

## A-S2-8

H-2K<sup>b</sup>/OVA<sub>257-264</sub>复合体的原核表达、折叠、纯化与鉴定

丁双<sup>1</sup>, 顾冬梅<sup>2</sup>, 许文锦<sup>2</sup>; 指导教师: 沈传来

1. 东南大学 2010 级临床医学七年制
2. 东南大学 2010 级护理学

**【目的】** 目前 pMHC 复合体(即 MHC 分子与抗原肽的复合体)常被用来检测特异性 T 细胞的数量, 还是 T 细胞功能分析、抗原表位验证以及 T 细胞靶向治疗等诸多方面的有力工具。但是其制备技术复杂, 复性、折叠和纯化等步骤受多种因素限制, 产出效率较低。国内目前尚无生产厂家, 一定程度上限制了我国基础与临床免疫学的更快发展。本实验旨在制备小鼠 H-2K<sup>b</sup>/OVA<sub>257-264</sub> 复合体, 验证其正确构象和与特异性 T 细胞 TCR 有效结合的功能, 为在小鼠模型中进行移植排斥和肿瘤的生物治疗研究提供靶向工具。

**【方法】** 利用 IPTG 诱导编码小鼠 H-2K<sup>b</sup> 蛋白重链的重组质粒和 OVA-β2m 融合蛋白的重组质粒在大肠杆菌 BL21 中表达; 通过超声粉碎、洗涤、化学纯化等方法收集两种重组蛋白, 经 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的纯度和分子大小; 再经稀释复性法在体外折叠并超滤浓缩; 利用尺寸排阻层析法在 FPLC 系统中纯化收集 H-2K<sup>b</sup>/OVA 复合体, 经 BCA 法蛋白定量后分装保存; 通过包被细胞大小的 PLGA 微球, 用 H-2K<sup>b</sup> 分子构象特异性单抗进行荧光染色, 经流式分析验证该复合体的空间构象; 利用 OVA 抗原特异性的 OT-1 细胞株和流式细胞术分析检测该自制分子与 TCR 的结合能力。

**【结果】** 两种重组质粒在大肠杆菌中表达后, 经 SDS-PAGE 分析分子量同预计大小相等; 复性、折叠、FPLC 系统纯化洗脱后得到 3 个峰, 其中第一个洗脱峰经 SDS-PAGE 鉴定证实含有重链蛋白和轻链蛋白, 为 H-2K<sup>b</sup>/OVA 复合体峰; 流式荧光染色分析显示: 该复合体包被 PLGA 后能与构象特异性抗体呈有效结合, 提示构象正确; 用该分子制备的 PE-标记的 H-2K<sup>b</sup>/OVA 四聚体染色 OT-1 转基因鼠的脾细胞, 经流式检测: OT-1 细胞占脾细胞群的 16.35%。

**【结论】** 利用大肠杆菌成功表达了小鼠 H-2K<sup>b</sup> 分子的重组重链和轻链, 并经体外折叠和纯化成功制备了构象正确、能与特异性 TCR 结合的 H-2K<sup>b</sup>/OVA 复合体。

**关键词:** MHC; 小鼠 H-2K<sup>b</sup>/OVA 复合体; 折叠; 纯化; FACS 检测

## A-S2-9

磁场下制备的  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜对成骨细胞分化作用的效果研究

单世豪, 黄继青, 陈奕含, 李雪琼; 指导教师: 刘璇

东南大学 2011 级生物工程

**【目的】** 骨质疏松症已成为世界公共卫生问题, 针对骨质疏松症的基础及临床研究是目前国际研究的热点。目前已有实验证明 PLA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 复合膜对于细胞的分化具有促进作用, 但是由于复合膜是自然晾干的, 纳米磁性材料分布不均, 对细胞的生长不利, 为了将这种材料的性能优化, 根据在磁场下, 磁性纳米粒子分布更加均匀的特性, 通过实验验证在磁场下制备的磁性纳米材料对于细胞分化的促进作用更加明显。

**【方法】** 因为 PLA 在复合膜中起到支架和黏附作用, 所有本项目将首先在磁场条件下组装纳米材料膜( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜), 研究其对成骨细胞的影响。利用 qPCR、ALP 等检测方法对不同组细胞的分化情况进行对比, 并分析各项检测结果得出结论。然后进一步在  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜的基础上用 PLA 粘附, 并对其对于成骨细胞的生长分化的作用进行研究。

**【结果】** ALP 染色结果: 在磁场下制备的纳米磁性材料上接种的细胞染色明显比自然晾干的磁性纳米材料