

长江江豚 MHC-DRB 基因第二外显子的分离鉴定

杜合军^{1, 2} 郑劲松¹ 武 敏^{1, 2} 赵庆中¹ 王 丁¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC)在脊椎动物的免疫系统中起着重要的作用,常作为适应性遗传标记应用于保护遗传学研究。长江江豚 (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*)是唯一生活于淡水环境中的江豚种群,且已处于濒危状况。为了开发适用于长江江豚保护遗传学研究的 MHC遗传标记,首次采用北象海豹 (*M. irounga angustirostris*)的一对 DRB 基因引物对长江江豚的基因组进行扩增,从 5 个个体中成功扩增并测序得到 5 条 MHC DRB 基因第二外显子 188 bp 的核苷酸序列。BLAST 结果表明这 5 条 DRB 特异序列与 GenBank 中白鲸 (*Delphinapterus leucas*)的 DRB2 序列具有较高的同源性,从而证实得到了预期扩增位点。进一步分析发现:这 5 条序列在 4 个核苷酸位点上产生替代,翻译后氨基酸序列在 3 个位点上发生替代;均具有完整的开放阅读框;且核苷酸的非同义替代率远远高于同义替代率;此外,从同一个体分离到两种以上不同 DRB 核苷酸序列,暗示着长江江豚在 DRB 座位上可能存在基因重复现象。初步分析结果表明长江江豚的 DRB 基因具有核苷酸多态性和氨基酸多态性及潜在功能性,并经受着强烈的自然选择。因此,该 DRB 座位可以作为适应性遗传标记进一步用于长江江豚遗传多样性以及种群适应能力评估等保护遗传学研究。

关键词:长江江豚;主要组织相容性复合体;DRB;遗传标记

中图分类号: Q959.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)05-0804-07

长江江豚 (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) 是我国特有的一种小型齿鲸,主要分布于长江中下游干流、洞庭湖和鄱阳湖及其主要支流^[1]。同时它也是目前惟一已知的、相对独立的江豚淡水种群^[2]。根据 1991 年之前的生态考察结果推测:当时长江江豚种群数量约为 2700 头^[1],但随后多年的考察结果表明该种群数量正在持续、迅速下降^[3-6]。此外,1998 年所做的种群生存力分析 (Population viability analysis, PVA) 结果显示,如果不采取保护措施,长江江豚将在 24—94 年内灭绝^[7]。基于该种群所面临的严峻现状,世界自然保护联盟 (UCN) 将其列入濒危级鲸类名录^[8],我国相关主管单位也正在申请将其保护等级由目前的国家二级升格为国家一级。

保护遗传学研究为物种的保护和长期发展提供了最基本的指导作用,而分子标记的发展和在一定程度上降低了相关遗传保护研究的盲目性,尤

其是与抗病性相关的遗传标记的应用对于濒危物种的遗传保护具有更切实的意义。到目前为止,对长江江豚进行的保护遗传学研究先后采用 RAPD、ISSR,以及线粒体 DNA 控制区、微卫星 DNA 等遗传标记^[9-14],而与抗病能力等密切相关的适应性遗传标记 (如 MHC) 在该亚种中的应用还未见报道。

主要组织相容性复合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) 是一类高度多态的基因家族,其表达产物分布于脊椎动物的细胞表面,在免疫反应中起着关键性作用^[15, 16]。MHC 主要包括两大类: Class II 和 Class I。许多哺乳动物在这两类基因上具有高度的多态性,这是动物对大量病原侵害后产生适应性反应的结果^[17, 18]。研究表明,隔离种群的 MHC 缺乏多态性,其种群灭绝的风险增高,因此,在进行动物驯养及遗传保护研究时应当考虑到 MHC 多态性^[19]。在进化研究中,由于 Class II 基因具有高度的多态性和同源性从而常被用作遗传标

收稿日期: 2008-02-22; 修订日期: 2008-11-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 项目, 2007CB411600); 科技部国际合作项目 (2004DFB03000); 国家自然科学基金 (30730018, 30570252) 资助

作者简介: 杜合军 (1973—), 男, 汉族, 河北邯郸人; 博士研究生; 主要从事鲸类保护遗传学研究。E-mail: duhejun21@sohu.com

通讯作者: 王丁, E-mail: Wangd@ihb.ac.cn; 郑劲松, E-mail: zhengjinsong@ihb.ac.cn

记^[15]。然而不是所有的 Class 基因在所有的动物中都是多态的^[20],其中只有四五个基因常具有较高的多态性,而 DRB 基因正是其中之一。由于 DRB 基因直接经受自然选择,它常被用于种群遗传、进化、分子生态和保护遗传学等研究领域^[19, 21, 22]。

本研究分离鉴定了长江江豚 MHC家族 DRB 基因的第二外显子 (Exon 2) 片段,包括部分肽结合区 (Peptide binding region, PBR), 目的在于初步了解长江江豚 DRB 基因的遗传变异特征及其与遗传多样性和进化之间的关系,为进一步在种群水平上评估该濒危种群的 MHC 遗传多样性和种群适应能力等保护遗传学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 用于本研究的 5 头长江江豚饲养于中国科学院水生生物研究所白鱔豚馆,三雄两雌,编号分别为: M19961225 (♂)、M20050705 (♂)、M20041031 (♂)、F19961225 (♀) 及 F19981227 (♀)。采用尾部静脉采血法,用一次性注射器从每个个体采取 5 mL 左右全血,用 ACD (Acid-citrate-dextrose) 抗凝后,立即进行 DNA 提取。

1.2 总 DNA 提取 应用 DNA 抽提试剂盒 E. Z. N. A. Blood DNA Kit (Omega Bio-tek Inc.) 从 ACD 抗凝的血液样品中提取基因组 DNA,操作按试剂盒说明书进行。将最后得到的 DNA 重悬于 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris, 0.1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中,通过琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化乙锭) 电泳检测 DNA 质量,保存在 -20℃ 冰箱内作为 PCR 扩增模板。

1.3 引物来源 本研究所用引物由上海生工生物技术公司合成, PAGE 纯化,引物序列参照北象海豹 (*Miirounga angustirostris*) DRB 基因第二外显子扩增引物对 (DRB2A: 5'-AAC GGG ACG GAG CGG GTG CG-3' 和 DRB2B: 5'-TCG CCG CTG CAC CAG GAA GC-3')^[23]。

1.4 PCR 扩增 PCR 反应体系如下: 1 × buffer; 50—100 ng DNA 模板; 0.5 mmol/L 引物; 25 mmol/L MgCl₂; 0.2 mmol/L dNTPs; 1 U Taq DNA 多聚酶 (BioStar); 补充灭菌双蒸水至终体积 100 μL。PCR 扩增条件如下: 92℃ 预变性 4 min, 接着 92℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 然后 72℃ 延伸 1 min, 接着在此退火温度下继续循环 36 次, 最后 72℃ 充分延伸 7 min。PCR 扩增在 PTC100 热循环仪 (Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc.) 上完成。

1.5 PCR 产物纯化、克隆与测序 PCR 产物经 2% 琼脂糖胶电泳分离, 切下目的带, 采用 Ultra-Pure™ PCR 产物纯化试剂盒 (上海赛百盛基因技术有限公司) 纯化回收。纯化后的 DNA 片段连入 pMD-18T 载体, 并将重组后的质粒转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。通过氨苄抗性及菌液 PCR 进行阳性克隆筛选。从每个个体中随机挑出 7 个阳性克隆进行测序, 测序工作由上海联合基因有限公司完成, 测序反应采用 M13 通用引物在 AB 3730 自动测序仪上进行。

1.6 序列分析 所得序列用 Clustal X 软件进行比对^[24]并辅以人工校正, 以确定变异位点以及不同序列。在 GenBank 中对所得到的 DNA 序列进行 BLAST 比对, 以确定所得片段为目的基因。用 MEGA3.1 软件^[25]中的附带程序来计算同义替代 (Synonymous substitution) 和非同义替代 (Nonsynonymous substitution), 并用基于 Kimura 双参数模型的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建 DRB 序列的系统树。

2 结果

2.1 DRB 序列鉴定

本研究从 5 头长江江豚 35 个阳性克隆中共分离出 5 条不同的核苷酸序列, 长度均为 188 bp (图 1), 在每个个体中分离到两条或三条不同的核苷酸序列 (表 1)。

表 1 本研究所得到的 5 条 DRB 特异序列在 5 头长江江豚中的分布情况

Tab. 1 Distribution of 5 unique DRB sequences among the five Yangtze finless porpoises

特异序列 Unique sequences	M19961225	M20050705	F19981227	M20041031	F19961225
Neph-DRB [*] 01	+		+	+	
Neph-DRB [*] 02	+	+	+	+	+
Neph-DRB [*] 03		+		+	
Neph-DRB [*] 04	+				
Neph-DRB [*] 05					+

在 GenBank中通过 BLAST进行核苷酸比对,发现得到的序列与人类的基因组中的 *HLA-DRB* 序列相似度高达 90%,与白鲸 (*Delphinapterus leucas*) *DRB2*第二外显子的序列相似度最高,达到 97%。进一步利用 NCB I网站上提供的基于遗传距离的聚类功能 (Distance tree of results),将 BLAST比对的结果进行聚类分析,发现所得序列与瓶鼻海豚 (*Tursiops truncatus*)的 *DRB* 基因的 3 条序列及白鲸的 *DRB2*序列紧密的聚在一起。

2.2 序列特征

2.2.1 核苷酸变异

序列比对结果表明在这 5 条特异序列中没有插入、缺失或异常的终止密码子;共检测到 4 个变异位点 (2 个发生在第一密码子上,1 个在第二密码子上,1 个在第三密码子上);在这 4 个位点上发生的 9 次替代均为转换 (图 1);其核苷酸的序列多态性为 2.1%。

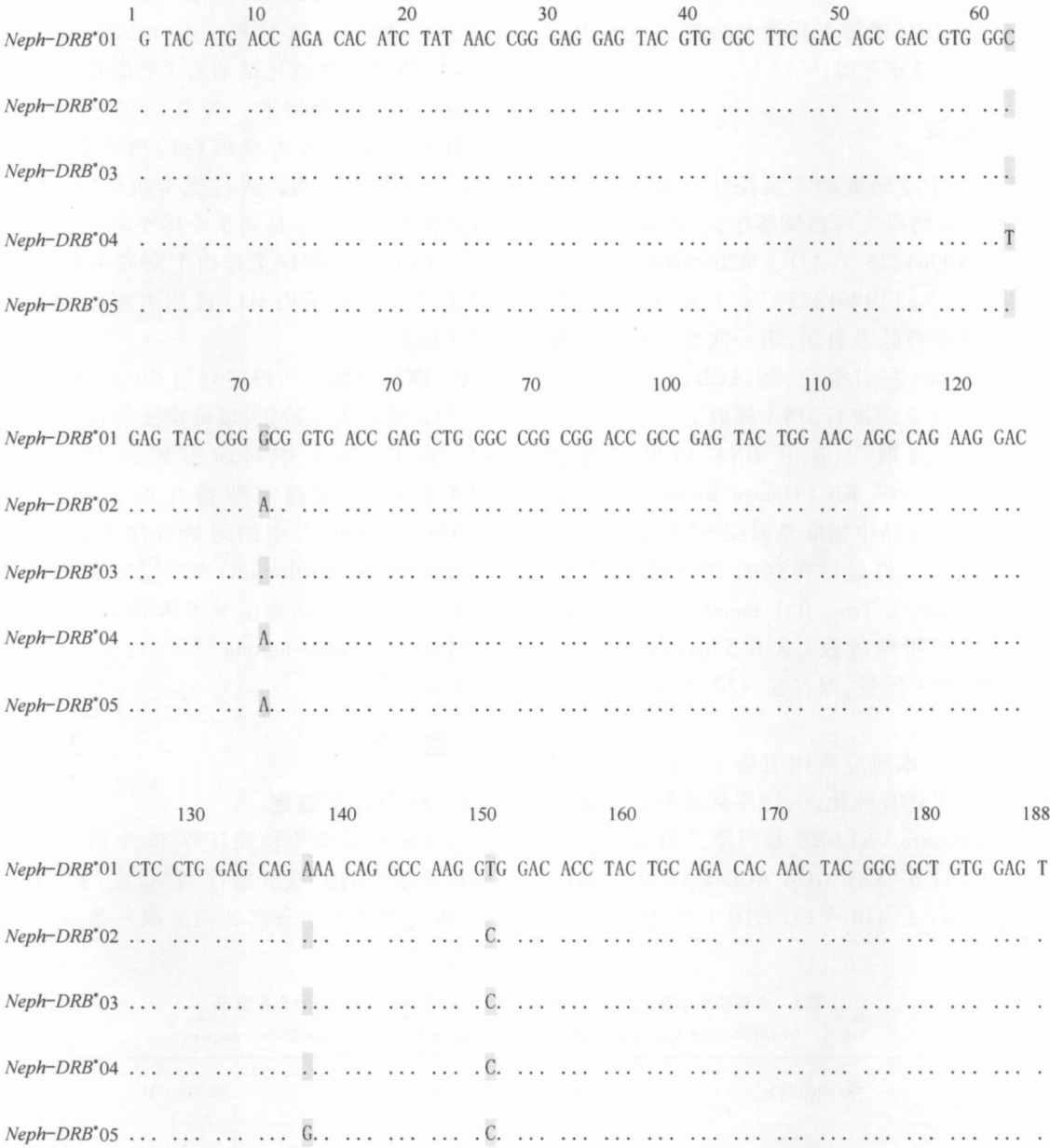


图 1 本研究分离得到的 5 条长江江豚 *DRB* 特异序列

Fig. 1 Five unique *DRB* sequences isolated from Yangtze finless porpoise

*Neph-DRB*01*作为比对的参照序列,圆点表示与 *Neph-DRB*01*具有相同的核苷酸,阴影部分显示变异位点
*Neph-DRB*01* used as the reference sequence, a dot indicates the same nucleotide as in the reference and variable sites are highlighted by shade

2.2.2 氨基酸变异

分离得到的 5 条 DRB 核苷酸序列翻译后序列长为 62 个氨基酸,对应于人的 *HLA-DRB1**0101 和白鲸的 *Dele-DRB2**0601 氨基酸序列的 26—87 位

点^[18, 26]。9 次核苷酸替代导致在 3 个氨基酸位点发生了 8 次替代(图 2),其中 1 次氨基酸替代发生在肽结合区(PBR)的 1 个位点上。氨基酸序列多态性为 4.8%。

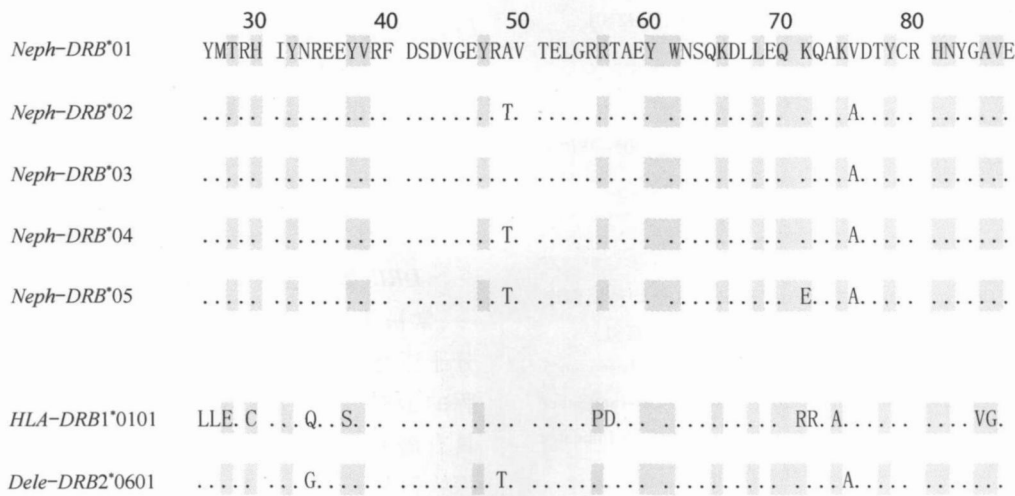


图 2 长江江豚 DRB 序列翻译后的氨基酸序列以及对应于人的 *HLA-DRB1**0101 和白鲸的 *Dele-DRB2**0601

Fig. 2 Induced amino acid sequences of the five DRB unique sequences isolated from Yangtze finless porpoise, and the corresponding sequences of *HLA-DRB1**0101 and *Dele-DRB2**0601 from human and beluga respectively
*Neph-DRB**01 作为比对的参照序列,圆点表示与 *Neph-DRB**01 具有相同的氨基酸,阴影部分显示推测的肽结合区(PBR)^[18, 26]
*Neph-DRB**01 used as the reference, a dot indicates the same amino acid as in the references, and the shaded sites indicate the possible PBR (Peptide binding Region)^[18, 26]

2.2.3 同义替代和非同义替代

无论是肽结合区还是全序列其非同义替代率与同义替代率之比均大于 1,尤其是对于肽结合区,其非同义替代与同义替代之比远远大于 1,而对于非肽结合区,其非同义替代率与同义替代率之比小于 1(表 2)。

2.3 系统树构建结果

将本研究从长江江豚基因组中分离得到的 5 条 DRB 特异序列与 GenBank 中人类(*Homo sapiens*)的 *HLA-DRB1**0101(NM_002124)、牛(*Bos taurus*)的 *B2LA-DRB3**2(NM_001012680)、北象海豹的 *Mian-DRB2**01^[23]以及白鲸的 *Dele-DRB1**0101

(AF012930)和 *Dele-DRB2**0601(AF012938)、一角鲸(*Monodon monoceros*)的 *Mamo-DRB**0101(AF012939)、座头鲸(*Megaptera novaeangliae*)的 *MenoQM90010-DRB**1(DQ354683)、瓶鼻海豚的 *Tutr-DRB**01(EF017817)、蓝鲸(*Balaenoptera musculus*)的 *Bamu94003-DRB**1(DQ354667.1)、长须鲸(*Balaenoptera physalus*)的 *BaphM02-DRB**1c(DQ354672)和北极露脊鲸(*Balaena mysticetus*)的 *Bamy92005-DRB**1c(DQ354669)序列用邻接法构建系统树。长江江豚的 5 条 DRB 特异序列紧密聚集在一起,之后与白鲸的 *Dele-DRB2**0601 聚在一起且具有很高的自举值(Bootstrap value)。

表 2 五条 DRB 序列中发生的非同义替代和同义替代

Tab. 2 Non-synonymous substitution and synonymous substitution among the five DRB sequences

		非同义替代率	同义替代率	非同义替代/同义替代
		Ratio of non-synonymous substitutions	Ratio of synonymous substitutions	Non-synonymous substitutions/synonymous substitutions
全序列	All region	0.0106 ±0.0066	0.0076 ±0.0081	1.3947
肽结合区	PBR	0.0100 ±0.0102	0.0000 ±0.0000	∞
非肽结合区	Non-PBR	0.0109 ±0.0078	0.0112 ±0.0112	0.6182

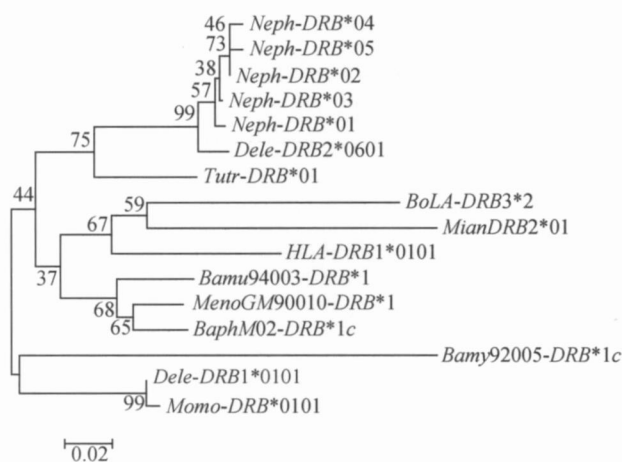


图3 本研究所获得的长江江豚的5条DRB序列与其他物种同源序列之间的系统发育关系(自举值通过1000次重复获得)

Fig. 3 Phylogenetic tree was constructed by NJ methods based on 5 DRB unique sequences isolated from Yangtze finless porpoise and other 11 DRB sequences downloaded from GenBank (Numbers indicates bootstrap values by 1000 replicates)

3 讨论

本研究利用北方象海豹的一对DRB2引物从5头长江江豚的基因组中成功扩增出DRB基因第二外显子的188 bp片段。首先以人类的基因组为标准进行比对,发现与DRB序列相似度最高。进一步将从长江江豚中分离得到的序列在GenBank中与其他动物进行序列比对并将比对的结果进行聚类分析,发现与白鲸的DRB2序列相似度最高且聚在一个类群中,说明长江江豚与白鲸的DRB2序列具有很高的同源性。因此,可以确认所分离的序列的正确性。

本研究所扩增出的5条DRB序列没有插入、缺失,均具有完整的阅读框,表明长江江豚的在该座位上具有潜在的功能性。无论是对于整条序列还是对于肽结合区,非同义替代与同义替代的比值都远远大于1,而对于非肽结合区则其非同义替代率与同义替代率的比率小于1,表明长江江豚的DRB基因的肽结合区经受着强烈的正向选择(Positive selection)^[27]。从该角度也印证DRB基因是具有潜在功能的基因。

本研究在两头江豚中各自分离到3条不同的DRB特异序列,从而暗示着长江江豚的DRB基因可能存在着基因重复(Gene duplication)^[28]。在与长江江豚同域分布的鲸类动物白鱀豚(*Lipotes vexillifer*)DQB以及本物种的DQB基因座位上也有人检测到基因重复的现象^[29,30]。

将从长江江豚中分离得到的DRB序列与人、牛、北象海豹及部分齿鲸类和须鲸类动物的DRB同源序列构建系统树,发现长江江豚的5条DRB序列紧密地聚集在一起。虽然长江江豚的DRB同源基因与亲缘关系较近的白鲸的DRB2基因在系统树上较近,但并未发现有跨种多态性(Trans-species polymorphism)现象^[31]。由于该研究所用的样品量较小分离得到的DRB序列也较少,至于江豚的DRB基因是否同MHC中其他某些基因或类似其他物种DRB基因存在跨种多态性现象^[32-35]需要进一步在大种群的层次上分离出更多的DRB序列来证实。

DRB基因是MHC家族中多态性较高的区域之一,常被用作遗传标记应用于种群遗传、分子生态和分子进化研究^[36-38]。而本研究的结果表明长江江豚的DRB基因存在着序列多态性和基因重复而且具有潜在功能,因此,利用该基因片段作为遗传标记深入开展长江江豚种群适应能力评估、保护管理单元划分等保护遗传学研究,对于该濒危种群的保护和管理将具有非常重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Zhang X F, Liu R J, Zhao Q Z, et al. The population of finless porpoise in the middle and lower reaches of Yangtze River [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 1993, 13 (4): 260—270 [张先锋, 刘仁俊, 赵庆中, 等. 长江中下游江豚种群现状评价. 兽类学报, 1993, 13 (4): 260—270]
- [2] Gao A L, Zhou K Y. Geographical variation of external measurements and three subspecies of *Neophocaena phocaenoides* in Chinese waters [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 1995, 15 (2): 81—92 [高安利, 周开亚. 中国水域江豚外形的地理变异和江豚的三亚种. 兽类学报, 1995, 15 (2): 81—92]
- [3] Liu R J, Wang D. Studies on population size and activities alteration regularities of *Lipotes vexillifer* and *Neophocaena phocaenoides* in the Yangtze River [A]. B1 Report, 1996, 1—8
- [4] Liu R J, Wang D, Yang J, et al. Some new considerations for the conservation of *Lipotes vexillifer* and *Neophocaena phocaenoides* in China [A]. B1 Report, 1997, 39—44
- [5] Wang D, Liu R J, Zhang X F, et al. Population status and conservation of the Yangtze finless porpoise [J]. *Occasional Papers of the IUCN/SSC*, 2000, 23: 81—85
- [6] Wei Z, Wang D, Zhang X F, et al. Population size, behavior, movement pattern and protection of Yangtze finless porpoise at Bali Jiang section of the Yangtze River [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2002, 11 (5): 427—432 [魏卓, 王丁, 张先锋, 等. 长江八里江江豚的种群数量、行为及其活动规律与保护. 长江流域资源与环境, 2002, 11 (5): 427—432]
- [7] Zhang X F and Wang K X. Population viability analysis for the

- Yangtze finless porpoise [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, **19** (4): 529—533 [张先锋, 王克雄. 长江江豚种群生存力分析. 生态学报, 1999, **19** (4): 529—533]
- [8] Hilton-Taylor C. IUCN Red List of Threatened Species [C]. Gland: IUCN-The World Conservation Union, 2000
- [9] Li D M, Lin G, Zheng J S, *et al* Preliminary analysis on genetic diversity of two finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*) populations with ISSR marker [J]. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2005, **29** (6): 546—550 [李东明, 林刚, 郑劲松, 等. 两个不同江豚群体 ISSR 遗传多样性初步分析. 南昌大学学报 (理科版), 2005, **29** (6): 546—550]
- [10] He S P, Wang D, Wang W, *et al* Genetic diversity in the Yangtze finless porpoise by RAPD analysis [J]. *High Technology Letters*, 2005, **11** (2): 207—210
- [11] Xia J H, Zheng J S, Wang D. *Ex situ* conservation status of an endangered Yangtze finless porpoise population (*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*) as measured from microsatellites and mtDNA diversity [J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2005, **62**: 1711—1716
- [12] Xia J H, Zheng J S, Wang D. Individual identification of the Yangtze finless porpoise *Neophocaena phocaenoides asiaorientalis* inhabiting the Tian-e-Zhou National Reserve on microsatellite fingerprints [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, **51** (1): 142—148 [夏军红, 郑劲松, 王丁. 用微卫星指纹识别天鹅洲保护区长江江豚个体. 动物学报, 2005, **51** (1): 142—148]
- [13] Zheng J S, Xia J H, He S P, *et al* Population genetic structure of the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*): Implications for management and conservation [J]. *Biochemical Genetics*, 2005, **43**: 307—320
- [14] Xia J H, Zheng J S, Wang D. Applicability of cetacean microsatellite primers in the Yangtze finless porpoise [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28** (6): 640—646 [夏军红, 郑劲松, 王丁. 鲸类微卫星引物对长江江豚的适用性研究. 水生生物学报, 2004, **28** (6): 640—646]
- [15] Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex [M]. New York: John Wiley and Sons 1986
- [16] Hedrick P W [A]. In: W V Holt, A R Pickard, J C Rodger, *et al* (Eds), *Reproduction Science and Integrated Conservation* [C]. Cambridge, Cambridge Univ Press 2003, 97—113
- [17] Klein J, Bontrop R E, Dawkins R L, *et al* Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal [J]. *Immunogenetics*, 1990, **31**: 217—219
- [18] Murray B W, Malik S, White B N. Sequences variation at the major histocompatibility complex locus *DQB* in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) [J]. *Mol Biol Evol*, 1995, **12**: 582—593
- [19] Yuhki N, O'Brien S J. DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 836—840
- [20] Parham P. Virtual reality in the MHC [J]. *Immunol Rev*, 1999, **167**: 5—15
- [21] Bugawan T L, Erlich H A. Rapid typing of *HLA-DQB1* DNA polymorphism using nonradioactive oligonucleotide probes and amplified DNA [J]. *Immunogenetics*, 1991, **33**: 163—170
- [22] Hambuch T M, Lacey E A. Enhanced selection for MHC diversity in social tuco-tucos [J]. *Evolution*, 2002, **56**: 841—845
- [23] Weber D S, Stewart B S, Schienman J, *et al* Major histocompatibility complex variation at three class loci in the northern elephant seal [J]. *Molecular Ecology*, 2004, **13**: 711—718
- [24] Jeanmougin F, Thompson J D, Gouy M, *et al* Multiple sequence alignment with ClustalX [J]. *Trends Biochem. Sci*, 1998, **23**: 403—405
- [25] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform.*, 2004, **5**: 150—163
- [26] 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
- [27] Hughes A, Nei M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: Evidence for overdominant selection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 958—962
- [28] Hughes A L, Yeager M. Natural selection and the evolutionary history of major histocompatibility complex loci [J]. *Frontiers in Bioscience*, 1998, **3**: 509—516
- [29] Yang G, Yan J, Zhou K, *et al* Sequence variation and gene duplication at MHC *DQB* loci of baiji (*Lipotes vexillifer*), a Chinese river dolphin [J]. *Journal of Heredity*, 2005, **96**: 310—317
- [30] Xu S, Sun P, Zhou K, *et al* Sequence variability at three MHC loci of finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*) [J]. *Immunogenetics*, 2007, **59**: 581—592
- [31] Klein J. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis [J]. *Human immunology*, 1987, **19** (3): 155—162
- [32] Van Den Bussche R A, Hooper S R, and Lochmiller L R. Characterization of MHC-DRB allelic diversity in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) provides insight into MHC-DRB allelic evolution within Cervidae [J]. *Immunogenetics*, 1999, **49**: 429—437
- [33] Hayashi K, Nishida S, Yoshida H, *et al* Sequence variation of the *DQB* alleles in the cetacean MHC [J]. *Mammal Study*, 2003, **28**: 89—96
- [34] Wan Q, Zhu L, Wu H, *et al*, Major histocompatibility complex class II variation in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) [J]. *Molecular Ecology*, 2006, **15**: 2441—2450
- [35] Bryja J, Galan M, Charbonnel N, *et al* Duplication, balancing selection and trans-species evolution explain the high levels of polymorphism of the *DQA* MHC class II gene in voles (*Arvicolinæ*) [J]. *Immunogenetics*, 2006, **58**: 91—202
- [36] Baker C S, Vant M D, Dalebout M L, *et al* Diversity and duplication of *DQB* and *DRB*-like genes of the MHC in baleen whales (suborder: Mysticeti) [J]. *Immunogenetics*, 2006, **58**: 283—296
- [37] Martínez-Agüero M, Flores-Ramírez S, Ruiz-García M. First

report of major histocompatibility complex class loci from the Amazon pink river dolphin (genus *Inia*) [J]. *Genet Mol Res*, 2006, 5: 421—431

[38] Edwards S V, Hedrick P W. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection [J]. *Trends Ecol Evol*, 1998, 13: 305—311

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MHC-DRB GENE EXON 2 IN THE YANGTZE FINLESS PORPOISE

DU He-Jun^{1,2}, ZHENG Jin-Song¹, WU Min^{1,2}, ZHAO Qing-Zhong¹ and WANG Ding¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: The major histocompatibility complex (MHC) is a large gene family encoding a set of transmembrane proteins that play a key role to initiate immune responses in the vertebrates. *DRB* gene is one member of the MHC gene family and usually with high diversity, thus, it is prevalently used as an adaptive genetic marker in conservation genetics study. The endangered Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) is also known as the only freshwater finless porpoise population in Chinese waters. In order to develop MHC genetic marker that suitable for conservation genetics study, a primer pair that originally designed for *DRB* gene of North elephant seal (*Mirounga angustirostris*) was used to amplify the genome of the Yangtze finless porpoise. As a result, 5 *DRB* exon 2 unique sequences of 188bp (including partial peptide binding region, PBR) were first isolated from 5 individuals via PCR and sequencing. When BLAST in GenBank, these sequences showed high similarity (97%) with the *DRB2* allele of the beluga (*Delphinapterus leucas*), indicating the expected *DRB* loci were successfully obtained for the Yangtze finless porpoise. In further sequence analysis, nucleotide substitutions were decided at 4 sites with inducing amino acid substitutions at 3 sites, all of the 5 *DRB* unique sequences showing entire open reading frames, and also much more non-synonymous substitutions than synonymous substitutions were detected especially at PBR. Additionally, more than two unique sequences were identified from one individual, suggesting possible gene duplication at this *DRB* locus. All of the above results indicated that *DRB* gene in the Yangtze finless porpoise had potential function and high variability, and also underwent strong positive selection. Thus, the *DRB* locus isolated and identified in this study could serve as useful adaptive genetic marker in the conservation genetics studies of the Yangtze finless porpoise, such as MHC genetic diversity and population adaptability estimation.

Key words: Yangtze finless porpoise; MHC; *DRB*; Genetic marker