论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0484-03

MHC-Ⅰ荧光四聚体载体的构建及其真核表达

熊锐华[1],李景怡[1],邹丽云[2],张晋宇[2],万 瑛[2],张荣华[1] (第三军医大学:[1]西南医院中医科,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 构建MHC-Ⅰ荧光四聚体真核表达质粒,并表达、纯化该蛋白,以更简便地检测特异性T细胞。**方法** 运用分子克隆技术,构建sKb-ZsGreen-6×His标签的融合蛋白真核表达质粒,转染293FT细胞表达,并以镍亲和层析法纯化。**结果** 经酶切及测序鉴定证实成功构建了MHC-Ⅰ荧光四聚体真核表达质粒并完成表达、纯化,并经SDS-PAGE电泳证实。**结论** 得到了纯化的MHC-Ⅰ荧光四聚体,并经流式细胞术证实其与β2-微球蛋白、OVA肽结合后能被B3Z细胞识别,为特异性T细胞检测提供了一种更方便的方法。

关键词: MHC-Ⅰ;四聚体;真核表达

中图法分类号: R392-33;R392.1 **文献标识码:** A

Construction of recombinant vector MHC-Ⅰ-fluorescin tetramer and its eukaryotic expression

XIONG Rui-hua[1], LI Jing-yi[1], ZOU Li-yun[2], ZHANG Jin-yu[2], WAN Ying[2], Zhang Rong-hua[1] ([1]Department of Traditional Chinese Medicine, Southwest Hospital; [2]Institute of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct an eukaryotic expression vector that expresses MHC-Ⅰ-fluorescin tetramer and then induce the protein to express and be purified in order to detect antigenic specificity T cell more conveniently. **Methods** The eukaryotic expression vector of a fusion protein was constructed by linking the target gene fragment with the sequence of the sKb-ZsGreen-6 His Tag by molecular cloning technique, and then the recombinant was transfected into 293FT to express the protein. Ni-affinity chromatography was used to purify the objective protein from the transfected cell lysis. Flow cytometry was used to detect the existence of B3Z cells pretreated with the mixture of our obtained protein, β2 microglobulin and peptide OVA (4 μg:4 μg:2.77 μg in 100 μl PBS). **Results** An eukaryotic expression vector of MHC-Ⅰ-fluorescin tetramer was constructed successfully, and the protein was expressed in 293FT cells and purified. The mixture treated B3Z cells showed 88.3% green fluorescence in compared with those untreated cells. **Conclusion** The MHC-Ⅰ-fluorescin tetramer is produced and purified. The tetramer is recognized by B3Z cells after bounding to β2 microglobulin and peptide OVA, and it can be used as a convenient method for detecting antigenic specificity T cells.

Key words: MHC-Ⅰ; tetramer; eukaryotic expression

MHC-Ⅰ类分子由重链(H)、轻链(L)及抗原肽组成,其基本生物学功能是将抗原肽提呈给T细胞识别。1996年,Altmanet等[1]首次报道将生物素化的MHC-肽复合物单体与荧光染料标记亲和素或链亲和素结合,生成四聚体复合物来检测HIV特异性细胞毒性T细胞,通过增强T细胞受体与MHC-肽复合物亲和力,达到可直接特异性检测T细胞的目的。随后这项技术在病毒性疾病[2]、肿瘤[3]及自身免疫性疾病[4]等研究中广泛应用。其优势在于迅速、直接、灵敏且特异性强,但也存在较多应用上的困难。本研究通过MHC-Ⅰ分子重链和荧光蛋白四聚体在真核细胞内融合表达,增加检测的灵活性,减轻四聚体技术的制备难度,具有用于高通量检测的潜力。

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

FUGW质粒、pUC18FUGWlinker质粒、pET16b-KbdsRed质粒、DH5α感受态、293FT细胞、B3Z细胞均为本校全军免疫学研究所保存;pDsRed-C1、pZsGreen-C1质粒购于Clontech公司;

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02Z416)
Supported by the National High-tech Research and Development Project of China (863 Program, 2006AA02Z416)

作者简介: 熊锐华,男,湖北省应城市人,硕士研究生,主治医师,主要从事乙型肝炎的临床和机制方面的研究。E-mail:xiongruihua@sohu.com
通信作者: 张荣华,电话:(023)68754136,E-mail:zhrhlggg@163.com
万 瑛,电话:(023)68752236

收稿日期: 2008-09-24;**修回日期:** 2008-10-10

β2-微球蛋白购于 BD Pharmingen 公司;寡聚核苷酸片段及 PCR 引物由上海生工合成;OVA 肽为本校全军免疫学研究所合成;限制性内切酶分别购于 NEB、TaKaRa、Fermentas 公司;T_4 连接酶购于 NEB 公司;Ex *Taq* 酶预混体系购于 TaKaRa 公司;Qiagen Ni-NTA Superflow 填料购于 Qiagen 公司;Cocktail 蛋白酶抑制剂购于 Roche 公司;BCA 蛋白浓度试剂盒购于碧云天公司;质粒小抽试剂盒及胶回收试剂盒购于 Omega 公司;1640 培养基、DMED 高糖型培养基购于 Invitrogen 公司;小牛血清购于成都哈里生物公司;胎牛血清购于 HyClone 公司。2 mol/L $CaCl_2$ 溶液;pH 值 7.0 的 2×HeBS 溶液;pH 值 7.3 的 Special Water,pH 值 7.2 的 0.01 mol/L PBS 溶液,pH 值 8.0 的 NPI-10 缓冲液、NPI-20 缓冲液、NPI-250 缓冲液。

BD FACS Aria 流式细胞仪(BD 公司),Bio-Rad 550 酶标仪(Bio-Rad 公司)。

1.2　实验方法

1.2.1　PCR 引物及寡聚核苷酸的设计　　设计包含 *Bam*HⅠ-*Bsr*GⅠ-GGG-*Age*Ⅰ-*Sac*Ⅰ-6×His Stop code-*Nhe*Ⅰ的寡聚核苷酸,序列 1:5′-GATCCGGACTGTACAGGCGGTGGACCGGTCGAGGAGCTCATCATCACCATCACCATAG-3′,序列 2:5′-CTAGCTATGGTGATGGTGATGATGAGCTCCTCGACCGGTCCACCGCCTGTACAGTCCG-3′,设计 1 对包含 *Bsr*GⅠ-4×GGGS-*Age*Ⅰ的寡聚核苷酸,序列 3:5′-GTACAGGCGGTGGATCTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGCTCCGGCGGTGGATCA-3′,序列 4:5′-CCGGTGATCCACCGCCGGAGCCACCTCCAGAACCTCCGCCAGATCCACCGCCT-3′。依据 PCR 引物设计原理,经计算机及网络辅助分析,设计了以 pET16b-KbdsRed 为模板、soluble Kb 为目的片段的 PCR 引物(上、下游分别引入 *Bam*HⅠ和 *Bsr*GⅠ酶切位点),序列 5:5′-GCGTGTACAGGATGGAGGAGGCTCCCATCTC-3′,序列 6:5′-TCAGGATCCATGGGAGGCCCACACTCGC-3′。

1.2.2　真核表达载体的构建　　用 Fermentas *Bam*HⅠ和 *Nhe*Ⅰ双酶切 pUC18FUGWlinker 后回收载体,将寡聚核苷酸片段序列 1 和序列 2 退火后与上述载体连接后转化 DH5α 培养克隆并抽提质粒(pUc18skblinker)。将 pUc18sKblinker 和 pDsRed-c1 以 NEB 公司 *Age*Ⅰ/*Sac*Ⅰ酶双酶切,回收 pUc18sKblinker 载体和 pDsRed-c1 片段连接、转化、筛选、培养、抽提质粒(pUC18DsRed)。以 pET16b-KbdsRed 为模板、序列 5、序列 6 为上下游引物行 PCR,将 PCR 产物(sKb)和 pUC18DsRed 分别以 NEB *Bam*HⅠ/*Bsr*GⅠ双酶切,回收 sKb 片段和 pUC18DsRed 载体,连接、转化、筛选、摇菌、抽提质粒(pUC18sKbDsRed)并送上海英骏公司测序。将 pUC18KbDsRed 质粒以 NEB *Age*Ⅰ/*Bsr*GⅠ双酶切后回收载体,将寡聚核苷酸片段序列 3、序列 4 退火后连入其中,转化、筛选、培养、抽提质粒(pUC18sKbDsRedGGGS)。将 pUC18sKbDsRedGGGS 和 pZsGreen-c1 质粒以 NEB *Age*Ⅰ/*Sac*Ⅰ双酶切,回收 pUC18sKbGGGS 载体和 ZsGreen 片段,连接、转化、筛选、培养、抽提质粒(pUC18sKbZsGreenGGGS)。将 pUC18sKbZsGreenGGGS 和 FUGW 质粒以 TAKARA *Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ双酶切后回收 sKbZsGreenGGGS 片段和 FUGW 载体,连接、转化、筛选、培养、抽提质粒(FU18sKbZsGreenGGGS),*Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ酶切鉴定。

1.2.3　sKbZsGreenGGGS 融合蛋白的真核表达　　在 10 cm×10 cm 细胞培养平皿中接种细胞 4×10^6 293FT 细胞,培养过夜使细胞密度达 60%~70%;在 1 095 μl Special Water 中加入 20 μg 的 FU18sKbZsGreenGGGS、155 μl 2 mol/L 的 $CaCl_2$,再缓慢加入 1 250 μl 2×HeBS 并剧烈震荡 2 min,小心加入培养皿中,培养 10 h 后换液,继续培养 48 h 去上清,收集细胞冻存于 -70 ℃。

1.2.4　蛋白质纯化、SDS-PAGE 电泳、脱盐、浓缩、浓度测定

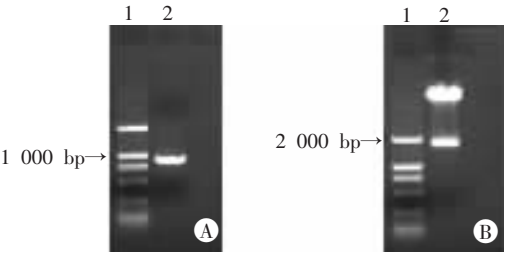
配制 NPI-10、NPI-20、NPI-250 缓冲液,取 NPI-10,将之与蛋白酶抑制剂 cocktail 以 9∶1 混合。以该液重悬细胞,超声裂解后离心收上清,留取少量以备做 SDS-PAGE 电泳,其余均按步骤行镍亲和层析纯化:取 Ni-NTA Superflow 填料 1 ml 入底部覆盖滤膜的 2.5 ml 一次性注射器,竖直固定,以 10 倍柱体积的 NPI-10 冲洗,加入细胞裂解上清,逐步以 NPI-20、NPI-250 各 10 倍柱体积清洗,并收集 NPI-20 的穿过液和 NPI-250 的洗脱液,再逐步以 10 倍柱体积的 NPI-10 和 20% 乙醇清洗,并以 20% 乙醇 1 ml 重悬后 4 ℃保存。剪取约 10 cm 长透析袋,先后以 2% $NaHCO_3$ 和 1 mmol/L EDTA-Na_2 煮沸后用双蒸水彻底清洗,夹紧透析袋下口,将上述洗脱液注入袋内,夹紧上口,置于 PBS 缓冲液内,4 ℃ 透析 2 h 后更换 PBS 透析过夜。将透析袋取出置于杯底平铺以 PEG-8000 的烧杯中,4 ℃浓缩 20 min。将浓缩后的蛋白液移入 1.5 ml EP 管中,取少许样品,采用碧云天 BCA 蛋白浓度试剂盒,配置蛋白标准液及 BCA 工作液,按说明书处理标准品孔和样品孔溶液,以 Bio-Rad 550 酶标仪检测蛋白质浓度后将蛋白溶液 4 ℃保存备用。

1.2.5　流式细胞仪检测　　将 sKbZsGreenGGGS 与 β2-微球蛋白、OVA 肽以 4 μg∶4 μg∶2.77 μg 混合于 100 μl PBS 中,37 ℃孵育过夜结合后 4 ℃保存备用。培养 B3Z 细胞至对数生长期,离心,以 PBS 洗涤、PBS + 1% FCS 重悬后取含 5×10^5 细胞的悬液,将 sKbZsGreenGGGS 与 β2-微球蛋白、OVA 肽结合后的复合物溶液加入混匀,室温下避光反应 30 min,以 PBS + 1% FCS 洗涤 2 次后 300 μl 重悬后进行流式细胞仪检测,同时取含 5×10^5 细胞的悬液作为空白对照送检。

2　结果

2.1　sKbZsGreenGGGS 真核表达载体的构建

sKb 片段 PCR 扩增得到 849 bp 的片段(图 1A),测序证实扩增片段的核苷酸序列与 pET16b-KbdsRed 中相关区域的序列完全一致,而 FUsKbZsGreenGGGS 经 *Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ酶切得到 1 654 bp 的片段(图 1B)。



1:DNA 标准(DL 2 000);2:目的条带

A:sKb PCR 产物;B:酶切鉴定重组质粒 FUsKbZsGreenGGGS

图 1　琼脂糖凝胶电泳分析 sKb PCR 产物和重组质粒 FUsKbZsGreenGGGS 酶切产物

2.2　sKbZsGreenGGGS 的真核表达

FUsKbZsGreenGGGS 在 293FT 细胞中表达后,在荧光显微镜下见大量绿色荧光表达(图 2)。因融合蛋白带 6×His 标签,以镍亲和层析纯化后 SDS-PAGE 电泳见相对分子质量分别约

为 60×10^3 和 120×10^3 的条带(图3),与 sKbZsGreenGGGS 单体及二聚体相对分子质量相符,而 ZsGreen 表达为四聚体,考虑 SDS-PAGE 过程中变性剂使四聚体分子变性为单体与二聚体。

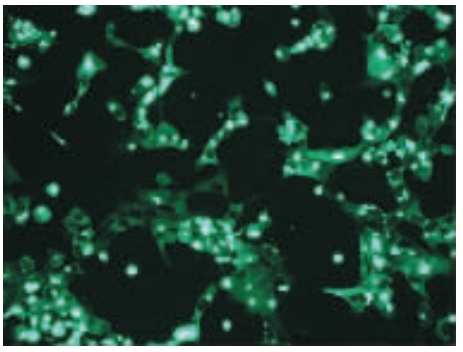
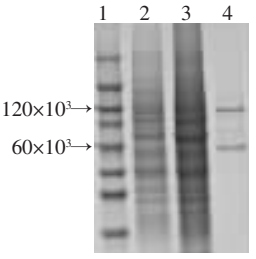


图2　荧光显微镜下观察 FUsKbZsGreenGGGS 在 293FT 细胞中的表达　(×400)

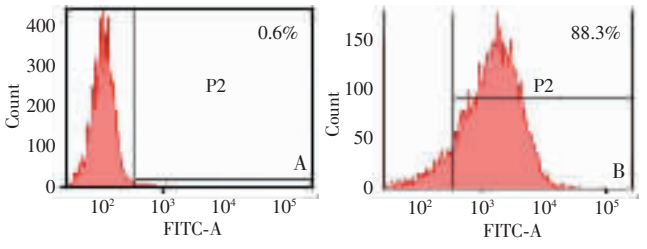


1:标准;2:293FT 细胞总蛋白;3:FUsKbZsGreenGGGS 转染的 293FT 细胞总蛋白;4:纯化后的 sKbZsGreen

图3　sKbZsGreen 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

2.3　流式细胞仪检测结果

与空白对照组(图4A)比较,经 MHC-肽四聚体(sKbZsGreen-β2m-OVA 肽复合物)处理后的 88.3% 的 B3Z 细胞结合了绿色荧光(图4B),sKbZsGreen-β2m-OVA 肽复合物被 OVA 特异性 T 细胞 B3Z 识别。



A:未与 sKbZsGreen-β2m-OVA 肽复合物反应的空白对照 B3Z 细胞;B:与 sKbZsGreen-β2m-OVA 肽复合物反应后的 B3Z 细胞

图4　流式细胞仪检测结果

3　讨论

Tetramer 技术是免疫学和临床诊断中重要的技术。但是,Tetramer 常规制备过程中存在复性率低、步骤繁琐等缺点,而且,每次反应只能分析单一的抗原表位特异性 T 细胞。为了弥补这些缺陷,增加 Tetramer 技术的应用范围,研究者们进行了很多技术改造,如 Leisner 等[5]表达生物素化的 MHC-Ⅰ重链用于构建混合-识别一体 MHC-肽四聚体,李绍飞等[6]融合表达肽-HLA-A2 用于 Tetramer 的改造,熊敏等[7]融合表达 β2m-HLA-A2-BSP 等均简化了 Tetramer 合成的步骤,优化了 Tetramer 合成条件,但这些改造均是针对 MHC 单体的改造,其后续过程仍然繁琐,而且仍未改变每次反应只能分析单一的抗原表位特异性 T 细胞的缺陷。商品化的 MHC-Ⅰ多聚体或可结合任意目的抗原肽,但本身无荧光基团,需用二抗染色方可进行检测,增加了检测的步骤,或自带荧光基团,无需染色,但抗原肽已经预先组装,每个产品仍然只能分析单一的抗原表位特异性 T 细胞。本研究通过构建 sKb-ZsGreen 融合表达载体,其单体 N 端为与 β2m 和抗原肽结合的小鼠 MHC-Ⅰ分子的可溶性部分 sKb,C 端为绿色荧光蛋白(ZsGreen),因 ZsGreen 表达后即形成四聚体蛋白,故经真核表达后即得到 sKb-绿色荧光蛋白四聚体,该四聚体拥有 4 个 sKb,可与 β2m 及小鼠特异性抗原肽结合形成 MHC-肽复合物,用于检测相应的抗原表位特异性 T 细胞。流式细胞检测结果证实 sKb-ZsGreen 与 β2m、OVA 肽组装的复合物可被 OVA 特异性小鼠杂交瘤 T 细胞 B3Z 识别并结合。而且真核表达的蛋白经纯化后即可用于 MHC-肽四聚体的合成,相对原核表达,无需考虑包涵体变性、复性、折叠等繁琐的步骤。

本实验采用分子克隆技术,经 PCR 鉴定、DNA 测序证明成功构建了 1 种 MHC-Ⅰ-绿色荧光蛋白四聚体真核表达载体,并通过真核表达、纯化等步骤得到了该四聚体,为更方便地检测特异性 T 细胞奠定了基础。

参考文献:

[1] Altman J D, Moss P A, Goulder P J, *et al*. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes[J]. Science, 1996, 274(5284): 94-96.

[2] Hobeika A C, Morse M A, Osada T, *et al*. Enumerating antigen-specific T-cell responses in peripheral blood: a comparison of peptide MHC Tetramer, ELISpot, and intracellular cytokine analysis[J]. J Immunother (1997), 2005, 28(1): 63-72.

[3] Kokowski K, Harnack U, Dorn D, *et al*. Quantification of the CD8+ T cell response against a mucin epitope in patients with breast cancer [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2008, 56(2): 141-145.

[4] Pinkse G G, Tysma O H, Bergen C A, *et al*. Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(51): 18425-18430.

[5] Leisner C, Loeth N, Lamberth K, *et al*. One-Pot, Mix-and-Read Peptide-MHC Tetramers[J]. PLoS ONE, 2008, 3(2): e1678.

[6] 李绍飞, 谢和芳, 张玉霞. 肽-HLA-A2 融合蛋白用于四聚体(Tetramer)的改造[J]. 山西农业大学学报, 2007, 6(5): 11-15.

[7] 熊　敏, 杨敬宁, 李　青, 等. 人可溶性单链 β2m-HLA-A2-BSP 融合蛋白表达载体的构建及其表达[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2006, 35(1): 1-4.

(编辑　吴培红)