

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00887

# 以绵羊 MHC 区段 BAC 克隆酶切片段为探针杂交筛选绵羊混合组织 cDNA 文库

杨小亮<sup>1,2</sup>, 白大章<sup>2</sup>, 邱巍<sup>2</sup>, 董慧芹<sup>2</sup>, 李大全<sup>1</sup>, 陈芳<sup>2</sup>, 马润林<sup>3</sup>, Hugh T Blair<sup>4</sup>, 高剑峰<sup>2</sup>

- 1 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003;
- 2 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003;
- 3 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;
- 4 梅西大学兽医、动物和生物医学科学研究所, 北帕默斯顿 4442, 新西兰

**摘要:** 在已知中国美利奴羊 MHC(Major histocompatibility complex)区段 BAC(Bacterial artificial chromosome)克隆序列信息和预测的基因注释前提下, 用位于中国美利奴羊基因组 BAC 文库 MHC 区段的 6 个 BAC 克隆酶切片段为探针, 以噬菌斑原位杂交筛选法筛选中国美利奴羊混合组织 cDNA 文库(库库杂交), 对分离到的 cDNA 阳性克隆进行全序列测定, 并与相应的已知序列信息和基因注释的 BAC 克隆比对以及在 NCBI Blastn 数据库中序列相似性检索, 旨在验证基因注释结果的准确性和对基因(序列)功能的初步分析。实验中, 经过两轮杂交共筛选出 27 个 cDNA 阳性克隆(序列), 并发现这些序列均可定位到相应的 BAC 克隆上, 且 25 条序列处在注释基因的外显子部分; 在 NCBI 数据库中经 Blastn 序列相似性检索发现, 23 条序列与牛基因的序列相似性最高, 且与免疫功能密切相关。

**关键词:** 绵羊 MHC; 细菌人工染色体(BAC); cDNA 文库; 噬菌斑原位杂交

## Screening of tissues pooled cDNA library using probes by restricted fragments of BAC positive clones of ovine MHC

YANG Xiao-Liang<sup>1,2</sup>, BAI Da-Zhang<sup>2</sup>, QIU Wei<sup>2</sup>, DONG Hui-Qin<sup>2</sup>, LI Da-Quan<sup>1</sup>, CHEN Fang<sup>2</sup>, MA Run-Lin<sup>3</sup>, Hugh T Blair<sup>4</sup>, GAO Jian-Feng<sup>2</sup>

1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
2. College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
3. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China;
4. Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences, Massey University, Palmerston North 4442, New Zealand

**Abstract:** Under the premise what we have known bacterial artificial chromosome(BAC)clone sequence information and gene annotation predicted in the Chinese Merino sheep major histocompatibility complex (MHC) region, the digested

收稿日期: 2011-11-16; 修回日期: 2012-03-05

基金项目: 科技部国际合作重大项目(编号: 2006DFB33750)和国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(编号: 2010CB530200)资助  
作者简介: 杨小亮, 博士研究生, 专业方向: 分子遗传与动物育种。Tel: 13519935403, E-mail: steven21309393@sina.com

通讯作者: 高剑峰, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: jianfengg@shzu.edu.cn

网络出版时间: 2012-5-22 02:47:38

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120522.1447.004.html>

fragments from 6 BAC clones that were located in the MHC region of the Chinese Merino sheep genome BAC library, which were used to screen the cDNA library using plaque *in situ* hybridization as probes. The full length of positive cDNA clones (sequences) isolated were completely sequenced, and the sequences obtained were aligned with the corresponding known sequence information and the BAC clones with gene annotation. Meanwhile, the sequence similarity was searched in NCBI Blastn database. This work aimed at verification of accuracy of the gene annotation results and initial analysis of gene (sequence) function. At last, 27 positive cDNA clones (sequences) in total were screened through two runs of hybridization. It was also found that these sequences could be positioned in the corresponding BAC clones, and 25 sequences were located in exon area of the annotated gene. It was verified that 23 sequences had the highest sequence similarity with those in the *Bos taurus* by searching against the NCBI Blastn database; moreover, the function of these sequences were closely relate to immunology.

**Keywords:** ovar-MHC; bacterial artificial chromosome (BAC); cDNA library; plaque *in situ* hybridization.

绵羊基因组主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) 又称绵羊白细胞抗原 (Ovine leukocyte antigen, OLA), 这是一个紧密连锁的免疫应答和调控基因簇区域, 且该区域基因与动物多种传染性疾病的抗性和易感性密切相关<sup>[1-3]</sup>。

研究显示, 绵羊MHC区段被定位于 20 号染色体的q15-q23 区域<sup>[4]</sup>, 但目前相对于人<sup>[5]</sup>、小鼠和牛等其它哺乳动物而言, 有关绵羊MHC的研究比较滞后<sup>[6]</sup>, 且主要集中在对 Class II 区的 DRB (主要是 DRB1 的第二外显子) 基因多态性及功能的研究上<sup>[7]</sup>。根据基于BAC克隆的绵羊MHC区段物理图谱<sup>[8]</sup>计算, 该区段含碱基数约 2.5 Mb。经预测, 此区段共有近 200 条基因, 如此庞大的基因信息想要得到一一验证, 那将是一项复杂而漫长的工程。近几年, 本实验室一直致力于中国美利奴羊MHC区段基因组成与结构的研究。目前已拥有中国美利奴羊混合组织 cDNA文库<sup>[9]</sup>、中国美利奴羊MHC区段BAC文库(克隆)、基于BAC克隆的绵羊MHC区段物理图谱<sup>[8,10]</sup>、绵羊MHC区段完整的DNA序列图等研究成果, 并率先完成了中国美利奴羊MHC区段序列测定和基因注释的预测<sup>[11]</sup>, 最近对该区段预测的 3 个新基因进行了验证和表达分析<sup>[12]</sup>。为了进一步有效且快速地通过实验验证注释的准确性和全面性, 本研究从位于MHC 3 个区段的 26 个BAC克隆中选择BAC55L9、BAC239C1、BAC346G21、BAC429P24、BAC304D17、BAC349I12 这 6 个克隆, 分别以它们的酶切片段作为探针, 采用噬菌斑原位杂交筛选法<sup>[13,14]</sup>对中国美利奴

羊混合组织cDNA文库进行筛选(我们称之为“库库杂交”), 并对杂交筛选得到的阳性cDNA克隆(序列)进行了一系列生物信息学分析, 以期对该区段的预测基因进行初步的验证和分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 中国美利奴羊 MHC 区段 BAC 文库(克隆)

中国美利奴羊基因组BAC 文库<sup>[15,16]</sup>, 由中国科学院遗传与发育生物学研究所与石河子大学共建, 本实验室参与构建。中国美利奴羊MHC区段BAC文库是把中国美利奴羊基因组BAC文库中的BAC克隆进行选择、测序、组装, 最终把绵羊MHC区段组装成了含 26 个BAC克隆的 3 个Contigs, 即MHC Class II、Class III、Class I。本研究中的 6 个克隆就选自这 26 个克隆之中。

#### 1.1.2 中国美利奴羊混合组织 cDNA 文库

中国美利奴羊混合组织cDNA文库由本实验室自行构建<sup>[9]</sup>。用采自新疆石河子市西部牧业公司屠宰场和新疆农垦科学院的 14 只不同性别、不同月龄、不同状态的中国美利奴羊心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肠淋巴结 5 种组织样品 140 份, 等量混合提取总RNA后, 分离并纯化mRNA, 反转录构建cDNA文库。该文库初级库容达到  $3.28 \times 10^5$  pfu, 扩增库滴度为  $4.405 \times 10^8$  pfu/mL, 重组率为 97.7%, 插入片段介于 0.5~2.5 kb之间, 平均大小 1.5 kb, 为绵羊表达

序列的分离奠定了分子基础。

### 1.1.3 药品及试剂

Agarose购自AMRESCO公司, 10 U/ $\mu$ L的限制性内切酶*Bsa*J、*Xho*、*Eco*R和Klenow fragment购自Fermentas公司, dNTP set购自QIAGEN公司, E.Z.N.A DNA Probe Purification Kit购自OMEGA bio-tek公司, 6000 Ci/mmol的Deoxycytidine 5'-triphosphate、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ 购自PerkinElmer公司, X-ray Film、显影液和定影液套装购自Kodak公司, Amersham Hybond-N<sup>+</sup>尼龙膜购自GE Healthcare公司。其他常用试剂均参照《分子克隆》配制<sup>[17]</sup>。

变性液 1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaOH; 中和液 0.5 mol/L Tris-Cl (pH7.4), 1.5 mol/L NaCl; 预洗液 6 $\times$ SSC, 0.1%SDS; 预杂交液 100 mL 中含 20 $\times$ SSC 30 mL, 10%SDS 10 mL, 50 $\times$ Denhardt's 液 2 mL, 使用前加入 10 mg/mL 变性的鲑鱼精 DNA 1 mL; 洗涤液 2 $\times$ SSC, 0.1%SDS。

## 1.2 方法

### 1.2.1 质粒提取及酶切

在含有氯霉素(10  $\mu$ g/mL)的LB平皿中划线培养各BAC克隆, 37 $^{\circ}$ C过夜培养后挑取单菌落, 加入 25 mL LB Broth 培养液中 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 振荡 8~10 h, 之后碱裂解法抽提质粒, 限制性内切酶*Bsa*J酶切, 检测并定量。

### 1.2.2 探针制备及纯化

本研究采用 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ 末端标记法制备放射性探针。反应体系为:酶切的质粒DNA为 13.3  $\mu$ L(对酶切的质粒进行盘分析, 13.3  $\mu$ L含质粒DNA总量约 1 000 ng, 可满足实验需求), 10 $\times$ buffer tango为 2.0  $\mu$ L, 3 $\times$ dNTPs(dATP、dTTP、dGTP)为 2.5  $\mu$ L, Klenow大片段为 0.2  $\mu$ L。

该反应体系在 30 $^{\circ}$ C 条件下反应 45 min 后于 75 $^{\circ}$ C 条件下终止反应 5 min, 然后参照 E.Z.N.A DNA Probe Purification Kit 说明书纯化探针, 最后得到 60  $\mu$ L 纯化好的探针。

### 1.2.3 杂交筛选

用制作好的探针对绵羊cDNA文库进行两轮杂交筛选。第一轮杂交筛选时将绵羊cDNA文库稀释并

铺置 6 块 15 cm 平皿, 控制每个平皿上的噬菌斑数量为 50 000 个左右, 每个平皿使用一张尼龙膜转移。将含有噬菌斑的尼龙膜用变性液和中和液处理后, 7 $\times$ 10<sup>4</sup>  $\mu$ J UV 交联 1 min 后置于预洗液中 68 $^{\circ}$ C 预洗 1 h, 再在预杂交液中 68 $^{\circ}$ C 预杂交 2 h, 然后将制备好的放射性探针加入预杂交液中, 68 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交结束后用洗涤液于室温洗涤 2~3 次, 每次 10 min, 后与X光片一起置于-80 $^{\circ}$ C 环境下 72 h, 进行放射自显影。最后把X光片与相应平皿对应, 挑取阳性克隆, 保存于 1 mL SM 缓冲液中。用挑取的阳性克隆按照第一轮杂交的方法进行进行第二轮杂交, 将最后得到的阳性单克隆置于 1 mL SM 缓冲液中保存, 备用。

### 1.2.4 剪切和测序

参照 ZAP Express<sup>®</sup> cDNA Synthesis Kit 的操作说明, 对所得阳性单克隆进行剪切、质粒提取, 并用*Eco*R和*Xho*双酶切以确认所得阳性单克隆中有目的片段插入及其大小, 然后将菌液送至北京华大基因公司测序。

### 1.2.5 序列分析

首先利用NCBI在线软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)将测序所得序列信息(MHC区段cDNA序列)进行去载体, 然后利用<http://pbil.univ-lyon1.fr/sim4.php>网页的在线软件将其与相应的BAC克隆(MHC区段DNA序列)进行比对, 再将位于该BAC克隆基因组内的序列加以定位, 并与之前用软件预测得到的该BAC克隆基因组内的基因进行位置比较, 最后利用NCBI中的Blastn程序将序列信息进行同源检索<sup>[18]</sup>, 对所得序列信息进行初步的生物信息学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒提取及酶切

将提取的质粒DNA经限制性内切酶*Bsa*J酶切, 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 1)。由于cDNA文库中插入片段长度(0.5~2.5 kb)的限制, 在内切酶的选择上, 实验前充分利用 GeneQuest 软件进行酶切预测选择, 控制酶切片段<2.5 kb, 内切酶*Bsa*J I 符合要求。检测结果显示, 用*Bsa*J I 酶切后目的片段长度均集中在 0.5~1.5 kb 之间, 实际酶

切效果与预测结果一致。同时, 由于每个 BAC 克隆自身的结构和提取过程的变化, 致使浓度出现差别, 但是在后续实验中通过浓缩和体积调整都能满足实验需要。

### 2.2 杂交筛选

分别用 6 个 BAC 克隆的酶切片制备放射性探针, 对绵羊 cDNA 文库进行筛选(图 2)。由图可以看出, 4 个克隆第一轮(各小图中左图)的杂交信号普遍较弱, 甚至出现了难以判断是否阳性信号的斑点,

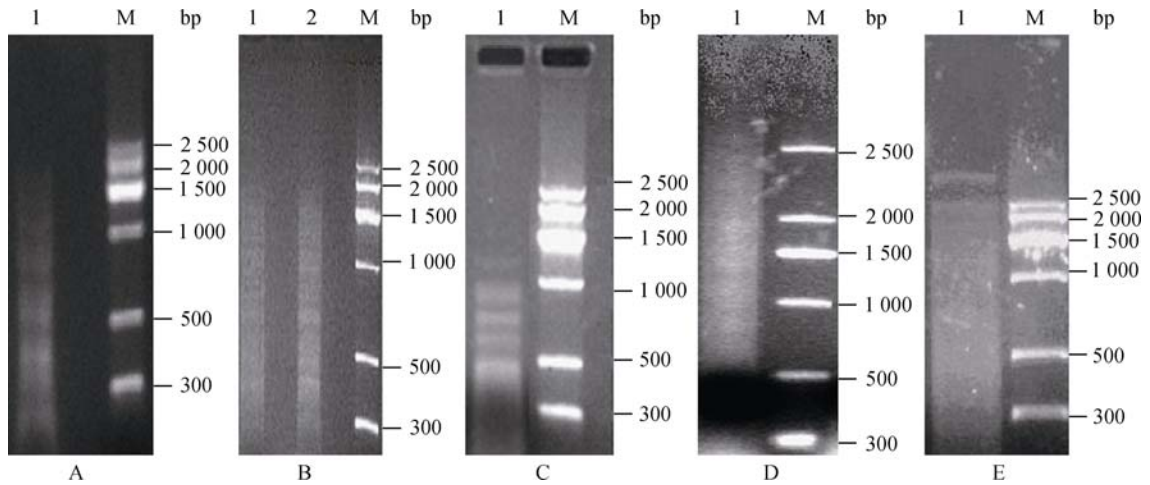


图 1 各个克隆的质粒酶切检测图

A : BAC55L9; B : BAC239C1(1 泳道)和 BAC346G21(2 泳道); C : BAC429P24; D : BAC304D17; E : BAC349I12; M:DNA Marker。

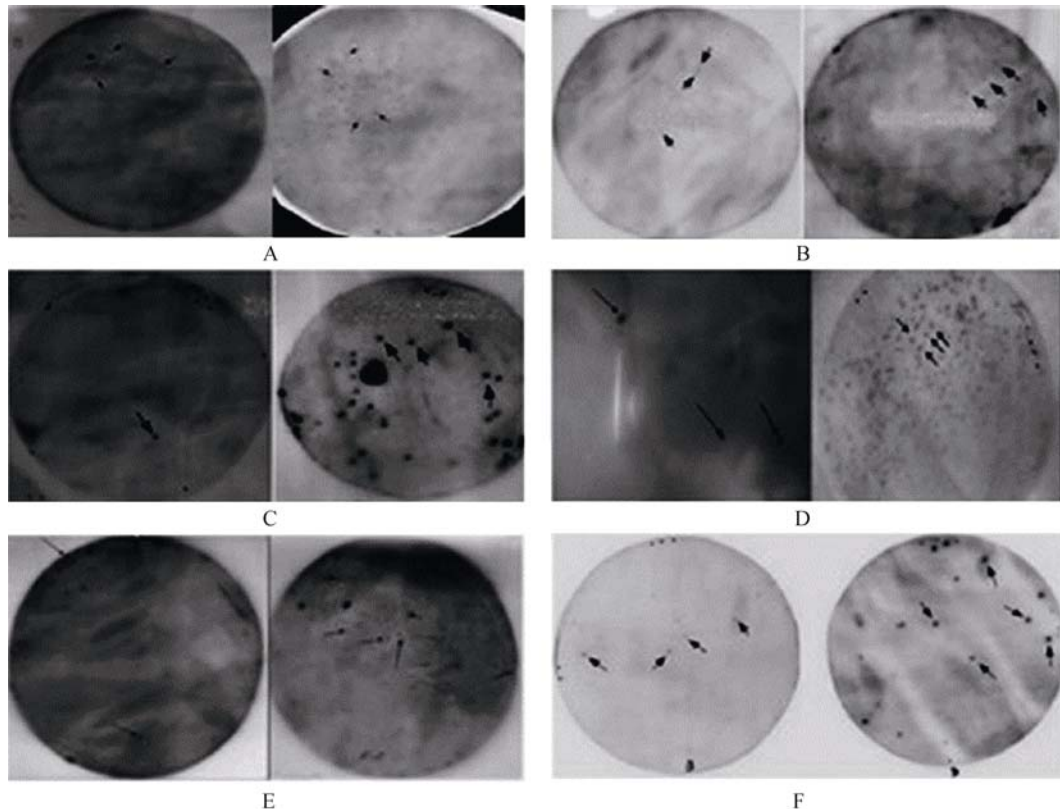


图 2 各个克隆两轮杂交放射自显影(以上各图中, 左图均为第一轮杂交图, 右图均为第二轮杂交图)

A : BAC55L9; B : BAC239C1; C : BAC346G21; D : BAC429P24; E : BAC304D17; F : BAC349I12。

而第二轮(各小图中右图)的杂交结果要显著优于第一轮。究其原因,第二轮杂交时的克隆的特异性高是主要因素。经过两轮筛选,每个 BAC 克隆获得了不同数量的阳性克隆(表 1)。由于假阳性因素的存在,第二轮的阳性克隆数量已少于第一轮。同时,比起预测基因的数量,杂交筛选出来的序列信息还比较缺乏。

### 2.3 序列分析

首先利用网页(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)上的GENSCAN软件分别对 6 个克隆进行基因预测,做出基因预测图<sup>[19]</sup>。再将测序所得结果经DNASTAR软件编辑、拼接和去重复后,将这些序列编号并利用<http://pbil.univ-lyon1.fr/sim4.php>网页上的在线软件与相应克隆的基因组DNA序列进行比对<sup>[20]</sup>,利用Lalnview软件查看。结果:BAC55L9、Contig、BAC429P24、BAC304D17、BAC349I12 分别有 6、7、1、3、10 条序列可以定位到相应的BAC克隆上,且匹配程度较高。同时,将序列定位图与BAC的基因预测图进行做图比较(图 3)。由图可知:定位的序列几乎都在预测的基因范围内,且绝大部分都在外显子部分。由此可见,实验所测序列数据和预测的有很大的吻合度,这在很大程度上也印证了本研究的预期。另外,将实验所得序列用NCBI中的Blastn程序进行核苷酸同源性检索分析(表 2),以期寻找同源序列,并根据比对结果对序列功能做初步了解。

## 3 讨论

杂交实验结果表明(图 2),第一轮杂交的信号普遍比较弱,出现的杂交信号(黑斑)数量较少,有的也比较模糊。第二轮杂交的信号普遍要强于第一轮,

有的克隆甚至出现了很强的背景,比如BAC429P24(图 2 中 图)。究其原因: BAC探针的限制。本研究中采用<sup>32</sup>P标记BAC克隆酶切片段末端补齐制作探针,第一轮杂交时探针须在成千上万个cDNA片段中寻找目的片段,加之杂交过程复杂,还会因为错配、标记失败等因素的干扰导致探针的特异性降低。cDNA文库的限制。基因表达是有时空差异的,基于一定时间点用特定组织所构建的cDNA文库,基因信息势必受到影响,其中低丰度表达和阶段性表达基因可能被遗漏,难以出现信号。而第二轮杂交效果较好,是因为第二轮杂交时的cDNA已经是第一轮杂交后出现的阳性单克隆,特异性好,更容易被标记。另外,由于洗膜时同位素的残留,转膜时粘连培养基等因素造成的假阳性,致使从第一轮到第二轮筛选出的阳性克隆数也有明显下降(表 2)。故在第一轮增加铺置平皿的数量和增加筛选次数是剔除假阳性,提高检出率的有效措施。

序列分析结果表明(图 3),定位在各自克隆上的序列有 25 条都能匹配在各自克隆预测基因的外显子部分,这符合实验的预期,也验证了基因注释的结果。但比如BAC349I12 克隆中的Seq6 和Seq14(外显子)等部分序列,定位后发现序列不在预测基因的外显子部分,与预测结果不符,分析有两方面原因:

由于预测软件的缺陷使预测基因的位置出现偏差;cDNA文库中有线粒体DNA的污染<sup>[21]</sup>。我们从序列分析结果也发现,所筛选出来的序列都只是预测基因外显子的一部分,或者很小一部分,未见有和预测基因一致且完整的ORF,这种现象与本研究中所使用的cDNA文库有密切关系(参见 1.1.2)。由于此cDNA文库的插入片段大小不一,所以筛选出来的序列片段长短差异也会很大,加之杂交的随机性,也就很难出现完整的ORF。另外,我们通过图 3

表 1 杂交筛选结果

探针 (BAC 克隆)	登录号 GenBank	插入长度 (bp)	阳性克隆数		预测基因数量
			第一轮	第二轮	
BAC55L9	FJ985854	145292	15	6	12
Contig <sup>a</sup>	FJ985864+FJ985870	169142	26	7	25
BAC429P24	FJ985873	198404	7	1	13
BAC304D17	FJ985868	140735	7	3	7
VAC349I12	FJ985871	148708	17	10	10

注: <sup>a</sup> Contig表示BAC239C1(FJ985864,142287bp)和BAC346G21(FJ985870, 138311bp)组装后的序列。

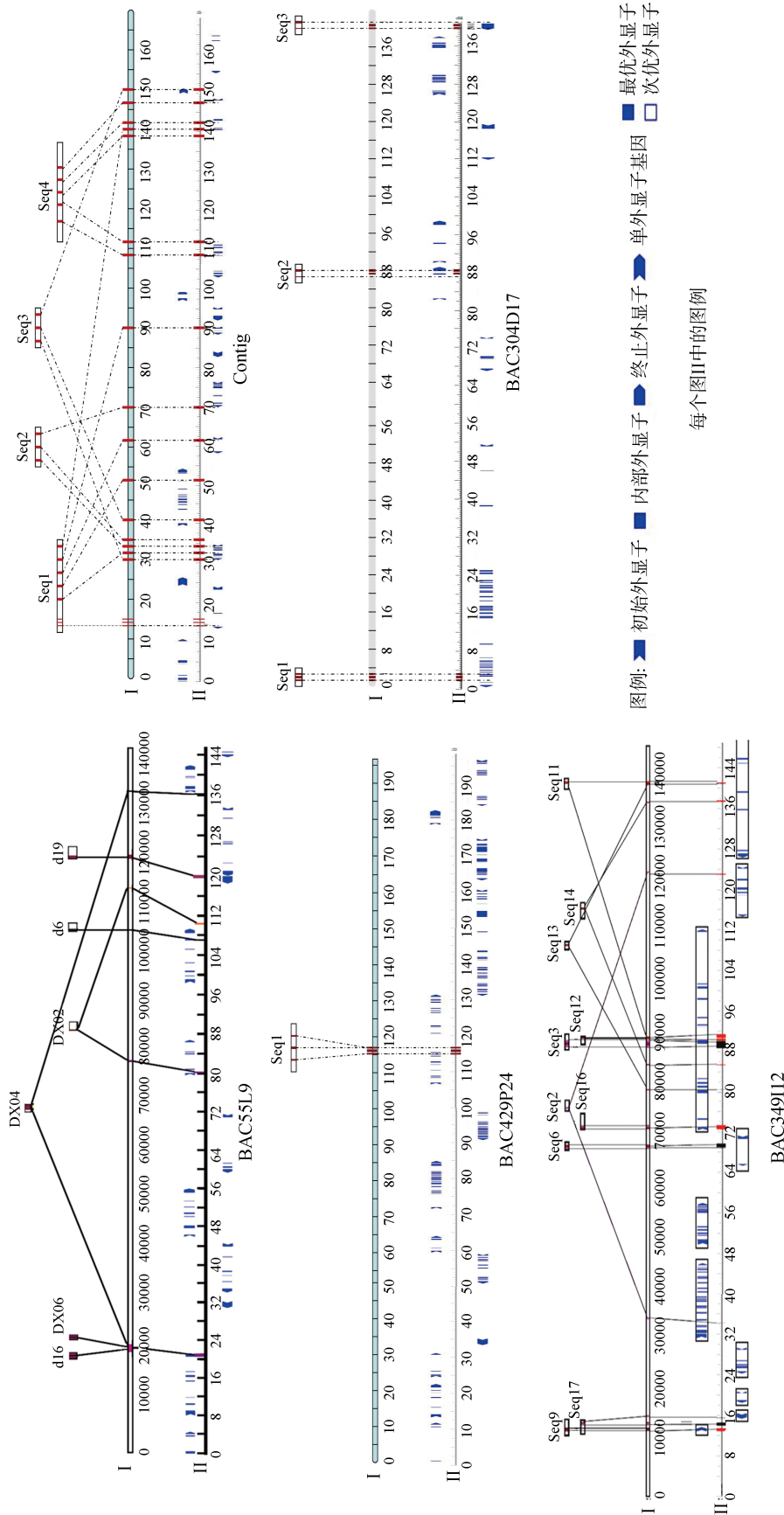


图 3 各个克隆测序定位图与基因预测图的比较

I: 各个克隆测序定位图; II: 各个克隆基因预测图。以上横坐标单位均为 kb。

表 2 测序序列在 NCBI 中 Blastn 检索的结果

序列编号	长度(bp)	Blastn 结果	E 值	匹配度
55L9				
D16	2364	Bos taurus hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1 (HERC1), mRNA	0.0	88%
DX06	830	Ovis aries reverse transcriptase-like ,mRNA	3e-9	74%
DX04	1480	Bos taurus zinc finger protein 33B (ZNF33B), mRNA	8	91%
DX02	1863	Bos taurus legumain (LGMN), mRNA	0.0	94%
D6	1583	Bos taurus LTV1 homolog (S.cerevisiae)(LTV1),mRNA	9e-1	98%
D19	2670	Bos taurus zinc finger protein 266 (ZNF266), mRNA	31	89%
Contig=BAC239C1+BAC346G21				
Seq1	2500	Bos taurus T cell receptor gamma cluster 2 (TCRG2) gene, complete sequence	0.0	87%
Seq2	2383	O.aries gene for beta-casein	0.0	91%
Seq3	2261	Bos taurus T cell receptor gamma cluster 2 (TCRG2) gene, complete sequence	0.0	89%
Seq4-1	1940	Ovis aries T-cell receptor gamma locus TRG1 genomic sequence	0.0	95%
Seq4-2	1882	Ovis aries MHC class II beta domain (DQB2)	0.0	88%
Seq4-3	1920	Bos taurus T cell receptor gamma cluster 1 (TCRG1) gene, complete sequence	0.0	92%
Seq4-4	1934	Bos taurus T cell receptor alpha (TCRA) gene, J segments and C region	0.0	98%
429P24				
Seq1	1798	Homo sapiens IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos) (IKZF3), RefSeqGene on chromosome 17	4e-1	82%
304D17				
Seq1	1470	PREDICTED: Bos taurus SP110 nuclear body protein (SP110), mRNA	2e-9	92%
Seq2	723	Bos taurus gart gene, son gene, donson gene and cryz11 gene	2	91%
Seq3	1013	Bos taurus tubulin, beta (TUBB), mRNA, complete cds	0.0	98%
349I12				
Seq 2	1542	Bos taurus major histocompatibility complex, class II, DM beta-chain, expressed (BOLA-DMB), mRNA	0.0	90%
Seq 3	2954	Bos taurus acyl-CoA thioesterase 11 (ACOT11), mRNA	0.0	87%
Seq 6	1364	Bos taurus angiotensin II receptor, type 1 (AGTR1), mRNA	0.0	91%
Seq 9	2944	Bos taurus endopin 1b (SERPINA3-3), mRNA	0.0	92%
Seq 11	2394	Bos taurus nipsnap homolog 1 (C. elegans) (NIPSNAP1), mRNA	1e-1	85%
Seq 12	1751	Bos taurus Lix1 homolog (chicken) (LIX1), mRNA	27	91%
Seq 13	1718	Bos taurus C-reactive protein, pentraxin-related (CRP), mRNA	0.0	93%
Seq 14	2580	PREDICTED: Bos taurus AFG3(ATPase family gene 3)-like 1-like (LOC532875), mRNA	0.0	96%
Seq 16	3071	PREDICTED: Bos taurus B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1-like (LOC100299906), mRNA	0.0	96%
Seq 17	2226	Bos taurus hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1 (HERC1), mRNA	0.0	88%

中的 BAC55L9 发现, 部分序列的各个片段跨度很大, 而且处在不同基因的外显子部分, 比如图 3 中 Contig 图的 Seq1、Seq3 序列等。除此之外, 还有序列交叉现象, 这些都有可能与真核生物复杂的基因组结构有密切的关联, 有待进一步研究。

本研究为了初步探究所得基因序列的功能, 将序列在 NCBI 的 Blastn 数据库中进行了同源检索, 结

果发现(表 2):23 条序列跟已报道的牛的序列同源性最高, 3 条是已报道的绵羊 MHC 区段基因的部分序列, 1 条与人的序列同源性最高, 且这些序列中 21 条都跟免疫密切相关。这些分析结果可以证明两个事实:一是在动物分类学上, 羊和牛同属于牛科, 进化上亲缘关系较近, 所以基因组序列有很高的同源性和结构一致性, 基因功能也有很大的共性。同时, 鉴

于牛基因组研究比较领先, 基因信息丰富, MHC 区段的研究也比较深入, 故本室目前正以牛的基因组 MHC 区段的基因信息为参考, 结合我们对绵羊 MHC 区段的测序数据, 运用比较基因组学方法绘制绵羊 MHC 区段的遗传连锁图, 本研所得数据可为连锁图上基因的验证提供可靠的证据。二是 MHC 区段尤其是 Class II 和 Class III 两个亚区的基因与免疫应答和调控的关系十分密切, 故本研究筛选的序列跟免疫相关也就容易理解。但是, 本研究中只选了一个位于 Class II 区的 BAC 克隆(BAC349I12)作为探针, 且尚未筛选出 MHC 区段最重要的 DRB 基因的序列, 故尚需要增加该区 BAC 克隆的数量继续进行杂交筛选, 以期最终覆盖 MHC 整个区段, 也为最终研究绵羊 MHC 区段基因的功能打下良好基础。

#### 参考文献(References):

- [1] Danchin E, Vitiello V, Vienne A, Richard O, Gouret P, McDermott MF, Pontarotti P. The major histocompatibility complex origin. *Immunol Rev*, 2004, 198(1): 216–232. [DOI](#)
- [2] Outteridge PM, Stewart DJ, Skerrnan TM, Dufty JH, Egerton JR, Ferrier G, Marshall DJ. A positive association between resistance to ovine footrot and particular lymphocyte antigen types. *Aust Vet J*, 1989, 66(6): 175–179. [DOI](#)
- [3] Hohenhaus MA, Outteridge PM. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *Br Vet J*, 1998, 151(2): 119–140. [DOI](#)
- [4] Tizard IR. Acquired immunity: antigen-presenting receptors. In: *Veterinary Immunology: An Introduction*. Philadelphia, USA, Elsevier, 2004: 67–77.
- [5] Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC Jr, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev (Genetics)*, 2004, 5(12): 889–899. [DOI](#)
- [6] Dukkipati VSR, Blair HT, Garrick DJ, Murray A. ‘Ovar-Mhc’- Ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases. *New Zealand Vet J*, 2006, 54(4): 153–160. [DOI](#)
- [7] Dukkipati VSR, Blair HT, Garrick DJ, Murray A. ‘Ovar-Mhc’ - Ovine major histocompatibility complex: Structure and gene polymorphisms. *Genet Mol Res*, 2006, 5(4): 581–608. [DOI](#)
- [8] Liu HB, Liu K, Wang JF, Ma RZ. A BAC clone-based physical map of ovine major histocompatibility complex. *Genomics*, 2006, 88(1): 88–95. [DOI](#)
- [9] 李鑫, 邹毅辉, 杨小亮, 李桂芳, 李峰, 陈芳, 石国庆, 高剑峰. 中国美利奴羊外周免疫器官cDNA文库的构建及鉴定. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2010, 28(5): 529–533. [DOI](#)
- [10] Liu K, Zhang P, Gao J, Liu H, Li G, Qiu Z, Zhang Y, Ren J, Tan P, Ma RZ. Closing a gap in the physical map of the ovine major histocompatibility complex. *Anim Genet*, 2010, 42(2): 204–207. [DOI](#)
- [11] Gao JF, Liu K, Liu HB, Blair HT, Li G, Chen CF, Tan PP, Ma RZ. A complete DNA sequence map of the ovine Major Histocompatibility Complex. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 466–474. [DOI](#)
- [12] 焦莎莎, 刘卡, 李刚, 高剑峰, 马润林. 绵羊MHC区段 3 个预测基因的验证与表达分析. *遗传*, 2011, 33(12): 1353–1358. [DOI](#)
- [13] Snell RG, Doucette-Stamm LA, Gillespie KM, Taylor SAM, Riba L, Bates GP, Altherr MR, MacDonald ME, Gusella JF, Wasmuth JJ, Lehrach H, Housman DE, Harper PS, Shaw DJ. The isolation of cDNAs within the Huntington disease region by hybridization of yeast artificial chromosomes to a cDNA library. *Human Mol Genet*, 1993, 2(3): 305–309. [DOI](#)
- [14] 韩力薇, 覃文新, 赵新泰, 黄弋, 张萍萍, 万大方, 顾健人. 以PAC和BAC克隆为探针筛选cDNA文库. *上海医科大学学报*, 2000, 27(6): 449–452. [DOI](#)
- [15] 李谨, 杨公社, 陈创夫, 刘海波, 马润林, 王金富. 新疆军垦型细毛羊基因组BAC文库的构建. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2006, 22(11): 880–885. [DOI](#)
- [16] 詹勇华, 陈创夫, 高剑峰, 王金富. 中国美利奴细毛羊 BAC文库的质量评价. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2006, 24(1): 102–104. [DOI](#)
- [17] Sambrook J. *分子克隆实验指南*. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002. [DOI](#)
- [18] Kulski JK, Shiina T, Anzai T, Kohara S, Inoko H. Comparative genome analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunol Rev*, 2002, 190(1): 95–122. [DOI](#)
- [19] Burge CB, Karlin S. Finding the genes in genomic DNA. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8(3): 346–354. [DOI](#)
- [20] Florea L, Hartzell G, Zhang Z, Zhang, Rubin GM, Miller W. A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Res*, 1998, 8(9): 967–974. [DOI](#)
- [21] 覃文新, 万大方, 顾健人. 人基因组中表达序列的分离. *自然杂志*, 1998, 20(6): 314–317. [DOI](#)



