

爬行动物 MHC 基因研究进展

原秀云^{①②} 刘金龙^{①②} 李大江^{①②} 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(MHC)是有颌脊椎动物中发现的编码免疫球蛋白受体的高度多态的基因群, 因其在免疫系统中的重要作用而备受关注。脊椎动物不同支系间 MHC 的结构和演化差异较大。尽管 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, 但对爬行动物 MHC 的了解仍较少。鉴于爬行动物对于理解 MHC 基因的演化占据很重要的系统发育位置, 研究其 MHC 具有重要意义。本文就近年来爬行动物 MHC 的分子结构、多态性维持机制、功能和主要应用的研究现状进行了系统地回顾和总结, 并展望了其研究前景。

关键词: 主要组织相容性复合体(MHC); 基因; 爬行类

中图分类号: Q495 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2014)03-452-11

Major Histocompatibility Complex in Reptiles

YUAN Xiu-Yun^{①②} LIU Jin-Long^{①②} LI Da-Jiang^{①②} GUO Xian-Guang^{①*}

① *Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041;*

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

Abstract: The major histocompatibility complex (MHC) is coded by a gene-dense genomic region containing the most polymorphic genes in all jawed vertebrate genomes. They play key roles in immune function via immune-recognition and -surveillance and host-parasite interaction. MHC genes are increasingly common for studies of immunology, genetics, and evolution as well as conservation biology. The organization and evolution of MHC genes vary considerably among vertebrate lineages. 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 vertebrate MHC genes. Here, we review the molecular structure, the maintaining mechanisms of MHC polymorphism and MHC gene function in reptiles. We also review the successful applications of MHC-typing for population genetic studies and conservation management in reptiles. We conclude this review by proposing several directions where future research is needed.

Key words: Major histocompatibility complex (MHC); Gene; Reptiles

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 是有颌脊椎动物染色体特定区域的一组紧密连锁的基因家族, 其编码的产物主要组织相容性抗原在免疫系统中起着抗原呈递和调节机体免疫应答反应的作用 (Klein et al. 1997)。尽管在一些植物和无脊椎动物的体内, 也发现有 MHC 的直系

同源基因 (Castro et al. 2004), 但是无颌脊椎

基金项目 中国科学院生命科学与生物技术局青年科技专项 (No. KSCX2-EW-Q-6), 国家自然科学基金项目 (No. 31272281);

* 通讯作者, E-mail: guoxg@cib.ac.cn;

第一作者介绍 原秀云, 女, 硕士研究生; 研究方向: 分子进化与系统发育; E-mail: shui.si@163.com。

收稿日期: 2013-09-27, 修回日期: 2014-01-28

动物和无脊椎动物中均未发现 MHC 基因座 (Kulski et al. 2002), 而有颌脊椎动物均有 MHC 基因座。因此, 通常认为 MHC 基因是伴随着有颌类的物种分化及适应性免疫系统的出现而产生的 (Laird et al. 2000, Danchin et al. 2004)。

MHC 是基因组上一个非常动态的区域, 其特征是多态性高, 发生频繁的基因重复和重排。这导致了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*), 以及鸟类、两栖类和鱼类中已被较好地描述, 但在爬行动物中其结构特征知之甚少。鉴于爬行动物对于理解哺乳类和鸟类 MHC 基因的演化占据很重要的系统发育位置, 研究其 MHC 具有很重要的意义。Farg 等 (1990) 发现, 与其他脊椎动物一样, 爬行动物组织排异也依赖于 MHC。爬行动物 MHC 研究起步较晚, 直到 1992 年, Grossberger 等通过设计简并引物, PCR 扩增获得了 2 种爬行动物的 MHC I 类基因, 才首次报道了有关爬行动物 MHC 的基因结构, 这一成果也揭开了爬行动物 MHC 基因后续研究的序幕。

近年来, 已有较多关于脊椎动物 MHC 结构、功能、演化及其在保护生物学中应用等评述 (如 Apanius et al. 1997, Bernatchez et al. 2003, Garrigan et al. 2003, Sommer 2005, Piertney et al. 2006, Újvári et al. 2011)。国内也有按类群介绍 MHC 基因的研究进展, 如鱼类 (杜佳莹等 2006, 李春梅等 2009)、两栖类 (于晓云等 2011)。但涉及爬行动物 MHC 的报道零星、分散, 本文对爬行动物 MHC 基因结构特征、功能及其应用等进行系统且全面的回顾, 并对其研究趋势进行展望。

1 爬行动物 MHC 基因的特点

爬行动物 MHC 分子与大多数脊椎动物的类似, 主要也包括 I 类分子和 II 类分子。其中, MHC I 类分子不具有特异性, 分布于几乎所有有核细胞表面, 但不同组织细胞的表达水

平可能存在差异; 而 MHC II 类分子分布比较局限, 主要表达于一些抗原递呈细胞上; III 类分子鲜有研究。不同种属的动物其 MHC 有不同的命名, 如小鼠的 MHC 称 H-2 复合体 (Gorer et al. 1948), 绵羊 (*Ovis aries*) 的 MHC 称 OLA 复合体 (Ballingall et al. 2010), 人的 MHC 称 HLA 复合体, 两栖类 MHC 基因座位为 XLA (于晓云等 2011), 但爬行动物 MHC 到目前为止, 还没有一个确定的名字。

1.1 MHC I 类分子 爬行动物的 MHC I 类分子是由 α 链和 β 微球蛋白非共价连接形成的异二聚体, 分为经典的 MHC I (MHC I a) 和非经典的 MHC I (MHC I b) 二类。MHC I a 由导肽、胞外结构域 ($\alpha 1 \sim \alpha 3$)、跨膜区和胞质区组成。 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 结构域中有保守的多肽结合区、 $\beta 2$ 微球蛋白结合位点和 CD8 作用位点等, 这类分子在爬行类的各个组织都有表达, 表现出高度多态性。

Grossberger 等 (1992) 首次报道爬行动物 MHC I 类基因特征。他们以 PCR 方法得到北水蛇 (*Nerodia sipedon*) 和绿丛林蜥 (*Ameiva ameiva*) MHC I 类基因 cDNA。通过与其他脊椎动物比较, 解析了 MHC I 类基因编码的导肽区 (leader peptide)、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 和跨膜区结构域 (transmembrane domain) 以及胞质区结构域 (cytoplasmic domain), 并揭示出爬行动物 MHC I 类序列有少数氨基酸残基在整个脊椎动物中均很保守。这些保守残基却不位于肽抗原结合区 (peptide binding region, PBR)、T 细胞受体作用区或 CD8 结合位点。Radtkey 等 (1996) 首次报道了壁虎类的 MHC I 类基因序列特征。Witzell 等 (1999) 通过 RFLP 分析发现水蟒 (*Liasis fuscus*) 中有 14 ~ 17 个 MHC I 类基因位点, 比雉鸡 (*Phasianus colchicus*) 和家鸡 (*Gallus gallus*) 中要多。Madsen 等 (2000) 研究了捷蜥蜴 (*Lacerta agilis*) 6 个种群和极北蝮 (*Vipera berus*) 5 个种群的 MHC I 类基因, 发现 MHC I 类基因在这两个物种中均具有丰富的多态性。Murphy 等 (2009) 首次报道了石龙子 (*Pseudemia* spp.) MHC I 类基因, 发现 MHC

在非繁殖期、孕期和妊娠后期的卵生种和胎生子子宫均表达。并发现 4 种 I a 类基因和至少 2 种 I b 类基因在南方草石龙子 (*Pseudemia entrecasteauxii*) 子宫里表达, 还发现石龙子中有 MHC 假基因。夏春 (1999) 对中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 的 MHC I 类分子 $\alpha 2$ 链基因进行了克隆和序列分析, 识别了 Pesi-BX1 的抗原多肽结合位点 (T-143、K-146、W-147、Y-159) 以及 β -2 微球蛋白结合位点 (Q-115, A-117, D-119, G-120, D-122)。刘至治等 (2006) 同样以中华鳖作为对象, 对不同地域的 5 个群体 MHC I 类基因外显子 3 进行研究, 分离得到 250 bp 片段, 其中 174 个为变异位点, 多态位点百分率达 69.6%, 指出该外显子多态性很丰富。

美洲鬣蜥亚科 (Iguaninae) 作为爬行动物的重要组成部分, 近年来也备受关注。Glaberman 等 (2008a) 通过研究该亚科 3 个不同物种, 即加拉帕戈斯海鬣蜥 (*Amblyrhynchus cristatus*)、加拉帕戈斯地鬣蜥 (*Conolophus suberistatus*) 和绿鬣蜥 (*Iguana iguana*) 的 MHC I 类基因的 cDNA 序列, 发现每个物种中均有多个 MHC I 类基因座位, 保守的 $\alpha 3$ 结构域的演化具有物种特异性。相反, $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域在物种间有共享多态性, 表明这两个结构域与 $\alpha 3$ 具有不同的演化历史。他们认为这些数据和 Nei 等 (1997) 提出的“生-灭进化模式” (birth and death model of evolution) 相兼容。同年, Glaberman 等 (2008b) 又通过 RACE 技术获得了加拉帕戈斯海鬣蜥 MHC I 类基因的 *Amcr-UA* 序列的全长, 这是迄今报道的有鳞目 MHC I 类基因第一条全序列。他们发现 *Amcr-UA* 的主要特点是其缺少跨膜区和胞质区域, 而这二个结构域对于将 I 类受体分子锚定到细胞膜必不可少, 这表明 *Amcr-UA* 基因的表达产物不参与经典 I 类基因的抗原递呈功能。基于 *Amcr-UA* 的这种截短和保守特征, 将其鉴定为非经典 MHC I 类基因。通过系统发育分析发现 *Amcr-UA* 相对于其他已发表的 MHC I 类基因, 处于基部的位点, 表明该基因在有鳞目

(Squamata) 动物分化的早期就开始发生了分歧。

爬行动物中, MHC 结构特征研究得较深入的还有喙头蜥 (*Sphenodon punctatus*)。Miller 等 (2006) 分离出了喙头蜥两种不同的 I 类 cDNA 序列, 二者有 93% 的序列相似性, 但与其他脊椎动物 MHC 基因分歧很大。Southern 印迹杂交及 PCR 扩增了 7 只喙头蜥的 MHC I 类基因表明, 这些序列代表至少有 2~3 个位点。这些基因座具有高度多态性, 通过最大似然法分析, 发现爬行类目级分类阶元内发生了基因重复。然而, 爬行动物不同目之间的进化关系尚未得到解决, 反映了爬行动物主要支系的分化之古老。Miller 等 (2007) 鉴别出喙头蜥 MHC I 类基因至少 2 个多态性高的位点 (*UA* 类型) 和一个多态性低的位点 (*UZ* 类型)。UZ 位点具有核苷酸多样性低和弱的平衡选择特征, 推测是非经典的 I 类基因或假基因; 相反, *UA* 位点具有核苷酸多样性高, 且 PBR 受到平衡选择。26 只喙头蜥个体中识别出 21 个不同的 *UA* 类型基因型, 表明新西兰斯蒂芬斯岛种群 MHC I 类基因变异水平较高。*UA* 类型的等位基因多样性是由点突变和基因转换 (gene conversion) 引起。他们的研究表明, 在非哺乳动物中, MHC 演化的分子机制决定了在一些物种中要扩增位点特异的 MHC 基因片段不大可能。

Jaratlerdsiri 等 (2012) 也研究了澳大利亚北部九大水系的 42 只盐水鳄 (*Crocodylus porosus*) 的 MHC I 类基因第三外显子, 获得了 43 种 MHC 基因型, 并分析指出该物种中至少有 4 个 MHC I 类基因位点。最近, Stiebens 等 (2013) 获得角群岛的濒危鬣龟 (*Caretta caretta*) 种群的 MHC I 类基因的变异特征, 发现带有中等 MHC I 类等位基因数的个体比带有高或低等位基因数的个体要多。这些都表明爬行动物 MHC I 类基因的高度多态性。

1.2 MHC II 类分子 MHC II 类分子主要参与外源途径, 它将外源多肽结合、传递给辅助性 T 细胞 (CD4+), 并将其激活, 然后通过细胞

的内吞作用将结合在抗原结合槽中的外源多肽降解。此外,它还有促进 B 细胞增殖分化以及细胞因子分泌的作用。MHC II 类分子在爬行动物中研究相对较少,Edwards 等(1995)首次获得了密西西比鳄(*Alligator mississippiensis*) MHC II 类基因序列,与哺乳类 MHC 基因类似,爬行类也易受到相似的选择压力。Miller 等(2005)以喙头蜥为对象,描述了爬行动物的第一条 MHC II B cDNA 序列。通过反转录 PCR (RT-PCR)反应,从喙头蜥 cDNA 文库中分离出 3 条 II B 序列和 4 条相关的序列片段。推测其中 6 条序列可能属于同一基因家族,他们命名为 *SppuDAB*,余下的那条序列命名为 *SppuDBB*,与 *SppuDAB* 仅有 43.9% 氨基酸相似性,推测 *SppuDBB* 可能属于非经典位点。随后,Glberman 等(2009)从加拉帕戈斯海鬣蜥中分离出 8 条 MHC II B cDNA 序列,并将其分为 5 个位点,即 *Amcr-DAB1* ~ *Amcr-DAB5*。系统发育分析指出所有海鬣蜥序列与其他脊椎动物的 II 类基因聚在一起,形成单系群,表明它们起源于有鳞目与其他爬行动物分离后所形成的一个共同祖先座位。Marosi 等(2011)报道了从棋斑水游蛇(*Natrix tessellata*)和草蛇(*Natrix natrix*)分离的 MHC II B 基因外显子 2 片段。由于片段太短(仅 113 bp)不能用于种群结构和亲缘地理分析,但它们可以用于设计特异性引物,作为识别这些蛇种的整个 MHC II 类基因的基石。

国内关于爬行动物 MHC II 类分子研究较晚,且研究主要集中于 *B*、*DQ*、*QR* 和 *QP* 基因的第二外显子。通过对扬子鳄(*Alligator sinensis*) (史燕等 2004)和乌龟(*Mauremys reeves*)、中国石龙子(*Plestiodon chinensis*) MHC II B 基因第二外显子进行克隆及序列分析(李恩等 2005, 2006),均发现 MHC II 类序列的多态性较高。此外,也有学者对扬子鳄不同种群的 MHC II B 基因第三外显子部分序列片段进行了克隆分析,发现其也存在多个基因座位(Liu et al. 2007)。

1.3 MHC III 类分子 关于 MHC III 类分子,目

前的研究主要集中于哺乳动物和少数鱼类、两栖类、鸟类,爬行动物少有报道。

2 爬行动物 MHC 多态性及其维持机制

MHC 是迄今为止在脊椎动物发现的多态性最高的基因家族,其多态性表现为个体内及群体内存在大量的、具有一定频率的等位基因以及等位基因间高度的序列变异,这一点在很多爬行动物物种中都存在。它还有一种多态性现象,表现为近缘物种间共享相同的等位基因谱系,称为跨种多态性(trans-species polymorphism, TSP)或跨种进化(trans-species evolution)。MHC 位点等位基因谱系的跨种多态性,在哺乳类已有较多的记录。但对于脊椎动物的其他种类而言,跨种多态性资料零星而缺乏,且多数集中于一些鱼类和个别鸟类(Klein et al. 1998, Freeman-Gallant et al. 2002)。但是这些物种由于起源较晚,因此不能提供有关等位基因谱系长期存在的信息(Graser et al. 1996)。李恩等(2005)研究比较了乌龟、中国石龙子以及扬子鳄的 MHC II B 基因,通过构建系统发育树,认为存在 TSP。Stiebens 等(2013)采用 454 深度测序发现 MHC I 类基因在角群岛的濒危蠪龟种群里存在 TSP。此外,我们也发现爬行动物麻蜥属(*Eremias* spp.)不同种间 MHC 也有 TSP(原秀云等,未发表资料)。

MHC 多态性产生的原因,一般认为是通过基因突变、基因重组、基因转换等机制获得多态性(Klein et al. 1998),这是可以理解的,与其他基因没有本质区别。但是在获得多态性后,如何长时间保持基因的多态性,即维持 MHC 多态性的机制却一直存在争议。MHC 多态性水平远远高于其他基因的多态性,脊椎动物能够长时间保持如此高的多态性必然存在一定的维持机制。在爬行动物中,MHC I 类、II 类分子都存在较高的多态性,关于其机制,也是近年来研究的一个热点。目前,有几个假设来解析爬行动物 MHC 多态性的维持机制。

2.1 超显性选择 (overdominant selection)

也称为杂合优势 (heterozygosity advantage), 指等位基因异质结合体优于同质结合体。这个假设认为, 一个群体处在有各种各样病原的环境中, MHC 座位杂合的个体能够识别及呈递更多的病原, 因而更能抵抗病原, 从而得以保存下来 (Apanius et al. 1997)。由于超显性选择既可加强替换率和杂合度, 又能促使多态位点保持下来, 因此它在 PBR 的多态保持机制中有重要意义 (Eklom et al. 2010)。壁虎类 MHC I 类基因 $\alpha 2$ 结构域的序列分析表明点突变是导致氨基酸置换的主要原因, 同时, 高度杂合性也是维持爬行动物单性生殖类群的抗原呈递多样性的重要机制 (Radtkey et al. 1996)。

2.2 平衡选择 (balancing selection) 指选择压力作用下氨基酸替换的趋同以及杂合分子之间特定位点的替换的平衡 (Bernatchez et al. 2003)。平衡选择能够在种群中维持遗传学多样性, 而不是仅选择一个最有利的基因型。Edwards 等 (1995) 最早对鳄类进行 MHC II 类基因研究时就指出, 与哺乳类 MHC 基因一样, 爬行类也易受到相似的选择压力。而后续的爬行动物 MHC 的多数研究表明, 爬行动物 MHC 多态性也是受到平衡选择影响的。乌龟 MHC II 类基因存在着高度的多态性, 并且序列之间不存在明显的个体差异和性别差异。这些序列中没有发现任何插入、缺失和异常的终止密码子, 推测它们应该具有一定的生物学功能, 而不是假基因拷贝 (李恩等 2005)。扬子鳄、乌龟和中国石龙子 MHC II B 基因第二外显子的研究表明, 非同义替换明显高于同义替换, 提示平衡选择可能发挥着重要作用 (史燕等 2004, 李恩等 2005, 2006)。Jaratlerdsiri 等 (2012) 研究发现澳大利亚北部九大水系的盐水鳄 MHC I 类基因受到平衡选择。而加拉帕戈斯海鬣蜥的 MHC II 类基因序列分析表明, 有鳞目 MHC II B 基因是受到独特的进化驱动力而形成, 选择压力与其他脊椎动物有不同程度的差异 (Glaberman et al. 2009)。

2.3 选型交配 (assortative mating) 选型交配是一种非随机的交配模式, 指物种更趋向于

选择和基因型差别较大的个体进行交配。早在 1976 年就发现小鼠倾向于选择不同 MHC 基因型配偶 (Yamazaki et al. 1976), 爬行动物择偶可能也有类似机制。对瑞典的捷蜥蜴关于 MHC 基因的配偶选择实验支持了这一假说 (Olsson et al. 2003, 2004, 2005)。Miller 等 (2009) 通过研究野生喙头蜥种群的交配, 也为 MHC 异型交配提供了证据。

近年来, 多数学者认为, 这些假说可以统一为平衡选择 (Sommer 2005)。但也有例外, 如对扬子鳄种群 MHC II B 基因第三外显子的研究发现, 非同义替换率显著小于同义替换率, 暗示该多态性不是由平衡选择保持的 (Liu et al. 2007), 可能还有其他机制维持该多态性。爬行动物一些近缘种或亚种之间的基因流, 也会对 MHC 多态性的产生和维持产生影响。从短时间来看, 选择会导致一些获得性遗传多样性的丢失, 但长期而言选择对维系多样性还是积极有效的 (Ejmond et al. 2011)。遗传漂变对于 MHC 多态性的产生和维持也发挥了重要作用, 对于一些小种群或瓶颈种群, 平衡选择可以缓和遗传漂变的作用结果, 但遗传漂变还是形成 MHC 基因变异的主要作用力 (Alcaide 2010), 选择的力量并非一定总是比遗传漂变对适应性变异的影响大。而事实上, 这些假说之间并不是相互矛盾的, 可能对于不同的种群, 在某个物种或者某个位点, 几种机制共同作用, 才产生了 MHC 如此丰富的多态性。

3 爬行动物 MHC 基因的主要功能及应用

3.1 主要功能 和哺乳动物 MHC 类似, 爬行动物 MHC 编码的分子递呈抗原给宿主的免疫系统, 并构成机体识别“自我”和“非我”的一个关键组成部分。同时还参与对抗原处理, 外源性抗原与 MHC II 类分子结合成稳定的复合物, 从而保证了多肽不被进一步降解为氨基酸。

对哺乳动物而言, 在胚胎组织下调 MHC I 类基因的表达量是胚胎可以“躲避”母体免疫

系统的机制之一(Moffett et al. 2006)。爬行动物 MHC 的免疫相关方面的报道还很少。Murphy 等(2009)发现石龙子 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表达,他们发现 4 种 I a 类基因和至少 2 种 I b 类基因在南方草石龙子的子宫里表达。这表明在此物种中编码和表达了 MHC I 类基因,可能使得胚胎能“躲避”母体免疫系统。Brandley 等(2012)通过对眼点石龙子(*Chalcides ocellatus*)的转录组测序,对比妊娠和非妊娠的子宫中 MHC 基因的表达量,发现该物种的 MHC I 类和 MHC II 类基因表达量均下调,暗示该物种可能也和哺乳动物类似,通过下调 MHC I 类分子的表达量来避免在妊娠过程中发生的胎儿和母体之间的免疫排斥,且这种机制并不是某个单独的基因发挥着作用,而是一系列基因联合作用的结果。子宫下调 MHC I 类基因表达也发生在牛(*Bos tarurs*)、猪(*Sus scrofa*)、绵羊的上皮绒毛膜胎盘(epitheliochorial placenta),但在这种情况下,滋养层细胞与子宫上皮合并形成双核合胞体(Davies et al. 2000, Choi et al. 2003, Joyce et al. 2008)。在哺乳动物, MHC I 类基因表达下调可能是使得母体免疫系统会忽略这些异体移植细胞的机制之一。尽管在妊娠晚期三趾石龙子(*Chalcides chalcides*) (Blackburn et al. 1998)和一些 *Mabuya* 属的石龙子蜥蜴会形成合胞体(Vieira et al. 2007, Blackburn et al. 2011),然而没有证据表明眼点石龙子在妊娠期有合胞体形成,因此,在眼点石龙子中,子宫 MHC 基因表达下调的作用或功能尚不清楚,有待进一步研究和探讨。

3.2 MHC 基因对爬行动物学研究的意义

3.2.1 爬行动物免疫学 爬行动物 MHC 主要编码和抗原呈递相关的多肽,将抗原呈递给免疫细胞,这一点和哺乳动物类似(Farag 1990),因此也有学者指出爬行动物 MHC 对于研究胎生与母体免疫系统的协同进化具有重要的意义。Brandley 等(2012)通过研究眼石龙子指出,该物种的 MHC 基因对胚胎避免母体免疫排斥

具有十分重要的意义。但由于缺乏可比较的参照,爬行动物 MHC 更多的研究是集中于基础分子结构方面,对于功能研究还较少,今后应该加强这方面的研究。

3.2.2 爬行动物的种群结构和适应性进化

由于 MHC 基因的高度多态性,常被作为一种遗传标记应用于多方面研究。MHC 作为分子标记与微卫星等其他标记方法相比,在阐明种群间的变异和适应机制方面更有优越性。微卫星位点因其主要受非选择性机制的影响而不适用于阐述种群间的不同适应性,而大多数受选择作用影响的分子标记则因缺少变异性而无法阐述种群间的差异和适应性, MHC 基因则是例外(Kim et al. 1999)。因此, MHC 可以作为分子标记来阐明不同种群的适应性。

Madsen 等(2000)研究了不同种群大小和不同隔离程度的 6 个捷蜥蜴种群和 5 个极北蝾种群,分别使用了小卫星 DNA 标记、微卫星 DNA 标记和 MHC I 类基因方法来研究其种群变异性与种群生存力之间的关系,并且检验种群大小对基因组中不同部分的遗传变异的影响机制。结果发现,相对种群大小(基于隔离程度和动物个体数)与小卫星 DNA 变异性或微卫星位点的杂合度都没有相关性,而 MHC I 类基因的多样性都显示了相对种群大小和 MHC 多态性之间存在显著相关性。这意味着基于 MHC 基因的遗传多样性评估得到的结果与种群遗传理论相符(Madsen et al. 2000)。Miller 等(2010)调查了不同岛屿间的喙头蜥种群 MHC I 类基因多样性。通过比较 MHC 与所观察到的中性微卫星标记变异水平,以确定平衡选择、歧化选择和遗传漂变对形成孤立的种群之 MHC 变异模式的相对贡献。他们发现喙头蜥种群 MHC 变异水平与微卫星变异一致;而 MHC 基因高度分化,尤其是北部和库克海峡地区之间,且种群间有歧化选择的趋势。然而,种群瓶颈和隔离比选择作用对喙头蜥种群 MHC 变异模式的影响更大。

3.2.3 爬行动物系统进化 在长期的自然选择下, MHC 基因的分子进化方式可分为核苷

酸(氨基酸)水平多态性、等位基因水平多态性、单倍型水平多态性和跨物种多态性。MHC 基因具有共显性、连锁不平衡等遗传特征。MHC 分子大约在 4~5 亿年前就在脊椎动物中出现,并且在那个时候就已经开始分化。因此,MHC 分子可以作为一个良好的系统进化标记(Kim et al. 1999, 于晓云等 2011)。通过对爬行类 MHC 的研究可以使我们更好地理解这些基因的进化、功能以及较高等脊椎动物中复杂免疫系统的进化关系。

Edwards 等(1995)对密西西比鳄 MHC II 类基因进行多态性研究,并指出相应的进化关系。Murphy 等(2009)通过对石龙子 MHC I 类基因的分析并与其他物种相比,指出 $\alpha 2$ 结构域在脊椎动物中都较保守,且石龙子该序列与人类或者哺乳类有约 36.4%~47.3% 的相似性,同时也指出 MHC 基因能够反应近缘物种的亲缘关系。Miller 等(2005)以喙头蜥为对象,通过得到的 MHC II B 类序列与其他爬行动物进行系统发育比较,发现喙头蜥 MHC 序列与其他爬行类的序列没有聚成一个分支,反映了喙头蜥遗传支系的古老性,缺少可比较的近缘序列。Glaberman 等(2008a)通过研究美洲鬣蜥亚科 3 个物种即加拉帕戈斯海鬣蜥、加拉帕戈斯地鬣蜥和绿鬣蜥的 MHC I 类基因 cDNA 序列,发现 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域在物种间有共享多态性,暗示这两个结构域与 $\alpha 3$ 具有不同的演化历史,而加拉帕戈斯海鬣蜥不同个体间 MHC I 类基因 $\alpha 3$ 结构域之间具有很大的相似性,表明致同进化(concerted evolution)对物种内 I 类基因位点均质化起了作用。而海鬣蜥的 *Amer-UA* 通过和其他已发表种的 MHC I 类基因进行系统发育分析,发现其处于基部的位点,这表明该基因在有鳞目分化的早期就开始发生了分歧(Glaberman et al. 2009)。同年,通过分离得到海鬣蜥的 MHC II 类基因序列并与其他脊椎动物的 II 类基因进行比对,发现它们聚为一支,形成单系群,表明该物种起源于有鳞目与其他爬行动物分离后的所形成的一个共同祖先座位(locus)。基于这些结果,

Glaberman 等(2009)初步认为有鳞目 MHC II B 基因是受到独特的进化驱动力而形成。

3.2.4 爬行动物的保护生物学 MHC 基因作为适应性分子标记研究爬行动物的种群结构、系统发育关系等,这些也都为其管理和保护提供科学依据。在大多数物种中,MHC 基因所编码的产物都表现出高度的抗原多态性。MHC 变异水平反映了物种应对内外复杂环境及识别外来病原微生物的适应能力或生存潜力,也反映了物种潜在的病原抵抗力(Yuhki et al. 1990)。在一定程度上,MHC 变异水平也可反映整个物种基因组的变异水平,通常小种群和濒危物种 MHC 的多样性都比较低。

因为 MHC 与动物的免疫功能和适应性进化潜力密切相关,所以近年来它已被认为是濒危动物保护生物学和进化生物学的最佳候选标记之一。与中性标记相比,MHC 可反映物种进化及物种对环境的适应性进化过程。因此,MHC 的遗传变异分析对于探索物种的遗传多样性、种群遗传结构和种群动态、近缘种之间的进化关系与进化历史(Klein et al. 1997, Hedrick et al. 1998),以及濒危物种遗传管理及保护策略的制定等,都具有极其重要的意义。在匈牙利,由于人类活动(如农业)干扰,草原毒蛇栖息地被严重片段化。Újvári 等(2002)通过研究 8 条匈牙利草原蝰 MHC I 类基因的遗传变异性,并与 2 个较大的乌克兰种群比较,发现匈牙利种群的遗传多样性要低得多。Miller 等(2010)也调查了新西兰不同岛屿间的喙头蜥种群 MHC I 类基因多样性,也为该物种的保护提供了指导意义。

MHC 在交配选择(mate choice)中的作用已越来越受到重视,对人和小鼠的研究表明了基于 MHC 基因型所进行的交配选择决定,而且提示其他脊椎动物中可能都有基于 MHC 的交配选择决定,MHC 在交配选择中的独特作用,提示在进行濒危动物饲养繁殖种群的管理时,建立基于 MHC 的、合理的交配和选育机制是十分重要和必要的(Millinski et al. 2006)。对瑞典的捷蜥蜴 MHC 基因的研究是当今首次

展示了野生爬行类种群的择偶与 MHC 基因型相似性之间相关性的报导,室内和室外实验都表明雌蜥更愿意选择 MHC I 类基因相似性低(差异大)的雄蜥气味(Olsson et al. 2003, 2004)。随后,Olsson 等(2005)又通过分析成年雄性捷蜥蜴的潜在好基因效应,指出有特定限制性片段长度多态性的 MHC 基因型(O-型雄性),与缺少这一遗传元件(NO-型雄性)相比,在增加的生理胁迫下,感染的寄生虫更少。而且 O-型雄性择偶更易成功,保护它们的配偶更长久,这也增加了基于 MHC 的择偶证据(Olsson et al. 2005)。通过研究野生喙头蜥种群,发现有证据支持 MHC 异型交配, MHC 相关的偏好似乎在交配选择中发挥了作用(Miller et al. 2009)。

在濒危物种的饲养繁殖中,需要对个体的遗传背景有详细地了解,以鉴定种群中稀有的等位基因,特别是 MHC 上的稀有等位基因,在制定饲养繁殖方案时注意加以选择,并已通过转铁蛋白基因的选育研究证明了这一点(Hedrick et al. 1994)。扬子鳄 MHC II B 基因第二外显子较高的多态性,将有利于扬子鳄饲养种群的遗传保护,尤其是在野生扬子鳄种群日益减少、饲养种群的遗传多样性减少的情况下(史燕等 2004)。

4 展 望

在过去的几十年里, MHC 已成为理解自然选择对种群遗传多样性的影响和调查宿主抵抗病原体的遗传基础的一种模型。然而,除人和小鼠外,许多脊椎动物 MHC 研究还很不足,这在一定程度上阻碍了 MHC 在这些类群的疾病、进化和保护遗传学研究中的应用。有鳞目尤为如此,作为爬行动物中分化程度最高的类群,有关其 MHC 研究还相当不足。

目前,国内关于爬行动物 MHC 基因的研究也相对较少。通常采用的研究方法主要是通过从 NCBI 数据库中搜索到 MHC 基因序列,应用比对软件(如 Clustal X)进行分析,进而设计出特定引物,再通过 PCR 扩增出特定的基因

片段,克隆、测序,然后分析 MHC 基因的多态性。但 MHC 基因变异程度很高,对每一个体(特别是杂合子),一般需要测定 5~7 个克隆的序列,才能保证来自双亲的两个等位基因的序列都被测出。如果对于发生基因重复的座位,则需要挑选、测定更多的克隆。显然,对大样本的种群分析来说,工作量将是异常惊人的。因此,在对 PCR 扩增产物的序列进行测定之前往往先通过单链构象多态性检测(single-strand conformation polymorphism, SSCP)技术进行初步分析,确定扩增产物的不同 SSCP 型。对每一个 SSCP 型,只需选择其中的一个或少数几个个体进行序列测定,即可在不减少信息量的情况下大大减少工作量(Sunnucks 2000)。

但是,目前对爬行动物 MHC 基因还有许多问题有待解决。首先,爬行动物 MHC 基因还没有被定位,研究者往往不能确定所研究基因的座位,这在以后的研究中可以通过序列特异性寡核苷酸探针(sequence-specific oligonucleotide probe, SSOP)分析方法(Bugawan et al. 1991)或序列特异性引物(sequence-specific primers, SSP)方法(Mullighan et al. 1997)来确定 MHC 基因座位。其次,当前研究爬行动物 MHC 基因获得的片段相对较短,一般在 100~300 bp。不能总是依赖通过从 GenBank 中搜索到的序列设计引物来获得目的片段,可以通过构建基因组文库的方法来获得较大片段的 MHC 基因,或者通过 RACE 技术得到 MHC 基因的全长,这一方法目前也得到广泛应用。第三,对于通过 MHC 基因来评价种群遗传多样性的研究,样本量通常都比较小,应该扩大样本量,这可以通过 PCR-RFLP 来进行分析。

不管是进化生物学还是种群生态学,都需要对 MHC 进行准确分型后才能开展下一步研究,而目前这依然是一个挑战。近年来,随着分子标记技术、电泳技术和荧光技术的不断提升,非模式脊椎动物的 MHC 基因分型方法也日趋多元化,包括 SSCP 检测、变性梯度凝胶电

泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)、参比链介导的构象分析 (reference strand mediated conformation analysis, RSCA) 以及 PCR 产物的克隆分型等, 这些方法也都各有利弊 (Babik 2010), 事实上, 没有一种技术可以说是毫无瑕疵的 (Knapp 2005)。研究 MHC 基因依然是一个长期的、艰难的过程, 随着新一代测序技术的发展和完善, 将越来越广泛运用于多位点 MHC 基因分型。同时, 我们也应该更多地关注 MHC 功能的研究, 以期将这些更好地应用于实践。

参 考 文 献

- Alcaide M. 2010. On the relative roles of selection and genetic drift in shaping MHC variation. *Molecular Ecology*, 19(18): 3842–3844.
- Apanius V, Penn D, Slev P R, et al. 1997. The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology*, 17(2): 179–224.
- Babik W. 2010. Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. *Molecular Ecology Resources*, 10(2): 237–251.
- Ballingall K T, Rocchi M S, McKeever D J, et al. 2010. Trans-species polymorphism and selection in the MHC Class II DRA genes of domestic sheep. *PLoS One*, 5(6): e11402.
- Bernatchez L, Landry C. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*, 16(3): 363–377.
- Blackburn D G, Flemming A F. 2011. Invasive implantation and intimate placental associations in a placental African lizard, *Trachylepis ivensi* (Scincidae). *Journal of Morphology*, 273(2): 137–159.
- Blackburn D G, Francisco S K S, Callard I P. 1998. Histology of abortive egg sites in the uterus of a viviparous, placental lizard, the skink *Chalcides chalcides*. *Journal of Morphology*, 235(2): 97–108.
- Brandley M C, Young R L, Warren D L, et al. 2012. Uterine gene expression in the live-bearing lizard, *Chalcides ocellatus*, reveals convergence of squamate reptile and mammalian pregnancy mechanisms. *Genome Biology and Evolution*, 4(3): 394–411.
- Bugawan T L, Erlich H A. 1991. Rapid typing of HLA-DQB1 DNA polymorphism using nonradioactive oligonucleotide probes and amplified DNA. *Immunogenetics*, 33(3): 163–170.
- Castro L F C, Furlong R F, Holland P W H. 2004. An antecedent of the MHC-linked genomic region in *Amphioxus*. *Immunogenetics*, 55(11): 782–784.
- Choi Y, Johnson G A, Spencer T E, et al. 2003. Pregnancy and interferon tau regulate major histocompatibility complex class I and β 2-microglobulin expression in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, 68(5): 1703–1710.
- Danchin E, Vitiello V, Vienne A, et al. 2004. The major histocompatibility complex origin. *Immunological Reviews*, 198(1): 216–232.
- Davies C J, Fisher P J, Schlafer D H. 2000. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. *Placenta*, 21(2/3): 194–202.
- Edwards S V, Grahn M, Potts W K. 1995. Dynamics of *Mhc* evolution in birds and crocodylians: amplification of class II genes with degenerate primers. *Molecular Ecology*, 4(6): 719–729.
- Ejmond M J, Radwan J. 2011. MHC diversity in bottlenecked populations: a simulation model. *Conservation Genetics*, 12(1): 129–137.
- Eklblom R, Sæther S A, Fiske P, et al. 2010. Balancing selection, sexual selection and geographic structure in MHC genes of Great Snipe. *Genetica*, 138(4): 453–461.
- Farg M A, El Ridi R. 1990. Functional markers of the major histocompatibility gene complex of snakes. *European Journal of Immunology*, 20(9): 2029–2033.
- Freeman-Gallant C R, Johnson E M, Saponara F, et al. 2002. Variation at the major histocompatibility complex in Savannah sparrows. *Molecular Ecology*, 11(6): 1125–1130.
- Garrigan D, Hedrick P W. 2003. Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. *Evolution*, 57(8): 1707–1722.
- Glaberman S, Caccone A. 2008a. Species-specific evolution of class I MHC genes in iguanas (Order: Squamata; Subfamily: Iguaninae). *Immunogenetics*, 60(7): 371–382.
- Glaberman S, Moreno M A, Caccone A. 2009. Characterization and evolution of MHC class II B genes in Galápagos marine iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 33(8): 939–947.
- Glaberman S, Pasquier L D, Caccone A. 2008b. Characterization of a nonclassical class I MHC gene in a reptile, the Galápagos marine iguana (*Amblyrhynchus cristatus*). *PLoS One*, 3(8): e2859.
- Gorer P A, Lyman S, Snell G D. 1948. Studies on the genetic

- and antigenic basis of tumour transplantation. Linkage between a histocompatibility gene and 'fused' in mice. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 135 (881): 499–505.
- Graser R, O' hUigin C, Vincek V, et al. 1996. Trans-species polymorphism of class II *Mhc* loci in danio fishes. *Immunogenetics*, 44(1): 36–48.
- Grossberger D, Parham P. 1992. Reptilian class I major histocompatibility complex genes reveal conserved elements in class I structure. *Immunogenetics*, 36(3): 166–174.
- Hedrick P W, Miller P S. 1994. Rare alleles, MHC and captive breeding. *Conservation Genetics*, 68(1): 187–204.
- Hedrick P W, Parker K M. 1998. MHC variation in the endangered Gila topminnow. *Evolution*, 52(1): 194–199.
- Jaratlerdsiri W, Isberg S R, Higgins D P, et al. 2012. MHC class I of saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*): polymorphism and balancing selection. *Immunogenetics*, 64 (11): 825–838.
- Joyce M M, Burghardt J R, Burghardt R C, et al. 2008. Uterine MHC class I molecules and β_2 -microglobulin are regulated by progesterone and conceptus interferons during pig pregnancy. *The Journal of Immunology*, 181 (4): 2494–2505.
- Kim T J, Parker K M, Hedrick P W. 1999. Major histocompatibility complex differentiation in Sacramento River chinook salmon. *Genetics*, 151(3): 1115–1122.
- Klein J, Sato A, O' hUigin C. 1998. Evolution by gene duplication in the major histocompatibility complex. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 80(1/4): 123–127.
- Klein M W, Nancy P M. 1997. Explaining the duration of exchange-rate pegs. *Journal of Development Economics*, 54 (2): 387–404.
- Knapp L A. 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis and its use in the detection of major histocompatibility complex polymorphism. *Tissue Antigens*, 65(3): 211–219.
- Kulski J K, Shiina T, Anzai T, et al. 2002. Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunological Reviews*, 190(1): 95–122.
- Laird D J, De Tomaso A W, Cooper M D, et al. 2000. 50 Million years of chordate evolution: seeking the origins of adaptive immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13): 6924–6926.
- Liu H, Wu X B, Yan P, et al. 2007. Polymorphism of exon 3 of MHC class II B gene in Chinese alligator (*Alligator sinensis*). *Journal of Genetics and Genomics*, 34(10): 918–929.
- Madsen T, Olsson M, Wittzell H, et al. 2000. Population size and genetic diversity in sand lizards (*Lacerta agilis*) and adders (*Vipera berus*). *Biological Conservation*, 94(2): 257–262.
- Marosi B, Ghira I V, Sós T, et al. 2011. Identification of partial MHC class II B exon 2 sequences in two closely related snake species: *Natrix tessellata* and *Natrix natrix*. *Herpetologica Romanica*, 5(1): 1–6.
- Milinski M. 2006. The major histocompatibility complex, sexual selection, and mate choice. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37(1): 159–186.
- Miller H C, Allendorf F, Daugherty C H. 2010. Genetic diversity and differentiation at MHC genes in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp.). *Molecular Ecology*, 19 (18): 3894–3908.
- Miller H C, Andrews-Cookson M, Daugherty C H. 2007. Two patterns of variation among MHC class I loci in tuatara (*Sphenodon punctatus*). *Journal of Heredity*, 98(7): 666–677.
- Miller H C, Belov K, Daugherty C H. 2005. Characterization of MHC class II genes from an ancient reptile lineage, *Sphenodon* (tuatara). *Immunogenetics*, 57(11): 883–891.
- Miller H C, Belov K, Daugherty C H. 2006. MHC class I genes in the tuatara (*Sphenodon* spp.): evolution of the MHC in an ancient reptilian order. *Molecular Biology and Evolution*, 23 (5): 949–956.
- Miller H C, Moore J A, Nelson N J, et al. 2009. Influence of major histocompatibility complex genotype on mating success in a free-ranging reptile population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1662): 1695–1704.
- Moffett A, Loke C. 2006. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Reviews Immunology*, 6(8): 584–594.
- Mullighan C G, Fanning G C, Chapel H M, et al. 1997. TNF and lymphotoxin-alpha polymorphisms associated with common variable immunodeficiency: role in the pathogenesis of granulomatous disease. *Journal of Immunology*, 159(12): 6236–6241.
- Murphy B F, Thompson M B, Belov K. 2009. Evolution of viviparity and the maternal immune system: major histocompatibility complex (MHC) class I genes in skinks. *Orbit: The University of Sydney Undergraduate Research Journal*, 1(1): 1–17.
- Nei M, Gu X, Sitnikova T. 1997. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15): 7799–7806.
- Olsson M, Madsen T, Nordby J, et al. 2003. Major

- histocompatibility complex and mate choice in sand lizards. *Proceedings of the Royal Society B: Biology Science*, 270 (Suppl. 2): S254 – S256.
- Olsson M, Madsen T, Ujvari B, et al. 2004. Fecundity and MHC affects ejaculation tactics and paternity bias in sand lizards. *Evolution*, 58(4): 906 – 909.
- Olsson M, Madsen T, Wapstra E, et al. 2005. MHC, health, color, and reproductive success in sand lizards. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58(3): 289 – 294.
- Piertney S B, Oliver M K. 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, 96(1): 7 – 21.
- Radtkey R R, Becker B, Miller R D, et al. 1996. Variation and evolution of class I MHC in sexual and parthenogenetic geckos. *Proceedings of the Royal Society B: Biology Science*, 263(1373): 1023 – 1032.
- Sommer S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, 2: 16.
- Stiebens V A, Merino S E, Chain F J J, et al. 2013. Evolution of MHC class I genes in the endangered loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) revealed by 454 amplicon sequencing. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 95.
- Sunnucks P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(5): 199 – 203.
- Újvári B, Belov K. 2011. Major histocompatibility complex (MHC) markers in conservation biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8): 5168 – 5186.
- Újvári B, Madsen T, Kotenkod T, et al. 2002. Low genetic diversity threatens imminent extinction for the Hungarian meadow viper (*Vipera ursinii rakosiensis*). *Biological Conservation*, 105(1): 127 – 130.
- Vieira S, De Pérez G, Ramírez-Pinilla MP. 2007. Invasive cells in the placentome of Andean populations of *Mabuya*: an endotheliochorial contribution to the placenta? *The Anatomical Record*, 290(12): 1508 – 1518.
- Witzell H, Madsen T, Westerdahl H, et al. 1999. MHC variation in birds and reptiles. *Genetica*, 104(3): 301 – 309.
- Yamazaki K, Boyse E A, Mike V, et al. 1976. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *The Journal of Experimental Medicine*, 144(5): 1324 – 1335.
- Yuhki N, O'Brien S J. 1990. DNA recombination and natural selection pressure sustain genetic sequence diversity of the feline MHC class I genes. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(2): 621 – 630.
- 杜佳莹, 丁少雄, 张之文, 等. 2006. 鱼类 MHC 基因的研究进展. *厦门大学学报: 自然科学版*, 45(增刊2): 116 – 124.
- 李春梅, 张全启, 齐洁, 等. 2009. 鱼类 MHC 基因的研究概况. *海洋湖沼通报*, (4): 39 – 50.
- 李恩, 吴孝兵, 晏鹏, 等. 2005. 中国石龙子 MHC II 类 B 基因第二外显子的克隆及序列分析 // 周开亚, 计翔. 中国动物学会两栖爬行动物学分会 2005 年学术研讨会暨会员代表大会论文集: 第 10 集. 长春: 吉林人民出版社, 275 – 281.
- 李恩, 吴孝兵, 晏鹏. 2006. 乌龟 MHC II 类 B 基因第二外显子的克隆及序列分析. *激光生物学报*, 15(1): 58 – 64.
- 刘至治, 蔡完其, 李思发. 2006. 中华鳖群体间编码 MHC I 类分子 $\alpha 2$ 结构域基因的克隆及序列分析. *水产学报*, 30(2): 197 – 203.
- 史燕, 吴孝兵, 晏鹏, 等. 2004. 扬子鳄 MHC II 类 B 基因第二外显子的克隆及序列分析. *动物学研究*, 25(5): 415 – 421.
- 夏春. 1999. 中华鳖 MHC I $\alpha 2$ 链基因克隆及序列分析. *中国免疫学杂志*, 15(2): 77 – 79.
- 于晓云, 黄华, 陈平, 等. 2011. 两栖动物 MHC 基因研究进展. *四川动物*, 30(6): 998 – 1002.