

可溶性人类白细胞抗原 F 和分化簇 8 α 同二聚体的表达、纯化与相互作用

罗开华, 樊峥, 李宏滨, 刘一苇

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 为了获得大量可溶性人类白细胞抗原 F (Human leukocyte antigen F, HLA-F) 和分化簇 8 α 同二聚体 (Cluster of differentiation 8 α homodimers, CD8 $\alpha\alpha$) 蛋白并对它们的相互关系进行研究, 通过同义突变的方法改变了 HLA-F 和 CD8 $\alpha\alpha$ 基因序列 N 端的大肠杆菌稀有密码子, 获得了高效表达的 HLA-F 和 CD8 $\alpha\alpha$ 包涵体蛋白; 所表达的蛋白通过稀释法复性后, 分别进行了凝胶过滤层析和离子交换纯化。经凝胶过滤层析和 native-PAGE 检测, 推测 HLA-F 与 CD8 $\alpha\alpha$ 间具有相互作用。该相互作用可能影响其他 MHC 分子与 CD8 $\alpha\alpha$ 结合, 从而调节免疫反应。研究结果对了解和进一步深入研究 HLA-F 的功能提供了线索。

关键词: HLA-F, CD8 $\alpha\alpha$, 同义突变, 分子相互作用

Expression, purification and interaction of human leukocyte antigen F and cluster of differentiation 8 α homodimers

Kaihua Luo, Zheng Fan, Hongbin Li, and Yiwei Liu

Institute of Microbiology, Chinese Academic of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: To obtain large quantity of human leukocyte antigen F (HLA-F) and cluster of differentiation 8 α homodimers (CD8 $\alpha\alpha$) proteins and to study their relationship, HLA-F and CD8 α genes with rare codon in *Escherichia coli* were cloned using an N-terminal synonymous mutation method. High-efficiency expression protein inclusion bodies were acquired. The proteins were refolded using the dilution method and purified with gel-filtration and anion exchange chromatography. The results of gel-filtration and native-PAGE indicate that HLA-F interacts with CD8 $\alpha\alpha$. This interaction may affect the binding between CD8 $\alpha\alpha$ and other MHC molecules to regulate immune responses. These results provide a basis for further research of HLA-F.

Keywords: HLA-F, CD8 $\alpha\alpha$, synonymous mutation, molecular interaction

Received: March 3, 2011; **Accepted:** April 29, 2011

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB833602).

Corresponding author: Yiwei Liu. Tel/Fax: +86-1064807376; E-mail: liuyw@im.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB833602) 资助。

主要组织相容性抗原复合物 I 类分子 (Major histocompatibility complex class I, MHC I) 分为典型 MHC I 类分子 (MHC I a) 和非典型 MHC I 类分子 (MHC I b)^[1-2]。MHC I a 分子表达在大多数体细胞表面, 它们将抗原多肽呈递给 T 细胞参与天然免疫反应。MHC I b 分子的功能与免疫调节相关, 主要通过免疫抑制受体的相互作用来调节 T 细胞活性。在人体中, MHC I b 主要分为 3 类基因: *HLA-E*、*HLA-F* 和 *HLA-G*^[3-5]。

HLA-E 在机体组织中广泛表达, 它结合的多肽大部分来自其他 MHC 分子的前导序列。*HLA-E* 通过与 NK 细胞和 T 细胞亚群表面表达的 *CD94/NKG2* 受体相互作用产生免疫抑制效应^[6-10]。*HLA-G* 是一种在母婴绒毛膜外滋养层细胞 (EVTs) 表面大量表达的基因, 它通过与免疫细胞表面表达的免疫球蛋白样转录分子 2 (Immunoglobulin-like transcript 2, *ILT2*) 和 *ILT4* 抑制受体相互作用从而诱导母婴免疫耐受^[11-13]。与其他的 MHC I 类分子相比, *HLA-F* 基因在灵长类动物中是高度保守的, 因此 *HLA-F* 可能在免疫系统具有重要功能^[14-15]。绝大多数 MHC I 类分子与 β_2 -微球蛋白 (β_2 -microglobulin, β_2m) 和抗原多肽形成 MHC : β_2m : 多肽的三元复合物, 抗原多肽是 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 的结合识别部位, 特异的抗原多肽将诱导特异性免疫反应。*HLA-F* 与 β_2m 形成一个二元复合物, 并不结合抗原多肽, 因此 *HLA-F* 不能引起 T 细胞针对特定抗原的免疫反应^[16-17]。虽然 *HLA-F* 被证明与 *ILT2*、*ILT4* 和开放构象的 MHC 具有相互作用, 但其功能仍然未被完全阐明^[18]。

CD8 α 的二元复合物 *CD8 $\alpha\alpha$* 是免疫共受体分子, MHC I 类分子只有同时结合 TCR 和 *CD8 $\alpha\alpha$* 才能激活 T 细胞产生免疫反应^[19]。MHC I 类分子的三元复合物能够与 *CD8 $\alpha\alpha$* 结合, 而 *HLA-F* 是否与 *CD8 $\alpha\alpha$* 相互作用尚未见文献报道。本研究对 *HLA-F* 和 *CD8 α* 基因序列进行同义突变, 重组后的基因以蛋白包涵

体形式表达, 通过稀释法复性后用凝胶过滤层析和离子交换法纯化, 通过凝胶过滤层析和 Native-PAGE 研究 *HLA-F* 与 *CD8 $\alpha\alpha$* 相互作用。

1 材料与方法

1.1 N 端序列突变及突变序列扩增

从质粒载体中扩增出不含信号序列和跨膜结构域的 *HLA-F* 序列 (成熟蛋白 1-280aa) 和 *CD8 α* (成熟蛋白 1-114aa) 及全长 β_2m 序列。携带 *HLA-F* 基因全序列的 pOTB7 载体和含全序列的 β_2m 、*CD8 α* 的 pCMV-SPORT6 质粒购于 Proteintech 公司。预实验结果表明, 直接将 *HLA-F* 与 *CD8 α* 编码序列重组进入 pET21a (Invitrogen, 美国) 质粒无法获得目的蛋白的大量表达。分析发现 *HLA-F* 和 *CD8 α* 序列的 N 端编码区含有大肠杆菌稀有密码子。稀有密码子对大肠杆菌表达具有重要影响, 突变稀有密码子能显著提高外源蛋白的表达水平^[20]。按图 1 所示, 设计 N 端同义突变引物, PCR 扩增出突变序列, 将突变后的序列重组到 pET21a 质粒中, 筛选阳性克隆并测序。

1.2 目的蛋白的表达及细胞破碎

分别将携带 *HLA-F*、*CD8 α* 及 β_2m 的 pET21a 质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。挑取平板上的单菌落接种于 5 mL 含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 培养基中, 过夜培养后接种于 500 mL 含 Amp 的 LB 进行摇瓶培养, 37 °C 振荡 3 h 后加入 IPTG (德国, Merck) 至终浓度为 0.001 mol/L, 诱导表达 15 h 后取样, SDS-PAGE 检测。4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 超声破碎后 12 000 r/min 离心 10 min, SDS-PAGE 检测目的蛋白表达量及在上清和沉淀中的分布。



图 1 *CD8 α* 和 *HLA-F* 基因 N 端突变前后序列比对结果
Fig. 1 Sequences alignment figure of *CD8 α* and *HLA-F* with their N terminal mutation.

1.3 包涵体的提取与溶解

SDS-PAGE 检测发现目的蛋白均以包涵体形式表达。分别将 *HLA-F*、*CD8 α* 及 β_2m 诱导表达后的菌液 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入 50 mL PBS (pH 7.4, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.4 mmol/L KH_2PO_4) 吹打重悬离心沉淀物。超声破碎 (400 W 100 次), 12 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀。用包涵体洗涤液 (0.5% Triton-100, 50 mmol/L Tris (pH 8.0), 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 二硫苏糖醇) 反复洗涤纯化颗粒沉淀物。称量包涵体沉淀, 用包涵体溶解液溶解沉淀 (pH 8.0, 6 mol/L 盐酸胍, 10% 甘油, 50 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 二硫苏糖醇) 使包涵体蛋白浓度达到 30 g/L。SDS-PAGE 检测和分析提取的包涵体蛋白。

1.4 包涵体蛋白复性

溶解的 *HLA-F*、 β_2m 和 *CD8 α* 包涵体蛋白分别采用稀释法复性。把 120 mg β_2m 滴入 500 mL 复性缓冲液 (pH 8.0, 400 mmol/L L-精氨酸, 100 mmol/L Tris, 2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽), 4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 1 h 后滴入 360 mg 的 *HLA-F*。搅拌 12 h 后静置 24 h, 将复性液用切向流系统 (Millipore, 法国) 浓缩, 随后用截留分子量 5 kDa 的超滤离心管离心浓缩。

1.5 复性蛋白的纯化

浓缩后的蛋白复性缓冲液在超滤离心管中置换成分子筛缓冲液 (pH 8.0, 10 mmol Tris, 150 mmol NaCl, 1 mmol/L EDTA)。换液后的 *HLA-F*、*CD8 α* 溶液分别经 Superdex200 凝胶层析柱 (GE, 美国) 纯化。收集分离的蛋白在超滤离心管中浓缩后换成离子交换缓冲液 (10 mmol Tris) 通过 Q XL 离子交换层析柱 (GE, 美国) 进一步纯化。

1.6 *HLA-F* 与 *CD8 α* 相互作用

离子交换分离产物超滤浓缩后置换成分子筛缓冲液, 凝胶过滤层析分别分析 *HLA-F* 和 *CD8 α* 。

回收过滤产物浓缩至 500 μL , 将 *HLA-F* 和 *CD8 α* 混匀, 静置 15 min 后用凝胶柱层析分析。*HLA-F*、*CD8 α* 及 *HLA-F/CD8 α* 混合物凝胶过滤层析图采用 UNICORN 软件 (GE, 美国) 分析和比较。将离子交换纯化浓缩后的 *HLA-F* 和 *CD8 α* 按 1:1 比例混合静置 15 min, 10% Native-PAGE (pH 8.8) 120 V 电泳约 2.5 h, 采用考马斯亮蓝对 Native 胶染色。

2 结果与分析

2.1 序列扩增及 PCR 突变结果

从质粒载体中成功扩增出 *HLA-F* (831 bp)、*CD8 α* (342 bp)、 β_2m (300 bp) 片段。用突变引物扩增 *CD8 α* 直接得到突变产物, *HLA-F* 突变引物 PCR 出现了 3 条条带, 回收测序后发现分子量最大的条带是正确突变产物, 将正确突变产物扩增后与突变 PCR 产物对比电泳如图 2 所示。

对 PCR 验证阳性克隆结果测序后发现目的基因序列成功重组进入 pET21a 质粒。

2.2 目的蛋白的成功表达

携带重组 pET21a 质粒的大肠杆菌 BL21 菌株经 IPTG 诱导后, 目的蛋白得到成功表达。如图 3 所示, IPTG 诱导前后目的蛋白表达量出现了显著变化。除 β_2m 外 *HLA-F* 和 *CD8 α* 在 IPTG 诱导前都无目的蛋白表达。

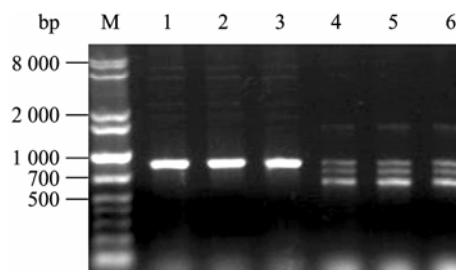


图 2 *HLA-F* 突变引物 PCR

Fig. 2 The PCR amplification figure of *HLA-F* with mutated primer. First PCR amplified out three bands, correct sequence was amplified from longer sequence after sequencing. 1-3: correct sequence; 4-6: first step PCR result.

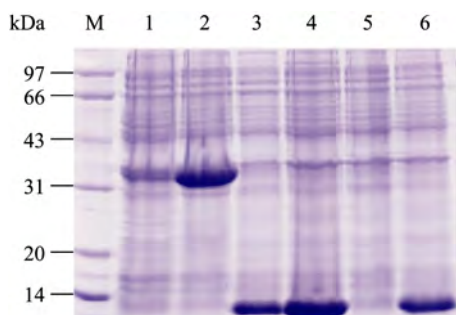


图3 IPTG 诱导前后 HLA-F、 β_2m 和 CD8 α 蛋白电泳图

Fig. 3 The expression of HLA-F, CD8 α and β_2m were induced by IPTG. 1: HLA-F before IPTG added; 2: HLA-F after IPTG added; 3: β_2m before IPTG added; 4: β_2m after IPTG added; 5: CD8 α before IPTG added; 6: CD8 α after IPTG added.

2.3 包涵体蛋白的提取结果

包涵体蛋白电泳结果 (图 4) 显示成功提取了目的蛋白。由图中可以看出尽管经过了反复洗涤纯化, 包涵体电泳条带仍含有大量的菌体蛋白。

2.4 HLA-F、CD8 α 纯化及相互作用结果

分子筛纯化和离子交换纯化结果显示蛋白复性成功。如图 5 显示产物以单峰洗脱, SDS-PAGE 也证明得到了纯度较高的 HLA-F 和 CD8 α , 其中左图 33 kDa 处为 HLA-F, 11 kDa 处为 β_2m ; 右图为

CD8 α , 分子量为 13 kDa。相对于 HLA-F, CD8 α 带电荷较少, 在盐浓度较低条件洗脱。

HLA-F、CD8 α 与 HLA-F/CD8 α 混合物凝胶过滤层析结果如图 6 所示。

如果 HLA-F 和 CD8 α 发生相互作用, 则新形成的 HLA-F/CD8 α 复合物在凝胶层析时保留时间将缩短。混合物的色谱图将会出现复合物色谱峰或者原来 HLA-F 色谱峰向左偏移, 而柱上保留较长的 CD8 α 峰将不会出现明显的变化。以纯化的 CD8 α 和混合物中 CD8 α 峰的相对位置之差作为内参, 第一个色谱峰相对于 HLA-F 的峰出现了 0.5 mL 的偏移。由此推测 HLA-F 与 CD8 α 可能具有相互作用。

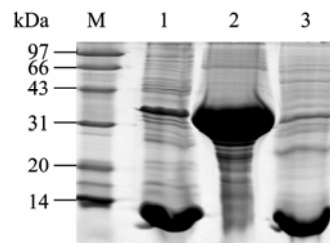


图4 CD8 α 、HLA-F 与 β_2m 包涵体蛋白电泳图

Fig. 4 The SDS-PAGE figure of CD8 α , HLA-F and β_2m inclusion body proteins. 1: CD8 α inclusion body; 2: HLA-F inclusion body; 3: β_2m inclusion body.

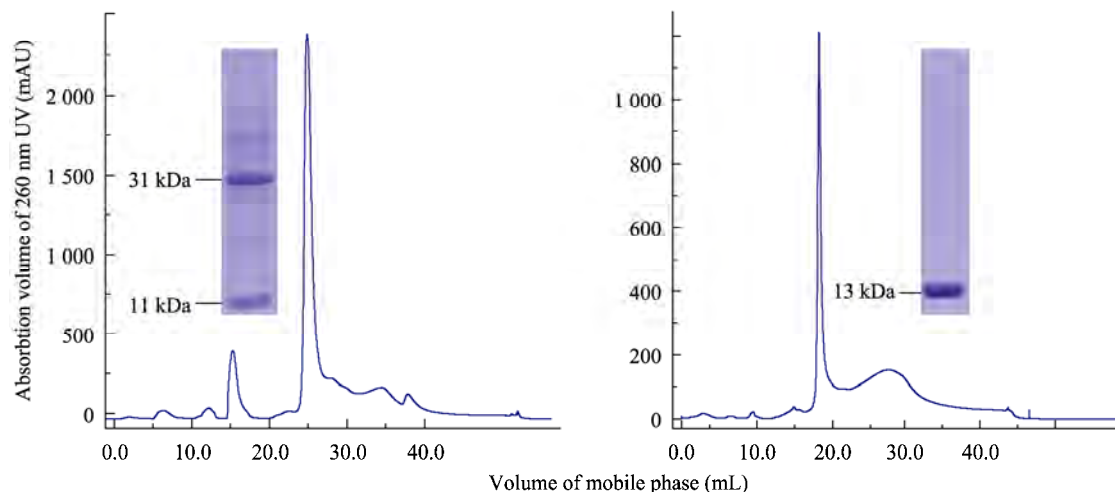


图5 CD8 α 与 HLA-F 的离子交换纯化结果

Fig. 5 The purification of HLA-F and CD8 α . left: ion exchange figure of HLA-F; right: ion exchange figure of CD8 α .

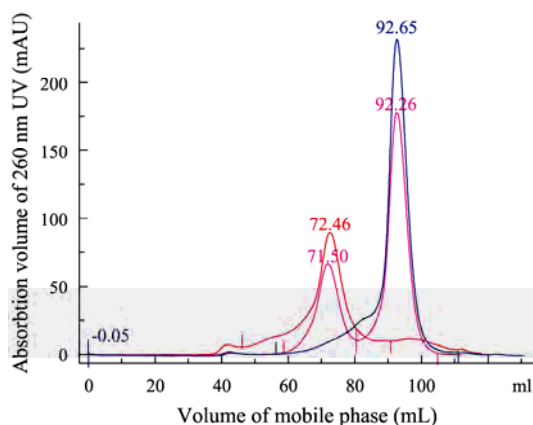


图 6 HLA-F、CD8 $\alpha\alpha$ 以及 HLA-F/CD8 $\alpha\alpha$ 凝胶过滤层析结果比较图

Fig. 6 The Gel-Filtration figure of HLA-F, CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-F/CD8 $\alpha\alpha$. Peak 72.46 mL is of HLA-F; peak 92.65 mL is CD8 $\alpha\alpha$; peak 71.50 mL and 92.26 mL are the peaks of HLA-F/CD8 $\alpha\alpha$ mixture. CD8 $\alpha\alpha$ peak move from 92.65 mL to 92.26 mL while the HLA-F peak move from 72.46 mL to 71.50 mL. Taking CD8 $\alpha\alpha$ peak as internal reference, the retention time of HLA-F becomes shorter after mixed with CD8 $\alpha\alpha$.

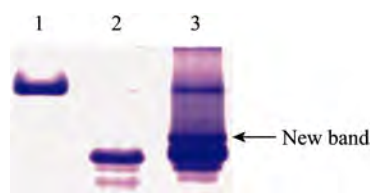


图 7 HLA-F、CD8 $\alpha\alpha$ 以及 HLA-F/CD8 $\alpha\alpha$ 的非变性蛋白电泳图

Fig. 7 The Native-PAGE figure of CD8 $\alpha\alpha$, HLA-F and CD8 $\alpha\alpha$ /HLA-F. Purified CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-F were mixed at the ratio of 1:1. Native-PAGE was performed in 10% gel at pH 8.8. 1: CD8 $\alpha\alpha$; 2: HLA-F; 3: mixture of CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-F. There is a new band appear in mixture lane.

另外, 通过 Native-PAGE 检测, 进一步验证了上述推测。如图 7 所示, 在 pH 8.8 的 Native 胶上 CD8 $\alpha\alpha$ 所带电荷少, 电泳速度较 HLA-F 慢, 混合物在 HLA-F 与 CD8 $\alpha\alpha$ 条带之间位置处出现了新的条带。新出现的条带可能是由 HLA-F 与 CD8 $\alpha\alpha$ 相互作用产生的复合物。

3 讨论

稀有密码子对外源基因在大肠杆菌体的表达具

有重大的影响, 尤其是序列 N 端稀有密码子会抑制外源蛋白的表达。这可能由于核糖体无法在稀有密码子区域引发蛋白合成有关, 也有可能 mRNA 的二级结构有关^[21]。这个特点可能是原核生物对外源核酸序列的一种自我保护机制。本实验对基因 N 端序列稀有密码子进行突变后显著提高了外源蛋白在大肠杆菌的表达水平。

溶解包涵体时, 包涵体的溶解性与所用变性剂的强度具有十分显著的关系, 之所以采用盐酸胍作为变性剂是因为之前的实验表明: 尿素不能完全溶解 CD8 α 包涵体, 所得的包涵体溶解液混浊。盐酸胍变性能力较尿素强能够完全溶解包涵体沉淀。此外 pH 值和变性剂浓度对包涵体的溶解有较大影响^[21]。同样, pH 值对蛋白复性也有很大的影响。CD8 α 复性过程中需要严格控制 pH, 因为复性液的 pH 接近 CD8 α 的等电点 ($pI=8.43$), 浓缩和换液过程必须缓慢进行, 溶液 pH 的快速变化容易导致复性蛋白发生絮凝和沉淀。

凝胶过滤层析分析 HLA-F 与 CD8 $\alpha\alpha$ 相互作用时, 混合物的峰扣除了内参后偏移量不大。分析认为可能是由于 superdex 200 分子筛柱对 4~7 kDa 蛋白质分子的分辨率有限, 故偏移的幅度较小。Native-PAGE 胶图中, 混合物电泳条带出现弥散, 一方面是由于上样量偏大所致; 另一方面可能由于蛋白结合是动态平衡的过程, 复合物在电泳过程发生部分解离, 解离的 CD8 $\alpha\alpha$ 移动变慢使复合物条带上方出现弥散。HLA-F 条带变化也证明了这个推测, 由复合条带十分靠近 HLA-F, 解离的 HLA-F 使 HLA-F 条带变浓。

HLA-F 与其他 MHC 分子的关键不同点在于它与 β_2m 形成二元复合物, MHC 结合的多肽参与细胞免疫识别过程。抗原多肽被 T 细胞受体 (TCR) 识别而引发特异的免疫反应, 其中 CD8 $\alpha\alpha$ 参与该识别过程。本研究发现 HLA-F 与 CD8 $\alpha\alpha$ 可能具有相互作用, 没有结合抗原多肽 HLA-F 与 CD8 $\alpha\alpha$ 发生相互作用必然会影响 CD8 $\alpha\alpha$ 与其他结合多肽的 MHC

分子的结合, 从而影响抗原多肽的呈递。从本研究的实验结果推测 HLA-F 可能参与免疫 T 细胞 TCR 识别抗原的调节过程。此结论需要进一步深入研究和量化分析。

REFERENCES

- [1] Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(24): 9145–9149.
- [2] Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 323–358.
- [3] Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59: 253–288.
- [4] Geraghty DE. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Curr Opin Immunol*, 1993, 5(1): 3–7.
- [5] O'Callaghan CA, Bell JI. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev*, 1998, 163(1): 129–138.
- [6] Braud V, Jones EY, McMichael A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol*, 1997, 27(5): 1164–1169.
- [7] Li J, Goldstein I, Glickman-Nir E, et al. Induction of TCR Vbeta-specific CD8⁺ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. *J Immunol*, 2001, 167(7): 3800–3808.
- [8] Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, et al. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol*, 1998, 160(10): 4951–4960.
- [9] Braud VM, Allan DSJ, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 1998, 391(6669): 795–799.
- [10] Lee N, Llano M, Carretero M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 5199–5204.
- [11] Le Bouteiller P, Blaschitz A. The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev*, 1999, 167(1): 233–244.
- [12] Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, et al. The α_1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(10): 5249–5254.
- [13] Le Gal FA, Riteau B, Sdlick C, et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol*, 1999, 11(8): 1351–1356.
- [14] Shiina T, Tamiya G, Oka A, et al. Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(23): 13282–13287.
- [15] Geraghty DE, Wei XH, Orr HT, et al. Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *J Exp Med*, 1990, 171(1): 1–18.
- [16] Wainwright SD, Biro PA, Holmes CH. HLA-F is a predominantly empty, intracellular, TAP-associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern. *J Immunol*, 2000, 164(1): 319–328.
- [17] Goodridge JP, Burian A, Lee N, et al. HLA-F complex without peptide binds to MHC class I protein in the open conformer form. *J Immunol*, 2010, 184(11): 6199–6208.
- [18] Lepin EJ, Bastin JM, Allan DS, et al. Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur J Immunol*, 2000, 30(12): 3552–3561.
- [19] Colel DK and Gao GF. CD8: Adhesion molecule, co-receptor and immuno-modulator. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1(2): 81–88.
- [20] Shi CB, Lü AG, Wu WF, et al. SEA rare codon modified to improve protein expression. *Chin J Biotech*, 2002, 18(4): 477–480.
时成波, 吕安国, 吴文芳, 等. 改造稀有密码子提高 SEA 蛋白表达量. *生物工程学报*, 2002, 18(4): 477–480.
- [21] Liu LB, Liu Y, He HQ, et al. The Changes of rare codon and mRNA structure accelerate expression of *qa-3* in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2006, 22(2): 199–203.
刘礼兵, 刘云, 何华庆, 等. *qa-3* 稀有密码子和 mRNA 结构改造及其在大肠杆菌中的高效表达. *生物工程学报*, 2006, 22(2): 199–203.