

3种麻蜥MHC I类基因外显子3和外显子4序列特征*

原秀云^{1,2} 刘金龙^{1,2} 曾晓茂¹ 郭宪光^{1**}

¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041

²中国科学院大学 北京 100049

摘要 主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) 是有脊椎动物基因组中的一个高度多态性的基因家族, 与免疫系统密切相关, MHC基因特征在哺乳类、鸟类、两栖类和鱼类中已被较好地描述. 为了解爬行动物MHC基因的序列特征, 通过PCR技术从胎生种密点麻蜥 (*Eremias multiocellata*)、荒漠麻蜥 (*Eremias przewalskii*) 及卵生种山地麻蜥 (*Eremias brenchleyi*) 的肝脏中克隆了MHC I类基因外显子3和4的DNA片段, 采用RT-PCR (逆转录-PCR) 从这3种麻蜥的妊娠期子宫组织克隆了这两个外显子的cDNA片段. 结果表明, 3种麻蜥MHC I类基因均发生基因重复, 密点麻蜥和山地麻蜥至少有4个基因座位, 荒漠麻蜥至少有5个基因座位. 在山地麻蜥获得的其中一条DNA片段中编码氨基酸的密码子突变为终止密码子, 推测其为MHC I类基因的假基因. 在外显子3编码的 $\alpha 2$ 结构域中检测到多个多肽结合位点和 $\beta 2$ -微球蛋白结合位点以及一个保守的半胱氨酸位点. 在外显子4编码的 $\alpha 3$ 结构域中检测到多个 $\beta 2$ -微球蛋白结合位点和CD8分子结合位点以及一个保守的半胱氨酸位点. 基于氨基酸的系统发育分析提示3种麻蜥的子宫均表达经典的MHC I类基因, 可能有一些MHC基因座位未在子宫中表达. DNA系统发育重建揭示3种麻蜥MHC I类基因谱系没有表现出物种特异性进化, 而表现出跨种多态性. 上述结果为进一步研究胎生繁殖方式与母体免疫系统的协同进化及有鳞目MHC的演化奠定了基础. 图5 表3 参36 附表1

关键词 主要组织相容性复合体; 外显子; 基因重复; 跨种多态性; 麻蜥

CLC Q959.6⁺20.3

Characterization of major histocompatibility complex (MHC) class I loci exon 3 and exon 4 in three racerunner species (Squamata: Lacertidae: *Eremias*)*

YUAN Xiuyun^{1,2}, LIU Jinlong^{1,2}, ZENG Xiaomao¹ & GUO Xianguang^{1**}

¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract The major histocompatibility complex (MHC) genes have been well characterized in mammals, birds, amphibians and fishes, but little is known about their organization in reptiles, despite the fact that reptiles occupy an important phylogenetic position for understanding the evolutionary history of vertebrates MHC genes. In this study we used polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) to amplify the genomic exon 3 and exon 4 fragments of MHC class I genes in three racerunner lizards, including viviparous Multiocellated Racerunner (*Eremias multiocellata*), viviparous Gobi Racerunner (*Eremias przewalskii*), and oviparous Ordos Racerunner (*Eremias brenchleyi*). We also presented the molecular characterization of class I sequences for racerunner lacertids. Gene duplication was detected in the three *Eremias* species, at least four MHC class I loci in Multiocellated Racerunners and Ordos Racerunners, and at least five in Gobi Racerunners. A putative class I pseudogene was inferred in Ordos Racerunner for a premature stop codon in a segment of so-called exon 3. The peptide binding region, $\beta 2$ -microglobulin interaction sites and a conserved cysteine residue were recognized in $\alpha 2$ domain encoded by exon 3. The $\beta 2$ -microglobulin interaction sites, CD8 molecule interaction sites and a conserved cysteine residue were recognized in $\alpha 3$ domain encoded by exon 4. Putative classical class I genes were expressed in the uterus of both oviparous and viviparous racerunners during pregnancy, along with some alleles unexpressed in uterine. In addition, phylogenetic reconstruction suggested the existence of trans-species polymorphism in MHC class I genes in *Eremias*. These findings provide clues for further investigations of co-evolution of viviparity and maternal immune system, as well as evolution

收稿日期 Received: 2014-02-10 接受日期 Accepted: 2014-03-21

*中国科学院生命科学领域优秀青年科技专项 (KSCX2-EW-Q-6) 和国家自然科学基金项目 (31272281) 资助 Supported by the Science and Technology Project for Outstanding Youths in Life Science (KSCX2-EW-Q-6) from the Chinese Academy of Sciences, and the National Natural Science Foundation of China (31272281)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: guoxg@cib.ac.cn)

of squamate MHC.

Keywords MHC; exon; gene duplication; trans-species polymorphism; *Eremias*

主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) 是广泛存在于有颌脊椎动物体内, 与免疫功能密切相关并编码免疫球蛋白受体的高度多态基因群, 在免疫系统中发挥着十分重要的作用^[1-2]. 其表达产物不仅直接参与移植排斥反应和T细胞的分化发育, 而且在免疫应答的启动和免疫调节中都发挥着非常重要的作用. MHC I类基因可分为两类, 即经典的MHC I类基因 (MHC Ia) 和非经典的MHC I类基因 (MHC Ib). 前者在有核细胞均表达, 其编码的蛋白识别并结合病毒及细胞内多肽, 并呈递给细胞毒性T淋巴细胞, 多态性程度较高^[2]. 而后者只在特定的细胞中表达, 如B细胞或巨噬细胞, 识别并结合细胞外病原多肽, 呈递给辅助性T细胞, 较少或没有多态性^[3-5].

对于哺乳动物而言, 成熟胚胎组织下调经典的MHC I类基因的表达量是胚胎“躲避”母体免疫系统的机制之一^[6]. 胎生的有鳞目爬行动物种具有胎盘, 母体和胎儿组织发生亲密接触, 母体对“半外来”胚胎产生免疫识别^[7-8]. 石龙子 (*Pseudemoia* spp.) MHC I类基因在非繁殖期、孕期和妊娠后期的卵生种和胎生种子宫里均被表达^[9]. 从胎生种南方草石龙子 (*Pseudemoia entrecasteauxii*) 的子宫组织发现4种Ia类基因和至少2种Ib基因表达^[9], 这表明该物种可能通过编码和调节MHC I类基因表达而使胚胎“躲避”母体免疫系统. 通过转录组测序, 比较妊娠和非妊娠的眼点石龙子 (*Chalcides ocellatus*) 子宫组织MHC基因的表达量, 发现其妊娠期子宫组织经典的MHC I类和MHC II类基因表达量均下调^[10], 提示该物种可能也和哺乳动物类似, 妊娠期通过下调经典的MHC I类基因的表达量来避免胚胎和母体之间的免疫排斥.

MHC富有多态性, 发生频繁的基因重复和重排, 这导致脊椎动物不同支系间MHC的结构和演化可能差异很大. MHC基因特征在哺乳类[尤其是人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*)]、鸟类、两栖类和鱼类中已被较好地描述, 但对爬行动物中其结构特征知之甚少. 爬行动物有着很重要的系统发育位置, 研究其MHC基因的序列特征对于理解MHC的演化具有重要意义. 而爬行动物的蜥蜴中MHC仅有零星研究^[9-14], 这可能是由于在非模式生物中, MHC的分离和特征分析仍然具有挑战性且费时费力^[15].

麻蜥属 (*Eremias*) 隶属于有鳞目 (Squamata) 蜥蜴科 (Latertidae), 是典型的草原和荒漠动物, 广泛分布于欧洲东南部、亚洲西部和中亚地区, 往东到达中国东北和朝鲜^[16]. 中国分布麻蜥约13种, 广布于北部及西北诸省, 南至

江淮平原^[17]. 麻蜥属分为5个亚属^[16-17], 其中*Aspidorhinus*、*Rhabderemias*、*Ommateremias*和*Scapteira*亚属为卵生方式. 而*Pareremias*亚属中除丽斑麻蜥 (*Eremias argus*) 和山地麻蜥 (*Eremias brenchleyi*) 外, 其余均为胎生, 其中以密点麻蜥 (*Eremias multiocellata*) 和荒漠麻蜥 (*Eremias przewalskii*) 为代表, 在中国分布最广. 麻蜥属的胎生繁殖方式为一次起源^[18]. 要研究麻蜥胚胎MHC I类基因表达调节, 首先必须了解其MHC I类基因特征. 由于MHC的快速演化和仅有零星的蜥蜴MHC序列可供比较, 麻蜥的MHC I类基因特征有可能与其它脊椎动物不同. 本研究以胎生的密点麻蜥和荒漠麻蜥及卵生的山地麻蜥为对象, 通过PCR和RT-PCR技术克隆其妊娠中期个体的MHC I类基因外显子3 (Exon 3) 和外显子4 (Exon 4) DNA片段和子宫中这两个外显子的cDNA片段, 进而比较分析3种麻蜥的MHC I类基因DNA序列及编码的氨基酸序列特征, 并分别比较3个物种MHC I类基因DNA和在子宫中的表达情况, 旨在为胎生繁殖方式与母体免疫系统的协同进化和有鳞目MHC的演化研究积累基础数据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

野外采集获得妊娠中期的密点麻蜥2号、荒漠麻蜥3号和山地麻蜥1号雌性个体, 详细信息见表1. 先注射戊巴比妥钠 (10 mg/mL), 麻醉后取子宫组织. 所有个体均在子宫中可见胚胎或卵, 以此判定所取样品为妊娠中期组织, 分成两份用RNA储存液 (RNA Hold, Transgen Biotech, 北京) 和液氮低温分别保存. 另取肝脏组织作为基因组DNA提取材料, 以95%酒精固定后-20 °C保存. 所用标本和组织样品均保存于中国科学院成都生物研究所两栖爬行动物研究室.

1.2 基因组DNA提取、RNA提取及cDNA合成

基因组DNA提取采用试剂盒*EasyPure* Genomic DNA Kit (TransGen Biotech, 北京), 用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果. 总RNA采用Trizol试剂盒 (Invitrogen) 提取, 参考试剂盒使用说明书进行. 总RNA提取后用RNase-free Dnase (Promega) 处理. 由RNA反转录成cDNA采用第一链合成系统和随机引物 (MBI Fermentas), 依照说明书进行.

1.3 外显子3和外显子4片段扩增

扩增3种麻蜥DNA和cDNA的外显子3的引物 (2MHCF, 2MHCR) 和外显子4的引物 (MHCIF, MHCIR) 参照石龙

表1 本研究所用物种信息表

Table 1 Species information used in this study

物种 Species	缩写 Abbreviation	个体数量 Individual number	采集地点 Collection site	繁殖方式 Reproductive mode
密点麻蜥 <i>Eremias multiocellata</i>	Ermu	2	甘肃省靖远县 Jingyuan County, Gansu Province, China (N 36°32'26.08", E 104°41'29.17")	胎生 Viviparity
荒漠麻蜥 <i>Eremias przewalskii</i>	Erpr	3	甘肃省民勤县 Minqin County, Gansu Province, China (N 38°34' 46.7", E 102°57' 46.2")	胎生 Viviparity
山地麻蜥 <i>Eremias brenchleyi</i>	Erbr	1	山东省青州市 Qingzhou, Shandong Province, China (N 36°40'05.36", E 118°23'59.95")	卵生 Oviparity

子MHC I类基因研究^[9]. PCR反应体系为50 μ L, 其中DNA (cDNA) 1-2 μ L, 引物一对各0.4 μ mol/L, $2 \times$ EasyTaq PCR SuperMix 25 μ L (TransGen Biotech, 北京), 最后加双蒸水补足反应体系. PCR反应在PTC-200 (Bio-Rad) 热循环仪上进行. 扩增条件为94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 然后30次循环(94 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C复性30 s (exon 4为72 $^{\circ}$ C复性30 s), 72 $^{\circ}$ C延伸60 s), 最后72 $^{\circ}$ C终延伸10 min. 每次PCR反应均设不含模板DNA (cDNA) 的空白对照, PCR产物于4 $^{\circ}$ C冰箱内短暂保存.

1.4 PCR产物回收及克隆测序

PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳分离, 电压设为80 V, 电泳时间约50 min. 在紫外灯下, 将目的片段(约200 bp)切下, 放入1.5 mL灭菌离心管, 采用琼脂糖凝胶回收试剂盒 EasyPure Quick Gel Extraction Kit (TIANGEN BIOTECH, 北京)回收纯化. 将目的DNA与T1载体(TransGen Biotech, 北京)连接, 重组子转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞, 克隆操作按照常规方法^[19]进行. 每个个体的每个片段均挑选10个克隆, 采用PCR方法鉴定阳性克隆, 每个个体每个片段均得到8-10个阳性克隆. 所有阳性克隆产物取200 μ L送上海生工公司(Sangon Biotech, 上海)用通用引物(M13F)测序, 剩余的阳性克隆产物加甘油后-20 $^{\circ}$ C保存备用.

1.5 数据分析

序列峰图读取采用Chromas 2.4.1软件(<http://www.technelysium.com.au>), Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对确定为目的序列. 序列比对采用Clustalx2.1^[20], 选用默认参数. 采用DAMBE5软件^[21]确定各个个体的不同等位基因(distinct allele). 利用MEGA5软件^[22]统计变异位点, 比较不同位点及计算核苷酸多态性. 然后, 在MEGA5软件中, 将所得序列片段与人类MHC I类分子HLA-A (GenBank登录号U07161) 和HLA-G (GenBank登录号M32800) 相比对, 放到合适的阅读框中翻译成氨基酸.

采用MEGA5软件^[22]中基于泊松(Poisson)模型的邻接法(Neighbor-joining, NJ)对山地麻蜥和密点麻蜥的外显子3氨基酸序列构建系统发生树, 分支节点置信度(BP)用自展检验(Bootstrap)经1 000次重复抽样得到. 分别加入南方草石龙子的4条MHC 1a和4条MHC 1b做比较^[9]. 此外, 从GenBank下载以下氨基酸序列: 绿丛林蜥(*Ameiva ameiva*) (登录号AAA48518), *Amam-LC13*; 大苇莺(*Acrocephalus arundinaceus*), *Acar-CN3* (登录号AJ005503); 喙头蜥(*Sphenodon punctatus*), *Sppu-U*01* (登录号ABA42599), *Sppu-U*02* (登录号ABA425600); 眼镜王蛇(*Ophiphagus hannah*), *Opha-L345* (登录号ETE60318); 北水蛇(*Nerodia sipedon*), *Nesi-SCI* (登录号AAA49389); 安乐蜥(*Anolis carolinensis*), *Anca-1* (登录号XP_003229871), *Anca-2* (登录号XP_003229571); 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*), *Pesi-b01* (登录号BAD32144) 作为外群. 以人类(*H. sapiens*), *HLA-A* (登录号CBW57246) 赋根.

根据新近MHC I类基因研究^[13], 从GenBank下载以下外群基因序列: 绿丛林蜥(*A. ameiva*), *LC13* (登录号M81096), *LC1* (登录号M81094); 加拉帕戈斯陆鬣蜥(*Conolophus subcristatu*), *Cosu-UB*0102* (登录号

EU604314); 北水蛇(*N. sipedon*), *SCI* (登录号M81099), 以喙头蜥(*S. punctatus*), *Sppu-U*01* (登录号DQ145788) 赋根. 采用贝叶斯推论(Bayesian inference, BI)重建外显子3系统发育树. 先用jModelTest 2.1.4^[23]基于贝叶斯信息标准^[24](Bayesian information criterion, BIC)选取核苷酸进化的最适模型. 然后在MrBayes 3.2^[25]中构建贝叶斯树, 以后验概率(Posterior probability, PP)表示各分支的节点可信度. 起始树为随机树, 独立运行二次. 以3条热链、1条冷链的马尔科夫蒙特卡罗(Markov chain Monte Carlo)方法运行 1×10^7 代, 每1 000代抽一次样, 最初3 000棵树作为老化样本(Burn-in)被舍弃, 余下的7 001棵树用于估算一致树(consensus tree)及相关参数.

2 结果

2.1 序列特征

所得的个体不同等位基因(Allele)序列上传GenBank, 登录号为KJ406388-KJ406504. 无论是卵生种或胎生种, 其子宫组织中均表达MHC I类基因. 由外显子3片段长度为207 bp (含引物), 翻译成69个氨基酸. 其中山地麻蜥(Guo2057)的一条cDNA序列*Erbrlut-3*6*发生了15 bp的缺失, 使得其长度为192 bp; 基因组DNA序列*Erbr1G-3*3*中间有提前终止密码子(Premature stop codon), 不能正常翻译成氨基酸(图1). 外显子3每个个体均获得3-9个等位基因(附录1), 表明这3种麻蜥该结构域多态性很丰富. 而外显子4片段长度为183 bp (含引物), 翻译成60个氨基酸(从所得片段的第3个碱基开始翻译). 同样, 对于外显子4, 每个个体均获得不少于2个等位基因, 说明该结构域也具有多态性, 但程度小于外显子3. 这暗示着有些序列不是来自同一个基因座位, 而是存在基因重复现象. 麻蜥属物种为二倍体^[26], 推断密点麻蜥和山地麻蜥至少有4个MHC I类基因座位, 荒漠麻蜥至少5个基因座位.

无论外显子3或外显子4, 同一种不同个体间有共享等位基因序列, 如*Ermulut-3*1*与*Ermu2ut-3*6*碱基序列相同, *Ermulut-4*4*与*Ermu2ut-4*3*碱基序列相同. 不同种之间也有共享等位基因序列, 如*Ermulut-3*2*、*Erprlut-3*8*和*Erbrlut-3*3*碱基序列相同, *Ermu2ut-4*2*、*Erprlut-4*4*和*Erbrlut-4*1*碱基序列相同(表2), 提示得到的MHC分子不具有个体特异性和物种特异性.

表3显示了3个物种的MHC I类基因平均核苷酸多样性. 总体而言, 外显子3核苷酸多样性均高于外显子4. 例如, 密点麻蜥基因组DNA外显子3核苷酸多样性0.084, 大于外显子4的0.02. 每个个体均选取DNA和cDNA各两条代表氨基酸序列, 参考其它物种的外显子3的功能位点^[9, 27-28], 检测到麻蜥属的外显子3编码的 $\alpha 2$ 结构域中的肽结合区(Peptide binding region, PBR)和 β -2微球蛋白结合位点及其它相关功能位点(图1). 在这些位点中, 有些可能在整个脊椎动物中均非常保守, 如1Q, 6C, 22Y, 24G等, 这可能与保守的理化性质和功能密切相关. 山地麻蜥得到的其中一条DNA(*Erbr1G-3*3*)包含提前终止密码子, 推测其为假基因. 外显子4多态性程度较外显子3较低. 在其编码的 $\alpha 3$ 结构域, 检测到 β -2微球蛋白结合位点和CD8分子结合位点以及一个保守的半胱氨酸位点

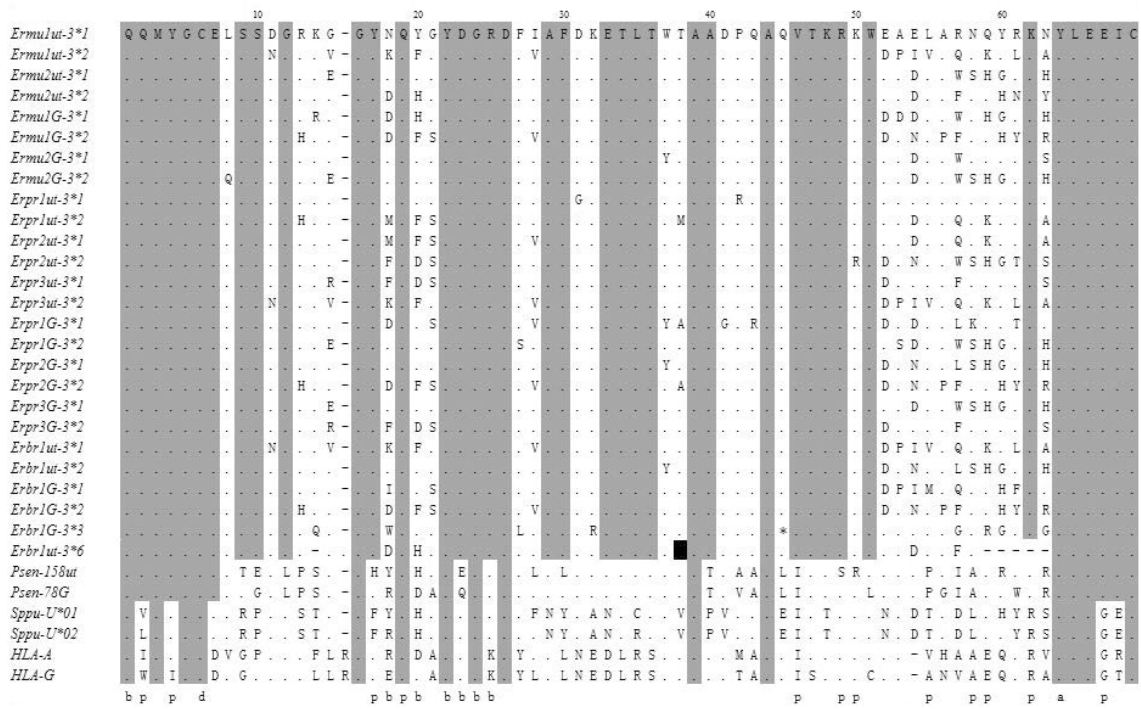


图1 3种麻蜥不同个体部分外显子3 (α2结构域) 氨基酸序列比对。Ermul: 密点麻蜥 (*Eremias multiocellata*) 第一号个体, 即Guo2046; ut: 该个体的子宫组织cDNA; G: 基因组DNA; -3: exon 3; *: 第一个等位基因。依次类推, 荒漠麻蜥和山地麻蜥也如此, 其物种和等位基因信息见表1和附表1。山地麻蜥一条基因组序列 (*Erbr1G-3*3*) 包含提前终止密码子 (第45位点*表示不能翻译成氨基酸)。Psen-158ut: 南方草石龙子 (*Pseudemoia entrecasteauxii*) 子宫组织MHC I cDNA; Psen-78G: 南方草石龙子MHC I类基因^[9]; Sppu-U*01 (GenBank登录号DQ145788) 和Sppu-U*02 (DQ145789): 喙头蜥 (*Sphenodon punctatus*) MHC I类分子; HLA-A (U07161) 和HLA-G (M32800): 人类MHC I类分子; “.”: 相同氨基酸残基; “-”: 缺失数据; “b”: β-2 微球蛋白结合位点; “p”: 多肽结合位点 (PBR); “a”: pocket A 位点; “d”: 保守的半胱氨酸结合位点。

Fig. 1 Amino acid alignment of some exon 3 fragments from three *Eremias* species in this study. Ermul: the first individual of *Eremias multiocellata* (Specimen no. Guo2046); ut: the cDNA of uterus; G: the genomic DNA; -3: exon 3; *: the first allele. *Erbr1G-3*3* contains premature stop codon, which cannot be translated as amino acid. Psen-158ut and Psen-78G: MHC I from *Pseudemoia entrecasteauxii*^[9]; Sppu-U*01 (DQ145788) and Sppu-U*02 (DQ145789): MHC I from *Sphenodon punctatus*; HLA-A (U07161) and HLA-G (m32800): MHC I from *Homo sapiens*. “.”: identical amino acid with *Ermulut-3*1*; “-”: missing data; “b”: the β2-microglobulin interaction sites; “p”: peptide binding region (PBR); “a”: the pocket A; “d”: the cysteine site.

表2 共享序列信息

Table 2 Intraspecific and interspecific shared alleles

物种内 Intraspecific		物种间 Interspecific	物种内 Intraspecific		物种间 Interspecific
外显子3 Exon 3			外显子4 Exon 4		
<i>Ermulut-3*1, Ermu2ut-3*6</i>		<i>Ermu2ut-3*5, Erpr3ut-3*6</i>	<i>Ermulut-4*4, Ermu2ut-4*3</i>		<i>Ermu2ut-4*3, Erprlut-4*3</i>
<i>Erpr1G-3*4, Erpr2G-3*3</i>		<i>Ermulut-3*2, Erprlut-3*8, Erbrlut-3*3</i>	<i>Erprlut-4*3, Erpr2ut-4*1, Erpr1G-4*2, Erpr2G-4*1</i>		<i>Ermu2G-4*4, Erpr2G-4*2, Erbrlut-4*3</i>
<i>Erpr2ut-3*7, Erpr3G-3*5</i>		<i>Ermu2ut-3*1, Erpr2ut-3*8, Erbrlut-3*4</i>	<i>Erpr1G-4*3, Erpr2G-4*2</i>		<i>Ermu2ut-4*2, Erprlut-4*4, Erbrlut-4*1</i>
<i>Erpr3ut-3*1, Erpr2G-3*7, Erpr3G-3*2</i>		<i>Ermu2ut-3*4, Erpr2G-3*1, Erbrlut-3*2</i>	<i>Erprlut-4*1, Erbr1G-4*2</i>		
<i>Erprlut-3*8, Erpr2ut-3*9, Erpr3ut-3*2</i>		<i>Ermu2G-3*6, Erpr1G-3*3, Erbr1G-3*4</i>			

表3 密点麻蜥、荒漠麻蜥和山地麻蜥MHC I类基因序列多样性

Table 3 Allelic diversity of MHC class I for *E. multiocellata*, *E. przewalskii*, and *E. brenchleyi*

物种 Species	N	基因组DNA Genomic DNA				子宫cDNA Ut cDNA			
		外显子3 Exon 3		外显子4 Exon 4		外显子3 Exon 3		外显子4 Exon 4	
		Nm	π	Nm	π	Nm	π	Nm	π
<i>E. multiocellata</i>	2	10	0.084	9	0.020	12	0.088	7	0.014
<i>E. przewalskii</i>	3	14	0.086	5	0.026	21	0.095	9	0.020
<i>E. brenchleyi</i>	1	8	0.092	4	0.028	6	0.091	3	0.025

N: 物种样本量; Nm: 物种所有个体的不同等位基因数目; π: 核苷酸多样性。N: number of samples; Nm: number of distinct alleles; π: nucleotide diversity.

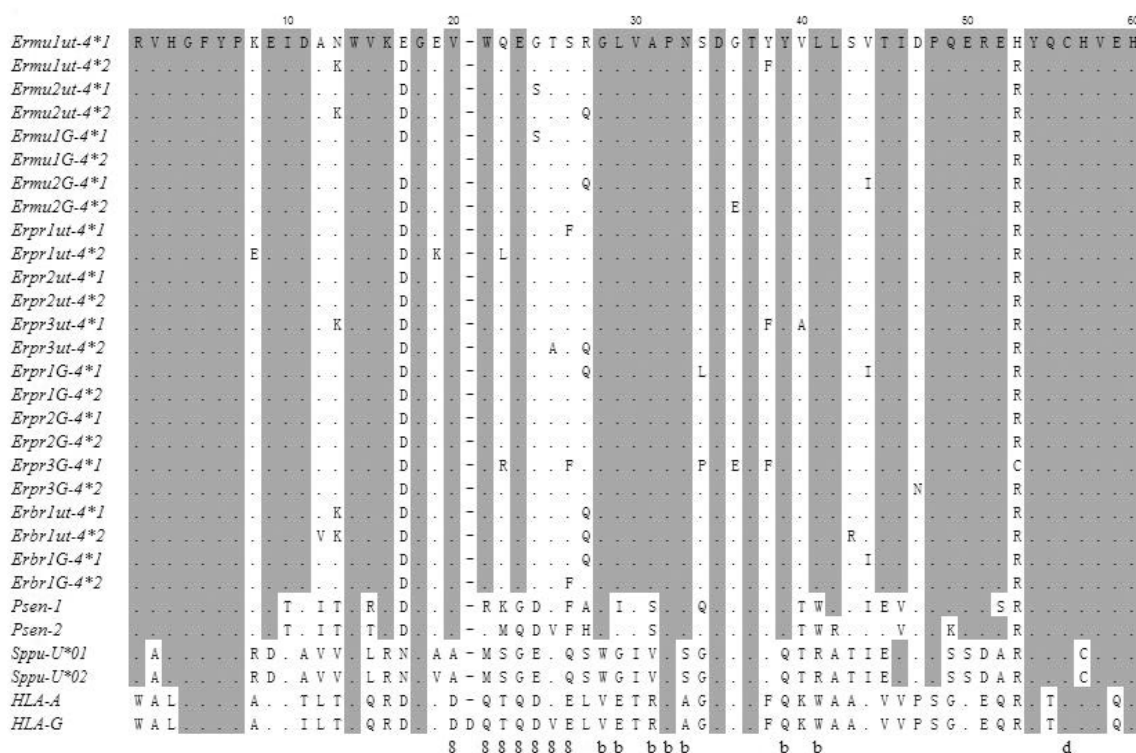


图2 3种麻蜥不同个体部分外显子4 ($\alpha 3$ 结构域) 氨基酸序列比对。Ermul: 密点麻蜥 (*Eremias multiocellata*) 第一号个体, 即Guo2046; ut: 该个体的子宫组织cDNA; G: 基因组DNA; -: exon 4; *: 第一个等位基因。依次类推, 荒漠麻蜥和山地麻蜥也如此, 其物种和等位基因信息见表1和附表1。Psen-1和Psen-2: 南方草石龙子 (*Pseudemoia entrecasteauxii*) MHC I类基因^[9]; Sppu-U*01 (GenBank登录号DQ145788)和Sppu-U*02 (DQ145789): 喙头蜥 (*Sphenodon punctatus*) MHC I类基因; HLA-A (U07161)和HLA-G (M32800): 人类MHC I类分子; “.”: 相同氨基酸残基; “-”: 碱基缺失; “b”: β -2 微球蛋白结合位点; “8”: CD8分子结合位点; “d”: 保守的半胱氨酸结合位点。

Fig. 2 Amino acid alignment of some exon 4 fragments from three *Eremias* species in this study. Ermul: the first individual of *Eremias multiocellata* (Specimen no. Guo2046); ut: the cDNA of uterus; G: the genomic DNA; -: exon 4; *: the first allele. Psen-1 and Psen-2: MHC I from *Pseudemoia entrecasteauxii*^[9]; Sppu-U*01 and Sppu-U*02: MHC I from *Sphenodon punctatus*; HLA-A and HLA-G: MHC I from *Homo sapiens*. “.”: identical amino acid with *Ermulut-4*1*; “-”: missing data; “b”: the β -2-microglobulin interaction sites; “8”: the CD8 molecule interaction sites; “d”: the cysteine residue.

(图2). 3种麻蜥的该结构域功能位点, 同外显子3一样, 有些在整个脊椎动物非常保守, 如32P; 也有少数氨基酸在有鳞目中相对保守, 如25T; 而较多氨基酸仅在本研究3种麻蜥中保守, 如20V, 21W和23E等。除假基因外, 外显子3和4均能正常翻译成氨基酸, 且其变异氨基酸残基也均能在其它相关物种中发现相同或功能相近的氨基酸, 提示得到的序列均为功能性MHC I类基因。

2.2 子宫组织外显子3 cDNA与基因组DNA比较

卵生种山地麻蜥外显子3氨基酸序列构建的NJ树见图3。所有山地麻蜥的序列聚为一支, 尽管自展支持率较低 (BP = 50%)。推测除假基因 (*Erbr1G-3*3*) 外, 获得的山地麻蜥外显子3序列和子宫cDNA均为经典的MHC I类基因 (MHC Ia)。Erbr1ut-3*1和Erbr1ut-3*3聚在一起, 自展支持率为100%, 推测二者来自同一个基因座位。同样, Erbr1ut-3*2和Erbr1ut-3*4聚在一起, 自展支持率为100%, 推测来自同一个座位。但由于多数节点的自展支持率低于50%, 这些等位基因序列的相互关系并不清楚, 不能确定基因座位。对于胎生种密点麻蜥, 其

所有序列聚在一起 (图4), 尽管自展支持率BP < 50%。未发现和Ermu2G-3*2与Ermu2G-3*5相对应的子宫cDNA序列, 推测此座位在密点麻蜥子宫中未表达。从图4可知, 多数节点的自展支持率低于50%, 不能解决序列间的相互关系, 因此不能确定基因座位。

2.3 外显子3系统发育关系

按BIC标准, jModelTest选取的核苷酸最适进化模型为K80 + G。贝叶斯系统发育树如图5所示, 3种麻蜥的MHC I类基因外显子3序列聚在一起, 形成单系 (PP = 0.98)。然而, 3种麻蜥的外显子3序列均没有按物种形成各自的遗传谱系, 表现出没有物种特异性的进化格局。尽管内部有一些亚分支结构, 但也没有表现出明显的按基因位点的进化格局。

3 讨论

通过对麻蜥属*Pareremias*亚属卵生种山地麻蜥及胎生种密点麻蜥和荒漠麻蜥妊娠中期子宫组织cDNA和基因组DNA

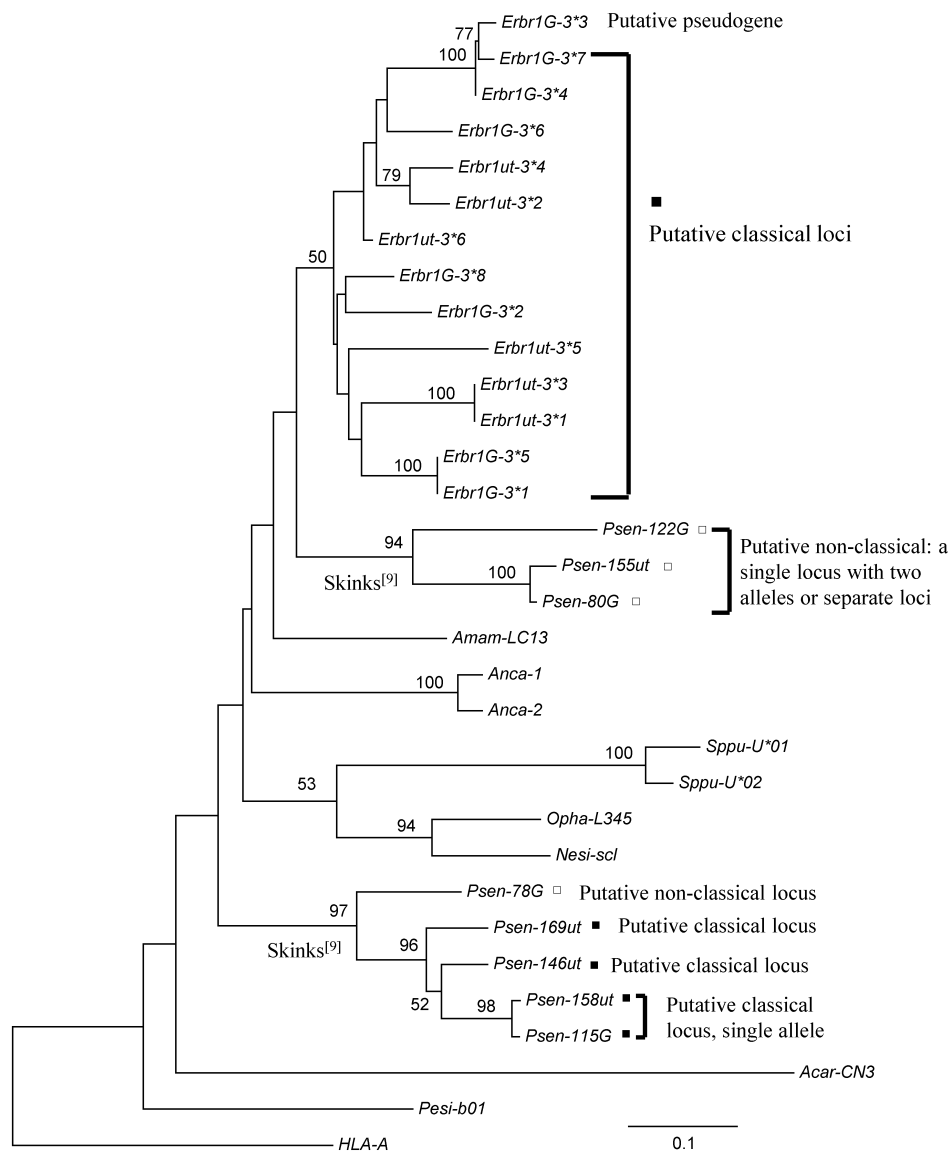


图3 基于妊娠中期山地麻蜥MHC I DNA和子宫cDNA exon 3 氨基酸序列构建的NJ树. 自展支持率小于50%的未标示. ■: 经典的MHC I类分子 (MHC Ia); □: 非经典的MHC I类分子 (MHC Ib).

Fig. 3 Neighbour-joining analysis of amino acid sequences from exon 3 of MHC I amplified from genomic DNA and uterine cDNA from a pregnant individual of *Eremias brechleyi*. Bootstrap values below 50% based on 1 000 replicates are not shown. ■: putative classical class I sequences (MHC Ia); □: putative non-classical class I sequences (MHC Ib).

MHC I类基因的克隆, 每个个体均得到多个等位基因序列, 我们推测这3种麻蜥均有多个MHC I类基因座位. 这和其它相关研究一致, 如喙头蜥 (*Sphenodon punctatus*) 有3-4个基因座位^[29-30], 南方草石龙子 (*Pseudemoia entrecasteauxii*) 9个基因座位 (其中至少6个表达)^[9], 绿丛林蜥 (*Ameiva ameiva*) 也至少4个座位表达^[11]. 除了*Erbr1G-3*3*之外, 获得的其他外显子3和外显子4片段均没有移码突变或提前终止密码子, 推测其均为功能性MHC I类基因.

通过构建氨基酸NJ树, 推测在这3种麻蜥有一些座位在子宫中并没有表达, 如*Erbr1G-3*8*和*Ermu2G-3*5*. 但这可能

是由于实验本身的局限引起的假阴性结果, 即挑选的阳性克隆太少, 引起结果有偏倚. 通常认为, 经典的MHC I类基因和非经典的MHC I类基因进化方式不同^[31], 在构建系统发育树时, 应处于不同的分支, 比如石龙子的MHC Ia和MHC Ib聚为两个不同的分支 (图3和图4). 另一方面, 非经典的MHC I类基因由于在呈递抗原时和经典的MHC I类基因承受不同的选择压力, 其PBR一般变异较大. 本研究获得的山地麻蜥和密点麻蜥的MHC I类序列中能检测到保守的功能位点 (包括PBR), 系统发育重建也分别单独聚为一支. 因此, 认为获得的除假基因外, 其它序列均为经典的MHC I类基因 (MHC

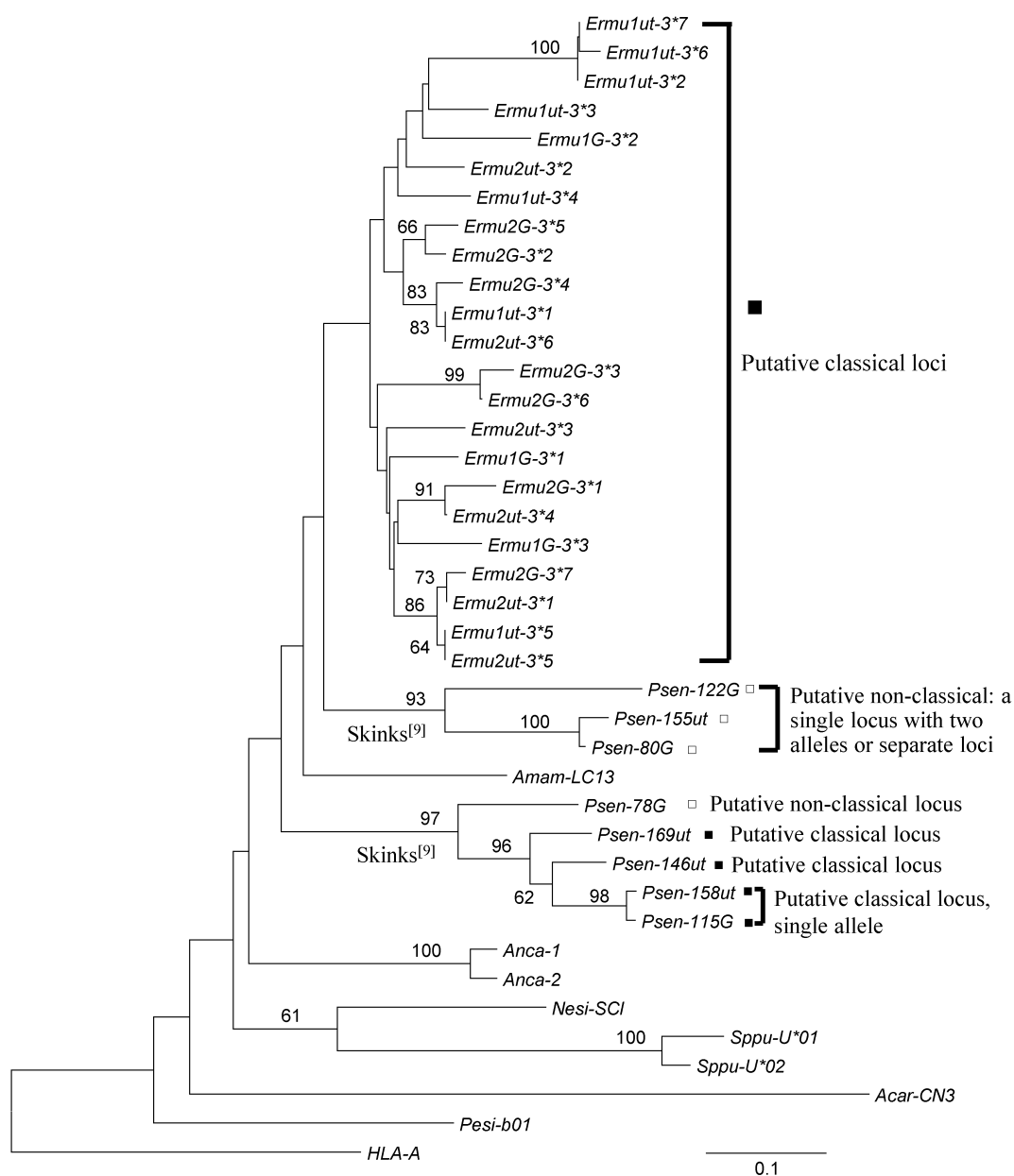


图4 基于妊娠中期密点麻蜥MHC I DNA和子宫cDNA exon 3氨基酸序列构建的NJ树. 自展支持率小于50%的未标示. ■: 经典的MHC I类分子 (MHC Ia); □: 非经典的MHC I类分子 (MHC Ib).

Fig. 4 Neighbour-joining analysis of amino acid sequences from exon 3 of MHC I amplified from genomic DNA and uterine cDNA from pregnant individuals of *Eremias multiocellata*. Bootstrap values below 50% based on 1 000 replicates are not shown. ■: putative classical class I sequences (MHC Ia); □: putative non-classical class I sequences (MHC Ib).

Ia).

本研究胎生种密点麻蜥和荒漠麻蜥均未获得非经典的MHC I类基因 (MHC Ib), 这与已报道的部分物种不一致. 妊娠中期, 南方草石龙子的子宫组织有非经典的MHC I类基因的表达^[9]; 加拉帕戈斯海鬣蜥 (*Amblyrhynchus cristatus*) 的非经典的MHC I类基因序列被成功扩增^[14]. 一种可能是本实验的局限, 每个个体仅挑取了10个克隆测序, 没有全部涵盖MHC I类基因的所有座位的该片段, 尚未获得非经典的MHC

I类基因. 另一种可能为, 南方草石龙子具有更复杂的胎盘^[9], 母体和胚胎的免疫相互作用更强; 而麻蜥属的胎生种胎盘类型可能较为简单, 母体和胎儿的免疫相互作用较弱, 子宫不涉及非经典MHC I类基因的表达. 后一种假设也有待进一步的解剖学研究来验证, 目前尚未有麻蜥属胎盘类型的研究报导. 本研究虽然没有获得非经典的MHC I类基因, 但发现经典的MHC I类基因在子宫的表达情况, 这为进一步研究胎生繁殖方式与母体免疫系统的协同进化积累了基础资料.

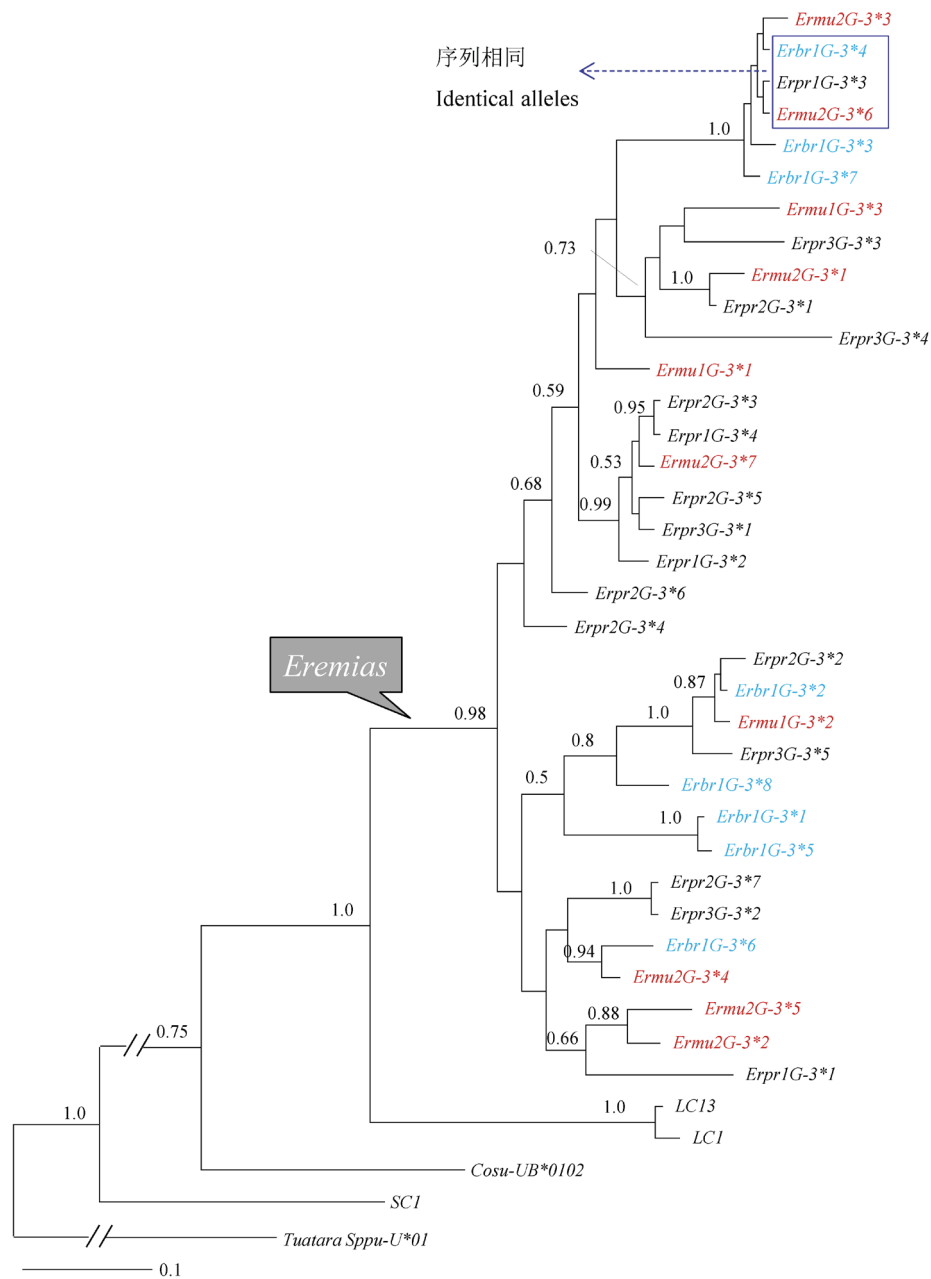


图5 3种麻蜥MHC I类基因exon 3序列的贝叶斯系统发育树。节点处数值贝叶斯后验概率, 仅显示 ≥ 0.5 。3种麻蜥共享的相同序列用方框标示。

Fig. 5 Bayesian phylogenetic reconstruction using exon 3 sequence data from three *Eremias* species. The number at each node is the Bayesian posterior probability (PP) supporting the phylogram displayed, shown with $PP \geq 0.5$. Identical alleles among the three racerunners are marked with frame.

外显子3的贝叶斯系统发育分析表明, 3种麻蜥MHC等位基因谱系之间有跨种多态性 (Trans-species polymorphism). 基于外显子4的系统发育重建结果相似 (未显示). MHC一种非常重要的多态性现象就是跨种多态性, 主要表现为近缘物种之间共享相同或相似的等位基因谱系^[32]. 通常可以通过构建近缘种MHC等位基因的系统发育关系来检测跨种多态性, 可发现等位基因的谱系不按物种关系来聚类, 即不同物种的等位基因混杂聚在一起^[15, 33]. MHC位点等位基因谱系的跨种多态性现象已经在较多脊椎动物中有报道^[34-35]. 密点麻蜥和荒

漠麻蜥的分布区有重叠, 二者可能有杂交渐渗^[18], 其MHC I类基因表现出的进化关系可能是杂交的结果. 而卵生种山地麻蜥和两种胎生麻蜥有明显的生殖隔离^[36], 其MHC I类基因序列也与二者呈网状进化格局, 不能按物种区分. 此外, 外显子3在物种间有共享的序列, 比如*Ermu2G-3*6*、*Erpr1G-3*3*和*Erb1G-3*4*完全相同 (表2). 而外显子4的物种间有共享的序列, 比如*Ermu2ut-4*2*、*Erprlut-4*4*和*Erb1lut-4*1*完全相同 (表2). 因此, 推测这3种麻蜥MHC I类基因之间有跨种多态性. 跨种多态性产生的原因是等位基因谱系在物种形成之前

就已经出现,而成种之后仍被保留下来^[32]。麻蜥属*Pareremias*亚属物种形成时间约为6.3百万年前(95%可信区间,5.3-8.5百万年)^[18],据此推测*Pareremias*亚属MHC I类等位基因谱系形成时间至少在6百万年前。

致谢 蔡波、周天和、李大江等在采样过程中提供了帮助,谨致谢意!

参考文献 [References]

- Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis [J]. *Nature*, 1974, **251** (5475): 547-548
- Klein J. The natural history of the major histocompatibility complex [M]. New York: John Wiley and Sons, 1986
- Geraghty DE. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes [J]. *Curr Opin Immunol*, 1993, **5** (1): 3-7
- Stroynowski I, Lindahl KF. Antigen presentation by non-classical class I molecules [J]. *Curr Opin Immunol*, 1994, **6** (1): 38-44
- Gouin N, Wright AM, Miska KB, Parra ZE, Samollow PB, Baker ML, Miller RD. Mdo-UG, a marsupial non-classical MHC class I locus [J]. *Immunogenetics*, 2006, **58** (5-6): 396-406
- Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6** (8): 584-594
- Blackburn DG. Chorionallantoic placentation in squamate reptiles: Structure, function, development and evolution [J]. *J Exp Zool*, 1993, **266** (5): 414-430
- Blackburn DG. Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity [J]. *Herpetolog Mono*, 2006, **20** (1): 131-146
- Murphy BF, Thompson MB, Belov K. Evolution of viviparity and the maternal immune system: major histocompatibility complex (MHC) class I genes in skinks [J]. *Orbit*, 2009, **1** (1): 1-17
- Brandley MC, Young RL, Warren DL, Thompson MB, Wagner GP. Uterine gene expression in the live-bearing lizard, *Chalcides ocellatus*, reveals convergence of squamate reptile and mammalian pregnancy mechanisms [J]. *Genome Biol Evol*, 2012, **4** (3): 394-411
- Grossberger D, Parham P. Reptilian class I major histocompatibility complex genes reveal conserved elements in class I structure. *Immunogenetics*, 1992, **36** (3): 166-174
- Radtkey RR, Becker B, Miller RD, Riblet R, Case TJ. Variation and evolution of class I MHC in sexual and parthenogenetic geckos. *Proc Biol Sci*, 1996, **263** (1373): 1023-1032
- Glaberman S, Caccone A. Species-specific evolution of class I MHC genes in iguanas (Order: Squamata; Subfamily: Iguaninae). *Immunogenetics*, 2008, **60** (7): 371-382
- Glaberman S, Pasquier LD, Caccone A. Characterization of a nonclassical class I MHC gene in a reptile, the Galápagos marine iguana (*Amblyrhynchus cristatus*) [J]. *PLoS ONE*, 2008, **3** (8): e2859
- Babik W. Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates [J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, **10** (2): 237-251
- Szczerbak NN. Yashchurki Palearktiki (*Eremias* lizards of the Palearctic) [M]. Kiev: Akademiya Nauk Ukrainkoi SSR. Institut Zoologii. Naukova Dumka (In Russian), 1974
- 郭宪光, 陈达丽, 万宏富, 王跃招. 麻蜥属*Eremias*的系统学研究进展[J]. 四川动物, 2010, **29** (4): 665-672 [Guo X, Chen D, Wan H, Wang Y. Review of systematics on the racerunner lizard (Lacertidae: *Eremias*). *Sichuan J Zool*, 2010, **29** (4): 665-672]
- Guo X, Dai X, Chen D, Papenfuss TJ, Ananjeva NB, Melnikov DA, Wang Y. Phylogeny and divergence times of some racerunner lizards (Lacertidae: *Eremias*) inferred from mitochondrial 16S rRNA gene segments [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2011, **61** (2): 400-412
- Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edn [M]. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, **23** (21): 2947-2948
- Xia X. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, **30** (7): 1720-1728
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28** (10): 2731-2739
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing [J]. *Nat Methods*, 2012, **9** (8): 772-784
- Schwarz GE. Estimating the dimension of a model [J]. *Ann Stat*, 1978, **6** (2): 461-464
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space [J]. *Syst Biol*, 2012, **61** (3): 539-542
- 戴鑫, 曾晓茂, 陈彬, 王跃招. 六种麻蜥核型研究[J]. 遗传, 2004, **26** (5): 669-675 [Dai X, Zeng XM, Chen B, Wang YZ. The research on the karyotypes of six species in the genus *Eremias* from China [J]. *Hereditas*, 2004, **26** (5): 669-675]
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2 [J]. *Nature*, 1987, **329** (6139): 506-512
- Siddle HV, Deakin JE, Baker ML, Miller RD, Belov K. Isolation of major histocompatibility complex Class I genes from the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) [J]. *Immunogenetics*, 2006, **58** (5-6): 487-493
- Miller HC, Belov K, Daugherty CH. MHC Class I genes in the tuatara (*Sphenodon* spp.): evolution of the MHC in an ancient reptilian order [J].

- Mol Biol Evol*, 2005, **23** (5): 949-956
- 30 Miller HC, Andrews-Cookson M, Daugherty CH. Two patterns of variation among MHC class I loci in tuatara (*Sphenodon punctatus*) [J]. *J Hered*, 2007, **98** (7): 666-677
- 31 Hughes AL, Nei M. Evolution of the major histocompatibility complex: independent origin of non-classical genes in different groups of mammals [J]. *Mol Biol Evol*, 1989, **6** (6): 559-579
- 32 Klein J, Sato a, Nagl S, O'hUigin C. Molecular trans-species polymorphism [J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 1998, **29**: 1-21
- 33 Klein J, Sato A, O'hUigin C. Evolution by gene duplication in the major histocompatibility complex [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, **80** (1-4): 123-127
- 34 Ottova E, Simkova A, Martin JF, de Bellocq JG, Gelnar M, Allienne JF, Morand S. Evolution and trans-species polymorphism of MHC class II β genes in cyprinid fish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, **18** (3): 199-222
- 35 Bos DH, Waldman B. Evolution by recombination and transspecies polymorphism in the MHC class I gene of *Xenopus laevis* [J]. *Mol Biol Evol*, 2006, **23** (1): 137-143
- 36 赵尔宓, 赵肯堂, 周开亚. 中国动物志(爬行纲, 第2卷, 有鳞目, 蜥蜴亚目) [M]. 北京: 科学出版社, 1999 [Zhao EM, Zhao KT, Zhou KY. Fauna Sinica (Reptilia, Vol. 2, Squamata, Lacertidae) [M]. Beijing: Science Press, 1999

附表1 个体等位基因信息及序列编号

Appendix 1 Distinct alleles and their number of different individuals

物种 Species	标本号 Specimen no.	个体等位基因 Individual distinct alleles			
		基因组DNA Genomic DNA		子宫组织MHC I类基因 ut cDNA	
		外显子3 Exon 3	外显子4 Exon 4	外显子3 Exon 3	外显子4 Exon 4
<i>E. multiocellata</i>	Guo2046	3 (<i>Ermu1G-3*1~Ermu1G-3*3</i>)	5 (<i>Ermu1G-4*1~Ermu1G-4*5</i>)	7 (<i>Ermulut-3*1~Ermulut-3*7</i>)	4 (<i>Ermulut-4*1~Ermulut-4*4</i>)
	Guo2048	7 (<i>Ermu2G-3*1~Ermu2G-3*7</i>)	4 (<i>Ermu2G-4*1~Ermu2G-4*4</i>)	6 (<i>Ermu2ut-3*1~Ermu2ut-3*6</i>)	4 (<i>Ermu2ut-4*1~Ermu2ut-4*4</i>)
<i>E. przewalskii</i>	Guo2054	4 (<i>Erpr1G-3*1~Erpr1G-3*4</i>)	3 (<i>Erpr1G-4*1~Erpr1G-4*3</i>)	8 (<i>Erprlut-3*1~Erprlut-3*8</i>)	4 (<i>Erprlut-4*1~Erprlut-4*4</i>)
	Guo2055	7 (<i>Erpr2G-3*1~Erpr2G-3*7</i>)	2 (<i>Erpr2G-4*1~Erpr2G-4*2</i>)	9 (<i>Erpr2ut-3*1~Erpr2ut-3*9</i>)	2 (<i>Erpr2ut-4*1~Erpr2ut-4*2</i>)
	Guo2056	5 (<i>Erpr3G-3*1~Erpr3G-3*5</i>)	2 (<i>Erpr3G-4*1~Erpr3G-4*2</i>)	6 (<i>Erpr3ut-3*1~Erpr3ut-3*6</i>)	4 (<i>Erpr3ut-4*1~Erpr3ut-4*4</i>)
<i>E. brenchleyi</i>	Guo2057	8 (<i>Erbr1G-3*1~Erbr1G-3*8</i>)	4 (<i>Erbr1G-4*1~Erbr1G-4*4</i>)	6 (<i>Erbrlut-3*1~Erbrlut-3*6</i>)	3 (<i>Erbrlut-4*1~Erbrlut-4*3</i>)

*Erbr1G-3*3*序列中有提前终止密码子, 提示为假基因.

*Erbr1G-3*3* contains premature stop codon, representing a putative pseudogene.