

# 牛胚系基因中两种 JH 和 C $\mu$ 抗体基因的克隆与分析\*

李 敏 陈丽梅 林爱星 杨兴元 安晓荣\*\* 陈永福

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

**摘要** 根据 NCBI GenBank™ 中登录的 2 个牛抗体重链可变区 J 基因(JH) (序列号为 AY158087, AY149283) 的序列不同之处设计 PCR 引物, 能从同一个体的 Holstein 牛基因组 DNA 中扩增得到与以上 2 个基因分别相同的序列, 证明这 2 个 JH 基因的差异不是由于牛个体或品种不同引起的. 提取牛脾脏总 RNA, RT-PCR 扩增 IgM cDNA, 测序结果显示: 序列号为 AY149283 的 JH 基因中第六外显子 JH6 是一个功能基因, 它可以编码牛 IgM 的部分 CDR3 区和完整的 FR4 区, 从 2 种 IgM cDNA 克隆的测序结果可以看出, 其恒定区序列分别与序列号为 U63637 和 AY230207 的 2 种抗体重链恒定区  $\mu$  基因(C $\mu$ ) cDNA 序列相同. PCR 扩增 JH-C $\mu$  序列, 测序结果表明: 序列号为 AY158087 的 JH 基因是同以上 2 种 C $\mu$  基因分别串连在一起的 (序列号分别为 AY230207 和 U63637). 以上结果证明: 序列号为 U63637 和 AY230207 的 2 个 C $\mu$  基因分别与 AY149283 的 JH 基因串联在一起, 都能够参与牛 IgM 的产生, 它们与 AY158087 的 JH 基因共同存在于同一个体 Holstein 牛胚系基因中.

**关键词** Holstein 牛, 胚系基因, 抗体, 抗体重链恒定区  $\mu$  基因 (C $\mu$ ), 抗体重链可变区 J 基因 (JH), 重组信号序列 (RSS)

学科分类号 Q951.3, S823

机体必须针对不同抗原产生特异性免疫球蛋白 (Ig) 来进行免疫应答. 胚系基因中多个 V、D、J 基因片段的的存在是 Ig 多样性产生的一个重要原因<sup>[1]</sup>. 在所有脊椎动物中, Ig 的产生过程和机制是基本一致的, 但不同动物的抗体胚系基因数目却显著不同<sup>[2]</sup>. 人和小鼠中, 大量 V、D、J 基因的存在产生了抗原结合位点的多样性<sup>[3]</sup>, 然而鸡<sup>[4]</sup>、兔<sup>[5]</sup>、猪<sup>[6]</sup>、羊<sup>[7]</sup>和牛<sup>[8-12]</sup>等动物中其数目却相对较少. 在牛 Ig 的形成过程中, 倾向于只使用同一个基因家族的 VH 基因<sup>[8-10]</sup>. 虽然 CDR3 区的多样性也是由多个 DH 基因编码的, 但目前鉴定出来的只有 3 个 DH 基因<sup>[13]</sup>. 除此之外, 抗体重链可变区 J 基因(JH)基因的数目和序列也很关键. 据报道: 人和兔都有 6 个 JH 功能基因<sup>[4, 15]</sup>, 小鼠有 4 个<sup>[16]</sup>, 猪只有 1 个<sup>[17]</sup>. Zhao 等<sup>[12]</sup>认为牛与羊等反刍动物相似, 都有 4 个假基因, 2 个真基因. 目前牛胚系基因中 VH (VL)、DH、VJ、C $\lambda$ 、C $\kappa$  的具体数目及序列都是未知的, 但对其抗体重链恒定区基因 (IGHC) 已比较清楚, 例如: 牛有 3 个  $\gamma$  基因<sup>[18]</sup>,  $\alpha$ 、 $\sigma$ 、 $\varepsilon$ 、 $\mu$  基因似乎都以单拷贝形式存在<sup>[11, 18]</sup>, 但是有研究者认为牛胚系基因中还有一个与抗体重链区  $\mu$  基因 (C $\mu$ ) 相似的基因 (IGHML)<sup>[19, 20]</sup>, 并将其定位于 11q23 上<sup>[20]</sup>.

NCBI GenBank™ 上登录了 2 种牛的 JH 序列

(序列号为 AY158087, AY149283), 经 NCBI 中 BLAST 程序分析发现它们相应区段同源率为 93%~96%, 有研究者认为这 2 种基因的差异可能是由于牛个体或品种不同引起的<sup>[21]</sup>. 为了对这一问题做进一步研究, 我们根据以上 2 个序列不同之处设计 PCR 引物, 扩增并测序后发现这 2 个基因存在于同一个体的牛基因组内. 提取牛脾脏总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 测序结果证实牛 IgM cDNA 恒定区基因 (C $\mu$ ) 也有 2 种 (序列号分别为 AY230207, U63637). PCR 扩增牛 JH-C $\mu$  基因, 测序结果表明: 序列号为 U63637 和 AY230207 的 2 个 C $\mu$  基因是与序列号为 AY149283 JH 基因分别串联在一起的. 本研究结果初步证明: 同一个体 Holstein 牛胚系基因中有 2 种 C $\mu$  基因和 2 种 JH 基因, 它们都能够参与牛 IgM 的产生.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Holstein 成年牛肝脏及脾脏均采自屠宰场. pMD18T 载体连接试剂盒, 聚合酶 Probest 购自大

\*国家高技术“863”计划资助项目(2002AA206311).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-62731594-12, E-mail: xra@cau.edu.cn

收稿日期: 2005-04-06, 接受日期: 2005-06-28

连 TaKaRa 公司; TRIzol 试剂, M-MLV 反转录酶及 RNase 抑制剂购自 Promega 公司; DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细菌购自北京天为时代公司; 分子质量标准  $\lambda$ EcoR I + Hind III 及  $\lambda$ Hind III DNA Marker 购自华美生物工程公司; 引物的合成及测序工作均由北京三博远志公司和上海博亚公司完成; 其他试剂均为国产分析纯试剂.

## 1.2 方法

**1.2.1** 牛基因组 DNA 的提取. Holstein 牛肝脏基因组 DNA 提取按常规方法进行<sup>[21]</sup>.

**1.2.2** 2 个 JH 基因片段的克隆. 比较 NCBI GenBank™ 中登录的 2 个牛 JH 序列(序列号为 AY158087, AY149283), 发现它们相应区段的同源率为 93%~96%. 根据其序列不同之处设计 2 对特异性引物 J1s (ACAGGTGCTTGTCGGTTGG), J1as (GCTGCAGGTGGTCAGTCC) 和 J2s (GCAGGTGCTTGTTGGGTTGG), J2as (GCTGCAGGTGGTCAGTCC), 以同一个体牛的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增. 从琼脂糖凝胶中回收目的片段, 与 pMD18T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆进行测序.

**1.2.3** C $\mu$  基因的 RT-PCR 扩增.

按 TRIzol 试剂说明书从 Holstein 牛新鲜脾脏中提取总 RNA. cDNA 第一条链的合成以 Oligo(dT) 为下游引物按 Promega M-MLV 反转录酶说明书进行. 反应体系及条件如下: 2.5  $\mu$ l 总 RNA, Oligo(dT) 1  $\mu$ l, 双蒸水 16.5  $\mu$ l, 70 $^{\circ}$ C 作用 5 min, 冰上迅速制冷, 然后快速加入 RNase 抑制剂 0.8  $\mu$ l (32U), dNTP (25  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ l, 5 $\times$ 缓冲液 5  $\mu$ l, M-MLV 反转录酶 1  $\mu$ l, 总反应体系为 25  $\mu$ l. 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h.

根据牛 VH 5' 端引导肽区域的保守序列及 C $\mu$  的 cDNA 序列设计引物 R1s (GTGGACCCTCCT-

CTTTGTGCT) 和 R1as (CACGGACGGCGGTTTC-AT), 以牛脾脏 cDNA 为模板进行 PCR 扩增.

根据牛 JH (序列号为 AY149283) 中的第 6 外显子 (JH6) 和 C $\mu$  的 cDNA 序列再设计引物 R2s (CGAGGGCTCAGGGTCACCGTCT) 和 R2as (CGGCGGTTTCATGGCGACG), 以上述 RT-PCR 产物为模板做巢式 PCR. 从琼脂糖凝胶中回收目的片段, 连接在载体 pMD18T 上转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆进行测序.

**1.2.4** C $\mu$  基因的克隆. 根据 2 个 C $\mu$  基因 (序列号为 U63637 和 AY230207) 的序列不同之处, 设计 2 对特异性引物 C1s (CCCGCTGACCTCTTGTCCTTC), C1as (CGAGTGTGTGAGCCTGGATGTGT) 和 C2s (CCCGCTAACCCCTTGTCCTTC), C2as (CGAGCGTGTGATCCTGGGTATGT), 以同一个体牛基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增. PCR 产物回收后连接在载体 pMD18T 上转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆进行测序.

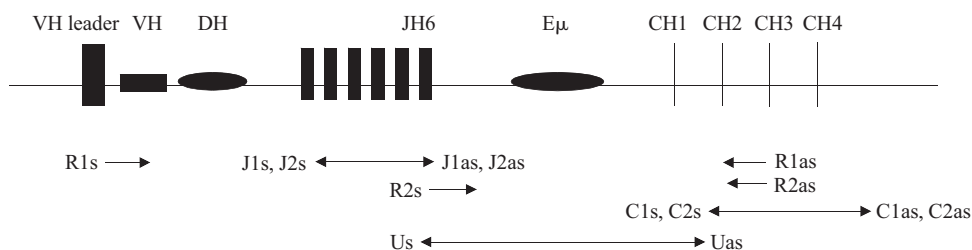
**1.2.5** JH-C $\mu$  基因的克隆. 依据 JH 序列 (序列号为 AY149283) 设计上游引物 Us (CGA GGG CTC AGG GTC ACC GTC T), C $\mu$  基因 (序列号为 U63637) 设计下游引物 Uas (CAC GAT GGG GGA CAG CAC TTC T), 以同一个体牛的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增. 从琼脂糖凝胶中回收目的片段, 连接在载体 pMD18T 上转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆进行测序.

**1.2.6** 数据的统计与分析. DNA 和氨基酸序列的比较和分析使用 BioEdit 软件和 NCBI 中的 BLAST 程序.

## 2 结 果

### 2.1 两种牛 JH 片段的扩增结果与分析

根据 NCBI GenBank™ 中登录的 2 种牛 JH 序列 (序列号为 AY158087, AY149283) 不同之处设计特异性引物 (图 1), 能从同一个体牛的基因组 DNA

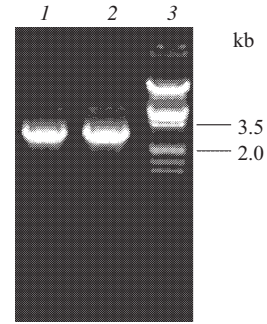


**Fig.1** The strategy used for RT-PCR and Nest-PCR amplifications of the bovine C $\mu$  cDNA and PCR amplifications of the bovine JH, C $\mu$ , JH-C $\mu$  genes

Primers R1s and R1as, R2s and R2as are used to amplify the C $\mu$  cDNA; primers J1s, J1as and J2s, J2as are used to amplify the two JH genes; primers C1s, C1as and C2s, C2as are used to amplify the two C $\mu$  genes; primers Us and Uas are used to amplify the JH-C $\mu$  gene.

中扩增出与两者分别相同的基因片段(命名为 SE1, SE2), 其长度基本相同(2.8 kb 和 2.83 kb) (图 2), 测序结果表明: SE1 是 Zhao 等<sup>[12]</sup>已经证明的序列号为 AY158087 的基因片段, SE2 是 Hosseini 等登录的序列号为 AY149283 的基因片段. 据外显子两侧的重组信号序列 (RSS) 和拼接位点判断, 两者都含有 6 个外显子, 在序列号为 AY158087 的 JH 序列中, JH1 和 JH2 外显子被证明是有功能的<sup>[12]</sup>, 而在序列号为 AY149283 的 JH 基因中只有最后一个外显子即 JH6 可能是有功能的, 其他均为假基因 (图 3, 4 和表 1). 各外显子编码的氨基酸同源性分析结果表明, 外显子 JH-PS1, JH-PS2, JH-PS3, JH-PS5 编码的氨基酸之间同源性较高, 与真基因相应的外显子编码的氨基酸序列之间则差异较大 (图 4). 这证明序列号为 AY158087 和 AY149283 的

2 个 JH 基因存在于同一个体牛的基因组 DNA 中, 它们编码不同的氨基酸序列, 其差异不是因为牛的个体或品种不同, 而可能是 2 个独立基因.



**Fig.2 The PCR products of two bovine JH genes**  
1: PCR products of SE1 segment; 2: PCR products of SE2 segment; 3:  $\lambda$ /EcoR I +Hind III DNA marker.

```

1      gcagatcaggagacagacagacactcaaatcccagaccaggggctgaggcagacaggtgctgtcggttg
71     ggggcaagtgtcttcaggaagacagacttgagctcctggggctccctggggaccctgggtgGGTTTC
141    CGTgctcccagcacaggccagccCACTGTGacTATGCAGACTTCCATCTCTGGAGCCAGGCTGCCCTG
                                     JH-PS1
211    GGACCGTCTCCTCAggtgaatctgggtctagtgtccaagtcaggggacagcaggacttgggtggactt
281    gggatgggagtcaggccagcaaggagtagggtgTGTTTTGTGgaaaagaattaacagaagagaAGCC
351    ATGcTGCTGGGACTTGGATCTCTGGGGCCAGCGCACCCCGGTACCGTGTCTTGGggagtgctccctt
                                     JH-PS2
421    gcagcactgectgggctcgggcagTccctggggTccgtccagccccaccgtgacctgagcaaggcagg
491    gtctcgttccaacggggtcgcgcccttggatctgcccggagccccctggagataagccagctgagccctgag
561    gggaggacagagctgactgggcgggagaaaggtgggcagagctgacggggcagggtctgtgctgagtag
631    cagcggggaggccccgggactgacctccccagGGTTCATGTcttggggcagccgggactgctGCCCTC
701    AGcAATGCTTTGACTCCTGGGGCCAGCGCACCCCATCTCCGCCTCCTCAggtgagacggctctctgccc
                                     JH-PS3
771    cgctcgtcttgggcccgggaagcgctccaggggcccccttggcttggggcagaccctcctggctccct
841    ggggatctcgtctgagccgctttgctctctgcccctgttaggtggcgcctctgctgtggaacgcgg
911    ccaggcagagtgggctctgtgcttggggcctggcttgggtggggcagaggacccagcccttgGGT
981    TTTGCacagccctagcggggcccatggCACTGTGaCTATTGACAAGTGGGGCCAGGAATCAAACA
                                     JH-PS4
1051   CCGTCTCCTCAggtgagctcacaagccctctctcctcactctgtctcagggttttggtgaccttggg
1121   gaaaatcaggggtgtcgggtctagaggccctggggcggtgggatctgagacagcaggagaccaggggcc
1191   caggcttacagcagcaggagcagaggtccaggcaccctctcctcctgggctctgtagcagggtcttc
1261   tctggggcctcagccaccttggctctggactccaaggtccagctgtgtgaggtggtccggaggcc
1331   tcagccggccacaGCTCTTGCCtggggtcacagcatcattgtCACTGTGtaaCAACTGGCTCAAGCACT
1401   GGGTCAAGCAAGCCTGGGCACTGTCTGCTCAgctgagccctcaccacccactcactgaccctggggag
                                     JH-PS5
1471   acctggagcgtcagagatccagaggcatctggaggtcaagaaggagctgggagaggttctggttaa
1541   acagcagagccagaccctccctgccccaaagacaccagatgtgggtacaaggcgctccttcggtgggt
1611   ctggctcctcacttgagcaggaccagggtctccgtcactttctggggcagcagctgctcagactgg
1681   acttaggagctgtggttcatggtccgcagccagccagcagtggtctggcctctgtgggcagaaatg
1751   ggacatagtgctctggcacagttaggtgggtggggccagcagaggtcactgacaagcacttggacc
1821   aatggtttccctgtggccctggagatgggtggggccagcgccctgagcctctgctcaggctcccgga
1891   GGTTTTGTtgggcagagctggagatatcacCACTGTGttTACTATGGTATAGACGCCTGGGGCCGAGGG
1961   CTCAGGGTCACCGTCTCCTCAggttaagacagccatcc
                                     JH6
    
```

**Fig.3 The sequence of bovine another germline JH gene (accession No. AY149283)**  
The potential RSS sites are underlined; the pseudo-JH genes, JH-PS1, JH-PS2, JH-PS3, JH-PS4, JH-PS5, JH6 are indicated by the dots.

AY158087	JH-PS1	YADFHLGQAALGTVSS
SE2	JH-PS2	.....WS.....
AY158087	JH-PS2	CWDMDLWGQRTPTVTVSL
SE2	JH-PS2	...L.....
AY158087	JH-PS3	NAFDSWGQRAPVSISS
SE2	JH-PS3	.....T.I.A..
AY158087	JH1	YVDAWGQGLLVTVSS
SE2	JH-PS4	.STTGA . ESKTPSP
AY158087	JH-PS4	QLAQUALGSGSLGTVCS
SE2	JH-PS5	.....
AY158087	JH2	YYSIYVCGRGIEVTVSS
SE2	JH6	.GTDAW...LR....

**Fig.4 The alignment of deduced amino acid of JH segments: SE2 and JH gene (Accession number AY158087)**

The dots indicate identical amino acid.

**Table 1 RSS and spacer for the bovine SE2 and JH gene (Accession number AY158087)**

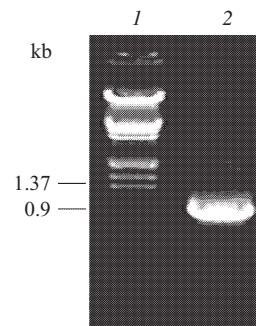
SE2	Nonamer	Spacer	Heptamer	AY158087	Nonamer	Spacer	Heptamer
JH PS1	GGTTTCCGT	22	CACTGTG	JH PS1	GGTTTCCGT	21	CACTGTG
JH PS2	TGTTTTTGT	22	AGCCATG	JH PS2	TGTTTTTGT	22	AGCCATG
JH PS3	GGTTCATGT	23	CCCTCAG	JH PS3	GGTTCATGT	23	CCCTCAG
JH PS4	GGGTTTTGC	23	CACTGTG	JH 1	GGTTTTTG C	23	CACTGTG
JH PS5	GCTCTTGCC	20	CACTGTG	JH PS4	GAGCTCTTG	22	CACCGTG
JH6	GGTTTTTGT	22	CACTGTG	JH2	GGTTTTTG T	22	CACTGTG

**2.2 2种牛 C $\mu$  的扩增结果及分析**

将 Berens 等<sup>[8]</sup>发表的牛 C $\mu$  cDNA 序列与本实验扩增的 SE2 JH 基因序列比较,发现其中有 3 个 cDNA 克隆 (F52M、F61M、A34M 均未登录 NCBI GenBank<sup>TM</sup>) 中的 JH 基因与 SE2 中的 JH6 外显子相同,说明 JH6 可能参与了 Ig 的合成.根据牛 VH 5'端引导肽区域的保守序列及 C $\mu$  的 cDNA 序列设计引物,从牛脾脏 RNA 反转录获得 IgM 总 cDNA.再分别以 JH6 和 C $\mu$  cDNA 序列为上下游引物(图 1),以 IgM 总 cDNA 为模板做巢式 PCR,得到长为 1.0 kb 目的片段(图 5).将 PCR 产物连至克隆载体后,测序结果证明,JH6 是一个功能基因,它可以编码牛 IgM cDNA 的部分第三互补决定区 (CDR3) 和完整的第四框架区 (FR4).

随机挑选多个 IgM cDNA 克隆进行测序,结果证明不同克隆的恒定区序列表现为两种.其中一种克隆(p12)恒定区编码的氨基酸与序列号为 U63637

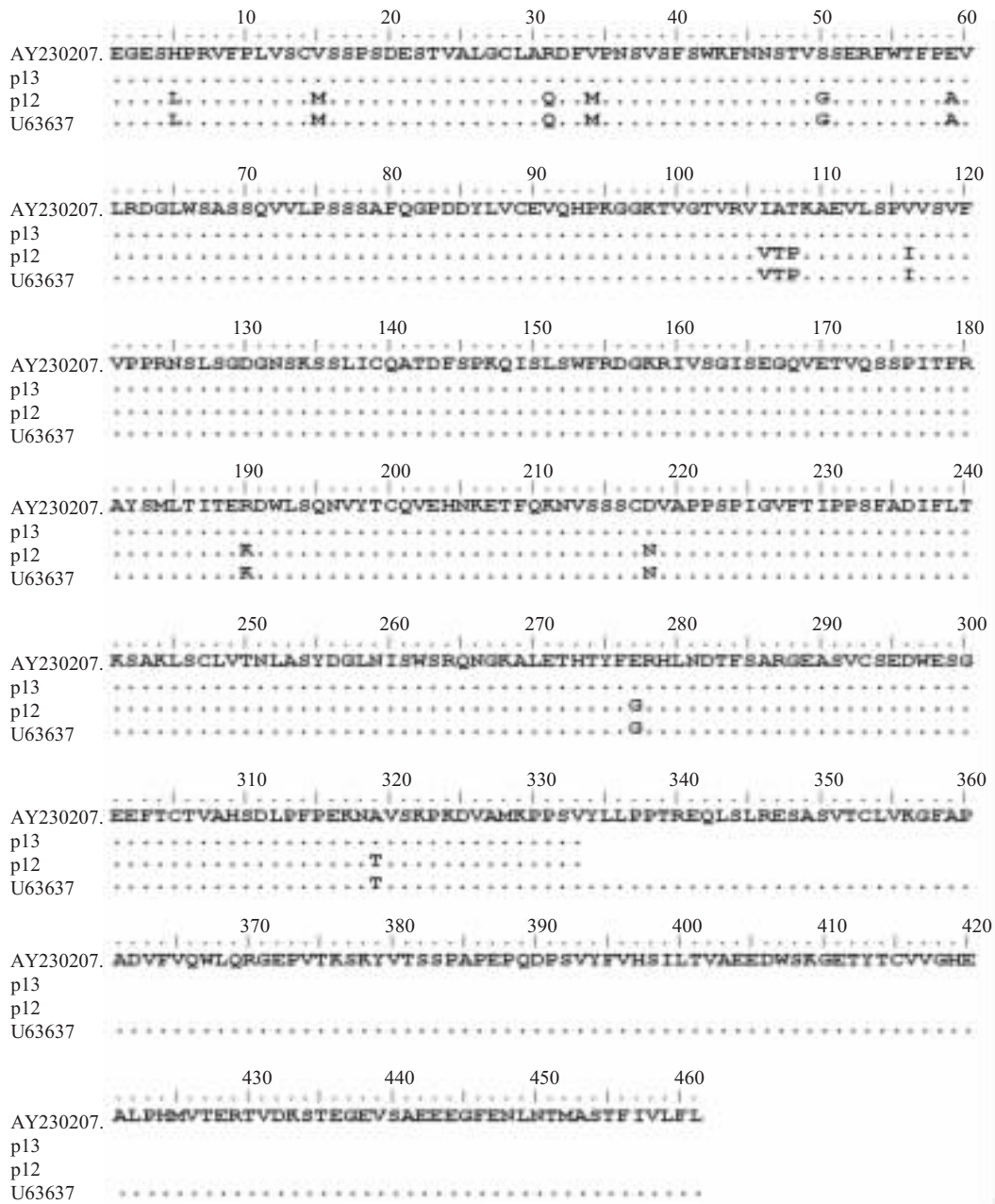
的 C $\mu$  cDNA 编码的氨基酸相同,另一种克隆(p13)则与序列号为 AY230207 的 C $\mu$  cDNA 编码的氨基酸相同,2 种 C $\mu$  基因编码的氨基酸在 CH1 部分(即 1~108 个氨基酸)差异显著,其他位置相差不多(图 6).



**Fig.5 RT-PCR results of bovine IgM cDNA**

1:  $\lambda$ EcoR I +Hind III DNA marker; 2: Nest-PCR products of bovine IgM cDNA.





**Fig.6** Alignment of the deduced amino acid sequences of four bovine C $\mu$  genes: the clones p12, p13 and the two C $\mu$  genes presented are available from GenBank™ accession numbers AY230207 and U63637

The dashes indicate identical amino acid.

根据 2 个 C $\mu$  基因 (序列号为 U63637 和 AY230207) 序列不同之处设计 2 对引物, 以同一头牛基因组 DNA 为模板, PCR 扩增均能得到 2.2 kb 大小的 DNA 片段 (分别命名为 SE3, SE4) (图 1, 7), 测序结果显示这 2 个 DNA 片段分别与序列号为 U63637 和 AY230207 的 2 个 C $\mu$  基因相同. 以上实验结果证明: 序列号为 U63637 和 AY230207 的 2 个 C $\mu$  基因存在于同一个体牛抗体胚系基因中,

并都能够编码产生牛 IgM.

### 2.3 JH-C $\mu$ 基因的克隆与分析

依据 JH 序列 (序列号为 AY149283) 设计特异性上游引物 Us, 2 个 C $\mu$  基因 (序列号为 AY23020 和 U63637) 序列相同之处设计特异性下游引物 Uas, 以同一个体牛基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增 (图 1), 获得 5.0 kb DNA 片段 (图 8). 挑选不同的克隆进行测序, 结果显示: 序列号为

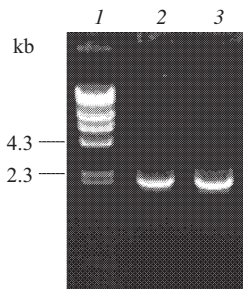


Fig.7 PCR results of two bovine Cμ genes

1:  $\lambda$  Hind III DNA marker; 2: PCR products of SE3 segment; 3: PCR products of SE4 segment.

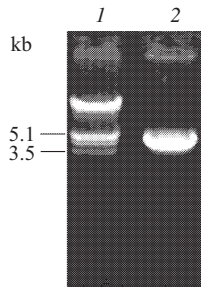


Fig.8 PCR results of bovine JH-Cμ gene

1:  $\lambda$  EcoR I +Hind III DNA marker; 2: PCR products of bovine JH-Cμ gene.

AY149283的 JH 基因在牛胚系基因中既可以同序列号为 AY230207 的 C $\mu$  基因也可以和序列号为 U63637 的 C $\mu$  基因串联在一起(图 9). 这为本实验结果中 2 种 IgM cDNA 克隆恒定区序列分别与以上 2 种 C $\mu$  基因 cDNA 序列相同提供了有力依据. 总结以上实验结果认为, 牛基因组中有 3 种 JH-C $\mu$  基因组合(图 9): 第一种是 Zhao 等<sup>[12]</sup>发表的序列号为 AY158087 的 JH 基因和序列号为 AY230207 的 C $\mu$  基因串联在一起; 第二种组合是序列号为 AY149283 的 JH 基因和序列号为 AY230207 的 C $\mu$  基因串联在一起; 第三种是序列号为 AY149283 的 JH 基因和序列号为 U63637 的 C $\mu$  基因串联在一

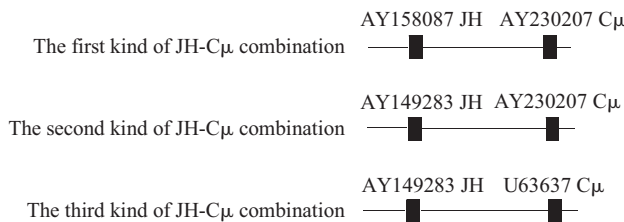


Fig.9 Three kinds of JH-Cμ gene combinations

The first one was proved by Zhao *et al*; the second and third kinds of combinations are the results proved by our experiment.

起; 三者共同存在于同一个体 Holstein 牛胚系基因中, 都能够参与牛 IgM 的产生.

### 3 讨 论

本试验从同一个体 Holstein 牛基因组 DNA 中扩增得到与序列号为 AY158087, AY149283 的 JH 基因分别相同的两个序列, 它们都含有 6 个外显子, 但其编码的氨基酸各不相同(图 4 和表 1). 在 NCBI GenBank™ 上登录的牛重链可变区(VH) cDNA 中, 全部只表达序列号为 AY158087 JH 基因中的 JH1 外显子, Zhao 等<sup>[12]</sup>通过 RT-PCR 证明其中的 JH2 外显子也是有功能的, 但处于低水平表达状态. 分析 Berens 等<sup>[8]</sup>发表的牛 C $\mu$  cDNA 序列, 发现其中克隆 F52M, F61M, A34M (均未登录 NCBI GenBank™) 中的 JH 序列与 JH6 外显子完全相同, 说明 JH6 可能是有功能的. 本实验从 Holstein 牛脾脏 RNA 中 RT-PCR 扩增其 C $\mu$  cDNA, 测序结果证实, 序列号为 AY149283 JH 序列中的 JH6 外显子可以编码 IgM 的部分 CDR3 区和完整的 FR4 区, 是一个功能基因, NCBI GenBank™ 上登录的 VH cDNA 中没有 JH6 表达, 可能是因为它与 JH2 一样处于低表达水平状态. 以上结果证明, 在同一个体 Holstein 牛抗体胚系基因中有 2 种 JH 基因, 它们都能够参与牛 IgM 的形成. 比较 JH2, JH6 外显子还发现, 两者的 RSS 序列及相隔碱基均相同, 所编码的氨基酸序列中也都含有 Gly Arg Gly 结构(图 4 和表 1), Kabat 等<sup>[9]</sup>认为, 功能性 JH 基因编码的氨基酸中 2 个 Gly 之间通常出现的是 Gln, Pro 或 Ala, 而不是 Arg, 这也许是两者表达水平均不高的原因之一<sup>[12]</sup>.

通过 RT-PCR 扩增 C $\mu$  cDNA 我们发现 2 种不同的 cDNA 克隆, 其中一种克隆与序列号为 U63637 的 C $\mu$  cDNA 相同, 另一种克隆与序列号为 AY230207 的 C $\mu$  cDNA 相同, 两者所编码的氨基酸在 CH1 部分差异较大(图 7). PCR 扩增牛基因组 DNA, 测序结果则显示, 序列号为 U63637 和 AY230207 的 2 个 C $\mu$  基因与序列号为 AY149283 JH 基因分别串联在一起(图 9), 共同存在于同一个体牛基因组中. Zhao 等证明序列号为 AY230207 的 C $\mu$  序列与序列号为 AY158087 的 JH 基因及其他已知 IGHC 基因一起组成一个大的基因簇, 定位于 21q23~q24<sup>[12,22]</sup>; Mousavi 等<sup>[19]</sup>的 DNA 印迹结果认为在牛的基因组 DNA 中应该有 2 个 C $\mu$  基因; Tobin-Janzen 等<sup>[20]</sup>也认为牛有 2 个 C $\mu$  基因, 他们

将 IGHML 基因(我们认为或许就是序列号为 U63637 的 C $\mu$  基因)定位于 11q23.

在研究人抗体胚系基因的进化过程中,发现抗体基因似乎是由一个原始基因通过基因的复制,重新整合,删除或由 IVS 介导的转移等方式进化而来的,因此 Ig 超家族中的各成员无论在核酸基础还是蛋白质水平以及功能都是紧密相关和相似的<sup>[23,24]</sup>.近年来 Zhao 等<sup>[11]</sup>克隆了牛的 C $\sigma$  基因,分析发现,IgD CH1 与 IgM CH1 部分完全相同,他们认为这可能是 C $\mu$  基因的部分序列在反转录过程中重新整合到基因组中去的<sup>[12]</sup>.本实验结果中的这两种 JH, C $\mu$  基因及其组合可能也是由某个部位的抗体基因在进化过程中通过某种方式形成的,这也许为牛抗体多样性的产生提供了新的来源.

总之,本实验结果证明:序列号为 U63637 和 AY230207 的 2 个 C $\mu$  基因分别与序列号为 AY149283 的 JH 基因串联在一起,它们与序列号为 AY158087 的 JH 基因都存在于同一个体 Holstein 牛胚系基因中,但它们可能独立存在于另一条染色体上,其 5' 端是否也有相应的 VH, DH 基因还不清楚,如果没有 VH, DH 基因,它们的表达可能是通过染色体间 DNA 重组来实现的<sup>[25,26]</sup>,这可能也是其表达水平较低的一个原因,以上推论有待进一步证明.

### 参 考 文 献

- 1 Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 1983, **302** (5909): 575-581
- 2 Kaushik A, Shojaei F, Saini S S. Novel insight into antibody diversification from cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, **87** (3-4): 347-350
- 3 Kabat E A, Wu T T, Perry H M, *et al.* Sequence of Proteins of Immunological Interest. 5th. Bethesda, MD, U S: Government Printing Office, 1991. 167-173
- 4 Reynaud C A, Dahan A, Anquez V, *et al.* Somatic hyper conversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell*, 1989, **59** (9): 171-183
- 5 Becker R S, Knight K L. Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell*, 1990, **63** (5): 987-997
- 6 Sun J, Kacs Kovics I, Brown W R, *et al.* Expressed swine VH genes belong to a small VH gene family homologous to human VH III. *J Immunol*, 1994, **153** (12): 5618-5627
- 7 Dufour V, Malinge S, Nau F. The sheep Ig variable region repertoire consist of a single VH family. *J Immunol*. 1996, **156** (6): 2163-2170
- 8 Berens S J, Wylie D E, Lopez O J. Use of a single VH family and long CDR3s in the variable region of cattle Ig heavy chains. *Int Immunol*, 1997, **9** (1): 189-199
- 9 Saini S S, Hein W R, Kaushik A. A single predominantly expressed polymorphic immunoglobulin VH gene family, related to mammalian group, I, clan II, is identified in cattle. *Mol Immunol*, 1997, **34** (9): 641-651
- 10 Sinclair M C, Gilchrist J, Aitken R. Bovine IgG repertoire is dominated by the single diversified VH gene family. *J Immunol*, 1997, **159** (8): 3883-3889
- 11 Zhao Y F, Kacs Kovics I, Artiodactyl Q P, *et al.* IgD: The missing link. *Immunology*, 2002, **169** (8): 4408-4416
- 12 Zhao Y F, Kacs Kovics I, Rabbani H, *et al.* Physical mapping of the bovine immunoglobulin heavy chain constant region gene locus. *J Biol Chem*, 2003, **278** (37): 35024-35032
- 13 Farbod S, Saini S S, Kaushik A K. Unusually long germline DH genes contribute to large sized CDR3H in bovine antibodies. *Mol Immunol*, 2003, **40** (1): 61-67
- 14 Ravetch J V, Siebenlist U, Korsmeyer S. Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell*, 1981, **27** (3): 583-591
- 15 Sakano H, Maki R, Kurosawa Y. Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain in genes. *Nature*, 1980, **286** (5774), 676-683
- 16 Butler J E, Sun J, Navarro P. The Swine Ig heavy chain locus has a single (JH) and no identifiable IgD. *Int Immunol*, 1996, **8** (12): 1897-1904
- 17 Becker R S, Zhai S K, Currier S J, *et al.* Ig VH DH and JH gene -line gene segments linked by overlapping cosmic clones of rabbit DNA. *J Immunol*, 1989, **142** (4): 1351-1355
- 18 Knight K L, Suter M, Becker R S. Genetic engineering of bovine Ig construction and characterization of Hapten-binding Bovine /Murine chimeric IgE, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 molecules. *J Immunol*, 1988, **140** (10): 3654-3659
- 19 Mousavi M, Rabbani H, Pilstrom L, *et al.* Characterization of the gene for the membrane and secretory form of the IgM heavy-chain constant region gene (C $\mu$ ) of the cow (*Bos Taurus*). *Immunology*, 1998, **19** (12): 581-588
- 20 Tobin -Janzen T C, Womack J E. Comparative mapping of IGHG1, IGHM FES, and FOS in domestic cattle. *Immunogenetics*, 1992, **36** (3): 157
- 21 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002. 467-471  
Sambrook J, Ruddle D W, Translated by Huang P T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. Beijing: Science Press, 2002. 467-471
- 22 Feng G U, Bhanu P, Chowdhary L. Assignment of the bovine immunoglobulin gamma heavy chain (IGHG) gene to chromosome 21q24 by in situ hybridization. *Heridas*, 1992, **117** (3): 237-240
- 23 Takahashi N, Ueda A S, Obata M, *et al.* Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family. *Cell*, 1982, **29** (2): 671-679
- 24 Williams A T, Barclay A N. The immunoglobulin superfamily domains for cell surface recognition. *Annu Rev Ontogeny Immunol*,

- 1988, 6 (3): 381~405
- 25 Gerstem R M, Frankel W N, Hsich C L, *et al.* Isotype switching of an immunoglobulin heavy chain transgene occurs by DNA recombination between different chromosomes. *Cell*, 1990, 63 (3): 537~548
- 26 Giusti A M, Manser T. Somatic generation of hybrid antibody H chain genes in transgenic mice via interchromosomal gene conversion. *J Exp Med*, 1994, 179 (1): 235~248

## Cloning and Characterization of Two JH and C $\mu$ Ig Genes in Bovine Germline Gene\*

LI Min, Chen Li-Mei, LIN Ai-Xing, YANG Xing-Yuan, AN Xiao Rong\*\*, CHEN Yong-Fu

(National Laboratory of Agro-Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** Using methods based upon the PCR, two DNA sequences which are identical to two JH genes (accession No. AY158087, AY149283) from one Holstein bovine genomic DNA have been cloned, the results demonstrate that all the two JH genes (accession No. AY158087, AY149283) are present in the same Holstein bovine genomic DNA. Two kinds of IgM cDNA was cloned from bovine spleen total RNA. Sequencing the cDNA clones show that the last exon of JH gene (accession No. AY149283) JH6 is a functional gene encoding part of CDR3 and whole FR4 region of bovine IgM. The sequences of two IgM cDNA clones indicate each constant region is identical to one of the two C $\mu$  genes (accession No. AY230207, U63637), there are greater diversities in the IgM CH1 domain than the other CH domains. PCR products of JH-C $\mu$  gene suggested that each C $\mu$  gene (accession No. AY230207, U63637) is in series with the same JH gene (accession No. AY149283) in the bovine germline genes, they are all functional genes in the process of bovine IgM generation.

**Key words** Holstein bovine, germline gene, immunoglobulin, immunoglobulin heavy chain constant region  $\mu$  gene (C $\mu$ ), immunoglobulin heavy chain joining region (JH), recombination signal sequence (RSS)

\*This work was supported by a grant from The State 863 High Technology R & D Project of China (2002AA206311).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-10-62731594-14, E-mail: xra@cau.edu.cn

Received: April 6, 2005 Accepted: June 28, 2005