

## \* 学术论文 \*

鸡复等位基因 BF2 与  $\beta 2m$  的结构解析\*李新生<sup>1,2</sup> 闫若潜<sup>1</sup> 高风山<sup>1</sup> 方勤美<sup>1</sup> 李云岗<sup>1</sup> 郝惠芳<sup>1</sup> 夏春<sup>1\*\*</sup>

1. 中国农业大学动物医学院, 农业部预防兽医学重点实验室, 北京 100094; 2. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002

**摘要** 为了阐明鸡主要组织相容性复合体 I (BF) 和  $\beta 2$  微球蛋白 ( $\beta 2m$ ) 不同复等位基因的分子结构, 利用 pMAL-p2X/*E. coli* TBI 系统表达了 5 类不同复等位基因 BF2 的胞外区和一类新的  $\beta 2m$ , 并采用纯化、蛋白酶切和 Western blot 进行了鉴定. 最后, 采用圆二色谱 (CD) 测定了各重组蛋白的二级结构以及同源建模了其三级结构. 5 类不同复等位基因的 BF2 蛋白分子中的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -片层、转角和随机卷曲的氨基酸长度分别为 69—73, 67—72, 35—37 和 94—98. 5 类不同复等位基因 BF2 和一类新的  $\beta 2m$  蛋白分子的同源建模揭示了其结构与人和鼠的 MHC I 类分子类似, 但各有其特征性的结构; 研究获得了正确折叠、不同复等位基因的 BF2 和  $\beta 2m$  蛋白分子, 并为进一步形成 BF2- $\beta 2m$  复合体、鉴定抗原表位提供了依据.

**关键词** BF2  $\beta 2m$  高级结构 圆二色谱 同源建模

主要组织相容性复合体 I (MHC I) 分子是一种膜表面糖蛋白, 主要功能是结合内源性抗原多肽呈递给 T 细胞受体, 从而激发动物机体的细胞性免疫应答. 迄今为止, 有关 MHC 的结构解析主要集中在人和鼠 MHC I 分子的三维 (3D) 晶体结构上. 即人 MHC I (HLA-A2) 是由一条重链 ( $\alpha$  链) 和一条轻链 ( $\beta 2m$ ) 非共价键结合而成; 并且, HLA-A2 的抗原结合区 (PBD) 是由 2 个反向平行的  $\alpha$  螺旋与 8 条  $\beta$  折叠片层形成的槽所组成<sup>[1, 2]</sup>. 晶体结构解析表明, 在 PBD 槽更低位置由关键性氨基酸形成了 6 个与抗原多肽侧链相互作用的锚定位点 (A—F). HLA-A2,  $\beta 2m$  和 CD8 $\alpha\alpha$  以及人免疫缺陷病毒 (HIV) T 细胞表位多肽已经通过大肠杆菌 (*E. coli*) 表达, 形成了复合体, 并解析了其晶体结构<sup>[3]</sup>. 猪 MHC I,  $\beta 2m$  与猪瘟病毒的 T 细胞表位由一富含甘氨酸的连接肽联合在一起共表达的融合蛋白其结构

的正确性也被相应单克隆抗体证明<sup>[4]</sup>. 人类 HLA-A2 体外结合抗原多肽的研究平台已经建立, 细胞毒性 T 细胞 (CTL) 抗原表位已可以预测和测定<sup>[5-8]</sup>. 与哺乳动物相比, 鸡 MHC I (BF) 的研究仍然局限在序列和部分功能方面<sup>[9-11]</sup>. Kaufman 等报道了来航鸡的 MHC I 的基因组结构; MHC I 有两个称为 BF1 和 BF2 的基因座位<sup>[12]</sup>. BF2 基因座呈显性表达并与鸡的抗病性密切相关; 并且, BF1 呈非显性表达; 而呈显性表达的 BF2 基因座决定了鸡对传染病的免疫应答水平, 并影响疫苗的免疫效果<sup>[13, 14]</sup>. 根据 BF2 序列的同源性, 我们将鸡 BF2 分为 11 个基因群, 同一个 BF2 复等位基因群间的氨基酸同源性达到 91%; 并发现了一类新的  $\beta 2m$  复等位基因<sup>[15]</sup>. 为了揭示鸡 BF2 和  $\beta 2m$  不同等位基因的高级结构, 本文表达了 5 类 BF2 复等位基因和 1 类新的  $\beta 2m$ , 并测定了各类纯化的重组蛋白的圆二色谱 (CD) 以及同源建模了其 3D 结构.

2005-11-23 收稿, 2006-01-25 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

## 1 材料和方法

### 1.1 BF2 和 $\beta$ 2m 表达载体的构建

根据我们报道的鸡 BF2 \* 03sh (AB159065), BF2 \* 04sh (AB159066), BF2 \* 09sh (AB159072), BF2 \* 12sh (AB159075) 和 BF2 \* 03zx (AB178049) 胞外区序列以及  $\beta$ 2m-Z01 (AB178594) 成熟肽序列<sup>[15]</sup>, 采用 Oligo 7.0 软件设计了表达引物对。上游引物 P1 序列为 5'-TCA GAA TTC GAG CTC CAT ACC CTG CGG TAC-3', P3 序列为 5'-TCA GAA TTC GAG CTC CAC TCC CTG CGG TAC-3' (仅用于 AB178049, 划线序列为 EcoR I 酶切位点); 下游引物序列 P2 为 5'-AGT AAG CTT TCA CCA CGA GTA GAG GCC GGG-3' (划线为 Hind III 酶切位点)。随后, 分别采用 P1/P2 和 P3/P2 引物对从 BF2 \* 04sh, BF2 \* 03sh, BF2 \* 09sh, BF2 \* 12sh 和 BF2 \* 03zx 扩增其胞外区(eBF2), 以及扩增  $\beta$ 2m-Z01 成熟肽 cDNA 序列。PCR 反应总体积均为 50  $\mu$ L, BF2 或  $\beta$ 2m 重组质粒量均为 10 ng; 扩增 eBF2 基因的 PCR 反应条件为: 98°C 5 min, 72°C 1 min, 1 个循环, 加入 ExTaq 聚合酶 (TaKaRa 公司); 94°C 热变性 5 min 后, 94°C 变性 1 min, 62°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。扩增  $\beta$ 2m 的 PCR 反应条件为: 94°C 热变性 5 min 后, 94°C 1 min; 60°C 45 s; 72°C 35 s; 33 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用玻璃奶试剂盒回收 830 bp 或 300 bp 的目的片段, 与 T-Easy 载体 (Promega 公司) 连接, 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定后测序。分别命名为 pGEM-T/eBF2-1, eBF2-2, eBF2-3, eBF2-4, eBF2-5 以及 pGEM-T/ $\beta$ 2m。随后, 用 EcoR I 和 Hind III 双酶切上述重组子并将目的片段插入 pMAL-p2X 表达载体, 构建成 p2X-eBF2 和 p2X- $\beta$ 2m 表达系, 转化大肠杆菌 (*E. coli*) TB1, 重组表达载体分别命名为 p2X-eBF2-1, eBF2-2, eBF2-3, eBF2-4, eBF2-5 和 p2X- $\beta$ 2m (图 1)。重组菌株命名为 rTB1/p2X-1, p2X-2, p2X-3, p2X-4, p2X-5 和 p2X- $\beta$ 2m。

### 1.2 可溶性表达复等位基因 BF2 和 $\beta$ 2m

按照 New England BioLabs 公司 pMAL-p2X 蛋白

融合表达与纯化系统操作手册表达复等位基因 BF2 胞外区和  $\beta$ 2m 成熟肽。即从平板上挑取 rTB1/p2X-1, p2X-2, p2X-3, p2X-4, p2X-5 和 p2X- $\beta$ 2m 单菌落, 分别接种于含有葡萄糖和氨苄青霉素的 5 mL LB 液中, 37°C 培养过夜。再按照 1:100 的比例接种于 1000 mL 新鲜的含葡萄糖和氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养至菌液光密度值 OD<sub>600</sub> 为 0.4-0.6 时, 加入 1 mol/L 的 IPTG, 使其终浓度为 0.3 mmol/L; 再诱导培养 2.5 h。然后 4000 g 离心 20 min 收集菌体, 按每 50 mL 原菌液加入 4 mL 过柱缓冲液的比例重悬沉淀, -20°C 过夜。再在冰水浴中进行超声波破碎菌体, 9000 g 离心 20 min, 分别收集上清液和菌体进行 SDS-PAGE 分析。表达的融合蛋白分别命名为 MBP-BF2-1, -2, -3, -4, -5 和 MBP- $\beta$ 2m。

### 1.3 亲和层析、SDS-PAGE 和 Western blot 分析

将含 MBP-BF2-1, -2, -3, -4, -5 和 MBP- $\beta$ 2m 融合蛋白的上清上样到柱床体积为 2 mL 的 Amylose 淀粉树脂亲和柱, 用 12 倍体积的缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH7.4) 洗柱; 再加入 3 倍体积的 10 mmol/L 麦芽糖缓冲液洗脱目的蛋白。按文献[16]的方法对重组蛋白进行 SDS-PAGE。另外, Western blot 的程序是纯化的融合蛋白经 SDS-PAGE 后电转至 PVDF 膜, 用含 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐 (PBS) 缓冲液封闭 1 h 后再用 1:10000 稀释的抗 MBP 单抗作为一抗与 PVDF 膜共孵育 1 h, 用含有 0.3% 吐温-20 的 PBS 液洗膜 3 次; PVDF 膜在 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗血清中室温反应 1.5 h, 最后用 4-氯-1-萘酚/过氧化氢溶液显色 30 s, 用蒸馏水终止反应。

### 1.4 融合蛋白的切割与纯化

按照每 1 mg Xa 因子蛋白酶切割 100 mg MBP 融合蛋白的比例, 在 23°C 24-72 h 切割上述纯化的融合蛋白。随后取少量样品进行 SDS-PAGE。再将切割后的蛋白混合物透析后上样于 DEAE-Sepharose 柱 (CL-6B), 进行 MBP 和重组蛋白的分离。即先使用 100 倍体积的缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L NaCl, pH8.0) 透析融合蛋白混合物, 再加样于 5 mL DEAE-Sepharose 柱, 用 3-5 倍柱床体积的缓冲液 B (10 mmol/L Tris-HCl,

25 mmol/L NaCl, pH8.0)洗柱, 然后用梯度洗脱液(25 mmol/L-500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)洗脱目的蛋白. 蛋白浓度的测定方法参照文献[17]进行. 纯化的 BF2s 和  $\beta 2m$  蛋白分别被命名为 BF2 \*03sh, BF2 \*04sh, BF2 \*09sh, BF2 \*12sh, BF2 \*03zz 和  $\beta 2m$ -z01,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用.

### 1.5 二级结构的测定与同源建模

采用 Jasco J175 圆二色谱仪(日本 Jasco 公司)在  $25^{\circ}\text{C}$  条件下对(0.2 mg/mL)BF2 \*03sh, BF2 \*04sh, BF2 \*09sh, BF2 \*12sh, BF2 \*03zz 和  $\beta 2m$ -z01 蛋白分别进行 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 $[\theta]$ ( $^{\circ} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ ), 再用 J-700 (Windows Secondary Structure Estimation) version 1.10 软件分析各蛋白二级结构的组成. 随后, 应用 EXPASY 服务器(<http://www.expasy.ch/tools/>)上的 SPOMA 法预测 BF2 \*03sh, BF2 \*

04sh, BF2 \*09sh, BF2 \*12sh, BF2 \*03zz 和  $\beta 2m$ -z01 蛋白的二级结构并与 CD 值进行比较.

依据蛋白数据库中的已结晶测定过的人和鼠的 3D 结构在 <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html> 服务器上进行复等位基因 BF2 和  $\beta 2m$  蛋白 3D 结构的同源建模. 用 Rasmol 软件观察各蛋白的 3D 结构图.

## 2 结果

### 2.1 BF2 和 $\beta 2m$ 表达载体的构建

BF2 的胞外区和  $\beta 2m$  成熟肽基因的表达载体的构建如图 1 所示. 测序结果显示插入表达载体的 BF2 基因的胞外区长 807-819 bp,  $\beta 2m$  长 294 bp. BF2 \*03sh 和  $\beta 2m$ -z01 基因与我们以前报道序列完全一致. BF2 \*04sh, BF2 \*09sh, BF2 \*03zz, BF2 \*12sh 与相应的 GenBank 中的序列的同源性分别是 99.87%, 99.51%, 99.88% 和 99.63%<sup>[15]</sup>.

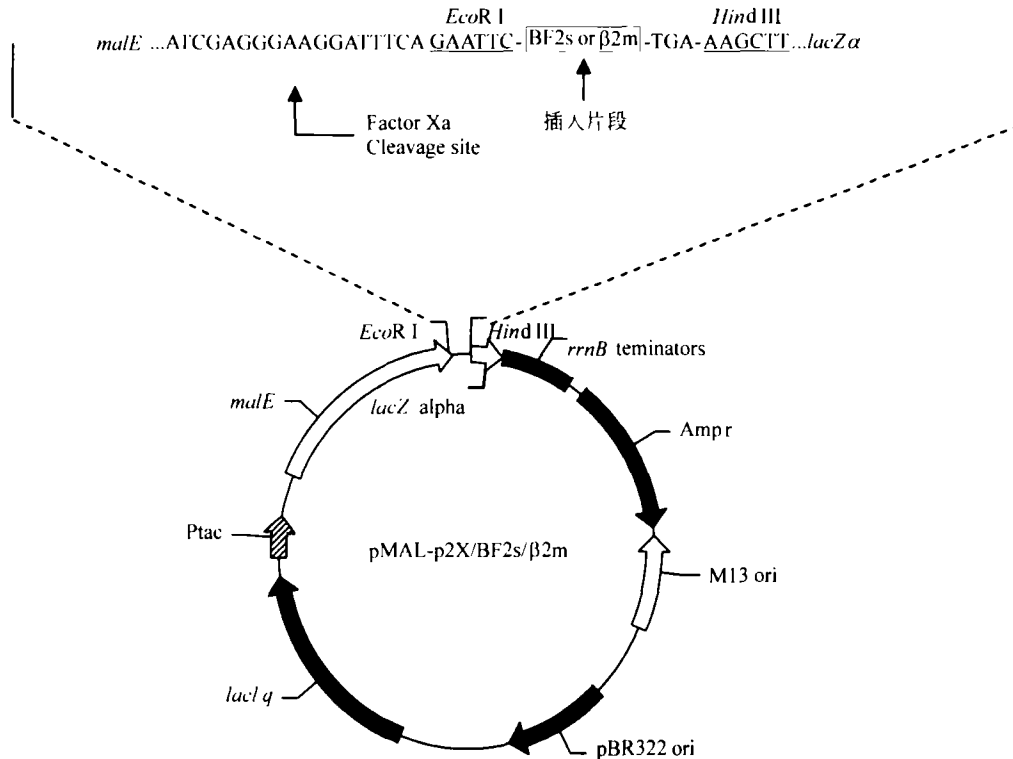


图1 构建复等位基因 BF2 胞外区和  $\beta 2m$  成熟肽基因表达载体 pMAL-p2X/ BF2 和 pMAL-p2X/ $\beta 2m$

### 2.2 复等位基因 BF2 的可溶性表达与纯化

BF2 胞外区的表达、纯化、Western blot 分析如图 2 所示. 表达的融合蛋白 MBP-BF2s 的分子质

量为 73.3-73.8 ku (图 2(a)). 融合蛋白 MBP-BF2 经 Amylose 淀粉树亲和层析纯化后, SDS-PAGE 呈现出了一条分子质量约 73.3-73.8ku 单一带(图 2(b)).

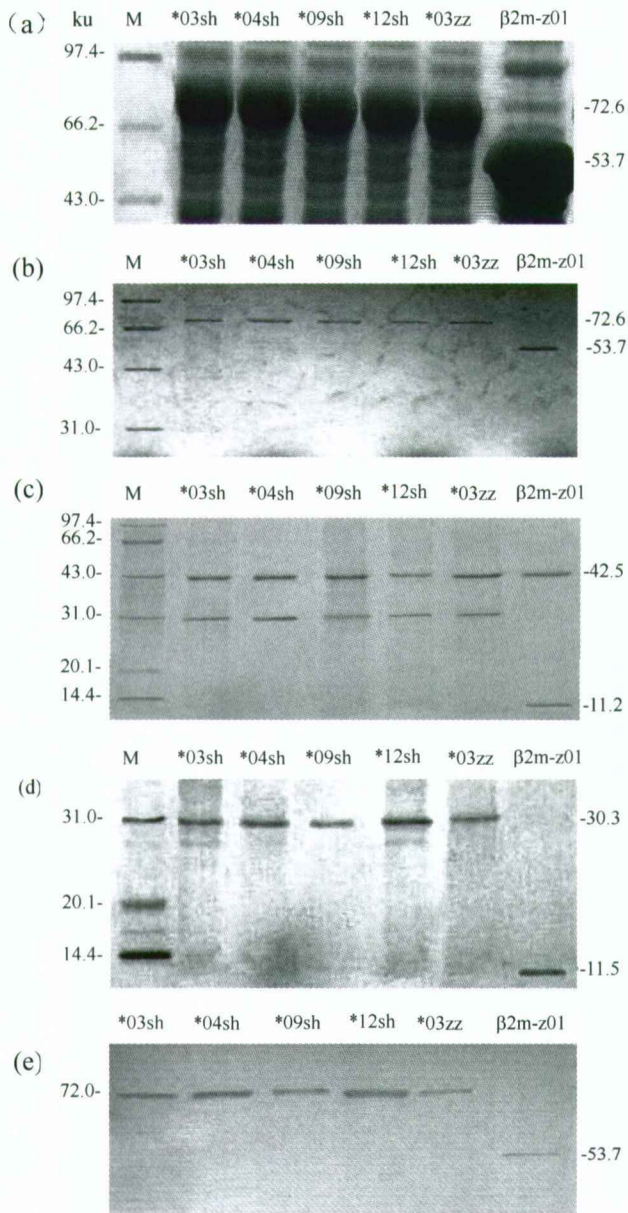


图 2 重组鸡复等位基因 BF2 胞外区和 β2m 蛋白的表达与纯化以及酶切与 Western blot 鉴定

(a) MBP-BF2s/MBP-β2m 菌体蛋白的 SDS-PAGE 结果; (b) 裂解菌体上清经淀粉树脂亲和层析柱后的融合蛋白 MBP-BF2s/MBP-β2m 的 SDS-PAGE 电泳结果; (c) 纯化的融合蛋白 MBP-BF2s/MBP-β2m 经 Xa 因子酶切后混合物的 SDS-PAGE 电泳分析; (d) DEAE-Sepharose 柱纯化后 MBP-BF2/MBP-β2m 中 MBP、BF2s 以及 β2m 的 SDS-PAGE 电泳结果; (e) MBP-BF2/MBP-β2m 的 Western blot 结果. M, 蛋白分子量标准; \*03sh, 04sh, 09sh, 12sh, 03zz 和 β2m-z01 分别代表表达的 BF2 \*03sh (AB159065), BF2 \*04sh (AB159066), BF2 \*09sh (AB159072), BF2 \*12sh (AB159075) 和 BF2 \*03zz (AB178049) 的胞外区以及 β2m-z01 (AB178593) 的成熟肽蛋白样品

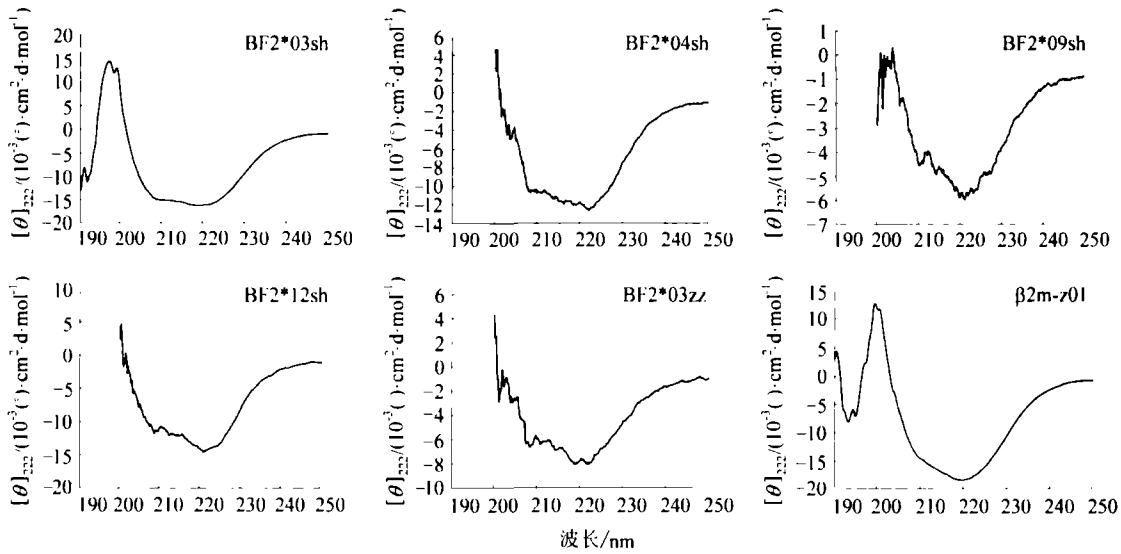
即 MBP-BF2 在 *E. coli* TB1 中实现了可溶性表达. 各个纯化的融合蛋白 MBP-BF2 均被 Xa 因子蛋白酶完全切割(图 2(c)). 切割后的蛋白混合物经 DEAE-Sepharose 柱后, SDS-PAGE 分析 BF2s 单体蛋白分子在 30.5—31.1ku 处(图 2(d)). Western blot 结果显示了 MBP-BF2s 融合蛋白分别在 73.3—73.8 ku 处呈现出一条特异性反应带(图 2(e)).

### 2.3 β2m 的可溶性表达与纯化

琼脂糖凝胶电泳显示插入表达载体 p2X 的 β2m 基因的长度为 294 bp, 这与我们以前报道结果完全一致<sup>[15]</sup>. β2m 的表达、纯化、SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果如图 2 所示. MBP-β2m 在 *E. coli* TB1 中为可溶性表达, 其分子质量为 54.0 ku (图 2(a)). 融合蛋白 MBP-β2m 过 Amylose 淀粉树脂柱和 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱后得到了高度纯化. SDS-PAGE 显示 MBP-β2m 分子质量为 54.0 ku (图 2(b)). MBP-β2m 被 Xa 因子蛋白酶完全切割后 SDS-PAGE 显示 MBP 的分子质量为 42.5 ku, β2m 分子质量为 11.2 ku (图 2(c)). DEAE-Sepharose 柱分离纯化获得的 β2m 单体如图 2(d) 所示. Western blot 结果也证实了 MBP-β2m 为分子质量 54.0 ku 的单一带(图 2(e)).

### 2.4 二级结构

圆二色谱测定复等位基因 BF2s 和 β2m 蛋白的二级结构结果如图 3 和表 1 所示. 纯化的 BF2s 蛋白圆二色谱图均在 208 nm 和 222 nm 处有一波谷(图 3), 显示出 BF2s 蛋白在测定条件下具有典型的 α 螺旋结构. 纯化的蛋白 β2m 的圆二色谱图只在 222 nm 处有一波谷, 显示出 β2m 蛋白为典型的 β 折叠. 按 Yang-Chen 公式计算的 BF2s 蛋白的二级结构如表 1 所示. 其中, α 螺旋、β 折叠、转角和随机卷曲氨基酸的含量分别为 69—73, 67—72, 34—37 和 94—98. 新类 β2m 蛋白 98 个氨基酸中 α 螺旋、β 折叠、转角和随机卷曲的含量分别为 0、46、32 和 20. 另外, SOPMA 方法预测 BF2s 的二级结构显示其 α 螺旋百分含量和氨基酸含量分别为 25.27%—27.41% 和 69—74, β 片层的百分含量和氨基酸含量分别是 39.26%—41.86% 和 106—113. 这一结果与 CD 测定的 BF2s 蛋白的二级结构一致.

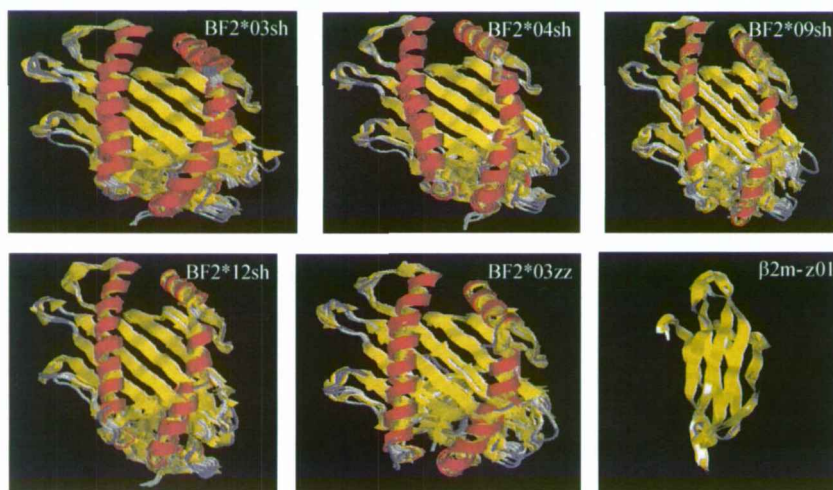
图3 BF2,  $\beta 2m$  及 MBP 蛋白圆二色谱测定结果表1 复等位基因 BF2 胞外区和  $\beta 2m$  蛋白二级结构

二级结构	BF2s 胞外区各成分的氨基酸数目					$\beta 2m$ -z01 各成分的氨基酸数目
	BF2*03sh	BF2*04sh	BF2*09sh	BF2*12sh	BF2*03zz	
$\alpha$ 螺旋	70	73	71	71	69	0
$\beta$ 折叠	67	69	67	69	72	46
转角	35	34	35	36	37	32
随机卷曲	98	94	96	94	95	20
总氨基酸数	270	270	269	270	273	98

## 2.5 BF2s 和 $\beta 2m$ 的 3D 结构

同源模建复等位基因 BF2s 胞外区和  $\beta 2m$  成

熟肽区 3D 结构结果如图 4 和表 2 所示。与人和鼠的 MHC I 类分子 3D 结构类似，鸡 BF2s PBD 均由两个  $\alpha$  螺旋区和 8 个  $\beta$  片层组成。新类  $\beta 2m$ -z01 也含有 7 个  $\beta$  片层。经分析发现 BF2s PBD 的氨基酸在  $\alpha$  螺旋的确切数量上均有细微差别。例如在 BF2 蛋白的 161—174 位是一个  $\alpha$  螺旋，而人和鼠 MHC I 类分子在 160—162 位氨基酸却不形成螺旋。

图4 同源模建复等位基因 BF2s 和  $\beta 2m$  蛋白的 3D 结构

(Rasmol 软件制作)。红、黄、蓝和灰色分别表示  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、转角和随机卷曲。BF2\*03sh, BF2\*04sh, BF2\*09sh, BF2\*12sh, BF2\*03zz 以及  $\beta 2m$ -z01 分别代表相应的复等位基因 BF2 和  $\beta 2m$  蛋白单体

表2 比较鸡BF2与人HLA-A2和鼠PBD区三级结构

等位基因	β片层								多肽结合区			
	α1区				α2区				α1螺旋		α2螺旋	
	β1	β2	β3	β4	β5	β6	β7	β8				
人 HLA-A2	3-12	21-28	31-37	46-47	94-103	109-118	121-126	133-135	51	85 <sub>(54-57)</sub>	138	179 <sub>(149-151, 160-162, 174-176)</sub>
大鼠 RT1 (1kj·mA)	1-13	21-29	31-38	46-48	93-105	108-119	121-127	132-136	57	85	138	179 <sub>(149-151, 160-162, 174-176)</sub>
BF2 *03sh	6-16	24-32	34-41	47-49	94-105	109-119	121-127	132-136	52	87 <sub>(55-59)</sub>	138	174 <sub>(149-151)</sub>
BF2 *04sh	4-16	24-32	34-41	47-49	94-106	113-119	121-127	132-136	52	87 <sub>(55-59)</sub>	138	174 <sub>(149-151)</sub>
BF2 *09sh	6-16	24-32	34-41	47-49	94-105	109-119	121-127	132-136	52	87 <sub>(55-60)</sub>	138	174 <sub>(149-151)</sub>
BF2 *12sh	6-16	24-32	34-41	47-49	94-105	109-119	121-127	132-136	52	87 <sub>(55-60)</sub>	138	174 <sub>(149-151)</sub>
BF2 *03zz	6-16	24-32	34-41	47-49	96-107	110-121	123-129	134-138	52	89 <sub>(55-62)</sub>	140	177 <sub>(152-156)</sub>

表中数字代表蛋白质每个结构区的起止氨基酸位置

### 3 讨论

为了推进鸟类 MHC I 的高级结构研究和在体外构建鉴定禽类病毒 T 细胞表位的 BF2-β2m 复合物, 本研究用 pMAL-p2X/*E. coli* TB1 表达系对 BF2 \*03sh, BF2 \*04sh, BF2 \*09sh, BF2 \*12sh, BF2 \*03zz 胞外区和 β2m-z01 成熟肽基因进行了可溶性的表达. BF2 复等位基因的 Y7<sup>Y7</sup>, Y58<sup>Y59</sup>, Y156<sup>Y159</sup>, Y168<sup>Y171</sup>, T140<sup>T143</sup>, K143<sup>K146</sup> 和 W144<sup>W147</sup> 位氨基酸是十分保守的, 并且 PBD, CD8<sup>+</sup> 以及 β2m 结合区也相对保守<sup>[15]</sup>. 我们根据氨基酸的同源性, 将三品系鸡(三黄鸡, 乌鸡, 珍珠鸡)的 BF2 分为 11 类, 并发现了 5 类(7, 8, 9, 10 和 11)新的复等位基因; 尽管在复等位基因之间氨基酸的同源性为 75.7%—99.2%, 但在同类复等位基因内其氨基酸的同源性大于 91%<sup>[15]</sup>. 考虑到 BF2 的多态性及其导致的抗病力差异, 本研究选择了 3, 4, 8, 9 和 10 类 BF2 进行了可溶性表达和二级结构测定. 另外, 鸡 β2m 基因也被我们分为两类: I 和 II 类<sup>[15]</sup>. 在 I 和 II 类复等位基因之间, 氨基酸的同源性为 81.9%—84.0%. 而 II 类是一新类群, 我们对其也进行了表达与结构分析.

本文使用的 pMAL-p2X/*E. coli* 表达系统能够大量、可溶性表达 BF2 和 β2m 蛋白, 并且易于纯化、Westernblot 鉴定和从融合蛋白中分离目的蛋白, 即表达的融合蛋白 MBP-BF2 和 MBP-β2m 以及切割后的蛋白混合物均能被淀粉树脂柱和 DEAE-Sepharose 离子交换柱成功地分离和纯化. SDS-PAGE 分析结果显示了 MBP-BF2 和 MBP-β2m 可溶, 分子稳定并且适合结构分析. MHC I 的多肽结合区是结合 CTL 表位多肽的结构基础. 人类 MHC

I 类分子(HLA-A2)的 α 链是由 73 个氨基酸组成, 抗原肽结合槽是由两个反向平行的 α 螺旋与 8 个平行的 β 片层形成; 而 β2m 则与 MHC I α1, α2 和 α3 区非共价键结合, 从而稳定结合槽<sup>[18]</sup>. 我们认为重组蛋白 BF2 和 β2m 的 α 螺旋和 β 折叠的氨基酸含量对维持 BF2-β2m 的高级结构同样重要, 甚至关系到 BF2-β2m 能否成功结合抗原多肽. CD 结果显示 BF2s 的 α 螺旋是 69—73 个氨基酸, 这与 HLA-A2 和我们报道的 BF2 \*02sh 基本一致<sup>[19]</sup>. 即鸡复等位基因间的 α 螺旋的符合率为 97.2%—100%. 同时, 人类和鸡 β2m-S01 均没有 α 螺旋的存在<sup>[20]</sup>, 本文对一新类 β2m 测定结果也显示没有 α 螺旋, 呈现出典型的 β 折叠, 并且, 其 β 片层和随机卷曲加 β 转角的氨基酸含量与人和鼠的 β2m 类似, 一致率到 74.6%—95.2%.

复等位基因 BF2s 和 β2m 3D 的同源模建进一步揭示了鸡与人类的 MHC I 类分子既具有相似性又有其独特性. 尤其是在 3D 结构中 PBD 的取向和氨基酸折叠的数量上有所不同. BF2 蛋白的 55—62 位是一个随机转角, 而人和鼠的 54—57 位则是 α 螺旋. 同时, 预测 BF2s 和 β2m 的二级结构与 CD 测定结果以及同源模建结果十分一致.

综上所述, pMAL-p2X 系统可以表达与纯化正确折叠的 BF2s 和 β2m 蛋白, 并且不同复等位基因 BF2s 和 β2m 蛋白间的高级结构相似, 差异细微. 结果为进一步体外构建鉴定病毒 CTL 表位提供了参数.

### 参 考 文 献

- 1 Speir J A, Abdel-Motal U M, Jondal M, et al. Crystal structure of an MHC class I presented glycopeptide that generates carbohy-

- drate-specific CTL. *Immunity*, 1999, 10: 51–61
- 2 Silver M L, Parker K C, Wiley D C. Reconstitution by MHC-restricted peptides of HLA-A2 heavy chain with beta 2-microglobulin *in vitro*. *Nature*, 1991, 350: 619–622
  - 3 Gao G F, Tormo J, Gerth U C, et al. Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature*, 1997, 387: 630–634
  - 4 Oleksiewicz M B, Kristensen B, Ladekjaer-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
  - 5 Wang B, Chen H, Jiang X, et al. Identification of an HLA-A\*0201-restricted CD8+ T-cell epitope SSp-1 of SARS-CoV spike protein. *Blood*, 2004, 104: 200–206
  - 6 Coles R M, Jones C M, Brooks A G, et al. Virus infection expands a biased subset of T cells that bind tetrameric class I peptide complexes. *Eur J Immunol*, 2003, 33: 1557–1567
  - 7 Altman J D, Moss P A, Goulder P J, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996, 274: 94–96
  - 8 Willcox B E, Thomas L M, Bjorkman P J. Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat Immunol*, 2003, 4: 913–919
  - 9 Kaufman J, Andersen R, Avila D, et al. Different features of the MHC class I heterodimer have evolved at different rates. Chicken B F and beta 2-microglobulin sequences reveal invariant surface residues. *J Immunol*, 1992, 148: 1532–1546
  - 10 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 U S A*, 1994, 91: 4397–4401
  - 11 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
  - 12 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
  - 13 Miller M M, Bacon L D, Hala K, et al. 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. *Immunogenetics*, 2004, 56: 261–279
  - 14 Kaufman J, Jacob J, Shaw I, et al. Gene organisation determines evolution of function in the chicken MHC. *Immunol Rev*, 1999, 167: 101–117
  - 15 Yan R Q, Li X S, Yang T Y, et al. Characterization of BF2 and beta2m in three Chinese chicken lines. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 108: 417–425
  - 16 Xia C, Dan W, Wen-Xue W, et al. Cloning and expression of interferon-alpha/gamma from a domestic porcine breed and its effect on classical swine fever virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 104: 81–89
  - 17 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254
  - 18 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
  - 19 Sapaer 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
  - 20 Yan R Q, Li X S, Yang T Y, et al. Structures and homology modeling of chicken major histocompatibility complex protein class I (BF2 and Beta2m). *Molecular Immunology*, 2006, 43: 1040–1046