

• 实验研究 •

HLA-A * 0201/BSP 融合基因的构建与表达

Construction and expression of HLA-A * 0201/BSP fusion gene

姜加陶¹, 范列英¹, 张玉芳², 侯彦强¹, 周演武¹, 耿红莲¹, 仲人前^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 杭州市第一人民医院中心实验室, 杭州 310006)

[摘要] 目的: 克隆表达 HLA-A * 0201 α 链胞外区与 BirA 酶底物肽(BirA substrate peptide, BSP)的融合蛋白。方法: 采用 PCR 技术从人 HLA-A * 0201 α 链 cDNA 库中克隆基因的胞外区, 拼接可生物素化的 BSP 片段序列后, 经双酶切插入载体 pET28a(+)后在 *E. coli* BL21(DE3)诱导高效表达, 并对表达产物进行纯化与复性。结果: 成功地扩增出 HLA-A * 0201/BSP 基因并测序证实, 构建了融合表达载体 pET-HLA-A * 0201, 并获表达与纯化。结论: 成功构建了 HLA-A * 0201/BSP 融合基因, 为进一步体外构建特定的 HLA-A * 0201 四聚体, 标记相应特异性 CD8⁺ T 细胞提供物质基础。

[关键词] HLA-A * 0201 α 链胞外区; BirA 酶底物肽; 融合基因; 基因表达

[中图分类号] Q 784 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1332-03

MHC 分子在免疫系统中扮演着重要角色, 它既是抗原肽的提呈者, 又充当 T 细胞抗原受体(TCR)识别抗原肽的限制性分子。抗原提呈细胞表面 MHC 分子与提呈的表位肽组成的复合物是抗原特异性 T 细胞 TCR 的惟一配体, 因此在体外模拟体内特异性识别过程是分析抗原特异性 T 细胞的最直接途径。1996 年, Altman 等^[1]应用基因工程技术, 体外构建了四聚体直接标记特异性 CD8⁺ T 细胞, 为抗原特异性 T 细胞研究提供了变革性的技术成就。本研究在成功克隆了 HLA-A * 0201 基因后, 将 BirA 酶底物肽(BSP, 经 BirA 酶作用可生物素化)连接到其胞外区末端^[2], 构建成融合表达载体, 进行原核表达, 并利用 6 $\times$ His tag 进行纯化。该融合蛋白成功表达为特定四聚体的构建奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株、工具酶及主要试剂 *E. coli* DH5 α , 为本室保存。*E. coli* BL21(DE3)、pET28a(+)购自 Novagen 公司, 为含有 T₇启动子的融合表达载体, 插入目的基因后, 表达蛋白的 C 端融合 6 个 His。含 HLA-A * 0201 α 链全长序列的质粒 pcDNA3 宿主菌 XL1-Blue 由上海免疫研究所尤强博士惠赠。T₄连接酶、各种限制性内切酶和 PCR 试剂及 Probest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。IPTG、其他主要化学试剂以及 DNA 凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品。抗 6 $\times$ His 抗体购自 Novagen 公司, 抗人 HLA-A2 McAb 购自 Serotec 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Immucell 公司。

1.2 引物设计合成 按 IMGT/HLA database 中的 HLA-A * 020107 的 cDNA 序列设计引物(上海生物工程服务有限公司)。Forward primer: 5'-A CCG GAA TTC TCT CAT TCT ATG AGA TAT TTC TTC ACA TCC GTG-3', Reverse primer: 5'-A CCG CTC GAG ACG ATG ATT CCA CAC CAT TTT CTG TGC ATC CAG AAT ATG ATG CAG CAT ATG CGG CTC CCA TCT CAG GGT-3'。

1.3 质粒抽取及克隆测序 挑取含目的基因的甘油菌 XL1-Blue, 接种到 2 ml 含有适量氨苄抗生素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡下培养过夜。过夜菌涂布含氨苄 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单菌落过夜增菌, 小量抽提质粒 DNA, 应用 pcDNA3 通用引物对克隆的 HLA-A * 0201 α 链基因进行序列分析(上海基康公司), 余留用 PCR 扩增反应的目的基因。

1.4 PCR 扩增 HLA-A * 0201 α 链胞外区/BSP 融合基因 PCR 的反应体系 50 μ l: 冰水浴中分别加入 pcDNA3 质粒 DNA 0.5 μ l、引物 2 μ l、10 $\times$ 反应缓冲液 5 μ l、2.5 mmol/L dNTP 4 μ l、最后加入 Probest DNA 聚合酶 0.5 μ l(2.5 U), 加水至 50 μ l 混匀后进行 PCR 反应, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 35 个循环, 最后再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物在含溴化乙锭的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 HLA-A2/BSP 表达载体的构建 扩增出的 HLA-A2/BSP 基因产物经电泳纯化回收后, 取 2 μ g PCR 产物、5 μ g 表达载体 pET28a(+), 用 *Xho*I 及 *Eco*R I 分别进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C 1 h, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切效果并纯化。取酶切后的 PCR 产物、载体 pET28a(+)按摩尔浓度 3:1 的比例进行 T₄连接酶连接, 构建 HLA-A2/BSP 表达载体, 氯化钙法转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3), 以含氨苄青霉素的 LB 平板培养转化菌, 挑克隆, 小量扩增, 提取质粒, 双酶切鉴定。应用 pET28a(+)通用引物对克隆的 HLA-A * 0201/BSP 基因进行序列分析(上海基康公司)。重组质粒命名为 pET-HLA-A2/BSP。

1.6 目的基因的诱导表达及鉴定 取经鉴定的重组表达质粒大肠杆菌 BL21(DE3)单菌落接种于 2 ml 与上述相同的

[基金项目] 上海市基础研究重大项目(02JC14005)。

[作者简介] 姜加陶(1972-), 男(汉族), 博士生, 主管检验医师。现在杭州市第一人民医院中心实验室, 杭州 310006。

E-mail: jiatao1001@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: rqzhong@guomai.sh.cn

LB 培养液中 37℃ 振荡培养过夜, 次日取 800 μ l 离心弃上清, 加同体积新鲜 LB 重悬全部加入 20 ml 相同的 LB 中振荡培养 3 h 至 D_{450} 值为 0.6, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37℃ 诱导 2~5 h, 离心收集菌体及上清。进行 SDS-PAGE 分析, 浓缩胶浓度 3%, 分离胶浓度 15%, 分别将上清及菌体沉淀加等量蛋白质电泳上样缓冲液, 考马斯亮蓝 R-250 染色 4 h, 脱色过夜后观察。

1.7 蛋白印迹法验证重组蛋白 将 SDS-PAGE 后凝胶上的条带电转移至硝酸纤维滤膜上, 含 5% 脱脂奶粉, 0.02% Tween-20 PBS 封闭过夜。鼠抗 HLA-A2 抗体为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体为二抗, DAB 显色。

1.8 变性条件下 6 $\times$ His 融合蛋白的亲纯化 以每克湿重菌体 4 ml Buffer B (8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 8.0) 缓冲液悬浮菌体, 室温搅拌混匀至溶液半透明, 细菌完全裂解。10 000 $\times g$ 离心 20 min 收集上清。取 1 ml 50% Ni-NTA 树脂与 4 ml 上清混匀, 室温放置 30~60 min 后装入空柱中, 用 4 ml buffer C (8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 6.3) 洗涤 1 次, 0.5 ml buffer D (8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 5.9) 洗脱 4 次, 0.5 ml buffer E (8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 4.5) 洗脱 4 次, 并收集各洗脱组分, 进行 SDS-PAGE 分析纯化产物。

1.9 纯化产物的复性及鉴定 采用氧化型/还原型谷胱甘肽系统。于 4℃ 以复性液 (5 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5) 透析过夜, 其间换液 3 次。样品进行 SDS-PAGE 电泳后, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 灰度扫描分析目的蛋白含量。蛋白质浓度采用 Bradford 法, 以 BSA 为标准样品。

2 结果

2.1 PCR 扩增 HLA-A * 0201 基因 以含有 HLA-A * 0201 α 链全长 cDNA 的质粒 pcDNA3 为模板, 经 PCR 扩增出大小为 879 bp 的 HLA-A * 0201 基因的胞外区片段。大小与理论预期一致 (图 1)。

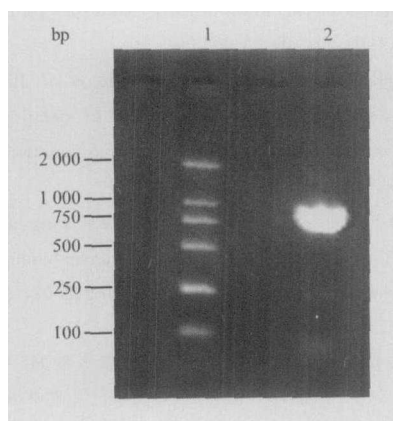


图 1 HLA-A * 0201 cDNA 产物的凝胶电泳
1: DNA marker; 2: HLA-A2 的 RT-PCR 产物

2.2 重组载体的构建、筛选及鉴定

2.2.1 重组载体的构建及酶切鉴定 PCR 产物与 pET28 质粒连接后, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 挑取阳性克隆, 抽取重组载体用 *Xho*I 及 *Eco*R I 进行双酶切, 得到与质粒载体和插入片段大小一致的 5.4 kb 及 879 bp 两片段。酶切图谱如图 2, 结果与理论预期值一致。

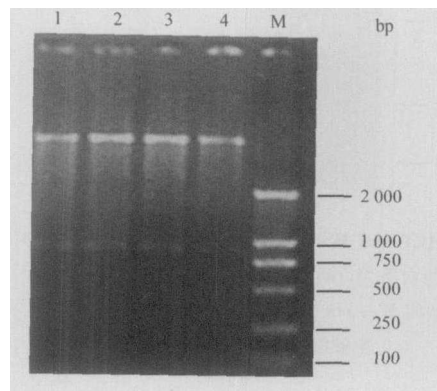


图 2 重组体 pET-A2-BSP 的酶切鉴定
1~4: pET-A2-BSP; M: DNA marker

2.2.2 测序分析 HLA-A * 0201 基因序列与 IMGT/HLA Database 登录的 HLA-A * 020107 序列完全一致。BSP 与文献报道^[3]完全符合。

2.3 目的基因的诱导表达

2.3.1 SDS-PAGE 分析 表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 经 IPTG 诱导后, 在相对分子质量 34 000 处有一明显的深染新生蛋白带, 与预计的 A2/BSP/6 $\times$ His 融合蛋白相对分子质量大小基本相符。以超声裂解细菌, 离心后分别取上清和沉淀电泳分析, 发现表达产物基本在沉淀中, 灰度扫描分析, 沉淀和上清中融合蛋白表达量分别占菌体总蛋白的 36%、5%。说明 A2-BSP 主要是以包涵体形式存在于细菌细胞内。此外, 重组蛋白在 *E. coli* BL21(DE3) 中诱导前后表达有差异, 且诱导前无明显表达 (图 3)。

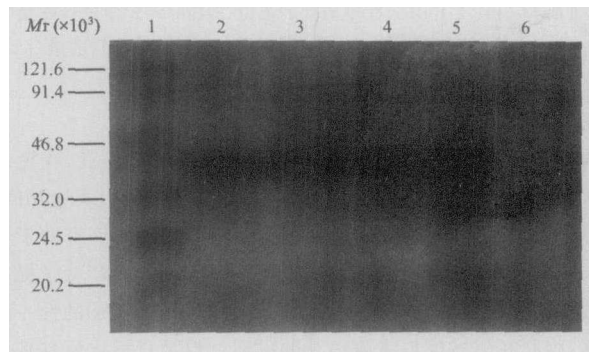


图 3 pET-A2-BSP 的表达

1: 低分子量 Marker; 2~5: 分别为经诱导 2、3、4、5 h 的 *E. coli* BL21(DE3) 中的沉淀样品; 6: 未经诱导的 *E. coli* BL21(DE3) 中的总蛋白

2.3.2 Western 印迹 结果显示, 在 NC 膜上 6 $\times$ His 表达产物位置处均有一强的杂交信号, 说明获得融合蛋白, 而未

诱导菌无此阳性信号(图 4)。

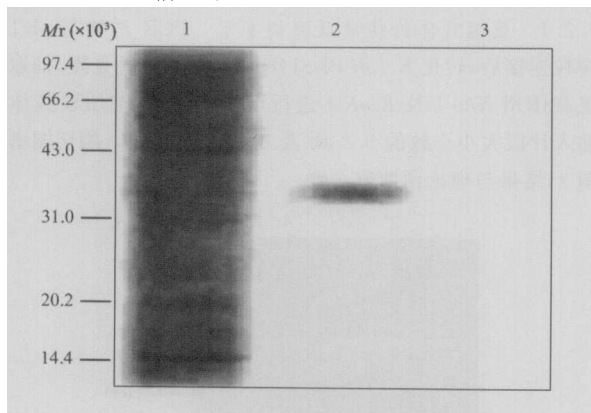


图 4 HLA-A2-BSP 不溶性表达产物的 Western 印迹分析
1: 蛋白质 Marker; 2: 经诱导的 *E. coli* BL21(DE3) 中的沉淀样品的 Western 印迹分析; 3: 未经诱导的 *E. coli* BL21(DE3) 中的沉淀样品的 Western 印迹分析

2.4 表达蛋白的纯化、纯度鉴定及浓度测定 根据各洗脱液 pH 值的不同进行蛋白分离, SDS-PAGE 分析各洗脱产物组分, 可见表达产物在 buffer E 中浓度及纯度均较高(图 5)。紫外分光光度法测定蛋白浓度为 2.5 mg/ml (buffer E 中)。

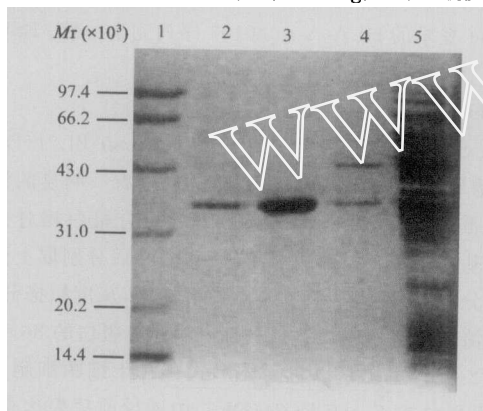


图 5 SDS-PAGE 分析各洗脱液组分

1: 蛋白 Marker 2: Buffer D 中的目的蛋白; 3: Buffer E 中的目的蛋白; 4: Buffer C 中的目的蛋白; 5: 纯化前菌体沉淀中的目的蛋白

3 讨论

MHC 分子的结构与功能是近年来的研究热点, 在免疫识别和调节中具有重要意义。利用基因工程技术, 表达 MHC 分子胞外区, 将细胞表面分子转变为可溶性分子, 有助于进一步研究其结构和功能。抗原提呈细胞表面 MHC 分子提呈的表位肽组成的复合物是抗原特异性 T 细胞 TCR 的惟一配体, 因此在体外模拟体内特异性识别过程是分析抗原特异性 T 细胞的最直接途径。由于可溶性 MHC 单体分子与相应特异性表位肽结合组成的单体复合物与 TCR 的亲和力很低, 因此无法用此单体复合物免疫荧光法标记特异性 TCR 分子而分析特异性 T 淋巴细胞。而多价此单体分子(如二价的单链抗体分子连接成的二聚体或生物素/亲和素连接的四聚体)与相应 TCR 则具有相对较高的亲和力。本研究体外表达的内含 BSP 的 15 个氨基酸共有序列残基与 HLA-A * 0201 α

链 C 末端融合表达、纯化^[2]。将与另外表达的 β_2M 以及与 HLA-A * 0201 匹配的肽段体外折叠复合, 形成 HLA-A2/肽复合物, 经凝胶过滤纯化, 以 BirA 酶作用融合蛋白中 BSP 的赖氨酸残基, 对其进行生物素化^[3]。进一步纯化后与 PE(藻红蛋白)标记的亲和素以 4 : 1 比例混合、纯化后形成 HLA-A * 0201/肽四聚体, 本实验成功地构建了可生物素化的融合表达载体, 表达纯化相应的融合蛋白, 为进一步构建四聚体, 标记特异性 CD8⁺ T 细胞打下了工作基础^[4]。之所以选择 HLA-A * 0201, 是因为汉族群体此基因频率在 I 类分子中最高, 约 50% 人群中表达此分子^[5]。

选择合适的载体-宿主系统是外源基因在原核体系内高效表达的关键之一。本研究选用了含有 T₇ 噬菌体启动子的表达载体 pET-28a(+) 构建融合表达载体 pET-A2-BSP, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 经 IPTG 诱导大量表达, 电泳鉴定发现, 目的蛋白主要存在于包涵体中, 包涵体的形成使目的蛋白相对浓缩, 并免于被胞内蛋白酶降解, 为纯化提供了便利条件。包涵体从破裂的菌体中分离出来, 经洗涤可除去大部分可溶性杂蛋白、核酸及脂类杂质。但需对其进行复性以恢复构象, 利用构象特异的单克隆抗体检测表明其产生正确折叠。此外, 由于本实验构建的表达载体在目的蛋白的 C 端融合 6 $\times$ His, 根据 6 $\times$ His 与过渡态金属离子 Ni²⁺ 高亲和力和络合的特性, 利用 Ni²⁺ NTA 螯合物树脂可对表达产物直接纯化, 且 6 $\times$ His 融合表达产物的载体蛋白的分子量较小, 因而免疫原性很低, 对目的蛋白的构象及活力影响不大, 故无需蛋白水解酶切去融合部分。另外, 6 $\times$ His 融合蛋白与 Ni²⁺ 的结合不需要任何功能结构, 在强变性剂存在的条件下仍不影响其结合。这比常用的通过离子交换树脂和 HPLC 进行纯化的方法简单很多。

参考文献

- [1] Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [J]. *Science*, 1996, 274 (5284): 94-96.
- [2] Schatz J. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme; a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology (N Y)*, 1993, 11 (10): 1138-1143.
- [3] O'callaghan CA, Byford MF, Wyer JR, et al. BirA enzyme: production and application in the study of membrane receptor-ligand interactions by site-specific biotinylation [J]. *Anal Biochem*, 1999, 266 (1): 9-15.
- [4] Reignat S, Webster GJ, Brown D, et al. Escaping high viral load exhaustion; CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Exp Med*, 2002, 195 (9): 1089-1101.
- [5] 侯亚非, 孙宗棠, Appella E, 等. 北方汉族人群 HLA-A2 亚型分布及 p53 的合成肽体外诱导 CTL 反应 [J]. *中华微生物学及免疫学杂志*, 1999, 19 (6): 47-50.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-10-15

[本文编辑] 曹 静