论著

文章编号:1000-5404(2010)09-0874-05

中国恒河猴 Mamu-B＊1703/EGFP 在 K562 和 B16 细胞中的表达及分布

欧阳东云[1,2],徐丽慧[3],高 琦[1,2],郭 贺[1,2],何贤辉[1,2] (510632 广州,暨南大学:组织移植与免疫实验中心[1],再生医学教育部重点实验室[2],生物工程研究所[3])

[摘要] **目的** 分析恒河猴主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)I类分子重链的亚细胞分布,建立适于体外研究恒河猴 MHC Ⅰ类分子表达和抗原呈递功能的细胞系。**方法** 将含 Mamu-B＊1703 重链基因真核表达载体 pEGFP-N1 分别转染 K562 和 B16 细胞,细胞收集后以 W6/32 单克隆抗体或抗 Mamu-B＊1703 抗血清及 PE 标记二抗染色,利用激光共聚焦显微镜和流式细胞术分析 Mamu-B＊1703 复合体在细胞内和细胞表面的表达。**结果** 在 K562 和 B16 细胞的细胞质内均可观察到与 Mamu-B＊1703 重链基因融合表达的绿色荧光蛋白激发后的绿色荧光,即 2 种细胞均可表达外源 Mamu-B＊1703 重链分子;但通过藻红蛋白标记的抗 MHC Ⅰ类分子复合体抗体染色显示,Mamu-B＊1703 复合体仅表达于 K562 细胞表面,而不表达于 B16 细胞表面。**结论** Mamu-B＊1703 重链可与人 K562 细胞而不能与小鼠 B16 细胞内的 β_2m 轻链结合组装成复合体,表达于细胞表面,提示研究恒河猴的 MHC Ⅰ分子表达应利用人类的细胞株。

[关键词] 主要组织相容性复合体Ⅰ类分子;Mamu-B＊1703;中国恒河猴;转染
[中图法分类号] R392.13; R394-33; R394.2 **[文献标志码]** A

Expression and distribution of Chinese rhesus macaque Mamu-B＊1703/EGFP in K562 and B16 cells

Ouyang Dongyun[1,2], Xu Lihui[3], Gao Qi[1,2], Guo He[1,2], He Xianhui[1,2] ([1]Institute of Tissue Transplantation and Immunology, [2]Key Laboratory for Regenerative Medicine of Ministry of Education, [3]Institute of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong Province, 510632, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the subcellular distribution of Chinese rhesus macaques' major histocompatibility complex (MHC) class Ⅰ molecules and to prepare a cell line suitable for study on their expression and antigen presentation potential *in vitro*. **Methods** An eukaryotic expression vector pEGFP-N1 harboring the Mamu-B＊1703 heavy chain gene was transfected into K562 (human chronic myelogenous leukemia) and B16 cells (mouse melanoma). The cells were collected and stained with W6/32 monoclonal antibody or Mamu-B＊1703 antiserum followed by PE-conjugated second antibody staining. Distribution of recombinant Mamu-B＊1703 molecules were observed with inverted laser confocal microscopy and further analyzed by flow cytometry. **Results** Green-fluorescence was observed in the cytoplasm of both K562 and B16 cells after excitation. This indicated that transfected Mamu-B＊1703 heavy chain gene, which was fused with EGFP sequence, could be expressed in both the cells. But only on the surfaces of K562 cells, instead of on that of B16 cells, Mamu-B＊1703 complexes were displayed as indicated by phycoerythrin-conjugated antibodies to MHC class Ⅰ complexes. **Conclusion** The heavy chain of Mamu-B＊1703 assembles with human β_2m molecules in K562 cells to form a complex that is transported onto cell surfaces. Such an assembly or transport process is unlikely to occur in B16 cells.

[Key words] major histocompatibility complex class Ⅰ; Mamu-B＊1703; Chinese rhesus macaque; transfection

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30230350), the Natural Science Fundation of Guangdong Province (8451063201000340) and the Starting Funds for Talents of Jinan University (51208004, 51208017). Corresponding author: He Xianhui, Tel: 86-20-85220679, E-mail: thexh@jnu.edu.cn

Mamu-B＊17 是印度恒河猴主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)Ⅰ类分子的高频等位基因,大约有 12% 的笼养印度恒河猴个体表达 Mamu-B＊17 分子[1]。由于携带 Mamu-B＊17 等位基因的印度恒河猴可以控制猴免疫缺陷病毒(SIV)感染的病毒载量和疾病进程[2],故成为研究免疫遗传背景与艾滋病进程控制关系的常用模型。研究也陆续发现有表达 Mamu-B＊17 分子(包括 Mamu-B＊1702 和 Mamu-B＊1703)的中国恒河猴,尽管它们占整个种群的比例尚不清楚[3-5]。比较 Mamu-B＊17 基因的开放读码框发现,Mamu-B＊17 基因的引导肽序列前端缺失一个鸟苷酸(G),只能编码 21 个氨基酸,而大多数其他恒河猴 MHC Ⅰ类分子的引导肽序列编码 24 个氨基酸[5]。基因突变是否影响 Mamu-B＊17 分子的表达及其在细胞表面的抗原呈递,并因此具有控制 SIV 感

[基金项目] 国家自然科学基金(30230350);广东省自然科学基金(8451063201000340);暨南大学人才启动基金(51208004, 51208017)
[通信作者] 何贤辉,电话:(020)85220679, E-mail: thexh@jnu.edu.cn

染的病毒载量和疾病进程尚不清楚。因此,有必要克隆该基因,建立体外细胞表达模型加以研究。本研究分析了恒河猴 MHC Ⅰ类分子重链的亚细胞分布,建立适于体外研究恒河猴 MHC Ⅰ类分子表达和抗原呈递功能的细胞系,为在细胞水平上研究中国恒河猴 MHC Ⅰ类分子复合体的免疫呈递功能奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

K562 细胞购自中国典型培养物保藏中心(武汉),B16F10(简称 B16)细胞由本实验室保存。转染试剂 DMRIE-C 和优化培养基购自 Invitrogen 公司,Sunbio Trans-EZ 试剂购自上海生博医学生物工程科技有限公司。大肠杆菌 DH5α 购自 Novagen 公司,pEGFP-N1 购自 ClonTech (Palo Alto, CA, USA),限制性内切酶 *Bam*Ⅰ、*Hind*Ⅲ、T_4 DNA 连接酶、高保真 Prime STAR HS *Taq* DNA 聚合酶、蛋白质分子量标准均为 TaKaRa 产品,PCR 引物由上海英骏公司广州合成部合成。QIAquick Gel Extraction Kit、Qiagen Plasmid Midi Kit、QIAprep Spin Miniprep Kit 为德国 QIAGEN 公司产品,Mamu-B＊1703/IW9 单体(monomer)由本实验室合成[6],抗 Mamu-B＊1703 抗血清来自免疫 Mamu-B＊1703/IW9 单体的 C57BL/6 小鼠(南方医科大学实验动物中心),藻红蛋白(PE)偶联的羊抗鼠 IgG 购自 Dako(Glostrup, Denmark),PE 标记的鼠抗人 HLA-A, B, C (W6/32)购自 BioLegend (San Diego, CA, USA)。

1.2　方法

1.2.1　PCR 及真核表达载体的构建　　Mamu-B＊1703 基因已通过 RT-PCR 的方法,从中国恒河猴外周血 cDNA 扩增并鉴定,其 GenBank 登录号为 EU682520[5]。为构建 Mamu-B＊1703 真核表达载体,采用上游引物 Forw-1703 (5′-ATAGAAGCTTG-CCACCATGGCGCCCGGAACCCTCCT-3′)和下游引物 Back-1703 (5′-GGGATCCCGAGCCGTGAGAGACACATCAGAGC-3′)(两端分别外接 *Bam*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ酶切位点),再次用 PCR 的方法从已鉴定的 Mamu-B＊1703 克隆质粒中扩增其编码序列。PCR 的反应条件以及定点突变 Mamu-B＊1703 基因序列内的 *Bam*Ⅰ酶切位点的方法参见文献[6]。扩增产物用 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收,*Bam*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切,经 T_4 DNA 连接酶连接,插入真核表达载体 pEGFP-N1。重组质粒(pEGFP/Mamu-B＊1703)转化大肠杆菌 DH5α,筛选卡那霉素抗性单克隆,Qiagen Plasmid Midi Kit 制备小量质粒,酶切鉴定插入正确大小片段外源基因的克隆,送 Invitrogen 公司进一步测序鉴定。经鉴定的质粒在 DH5α 中扩增,以超纯质粒抽提试剂盒(Qiagen Plasmid Midi Kit)制备转染用载体。

1.2.2　细胞培养和转染　　K562 细胞在 37 ℃、5% CO_2 条件下,用含 10% 胎牛血清(Gibco)的 RPMI1640 (Invitrogen,上海)培养,2～3 d 传代 1 次;B16 细胞在 5% CO_2 条件下,用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(Invitrogen/Gibco)培养,3～4 d 传代 1 次。对数生长期细胞按试剂说明,分别采用 DMRIE-C(K562 细胞)和 Sunbio Trans-EZ(B16 细胞)转染 pEGFP/Mamu-B＊1703 重组质粒。同时以转染空白对照(即等体积的优化培养基)和 pEGFP-N1 空载体的细胞作对照。转染细胞继续在 37 ℃和 5% CO_2 条件下培养,转染后 48 h 观察外源基因的表达。K562 细胞经离心收集,PBS 洗 2 次,B16(贴壁)细胞弃上清,PBS 洗 2 次。上述细胞加抗 Mamu-B＊1703 抗血清(一抗)和 PE 偶联的羊抗鼠 IgG(二抗)或者直接用 PE 偶联的鼠抗人 HLA-A, B, C (W6/32)染色。一部分 B16 细胞用 PBS/EDTA 消化,离心收集,PBS 洗涤后用上述抗体染色。染色后的细胞加入适量 4% 多聚甲醛固定。

1.2.3　激光共聚焦显微镜观察　　在 Zeiss LSM510 Meta 激光共聚焦倒置显微镜(Oberkochen, Germany)下观察,LSM Image Browser Ver. 4.0 (Zeiss)软件分析:①Mamu-B＊1703 表达的亚细胞分布,通过与其融合表达的绿色荧光蛋白(EGFP,绿色)揭示;②Mamu-B＊1703 在细胞表面的表达,通过细胞表面抗体染色(PE 荧光,红色)揭示。同时以软件对上述图像,连同细胞微分干涉差(DIC)图像进行叠加获得重合图像。

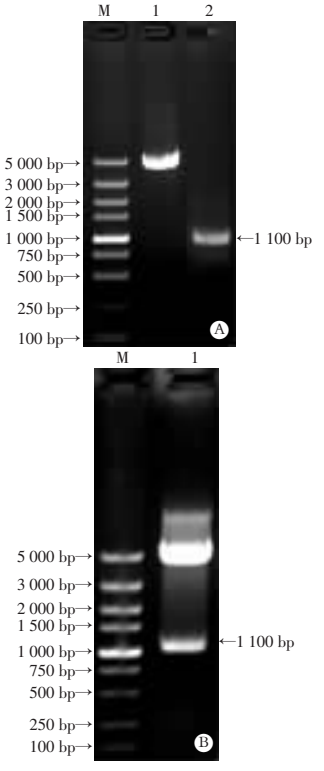
1.2.4　流式细胞仪分析　　上述经细胞表面抗体标记的 K562 悬浮细胞以及经 EDTA 消化的 B16 细胞,通过 Canto Ⅱ 流式细胞仪(Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)上样,FACSDiva 软件 (Becton Dickinson)分析 EGFP 和 PE(抗体表面染色)阳性细胞百分率。

2　结果

2.1　Mamu-B＊1703/EGFP 表达载体的构建

用 PCR 的方法直接从已鉴定的克隆载体[5]中扩增两端带有酶切位点的 Mamu-B＊1703 编码序列,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,与预期大小相符(1 100 bp,图 1A)。

扩增产物经胶回收和双酶切后插入 pEGFP-N1 载体。重组质粒转化大肠杆菌 DH5α,并筛选卡那霉素抗性单克隆,摇菌扩增后小量提取质粒,再次双酶切鉴定插入外源片段大小。经琼脂糖凝胶电泳鉴定,筛选的多个克隆均插入预期大小片段(图 1B)。插入预期大小片段的重组质粒,其插入的外源基因序列经进一步测序确认。

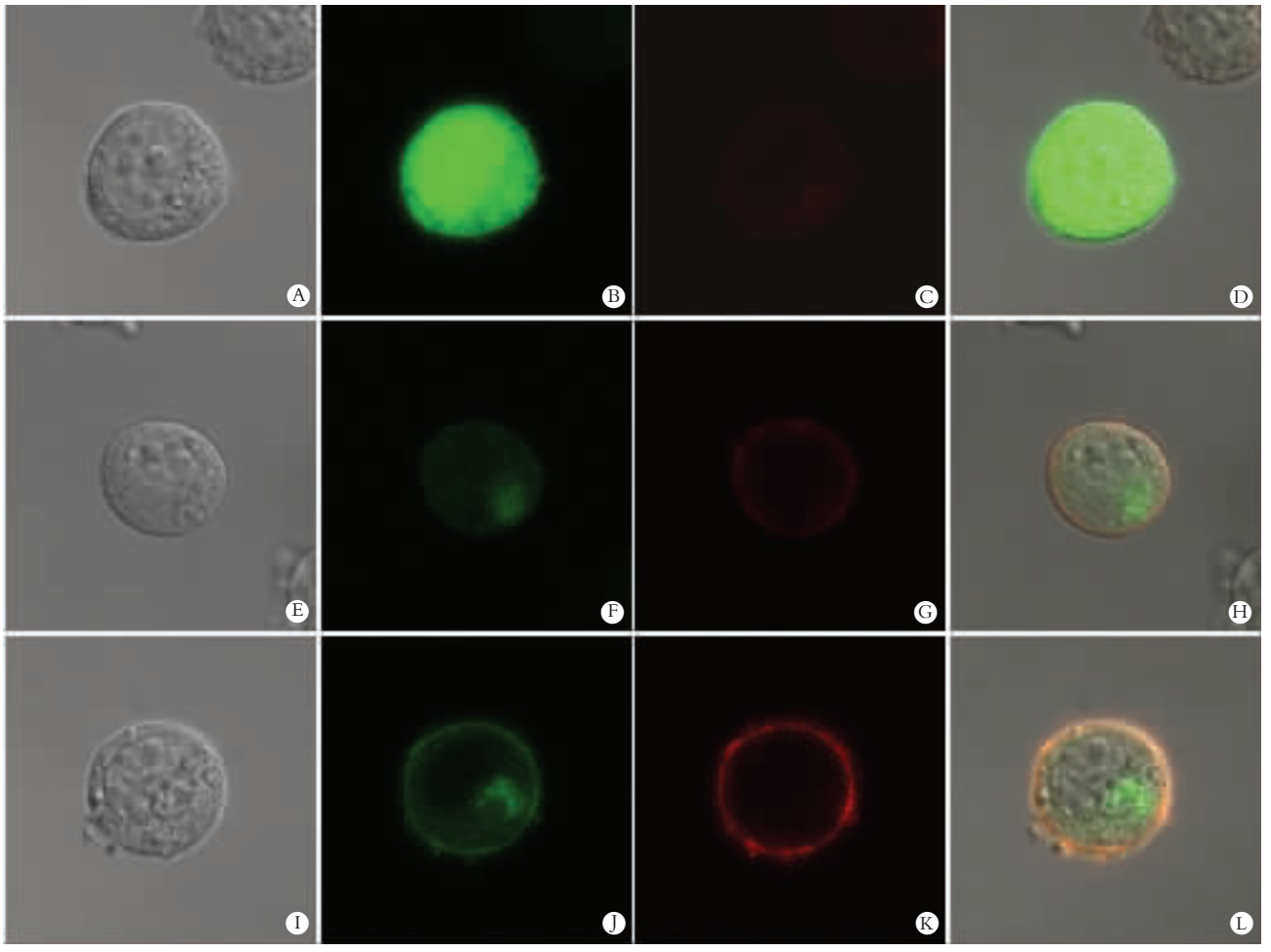


A:PCR 扩增产物　M: DNA 标准(DL 5000); 1:*Bam*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切 pEGFP-N1;2:Mamu-B＊1703 PCR 产物
B:重组质粒的双酶切鉴定结果　M:DNA 标准(DL 5000);1: *Bam*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切 pEGFP/Mamu-B＊1703 重组质粒

图 1　Mamu-B＊1703 cDNA 的 PCR 产物和重组质粒的双酶切鉴定

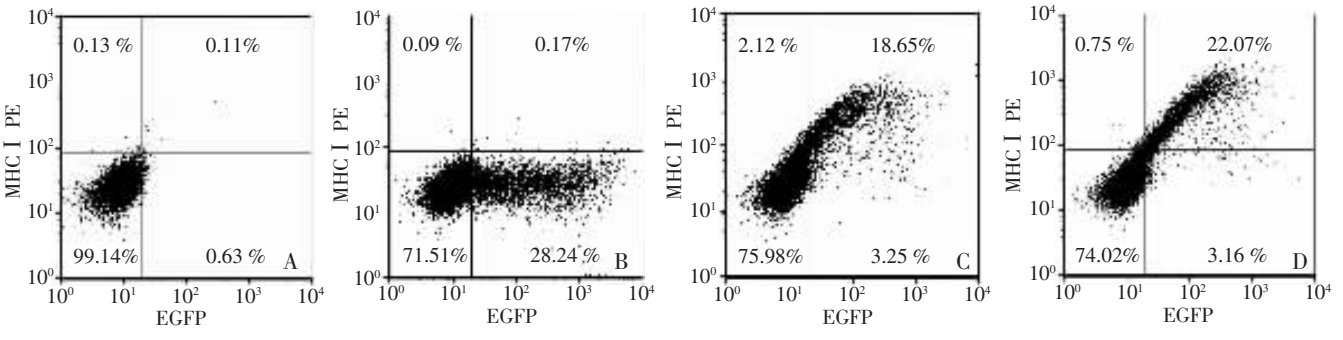
2.2 Mamu-B*1703在K562亚细胞中的分布

重组质粒pEGFP/Mamu-B*1703在转染的K562细胞中瞬时表达，激光共聚焦观察表明，融合蛋白分布于除细胞核基质外的整个细胞，少数细胞仅在细胞膜观察到绿色荧光，而对照细胞转染pEGFP-N1空载体表达绿色荧光蛋白，则分布于包含细胞核在内的整个细胞基质（图2）。Mamu-B*1703是中国恒河猴的MHC Ⅰ类分子，而且DNA序列分析也表明，Mamu-B*1703基因具有跨膜区，为分析其在细胞膜上的分布，转染细胞分别经抗Mamu-B*1703抗血清和抗人HLA-A，B，C（W6/32）抗体标记，分析其在细胞膜上的分布。2种抗体均检测到Mamu-B*1703表达于细胞表面，呈指环状分布，而对照细胞未见抗体标记荧光（图2）。流式细胞仪分析表明，至少占85%的EGFP阳性细胞（视为转染成功细胞）表面有MHC Ⅰ蛋白的分布（图3）。



A～D：转染pEGFP-N1空载体；E～H：转染pEGFP/Mamu-B*1703；I～L：转染pEGFP/HLA-A*0201；A、E、I：DIC观察K562细胞；B、F、J：EGFP或与之融合表达的外源蛋白；C、G、K：PE显示与抗体有结合反应的表面MHC Ⅰ类分子复合体；D、H、L：重合图像为DIC、EGFP和PE的叠加结果

图2 激光共聚焦显微镜观察Mamu-B*1703/EGFP在K562细胞中的表达 （×600）

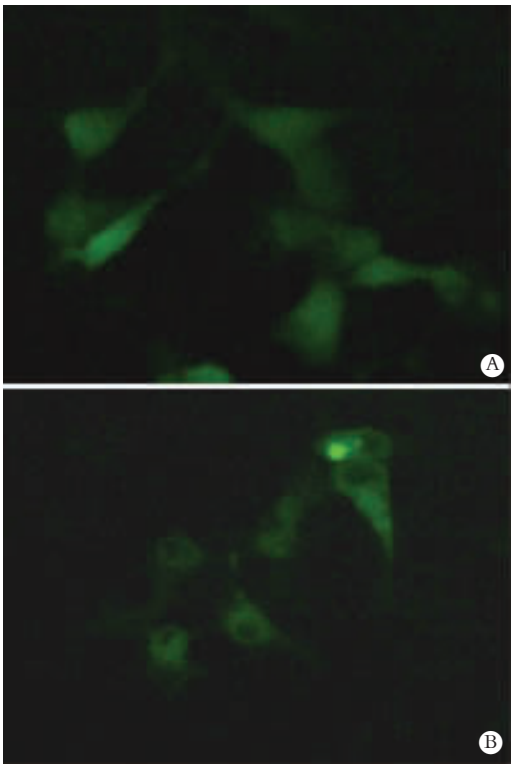


A：空白对照；B：转染pEGFP-N1空载体；C：转染pEGFP/Mamu-B*1703；D：转染pEGFP/HLA-A*0201

图3 流式细胞仪分析转染Mamu-B*1703/EGFP的K562细胞表达EGFP和PE的百分率

2.3 Mamu-B*1703/EGFP在B16亚细胞中的分布

重组质粒pEGFP/Mamu-B*1703转染小鼠黑素瘤B16细胞虽然也表达外源基因,而且分布于除细胞核基质以外的细胞基质中(图4),但与其在人K562细胞中的表达不同,抗人W6/32单抗和抗Mamu-B*1703抗血清均未检测到外源Mamu-B*1703复合体在B16细胞表面的表达。



A:转染pEGFP-N1空载体;B:转染pEGFP/Mamu-B*1703

图4 激光共聚焦显微镜观察Mamu-B*1703/EGFP在B16细胞中的表达 (×100)

3 讨论

MHCⅠ类分子在哺乳动物细胞免疫中起着关键的作用。即使同一物种的不同个体,由于表达的MHCⅠ类分子不同,所能提呈的抗原表位也有所不同,诱发的细胞免疫应答水平不尽相同,因此,携载不同MHCⅠ类分子的个体,对病毒感染的疾病进程也不同。研究表明,某些人类MHCⅠ类分子如HLA-B*57和HLA-B*27,可以控制人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染的病毒载量和疾病进程[7-9],而限制性抗原表位突变以后,HLA-B*5703对HIV-1病毒感染的控制功能随之消失[10]。

与人的HLA-B*57和HLA-B*27的作用相似,恒河猴Mamu-B*17也可以控制SIV在恒河猴体内复制的病毒载量和艾滋病进程,但其机制尚不清楚。由于同一恒河猴个体表达多种MHC分子,不适于在个体水平上研究某一特定分子的作用机制,因此克隆其基因,并在不表达自身MHCⅠ类分子的细胞系(如本实验涉及的K562细胞)中转染表达,进行体外机制研究是一个可行的选择。

基因序列分析表明,大部分恒河猴的MHCⅠ类分子重链基因,其N端均编码1个由24个氨基酸残基组成的引导肽,只有少数基因如Mamu-B*1703的引导肽序列,由于丢失1个鸟苷酸而丢失了N端的3个氨基酸。为研究Mamu-B*1703在细胞内是否可转染表达,我们将Mamu-B*1703编码序列插入真核表达载体pEGFP-N1,表达的融合蛋白可以通过绿色荧光蛋白指示,在激光共聚焦显微镜下观察或通过流式细胞仪进行分析。绿色荧光蛋白对表达细胞毒性小,而且蛋白本身的相对分子质量较小,一般不会影响与之融合的蛋白的折叠和功能,常作为外源蛋白的表达和定位指示[11]。本研究表明,尽管在进化过程中发生了这一突变,Mamu-B*1703仍然能够在转染细胞(K562和B16)内表达,与EGFP融合表达的Mamu-B*1703重链分子分布于除细胞核基质外的细胞质中,但它们在K562和B16细胞表面的亚细胞分布有所不同,前者可用抗体检测到外源表面分子,而后者细胞表面不表达外源蛋白。

MHCⅠ类分子复合体包含1对相互结合的1条重链和1条轻链,以及结合其上的抗原多肽。重链基因表达后,进入内质网,在内质网内与β_2m轻链分子结合,最终运输至细胞表面。由于抗人HLA-A,B,C(W6/32)单克隆抗体是个构象识别抗体,可识别多个物种(包括人、非人灵长类、牛和猫等)[12]的MHCⅠ类分子重链和轻链分子复合体,单独对重链分子只有很弱的结合能力,而几乎不单独作用于轻链分子[13]。由于不同物种的β_2m分子具有高度的同源性,它们的MHCⅠ类分子重链和轻链常常可以交叉折叠。尽管W6/32最初针对的是人的MHCⅠ类分子,但它也能识别恒河猴的MHCⅠ类分子以及恒河猴的MHC重链和人的轻链组成的嵌合分子[12]。我们前期工作也证明,W6/32单抗与用原核表达方法构建的Mamu-B*1703重链和人的β_2m轻链分子嵌合复合体(在SIV抗原多肽存在下折叠而成)有很强的结合能力,却几乎不单独识别重链分子或轻链分子以及无抗原多肽存在下的混合物[6]。

因此本研究用W6/32单抗检测到Mamu-B*1703在K562细胞表面表达,说明中国恒河猴Mamu-B*1703重链可与人的β_2m轻链结合,组装成能被W6/32单抗识别的具有正确构象的复合体分子,并转运至细胞表面,这一结果与文献[14]报道的预测相符。又由

于由重链和轻链分子组成的MHC Ⅰ类分子复合体,其在细胞内的运输和在细胞表面的稳定性都依赖于抗原肽的结合,说明中国恒河猴MHC重链与人的β_2m轻链分子组成的复合体在K562细胞内具有抗原呈递的潜能。值得指出的是,人的K562细胞本身不表达MHC Ⅰ类分子,以K562细胞转染恒河猴的MHC重链基因,表达人猴嵌合的MHC Ⅰ类分子复合体,有利于研究某一特定恒河猴MHC Ⅰ类分子的表达特性和抗原呈递功能。

虽然Mamu-B*1703能够在小鼠B16细胞的细胞质内表达,但用W6/32单抗未能检测到表面外源分子。其原因可能为:①Mamu-B*1703重链不能与小鼠的β_2m轻链结合形成复合体;②B16细胞内缺乏合适的抗原多肽,不能形成正确的复合体构象;③形成的复合体不能运输到B16细胞表面;④复合体分子能够运输到细胞表面,但不能被W6/32识别。有研究表明,W6/32单抗不能识别包含小鼠β_2m轻链分子的MHC Ⅰ类分子复合体(不管是与同源重链还是与异源重链结合)[12,15]。尽管如此,Mamu-B*1703重链分子与小鼠β_2m轻链复合体运输到细胞表面的可能性几乎可以排除,因为我们制备的高滴度(1∶200 000)抗Mamu-B*1703抗血清也未能检测到B16转染细胞表面的外源分子。这些结果说明,尽管W6/32单抗不能识别小鼠本身的MHC Ⅰ类分子复合体,不会与转染表达的外源复合体形成交叉反应,但由于小鼠细胞自身的β_2m轻链分子不能与外源的恒河猴重链分子结合,形成可呈递到细胞表面的正确构象,因此用小鼠细胞研究恒河猴的MHC Ⅰ类分子复合体的抗原呈递功能,可能不是合适的平台。

总之,我们成功构建了克隆中国恒河猴Mamu-B*1703重链基因的真核表达载体,并在人的K562细胞和B16细胞中转染获得成功表达,但它们在细胞表面的亚细胞分布有异。Mamu-B*1703重链和小鼠β_2m轻链复合体可能不能呈递到细胞表面。Mamu-B*1703重链和人的β_2m轻链分子形成正确折叠构象的细胞表面复合体分子,为在细胞水平上研究中国恒河猴MHC Ⅰ类分子复合体的免疫呈递功能打下了基础。

志谢 衷心感谢华南师范大学王希朝教授在流式细胞仪分析上的大力帮助

参考文献:

[1] Mothe B R, Sidney J, Dzuris J L, *et al*. Characterization of the peptide-binding specificity of Mamu-B*17 and identification of Mamu-B*17-restricted epitopes derived from simian immunodeficiency virus proteins [J]. J Immunol, 2002, 169(1): 210-219.

[2] Yant L J, Friedrich T C, Johnson R C, *et al*. The high-frequency major histocompatibility complex class Ⅰ allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication [J]. J Virol, 2006, 80(10): 5074-5077.

[3] Otting N, Heijmans C M, van-der-Wiel M, *et al*. A snapshot of the Mamu-B genes and their allelic repertoire in rhesus macaques of Chinese origin[J]. Immunogenetics, 2008, 60(9): 507-514.

[4] Karl J A, Wiseman R W, Campbell K J, *et al*. Identification of MHC class Ⅰ sequences in Chinese-origin rhesus macaques[J]. Immunogenetics, 2008, 60(1): 37-46.

[5] Ouyang D, Xu L, Dai Z, *et al*. Identification of major histocompatibility complex class Ⅰ alleles in Chinese rhesus macaques[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008, 40(11): 919-927.

[6] Ouyang D, Wang X, He X, *et al*. Construction of soluble Mamu-B*1703, a class Ⅰ major histocompatibility complex of Chinese rhesus macaques, monomer and tetramer loaded with a simian immunodeficiency virus peptide[J]. Cell Mol Immunol, 2009, 6(2): 117-122.

[7] McNeil A J, Yap P L, Gore S M, *et al*. Association of HLA types A1-B8-DR3 and B27 with rapid and slow progression of HIV disease[J]. QJM, 1996, 89(3): 177-185.

[8] Migueles S A, Sabbaghian M S, Shupert W L, *et al*. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(6): 2709-2714.

[9] Carrington M, O'Brien S J. The influence of HLA genotype on AIDS [J]. Annu Rev Med, 2003, 54: 535-551.

[10] Crawford H, Lumm W, Leslie A, *et al*. Evolution of HLA-B*5703 HIV-1 escape mutations in HLA-B*5703-positive individuals and their transmission recipients[J]. J Exp Med, 2009, 206(4): 909-921.

[11] 雒喜忠, 王阁, 郑继军, 等. RAI16基因真核表达载体的构建及在HepG2中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(17): 1620-1624.

[12] Jefferies W A, MacPherson G G. Expression of the W6/32 HLA epitope by cells of rat, mouse, human and other species: critical dependence on the interaction of specific MHC heavy chains with human or bovine beta 2-microglobulin[J]. Eur J Immunol, 1987, 17(9): 1257-1263.

[13] Lu X, Wu X, Liang Z, *et al*. Construction and functional test of HLA-A*2402-peptide tetramer[J]. Cell Mol Immunol, 2005, 2(2): 145-149.

[14] Su J, Luscher M A, MacDonald K S. Sequence of beta(2)-microglobulin from rhesus macaque (Macaca mulatta) includes an allelic variation in the 3′-untranslated region[J]. Immunogenetics, 2004, 55(12): 873-877.

[15] Kievits F, Ivanyi P. Monomorphic anti-HLA monoclonal antibody (W6/32) recognizes polymorphic H-2 heavy-chain determinants exposed by association with bovine or human but not murine beta 2-microglobulin[J]. Hum Immunol, 1987, 20(2): 115-126.

(**收稿**:2009-11-03;**修回**:2009-12-03)

(编辑 王小宴)