

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (3) :338 - 344; 4 March 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.011

恒定链 CLIP 的 2 个片段在增强体液免疫效果的比较

王瑞靖, 陈芳芳, 余为一*

安徽农业大学, 安徽省人畜共患病重点实验室, 安徽 合肥 230036

摘要: 【目的】比较恒定链 (invariant chain, Ii) CLIP 的 2 个片段 (PBS、GBS) 影响免疫载体增强体液免疫的效果。【方法】首先, 构建了基于小鼠 Ii 功能片段与新城疫病毒抗原肽 F2 的 6 个嵌合体 (Cyt/TM/F2、Cyt/TM/F2/GBS、Cyt/TM/PBS/F2、Cyt/TM/F2/TRIM、Cyt/TM/F2/GBS/TRIM、Cyt/TM/PBS/F2/TRIM); 其次, 定向克隆至原核表达载体 pET-32a 中, 并转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 诱导表达和纯化目的蛋白; 最后, 免疫小鼠, 经间接 ELISA 法测定血清抗体效价, 以及比较分析不同嵌合体免疫组免疫效果。【结果】一是所构建的含不同 Ii 功能片段/F2 嵌合体的 6 个免疫组, 均比单独 F2 的免疫组提高抗体水平 1.5 - 4.9 倍; 二是在上述 6 个免疫组中, 含 CLIP 的 PBS 或 GBS 的免疫组比不含 CLIP 的免疫组增强 1.6 - 2.4 倍; 三是含 PBS 比含 GBS 的免疫组增强 1.5 倍。【结论】Ii 胞浆区、跨膜区具有增强免疫效果的作用, 而 CLIP 的 PBS 在 Ii 免疫载体中的作用优于 GBS。

关键词: 恒定链, 抗体, CLIP

中图分类号: S852.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2014)03-0338-07

MHC II 类分子的 α 、 β 链在内质网中与 γ 链聚合, 形成九聚体 ($\alpha\beta\gamma$)₃。其中 γ 链不同于 α 、 β 链的多态性, 呈非多态性, 故称为恒定链 (Invariant chain, Ii)^[1]。Ii 由胞浆区、跨膜区和内质网区 3 个结构域组成, 它的主要功能是协助 MHC II 类分子递呈外源性抗原肽。其内质网腔区含有 CLIP (Class II-associated invariant chain peptide, 81 - 104 aa) 和三聚体区 (TRIM, Trimerization) 两个片段^[2]。CLIP 占据 MHC II 类分子的沟槽, 阻止内质网中合成的内源性多肽的结合。经过细胞内转运, Ii 在酸性环境下逐步降解^[3], 导致 CLIP 从沟槽中脱离、外源性抗原肽进入并与 MHC II 分子结合, 并被递呈到免疫细胞表面^[4]。

研究表明, 在 Ii 的 CLIP 存在与 MHC II 类分子的结合位点 (CBS, Class II binding site) 片段。CBS 片段又分为两个功能片段, 即与所有多态性 MHC II 结构相关的混合结合位点 (PBS, promiscuous binding site, 81 - 87 aa) 片段和沟槽结合位点 (GBS, groove binding site, 91 - 99 aa) 片段^[5]。当 Ii 的 CLIP 与 MHC II 类分子结合时, PBS 存在于 MHC II 类分子的肽结合沟槽外部, 同 CLIP 与 MHC II 类分子的解离有关^[6], 而 GBS 与 MHC II 类分子的肽结合沟槽相互作用^[7]。

近年来发现, Ii 作为免疫载体具有促进免疫应答的作用。通常用抗原肽取代 Ii 的 CLIP。结果表明, 不仅可增强抗感染免疫, 还可以改变异常免疫应

基金项目: 国家自然科学基金 (31172306)

* 通信作者。E-mail: yuweiyi@ahau.edu.cn

作者简介: 王瑞靖 (1988 -), 男, 安徽桐城人, 硕士, 专业方向微生物与免疫学。E-mail: warage@163.com

收稿日期: 2013-08-23; 修回日期: 2013-10-30

答的性质^[8-10]。我们的前期工作用 Ii 的胞浆区 (Cyt, Cytosolic domain) 和跨膜区 (TM, Transmembrane domain) 作为载体, 发现其具有增强抗体分泌的作用, 机理是与 MHC II 类分子的结合相关^[11]。由于 CLIP 是 Ii 结合 MHC II 类分子的重要片段^[12], 其内部的两个功能片段 PBS 和 GPS 在免疫载体中的作用并不清楚。本研究为了进一步了解 Ii 胞浆区和跨膜区下游的 CLIP 区的氨基酸序列有无类似于载体的免疫增强作用, 在 Cyt/TM 的基础上, 分别加入 PBS 和 GPS, 构建了含新城疫病毒 (NDV, Newcastle disease virus) F 蛋白的抗原表位 F2^[13] 的 6 个嵌合体免疫小鼠, 检测血清效价, 比较它们免疫增强作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: SPF 级昆明系雌性小鼠购于安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 菌株和质粒: *E. coli* Rosetta (DE3)、pET-32a、pGEX-4T-1、pGEX-4T-1/F306、pEGFP-C1/Ii, 安徽省人畜共患病重点实验室保存。

1.1.3 工具酶和试剂: DL2000 DNA Marker、限制性内切酶 (*SalI*、*BamHI*)、Ex Taq 酶、T4 DNA 连接酶, 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 大肠杆菌 (*E. coli*) Rosetta (DE3) 感受态细胞按《分子克隆实验指南》制备; 蛋白质分子量标准 (低), 分别购于 TaKaRa 公司和 Fermentas 公司; 三氯甲烷、甘氨酸、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺, 购于中国医药集团上海化学试剂公司; HRP 标记羊抗鼠二抗, 购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 购于 Promega 公司; OPD、Folin-酚试剂、牛血清白蛋白 (BSA)、弗氏 (不) 完全佐剂, 购于 Sigma 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、小量日常型质粒 DNA 抽提试剂盒, 购自杭州爱思进生物技术有限公司; 琼脂糖购于上海生工生物工程公司。新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 的抗原表位 F2 保存于安徽省人畜共患病重点实验室。

1.2 嵌合体的构建

根据小鼠 Ii 和 NDV-F2 (F 蛋白 147-182 aa) 结构, 以本实验室保存的重组质粒 pGEX-4T-1/F306、pEGFP-C1/Ii 为模板, 采用 Overlap PCR 法构建了多个嵌合体 (图 1)。

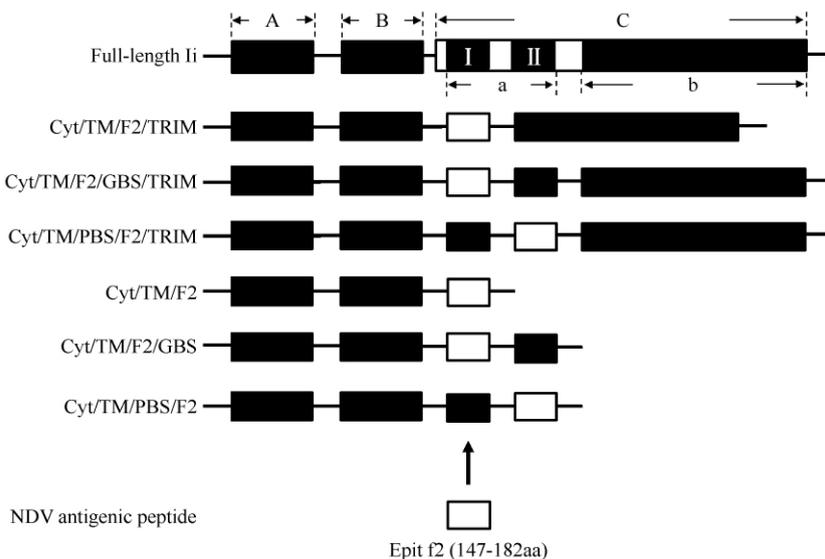


图 1. 含 Ii 片段和抗原表位的嵌合体示意图

Figure 1. A schematic diagram of the hybrids containing Ii segments and antigen peptides F2. Note: A. Cytosolic domain (Cyt); B. Transmembrane domain (TM); C. Luminal Domain; a. Class II-associated invariant chain peptide (CLIP); b. Trimerization (TRIM); I. Promiscuous Binding Site (PBS); II. Groove Binding Site (GBS).

PCR 扩增引物和相应嵌合体如表 1, 各活性片

段分别与 pET-32a、pGEX-4T-1 载体连接, 将重组质

粒转化 Rosetta (DE3) 宿主菌中, 筛选出阳性克隆送上海生工生物工程有限公司进行测序, 同时对其重组质粒进行双酶切鉴定。

表 1. 嵌合体片段引物表
Table 1. Primer sequences of the chimers

chimers	primer sequences
li	F: 5'CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA 3' (<i>Bam</i> H I) R: 5'GCGTCGACCTACTTGGCTTTCACCA 3' (<i>Sal</i> I)
Cyt/TM/F2/TRIM	F:5'CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA3' (<i>Bam</i> H I) R: 5'GCGTCGACCTACTTGGCTTTCACCA 3' (<i>Sal</i> I)
Cyt/TM/F2/GBS/TRIM	F:5'CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA 3' (<i>Bam</i> H I) R: 5'GCGTCGACCTACTTGGCTTTCACCA 3' (<i>Sal</i> I)
Cyt/TM/PBS/F2/TRIM	F:5'CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA 3' (<i>Bam</i> H I) R: 5'GCGTCGACCTACTTGGCTTTCACCA 3' (<i>Sal</i> I)
Cyt/TM/F2	F:5'CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA 3' (<i>Bam</i> H I) R: 5'GCGTCGACTTACATCTTCCCAAC 3' (<i>Sal</i> I)3' (<i>Sal</i> I)
Cyt/TM/F2/GBS	F:5'CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA 3' (<i>Bam</i> H I) R: 5'GCGTCGACTTACATGGACATTGG 3' (<i>Sal</i> I)
Cyt/TM/PBS/F2	F:5'CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA 3' (<i>Bam</i> H I) R: 5'GCGTCGACTTACATGGACATTGG 3' (<i>Sal</i> I)
DNV-F2	F:5'CGGGATCCATGAATGCTGCCAACAT 3' (<i>Bam</i> H I) R: 5'GCGTCGACCCTACATCTTCCCAACT 3' (<i>Sal</i> I)

1.3 嵌合体抗原的制备

将测序正确的质粒分别转入 Rosetta, 挑取单菌落在 Amp (100 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、230 r/min 培养 4 h, 以 1% 体积接种于 300 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、230 r/min 培养至 A_{600} 达 0.4–0.6 时, 加入 IPTG 使其终浓度为 200 μ g/mL。37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 诱导 4 h, 4 $^{\circ}$ C, 12000 \times g 离心 10 min, 磷酸盐缓冲液 (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L KH₂PO₄) 洗涤 3 次, 条件同上。细胞裂解缓冲液 (pH 8.0, 50 mmol/L Tris-HCl, 1.0 mmol/L EDTA, 2.0 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF) 重悬后进行超声波破碎 (180 W, 超声 5 s, 间隔 10 s, 36 循环) 菌体。分别对超声波破碎上清及沉淀部分 (用 pH 8.0, 50 mmol/L Tris-HCl, 225 mmol/L NaCl, 1.0 mmol/L EDTA, 2.0 mmol/L DTT 重悬) 进行 SDS-PAGE 分析, 分析融合蛋白可溶性, 并经 Native-PAGE (非变性-PAGE) 和 0.25 mol/L KCl 切胶纯化法进行纯化蛋白^[14], 通过 Folin 酚法测定各蛋白浓度, 分装, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 小鼠免疫

实验用 6 周龄 SPF 级别昆明系雌性小白鼠 32 只, 体重 (20 \pm 0.2) g, 随机分成 8 组, 每组 4 只, 参照 Chen^[11] 和孟凡涛^[15] 等, 腹腔注射约 50 μ g/只。7 个实验组以携带 pET-32a 载体的 His 标签融合蛋白

为免疫原, 混合等体积弗氏佐剂 (第一次为完全弗氏佐剂, 后两次为不完全弗氏佐剂)。阴性对照组注射的生理盐水。免疫 3 次, 间隔期分别为 10 d 和 7 d, 第 3 次免疫后 7 d 经眼球采血, 收集血清, 分装, 于 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 抗体效价的检测

采用间接 ELISA 法测定各实验组血清中抗体效价, 为去除标签蛋白对血清效价的影响, 用构建的 pGEX-4T-1-F2 融合蛋白 GST-F2 包被酶标板, 筛选出 GST-F2 最佳包被浓度 8 μ g/mL。再以最佳抗原包被浓度进行包被。每个样品重复 3 孔。实验组血清为一抗, 1:1000 稀释度为首孔开始倍比稀释, 最后一孔为阴性对照。以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗 (1:5000 稀释), 最后以邻苯二胺 (OPD) 显色反应, 室温放置 10–15 min 后 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 以阳性血清与阴性血清的 OD₄₉₀ 比值大于等于 2.1 为判定标准, 3 次重复试验, 对数据进行统计学分析。

2 结果和分析

2.1 li 活性片段嵌合体与质粒的构建及其鉴定

如图 1 所示, li 是由胞浆区、跨膜区和内质网区 3 个结构域所组成。在过去的实验中发现, 胞浆区

和跨膜区具有增强抗体分泌的免疫载体作用^[11]。本研究在此基础上,为探明 CLIP 中 2 个片段的活性作用,分别构建了 2 个含 NDV-F2 的重组质粒(pGEX-4T-1-F2, pET-32a-F2)和含相应 Ii 片段与新城疫病毒抗原肽 F2 的 6 个嵌合体(Cyt/TM/F2、Cyt/TM/F2/GBS、Cyt/TM/PBS/F2、Cyt/TM/F2/

TRIM、Cyt/TM/F2/GBS/TRIM、Cyt/TM/PBS/F2/TRIM)的 pET-32a-重组质粒(图 1)。这些重组质粒先后经双酶切鉴定和测序鉴定。图 2 所示的是双酶切后的凝胶电泳结果,表明酶切的目的片段的大小也符合其应有的分子大小,它们已分别被插入质粒。

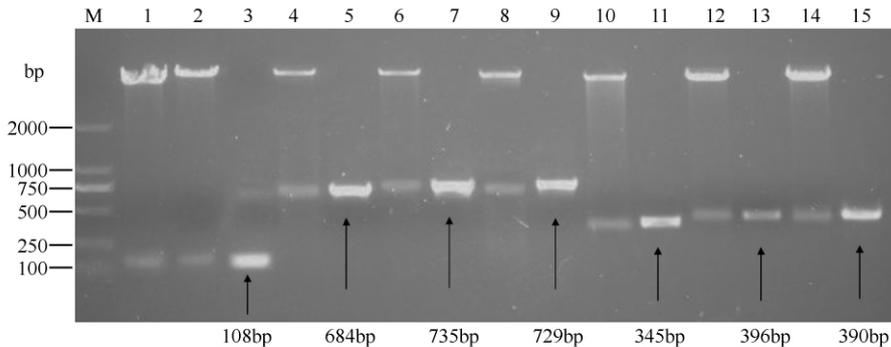


图 2. 重组质粒的双酶切鉴定

Figure 2. Results of double digestion of recombinant plasmid. M. DL2000Marker. The products of double digestion. lane 1. pGEX-4T-1-F2; lane 2. pET-32a-F2; lane 4. pET-32a-Cyt/TM/F2/TRIM; lane 6. pET-32a-Cyt/TM/F2/GBS/TRIM; lane 8. pET-32a-Cyt/TM/PBS/F2/TRIM; lane 10. pET-32a-Cyt/TM/F2; lane 12. pET-32a-Cyt/TM/F2/GBS; lane 14. pET-32a-Cyt/TM/PBS/F2. The corresponding PCR products: lane 3. F2; lane 5. Cyt/TM/F2/TRIM; lane 7. Cyt/TM/F2/GBS/TRIM; lane 9. Cyt/TM/PBS/F2/TRIM; lane 11. Cyt/TM/F2; lane 13. Cyt/TM/PBS/F2; lane 15. Cyt/TM/PBS/F2.

2.2 融合蛋白分子的纯化和鉴定

作为载体和免疫抗原,分别需要具有特定的生物学活性和免疫原性,而获得高纯度的载体/抗原肽融合蛋白分子是实验成功的重要前提。构建的各种重组质粒,经转入工程菌和诱导表达,并进一步用切胶法提取融合蛋白分子。如图 3 所示,经纯化的所有融合蛋白在 SDS-PAGE 电泳中,均表现出较高纯度的条带。其中,His/F2 作为免疫抗原(2 泳道),GST/F2 作为 ELISA 包被抗原(1 泳道)。其他 6 个融合蛋白分子为 His/Cyt/TM/F2、His/Cyt/TM/F2/GBS、His/Cyt/TM/PBS/F2、His/Cyt/TM/F2/TRIM、His/Cyt/TM/F2/GBS/TRIM 和 His/Cyt/TM/PBS/F2/TRIM(3-8 泳道),其分子量分别如图 3 中所示。

2.3 CLIP 两个片段在免疫载体中的对小鼠特异性抗体分泌水平的影响

用 His/F2 和 6 个 His-载体/F2 融合蛋白分别免疫小鼠,24 d 后用 GST/F2 作为包被抗原用间接 ELISA 检测小鼠血清抗 F2 特异性抗体。结果分别为 F2:0.794 ± 0.01、Cyt/TM/F2:0.900 ± 0.06、Cyt/TM/F2/GBS:1.467 ± 0.03、Cyt/TM/PBS/F2:1.726 ±

0.04、Cyt/TM/F2/TRIM:1.430 ± 0.09、Cyt/TM/F2/GBS/TRIM:1.527 ± 0.05 和 Cyt/TM/PBS/F2/TRIM:1.812 ± 0.03,得出效价结果显示(图 4),6 个含 Ii 不同片段的载体均能提高小鼠特异性抗体的分泌水平(约 1.5-4.9 倍,0.95 × 10⁴ - 3.20 × 10⁴ / 0.63 × 10⁴),这表明 Ii 作为载体,具有明显的免疫增强作用。其中,用已报道的抗原肽 F2 取代 CLIP 的方法,只能提高抗体水平约 2 倍(1.20 × 10⁴ / 0.63 × 10⁴);用 F2 取代 CLIP 的 PBS、保留其 GBS 的载体可提高抗体水平 3.0 倍(1.90 × 10⁴ / 0.63 × 10⁴),而用 F2 取代 GBS、保留 PBS 的载体则提高抗体水平至 4.4 倍(2.78 × 10⁴ / 0.63 × 10⁴),它们比上述 F2 取代 CLIP 全片段的载体分别提高了 1.6(1.90 × 10⁴ / 1.20 × 10⁴)和 2.4 倍(2.78 × 10⁴ / 1.20 × 10⁴)。此外,在含 PBS 或 GBS 两个片段的载体中,在末端缺失 TRIM 明显比加载 TRIM 的免疫组约高 1.2 倍(2.32 × 10⁴ / 1.96 × 10⁴)。有意义的是,PBS 高于 GPS 趋势在有无 TRIM 时保持了一致。所有这些结果表明,在载体中 PBS 的增强作用优于 GPS。

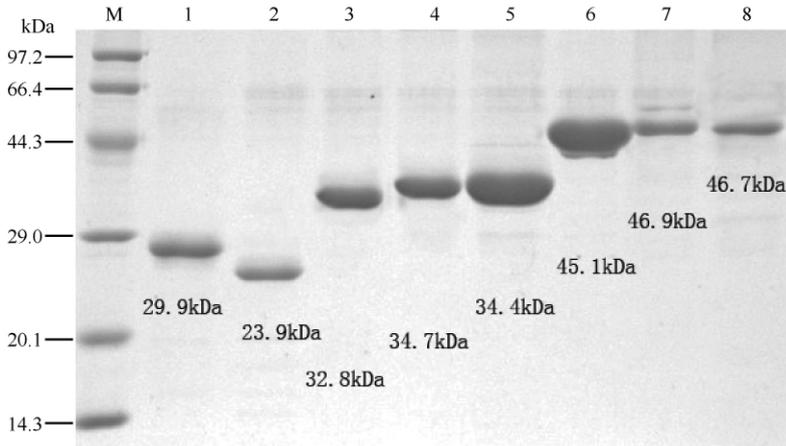


图 3. 表达和纯化的融合蛋白分子鉴定

Figure 3. Identification of expressed and purified fusion proteins. M. Marker; lane 1. GST-F2; lane 2. His-F2; lane 3. His/Cyt/TM/F2; lane 4. His/Cyt/TM/F2/GBS; lane 5. His/Cyt/TM/PBS/F2; lane 6. His/Cyt/TM/F2/TRIM. lane 7. His/Cyt/TM/F2/GBS/TRIM; lane 8. His/Cyt/TM/PBS/F2/TRIM.

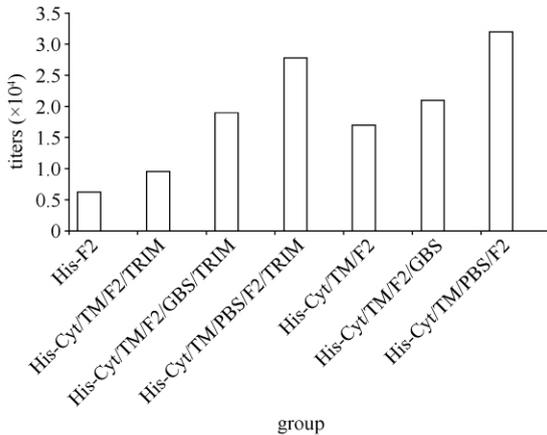


图 4. 含不同 Ii 片段的免疫载体增强小鼠分泌的特异性抗体水平

Figure 4. Specific antibody levels secreted by the mice immunized with the carrier containing various Ii segments.

3 讨论

首先,基于与 MHC II 类分子及其沟槽区结合, CLIP 的两个片段均具有增强免疫效果的作用。Ii 作为 MHC II 类分子的重要分子伴侣,在抗原呈递过程中起到了非常重要的作用^[16]。抗原肽与 MHC II 类分子不是特异性的结合,而是基于异体识别的兼容性的结合。MHC II 类分子的肽结合槽是与抗原肽结合的部位。用抗原肽取代恒定链 CLIP 区能够明显增强小鼠产生特异性抗体水平的作用^[11]。我们的前期工作,用激光共聚焦和免疫共沉淀试验证

明,基于 Ii 的胞浆区和跨膜区为载体的抗原肽嵌合体在细胞内具有结合 MHC II 类分子的特性,其增强机体分泌特异性抗体的效果优于单一抗原肽^[11,17,15]。由于 CLIP 也具有结合 MHC II 类分子的特性,结合部位又正是 MHC II 类分子的肽结合沟槽^[7];而且,CLIP 与 MHC II 类分子的结合可以改变其构象,影响其与抗原肽的结合^[18-19]:当 CLIP 区进入 MHC II 类分子沟槽后,MHC II 类分子从易于抗原肽进入的“松弛型”变成不能再次结合抗原的“紧密型”构象,以阻止内源性抗原与未成熟的 MHC II 类分子结合。本研究的结果表明,在胞浆区和跨膜区基础上,加载 PBS 或者 GBS 的 Ii 载体,其增强机体抗体分泌的效果均优于单一用胞浆区和跨膜区的载体,这说明 PBS 和 GBS 与 MHC II 类分子的结合有助于抗原肽的进入和递呈。

其次,在 CLIP 的两个片段中,PBS 的作用优于 GBS。在 CLIP 中,PBS 位于 N 端的 81-89 aa,它是与多态性 MHC II 类分子结合的区域,与 CLIP 从 MHC II 类分子的解离相关;而 GBS 位于 C 端的 90-105 aa,与 MHC II 类分子的肽结合沟槽相互作用相关。它们在免疫载体中的作用差异是本研究的关键。我们用新城疫病毒 F2 抗原表位分别取代 PBS 和 GBS,比较它们的免疫应答效果;同时考虑到三聚体区介导 Ii 分子结合成同源三聚体的作用^[20],做了加载该区的平行实验。结果表明,PBS 的作用优于 GBS,而且不加载三聚体区又优于加载的载体。该结果提示:一是 PBS 直接结合 MHC II 类分子,以维

持 GBS 在 MHC II 沟槽区中的稳定性;而在连接抗原肽后,通过稳定抗原肽在沟槽中与 MHC II 类分子的结合,提高了抗原肽的递呈效果;而结合于沟槽中 GBS 与胞浆区和跨膜区载体一起,也可加强抗原肽与 MHC II 类分子的结合稳定性,也具有一定程度提高递呈的作用。二是 Ii 与 MHC 类分子之 II 间是基于多位点结合为基础的互相作用,所以 Ii 的多片段的载体可以起到免疫效果叠加的作用;但是,也并不是所有片段均在免疫增强中起作用,比如,其三聚体区的作用却相反。

参考文献

- [1] Lipp J, Dobberstein B. Signal recognition particle-dependent membrane insertion of mouse invariant chain: a membrane-spanning protein with a cytoplasmically exposed amino terminus. *The Journal of Cell Biology*, 1986, 102 (6) : 2169-2175.
- [2] Bijlmakers MJ, Benaroch P, Ploegh HL. Mapping functional regions in the luminal domain of the class II - associated invariant chain. *The Journal of Experimental Medicine*, 1994, 180:623 - 629.
- [3] Pezeshki AM, Azar GA, Mourad W, Routy JP, Boulassel MR, Denzin LK, Thibodeau J. HLA-DO increases bacterial superantigen binding to human MHC molecules by inhibiting dissociation of class II-associated invariant chain peptides. *Human Immunology*, 2013, 74 (10) : 1280-1287.
- [4] Stumptner P, Benaroch P. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *The EMBO Journal*, 1997, 16 (19) : 5807-5818.
- [5] Siebenkotten IM, Carstens C, Koch N. Identification of a sequence that mediates promiscuous binding of invariant chain to MHC class II allotypes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1998, 160 (7) : 3355-3362.
- [6] Kropshofer H, Vogt AB, Hammerling GJ. Structural features of the invariant chain fragment CLIP controlling rapid release from HLA-DR molecules and inhibition of peptide binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92 (18) : 8313-8317.
- [7] Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature*, 1995, 378 (6556) : 457-462.
- [8] Gao M, Wang HP, Wang YN, Zhou Y, Wang QL. HCV-NS3 Th1 minigene vaccine based on invariant chain CLIP genetic substitution enhances CD4(+) Th1 cell responses in vivo. *Vaccine*, 2006, 24 (26) : 5491-5497.
- [9] Kim D, Hoory T, Monie A, Ting JP, Hung CF, Wu TC. Enhancement of DNA vaccine potency through coadministration of CIITA DNA with DNA vaccines via gene gun. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2008, 180 (10) : 7019-7027.
- [10] Mikkelsen M, Holst PJ, Bukh J, Thomsen AR, Christensen JP. Enhanced and sustained CD8+ T cell responses with an adenoviral vector-based hepatitis C virus vaccine encoding NS3 linked to the MHC class II chaperone protein invariant chain. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2011, 186 (4) : 2355-2364.
- [11] Chen F, Meng F, Pan L, Xu F, Liu X, Yu W. Boosting immune response with the invariant chain segments via association with non-peptide binding region of major histocompatibility complex class II molecules. *BMC Immunology*, 2012, 13: 55.
- [12] Baraliakos X, Baerlecken N, Witte T, Heldmann F, Braun J. High prevalence of anti-CD74 antibodies specific for the HLA class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in patients with axial spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2013.
- [13] Cheng B, Peng M, Yu W, Zhang D, Zhan K. Construction of prokaryotic expression vector for F protein epitope gene cascade of Newcastle disease virus. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30 (6) : 734-737. (in Chinese)
程宝艳, 彭明义, 余为一, 张丹俊, 詹凯. 新城疫病毒 F 蛋白抗原表位串联基因的构建及其原核表达. *中国兽医学报*, 2010, 30 (6) : 734-737.
- [14] Yu Z, Ma X, Zhou J. A Modified Method for Purification of Inclusion Bodies Proteins in Gel Slices. *Biotechnology*, 2007, 17 (3) : 46-48. (in Chinese)
于在江, 马学恩, 周建华. 切胶纯化表达蛋白包涵体的可行性分析. *生物技术*, 2007, 17 (3) : 46-48.
- [15] Meng F, Chen F, Yu W. Comparison of effect of two vector based on invariant chain segments on the increasing antibody production. *Chinese Journal of Immunology*, 2012, 28 (8) : 728-732. (in Chinese)
孟凡涛, 陈芳芳, 余为一. 两种基于恒定链活性片段

载体在增强抗体分泌中作用的比较. 中国免疫学杂志, 2012, 28 (8) : 728-732.

- [16] Biedrzycka A, Radwan J. Population fragmentation and major histocompatibility complex variation in the spotted suslik, *Spermophilus suslicus*. *Molecular Ecology*, 2008, 17 (22) : 4801-4811.
- [17] Jensen S, Steffensen MA, Jensen BA, Schluter D, Christensen JP, Thomsen AR. Adenovirus-Based Vaccine against *Listeria monocytogenes*: Extending the Concept of Invariant Chain Linkage. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2013, 191 (8) : 4152-4164.
- [18] Sadegh-Nasseri S, Germain RN. A role for peptide in

determining MHC class II structure. *Nature*, 1991, 353 (6340) : 167-170.

- [19] Sato AK, Zarutskie JA, Rushe MM, Lomakin A, Natarajan SK, Sadegh-Nasseri S, Benedek GB, Stern LJ. Determinants of the peptide-induced conformational change in the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (3) : 2165-2173.
- [20] Gedde-Dahl M, Freisewinkel I, Staschewski M, Schenck K, Koch N, Bakke O. Exon 6 is essential for invariant chain trimerization and induction of large endosomal structures. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (13) : 8281-8287.

Effect difference between two segments in invariant chain CLIP on humoral immune

Ruijing Wang, Fangfang Chen, Weiyi Yu*

Key Laboratory of Zoonoses of Anhui Province, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China

Abstract: [Objective] To compare the effect between two segments (PBS and GBS) of Class II-associated invariant chain peptide (CLIP) of invariant chain (Ii) on humoral immune by immune carrier. [Methods] First six hybrids containing Newcastle disease virus (NDV) epitope F2 and Ii segments (Cyt/TM/F2, Cyt/TM/F2/GBS, Cyt/TM/PBS/F2, Cyt/TM/F2/TRIM, Cyt/TM/F2/GBS/TRIM, Cyt/TM/PBS/F2/TRIM) were reconstructed respectively. Then they were inserted into the prokaryotic expression vector pET-32a and transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) to induce the expression of the recombinant proteins. Finally mice were immunized with these purified fusion proteins, the specific antibody titers were detected with ELISA, to compare and analyze the effect among different groups on the immune response. [Results] All the six groups immunized with these hybrids increased antibody titers (from 1.5-fold to 4.9-fold, respectively) compared with the group immunized with F2 alone. Within the above six groups, the hybrids containing either PBS or GBS had higher antibody titers from 1.6-fold to 2.4-fold than the hybrids without the both segments. However, the group of the hybrid containing PBS had a 1.5-fold antibody titer higher than the group of GBS hybrid. [Conclusion] Ii cytosolic and transmembrane domains could increase the immune response, while the segment PBS behaved better than GBS in an immune vector based on Ii.

Keywords: Invariant chain (Ii), antibody, CLIP

(本文责编:张晓丽)