

HLA-A*2402-BSP 在大肠杆菌中的优化表达及其四聚体的制备和鉴定 Improved Expression of HLA-A*2402-BSP in *Escherichia coli* and Its Tetramer Preparation

贾任涛^{1‡}, 徐丽慧^{2‡}, 李丰耀¹, 查庆兵³, 何贤辉^{1*}

JIA Qian-Tao^{1‡}, XU Li-Hui^{2‡}, LI Feng-Yao¹, ZHA Qing-Bing³ and HE Xian-Hui^{1*}

1 暨南大学生命科学技术学院 组织移植与免疫实验中心 广州 510632

2 暨南大学生命科学技术学院 生物工程研究所 广州 510632

3 暨南大学附属第一医院临床实验中心 广州 510632

1 Institute of Tissue Transplantation and Immunology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Institute of Bioengineering, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

3 Clinical Experimental Center of the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China

摘 要 HLA-A*2402 是中国人群中最常见的等位基因之一,为研究该基因型人群的人巨细胞病毒(HCMV)特异性细胞毒 T 细胞(CTL)免疫应答,需要制备负载相应抗原肽的 HLA-A*2402 四聚体。以 RT-PCR 方法克隆 HLA-A*2402 重链基因的 cDNA,并构建了羧基端融合生物素化酶 BirA 底物肽(BSP)的 HLA-A*2402 重链胞外域融合蛋白(HLA-A*2402-BSP)的表达载体,但该载体不能在大肠杆菌(*E. coli*)中有效表达 HLA-A*2402-BSP 融合蛋白,通过对氨基端(N 端)区域编码区的密码子进行优化,构建了同义突变的 HLA-A*2402-BSP 表达载体,融合蛋白在 *E. coli* 中获得了高效表达。进而制备了负载 HLA-A*2402 限制性 HCMV pp65₃₄₁₋₃₄₉ 抗原肽(QYDPVAALF, QYD)的可溶性 HLA-A*2402-QYD 单体分子和四聚体,获得的四聚体具有与 HLA-A24* 供者抗原特异性 CTL 的结合活性,特异性 CTL 的频率为总 CD8⁺ T 细胞的 0.09%~0.37%。这些结果为进一步研究 HLA-A*2402 限制性的特异性 CTL 免疫应答规律奠定基础。

关键词 四聚体, HLA-A*2402, 巨细胞病毒, 密码子优化, 原核表达, 包涵体

中图分类号 Q78;R392.12 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0284-08

Abstract HLA-A*2402 is one of the most frequently encountered HLA-A alleles in East Asian populations. In order to study the CD8⁺ T cell responses in Chinese populations, we have described the generation and functional test of HLA-A*2402 tetramer loaded with HCMV pp65₃₄₁₋₃₄₉ peptide(QYDPVAALF, QYD). The cDNA of HLA-A*2402 heavy chain was cloned by RT-PCR from one of the donors. DNA fragment encoding the ectodomain of HLA-A*2402 heavy chain fused at its carboxyl-terminal a BirA substrate peptide(BSP) was amplified by PCR with the cloned heavy chain cDNA as a template. The wild-type gene of HLA-A*2402-BSP was not expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*), while mutant HLA-A*2402-BSP gene with optimized codons was overexpressed as inclusion bodies in *E. coli*. Furthermore, the soluble HLA-A*2402-QYD monomers were generated by in vitro refolding of washed inclusion bodies in the presence of β_2 -microglobulin and QYD peptide. The

Received: October 9, 2006; Accepted: November 8, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China(No. 30230350, 30371651 and 30572199).

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-85220679; E-mail: thehx@jnu.edu.cn

‡ 这些作者对本文贡献相等。

国家自然科学基金重点项目资助(No. 30230350);国家自然科学基金面上项目资助(No. 30371651 和 30572199)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

tetramer was subsequently formed by mixing HLA-A*2402-QYD monomers with streptavidin-PE at a molar ratio of 4:1. Flow cytometry analysis indicated that this tetramer possessed binding activity with specific CTL from HLA-A24⁺ donors and the frequencies of tetramer-binding CTL were 0.09% ~ 0.37% within total CD8⁺ T cells. This tetrameric agent provides a powerful tool to explore the secrets of CTL responses against HCMV antigens in HLA-A*2402 individuals.

Key words tetramer, HLA-A*2402, cytomegalovirus, codon optimization, prokaryotic expression, inclusion bodies

抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)是抗细胞内感染和杀伤肿瘤细胞的重要效应细胞,在机体免疫防御中发挥着重要作用^[1]。主要组织相容性复合 I 类分子(MHC I)四聚体技术(tetramer technology)^[2]灵敏度高、特异性强,目前已成为研究 CTL 免疫应答的核心技术^[3,4]。然而四聚体通用性差,每个 MHC I-肽四聚体均需针对特定 MHC I 分子而设计,这是由于 MHC 基因的多态性和 CTL 识别的 MHC 限制性造成的。特定抗原肽和不同的 MHC I 类分子具有不同的亲和力,因此在一定程度上,MHC I 基因型决定个体对特定抗原肽的免疫应答能力。由于 MHC I 类分子为高度的多态性,制备四聚体应该首选基因频率相对较高的等位基因。HLA-A*2402 是东亚群体中最常见的等位基因之一,尤其在日本(基因频率 58.1%)及中国(基因频率 32.9%)群体中常见^[5,6]。

为了建立人类高频 MHC I 类分子四聚体技术平台,本文报道从汉族人中成功克隆 HLA-A*2402 的重链 cDNA,构建了 HLA-A*2402 重链胞外域与 BSP 融合蛋白(HLA-A*2402-BSP)的原核表达载体,然而该融合蛋白在 *E. coli* 未见任何表达。通过同义突变将氨基酸(N端)区域编码区的稀有密码子突变为 *E. coli* 偏好的密码子,并有效降低其 G/C 含量,突变型 HLA-A*2402-BSP (mutant HLA-A*2402-BSP, mHLA-A*2402-BSP)在 *E. coli* 中获得了高水平表达,表明通过密码子优化提高 HLA-A*2402 在 *E. coli* 中的表达策略是成功的。在此基础上复性获得负载 HLA-A*2402 限制性 HCMVpp65₃₄₁₋₃₄₉ 抗原肽(QYDPVAALF, QYD)^[7,8]的可溶性 HLA-A*2402-QYD 单体分子,并制备了具有特异结合活性的 HLA-A*2402-QYD 四聚体,从而为进一步研究 HLA-A*2402 限制性的特异性 CTL 免疫应答的规律打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)菌株、质粒 pET-

3d 购自 Novagen; *Eco*R I、*Nco* I 和 *Bam*H I、T4 DNA 连接酶、高保真 Pyrobest DNA 聚合酶等均为大连 TaKaRa 产品;pEGFP-N1 载体购自 ClonTech;TRIzol 试剂、ThermoScript RT-PCR 系统购自美国 Invitrogen; QIAquick Gel Extraction Kit 为德国 QIAGEN 公司产品;淋巴细胞分离液为挪威 NYCOMED 产品;MonoQ 5/50 GL 购自 Amersham 公司。抗-CD3mAb-FITC、抗-CD8mAb-APC、抗 HLA-A2mAb-FITC 均为 BD PharMingen 公司产品。藻红蛋白-链亲和素(Streptavidin-PE)蛋白分子量标准(DALTON MARK VII-L)为 Sigma 公司产品。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为北京中杉公司进口分装。BirA 购自美国 Avidity 公司。异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)等化学试剂为进口或国产分析纯试剂。源自 HCMV pp65 的 HLA-A*2402 限制性抗原肽 QYDPVAALF^[7,8](简称 QYD),由上海英骏生物公司(Shanghai Invitrogen Biotechnology Co)用固相 Fmoc 法合成,经 HPLC 纯化,纯度大于 95%,以 DMSO 溶解,浓度为 10g/L,分装后存 -70 $^{\circ}$ C 备用。小鼠抗人 HLA-A*0201 抗血清按前文^[9]方法制备。

1.2 方法

1.2.1 人白细胞总 RNA 抽提及 cDNA 合成:取 HLA-A2⁻(经 HLA-A2-FITC 染色后以流式细胞仪分析确定)的健康成年志愿者肝素抗凝静脉 3mL,以淋巴细胞分离液分离 PBMC,以 TRIzol 试剂提取总 RNA,按试剂盒建议的方法进行逆转录反应,合成第一链 cDNA,即可用于 PCR 扩增或存 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 HLA-A*2402 重链 cDNA 的克隆扩增:参照 IMGT/HLA 库的 HLA-A*2402 基因序列设计引物,前向引物为 5'-ACTAGAATTCGCCACCATGGCCGTCATGGCGCC-3',逆向引物为 5'-CGCGGGATCCCCGCACTTTACAAGCTGTGAGAGACAC-3',引物由上海英骏生物公司(Shanghai Invitrogen Biotechnology Co)合成。PCR 反应在 50 μ L 总体积中进行,以 1 μ L 第一链 cDNA 为模板,反应条件为在 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min 后开

始循环,即 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1.5min, 共 35 个循环后,于 72℃ 延伸 10min。PCR 产物以 QIAquick Gel Extraction Kit 从凝胶中回收, *EcoR* I + *Bam*H I 双酶切并再次从凝胶中回收,与经 *EcoR* I + *Bam*H I 双酶切的 pEGFP-N1 载体连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,以碱裂解法从转化子中提取质粒,双酶切法筛选正确接入外源基因的转化子,克隆的基因序列由上海英骏公司测定。

1.2.3 融合 BSP 的 HLA-A*2402 重链胞外域 (HLA-A*2402-BSP) 表达载体的构建:重链胞外域羧基端 1-276 氨基酸序列的编码区与 BSP (LHHILDAQKVMWNHR) 的编码区片段连接,其表达载体的构建方法如下:根据编码成熟 HLA-A*2402 的基因序列设计前向引物为 5'-ATA TCC ATG GGT TCT CAC TCC ATG AGG TAT TTC-3', 逆向引物为 5'-A ATA GGA TCC TTA ACG ATG ATT CCA CAC CAT TTT CTG TGC ATC CAG AAT ATG ATG CAG AGA GCC GGG CTG GGA AGA CGG CTC CCA TCT CAG GGT GA -3'(其中包含编码 Gly-Ser 接头和 BSP 的 DNA 序列);并根据编码成熟 HLA-A*2402 的 DNA 序列及 *E. coli* 密码子偏好性,将氨基端(N端)区域编码区中 *E. coli* 使用频率极低的密码子,用同义密码子替换,编码的氨基酸不变,设计突变前向引物为 5'-ATA TCC ATG GGT AGT CAT TCT ATG CGT TAT TTT TCT ACC TCT GTG TCC CGG CCC-3', 逆向引物同前,以克隆的 HLA-A*2402 cDNA 为模板,按上述方法(退火温度为 48℃,其余同上)扩增编码 HLA-A*2402 胞外域的 DNA 片段,经 *Nco* I + *Bam*H I 双酶切、连接至表达载体 pET-3d,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞、筛选转化子,以 *Nco* I + *Bam*H I 双酶切鉴定阳性克隆,从中提取质粒测序鉴定。

1.2.4 HLA-A*2402-BSP 及 mHLA-A*2402-BSP 的表达和鉴定:方法同文献[10, 11]。表达质粒转化 BL21(DE3),以 IPTG 诱导融合蛋白表达。将表达的融合蛋白进行 150g/L SDS-PAGE 分离,然后以 15V 电压转移 16h,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,膜浸于 0.1% 丽春红(Ponceau S, 含 1% 乙酸)染色液于室温振荡 3min,以不退色墨水标记蛋白质分子质量标准位置,去离子水漂洗 10min 后膜以封闭液(Tris-Buffered-Saline, pH 7.5, 含 30mL/L 小牛血清和 0.5mL/L Tween 20)于 37℃ 振荡封闭 30min。依次加入 1:3 000 鼠抗人 HLA-A*0201 抗血清(37℃ 温育

2h,洗膜)及 1:2 000 HRP-羊抗鼠 IgG(37℃ 温育 1.5h,洗涤)。以 DAB 底物溶液显色后,用 Alpha 成像系统(Alpha Innotech FluorChem SP)成像。

1.2.5 包涵体的纯化:按前文[12]报道的方法对包涵体进行洗涤纯化、溶解和定量分析。

1.2.6 HLA-A*2402-QYD 单体的制备及其生物素化:负载抗原肽的可溶性 HLA-A*2402-QYD 单体是在同时存在 HLA-A*2402-BSP、 β_2 微球蛋白(β_2m)按文献[10]的方法制备)及 HLA-A*2402 限制性抗原肽 QYD 的情况下通过稀释法复性而获得,方法与文献[11]报道的稀释法基本相同。然后按生物素化酶 BirA 供应商建议的方法,将 HLA-A*2402-QYD 单体进行生物素化修饰。反应完成后,对 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)透析,上样至阴离子交换树脂(MonoQ 5/50 GL)柱中,以 0~300mmol/L NaCl 进行线性梯度洗脱(Amersham ÄKTÄ UPC-9000)。SDS-PAGE 进行分析后,合并含 HLA-A*2402-QYD(同时含重链和轻链 β_2m)的洗脱峰,透析后以 Amicon Ultra-4 (MWCO 10000)离心超滤浓缩至 300 μ L 左右,加 4mL PBS(含 0.2mmol/L PMSF 和 2mmol/L EDTA)后,再浓缩至 300 μ L,按上述方法测定蛋白浓度,置 4℃ 备用。

1.2.7 HLA-A*2402-QYD 四聚体的制备和鉴定:将 HLA-A*2402-QYD 与 Streptavidin-PE 按 4:1 的比例混合后即可形成四聚体。样品液中不加还原剂,也不经加热处理而直接上样,以 SDS-PAGE 鉴定生物素化的程度。

1.2.8 四聚体结合活性的流式细胞术分析:取经 HLA 分型的 HLA-A24⁺ 志愿者的静脉血(肝素抗凝) 100 μ L,加入 1 μ g HLA-A*2402-QYD 四聚体或相应量的 Streptavidin-PE(为阴性对照组),于 37℃ 避光反应 20min 后,再加入 20 μ L 抗-CD8 mAb-APC 和 20 μ L 抗-CD3 mAb-FITC,于 4℃ 避光温育 20min。然后加入 3mL 红细胞裂解液,于室温避光放置 6~8min,离心弃上清,以含 10mL/L 小牛血清的 PBS 洗涤 2 次,加 0.3mL 40g/L 多聚甲醛固定 15min,以流式细胞仪(FACSCalibur, Becton Dickinson)收集 300 000 个细胞的参数,用 CELLQuest 软件分析 CD8⁺ T 细胞中 HLA-A*2402-QYD 四聚体阳性细胞的比率。

2 结果

2.1 HLA-A*2402 重链基因 cDNA 的克隆及其序列测定

根据 HLA-A*2402 基因序列设计引物,从四位

经流式细胞仪分析表明均为 HLA-A2⁻ 的汉族人中分离 PBMC,提取的总 RNA 逆转录第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应,均扩增出与预计大小(1 100 bp)相符的 DNA 片段(图 1,泳道 2~5)。扩增出的 DNA 片段经 *Nco* I + *Bam*H I 双酶切后,分别与 pEGFP-N1 连接,转化 *E. coli* DH5 α ,各选取 4 个菌落

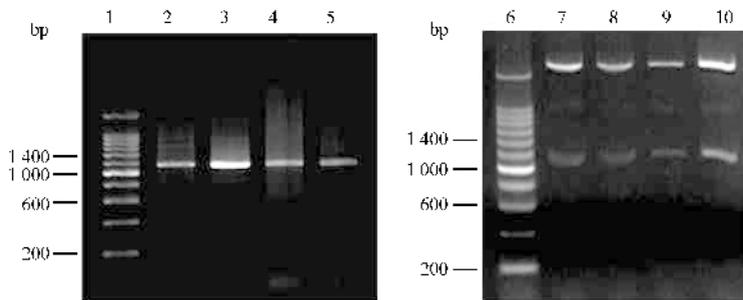


图 1 HLA-A*2402 重链 mRNA 的 RT-PCR 扩增及其重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products for mRNA of HLA-A*2402 heavy chain and restrictive enzyme digestion of the recombinant vectors containing HLA-A*2402 cDNA

1,6:200bp DNA ladder;2~5:RT-PCR products from 4 donors;7~10:recombinant vectors cut with *Eco*R I and *Bam*H I.

2.2 HLA-A*2402-BSP 及 mHLA-A*2402-BSP 原核表达载体的构建

根据 Altman 等^[2]的策略,通过 PCR 方法将编码 HLA-A*2402 重链胞外域 1-276 氨基酸序列的编码区与 BSP 的编码区片段连接,两者间包含编码 Gly-Ser 接头的编码序列,分别采用针对野生型及同义突变型序列的编码区作为引物,以克隆的 HLA-A*2402 的 cDNA 为模板,均扩增出长度约 900bp 的 DNA 片段(图 2,泳道 2),经 *Nco* I + *Bam*H I 双酶

抽提质粒,经 *Nco* I + *Bam*H I 双酶切鉴定表明所有质粒均已插入预计大小的外源片段(图 1,泳道 7~10),序列分析显示从供者 3 克隆的 cDNA 编码 HLA-A*2402 重链,该 cDNA 序列已在 GenBank 登记,登录号为 DQ327722。

切、连接至 pET-3d 载体,筛选接入目的基因的阳性克隆(图 2,泳道 4~7),经测序验证均插入序列为正确的目的基因,含起始密码 ATG 和终止密码 TAA,表明成功构建 HLA-A*2402-BSP(图 2A)及 mHLA-A*2402-BSP(图 2B)的原核表达载体。载体测序结果表明定点突变位点正确,突变后的 HLA-A*2402-BSP 上稀有密码子发生突变,而编码的氨基酸无变化,同实验设计完全一致。这两个重组载体分别称为 pET/HLA-A*2402-BSP 和 pET/mHLA-A*2402-BSP。

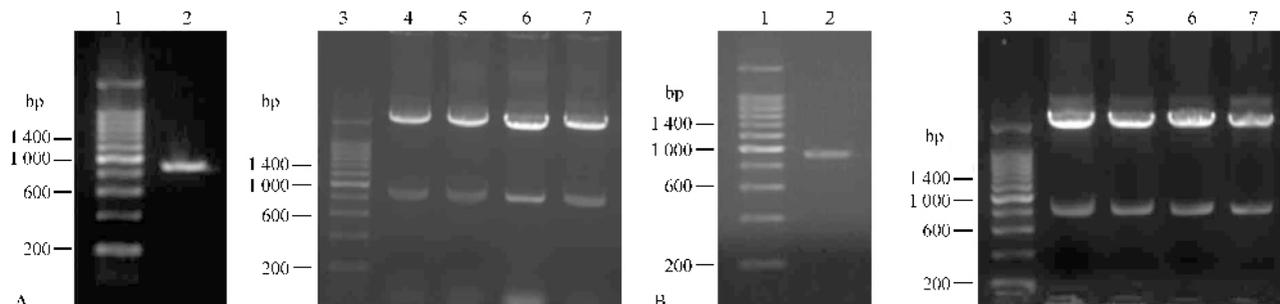


图 2 PCR 扩增 HLA-A*2402-BSP(A)和 mHLA-A*2402-BSP(B) DNA 片段及其重组质粒酶切鉴定

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR product for HLA-A*2402-BSP(A) and mHLA-A*2402-BSP(B) and restrictive enzyme digestion of the recombinant vectors

1,3:200 bp DNA ladder;2:PCR product for HLA-A*2402-BSP(A) and mHLA-A*2402-BSP(B);4~7:recombinant vectors cut with *Nco* I and *Bam*H I.

2.3 HLA-A*2402-BSP 及 mHLA-A*2402-BSP 在 *E. coli* 中的表达及鉴定

将构建的重组质粒转化 BL21(DE3),按常规方

法诱导重组蛋白表达。SDS-PAGE 分析表明,HLA-A*2402-BSP 工程菌未见外源蛋白表达(图 3A,泳道 4),mHLA-A*2402-BSP 工程菌以 IPTG 于 37℃ 诱导

4 h 后, 相对分子质量 34.5 kD (美国 Alpha Innotech 公司 AlphaEaseFC 软件分析) 的外源蛋白表达水平大大提高, 该蛋白分子量与 HLA-A*2402-BSP 理论分子量一致, 约占菌体总蛋白的 20% (图 3A, 泳道 6)。大部分重组蛋白以包涵体形式存在于沉淀部分, 上清液中基本没有 mHLA-A*2402-BSP (图 4A, 泳道 5)。免疫印迹分析显示, HLA-A*2402-BSP 工程菌未见任何特异性反应条带 (图 3B, 泳道 4), mHLA-A*

2402-BSP 工程菌在 IPTG 诱导 4 h 后, 预期位置即相对分子质量 34.5 kD 处有明显与鼠抗人 HLA-A*0201 抗血清有特异性反应的蛋白条带, 而无 IPTG 诱导菌体中也有特异性反应条带 (图 3B, 泳道 5 和 6)。重组蛋白完全存在于沉淀中, 上清液中未见表达 (图 4B)。这表明重组蛋白 mHLA-A*2402-BSP 在 *E. coli* 中以包涵体形式获得高效表达。

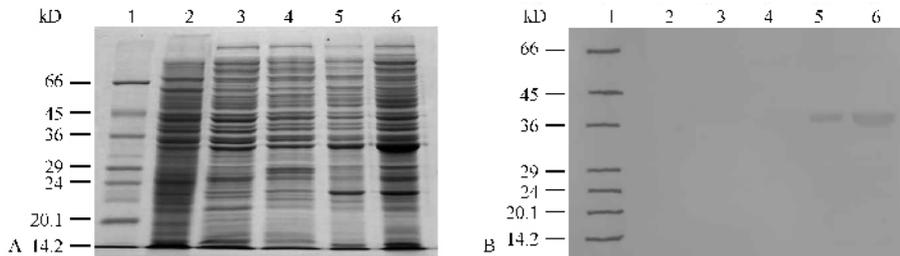


图 3 大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达的 HLA-A*2402-BSP 及 mHLA-A*2402-BSP 的 SDS-PAGE (A) 及免疫印迹 (B) 分析结果

Fig.3 SDS-PAGE (A) and immunoblotting (B) analyses of HLA-A*2402-BSP and mHLA-A*2402-BSP expressed in *E. coli* strain BL21(DE3)

1: protein MW standards; 2: BL21(DE3) transformed with pET-3d; 3: BL21(DE3) transformed with pET/HLA-A*2402-BSP before IPTG induction; 4: BL21(DE3) transformed with pET/HLA-A*2402-BSP induced with IPTG for 8h; 5: BL21(DE3) transformed with pET/mHLA-A*2402-BSP before IPTG induction; 6: BL21(DE3) transformed with pET/mHLA-A*2402-BSP induced with IPTG for 8h.

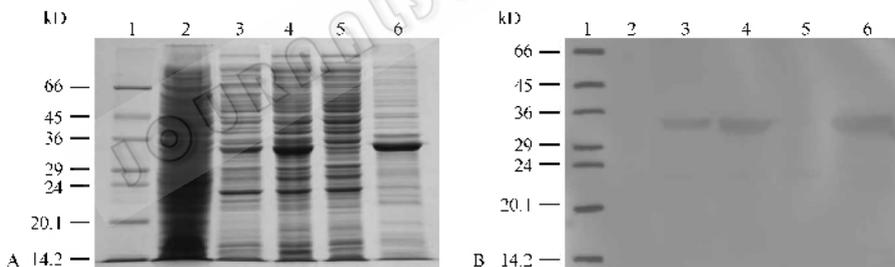


图 4 大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达的 mHLA-A*2402-BSP 的 SDS-PAGE (A) 及免疫印迹 (B) 分析结果

Fig.4 SDS-PAGE (A) and immunoblotting (B) analyses of mHLA-A*2402-BSP expressed in *E. coli* strain BL21(DE3)

1: protein MW standards; 2: BL21(DE3) transformed with pET-3d; 3: BL21(DE3) before IPTG induction; 4: BL21(DE3) induced with IPTG for 8h; 5: supernatant of IPTG-induced BL21(DE3) bacterial lysates; 6: washed inclusion body of IPTG-induced BL21(DE3).

2.4 单体 HLA-A*2402-QYD 的制备及其生物素化

HLA-A*2402-QYD 单体通过稀释复性法进行复性。复性后的可溶性 HLA-A*2402-QYD 单体经 SDS-PAGE 显示两条主带, 即 M_r 约 34kD 的重链和 M_r 为 12kD 的轻链 β_2m (图 5, 泳道 2)。生物素化的 HLA-A*2402-QYD 单体经阴离子交换树脂纯化, 以 NaCl 线性梯度洗脱出现 2 个主峰。SDS-PAGE 分析显示, 第 I 峰为轻链 β_2m , 第 II 峰为可溶性 HLA-A*2402-QYD 单体 (图 5, 泳道 3)。将含纯 HLA-A*2402-QYD 单体的组分合并, 以超滤浓缩后蛋白的浓度为 1g/L。

2.5 HLA-A*2402-QYD 四聚体的制备

将生物素化的 HLA-A*2402-QYD 可溶性单体按 4:1 比例与链亲和素-PE 混合后, 即可形成四聚体。由于链亲和素与生物素形成的复合物, 即使以 SDS 处理, 若无还原剂并且不对样品进行煮沸处理, 就不会解离, 故可利用 SDS-PAGE 对四聚体形成的程度进行估计。HLA-A*2402-QYD 单体在非还原条件下且不经煮沸处理时, 电泳后显示 M_r 为 34 kD 的重链和 M_r 为 12kD 的轻链 β_2m 两条主带 (图 5 泳道 5)。经分析 (美国 Alpha Innotech 公司 AlphaEaseFC 软件) 显示, 四聚体中重链条带约为单体的 19% (图 5 泳

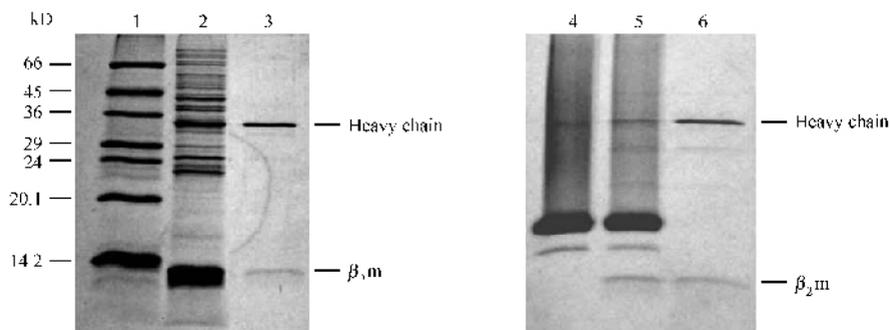


图 5 HLA-A* 2402-QYD 单体和四聚体的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of HLA-A* 2402-QYD monomer and tetramer

1 : protein MW standards ; 2 : refolded HLA-A* 2402-QYD monomer ; 3 : purified and biotinylated HLA-A* 2402-QYD monomer ; 4 : Avidin ; 5 : HLA-A* 2402-QYD tetramer ; 6 : HLA-A* 2402-QYD monomer.

道 6) ,表明约 81% 的单体已与链亲和素结合形成了四聚体。

2.6 HLA-A* 2402-QYD 四聚体的结合活性

为了验证 HLA-A* 2402-QYD 四聚体与特异性 CTL 的结合活性 ,以该四聚体对 HLA-A24⁺ 供者全血进行三荧光染色 ,阴性对照组以荧光标记的链亲和素代替四聚体 ,以 FACSCalibur 流式细胞仪 CELLQuest 软件获取和分析。先在 FSC-SSC 二维散

点图上划出淋巴细胞区 ,再利用抗-CD3mAb-FITC 在总 T 细胞上设门 ,然后分析 CD8⁺ T 细胞中 HLA-A* 2402-QYD 四聚体阳性细胞的比率(图 6) 。结果显示 ,该四聚体能在 HLA-A24⁺ 供者中染出 HCMV 特异性 CTL。右上象限即为 HCMV QYD 特异性的 CTL ,其比例约为总 CD8⁺ T 细胞的 0.09% ~ 0.37% ,而阴性对照组未发现四聚体特异性的 CD8⁺ T 细胞 ,表明该四聚体具有与 CTL 特异性结合的特性。

3 讨论

自 1996 年 Altman 等^[2]首次利用四聚体技术来检测抗原特异性 T 细胞以来 ,该技术在基础和临床免疫学研究中得到广泛应用 ,目前已经成为研究抗肿瘤、细胞内感染以及自身免疫疾病的内在机制的核心技术^[3,4]。MHC I 类分子是由高度多态的重链 α 与保守的轻链即 β_2m 组成的异源二聚体^[13] ,HLA-A 是人类重要的 MHC I 类分子 ,分布于几乎所有有核细胞表面 ,其中 HLA-A24 超型是许多种群中最为常见的等位基因之一 ,在亚洲尤其是中国及日本人群中高度表达 (日本 60% ,中国 33% ,西班牙 27% ,高加索 17% ,非裔美国人 9%)^[5,6]。与 HLA-A2 超型的高度异质不同 ,HLA-A24 超型且具有高度同源性 ,有研究表明 90% 的 HLA-A24 属于 HLA-A* 2402 亚型^[5,6]。这说明 HLA-A* 2402 值得制备相应的四聚体 ,以便对该基因型的个体的免疫应答进行研究。本研究选择了 HLA-A* 2402 限制性的 HCMV 免疫优势抗原肽 pp65₃₄₁₋₃₄₉ (QYD)^[7,8] ,成功制备了 HLA-A* 2402-QYD 四聚体 ,为研究中国人群中 HLA-A24⁺ 个体中 HCMV 特异性细胞免疫应答提供了有

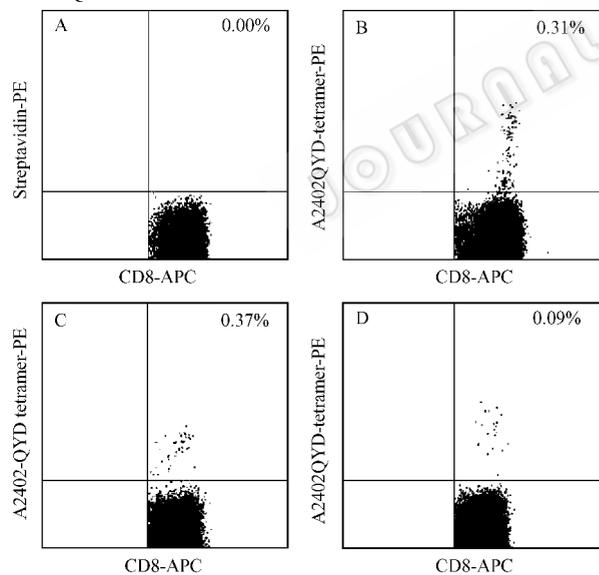


图 6 HLA-A* 2402-QYD 四聚体与 HCMV 特异性 CTL 结合的流式细胞术分析

Fig. 6 Flowcytometry analysis of binding of HCMV antigen-specific CTLs to HLA-A* 2402-QYD tetramers

A : Streptavidin-PE staining of whole blood from one HLA-A24⁺ donor ; B , C , D : HLA-A* 2402-QYD tetramer staining of whole blood from three HLA-A24⁺ donors , respectively. The data stand for the percentages of HLA-A* 2402-QYD tetramer-positive CTLs within CD8⁺ T cells.

利条件。

为合成可溶性 MHC-抗原肽四聚体,需要大量制备和初步纯化重链蛋白^[11]。但在 *E. coli* 中表达人源基因受到很多因素的影响,如表达载体的拷贝数和稳定性,翻译起始效率以及重组蛋白的稳定性^[14]。其中翻译起始效率跟 mRNA 5' 氨基端(N 端)区域编码区二级结构的稳定性以及稀有密码子的使用频率有着很大的关系^[14]。由于遗传密码子的简并性,绝大多数氨基酸都由几种密码子来编码,*E. coli* 对编码同一种氨基酸的各种密码子的使用频率并不相同,甚至相差很大。某些稀有密码子,尤其是稀有密码子密集区往往成为制约翻译速率的因素,这种偏好性密码子的使用程度与其表达水平之间存在强相关性^[15]。如编码精氨酸的 AGA 和 AGG 为 *E. coli* 众多稀有密码子之一,这样编码的氨基酸序列很难在 *E. coli* 中表达的。未经修饰的人 HLA-A*2402 重链基因氨基端(N 端)区域编码区中含有许多 *E. coli* 稀有密码子。本研究表明野生型 HLA-A*2402 重链分子在原核表达载体中未见任何表达,说明稀有密码子的使用确实限制了该基因的表达。根据 *E. coli* 基因中密码子的使用频率,将 HLA-A*2402 重链分子氨基端(N 端)区域编码区中稀有密码子突变为 *E. coli* 偏好的密码子,并有效降低其 G/C 含量。结果显示 mHLA-A*2402-BSP 在 *E. coli* 获得了高效表达,再次证明氨基端(N 端)区域编码区的稀有密码子对 HLA-A*2402-BSP 在 *E. coli* 中的表达水平有很大影响,也证明通过密码子优化提高 HLA-A*2402 在 *E. coli* 中的表达策略是成功的。此外,SDS-PAGE 和免疫印迹分析显示表达的重链蛋白与抗 HLA-A*0201 抗血清有反应性,表明该蛋白与 HLA-A*0201 有较高的同源性。由于表达率高,突变型 HLA-A*2402-BSP 在 *E. coli* 获得高水平表达的产物完全存在于包涵体中,由于包涵体相对易于纯化,这对该融合蛋白的大量制备及进一步的复性工作是极为有利的,因为可溶性 pMHC 的复性并不需要可溶性表达产物^[11,13]。

目前已证实源于 HCMV_{pp65} 的 CTL 表位为许多 HLA I 类分子等位基因(如 HLA-A*0201、HLA-A*1101、HLA-B*0702)的优势表位,特别是 HLA-A*0201-NLV 四聚体被广泛应用于对 HCMV 特异性 CTL 的表型及功能分析^[3,4]。已明确的 HLA-A*2402

限制性的 HCMV 优势表位为源自 pp65₃₄₁₋₃₄₉ 抗原肽(QYDPVAALF, QYD)^[7,8]。我们以合成的 QYD 肽与 HLA-A*2402-BSP 和 β_2m ^[10] 复性,获得了可溶性 HLA-A*2402-QYD 单体和四聚体,说明了 QYD 肽确实可与 HLA-A*2402 结合,促进后者正确折叠为可溶性复合体分子。本研究中以 HLA-A*2402-QYD 四聚体对 3 例 HLA-A24⁺ 供者染色结果显示,HLA-A*2402-QYD 四聚体特异性 CTL 的频率约为 0.09%~0.37%,而阴性对照组未发现四聚体特异性的 CD8⁺ T 细胞,表明该四聚体具有高度的特异性和亲和力(avidity),可用于分析 QYD 特异性 CTL 的频率、表型和功能等特性。

HCMV 是一种广泛存在的常见双链 DNA 的 β 疱疹病毒,其感染普遍存在于所有人群中^[16-18]。在大多数发展中国家包括中国在内,初次感染 HCMV 常发生于婴幼儿期并终生潜伏感染,成人中感染率为 100%;在条件较好的发达国家成年人血清中 HCMV 抗体检出率约 50%,且随年龄增加而增长,经济水平较低人群中相对较高^[16,18]。在免疫功能正常个体通常不产生任何明显临床症状或损害,但免疫功能低下者如器官移植患者和 HIV 感染者等,可发生严重的 CMV 疾病,通常表现为发热、白细胞减少、肝脾肿大、肌痛、肺炎、胃肠疾病等症状,脉络膜视网膜炎为 AIDS 的重要并发症^[16-18]。在免疫系统发育未成熟的儿童中,先天性 HCMV 可能引起严重的巨细胞性包涵体病(CID, cytomegalic inclusion disease)^[18]。再者,最近研究表明,HCMV 血清阳性和免疫衰老的许多生物标记相关,是预测老年群体死亡率的免疫参数之一,这表明 HCMV 慢性感染是免疫衰老以及相关死亡率的重要因素^[19,20]。利用我们制备的 HLA-A*2402-QYD 四聚体将可以用于详细分析 HLA-A24⁺ 个体中 HCMV 特异性 CTL 的频率和功能状态,从而为分析机体的细胞免疫功能与免疫衰老的相关性提供有价值的信息。

总之,我们克隆了 HLA-A*2402 重链基因的 cDNA,通过密码子优化策略使 mHLA-A*2402-BSP 重组蛋白在 *E. coli* 获得了高效表达,并成功制备了负载 HLA-A*2402 限制性 HCMV 抗原肽 QYD 的可溶性 HLA-A*2402-QYD 四聚体,为进一步研究 HLA-A*2402 限制性的特异性 CTL 免疫应答的规律奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Harty JT, Tivnereim AR, White DW. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*, 2000, **18**(1):275-308.
- [2] Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [Published erratum appears in *Science* 1998, **280**(5371):1821]. *Science*, 1996, **274**(5284):94-96.
- [3] Meidenbauer N, Hoffmann TK, Donnenberg AD. Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC-class I tetrameric complexes. *Methods*, 2003, **31**(2):160-171.
- [4] Appay V, Rowland-Jones SL. The assessment of antigen-specific CD8 T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *J Immunol Methods*, 2002, **268**(1):9-19.
- [5] Date Y, Kimura A, Kato H, *et al.* DNA typing of the HLA-A gene: population study and identification of four new alleles in Japanese. *Tissue Antigens*, 1996, **47**(2):93-101.
- [6] Imanishi T, Akaza T, Kimura A, *et al.* Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic group. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, eds. HLA 1991. Oxford: Oxford University Press, 1992, pp. 1065-1220.
- [7] Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, *et al.* Efficient identification of HLA-A* 2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay. *Blood*, 2001, **98**(6):1872-1881.
- [8] Akiyama Y, Maruyama K, Mochizuki T, *et al.* Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope encoded by the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus. *Immunol Lett*, 2002, **83**(1):21-30.
- [9] Xu LH(徐丽慧), Hong AC(洪岸), He XH(何贤辉), *et al.* Prokaryotic expression of recombinant human bFGF and production of high titer anti-serum against bFGF. *Immunological Journal*(免疫学杂志) 2005, **21**(3):186-189.
- [10] He XH(何贤辉), Xu LH(徐丽慧), Liu Y(刘毅), *et al.* Cloning of human beta2-microglobulin gene and its high expression in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2004, **20**(1):99-103.
- [11] He XH, Xu LH, Liu Y. Procedure for preparing peptide-major histocompatibility complex tetramers for direct quantification of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**(27):4181-4184.
- [12] He XH(何贤辉), Xu LH(徐丽慧), Liu Y(刘毅), *et al.* Preparation and characterization of HLA-A* 0201 monomer and tetramer loaded with HCMV antigenic peptide. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2004, **20**(3):382-388.
- [13] Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(8):3429-3433.
- [14] Kimura S, Iyanagi T. High-level expression of porcine liver cytochrome P-450 reductase catalytic domain in *Escherichia coli* by modulating the predicted local secondary structure of mRNA [Erratum in: *J Biochem (Tokyo)*, 2005, **137**(6):757]. *J Biochem (Tokyo)*, 2003, **133**(3):403-413.
- [15] Sinclair G, Choy FY. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2002, **26**(1):96-105.
- [16] Sissons JG, Carmichael AJ, McKinney N, *et al.* Human cytomegalovirus and immunopathology. *Springer Semin Immunopathol*, 2002, **24**(2):169-185.
- [17] Harari A, Zimmerli SC, Pantaleo G. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol*, 2004, **65**(5):500-506.
- [18] Reddehase MJ. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**(11):831-844.
- [19] Pawelec G, Akbar A, Caruso C, *et al.* Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev*, 2005, **205**(1):257-268.
- [20] Koch S, Solana R, Dela Rosa O, *et al.* Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: a mini review. *Mech Ageing Dev*, 2006, **127**(6):538-543.