

* 研究简讯 *

鸡主要组织相容性复合体 I(BF2 和 β_2m) 二级结构与同源模建*

闫若潜 李新生 杨天耀 夏 春**

中国农业大学动物医学院, 北京 100094

摘要 为了推进鸡主要组织相容性复合体(MHC) I类分子(BF2, β_2m)空间结构的研究, 克隆、表达了鸡 BF2 和 β_2m 基因, 采用圆二色谱(CD)测定了其重组蛋白的二级结构, 并同源模建了其三级结构. 首先, 将 BF2 和 β_2m 基因分别插入原核表达载体进行了可溶性表达. 对表达的融合蛋白进行纯化、蛋白酶切割并对切割后的蛋白进行分离和纯化, 获得了麦芽糖结合蛋白(MBP)-BF2, β_2m 蛋白以及 MBP 单体. 随后, 测定了 BF2 和 β_2m 的 CD 值. CD 表明 BF2 蛋白呈典型的 α 螺旋; 其中, α 螺旋、 β 折叠、转角和随机蜷曲分别为 72, 102, 70 和 90 个氨基酸. β_2m 重组蛋白呈典型的 β 折叠, α 螺旋、 β 折叠、转角和随机蜷曲分别为 0, 46, 30 和 22 个氨基酸. 同源模建显示鸡 BF2 和 β_2m 蛋白与人 HLA-A2 和小鼠 H2 的 3D 结构类似. 结果显示了 BF2 和 β_2m 蛋白在二维和三维上的分子特征及其与抗原多肽结合氨基酸的空间分布, 为以后进一步构建鸡 BF2- β_2m 复合体外鉴定病毒抗原肽系统奠定了基础.

关键词 BF2 β_2m 表达 二级结构 圆二色谱 同源模建

编码哺乳动物主要组织相容性复合体(MHC) 基因指连锁于某一染色体、编码与免疫应答直接相关的一类细胞膜糖蛋白基因群. 此基因群决定了脊椎动物种群和个体间的免疫应答及差异, 并与病毒等疾病抗性密切相关^[1]. MHC 又分为 MHC I 和 MHC II 类, MHC I 由 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ 链、跨膜区和胞质区组成^[2]. 在脊椎动物抗病毒免疫应答中, 病毒首先被胞内蛋白酶分解成多肽(P), 再与 MHC I 和 β 微球蛋白(β_2m) 结合, 形成 MHCp- β_2m 复合体分泌至细胞表面, 使细胞毒性 T 细胞(CTL)能识别并杀伤被感染细胞. MHC I 复合体结合抗原多肽的核心部分是 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区形成的抗原多肽结合槽, 即 8 条反向平行的 β 片层形成的一个层面, 支撑着两个

反向平行的 α 螺旋. 在抗原多肽结合槽面更低位置由氨基酸侧链形成了 6 个口袋, 可与抗原多肽的侧链牢固结合^[3-5]. 近年来, 人 MHC I 体外结合多肽的研究已有所突破, Gao 等在原核中表达了人 MHC I (HLA-A2)、 β_2m 和 CD8 $\alpha\alpha$, 并与 HIV-1 多肽表位结合形成了 MHCp- β_2m -CD8 复合体^[6]. 最近, Krogsgaard 等在 MHC 体外结合多肽的基础上, 展开了结合肽生物学活性研究^[7]. 在家畜方面, Oleksiewicz 等也进行过猪 MHC I 与病毒多肽结合的体外试验, 将 MHC I - β_2m -与猪瘟病毒(CSFV) 或口蹄疫病毒(FMDV) 多肽结合, 证明了猪的 MHC I p- β_2m 重组蛋白复合体能在体外正确折叠^[8].

2005-04-05 收稿, 2005-05-25 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30371098)

** 通讯作者, E-mail: xiachun@cau.edu.cn

鸟类 MHC 的研究主要集中在来航鸡. Briles 和 Miller 等报道了鸡 MHC I (*BF*) 基因序列^[9, 10]. Kaufman 等报道了鸡 MHC 即 B 复合体基因组结构. B 基因组全长 92 kb, 含有 19 个基因座, 大小仅为人类 MHC 基因组的二十分之一. B 基因座中含有 2 个 *BF* 位点, 即 *BF1* 和 *BF2*; 仅 *BF2* 显性表达, 并与多种禽类病毒病的抗性有关^[11, 12]. 我们曾对三黄鸡、乌鸡和珍珠鸡的 *BF2* 和 β_2m 基因进行了克隆, 发现了 5 类 *BF2* 和 1 类 β_2m 等位基因^[13]. 然而, 迄今为止, 尚未见到有关鸡 *BF* 结构方面的研究报道. 为了推进鸡 *BF* 空间结构的研究以及在体外构建鸡 *BF2*- β_2m 复合体鉴定病毒抗原系统, 本研究克隆、表达了三黄鸡 *BF2* 和 β_2m 基因, 并测定了 *BF2* 和 β_2m 重组蛋白的二级结构(2D)以及同源建模了其三级结构(3D).

1 材料与方法

1.1 构建 *BF2* 和 β_2m 表达载体

根据闫若潜等报道的三黄鸡 *BF2** *SH* (基因登录号: AB159064) 和 β_2m -S01 (基因登录号: AB162661) 序列^[13] 分别设计表达引物对 P1/P2, P3/P4 (P1: 5'-TCAGAATTCGAGCTCCATACCCTGCGGTAC-3', P2: 5'-AGT AAGCTTTGAGATGGCGGGGT TGCTCC-3'; P3: 5'-TCAGAATTCGACCTGACGCCCAAGGTGCAG-3', P4: 5'-AGTAAGC TTTCA GAACTCGGGATCCCACTTG-3'; P1 和 P3 含 *EcoR* I 酶切位点, P2 和 P4 含 *Hind* III 酶切位点). 采用 PCR 法从 *BF2** *SH* 和 β_2m -S01 重组 T-载体中分别亚克隆其成熟蛋白基因序列^[13]. 如图 1 所示构建 p2X-*BF2* 和 p2X- β_2m 表达载体, 并转化大肠杆菌 (*E. coli*) TB1.

1.2 可溶性表达 *BF2* 和 β_2m

参照 New England BioLabs 公司 pMAL-p2X 蛋白融合表达及纯化系统操作手册进行 *BF2* 和 β_2m 基因的可溶性表达. 即将 *E. coli* TB1/p2X-*BF2* 和 *E. coli* TB1/p2X- β_2m 菌株分别接种于 500 mL 含葡萄糖的 LB 培养基中, 再添加终浓度为 0.03 mmol/L 的 IPTG, 37°C 诱导表达 4 h 后, 4000 g 离心 10 min, 收集菌体, 按每 40 mL 原菌液加入 5 mL 过柱缓冲

液的比例重悬沉淀, 放入 -70°C 过夜. 冻融后进行超声波破碎菌体, 然后 9000 g 离心 20 min, 分别进行上清和沉淀的 SDS-PAGE 电泳^[14]. 表达的融合蛋白分别命名为 MBP-*BF2* 和 MBP- β_2m .

1.3 SDS-PAGE 电泳、Western-blot 杂交、重组蛋白纯化与酶切

按照夏春等的方法对重组蛋白 MBP-*BF2* 和 MBP- β_2m 进行 SDS-PAGE 电泳^[14]. 对表达的蛋白质进行 Western-blot 杂交鉴定. 即电泳完成后, 蛋白带经电转移至 PVDF 膜, 以含 5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗膜 3 次; 用 1:10000 倍稀释的兔抗 MBP 抗血清作为一抗 (37°C, 1h)、1:500 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗血清为二抗 (37°C, 1h) 进行杂交, 采用 4-氯-1-萘酚/过氧化氢显色、双蒸馏水终止反应. 随后, 对大量表达的重组蛋白进行纯化与酶切, 简言之: 首先对表达菌离心、超声波破碎菌体并离心, 将上清上样于 Amylose 树脂亲和层析柱, 用 10 mmol/L 麦芽糖洗脱缓冲液洗脱融合蛋白, 取少量样品进行 SDS-PAGE 电泳以确定初步纯化效果. 向纯化后的融合蛋白 MBP-*BF2* 和 MBP- β_2m 中分别加入 factor Xa 蛋白酶 (分别按 1 μ L 酶切割 20 和 100 μ g 融合蛋白的比例), 23°C 切割 24 h, 取少量样品进行 SDS-PAGE 电泳以观察切割程度. 融合蛋白 MBP-*BF2*, MBP- β_2m 以及 MBP- β_2m 蛋白 (3 mg 左右) 经 factor Xa 切割完全后的混合物分别经充分透析后过 DE-AE-sepharose 琼脂糖凝胶柱 (CL-6B) 以进行融合蛋白的二次纯化以及 MBP 与 β_2m 单体蛋白的分离和纯化, 之后进行 SDS-PAGE 电泳确定分离、纯化效果. 将经二次纯化后的融合蛋白及分离纯化后的 MBP 与 β_2m 单体蛋白保存于 4°C 以用于 CD 分析.

1.4 圆二色谱分析与二级结构

采用 Jasco J 175 圆二光谱仪在 25°C 条件下对纯化的 MBP-*BF2*, MBP- β_2m , β_2m 和 MBP 蛋白进行 190—250 nm 范围的光谱值测定, 取信号平均值并进行基线校正, 将所测定的 CD 值转换成摩尔椭圆度 $[\theta](^\circ) \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$; 再用 J-700 for Windows Secondary Structure Estimation Version 1.10 软件分析各蛋白质二级结构的组成. 随后, 应用 EX-PASY 服务器 (<http://www.expasy.ch/tools/>) 上

的GOR法预测BF2蛋白的二维(2D)结构。

1.5 同源模建BF2和 β_2m 蛋白的三级结构

根据蛋白结构数据库(PDB)中人和小鼠MHC I蛋白的三维(3D)结构,在http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html服务器上同源模建BF2和 β_2m 蛋白的3D结构,并应用Rasmol分析软件制作3D结构图。

2 结果与讨论

2.1 BF2和 β_2m 表达质粒的构建与序列

BF2/ β_2m 表达载体的构建如图1所示。BF2/ β_2m 基因分别经EcoR I和Hind III双酶切后成功插入pMAL-p2X表达载体,重组表达载体

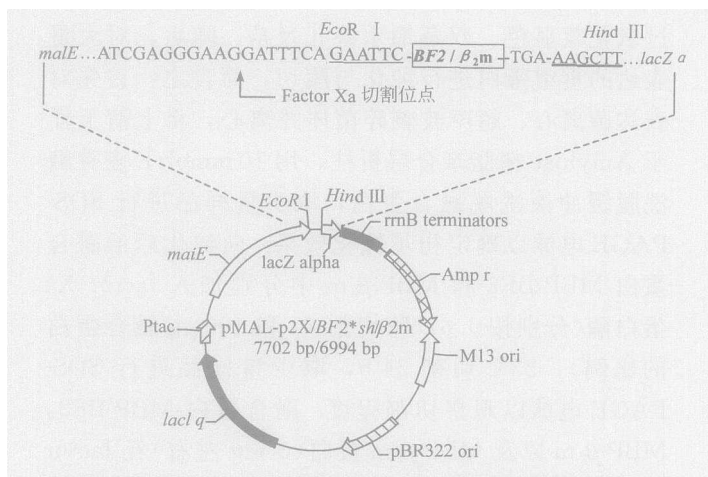


图1 pMAL-p2X表达BF2和 β_2m 质粒的构建与序列

p2X-BF2和p2X- β_2m 经EcoR I和Hind III双酶切以及测序鉴定表明插入的BF2和 β_2m 基因长度分别为1005 bp和294 bp,两者核苷酸序列与我们此前报道的BF2和 β_2m 成熟肽基因完全相同^[13]。

2.2 BF2的SDS-PAGE电泳、Western-blot杂交、纯化与酶切

BF2的表达、Western-blot杂交、纯化及factor Xa蛋白酶切结果如图2所示。MBP-BF2在E. coli TB1工程菌中为可溶性表达,SDS-PAGE电泳显示在80.4 ku处有一条表达带(图2(a))。Western-blot杂交也确证了融合蛋白MBP-BF2的大小为80.4 ku(图2(b))。融合蛋白MBP-BF2经Amylose树脂亲和层析柱初步纯化、DEAE-sepharose柱二次纯化、Factor Xa酶切后,所得MBP-BF2,MBP和BF2蛋白分别在SDS-PAGE电泳的80.4,42.5和37.9 ku处;MBP-BF2蛋白为非常纯的一条带,达到电泳纯(图2(c)),且水溶性好、性质稳定,适用于进行CD分析。

选用pMAL-p2X原核表达系统主要是因为其具备两个特点:一是可溶性融合表达外源基因;二是具有一套完整的亲和层析、Western-blot鉴定、factor Xa蛋白酶切割分析纯化系统。本研究表明利用pMAL-p2X表达系统表达的蛋白质可溶性好、折叠正确、具有与天然蛋白质最大的相似性构象,这与Goh等的报道相一致^[15]。

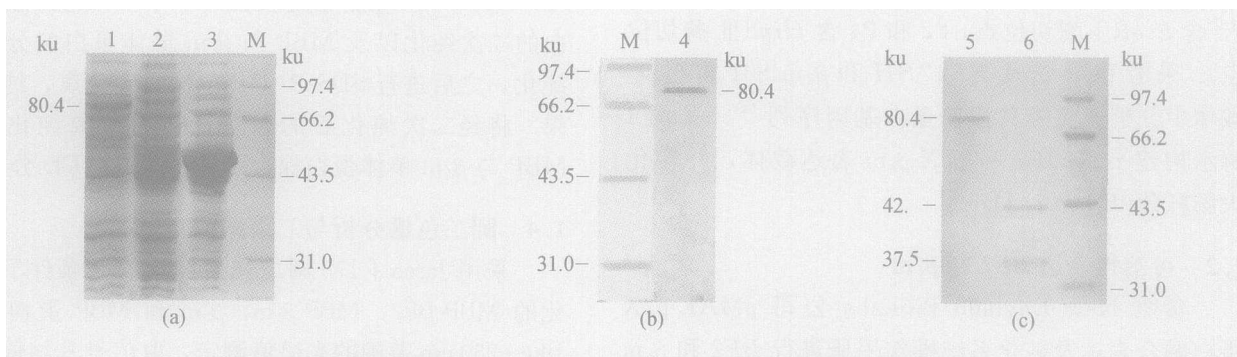


图2 BF2蛋白的表达、Western-blot杂交、纯化及factor Xa蛋白酶切

- (a) MBP-BF2可溶性融合表达产物SDS-PAGE电泳分析;(b) MBP-BF2可溶性融合表达产物Western-blot杂交;
(c) 经初次及二次纯化后的MBP-BF2蛋白及纯化蛋白经factor Xa蛋白酶切割的SDS-PAGE电泳分析。M, 蛋白分子量标准;
1, MBP-BF2; 2, TB1空菌对照; 3, p2X空载体; 4, MBP-BF2; 5, 经初次及二次纯化后的融合蛋白MBP-BF2;
6, 纯化的MBP-BF2蛋白经factor Xa蛋白酶切割

2.3 β_2m 的 SDS-PAGE 电泳、Western-blot 杂交、纯化与酶切

β_2m 蛋白的 SDS-PAGE 电泳、Western-blot 杂交、纯化及 factor Xa 酶切结果如图 3 所示。 β_2m 在 *E. coli* TB1 中为可溶性表达，融合蛋白 MBP- β_2m 在 53.7 ku 处有一条明显带(图 3 (a))。Western-blot 杂交也显示在 53.7 ku 处有一条特异性带(图 3 (b))。融合蛋白 MBP- β_2m 经 Amylose 树脂亲和层

析柱纯化、DEAE-sepharose 柱二次纯化、factor Xa 酶切后，所得 MBP- β_2m ，MBP 和 β_2m 蛋白分别在 SDS-PAGE 电泳中出现 53.7、42.5 和 11.2 ku 的条带(图 3(c))。切割后的 MBP 蛋白经 DEAE-sepharose 柱分离、纯化后在 42.5 ku 处有一条非常纯的特异带(未显示)。MBP- β_2m 蛋白和 MBP 单体的纯度达到了电泳纯，水溶性好、不易降解，可用于 CD 分析。

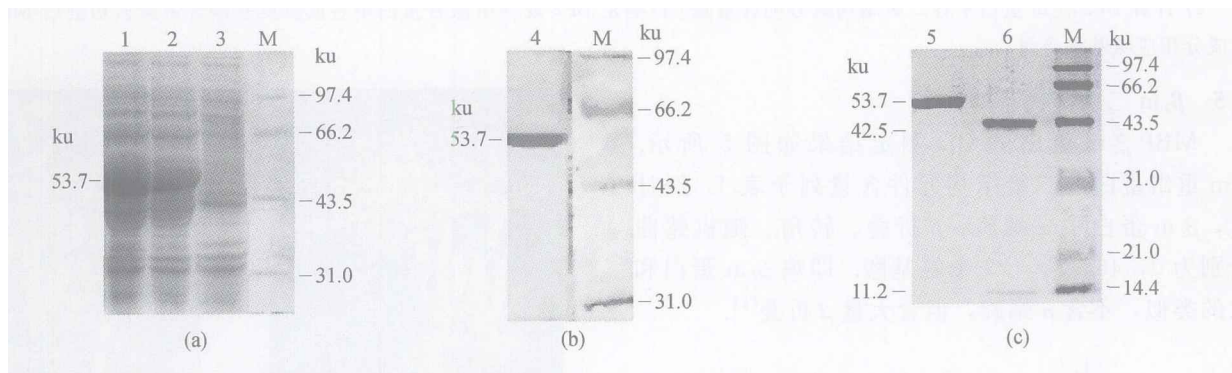


图 3 β_2m 蛋白的表达、Western-blot 杂交、纯化及 factor Xa 蛋白酶切

- (a) MBP- β_2m 可溶性融合表达产物 SDS-PAGE 电泳分析；(b) MBP- β_2m 可溶性融合表达产物 Western-blot 分析；
 (c) 经初次及二次纯化后的 MBP- β_2m 蛋白及纯化蛋白经 factor Xa 蛋白酶切割的 SDS-PAGE 电泳分析。M，蛋白分子量标准；
 1、2，MBP- β_2m ；3，TB1 空菌对照；4，MBP- β_2m ；5，经初次及二次纯化后的融合蛋白 MBP- β_2m ；
 6，纯化的 MBP- β_2m 融合蛋白经 factor Xa 蛋白酶切割

2.4 BF2 二级结构

MBP-BF2，MBP 蛋白的 CD 测定结果如图 4 所示。MBP-BF2 融合蛋白和 MBP 在 208 和 222 nm 处值最小，呈典型的 α 螺旋结构。根据 CD 结果，用 CONTIN 程序及 Yang-Chen 氏公式^[16]计算后，

BF2 的 2D 结果如表 1 所示。即 BF2 蛋白中 α 螺旋、 β 折叠、转角、随机蜷曲分别为 72，102，70，90 个氨基酸，这与人 HLA-A2 的二级结构元件含量相近^[17]； α 螺旋含量与 EXPASY 服务器上的 GOR 法预测的结果相似。

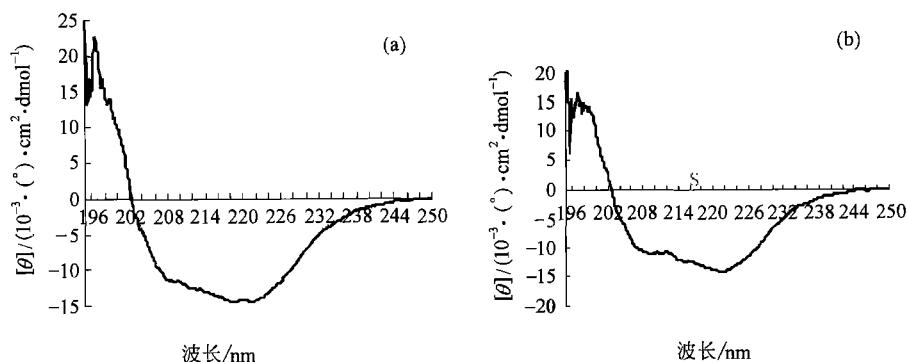


图 4 MBP-BF2 及 MBP 蛋白圆二色谱测定结果

- (a) MBP-BF2 蛋白圆二色谱测定；(b) 单体 MBP 圆二色谱测定

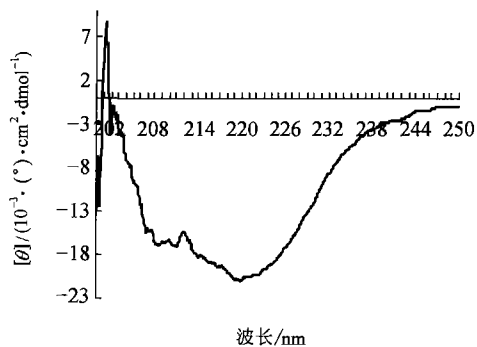
表1 BF2和 β_2m 蛋白的圆二色谱测定结果^{a)}

二级结构元件	MBP-BF2 融合蛋白		计算 BF2 蛋白		MBP- β_2m 蛋白		计算 β_2m 蛋白		切割后 MBP	
	/%	氨基酸数目	氨基酸数目	氨基酸数目	/%	氨基酸数目	氨基酸数目	氨基酸数目	/%	氨基酸数目
α 螺旋	19.6	142	72	14.4	70	0	17.9	70		
β 折叠	38.5	279	102	45.7	223	46	45.4	177		
转角	19.5	141	70	20.6	101	30	18.2	71		
随机蜷曲	22.4	162	90	19.3	94	22	18.4	72		

a) 计算 BF2, β_2m 蛋白中各二级结构成分的含量是 CD 测定 BF2 或 β_2m 融合蛋白中各成分氨基酸含量减去切割后 MBP 中各成分相应氨基酸含量

2.5 β_2m 二级结构

MBP- β_2m 蛋白的 CD 测定结果如图 5 所示。 β_2m 重组蛋白的二级结构元件含量列于表 1。经计算, β_2m 蛋白中 α 螺旋、 β 折叠、转角、随机蜷曲分别为 0, 46, 30, 22 个氨基酸。即鸡 β_2m 蛋白和人的类似, 不含 α 螺旋, 但含大量 β 折叠^[4]。

图5 β_2m -MBP 蛋白圆二色谱测定结果

2.6 BF2 和 β_2m 的同源建模

在 <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html> 服务器上进行 BF2 和 β_2m 蛋白同源建模的结果如图 6 所示。BF2 分子的抗原多肽结合区(PBD)由两个反向平行的 α 螺旋和 8 条 β 片层组成, α_3 区为 7 条 β 片层组成, 与人 HLA-A2 和小鼠 H2 结构类似; β_2m 蛋白由 7 条 β 片层组成, 无 α 螺旋; 但氨基酸在 3D 结构的位置、数目有细微的差异; 如与人 HLA-A2 和小鼠 H2 PBD 的具体位置进行详细比较发现鸡 BF2 在 160—165 区域有 β 转角, 而人和鼠在 149—179 之间则为 α 螺旋。这些变异可能是鸡在长期进化过程中为适应外界环境、结合更广泛的抗原多肽从而维持种群的延续而形成的。

图6 鸡 BF2 和 β_2m 蛋白分子的同源建模图

(rasmol 软件绘制)

(a) BF2 蛋白分子的同源建模图; (b) β_2m 蛋白分子的同源建模图。红、黄、蓝、灰色丝带分别表示 α 螺旋、 β 片层、 β 转角和无规则蜷曲

α_1 和 α_2 区组成的肽结合槽是 MHC I 类结合抗原多肽的结构基础, 且脊椎动物种属间有一定的差异。人类 MHC I 类多肽结合槽两侧是由两个 α 螺旋约 73 个氨基酸组成, 底部为直角排列的 8 条 β 片层; α_1 , α_2 , α_3 区与 β_2m 结合^[4, 17]。MHC I 的两个 α 螺旋与 T 细胞受体(TCR)的互补决定区(CDR)接触形成 MHC—多肽—TCR 复合物从而引发机体的细胞免疫应答^[18]。我们认为鸡 BF2 和 β_2m 中 α 螺旋和 β 折叠氨基酸百分含量的正确与否是研究其空间结构和判断 BF2- β_2m 复合体能否结合抗原多肽的重要前提。CD 结果表明鸡 BF2 蛋白中 α 螺旋和 β 折叠的含量分别为 72 和 102 个氨基酸, 这与人 HLA-A2 类分子 α 螺旋和 β 折叠的氨基酸数目接近^[17], 符合率分别为 98.6% 和 96.2%。另外, 在 EXPASY 服务器(<http://www.expasy.ch/tools/>)上用 GOR 法预测 BF2 的二级结构显示其 α 螺旋和 β 折叠的含量分别为 22.16% 和 25.45%, 即 CD 测定结果与 GOR 法预测的 α 螺旋氨基酸含量的符合率为

95.9%。CD测定鸡 β_2m 结果也证实了其中只含 β 折叠、转角、无规则蜷曲,其二级结构元件中 β 折叠、转角加无规则蜷曲含量与人 β_2m 的符合率分别为97.8%和95.5%。BF2和 β_2m 蛋白3D结构的同源模建也揭示了鸡BF2, β_2m 与人HLA-A2 3D结构相似,只在 α 螺旋、 β 片层、 β 转角、无规则蜷曲的具体位置、数目方面存在差异。

综上所述,本研究揭示了鸡BF2和 β_2m 蛋白的二级结构,并同源模建了其三级结构。结果为以后体外构建鸡BF2- β_2m 复合体鉴定病毒抗原系统提供了依据。

参 考 文 献

- Collins R W. Human MHC class I chain related (MIC) genes: Their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet*, 2004, 31: 105—114
- Bjorkman P J, Strominger J L, Wiley D C. Crystallization and X-ray diffraction studies on the histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-A28 from human cell membranes. *J Mol Biol*, 1985, 186: 205—210
- Bjorkman P J, Saper M A, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 1987, 329: 506—512
- Saper M A, Bjorkman P J, Wiley D C. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol*, 1991, 219: 277—319
- Madden D R. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 587—622
- Gao G F, Tormo J, Gerth U C, et al. Crystal structure of the complex between human CD8 α (α) and HLA-A2. *Nature*, 1997, 387: 630—634
- Krogsgaard M, Li Q J, Sumen C, et al. Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature*, 2005, 434: 238—243
- Oleksiewicz M B, Kristensen B, Ladckjaer-Mikkelsen A S, et al. Development of a rapid *in vitro* protein refolding assay which discriminates between peptide-bound and peptide-free forms of recombinant porcine major histocompatibility class I complex (SLA-I). *Vet Immunol Immunopathol*, 2002, 86: 55—77
- Briles W E, Goto R M, Auffray C, et al. A polymorphic system related to but genetically independent of the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, 1993, 37: 408—414
- Miller M M, Goto R, Bernot A, et al. Two *Mhc* class I and two *Mhc* class II genes map to the chicken Rfp-Y system outside the B complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4397—4401
- Kaufman J, Milne S, Gobel T W, et al. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature*, 1999, 401: 923—925
- Kaufman J, Wallny H J. Chicken MHC molecules, disease resistance and the evolutionary origin of birds. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 212: 129—141
- Yan R Q, Li X S, Xia C, et al. Characterization of BF2 and b2m in three Chinese chicken lines. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 108: 129—38
- Xia C, Dan W, Wu W X, et al. Cloning and expression of interferon- α / γ from a domestic porcine breed and its effect on classical swine fever virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 104: 81—89
- Goh L L, Loke P, Singh M, et al. Soluble expression of a functionally active Plasmodium falciparum falcipain-2 fused to maltose-binding protein in Escherichia coli. *Protein Expr Purif*, 2003, 32: 194—201
- Chen Y H, Yang J T, Martinez H M. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry*, 1972, 11: 4120—4131
- Parham P. Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Am J Med*, 1988, 85: 2—5
- Garboczi D N, Ghosh P, Utz U, et al. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, 1996, 384: 134—141