

# 人多反应性抗体重链 V 区基因克隆和序列分析\*

张劲松 叶敏

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031)

**关键词** 多反应性抗体, 基因克隆, DNA 序列分析, RT-PCR

近年来,对 CD5 B 淋巴细胞的研究引起了人们广泛的兴趣。最早发现小鼠中有两种 B 细胞世系。其中 Ly-1/CD5<sup>+</sup>B 细胞(现称 B-1a 细胞)是自身抗体和天然抗体的产生者,主要分泌 IgM 型多反应性抗体(polyreactive antibody)。其 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 部分一般不发生体细胞突变。人免疫系统也存在相应的 CD5<sup>+</sup>B 细胞。最近 Kantor 等<sup>[1]</sup>在小鼠中发现了第三种 B 细胞世系(B-1b 细胞)。这种细胞在形态和功能上具有 B-1a 细胞的特征,但缺乏 Ly-1/CD5 抗原。Kasaian 等<sup>[2]</sup>最近报道有一类人 CD5<sup>+</sup>B 细胞也能产生 IgM 型多反应性抗体,推测它们可能相应于小鼠 B-1b 细胞。但迄今尚未见到这类细胞分泌的多反应性抗体可变区序列方面的报道。

我们实验室在用体外免疫的人淋巴细胞制作杂交瘤时,发现相当数量的杂交瘤单克隆分泌多反应性抗体。FACS 分析表明 CD5<sup>+</sup>B 细胞在培养过程中始终占极少数,未见增殖<sup>[3]</sup>。因此这类细胞可能不是 CD5<sup>+</sup>B 细胞。我们用逆转录 PCR(RT-PCR)法克隆了其中一株杂交瘤细胞(104-A6)分泌的 IgM 型多反应性抗体重链可变区基因,并测定了序列。

用盐酸胍-酚-氯仿一步法抽提 104-A6 细胞株的总 RNA。10 μg 总 RNA 在 50 μl 反应体积中以引物 C<sub>μ1</sub>(5'GAGGATCCGGGTGCT-GCTGATG3')合成 cDNA。PCR 反应体积 100 μl,含 cDNA 1 μl,引物 C<sub>μ2</sub>(5'CTGGA-TCCGA CGGGGAATTCTCAC3')和 5'端引物(5'AGGT(C/G) (A/C)A(A/G)CTGCAG(C/G) AGTC(A/T) GG3')各 50 pmol, 10 × PCR

缓冲液 10 μl, 5mmol/L dNTPs 4 μl, Taq DNA 聚合酶 5U。93°C, 1min; 50°C, 1.5min; 72°C, 1min 扩增 35 个循环。所得约 450bp 的 PCR 产物(见图 1)经 PstI, EcoRI 双酶切,低熔点胶电泳纯化后克隆至载体 M13 mp18/19。



**图 1** 抗体重链可变区基因 PCR 扩增产物的 1%琼脂糖凝胶电泳图谱  
1. PCR 产物; 2. λ/HindIII 片段

用末端终止法测定了 6 个独立克隆的序列。结果(见表 1)表明,编码这个多反应性抗体重链可变区的 V<sub>H</sub>, D, J<sub>H</sub> 片段分别与胚系序列 V<sub>H</sub>4.18, DXP4, J<sub>H</sub>6 完全同源。迄今文献中尚未见到组成人抗体重链可变区的三个片段(V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>)都与胚系序列完全同源的报道。较长的 NDN 区(37bp)可能与抗体的多反应性有关。V<sub>H</sub>4.18 是 V<sub>H</sub>4 家族的成员。这一家族主要编码 CD5<sup>+</sup>B 细胞分泌的自身抗体。有文献报道 V<sub>H</sub>4.18 编码 CD5<sup>+</sup>B 细胞产生的类风

\* 国家自然科学基金资助项目。  
收稿日期: 1992-08-24 修回日期: 1992-11-09

表 1 抗体重链 可变区基因及各片段的序列

V <sub>H</sub>	5' PCR引物 GGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTG TCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGTATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTACAACCC GTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA AGCTGAGCTCTGTGACCGCCGACACACGGCTGTGTATTACTGTGGAGA 297
N	<u>CATC</u> 301
D	<u>ATTACGATTTTGGAGTGGTATTATAC</u> 329
N	<u>GGCGC</u> 334
J <sub>H</sub>	<u>ACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3'</u> 387

下面划线部分标出三个超变区 (CDR), CDR3 包括 N<sub>1</sub>D<sub>1</sub>N 片段及 J<sub>H</sub> 片段的一部分。

湿因子(自身抗体)的 V<sub>H</sub> 片段。这些结果说明产生克隆 104-A6 的 B 细胞和 CD5<sup>+</sup>B 细胞有共同的特点。结合 FACS 分析结果,这类细胞很可能代表第三种人 B 细胞世系,相应于小鼠 B-1b 细胞。我们将进一步测定其它细胞株分泌的多反应性抗体可变区基因序列,并研究这类细胞在人 B 细胞库中的分布情况。

development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 3320

2 Kasaian MT, Ikematsu H, Casali P. Identification and analysis of a novel human surface CD5<sup>+</sup>B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J Immunol*, 1992; 148: 2690

3 季永铺,叶敏,孙佩芳. 体外诱发抗体生成过程中淋巴细胞的变化. *实验生物学报*, 1991; 24(4): 333

### 参 考 文 献

1 Kantor A B, Stall A M, Adam S *et al.* Differential

## 人白血病抑制因子基因 cDNA 的克隆及分析

涂 强 王永俊 李文 谢宝树 朱元晓<sup>1)</sup> 阎玉河<sup>2)</sup> 余竞源 兰 兰 林万明

(空军总医院临床分子生物学研究中心,北京 100036)

**关键词** 人,白血病抑制因子,基因克隆

白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 是 80 年代初发现的一种新的细胞因子。它能不可逆地抑制白血病细胞增殖,并诱导其分化<sup>[1]</sup>,同时它还能在没有明显毒副作用的情况下在体内或体外直接刺激巨核血小板系统生成,增加外周血血小板数量,并协同其

他因子促进正常造血<sup>[2]</sup>。因此,它在白血病、血小板减少症以及其他造血系统低下病症的治疗中有广阔的应用前景。目前国外还开展了 LIF

1) 军事医学科学院基础医学研究所;

2) 河南省农业科学院畜牧兽医研究所。

收稿日期: 1992-09-24 修回日期: 1992-11-18