

负载 SIV 抗原肽的中国恒河猴 Mamu-B * 1703 可溶性单体及其四聚体的制备和鉴定

王笑迎¹, 欧阳东云¹, 何贤辉¹, 徐丽慧², 施焕敬¹, 高琦¹, 郭贺¹
(暨南大学生命科学技术学院 1. 组织移植与免疫实验中心; 2. 生物工程研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 制备负载 SIV 抗原肽的中国恒河猴 Mamu-B * 1703 可溶性单体及其四聚体。方法: 以含 Mamu-B * 1703 重链 cDNA 序列的 pMD19-T 克隆为模板, 通过 PCR 的方法克隆 Mamu-B * 1703 重链基因, 进而构建羧基端融合生物素化酶 BirA 底物肽(BSP)的 Mamu-B * 1703 重链胞外域融合蛋白的表达载体, 并在大肠杆菌中获得表达。 β 微球蛋白、SIV 抗原肽共存时, 通过稀释法复性可溶性 Mamu-B * 1703 单体, 经生物素化并纯化后与荧光素标记的链亲和素按 4:1 的比例混合形成四聚体。结果: ELISA 检测显示获得具有正确构象的负载 SIV 抗原肽的 Mamu-B * 1703 四聚体。结论: 印度恒河猴 Mamu-B * 1701 特异性抗原肽 IW9, 与中国恒河猴的 Mamu-B * 1703 相结合形成可溶性 Mamu-B * 1703/IW9 单体和四聚体。

[关键词] 恒河猴; Mamu-B * 1703; 猴免疫缺陷病毒; 四聚体

[中图分类号] R392.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)04-0349-06

Preparation and identification of soluble Chinese rhesus macaques Mamu-B * 1703 monomer and tetramer loaded with a SIV peptide

WANG Xiao-ying¹, OUYANG Dong-yun¹, HE Xian-hui¹, XU Li-hui²,
SHI Huan-jing¹, GAO Qi¹, GUO He¹

(1. Institute of Tissue Transplantation and Immunology, 2. Institute of Bioengineering, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To prepare soluble Chinese rhesus macaques Mamu-B * 1703 monomer and tetramer loaded with a SIV peptide. **Methods:** Mamu-B * 1703 sequence cloned in pMD19-T vector was used as an initial template for amplification of the fragment encoding the extracellular domain of Mamu-B * 1703 heavy chain, then the DNA fragment encoding the ectodomain of Mamu-B * 1703 heavy chain fused at its carboxyl-terminal a BirA substrate peptide (BSP). The recombinant protein was expressed in *E. coli*. It was then refolded in the presence of β_2 -microglobulin and SIV peptide to form a soluble Mamu-B * 1703 monomer. After purification and biotinylation, the tetramer was formed by incubation with streptavidin-PE at a ratio of 4:1. **Results:** The spatial conformation of the monomer and tetramer was correct as confirmed

[收稿日期] 2009-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572199, 30230350); 广东省自然和科学基金项目(8451063201000340); 生物化学与分子生物学广东省重点学科资助项目

[作者简介] 王笑迎(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 免疫调节与免疫药理

通讯作者: 何贤辉, 男, 研究员, 博士生导师, Tel: 020-85220679; E-mail: thehxh@jnu.edu.cn

by an ELISA-based assay. **Conclusion:** It was shown that IW9 peptide, identified to be Mamu-B * 1701-restricted in Indian-origin macaques, could combined with the Mamu-B * 1703 to form soluble Mamu-B * 1703/IW9 monomer and tetramer.

[Key words] rhesus macaques; Mamu-B * 1703; simian immunodeficiency virus; tetramer

猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)感染的恒河猴是研究人类获得性免疫缺陷综合症(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)、评价 AIDS 疫苗的安全性和有效性较理想的动物模型^[1-2]。因印度禁止出口恒河猴,国际上越来越多使用中国恒河猴进行 AIDS 的研究。

研究表明,抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)在控制和清除恒河猴 SIV 病毒感染过程中发挥主要作用,深入分析 SIV 特异性 CTL 免疫应答,对于阐明 AIDS 的发病机理和 AIDS 疫苗的研究极为重要^[2]。主要组织相容性复合体 I 类分子(major histocompatibility complex I, MHC I)四聚体技术(tetramer technology)灵敏度高、特异性强,目前已成为研究 CTL 免疫应答的核心技术。

恒河猴的 MHC 以 Mamu 表示,定位于染色体 6q24 上,而人类的 MHC 位于 6p21.3 上^[3]。与人类 MHC I 基因相比,恒河猴的 MHC I 更为复杂。中国恒河猴的 MHC I 等位基因与印度恒河猴 MHC I 等位基因差异很大,有关中国恒河猴的主要组织相容性复合体等遗传背景的研究较少,近年新的中国恒河猴 MHC I 类等位基因才不断被鉴定^[4-5]。Mamu-B 是恒河猴 MHC I 类分子中的一种,而等位基因 Mamu-B * 1703 在中国恒河猴中携带率较高^[5]。因此选择 Mamu-B * 1703 为对象,与已知的 Mamu-B * 1701 限制性 SIV Nef 抗原肽(IRYPKTFGW, IW9)^[6],进一步构建了 Mamu-B * 1703/IW9 四聚体,为研究中国恒河猴 Mamu-B * 1703 限制性的、SIV 特异性的 CTL 免疫应答提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)菌株、质粒 pET-3d 购自 Novagen; Nco I 和 BamH I、T₄ DNA 连接酶、高保真 Pyrobest DNA 聚合酶等均为大连 TaKaRa

产品; TRIzol 试剂、ThermoScript RT-PCR 系统购自美国 Invitrogen; QIAquick Gel Extraction Kit 为德国 QIAGEN 公司产品;淋巴细胞分离液为挪威 NYCOMED 产品; MonoQ 5/50 GL 购自 Amersham 公司。藻红蛋白(PE)-链亲和素(Streptavidin-PE)、蛋白分子质量标准(DALTON MARKVII-L)为北京 TIAN-GEN 公司产品。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为北京中杉公司进口分装。BirA 购自美国 Avidity 公司。异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)等化学试剂为进口或国产分析纯试剂。源自 SIV Nef 的 Mamu-B * 1701 限制性抗原肽 IRYPKTFGW(简称 IW9)^[6],由上海英骏生物公司(Shanghai Invitrogen)合成。小鼠抗人 HLA-A * 0201 抗血清为本实验室制备。抗克隆抗体(克隆号: W6/32)购自美国 eBioscience。

1.2 方法

(1) Mamu-B * 1703 重链 cDNA 的克隆扩增按文献[5]获得的、含 Mamu-B * 1703 重链 cDNA 序列的 pMD19-T 克隆,作编码 Mamu-B * 1703 重链片段的初始模板,参照 Mamu-B * 1703 基因序列设计引物,为了定点诱变链中 BamH I 酶切位点需经过 2 轮 PCR 反应。第 1 轮 PCR 反应: A 管前向引物为 5'-TAT ACC ATG GGT TCT CAT TCT ATG AAA TAT TTT TAT ACC TCC GTG TCC CGG CCC GG-3', 突变点逆向引物为 5'-GTC TTT GGG GGA TCT GCG CGC TGC AGC GTC T-3'; B 管突变位点前向引物为 5'-AG CGC GCA GAT CCC CCA AAG AC-3', 逆向引物为 5'-CTG TGC ATC CAG AAT ATG ATG CAG AGA GCC CCA TCT TAG GGT GAG GGG CTC-3'; 第 2 轮 PCR 反应: 引物为 Mamu-B * 1703 的前向引物和逆向引物,用第 1 轮 A 管和 B 管的 PCR 产物的混合作为模板合成链。引物由上海英骏生物公司(Shanghai Invitrogen)合成。PCR 反应分别在 50 μ L 总体积中进行,反应条件为在 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后开始循环,

即 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环后, 于 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物以 QIA-quick Gel Extraction Kit 从凝胶中回收, *Nco* I + *Bam* H I 双酶切并再次从凝胶中回收。

(2) 融合 BSP 的 Mamu-B * 1703 重链胞外域 (Mamu-B * 1703-BSP) 表达载体的构建 重链胞外域羧基端连接 BSP 序列 (LHHILDAQKMVWNHR), 其表达载体的构建方法如下: 根据编码成熟 Mamu-B * 1703 的基因序列设计前向引物为 5'-TAT ACC ATG GGT TCT CAT TCT ATG AAA TAT TTT TAT ACC TCC GTG TCC CGG CCC GG-3', 逆向引物为 5'-A ATA GGA TCC TTA ACG ATG ATT CCA CAC CAT TTT CTG TGC ATC CAG AAT ATG ATG CAG-3' (其中包含编码 Gly-Ser 接头和 BSP 的 DNA 序列), 以克隆的 Mamu-B * 1703 cDNA 为模板, 按上述方法扩增编码 Mamu-B * 1703 胞外域的 DNA 片段, 经 *Nco* I + *Bam* H I 双酶切、连接至表达载体 pET-3d、转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞、筛选转化子, 以双酶切鉴定阳性克隆, 从中提取质粒测序鉴定。

(3) Mamu-B * 1703-BSP 融合蛋白的表达和鉴定 方法同文献[7]。表达质粒转化 BL21 (DE3), 以 IPTG 诱导融合蛋白表达。

(4) SDS-PAGE 参照文献[8]的方法进行, 浓缩胶质量浓度为 50 g/L, 分离胶质量浓度为 150 g/L, 以考马斯亮蓝 R250 染色显示蛋白质条带。

(5) 小鼠抗人 HLA-A * 0201 抗血清的制备 按文献[7]方法制备, 免疫原为 HLA-A * 0201。

(6) Western 印迹法 蛋白样品以质量浓度 150 g/L SDS-PAGE 分离, 然后以 15 V 电压转移 16 h, 将蛋白转移至硝酸纤维膜, 膜以封闭液 (Tris-Buffered-Saline, pH 7.5, 含体积分数 3% 小牛血清和体积分数 0.05% Tween 20) 于 37 ℃ 振荡封闭 30 min, 加入以封闭液稀释 (1:1 000) 的鼠抗人 HLA-A * 0201 抗血清于 37 ℃ 温育 2 h, 经洗膜后加入 1:3 000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG 于 37 ℃ 温育 1.5 h, 洗去二抗后以 DAB 显色后, 用 Alpha 成像系统 (Alpha Innotech Fluorchem SP) 成像。

(7) 包涵体的纯化 按文献[7]报道的方法对包涵体进行洗涤纯化, 得到的包涵体蛋白以浓度 20 mmol/L MES (pH 6.0, 含浓度 8 mol/L 脲, 浓度 10 mol/L EDTA 和浓度 0.1 mmol/L DTT) 溶解, 离心去除不溶物。取 10 μ L 以同一溶液稀释至 100 μ L,

在 280 和 260 nm 波长测定光吸收, 并按经验公式 ($1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$ = 蛋白质量浓度 mg/mL) 计算蛋白的浓度, 分装后冻存于 -70 ℃ 备用。

(8) Mamu-B * 1703/IW9 单体的制备及其生物素化 负载抗原肽的可溶性 Mamu-B * 1703 单体是在同时存在 Mamu-B * 1703-BSP、 β_2 微球蛋白 (β_2 m) 按文献[9]的方法制备, 及 Mamu-B * 1701 限制性抗原肽 IW9 的情况下通过稀释法复性而获得, 方法与文献[7]报道的稀释法相同。然后按生物素化酶 BirA 供应商建议的方法, 将 Mamu-B * 1703/IW9 单体进行生物素化修饰。反应完成后, 对浓度为 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 透析, 上样至阴离子交换树脂 (MonoQ 5P50 GL) 柱中, 以浓度 0 ~ 300 mmol/L NaCl 进行线性梯度洗脱 (Amersham AKTA UPC29000)。SDS-PAGE 进行分析后, 合并含 Mamu-B * 1703/IW9 (同时含重链和轻链 β_2 m) 的洗脱峰, 透析后以 Amicon Ultra 24 (MWCO 10 000) 离心超滤浓缩至 300 μ L 左右, 加 4 mL PBS (含浓度为 0.2 mmol/L PMSF 和浓度为 2 mmol/L EDTA) 后, 再浓缩至 300 μ L, 按上述方法测定蛋白浓度, 置 4 ℃ 备用。

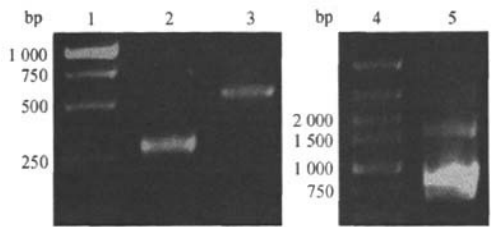
(9) Mamu-B * 1703/IW9 四聚体的制备 将 Mamu-B * 1703/IW9 与 Streptavidin-PE 按 4:1 的比例混合后, 即可形成四聚体。样品液中不加还原剂, 也不经加热处理而直接上样, 以 SDS-PAGE 鉴定生物素化的程度。

(10) Mamu-B * 1703/IW9 单体构象的鉴定 ELISA 检测 将未复性的 Mamu-B * 1703 重链、 β_2 m; Mamu-B * 1703/IW9 单体; HLA-A * 0201/NLV 单体, 加 PBS 稀释后以 5 μ g/孔分别加入 96 孔板中, 4 ℃ 过夜。体积分数为 0.05% PBS-T 洗板后, 以封闭液 (Tris-Buffered-Saline, pH 7.5, 含体积分数为 3% 小牛血清和体积分数为 0.05% Tween 20) 于 37 ℃ 振荡封闭 30 min。每孔加入 50 μ L 质量浓度为 0.25 μ g/L 的 mAb W6/32 于 37 ℃ 温育 1 h, 经洗板后加入以封闭液稀释 (1:4 000) 的 HRP-羊抗鼠 IgG 于 37 ℃ 温育 1 h, 洗去二抗后以 OPD 显色, 经紫外分光光度计 490 nm 检测。

2 结果

2.1 Mamu-B * 1703 重链基因 cDNA 的克隆及其序列测定

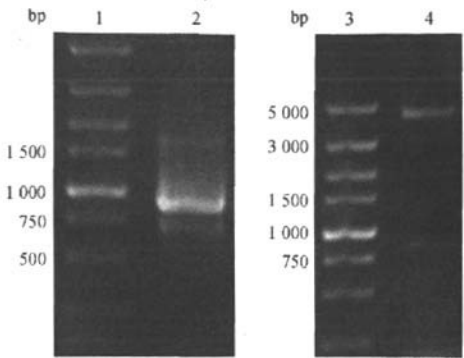
根据 Mamu-B * 1703 基因序列设计引物,以含 Mamu-B * 1703 基因的 pMD19-T 克隆为模板进行 PCR 反应,诱变链中的 *Bam*H I 酶切位点,经过 2 轮 PCR 反应,均扩增出与预计大小(分别为 569、314、850 bp)相符的 DNA 片段(图 1 泳道 2、3、5)。



1,4: DL 5000 DNA 标志; 2,3,5: Mamu-B * 1703 的 PCR 产物
图 1 Mamu-B * 1703 重链 RT-PCR 扩增的琼脂糖电泳鉴定

2.2 Mamu-B * 1703-BSP 融合蛋白原核表达载体的构建

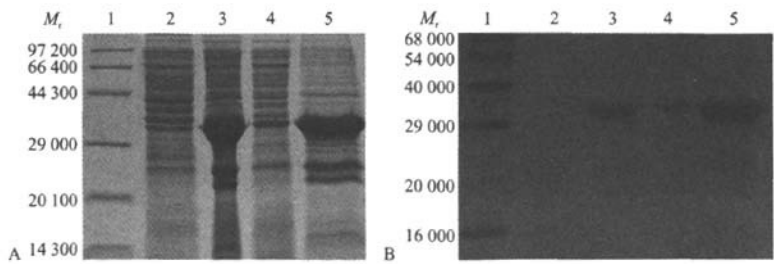
根据 Altman 等^[10]通过 PCR 方法将编码 Mamu-B * 1703 重链胞外域氨基酸序列的 DNA 片段与编码 BSP 的片段融合,两者间包含编码 Gly-Ser 接头的序列,以上述第 2 轮 PCR 产物为模板,扩增出的 DNA 片段长度约 895 bp (图 2,泳道 2),经双酶切、连接至 pET-3d 载体,筛选接入目的基因的阳性克隆(图 2,泳道 4),经测序验证插入序列为正确的目的基因,含起始密码 ATG 和终止密码 TAA,表明成功构建 Mamu-B * 1703-BSP 的原核表达载体。



1,3: DL 5000 DNA 标志; 2: Mamu-B * 1703-BSP 的 PCR 产物;
4: 重组质粒的 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切产物
图 2 PCR 扩增 Mamu-B * 1703-BSP DNA 片段及其重组质粒酶切产物琼脂糖电泳鉴定

2.3 Mamu-B * 1703-BSP 在 *E. coli* 中的表达及鉴定

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 ℃ 诱导 4 h 后,相对分子质量 34 000 (AlphaInnotech 公司的 AlphaEaseFC 软件分析)的外源蛋白表达水平大大提高,该蛋白分子质量与 Mamu-B * 1703-BSP 理论分子质量一致,重组蛋白量约占菌体总蛋白量的 20%。大部分重组蛋白以包涵体形式存在于沉淀部分(图 3A,泳道 5),上清液中存在很少的 Mamu-B * 1703-BSP。免疫印迹分析结果与 SDS-PAGE 一致,Mamu-B * 1703-BSP 主要存在于包涵体中(图 3B,泳道 5)。



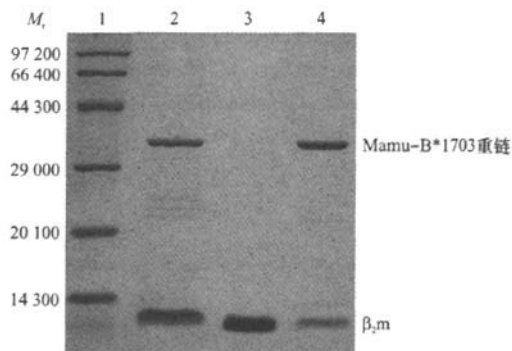
1: 蛋白质相对分子质量标准; 2: 诱导前的 BL21 (DE3); 3: IPTG 诱导 BL21 (DE3); 4: 诱导后 BL21 (DE3) 菌体裂解物上清液; 5: 诱导后 BL21 (DE3) 包涵体
图 3 Mamu-B * 1703-BSP 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达的 SDS-PAGE (A) 及免疫印迹分析结果(B)

2.4 Mamu-B * 1703/IW9 单体的制备及其生物素化

Mamu-B * 1703/IW9 单体通过稀释复性法进行复性,获得的可溶性 Mamu-B * 1703/IW9 单体经 SDS-PAGE 显示两条主带,即 M_r 约 34 000 的重链和 M_r 为 12 000 的轻链 β_2m (图 4,泳道 2)。生物素

化后的 Mamu-B * 1703/IW9 单体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 (图 4,泳道 3),第 II 峰为可溶性 Mamu-B * 1703/IW9 单体(图 4,泳道 4)。将含纯 Mamu-B * 1703/IW9 单体的部

分合并,以超滤浓缩后蛋白的质量浓度为 1 g/L。

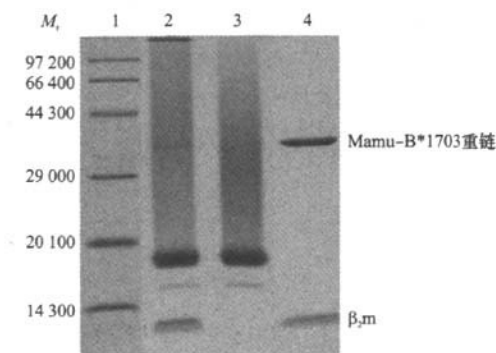


1: 蛋白质相对分子质量标准; 2: 纯化前的 Mamu-B * 1703-IW9 单体; 3: β 微球蛋白; 4: 纯化后的 Mamu-B * 1703/IW9 单体

图4 Mamu-B * 1703/IW9 单体的 SDS-PAGE 鉴定

2.5 Mamu-B * 1703/IW9 四聚体的制备

将生物素化的 Mamu-B * 1703/IW9 可溶性单体按 4:1 比例与 Streptavidin-PE 混合后,即形成四聚体。由于链亲和素与生物素形成的复合物,若无还原剂并且不对样品进行煮沸处理,即使以 SDS 处理,也不会解离,故可利用 SDS-PAGE 对四聚体形成的程度进行估计。Mamu-B * 1703/IW9 单体在非还原条件下且不经煮沸处理时,电泳后显示 M_r 为 34 000 的重链和 M_r 为 12 000 的轻链 β_2m 两条主带(图 5 泳道 4)。经 AlphaEaseFC 软件分析显示,四聚体中重链条带约为单体的 10% (图 5 泳道 2),表明约 90% 的单体已与链亲和素结合形成了四聚体。



1: 蛋白质相对分子质量标准; 2: Mamu-B * 1703/IW9 四聚体; 3: 链亲和素; 4: Mamu-B * 1703/IW9 单体

图5 Mamu-B * 1703/IW9 四聚体的 SDS-PAGE 鉴定

2.6 Mamu-B * 1703/IW9 四聚体构象的鉴定

W6 /32 是抗人 HLA I 类分子的单克隆抗体 (mAb),能与灵长类 MHC I 分子反应,但只能识别

轻链和重链结合形成的具有正确构象的复合物,不能与单独的轻链反应,与重链仅有极微弱的结合^[11]。将基于 ELISA 的方法用于恒河猴 Mamu-B * 1703/IW9 单体构象的鉴定结果表明(图 6),Mamu-B * 1703/IW9 单体与可溶性 HLA-A * 0201/NLV 一样,能够被 W6/32 mAb 识别,表明本实验获得的 Mamu-B * 1703/IW9 单体具有正确的构象。

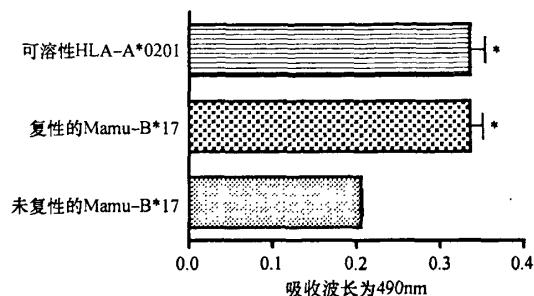


图6 基于 ELISA 的方法检测可溶性单体 Mamu-B * 1703/IW9 的构象

3 讨论

中国恒河猴分布较广,不同的亚群其 MHC I 等位基因的分布频率有很大不同^[4-5]。本研究小组从华南地区笼养的中国恒河猴中克隆的基因中发现 Mamu-B * 1703 是相对高频的等位基因^[4],因此制备该基因的四聚体可得到更广泛的应用。另一方面,四聚体制备还需要已知的抗原表位肽。由于 Mamu-B * 1703 是新鉴定的基因^[4],其特异性表位肽有待研究确定。因此,从相近的 Mamu-B * 1701 的抗原表位中选择了 SIV Nef 抗原肽 (IRYPKTF-GW, IW9)^[6]。研究表明,IW9 抗原肽是印度恒河猴 Mamu-B * 1701 特异性抗原肽,可有效地与 Mamu-B * 1701 特异性结合,引起 CTL 反应^[6]。本研究结果显示 IW9 抗原肽也可与中国恒河猴 Mamu-B * 1703 相结合,并成复性获得可溶性单体和四聚体。IW9 可能含与 Mamu-B * 1701 和 Mamu-B * 1703 结合的基序,即超级基序 (super motif),该抗原肽可能可以被不同的 Mamu-B * 17 等位基因亚型所提呈,并进而诱导 Nef 特异性的 CTL 应答。

本实验结果显示 Mamu-B * 1703/IW9 的空间构象与人类 HLA-A * 0201/NLV 相似,说明 Mamu-B * 1703/IW9 的空间构象正确,但在 Mamu-B * 1703 阳性的、感染 SIV 的中国恒河猴中的验证有待进一步完成。

Nef 蛋白不仅是 SIV 病毒的调节蛋白之一,也是 SIV 病毒生命周期中的早期产物,可迅速被 MHC I 识别、呈递到细胞表面,有效激发 CTL 反应,抑制 SIV 病毒复制及控制病毒感染^[8]。因此 Nef 一直是 HIV 疫苗研究的目标蛋白^[12-13],制备负载 SIV Nef 抗原肽 IW9 的 Mamu-B * 1703 四聚体,可用于检测中国恒河猴模型中 SIV 诱发的早期免疫应答和基于 Nef 的疫苗诱发的细胞免疫应答。总之, Mamu-B * 1703 四聚体制备和鉴定为研究 Mamu-B * 1703 限制性的 CTL 免疫应答规律奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] LING B, VEAZEY R S, LUCKAY A, et al. SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans [J]. AIDS, 2002, 16(11): 1489 - 1496.
- [2] HANKE T, SAMUEL R V, BLANCHARD T J, et al. Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multi-epitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen [J]. J Virol, 1999, 3(9): 7524 - 7532.
- [3] HUBER I, WALTER L, WIMMER R, et al. Cytogenetic mapping and orientation of the rhesus macaque MHC [J]. Cytogenet Genome Res, 2003, 103(122): 144 - 149.
- [4] OTTING N, de VOS-ROUWELER A J, HEIJMANS C M, et al. MHC class I A region diversity and polymorphism in macaque species [J]. Immunogenetics, 2007, 59(5): 367 - 375.
- [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, 2008, 40(11): 919 - 927.
- [6] MOTHÉ 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.
- [7] HE X H, XU L H, LIU Y. Procedure for preparing peptide major histocompatibility complex tetramers for direct quantification of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(27): 4180 - 4187.
- [8] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680 - 685.
- [9] HE X H, XU L H, LIU Y, et al. Cloning of human β_2 -microglobulin gene and its high expression IN ESCHERICHIA COLI [J]. China J Biotechnol, 2004, 20(1): 99 - 103.
- [10] ALTMAN J D, MOSS P A H, GOULDER P J R, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [J]. Science, 1996, 274(5284): 94 - 96.
- [11] LU X, WENG X, LI Q, et al. Construction and functional test of HLA-A * 2402-peptide tetramer [J]. Cell Mol Immunol, 2005, 2(2): 145 - 149.
- [12] GALLIMORE A, CRANAGE M, COOK N, et al. Early suppression of SIV replication by CD8 + nef-specific cytotoxic T cells in vaccinated macaques [J]. Nat Med, 1995, 1(11): 1167 - 1173.
- [13] MINANG J T, TRIVETT M T, COREN L V, et al. The Mamu B * 17-restricted SIV Nef IW9 to TW9 mutation abrogates correct epitope processing and presentation without loss of replicative fitness [J]. Virology, 2008, 375(1): 307 - 314.

[责任编辑:朱颖娜]