的基因和氨基酸的综合分析认为,荷包红鲤与其它3群体红鲤属不同的进化

分支,这与 RAPD 分析结果一致^[22];而在其它 3 群体红鲤中,兴国红鲤与瓯江彩鲤的亲缘关系较近。另在构建的系统树中,兴国红鲤各个体的位置不集中,原因有待于进一步探讨;而玻璃红鲤则起源于另一进化分支。

从以上的比较分析,可知红鲤不同群体的编码 MHC I 类分子 α_2 链的基因多态性丰富,这表明编码 MHC I 类分子 α_2 链的基因作为研究鲤鱼种内分化的分子遗传标记是适宜的。

参考文献:

- [1] Zhou G Y. Principles of immunology[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Document Press, 2000. 63- 121. [周光炎. 免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000. 63- 121.]
- [2] Hashimoto K, Nakanishi T, karosawa Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens[C]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:6863- 6867.
- [3] Persson A C, Stet R J M, Pilstrom L. The complete MHC class I encoding genes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L) [J]. Hereditas, 1997, 127: 166.
- [4] Klein D, Ono H, O' huign C, et al. Extensive MHC variability in cichlid fishes on Lake Malwi[J]. Nature, 1993, 363:330- 334.
- [5] Grimholt U, Olaker I, Lindstrom D V, et al. A study of variability in the MHC class II β_1 and I α_2 domain exons of Atlantic salmon *Salmo salar* [J]. Anim Genet, 1994, 25:147- 153.
- [6] Lie O, Grimholt U. The major histocompatibility complex of fish: genetics structure and function of the MHC in teleost species[A]. The major histocompatibility complex region in domestic animal species[C]. CRC Press, Cleveland, OH, 1996. 17- 29.
- [7] Miller K M, Withler R E. Sequence analysis of a polymorphic Mhc class II gene in Pacific salmon[J]. Immunogenetics, 1996, 43: 337- 351.
- [8] van Erp S M H. Major histocompatibility complex genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L) [J]. In Dissertation, Dutch, Thesis landbouw universiteit Wageningen. 1996.
- [9] Betz U A K, Mayer W E, Klein J. Major histocompatibility complex class I genes of the coelacanth latimeria chalumnae[M]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. 91:11065- 11069.
- [10] Sato A, Figueroa F, O' huign C, et al. Identification of a major histocompatibility complex genes in the guppy *Poecilia reticulata* [J]. Immunogenetics, 1995, 43: 48- 49.
- [11] Xia C. Molecular cloning and sequence analysis of MHC class I α_2 domain from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Acta Zool Sin, 1999, 45(3): 345- 349. [夏春. 白鲢 MHC I α_2 基因克隆及序列分析[J]. 动物学报, 1999, 45(3): 345- 349.]
- [12] Dorscher M O, Duris T, Bronte C R, et al. High levels of MHC class II allelic diversity in lake trout from lake superior [J]. J Heredity, 2000, 91: 359- 363.
- [13] Landry C, Bematchez L. Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Mol Evol, 2001, 10(10): 2525- 2539.
- [14] Miller K M, Wither R E, Beacham T D. Molecular evolution at Mhc genes in two populations of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. Mol Evol, 1997, 6(10): 937- 954.
- [15] Miller K M, Kaukinen K H, Beacham T D, et al. Geographic heterogeneity in natural selection on an MHC locus in sockeye salmon [J]. Genetics, 2001, 111(1- 3):237- 257.
- [16] Timothy J K, Karen M P, Hedrick P W. Major histocompatibility complex differentiation in Sacramento River chinook salmon [J]. Genetics, 1999, 151: 1115- 1122.
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [18] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucl Acid Symp Ser, 1998, 41: 95- 98.
- [19] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22:4673- 4680.
- [20] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software[J]. Bioinformatics, 2001, 17, 12: 1244 - 1245.
- [21] Nei M, Hughes A L. Polymorphism and evolution of the MHC in mammals[A]. Evolution at the molecular level[C]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1991, 224- 247.
- [22] Wang C H. Study on genetic diversity of red common carps in China[D]. Shanghai Fisheries University Doctor dissertation, 2002. [王成辉. 中国红鲤遗传多样性研究[D]. 上海: 上海水产大学博士学位论文, 2002.]