

H-2D^b 四聚体的制备及其在检测 LCMV 特异性 CD8⁺ T 细胞中的应用

刘毅^{1,2‡}, 徐丽慧^{3‡}, 曾学思¹, 孙建方¹, 何贤辉²

1 中国医学科学院 中国协和医科大学皮肤病研究所, 南京 210042

2 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

3 暨南大学 生命科学技术学院生物工程研究所, 广州 510632

摘要: MHC 四聚体技术是研究抗原特异性淋巴细胞应答的关键技术之一。为研究 H-2D^b 基因型(如 C57BL/6)小鼠的特异性 CD8⁺ T 细胞免疫应答, 需要建立 H-2D^b 四聚体制备技术平台。首先以 RT-PCR 方法克隆 H-2D^b 重链基因的 cDNA, 进而构建 H-2D^b 胞外域与生物素化酶 BirA 底物肽(BSP)融合蛋白的表达载体, 并在大肠杆菌中获得表达。在 LCMV GP₃₃₋₄₁ 抗原肽(KAVYNFATC, KAV)和人 β₂-微球蛋白存在时, 通过稀释法复性获得 H-2D^b/KAV 单体。该单体经生物素化并纯化后与 PE-链亲和素按 4:1 的比例混合, 即形成四聚体。通过流式细胞术检测经 KAV 肽免疫的 C57BL/6 小鼠体内的 LCMV 特异性 CD8⁺ T 细胞的频率, 结果表明在外周血、引流淋巴结和脾脏中均可检测到一定频率的 LCMV 特异性 CD8⁺ T 细胞, 其中以对外周血标本染色的效果最佳。成功建立了小鼠 H-2D^b 四聚体制备技术平台, 为监测及分析基于 H-2D^b 基因型小鼠的实验性免疫治疗创造了条件。

关键词: H-2D^b, MHC 四聚体, 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒, 原核表达

Preparation of H-2D^b Tetramer and Its Application in Enumerating the CD8⁺ T Cells Specific for Lymphocytic Choriomeningitis Virus

Yi Liu^{1,2‡}, Lihui Xu^{3‡}, Xuesi Zeng¹, Jianfang Sun¹, and Xianhui He²

1 Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210042, China

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

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

Abstract: Major histocompatibility complex (MHC) tetramer technology offers a powerful means to study specific T cell populations of interest. To investigate the immune response of H-2D^b-restricted CD8⁺ T cells in immunotherapy, we prepared the H-2D^b tetramer and verified its effectiveness in enumerating the CD8⁺ T cells specific for the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). First, the cDNA encoding H-2D^b heavy chain was cloned by RT-PCR from the spleen of a C57BL/6 mouse. The expression vector for

Received: June 7, 2007; **Accepted:** September 18, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30672474, 30572199, and 30230350).

Corresponding author: Jianfang Sun. Tel: +86-25-85478015; E-mail: fangmin5758@yahoo.com.cn

Xianhui He. Tel: +86-20-85220679; E-mail: thehx@jnu.edu.cn

‡这些作者对本文贡献相等。

国家自然科学基金项目(Nos.30672474, 30572199, 30230350), 中国医学科学院中国协和医科大学皮肤病研究所科研基金资助项目。

H-2D^b-BSP, i.e. the ectodomain of H-2D^b fused to a BirA substrate peptide (BSP), was constructed and overexpressed in *E. coli* BL21(DE3). Then, the denatured H-2D^b-BSP was refolded in the presence of human β_2 -microglobulin as well as the GP₃₃₋₄₁ peptide (KAVYNFATC, KAV) of LCMV. The biotinylated H-2D^b/KAV molecules were purified, then bound to streptavidin-PE and tetramerized. Finally, the prepared H-2D^b KAV tetramer reagent was verified by detecting the CD8⁺ T cells specific for HCMV in KAV peptide vaccinated C57BL/6 mouse, with a mouse receiving subcutaneous injection of only adjuvant as negative control. The results showed that the tetramer positive rates were 0.27%, 0.11%, and 0.24% within the CD8⁺ T cell populations in the peripheral blood, draining lymph nodes, and spleen of vaccinated mouse, respectively. There was only very low background staining ($\leq 0.01\%$) of those samples from the control mouse. Beside, the best results were achieved in the staining of the peripheral blood sample. In conclusion, the established procedure of preparing H-2D^b tetramer will facilitate the study of the immune responses of antigen-specific CD8⁺ T cells in the experimental immunotherapy on the mice with H-2D^b allele background.

Keywords: H-2D^b, MHC tetramer, lymphocytic choriomeningitis virus, prokaryotic expression

免疫治疗是通过恢复和增强患者自身的免疫监视功能, 以治疗某些恶性肿瘤和慢性病毒感染的新治疗策略, 因其具有特异性强、疗效持久等潜在优势而成为当今基础与临床医学研究的热点与发展方向^[1]。然而, 目前多数免疫治疗效果并不理想, 其原因尚未完全揭示。抗原特异性 CD8⁺ T 细胞是免疫系统发挥抗病毒和抗肿瘤效应的主要免疫活性细胞, 分析其细胞频率、免疫表型、分化阶段和功能状态, 有助于探讨其抗肿瘤和抗病毒的机制, 对于发展免疫治疗乃至其临床疗效监测均具有重要意义。

MHC I 类分子四聚体技术(tetramer technology)是目前检测抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的金标准^[2], 于 1996 年由 Altman 等成功建立^[3], 在此之前应用 pMHC 复合物试图标记抗原特异性 T 细胞的尝试均未获成功, 其原因在于虽然 TCR 对 pMHC 复合物的识别是高度特异性的, 但单价 pMHC 与 TCR 的亲合力过低、结合半衰期极短限制了其与相应 TCR 的有效结合^[4]。而 MHC 四聚体以荧光素标记的链亲和素为连接体, 使生物素化并负载抗原肽的 MHC I 类分子重链胞外域形成四聚体, 后者与相应 TCR 间的高亲和力是其标记抗原特异性 CTL 的基础^[3,5]。该技术具有灵敏度高、便于与其它免疫学技术(如: 表型分析、细胞内细胞因子染色)联合应用等优点, 从而可实现在抗原特异性 CD8⁺ T 细胞水平上进行频率、表型、分化和功能研究^[2,6,7]。

本研究报道了以羧基端融合生物素化酶 BirA 底物肽(BirA substrate peptide, BSP)的 H-2D^b 重链胞外域融合蛋白、人 β_2 -微球蛋白(β_2 -microglobulin, β_2m)、抗原肽为材料的 H-2D^b 四聚体制备流程, 并成功应用于检测淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)糖蛋白肽 GP₃₃₋₄₁ 特异

性 CD8⁺ T 细胞。该 H-2D^b 四聚体制备平台为小鼠病毒感染和肿瘤模型的免疫治疗研究创造了条件。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠购自南方医科大学实验动物中心。大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)菌株、质粒 pET-3d 购自 Novagen; 质粒 pEGFP-N1 购自 Clontech 公司; *EcoR* I、*Nco* I 和 *Bam*H I、T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶均为大连 TaKaRa 产品; PCR 引物(表 1)全部由上海英骏生物公司(Shanghai Invitrogen Biotechnology Co)合成。TRIzol 试剂、ThermoScript RT-PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; QIAquick Gel Extraction Kit 为德国 QIAGEN 公司产品; 蛋白质分子量标准(DALTON MARK VII-L)购自 Sigma 公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)为进口分装分析纯试剂。含 BSP 编码片

表 1 构建表达载体所用引物序列
Table 1 Primer sequences used for construction of the expression vector

Primer number	Primer sequences
1	5'-ATATGAATTCATGGGGCGATGGCTCCGC-GC-3'
2	5'-ATATGGATCCTCACGCTTACAATCTCGGAGAGA-3'
3	5'-ATATCCATGGGTCCGCATAGCATGCGTTATTTCGAAACCGCCGTGTCCCGG-3'
4	5'-AGAGCCAGTGGACGGAGGAGGCTC-3'
5	5'-CCTCCGTCCACTGGCTCTCTGCATCATATTCTG-3'
6	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG-3'

段的 pET-A2 质粒、人 β_2m 均为本实验室制备^[8,9]。BirA 购自美国 Avidity 公司。PE-链亲和素 (Streptavidin-PE) 为 Molecular Probes 公司产品。LCMV 的 H-2D^b 限制性抗原肽 GP₃₃₋₄₁ (KAVYNFATC, 简称 KAV)^[10], 由上海英骏生物公司用固相 Fmoc 法合成, 经 HPLC 纯化, 纯度大于 95%。KAV 肽以 DMSO 溶解, 浓度为 10 g/L, 分装后存 -70℃ 备用。弗氏完全佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA) 为 Sigma 公司产品。抗-mCD3-FITC、抗-mCD8-APC 荧光标记单抗均为 eBioscience 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脾细胞总 RNA 抽提及 cDNA 合成

断颈处死 C57BL/6 小鼠并摘取脾脏, 按试剂盒推荐方法, 以 TRIzol 试剂提取总 RNA, ThermoScript RT-PCR 进行逆转录反应, 所合成的第一链 cDNA 用于 PCR 扩增。

1.2.2 H-2D^b 重链全长 cDNA 的克隆

参照 GenBank 中登记的 H-2D^b 基因序列(登录号: U47325)设计引物 1 和引物 2。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℃ 预变性 2 min 后开始循环, 即 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min 20 s, 共 35 个循环后, 于 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物以 QIAquick Gel Extraction Kit 从凝胶中回收, EcoR + BamH 双酶切并再次从凝胶中回收, 与经 EcoR + BamH 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 H-2D^b 重链胞外域(H-2D^b-BSP) 表达载体的构建

H-2D^b 重链胞外域(成熟蛋白序列 1-280)羧基端连接 BSP (LHHILDAQKMWVWVNR), 其表达载体的构建方法如下: 首先, 分别扩增 H-2D^b 重链胞外域和 BSP 的编码序列。根据 H-2D^b 重链胞外域的基因编码序列设计引物 3 和引物 4, 以扩增 H-2D^b 重链胞外域羧基端 1-280 氨基酸序列的 DNA 片段。同时根据 pET-A2 质粒^[5]中的 BSP 编码序列设计引物 5 和引物 6, 以扩增 BSP 编码序列。分别以 1 μ L 经测序验证的 H-2D^b 全长 cDNA 和 pET-A2 质粒为模板, 反应条件同上, PCR 产物以 QIAquick Gel Extraction

Kit 从凝胶中回收。然后, 以所扩增的 H-2D^b 重链胞外域和 BSP 编码序列为模版进行 PCR 反应, 选用引物 3 和引物 6, 反应体系及条件同前。PCR 产物以 QIAquick Gel Extraction Kit 从凝胶中回收, Nco I+BamH I 双酶切并再次从凝胶中回收, 与经 Nco I+BamH I 双酶切的表达载体 pET-3d 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, 克隆的基因序列由上海英骏公司测定。

1.2.4 H-2D^b-BSP 融合蛋白的表达与鉴定

H-2D^b-BSP 融合蛋白的表达方法同文献^[8,11]。表达质粒转化 BL21(DE3), 以 IPTG 诱导融合蛋白表达。SDS-PAGE 浓缩胶浓度为 50 g/L, 分离胶浓度为 150 g/L, 以考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白质条带。

1.2.5 H-2D^b-BSP/KAV 复合物单体的重折叠

按已报道的方法制备^[8,11], 简述如下: 首先将 2 mg KAV 肽以移液器滴加入 200 mL 预冷的复性缓冲液中, 然后将 6 mg H-2D^b-BSP 和 5 mg 人 β_2m 快速注入, 在 4℃ 搅拌复性 3 d。超滤浓缩至 5 mL 左右, 对 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 含 0.2 mmol/L PMSF)透析, 离心去除沉淀后进行生物素化。

1.2.6 H-2D^b-BSP/KAV 单体的生物素化及纯化

按已报道的方法进行^[8,11], 简述如下: 在 H-2D^b-BSP/KAV 单体溶液中加入生物素化酶 BirA, 30℃ 反应 40 min。反应完成后透析, 上样至 MonoQ 5/50 GL 柱中进行线性梯度洗脱(Amersham AKTA UPC-9000)。SDS-PAGE 分析后合并含有生物素化的 H-2D^b/KAV(同时含重链和轻链 β_2m)的洗脱峰, 透析后超滤浓缩至 300 μ L 左右, 加 4 mL PBS 后再浓缩至 300 μ L, 测定蛋白浓度后置 4℃ 备用。

1.2.7 H-2D^b-BSP/KAV 四聚体的制备和鉴定

将生物素化的 H-2D^b/KAV 单体与 PE-链亲和素按 4: 1 的比例混合后即形成四聚体。按前文^[8]报道方法测定生物素化程度。

1.2.8 LCMV KAV 抗原肽免疫 C57BL/6 小鼠

100 μ g KAV 抗原肽与佐剂等体积混匀, 充分乳化后双足垫注射, 2 周、4 周后以相同剂量抗原肽分别加强免疫一次。初次免疫以 CFA 为佐剂, 加强免疫则应用 IFA。同时, 另取小鼠以等量 PBS 代替 KAV 抗原肽与相应佐剂乳化后注射, 用作阴性对照。

1.2.9 LCMV 特异性 CD8⁺ T 细胞的检测

末次免疫 2 周后, 经眼静脉采集 200 μ L 血液至肝素抗凝管中。断颈处死小鼠后取腹股沟淋巴结及脾脏, 常规制备淋巴结和脾脏细胞悬液。分别取肝素抗凝静脉血 100 μ L、 2×10^6 腹股沟淋巴结细胞、 2×10^6 脾脏细胞, 加入 0.5 μ g H-2D^b KAV 四聚体, 于室温避光孵育 15 min; 加入 0.2 μ g 抗-CD8 mAb-APC 和 0.5 μ g 抗-CD3 mAb-FITC, 于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min; 外周血及脾脏细胞标本尚需加入 3 mL 红细胞裂解液, 于室温避光放置 6~8 min, 离心弃上清, 淋巴结标本略去本步骤; 以含 1% 小牛血清的 PBS 洗涤 1 次, 加 0.3 mL 4% 多聚甲醛固定; 24 h 以内以流式细胞仪(FACSCalibur, Becton Dickinson)检测, 收集 300 000 个细胞的参数; 用 WinMDI 软件分析 CD8⁺ T 细胞中 H-2D^b/KAV 四聚体阳性细胞的比率。

2 结果

2.1 H-2D^b 重链全长 cDNA 的克隆及其序列测定

根据 H-2D^b 基因序列设计引物, 从 C57BL/6 小鼠脾细胞中提取总 RNA, 逆转录第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增出与预期大小(1100 bp)相符的 DNA 片段(图 1, 泳道 2)。扩增出的 DNA 片段经双酶切后, 分别与 pEGFP-N1 连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 各选取 4 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 1, 泳道 4-7), 序列分析显示其编码 H-2D^b 重链, 与 GenBank 中登录的 H-2D^b 序列(登录号: U47325)完全一致。

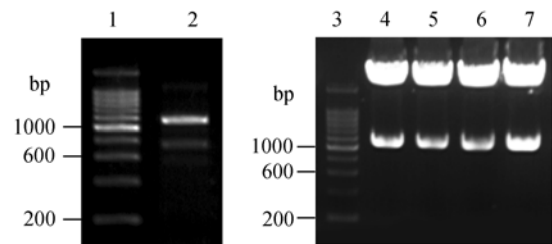


图 1 RT-PCR 扩增 H-2D^b 重链的全长 cDNA 及重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 RT-PCR products for the full-length cDNA of H-2D^b heavy chain and the screening of recombinant vectors by restriction enzyme digestion

1, 3: 200 bp DNA ladder; 2: RT-PCR product for the full-length cDNA of H-2D^b heavy chain; 4-7: screening of the recombinant vectors by cutting with *Eco*R I and *Bam*H I

2.2 H-2D^b-BSP 融合蛋白原核表达载体的构建

参考 Altman 等[3]的策略, 通过 PCR 方法将编码 H-2D^b 重链胞外域 1-280 氨基酸序列的 DNA 片段与编码 BSP 的片段融合。以本室构建的 pET-A2 质粒为模版, 扩增编码 BSP 的 DNA 片段(图 2, 泳道 2); 同时, 以克隆的 H-2D^b 全长 cDNA 为模板, 扩增编码 H-2D^b 重链胞外域的 DNA 片段(图 2, 泳道 3)。以二者 PCR 产物为模版再次 PCR, 扩增编码 H-2D^b-BSP 的 DNA 片段, 长度约 900 bp (图 2, 泳道 5), 经双酶切、连接至 pET-3d 载体, 筛选接入目的基因的阳性克隆(图 2, 泳道 7), 经测序验证插入序列为正确的目的基因, 表明成功构建了 H-2D^b-BSP 的原核表达载体。

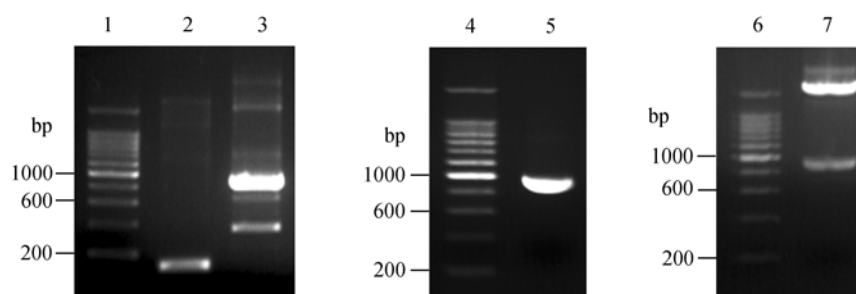


图 2 PCR 扩增 H-2D^b-BSP DNA 片段及重组质粒酶切鉴定

Fig. 2 Construction of H-2D^b-BSP coding sequence by PCR, and the screening of the recombinant vectors by restriction enzyme digestion

1, 4, 6: 200 bp DNA ladder; 2, 3, 5: PCR product for the coding sequences of BSP, ectodomain of H-2D^b, and H-2D^b-BSP, respectively; 7: recombinant vector cut with *Nco* I and *Bam*H I

2.3 H-2D^b-BSP 融合蛋白在 *E. coli* 中的表达
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, 加 IPTG 于 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h 后, 相对分子质量 34 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 H-2D^b-BSP 融合蛋白的理论分子量相符,重组蛋白约占菌体总蛋白的 17.2%(图 3,泳道 3),主要存在于包涵体中(图 3,泳道 4)。

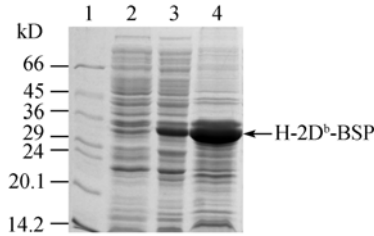


图 3 大肠杆菌 BL21(DE3)中表达的 H-2D^b-BSP 的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant H-2D^b-BSP expressed in *E. coli* strain BL21(DE3)

1: protein MW marker; 2: BL21(DE3) before IPTG induction; 3: BL21(DE3) induced with IPTG for 4 h; 4: inclusion bodies of IPTG-induced BL21(DE3)

2.4 H-2D^b-BSP/KAV 单体的制备及其生物素化

H-2D^b-BSP/KAV 单体通过稀释复性法进行重折叠,复性后的 H-2D^b-BSP/KAV 单体经生物素化酶 BirA 催化其生物素化(图 4 泳道 2),然后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 H-2D^b/KAV 单体(图 4 泳道 3),将后者各组分合并,超滤浓缩后蛋白浓度为 1 g/L。

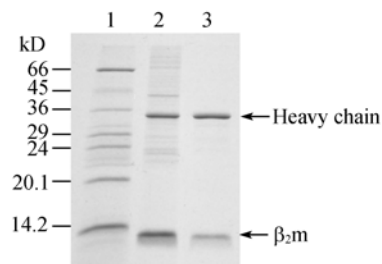


图 4 纯化的 H-2D^b/KAV 单体的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of refolded and purified H-2D^b/KAV monomer

1: protein MW marker; 2: refolded H-2D^b/KAV monomer; 3: purified H-2D^b/KAV monomer

2.5 H-2D^b/KAV 四聚体的制备与鉴定

将生物素化的 H-2D^b/KAV 可溶性单体按 4:1 的比例与 PE-链亲和素混合后形成四聚体。链亲和素与生物素间具有极高的亲和力,因此,若不经还原剂及煮沸处理,SDS 处理本身并不会导致四聚体解

离,故可利用 SDS-PAGE 对四聚体的比例进行测定。H-2D^b/KAV 单体在非还原条件下且不经煮沸处理时,电泳后显示分子量分别为 34 kD 的重链和 12 kD 的轻链 β_2m 两条主带(图 5 泳道 3)。AlphaEaseFC 软件分析显示,四聚体中重链条带(图 5 泳道 4)约为单体的 15%(图 5 泳道 3),表明 85%的单体已与链亲和素结合形成了四聚体。

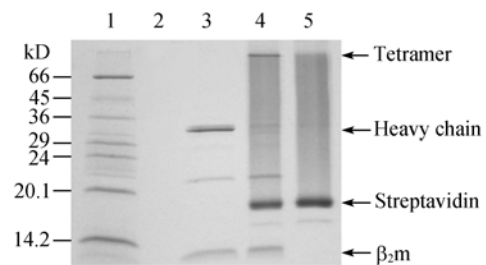


图 5 H-2D^b/KAV 四聚体的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 5 Analysis of the multimerization degree of H-2D^b/KAV tetramer by non-reducing SDS-PAGE

1: protein MW marker; 2: blank; 3: H-2D^b/KAV monomer; 4: H-2D^b/KAV tetramer; 5: streptavidin-PE

2.6 H-2D^b/KAV 四聚体的结合活性

以接受或未接受 KAV 肽免疫的 C57BL/6 小鼠为研究对象,通过对其外周血、腹股沟淋巴结、脾脏细胞悬液进行三荧光标记,以 FACSCalibur 流式细胞仪检测,CELLQuest 软件获取资料,WinMDI 软件分析。首先在 FSC-SSC 二维散点图上划出淋巴细胞区,再利用抗 -CD3 mAb-FITC 和抗 -CD8 mAb-APC 同时设门,然后分析 CD8⁺ T 细胞中 H-2D^b/KAV 四聚体阳性细胞的比率。结果显示,该四聚体在外周血、腹股沟淋巴结和脾脏细胞中均检出 LCMV 特异性 CTL,它们占总 CD8⁺ T 细胞的比例依次为 0.27%、0.11%和 0.24%(图 6),而未经 KAV 肽免疫鼠 CD8⁺ T 细胞为背景水平(0.01%),提示该四聚体具有与 LCMV 特异性 CD8⁺ T 细胞高效、特异的结合活性。

3 讨论

抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的研究一直是现代免疫学的热点和前沿领域,对其频率、表型与生物学行为等进行研究将极大地推动肿瘤免疫、感染免疫等领域的进展。有限稀释分析法(limiting dilution analysis, LDA)是对抗原特异性 CTL 进行定量分析

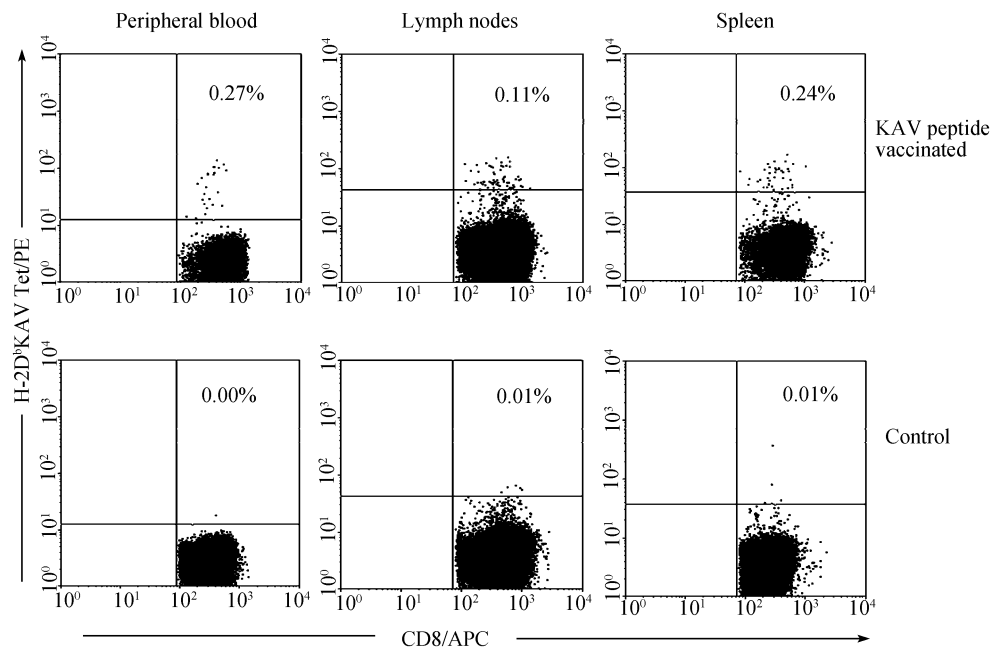


图 6 H-2D^b/KAV 四聚体与 LCMV 特异性 CD8⁺ T 细胞结合的流式细胞术分析

Fig. 6 Flow cytometric analysis of CD8⁺ T cells specific for LCMV by staining with H-2D^b/KAV tetramer

The data stand for the H-2D^b/KAV tetramer positive rates within the CD8⁺ T cell populations in the peripheral blood, draining lymph nodes, and spleen of KAV peptide vaccinated mouse (upper column), and control mouse (lower column), respectively

的经典技术, 但该方法费时费力, 影响因素多, 检测灵敏度低, 这些缺点限制了其应用^[5]。自二十世纪九十年代中期以来, 陆续发展出四聚体技术、酶联免疫斑点法(ELISPOT)、细胞内细胞因子染色等多种新型的抗原特异性 CTL 研究方法^[12-14]。其中四聚体技术具有检测灵敏度高(较 LDA 灵敏度高 10~50 倍、便于与其它免疫学技术联合应用、可用于原位分析组织中的抗原特异性 CTL 等独特优势, 成为当今免疫学研究的核心技术之一^[2,6,7,14]。

我们已于 2003 年成功建立了人类 MHC I 类分子四聚体的简化制备程序^[8,15], 为临床肿瘤免疫和感染免疫研究提供了条件。然而, 小鼠作为免疫学研究最为常用的实验动物, 以其建立动物模型开展相应研究同样具有十分重要的意义, 而四聚体技术已经是研究 CTL 应答的核心技术, 为此, 我们需要建立小鼠 MHC I 类分子四聚体技术平台。小鼠 MHC 称为 H-2 复合体, 其中 K 区和 D 区为 I 类基因位点, 编码 I 类分子。小鼠 H-2 分子具有多态性(如 C57BL/6 小鼠 I 类分子的基因型为 D^bK^b), 同时, TCR 识别 pMHC 具有 MHC 限制性, 这两个特点决定了四聚体仅适用于具有该基因型 I 类分子的小鼠。因此, 有必要构建相应的 MHC I 类分子四聚体以开展

小鼠的细胞免疫应答研究。

为了构建 H-2D^b 四聚体, 我们首先构建了 H-2D^b 重链胞外域羧基端融合生物素化酶 BirA 底物肽(BSP)的融合蛋白(H-2D^b-BSP)的原核表达载体, 并在大肠杆菌中获得高水平表达。SDS-PAGE 分析显示表达产物相对分子质量约为 34 kD, 与其理论分子质量相符。需要指出的是, H-2D^b-BSP 在大肠杆菌获得高水平表达的产物主要存在于包涵体中, 这对于大量制备、纯化及进一步的复性工作十分有利, 因为可溶性 MHC I 类分子的复性并不需要可溶性表达产物^[16]。另外, 研究表明人 β 2-微球蛋白(β 2m)较鼠 β 2m 与鼠 MHC I 类分子结合能力更高, 通过掺入人 β 2m 可制备小鼠四聚体并成功标记小鼠抗原特异性 CTL^[17]。本研究即采用这一策略, 利用已制备的人 β 2m 与 H-2D^b-BSP 融合蛋白, 在 LCMV GP₃₃₋₄₁ 抗原肽存在下, 成功制备出小鼠 H-2D^bKAV 四聚体。

LCMV GP₃₃₋₄₁/KAV 特异性 CD8⁺ T 细胞常用于病毒免疫研究^[10], 我们以 KAV 肽免疫小鼠, 并以 H-2D^b KAV 四聚体检测了 LCMV GP₃₃₋₄₁/KAV 特异性 CD8⁺ T 细胞的细胞频率。结果显示 LCMV GP₃₃₋₄₁/KAV 肽可诱导 C57BL/6(H-2^b)小鼠产生特异性 CD8⁺ T 细胞: KAV 特异性 CD8⁺ T 细胞不仅可在

引流区淋巴结、脾脏中检出,在外周血中也可检出,其占总 CD8⁺ T 细胞的比例依次为 0.11%、0.24%和 0.27%。外周血中存在较高频率的特异性 CD8⁺ T 细胞这一现象支持 GP₃₃₋₄₁ 确实是 LCMV 的优势表位。与未免疫小鼠比较,研究结果显示外周血标本非特异性染色最少,抗原特异性细胞群染色的荧光强度高,分群明显;而淋巴细胞和脾脏背景染色较高。其原因可能与外周血细胞取材时未受机械损伤,并且染色过程中始终处于自体血浆和红细胞保护之中,细胞活力好;而淋巴细胞和脾脏细胞悬液制备过程中的机械损伤可能对四聚体染色不利。另外,外周血取材简便,定期剪尾取血便于连续观察。因此,外周血同样可作为理想的样品来源,用于免疫治疗过程中对特异性 CD8⁺ T 细胞的监测。

总之,我们建立了 H-2D^b 四聚体的制备平台,并在 LCMV 肽免疫小鼠中进行了验证,为分析小鼠实验性免疫治疗中 H-2D^b 限制性 CD8⁺ T 细胞应答打下了基础。

REFERENCES

- [1] Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*, 2003, **21**: 807–839.
- [2] Doherty PC. The numbers game for virus-specific CD8⁺ T cells. *Science*, 1998, **280**(5361): 227.
- [3] Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996, **274**(5284): 94–96.
- [4] Matsui K, Boniface JJ, Reay PA, Schild H, Fazekas de St Groth B, Davis MM. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science*, 1991, **254**(5039): 1788–1791.
- [5] McMichael AJ, O'Callaghan CA. A new look at T cells. *J Exp Med*, 1998, **187**(9): 1367–1371.
- [6] Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8⁺ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med*, 2000, **192**(1): 63–75.
- [7] Maczek C, Berger TG, Schuler-Thurner B, Schultz ES, Hamann A, Dunbar PR, Cerundolo V, Steinkasserer A, Schuler G. Differences in phenotype and function between spontaneously occurring melan-A-, tyrosinase- and influenza matrix peptide-specific CTL in HLA-A*0201 melanoma patients. *Int J Cancer*, 2005, **115**(3): 450–455.
- [8] He XH, Xu LH, Liu Y, Cai XC, Zeng YY. Preparation and characterization of HLA-A*0201 monomer and tetramer loaded with HCMV antigenic peptide. *Chin J of Biotech*, 2004, **20**(3): 382–388.
何贤辉, 徐丽慧, 刘毅, 蔡小嫦, 曾耀英. 加载 HCMV 抗原肽的 HLA-A*0201 单体及其四聚体制备和鉴定. *生物工程学报*, 2004, **20**(3): 382–388.
- [9] He XH, Xu LH, Liu Y, Zeng YY. Cloning of human beta2-microglobulin gene and its high expression in *Escherichia coli*. *Chin J of Biotech*, 2004, **20**(1): 99–103.
何贤辉, 徐丽慧, 刘毅, 曾耀英. 人 β 2-微球蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的高效表达. *生物工程学报*, 2004, **20**(1): 99–103.
- [10] Oldstone MB, von Herrath M, Lewicki H, Hudrisier D, Whitton JL, Gairin JE. Use of a high-affinity peptide that aborts MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte activity against multiple viruses in vitro and virus-induced immunopathologic disease *in vivo*. *Virology*, 1999, **256**(2): 246–257.
- [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] Letsch A, Scheibenbogen C. Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods*, 2003, **31**(2): 143–149.
- [13] Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4⁺ T cell frequencies by flow cytometry: Evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest*, 1997, **99**(7): 1739–1750.
- [14] Skinner PJ, Daniels MA, Schmidt CS, Jameson SC, Haase AT. Cutting edge: *In situ* tetramer staining of antigen-specific T cells in tissues. *J Immunol*, 2000, **165**(2): 613–617.
- [15] He XH, Zha QB, Liu Y, Xu LH, Chi XY. High frequencies cytomegalovirus pp65₄₉₅₋₅₀₃-specific CD8⁺ T cells in healthy young and elderly Chinese donors: characterization of their phenotypes and TCR Vbeta usage. *J Clin Immunol*, 2006, **26**(5): 417–429.
- [16] 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.
- [17] Shields MJ, Assefi N, Hodgson W, Kim EJ, Ribaldo RK. Characterization of the interactions between MHC class I subunits: A systematic approach for the engineering of higher affinity variants of β 2-microglobulin. *J Immunol*, 1998, **160**(5): 2297–2307.