

中国不同地域恒河猴 MHC- I 型 部分等位基因的调查

万玉玲^{①③} 季芳^② 饶军华^② 刘晓明^{②*}

(^①中国科学院华南植物园 广州 510650; ^②广东省昆虫研究所 广州 510260;

^③中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要:采用序列特异性引物-聚合酶链式反应(PCR-SSP)分型方法对在华南灵长类动物研究中心繁殖的247只中国恒河猴(*Macaca mulatta*) (其中30只来源于广西、34只来源于海南、183只来源于川西、安徽等内陆地区杂交群)的Mamu-A*01、A*02、A*08、B*01和NA7等5个MHC-I型分子位点进行检测。结果显示,A*01、A*02发现于海南群和杂交群,阳性率均小于8.8%;A*08发现于杂交群中,阳性率小于3.8%;B*01发现于广西群和杂交群,阳性率均大于17.48%;NA7在3个猴群中均有发现,阳性率均大于32.4%。中国不同地域恒河猴群体携带的5个MHC-I型等位基因的频率存在明显差异,通过与印度的恒河猴比较,中国恒河猴与印度恒河猴携带的MHC-I等位基因也存在显著的差异。

关键词: Mamu-I型;中国;恒河猴;PCR-SSP

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)02-01-05

Typing of Several MHC- I Alleles of Rhesus Monkeys Derived from Different Regions of China

WAN Yu-Ling^{①③} JI Fang^② RAO Jun-Hua^② LIU Xiao-Ming^{②*}

(^① South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650;

^② Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260;

^③ Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: PCR-SSP was applied to type five MHC- I alleles (Mamu-A*01, A*02, A*08, B*01 and NA7) of Chinese Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*) derived from Hainan ($n = 30$), Guangxi ($n = 34$) and Crossbreed groups ($n = 183$). The results showed that A*01 and A*02 existed in Hainan and Crossbreed groups with frequencies less than 8.8%. A*08 only existed in crossbreed group with a frequency less than 3.8%. The frequencies of B*01 in Guangxi and Crossbreed groups were more than 17.48%, while NA7 was found in Guangxi, Hainan and Crossbreed groups with frequencies more than 32.4%. The different allelic frequencies among monkeys derived from different regions of China suggest that there are great differences in distribution frequencies of MHC- I alleles among them. In addition, compared to Indian Rhesus Monkey, this discrepancy also appeared in Chinese Rhesus Monkey and Indian Rhesus Monkey.

Key words: Mamu Class I; China; Rhesus Monkey; PCR-SSP

恒河猴(*Macaca mulatta*)是重要的非人灵长类实验动物之一,在医药、生物制品、人类疾病等方面的研究中被广泛应用,其中携带猴免疫缺陷病毒(SIV)的恒河猴是目前研究HIV感

* 通讯作者, E-mail: xmoonliu@hotmail.com;

第一作者介绍 万玉玲,女,硕士研究生;研究方向:生物化学与分子生物学;E-mail: wanyul@mails.gucas.ac.cn

收稿日期:2006-07-12,修回日期:2007-01-08

染艾滋病(AIDS)的最理想的动物模型^[1,2]。

在 HIV-1 病毒感染过程中研究最多的就是细胞毒性淋巴细胞(cytotoxic T cell lymphocytes, CTL),CTL 前体通过其表面受体识别并结合细胞表面的 MHC-I 类分子呈递的病毒抗原肽后,特异性激活或增殖成为效应 CTLs,然后释放细胞浆颗粒或表达 Fas 蛋白配体来杀伤靶细胞,引发免疫反应,所以 MHC-I 类分子在 CTL 对病毒的识别中起重要作用,进一步研究发现,个体间 MHC-I 型的多态性对疾病进程有显著影响。在动物实验中,对实验动物的 MHC-I 基因没有清晰的了解,所得到的免疫学结果的意义非常有限,此外,新型 CTL 检测技术 MHC-I/肽四聚体复合物(tetramer complex)技术的应用也要求恒河猴所携带的 MHC-I 类基因与复合物中所包含的 MHC-I 型基因一致^[3]。因此,充分了解实验动物的 MHC 基因型是十分必要的。

建立 AIDS 模型的恒河猴,前期多来源于印度,自 20 世纪 70 年代后,随着印度禁止出口恒河猴及中国人工繁殖恒河猴规模的扩大,国际上使用中国恒河猴进行 AIDS 研究的比例日益增加。然而有关中国恒河猴 MHC 的基础研究不多。2003 年,李元对中国恒河猴与印度恒河猴 MHC-I 型基因进行了分型比较*,但不同地域来源尤其是从亚种水平分型分析中国恒河猴 MHC-I 型基因的研究尚未见报道。本文以来源清晰的广西群、海南群和川西、安徽等各内陆地区杂交群的恒河猴为研究对象,通过序列特异性引物-聚合酶链式反应(PCR-SSP)分型技术对这些恒河猴 MHC-I 型部分等位基因进行调查,采用 Excel 和 SPSS 软件进行统计学分析,并采用二项式分布检验法进行显著性分析。本文中的 Mamu-A * 01、Mamu-A * 02、Mamu-A * 08 和 Mamu-B * 01,均有对应的 MHC-I/肽四聚体复合物,筛选的动物有利于 MHC-I/肽四聚体复合物技术的应用。Mamu-NA7 由于在中国恒河猴中携带率较高,也纳入本实验的研究对象之中*。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 恒河猴由华南灵长类动物研究与开发中心提供,选取普通级健康恒河猴 247 只,其中 30 只来自广西群,编号:1~30;34 只来自海南群,编号:31~64;183 只来自杂交群(亲本来自川西、安徽等各内陆地区),编号:65~247。分别采血 0.5 ml,EDTA 抗凝。

1.1.2 主要仪器 Alpha imagine 2200 凝胶图像分析系统(Alpha Innotech 公司),BioRad 电泳槽,Primus 25 MWG PCR 仪(德国 MWG 公司)。

1.1.3 试剂 PCR Master Mix 试剂盒和 Wizard Genomic DNA Purification 试剂盒(均购自 Promega 公司),DL2000 Marker(购自宝生物公司)等。

1.1.4 引物 参考已发表的印度恒河猴引物资料,引物及引物序列见表 1,其中 DRB 为内参位点^[4]。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 按 Wizard Genomic DNA Purification 试剂盒的方法,从恒河猴血样中提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 扩增体系为 20 μl,其中模板 DNA 3.6 μl,引物 0.5 μl,变性温度 95℃、各等位基因的退火温度及反应循环次数见表^[4]。

1.2.3 PCR 结果检测 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,根据图谱判断并记录实验结果,阳性记录为“1”,非阳性记录为“0”。

1.3 统计学分析 检测数据采用 Excel 和 SPSS 软件进行统计学分析,并采用二项式分布检验进行显著性分析。

2 结果和分析

2.1 电泳结果及阳性分析 对 Mamu-I 型分子中的 Mamu-A * 01、Mamu-A * 02、Mamu-A * 08、Mamu-NA7 和 Mamu-B * 01 等位基因进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测,根据图谱判断结果,本文仅以 Mamu-B * 01 电泳图谱来说明,B * 01 产物大小为 530 bp,图中 96、97、100、107、108 号

* 李元.用 PCR-SSP 方法对中国恒河猴 MHC-I 分子分型的初步研究.南开大学硕士论文,2003.

表 1 引物序列及 PCR 扩增产物名称^[4]

Table 1 Primer sequence and name of PCR products

扩增位点 Alleles	上游序列 Primer of 5'	下游序列 Primer of 3'	产物大小(bp) Size of products	退火温度(°C) Annealing temperature	循环次数 Cycle numbers
A * 01	GACAGCGACGCCGAGCCAA	GCTGCAGCGTCTCCTCCCC	685	66	35
A * 02	TGTA AACGACGCCACTGTGGGTG- GAGCAGGAGGTCC	CAGGAAACAGCTATGACCCAGCACC- TCAGGGTGGCCTCT	1 300	66	30
A * 08	TGTA AACGACGCCACTCTTTGAG- GTATTTCTACACCG	CAGGAAACAGCTATGACCCAGCCCA- TGTCCGCTGCC	611	64	35
B * 01	TGTA AACGACGCCACTACCGGA- GACACGGAAGG	CAGGAAACAGCTATGACCAGCCACT- CCACGCACCGG	530	62	35
NA7	TGTA AACGACGCCACTATGAGGT- ATTTCTACACCTCCA	CAGGAAACAGCTATGACCCGCCACA- TCCGCCGCGAA	606	64	35
DRB	GCCTCGAGTGTC CCCCAGCAGCTTTC	GCCGCAGCTTTCACCTCGCCGCTG	260		

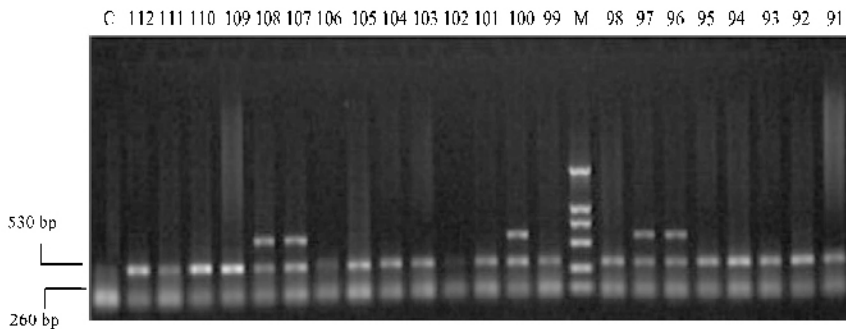


图 1 Mamu-B * 01 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of Mamu-B * 01

91 ~ 112 杂交群; M :DL2000, 从上至下分别为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp; C :阴性对照。

91 - 112 Samples of crossbreed group; M :DL2000 marker ,these were 2 000 ,1 000 ,750 ,500 ,250 ,100 bp; C :Negative control.

判断为阳性,阴性对照用无离子水替代模板(图 1)。

2.2 Mamu- I 型等位基因在各研究群体中的分布频率 表 2 数据表明 Mamu-A * 01、Mamu-A * 02 和 Mamu-A * 08 位点在这 3 个群体中阳性率极低,尤其是 Mamu-A * 01,247 只恒河猴中仅发现 2 只携带该基因,在海南群和杂交群中阳性率分别为 2.94% 和 0.54%,Mamu-A * 02 在海南群和杂交群中的阳性率分别为 8.82% 和 0.54%,Mamu-A * 08 仅出现于杂交群中,阳性率为 3.8%,Mamu-B * 01 和 Mamu-NA7 在这 3 个群体中携带率较高,Mamu-B * 01 在广西群和

杂交群中的阳性率分别为 20% 和 17.48%,Mamu-NA7 在广西群、海南群和杂交群的阳性率依次为 46.67%、32.4% 和 46%。已发表的印度恒河猴猴群^[4]以上各等位基因分布频率均大于中国恒河猴各群(图 2)。

2.3 差异显著性分析 二项式分布检验进行显著性分析,结果表明(表 2),Mamu-A * 01 和 A * 02 的携带率在海南群与印度恒河猴之间差异显著($P < 0.05$),杂交群与印度恒河猴之间差异非常显著($P < 0.01$),其中,Mamu-A * 02 在海南与杂交群之间差异非常显著($P < 0.01$),但 Mamu-A * 01 在海南群与杂交群之间

差异不显著 ,Mamu-A * 08 的携带率在杂交群与印度恒河猴之间差异非常显著($P < 0.01$); Mamu-NA7 的携带率在海南群与印度群之间差异显著($P < 0.05$),杂交群与印度群之间差异非常显著($P < 0.01$),广西群与印度群之间差异非常显著($P < 0.01$);Mamu-B * 01 的携带率

在各群体中的差异均不显著。Mamu-A * 01、Mamu-A * 02 和 Mamu-A * 08 在中国各群中的出现频率都很低 ,Mamu-B * 01 和 Mamu-NA7 在中国各群中的携带率较高且分布较均匀。总的来说 ,以上各位点在印度恒河猴猴群中出现的频率均高于中国恒河猴猴群 ,差异也非常显著。

表 2 在不同地域来源的中国恒河猴以及印度恒河猴中各等位基因出现的频率($n, %$)

Table 2 The frequencies of Mamu- I alleles in different tested populations from China and India

等位基因 Alleles	A * 01	A * 02	A * 08	B * 01	NA7
广西群 Guangxi group ($n = 30$)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	6(20.0)	14(46.7)
海南群 Hainan group ($n = 34$)	1(2.9)	3(8.8)	0(0.0)	0(0.0)	11(32.4)
杂交群 Crossbred group ($n = 183$)	1(0.5)	1(0.5)	7(3.8)	32(17.5)	84(46.0)
印度群 Indian group ($n = 91$)	13(14.3)	15(16.0)	74(81.3)	20(22.0)	44(48.4)
广西群-印度群 Guangxi group-Indian group					**
海南群-杂交群 Hainan group-Crossbred group		**			
海南群-印度群 Hainan group-Indian group	*	*			*
杂交群-印度群 Crossbred group-Indian group	**	**	**		**

* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

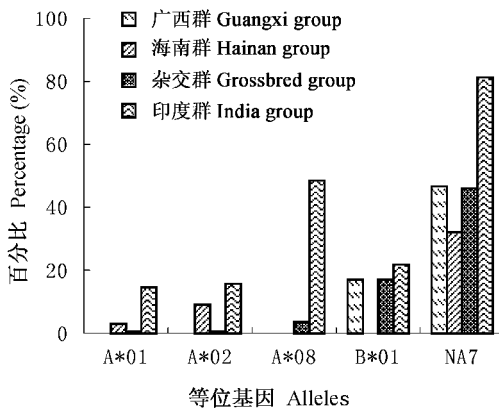


图 2 中国恒河猴各群以及印度恒河猴 Mamu- I 型等位基因的频率

Fig. 2 The frequency of Mamu- I alleles in different tested populations from China and India

3 讨论

MHC 是迄今为止最为复杂的一个遗传多态性系统。MHC 分型技术早年采用的是血清学方法 ,然而 ,属于同一血清学特异性的抗原往往可以由数个不同的等位基因所编码 ,只能进行宽泛的检验。1992 年以来 ,PCR-SSP 技术已成为 MHC 分型研究的常规手段 ,具有简洁、快

速、准确及重复性好等特点 ,普遍应用于人类 MHC 等位基因的高解析分型研究 ,但此方法应用于中国恒河猴 ,特别是针对不同地域来源恒河猴的 Mamu- I 分型却鲜见报道。因此 ,本文采用 PCR-SSP 技术对各地域的中国恒河猴 MHC- I 型部分等位基因进行了分型研究。由于没有中国恒河猴 MHC 基因的资料^[3] ,本研究所用引物参照印度恒河猴相关等位基因的引物序列^[4]。

结果表明 ,不同地域来源的群体之间 Mamu- I 型等位基因存在着显著差异 ,广西群中没有发现 Mamu-A * 01、Mamu-A * 02 和 Mamu-A * 08 ,海南群中没有发现 Mamu-A * 08 和 Mamu-B * 01 基因 ,本研究中的广西群和海南群 ,在亚种分类上 ,分属于指名亚种(*M. m. mulatta*)和海南亚种(*M. m. brevicaudus*) ,因此推测 ,基因分布的差异可能与种群来源有关 ,对此还有待进一步研究证实。其次 ,杂交群携带所有的被检测位点 ,说明建立杂交群有利于维持和提高恒河猴种群的遗传多样性。

Mamu-A * 01 是影响 SIV 感染的恒河猴动物模型疾病发生过程重要的 Mamu- I 型分子^[5] ,Vogel 等的研究认为中国恒河猴中不存在

Mamu-A * 01 基因^[6], 而李元检测的中国恒河猴的 Mamu-A * 01 携带率高达 28.7%*, 本文在 247 只恒河猴中检测到 2 只恒河猴携带 Mamu-A * 01 基因, 再次证明中国恒河猴中确实携带有 Mamu-A * 01。以上恒河猴 MHC 基因研究结果的差异可能与样品来源的不同有关, Kanthaswamy 通过对中国不同地区驯养猴群的 mtDNA 的聚类分析表明, 中国猴群各地区间的遗传基础差距较大, 各地区内部的猴群也呈现遗传结构的多样性, 并不简单的依从地区分类的模型^[7], 本文通过对中国恒河猴 MHC- I 型部分基因的分型研究印证了上述观点, 因此, 在建立猕猴繁殖群时, 有必要考虑保持不同区域恒河猴各自的遗传特性, 为生物医学研究提供合适的具有特定遗传背景的实验动物。

另一方面, 中国恒河猴携带 Mamu-B * 01 和 Mamu-NA7 的比例相当高, 这与李元* 的分析结果类似, Mamu-B * 01 和 Mamu-NA7 的进一步研究对中国恒河猴的开发利用将具有重要意义。

本文是为筛选符合 AIDS 研究需要的恒河猴所做的基础研究, 虽然研究涉及的等位基因个数较少, 也可以描述 MHC- I 类等位基因在中国恒河猴中的分布; 其次, 等位基因的多态位点在免疫过程中起决定作用, 有必要从基因序列的方面对中国恒河猴的 Mamu- I 型等位基因进行深入了解。最后, 为了提高 PCR-SSP 分型的

准确性和完整性, 应根据中国恒河猴自身的 Mamu 基因序列来设计引物, 这需要知道更多的中国恒河猴 Mamu 基因序列, 值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] Johnson R P. Macaque models for AIDS vaccine development. *Curr Opin Immunol*, 1996, **8**(4): 554 ~ 560.
- [2] Stott J, Almond N. Assessing animal models of AIDS. *Nat Med*, 1995, **1**(4): 295 ~ 297.
- [3] Kuroda M J, Schmitz J E, Barouch D H, et al. Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex. *J Exp Med*, 1998, **187**(9): 1 373 ~ 1 381.
- [4] Thorsten Mühl, Michael Krawczak, Peter ten Haft, et al. MHC class I alleles influence set-point viral load and survival time in Simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol*, 2002, **169**: 3 438 ~ 3 446.
- [5] Zhang Z Q, Fu T M, Danilo R, et al. Mamu-A * 01 allele-mediated attenuation of disease progression in Simian-human immunodeficiency virus infection. *J Virol*, 2002, **76**(24): 12 845 ~ 12 854.
- [6] Vogel T, Norley S, Beer B, et al. Rapid screening for Mamu-A1-positive rhesus macaques using a SIVmac Gag peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte assay. *Immunology*, 1995, **84**(3): 482 ~ 487.
- [7] Kanthaswamy S, Smith D G. Effects of geographic origin on captive *Macaca mulatta* mitochondrial DNA variation. *Comp Med*, 2004, **54**(2): 193 ~ 201.

* 李元. 用 PCR-SSP 方法对中国恒河猴 MHC-I 分子分型的初步研究. 南开大学硕士学位论文, 2003.