

加载 HCMV 抗原肽的 HLA-A * 0201 单体及其四聚体制备和鉴定

何贤辉¹ 徐丽慧^{1,2} 刘 毅^{1,4} 蔡小嫦³ 曾耀英^{1,*}

¹(组织移植与免疫教育部重点实验室,暨南大学,广州 510632)

²(暨南大学生物工程研究所,广州 510632)

³(暨南大学第一附属医院皮肤科,广州 510632)

⁴(郑州大学第一附属医院皮肤科,郑州 450052)

摘 要 细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)在控制病原体感染以及抗肿瘤过程中发挥重要作用,因而特异性 CTL 的检测相当重要,而过去检测 CTL 的方法都是间接的,最近发展起来的四聚体技术则是直接检测抗原特异性 CTL 的有效而特异的方法,成为目前研究 T 细胞免疫应答的关键技术。报道一种简化的四聚体制备程序,利用该程序成功制备加载人巨细胞病毒(HCMV)抗原肽的 HLA-A2 四聚体,具有特异性结合 CTL 活性。HLA-A * 0201 重链基因是通过 RT-PCR 方法从 HLA-A2⁺ 供者白细胞中克隆,进而以 PCR 方法构建在羧基端融合生物素化酶 BirA 底物肽(BSP)的 HLA-A * 0201(A2)重链胞外区原核表达载体, A2 重组蛋白在大肠杆菌中得到高表达,主要以包涵体形式存在。加载抗原肽的可溶性 A2 单体是 A2 胞外区在轻链 β_2 微球蛋白和 HLA-A2 限制性 HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ 抗原肽(NLVPMVATV, NLV)存在时通过稀释法复性获得,以 BirA 对其进行生物素化,然后以阴离子交换树脂纯化,得到的纯化 A2-NLV 单体与 Streptavidin-PE 按 4 D.8 比例混合形成四聚体,结合程度在 85% 以上,流式细胞仪分析显示该四聚体具有与 HLA-A2⁺ 供者的特异性 CTL 结合活性。总之,这种简化的四聚体制备程序,不仅有利于该技术的推广,为特异性 T 细胞免疫研究建立必要的技术平台,而且 A2-NLV 四聚体在临床监测 CMV 特异性 CTL 水平等方面也有应用价值。

关键词 人类白细胞抗原,四聚体,细胞毒 T 淋巴细胞,包涵体,人巨细胞病毒

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0382-07

细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)在控制病毒和细菌感染以及抗肿瘤过程中发挥着极为重要的作用,在最初的致敏之后,病原体或肿瘤特异的 T 细胞群体扩增,并获得细胞毒活性和产生细胞因子等效应功能^[1]。要更好地了解针对病原体或肿瘤的细胞免疫应答,就必须仔细分析抗原特异性应答 T 细胞的数量和效应功能^[2];然而这些特异性 T 细胞往往被其它大量无关 T 细胞所淹没,并且抗原特异性 T 细胞的检测需要体外培养和重复刺激等处理,这些过程又易于引入偏差,如有限稀释分析(LDA)是测量 CTL 频率的标准方法,但越来越多的证据表明该方法低估了 CTL 的数量^[3],其它如 ELISPOT 和胞内细胞因子染色等方法均存在类似缺点^[2,3]。因此,需要有更直接的方法以鉴定抗原特异性 T 细胞。

T 细胞活化、增殖和效应功能的诱导都需通过

T 细胞受体(TCR)和表达于抗原提呈细胞(APC)上的肽-主要组织相容性复合体(pMHC)相互作用而得以实现,因而以可溶性单体 pMHC 对 T 细胞染色以鉴定抗原特异性 T 细胞的策略很吸引人,然而由于 pMHC 和 TCR 之间的低亲和力(affinity),该方法从未取得成功^[2,4]。这一障碍已通过 pMHC 的四聚体技术(Tetramer technology)而被突破^[4],从而实现了以流式细胞仪直接检测抗原特异性 T 细胞。该方法首先将任何与 MHC I 类分子结合的肽与 MHC I 类分子重链和轻链 β_2 微球蛋白(β_2m)组装为 pMHC 复合体^[5],然后通过生物素化后与荧光标记的亲合素(avidin)或链亲和素(streptavidin)(四价)结合而实现多聚化,从而提高了 MHC 与 TCR 的亲合力(avidity),形成的四聚体能直接与抗原特异性 CTL 结合,通过流式细胞仪可对其进行分离鉴定或定量分

收稿日期 2003-10-16,修回日期 2003-12-19。

基金项目:国家自然科学基金重点项目(No. 30230350),国家重点基础研究发展规划项目("973")(No. G2000057006)及广东省"十五"重大专项(No. A302020204)基金资助。

* 通讯作者。 Tel: 86-20-85220732; Fax: 86-20-85221337; E-mail: jzms@jnu.edu.cn

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

析^[4]。虽然抗原特异性四聚体已在 T 细胞免疫研究领域得到广泛应用,成为该领域必不可少的工具^[2,3,6],但其制备过程复杂,这在很大程度上限制了该技术的推广。本文报道从汉族人中成功克隆人类 MHC I 类分子-人类白细胞抗原(HLA)-A * 0201 重链基因,构建重链胞外区原核表达载体,在大肠杆菌中得到高表达,成功制备了加载人巨细胞病毒(HCMV)基质磷酸蛋白 pp65 HLA-A * 0201 限制性抗原肽(NLVPMVATV)^[7]四聚体,同时对复杂的四聚体制备过程^[4]进行了简化,使其更简便易行,在一般实验室即可完成,为特异性 T 细胞免疫的定性和定量研究建立了一个必要的技术平台。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和菌株:大肠杆菌 DH5 α 由本校周天鸿教授惠赠;BL21(DE3) LysS、BL21(DE3)和质粒 pET-3c 购自 Novagen;限制酶 *Nde* I 和 *Bam* H I、T4 DNA 连接酶、高保真 DeepVent DNA Taq 聚合酶等均为美国 New England Biolabs 产品;TRIzol 试剂、ThermoScript RT-PCR 系统购自 Invitrogen;QIAquick Gel Extraction Kit 与 QIAprep Spin Miniprep Kit 为德国 QIAGEN 公司产品;淋巴细胞分离液为挪威 NYCOMED 产品;Q-Sepharose (Fast Flow)购自 Amersham;CD3-FITC、CD8-CyChrome、HLA-A2-FITC 为 BD Pharmingen 产品;Streptavidin-PE、蛋白质分子量标准(DALTON MARK VII-L)为 Sigma 产品;BirA 购自美国 Avidity 公司(Denver;网址:www.avidity.com);IPTG、尿素等为进口或国产分析纯试剂。

1.1.2 合成抗原肽:源自人巨细胞病毒(HCMV)基质磷酸蛋白 pp65 HLA-A * 0201 限制性抗原肽(HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃) NLVPMVATV^[7](简称 NLV)由上海申友公司合成(固相 Fmoc 法合成),经 HPLC 纯化,纯度为 98.2%。NLV 肽以 DMSO 溶解,浓度为 10 mg/mL,分装后存 -20℃ 备用。

1.2 方法

1.2.1 人白细胞总 RNA 抽提及 cDNA 合成:取 HLA-A2 阳性(经 HLA-A2-FITC 染色后以流式细胞仪分析)的健康成年志愿者肝素抗凝静脉血 3 mL,以淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),以 TRIzol 试剂提取总 RNA,按前文方法^[8]进行逆转录反应,合成的第一链 cDNA 即可用于 PCR 扩增或存 -20℃ 备用。

1.2.2 PCR 扩增 HLA-A * 0201(简称 HLA-A2 或

A2)重链基因及其克隆:参照 IMGT/HLA 库的 HLA-A * 0201 基因序列设计引物,前向引物为 5'-ATAT-ACCATGGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTC-3',反向引物为 5'-AACCAGGGATCCTACACTTTACAAGCTGTGAGAG-3',引物由上海博亚公司(Bioasia)合成。PCR 反应在 50 μ L 总体积中进行,以 2 μ L 第一链 cDNA 为模板,反应条件为在 94℃ 变性 2 min 后开始循环,然后 94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1.5 min,共 35 个循环后,于 37℃ 延伸 10 min。PCR 产物以 *Nde* I + *Bam* H I 双酶切并以 QIAquick Gel Extraction Kit 从凝胶中回收,与经 *Nde* I + *Bam* H I 双酶切的 pET-3c 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,双酶切法筛选接入正确外源基因的转化子,QIAprep Spin Miniprep Kit 小量制备质粒,以 ABI 377 DNA 自动测序仪测定克隆的基因序列(由大连 TaKaRa 公司测定)。

1.2.3 成熟 β_2 m 表达载体和融合 BSP 序列的 HLA-A * 0201 重链胞外区表达载体的构建:成熟 β_2 m 表达载体的构建见前文报道^[8]。A2 重链胞外区(成熟蛋白序列 1-275)羧基端连接生物素化酶 BirA 底物肽(BirA substrate peptide, BSP) LHHILDAQKMVWN-HR,其表达载体的构建方法如下:根据编码成熟 A2 基因 5' 序列并进行优化使 G/C 含量降低,设计前向引物为 5'-TATACCATGGGTTCTCATTCTATGCGTTATTTTTTACATCTGTTTCCCGGCCCGGCCGC-3',反向引物为 5'-GCGCGGATCCTTAACGATGATTCCACACCA TTTTCTGTGCATCCAGAATATGATGCAGAGAGCCCGGCTCCCATCTCAGGGT-3'(其中包含编码 Gly-Ser 接头和 BSP 的 DNA 序列),以携带 A2 基因的质粒为模板,按上述方法(退火温度为 58℃,其余同上)扩增编码 A2 胞外区基因,经 *Nde* I + *Bam* H I 双酶切,连接至表达载体 pET-3c,转化 DH5 α 感受态细胞、筛选转化子,以双酶切鉴定阳性克隆,从中提取质粒测序鉴定。

1.2.4 HLA-A2 重链胞外区和 β_2 m 在 *E. coli* 中的表达与包涵体纯化:方法基本同前文^[8]。 β_2 m 在 BL21(DE3) pLysS 中进行表达,A2 重链胞外区在 BL21(DE3)中进行表达,以 IPTG 诱导外源蛋白表达。表达的蛋白主要存在于包涵体内,按前文^[8]报道方法对包涵体进行洗涤纯化,得到的包涵体蛋白以 20 mmol/L MES (pH6.0,含 8 mol/L 脲和 0.1 mmol/L DTT)溶解,离心去除不溶物,取 10 μ L 以同一溶液稀释至 100 μ L,测定在 280 nm 和 260 nm 波长

的光吸收,按经验公式 $14.5 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260} =$ 蛋白浓度 (mg/mL) 估计蛋白浓度,将其分装后冻存于 -70°C 备用。

1.2.5 HLA-A2 NLV 复合物(简称 A2-NLV)单体的重折叠: A2-NLV 单体的复性方法与文献 [5] 报道的稀释法基本相同,仅作微小改动。首先将 2 mg NLV 肽以移液器滴加入 200 mL 预冷的复性缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 含 400 mmol/L L-arginine、2 mmol/L EDTA、5 mmol/L reduced glutathione、0.5 mmol/L oxidized glutathione、0.2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) 然后将 6 mg A2 重链配于 0.5 mL 注入缓冲液(3 mol/L Guanidine-HCl pH 4.2, 含 10 mmol/L sodium acetate, 10 mmol/L EDTA)以带 26 号针头的注射器快速注入高速搅拌的复性缓冲液中,最后以同样方法将 5 mg $\beta_2\text{m}$ 注入缓冲液,随后在 4°C 搅拌复性 3 d。重折叠的复合物以装有分子量排阻(MWCO)为 10 000 超滤膜的 200 mL 超滤浓缩器(Amicon, Millipore)浓缩至 5 mL 左右,对 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0, 含 0.2 mmol/L PMSF)透析 3 h,得到的重折叠 A2-NLV 复合物经 Eppendorf 离心机在 4°C 、1300 r/min 离心 10 min 去除沉淀后,即可进行生物素化。

1.2.6 A2-NLV 单体生物素化及纯化: 按生物素化酶 BirA 供应商(Avidity Co)建议的方案对 A2-NLV 单体进行生物素化反应(30°C 进行 40 min),反应液中加入 0.2 mmol/L PMSF 以抑制蛋白酶活性。反应完成后混合液对 10 mmol/L Tris-HCl buffer (pH8.0, 含 0.2 mmol/L PMSF)透性,上阴离子交换树脂 Q-Sepharose 柱,以 0~300 mmol/L NaCl 线性梯度洗脱(Pharmacia GradiFrac System),各级分(fraction)以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)(见下)进行分析,合并含 A2-NLV 的主峰级分,透析后以 Amicon Ultra-4 (MWCO10000)离心超滤浓缩至 300 μL 左右,加 4 mL PBS(含 0.2 mmol/L PMSF 和 2 mmol/L EDTA)后再浓缩至 300 μL ,按上述方法测定蛋白浓度,存 4°C 备用。

1.2.7 A2-NLV 四聚体制备和鉴定: 将 A2-NLV 与 Streptavidin-PE 按 4:0.8 的比例混合, A2-NLV 分 10 次加入,间隔 5~10 min。四聚体的形成以 SDS-PAGE 电泳鉴定,样品缓冲液中不加还原剂,也不经加热处理而直接上样电泳。

1.2.8 SDS-PAGE: 参照 Laemmli 的方法进行,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12% 或 15%,以考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白质条带。

1.2.9 流式细胞仪分析: 从 HLA-A2 阳性供者(40 yrs)取 3 mL 静脉血(肝素抗凝),以淋巴细胞分离液制备 PBMC,将 1×10^6 细胞悬于 50 μL PBS-2% 胎牛血清(FCS)中,加入 CD3-FITC、CD8-CyChrome 各 10 μL ,然后加 4 μg A2-NLV Tetramer(对照加相应量的 Streptavidin-PE),混匀后在冰浴中反应 1 h,以 PBS-2% FCS 洗涤 2 次,最后以 400 μL 4% 多聚甲醛固定。样品按前文^[9]方法以流式细胞仪(FACSCalibur, Becton Dickinson)分析,每个样品收集 50000 个细胞的参数,数据以 CellQuest 软件进行分析。

2 结 果

2.1 HLA-A * 0201 基因克隆及其序列测定

根据 IMGT/HLA 数据库的 HLA-A * 0201 基因序列设计引物,从三位随意选取的汉族人中分离 PBMC,流式细胞仪分析表明均为 HLA-A2 阳性,以从中提取的总 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(1100 bp)相符的 DNA 片段(图 1A, lanes 2,3,4)。扩增出的 DNA 片段经双酶切后,分别与 pET-3c 连接,转化 DH5 α ,各选取 8 个菌落抽提质粒,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 1A, lane 6,7,仅显示来自供者 1 的其中二个克隆),序列分析显示从供者 1 和 3 克隆的基因为编码 HLA-A * 0201 成熟蛋白的基因,该基因已在 GenBank 登记,接受号为 AY191309;从供者 2 克隆的基因为 HLA-A * 0201(数据略)。

2.2 与 BSP 融合的 HLA-A * 0201(简称 HLA-A2 或 A2)重链胞外区原核表达载体构建

根据 Altman 等^[4]策略,通过 PCR 方法将编码 HLA-A2 重链胞外区 1-275 氨基酸序列的 DNA 片段与 BSP 融合,两者间包含编码 Gly-Ser 接头的序列,模板为含 HLA-A2 基因的质粒,扩增出的 DNA 片段长度约 900 bp(图 1B, lane 2),经双酶切、连接至 pET-3c 载体,筛选接入目的基因的阳性克隆(图 1B, lane 4)经测序验证插入序列为正确的目的基因,含起始密码 ATG。构建的表达载体称 pET-A2。

2.3 A2 重链和 $\beta_2\text{m}$ 在 *E. coli* 中表达及其包涵体纯化

$\beta_2\text{m}$ 在 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 中进行表达,表达的重组蛋白约占菌体总蛋白的 30%,大都在包涵体中^[8]。A2 重链胞外区在 *E. coli* BL21(DE3)中表达,将构建的 pET-A2 质粒转化 BL21(DE3),得到稳定高效表达 A2 重链的基因工程菌。SDS-PAGE 分析表明,该工程菌在未加 IPTG 诱导前就泄漏表达一

定水平的分子量(法国 VL 公司 PhotoCapt Ver11.01 软件分析)为 35 kD A2 重链分子(图 2, lane 3),加 IPTG 在 37℃ 诱导 4 h 后,分子量 35 kD 的 A2 重链分子表达水平大大提高,以 PhotoCapt 软件分析表明重组约占菌体总蛋白的 20%(图 2, lane 4)。大部分重组蛋白以包涵体形式存在于沉淀部分,上清中基本没有(图 2, lane 5)。因此,沉淀部分经反复洗涤后得到较高纯度的 A2 重链蛋白(图 3, lane 6),以 8 mmol/L 胍溶解后测得蛋白浓度为 15 mg/mL。按相同方法对 β_2m 包涵体进行纯化,也获得较纯的蛋白^[8]。

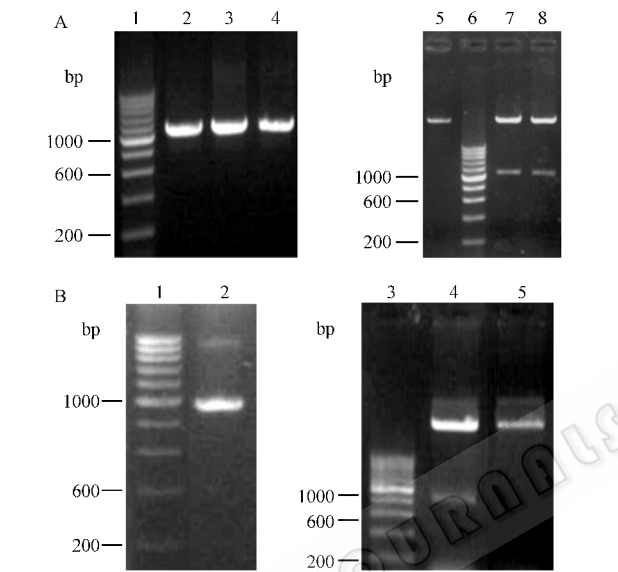


图 1 含 HLA-A * 0201 基因的重组载体及融合生物素化酶底物肽(BSP)的 A2 胞外区表达载体的双酶切鉴定

Fig.1 Restriction enzyme digestion of the recombinant vector containing HLA-A * 0201 (A2) gene and the expression vector for A2 heavy chain fused with BSP sequence at its carboxyl terminus

(A) 1: 200 bp DNA ladder; 2, 3, 4: RT-PCR products from 3 donors; 5: pET-3c/*NdeI* + *Bam*HI; 7, 8: vector for A2 heavy chain gene/*NdeI* + *Bam*HI. (B) 1: 200 bp DNA ladder; 2: PCR product for extracellular domain of A2 heavy chain; 4: expression vector for A2 heavy chain gene/*NdeI* + *Bam*HI; 5: pET-3c/*NdeI* + *Bam*HI.

2.4 A2-NLV 单体的制备及其生物素化

A2-NLV 单体通过稀释法^[5]进行复性,得率在 15% 左右。复性后的可溶性 A2-NLV 单体在 SDS-PAGE 胶上显示两条主带,即分子量约 35 kD 的重链和 12 kD 的轻链 β_2m (图 3, lane 2),纯度明显提高。以同一方法加入流感 A 基质蛋白肽 GILG-FVFTL 进行复性也获得成功(另文发表)。A2-NLV 单体生物素化(图 3, lane 3)后上阴离子交换树脂 Q-Sepharose 柱纯化,以 NaCl 线性梯度洗脱下三个峰

(图 4),经 SDS-PAGE 分析显示,第 I 峰(级分 18)为轻链 β_2m (图 3, lane 4),第 II 峰(级分 21-25)为可溶性的 A2-NLV 单体,电泳图上显示为重链和轻链(图 3, lane 5-9),第 III 峰为非蛋白成分(图 3, lane 10),其 260 nm 光吸收大大高于 280 nm 吸收。将含纯 A2-NLV 的级分 22、23 和 24 合并,以超滤浓缩,浓缩后蛋白浓度为 4 mg/mL。

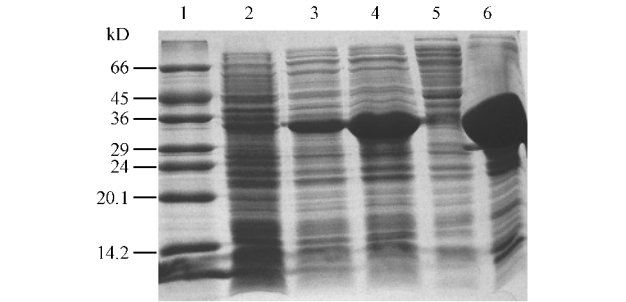


图 2 大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达的 HLA-A * 0201 重链的 SDS-PAGE 结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis of extracellular domain of HLA-A * 0201 (A2) heavy chain expressed in *E. coli* strain BL21 (DE3) (BL21)

1: MW markers; 2: BL21 (pET-3c) induced with IPTG for 4 h; 3: BL21 (pET-A2) before IPTG induction; 4: BL21 (pET-A2) induced with IPTG for 4 h; 5: supernatant of BL21 (pET-A2) bacterial lysate; 6: washed inclusion body

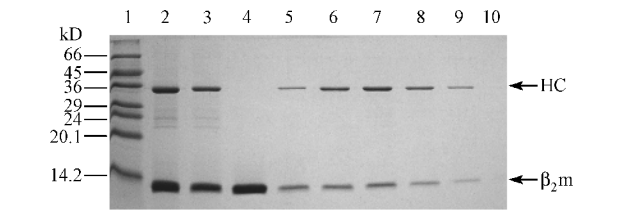


图 3 HLA-A * 0201 NLV 单体的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.3 SDS-PAGE analysis of HLA-A * 0201 NLV (A2-NLV) monomer

1: MW marker; 2: refolded A2-NLV monomer; 3: biotinylated A2-NLV monomer; 4~10: fractions no. 18, 21, 22, 23, 24, 25, 28 (see Fig. 4), respectively. HC: heavy chain; β_2m : β_2 -microglobulin

2.5 A2-NLV 四聚体制备

将生物素化的 A2-NLV 可溶性单体按比例与 Streptavidin-PE 混合后即可形成四聚体。由于 Streptavidin 与生物素形成的复合物,即使在 SDS 存在条件下,如不对样品进行煮沸处理,就不会解离,因而可以利用 SDS-PAGE 对四聚体形成程度进行估计。A2-NLV 单体在非还原条件且未经煮沸处理,电泳结果显示为 35 kD 重链和 12 kD 轻链 β_2m 两条主带(图 5, lane 5),中间一条弱带为少量 β_2m 二聚体。经软

牛(PharMacia)分析显示,四聚体中重链条带约为单

体的 10% ~ 15%(图 5 ,lanes 5 ,6)表明 85% 以上的单体已与 Streptavidin 结合形成了多聚体。

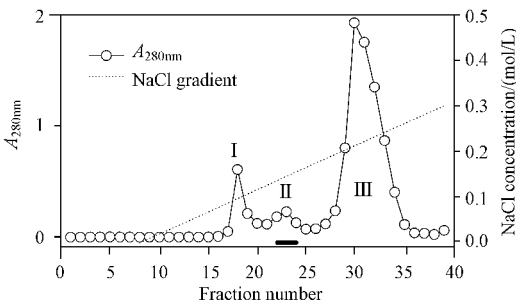


图 4 Q-Sepharose 离子交换柱层析
纯化生物素化的 A2-NLV 层析图

Fig.4 Purification of biotinylated A2-NLV monomer
with Q-Sepharose column (2 × 8 cm) chromatography

The column was equilibrated with 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0). The sample dialyzed against the same buffer was loaded onto the column and eluted with 0 ~ 300 mmol/L NaCl linear gradient at a flow rate of 0.8 mL/min. Fractions of 3 mL were collected. Fractions 22 ~ 24 containing pure A2-NLV were pooled (indicated by bar).

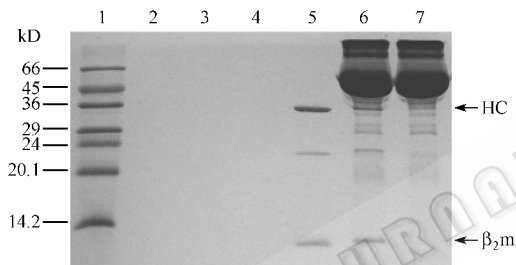


图 5 HLA-A * 0201 NLV 四聚体的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.5 SDS-PAGE analysis of HLA-A * 0201 NLV (A2-NLV) tetramer under nonreducing conditions and without boiling
1 : protein molecular weight marker ; 2 ~ 4 : empty ; 5 : A2-NLV monomer (4 μg) ; 6 : A2-NLV tetramer (4 μg A2-NLV monomer + 1 μg Streptavidin-PE) ; 7 : Streptavidin-PE (1 μg , containing 1% BSA). HC : heavy chain ; β₂m : β₂-microglobulin

2.6 A2-NLV 四聚体对特异性 CTL 的染色

为了验证 A2-NLV 四聚体与特异性 CTL 的结合活性,以该四聚体对 HLA-A2 阳性供者 PBMC 进行三荧光染色,以流式细胞仪分析。先在 CD3⁺ 的淋巴细胞(即总 T 细胞)上设门(gated),然后分析 CD8⁺ T 细胞(即 CTL,图 6 中位于十字线右侧)和 CD8⁻ (相当于 CD4⁺ T 细胞,图 6 中位于十字线左侧),结果显示 A2-NLV 四聚体能染出一群 HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ 特异性 CTL(图 6B 位于十字线右上侧的细胞群),在总 T 细胞中占 0.61%,在 CD8⁺ T 细胞中占 2.0% ;而位于十字线左侧的 CD4⁺ T 细胞无特异性染色。值得注意,四聚体阳性的 CTL 为 CD8^{bright} ,而非 CD8^{dim}。

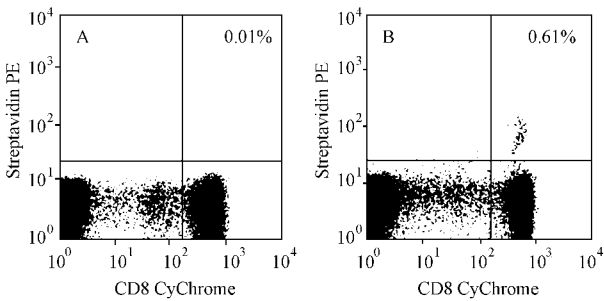


图 6 流式细胞仪分析 HLA-A * 0201 NLV 四聚体
对 HCMV 特异性 CTL 的染色结果

Fig.6 Flow cytometry analysis of the staining of HCMV-specific CTL with HLA-A * 0201 NLVPMVATV (A2-NLV) tetramer
PBMC from an HLA-A2 donor was stained with HLA-A * 0201 pp65₄₉₅₋₅₀₃ tetramer. Data represent the percentages of A2-NLV tetramer positive CTL within total T cells (gated on CD3⁺ cells). A : Control (Streptavidin-PE) ; B : A2-NLV Tetramer.

3 讨论

自从 Altman 等^[4]1996 年建立 TCR 特异性配基 pMHC 四聚体技术以来,该技术的特异性和有效性已经完全确立,并且取代原来测定抗原特异性 T 细胞的标准方法-有限稀释分析法(limiting dilution analysis ,LDA),被广泛用于研究抗原特异性 CTL 的定性和定量分析,成为研究细胞免疫的强有力工具^[2-4,6,10,11]。Altman 等人^[4]发明的四聚体技术关键是通过基因工程技术巧妙地将 MHC I 类分子 (HLA-A2)重链的羧基端融合一段由 15 个氨基酸残基组成的 BSP 序列,从而可以利用生物素化酶 BirA 在 BSP 序列内的一个 Lys 残基侧链上接一个生物素分子,这样与 Avidin 或 Streptavidin 结合后可以使 MHC 分子正确定向,而不影响位于氨基端 TCR 识别区域^[2]。由此构建的工程化 HLA-A2 重链胞外区在轻链 β₂m 及 HLA-A2 限制性抗原肽存在下,正确折叠成为可溶性 pMHC 分子,进一步与荧光标志的亲本素结合形成四聚体^[4]。四聚体制备过程较为复杂,包括包涵体复性和纯化等过程,其中需要以 HPLC 和 FPLC 进行三次纯化^[2,4,11] ;我们参考 Garboczi 等人^[5]的 HLA-A2 稀释复性法,将纯化步骤减少为一次常压离子交换柱层析,简化了四聚体的制备过程,减少了对 HPLC 等仪器的依赖,而获得的可溶性 HLA-A2 单体已相当纯,由此制备的四聚体具有与特异性 CTL 结合的活性,这表明这一简化的方法是可行的,可以成功制备特异性四聚体。

合的抗原肽,这是 TCR 的 MHC 限制性。因此,肽-MHC 复合物(pMHC)是 TCR 的天然配基^[1]。MHC 为目前已知最具多态性的蛋白分子,各种等位基因在人群的分布不一,其中 HLA-A * 0201 是所有种族中的最高频等位基因,在中国人中约有 50% 的人具有该等位基因^[12],所以 HLA-A * 0201 四聚体可以用于 50% 中国人的 CTL 分析。我们对随意选取的三位供者分析表明三者均为 HLA-A2 阳性,从其中两位供者的 PBMC 中克隆到 HLA-A * 0201 基因,另一位为 HLA-A * 0207,这在一定程度上说明中国人中 HLA-A2 的频率可能高于以往的估计^[12]。因此,我们制备 A2-NLV 四聚体可以涵盖较广泛的人群。

人巨细胞病毒(HCMV)的结构蛋白 pp65 是免疫优势 CTL 表位的主要来源^[7],其中 pp65₄₉₅₋₅₀₃ NLVPM-VATV (NLV)是由 HLA-A2 递呈的主要抗原肽^[7,10,11],利用 NLV 单一抗原肽制备的四聚体即可检测到较高水平的特异性 CTL,表明 NLV 肽在针对 HCMV 的 HLA-A2⁺ 限制性的免疫应答中表现出明显的优势^[10,11,13,14]。利用 A2-NLV 四聚体检测显示,健康人外周血中 NLV 特异性 CTL 占 CD8⁺ T 细胞的百分比为 <0.1% ~ 11.3%,健康 HCMV 携带者中大多数在 <0.1% ~ 5% 之间^[13,14]。我们利用制备的 A2-NLV 四聚体在 1 例 HLA-A2⁺ 供者外周血检测到 2% 的 NLV 特异性 CTL,说明该四聚体具有较好的特异性。

进行性 CMV 感染一直是器官和造血干细胞移植的严重并发症,这与移植后 T 细胞免疫缺陷有强烈相关性^[13,14]。同种干细胞移植临床研究^[10,11]表明,在活动 CMV 感染的病人中 CMV 特异性 CTL 重建能保护机体对抗 CMV 疾病,而移植物中 CMV 特异性 CD8⁺ T 细胞对机体对抗 CMV 感染有保护作用。因此在干细胞移植中,以四聚体对移植物中 HLA 限制性的 CMV 特异性 CD8⁺ T 细胞数量测定以及移植后这些特异性 T 细胞的监测,成为快速评价受者发生 CMV 疾病的灵敏工具,对临床实践有重要意义^[10,11,13-15]。可见,我们建立的简化的四聚体制备程序,不仅有利于该技术的推广,为特异性 T 细胞免疫研究建立必要的技术平台,而且该四聚体本身也有潜在的应用前景。

REFERENCES (参考文献)

[1] Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*, 2000, **18**: 275 - 308

[2] Meidenbauer N, Hoffmann TK, Donnenberge AD. Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC-class I tetrameric complexes. *Methods*, 2003, **31**: 160 - 171

[3] 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**: 9 - 19

[4] Altman JD, Moss P AH, Goulder PJR *et al*. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [published erratum appears in *Science* 1998, **280**(5371):1821]. *Science*, 1996, **274**: 94 - 96

[5] 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**: 3429 - 3433

[6] Bousso P. Generation of MHC-peptide tetramers: a new opportunity for dissecting T-cell immune responses. *Microbes Infect*, 2000, **2**: 425 - 429

[7] Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K *et al*. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol*, 1996, **70**: 7569 - 7579

[8] He XH (何贤辉), Xu LH (徐丽慧), Liu Y (刘毅) *et al*. Cloning of human β_2 -microglobulin gene and its high expression in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2004, **20**(1): 99 - 103

[9] He XH (何贤辉), Zeng YY (曾耀英), Li Z (李振) *et al*. Inhibitory effects of gossypol on the activation of human T-lymphocytes stimulated with polyclonal activators. *Chinese Journal of Pathophysiology* (中国病理生理杂志), 2001, **17**: 510 - 514

[10] Gratama JW, van Esser JWJ, Lamers CHJ *et al*. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T-cell depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood*, 2001, **98**: 1358 - 1364

[11] Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M *et al*. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 2001, **97**: 1232 - 1240

[12] Marsh SGE, Parham P, Barber LD. The HLA class I and class II loci. In: *The HLA Facts Book*, edited by Marsh SGE, Parham P, Barber LD. London: Academic Press, 2000. pp.100 - 150

[13] Gratama JW, Cornelissen JJ. Potential clinical utility of monitoring cytomegalovirus-specific T lymphocytes in allogeneic stem cell transplantation of tetramer-based monitoring of cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes in allogeneic stem cell transplantation. *Clin Appl Immunol Rev*, 2001, **2**: 17 - 32

[14] Gratama JW, Cornelissen JJ. Diagnostic potential of tetramer-based monitoring of cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes in allogeneic stem cell transplantation. *Clin Immunol*, 2003, **106**: 29 - 35

[15] Bodinier M, Peyrat MA, Tournay C *et al*. Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat Med*, 2000, **6**: 707 - 710

Preparation and Characterization of HLA-A * 0201 Monomer and Tetramer Loaded with HCMV Antigenic Peptide

HE Xian-Hui¹ XU Li-Hui^{1 2} LIU Yi^{1 4} CAI Xiao-Chang³ ZENG Yao-Ying^{1 *}

¹(Key Laboratory of Tissue Transplantation and Immunology , Ministry of Education , Jinan University , Guangzhou 510632 , China)

²(Institute of Bioengineering , Jinan University , Guangzhou 510632 , China)

³(Department of Dermatology , the First Affiliated Hospital , Jinan University , Guangzhou 510632 , China)

⁴(Department of Dermatology , the First Affiliated Hospital , Zhengzhou University , Zhengzhou 450052 , China)

Abstract Quantification of cytotoxic T lymphocytes (CTL) is extremely important due to the pivotal role they play in controlling pathogen infection and anti-tumor actions. Previously used methods for detecting specific CTL are usually indirect. In recent years , tetramer technology has been developed to directly visualize antigen-specific CTL efficiently , and become the critical approach in studying T cell immune responses. A simplified procedure for preparing tetramers is reported here in this paper and a tetramer loaded with human cytomegalovirus (HCMV) peptide was successfully obtained using this procedure , which possessed binding activity with specific CTL. The heavy chain of HLA-A * 0201 gene was cloned by RT-PCR from HLA-A2⁺ donor. An expression vector , encoding the extracellular domain of HLA-A * 0201 heavy chain (A2) fused with a BirA substrate peptide (BSP) at its carboxyl terminus , was constructed by PCR with cloned A2 gene as the template. The A2 heavy chain was expressed in *Escherichia coli* mostly in the form of inclusion body and purified by washing inclusion body. The monomer of soluble A2 loaded with peptide was reconstructed by dilution from the heavy chain in the presence of light chain β_2 -microglobulin and HLA-A2 restricted HCMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ peptide (NLVPMVATV , NLV). Refolded A2-NLV monomer was biotinylated with a commercial BirA and purified by low pressure anion exchange chromatography on a Q-Sepharose (fast flow) column. The tetramer was then formed by mixing A2-NLV monomer with streptavidin-PE in a ratio of 4 : 0.8 leading to more than 85% multiplication as revealed by SDS-PAGE under non-reducing conditions without boiling the sample. Flow cytometry analysis indicated that this tetramer could bind to specific CTL from HLA-A2⁺ donor. In conclusion , a simplified procedure is established to prepare HLA-A2 tetramer , which may not only facilitate the application of tetramer technology for studying specific T lymphocyte immune response but A2-NLV itself be applied clinically to monitor CMV-specific CTL in stem cell and organ transplantation.

Key words human leukocyte antigen , tetramer , cytotoxic T lymphocyte , inclusion body , human cytomegalovirus

Received : 10-16-2003

This work was supported by Grants from National Natural Science Foundation of China (No. 30230350) , National Basic Research Priorities Program of China (No. G2000057006) and Special Grant of Guangdong Province (No. A302020204).

* Corresponding author. Tel 86-20-85220732 ; Fax : 86-20-85221337 ; E-mail : zyms@jnu.edu.cn