

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

**BF2/肽四聚体的构建及其在传染性支气管炎
病毒特异性 T 细胞反应评价中的应用**

**Constrution of BF2/peptide tetramer and assessment of the
infectious bronchitis virus -sepecific T cells by using the
prepared BF2/peptide tetramer**

博 士 研 究 生 ：刘光亮

指 导 教 师 ：吴东来 研究员

申 请 学 位 类 别 ：农学博士

专 业 ：预防兽医学

研 究 方 向 ：兽医分子病理学与免疫学

培 养 单 位 ：研究生院

哈尔滨兽医研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D Dissertation

**Constrution of BF2/peptide tetramer and assessment of the
infectious bronchitis virus -sepecific T cells by using the
prepared BF2/peptide tetramer**

Ph.D Candidate : Liu Guang-liang

Advisor : Prof. Wu Dong-lai

Major : Preventive Veterinary Medicine

Specialty : Veterinary Molecular Pathology
and Immunology

Chinese Academy of Agricultural Sciences
June 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

中 国 农 业 科 学 院
博士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

论文题目		BF2/肽四聚体的构建及其在传染性支气管炎病毒特异性 T 细胞反应评价中的应用				
论文作者		刘光亮	专 业	预防兽医学	研究方向	兽医分子病理学与免疫学
指导教师		吴东来	研究员	培养单位(研究所、中心)		哈尔滨兽医研究所
姓名		职称	硕 (博) 导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	刘文周	教 授	硕导博导	东北农业大学	动物传染病	
	师东方	教 授	硕导博导	东北农业大学	预防兽医学	
	刘胜旺	研究员	硕导博导	哈尔滨兽医研究所	动物病毒分子生物学	
答辩主席		魏平	教 授	硕导博导	东北农业大学	动物传染病
答 辩 委 员	李一经	教 授	硕导博导	东北农业大学	动物传染病	
	李书华	教 授	硕导博导	黑龙江省兽医防疫站	动物疫苗研究	
	刘长明	研究员	硕导博导	哈尔滨兽医研究所	动物病毒学	
	周建华	研究员	硕导博导	哈尔滨兽医研究所	医学免疫学	
	薛 飞	研究员	硕导博导	哈尔滨兽医研究所	动物病毒学	
	王笑梅	研究员	硕导博导	哈尔滨兽医研究所	动物病毒学	
			硕导博导			
会议记录 (秘书)			刘永刚			
论文答辩时间地点			2007 年 6 月 14 日 哈尔滨兽医研究所三楼学术报告厅			

摘 要

MHC I 类分子/肽四聚体技术是 1996 年建立的一种检测特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs) 的方法, 该方法已在人类及模式动物的相关领域得到较为广泛的研究和应用, 然而在兽医学相关研究中只有近年来在猪和马上有了初步的研究, 目前该项技术在禽类的研究尚属空白。

为了构建鸡的MHC/肽四聚体, 本实验从SPF莱航鸡全血克隆了鸡MHC I重链 α (BF2) 和 β 2微球蛋白 (Ch β 2m) 全基因, 经系统进化分析表明本实验所获得的BF2 基因为B15 单倍型。然后利用软件分析了其各自的信号肽序列及BF2 的跨膜区, 利用引物分别缺失了这两段基因的信号肽序列以及BF2 的跨膜区, 并在BF2 基因的 3'端融合了BirA底物肽 (BSP) 序列。将经改造的两段基因分别克隆至融合蛋白重组表达载体中, 分别命名为pET-BF₂-BSP和pET-Ch β 2m, 并将其分别转化至大肠杆菌感受态BL21 (DE3) 中进行诱导表达, 获得了包涵体表达的重组蛋白, 表达产物溶解于 8M脲中, 经SDS-PAGE分析, 结果表明所得融合目的蛋白分别约为 38kD和 15kD, Western-blot结果显示该重组蛋白均成功融合了 6 \times His标签。为了获得大量的目的蛋白, 优化了诱导剂浓度、起始诱导菌体浓度及诱导时间等表达条件。此外, 建立了重组蛋白BF2-BSP和Ch β 2m在变性状态下通过镍柱亲和层析纯化包涵体的方法, 获得了高纯度的重组蛋白BF2-BSP和Ch β 2m。

根据文献所报道, 合成了鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 核蛋白N₇₁₋₇₈ T细胞表位肽, 将其与纯化后的重组蛋白BF2-BSP和Ch β 2m在重折叠缓冲液中复性。复性后在快速蛋白液相色谱仪 (FPLC) 上分离出复性组装成功的BF2/肽单体复合物。将该单体复合物在体外进行生物素化, 其产物再次采用FPLC通过分子筛分离出生物素化后的BF2/肽单体复合物;通过链霉亲和素迁移实验检测体外生物素化效率, 然后将生物素化后的BF2/肽单体复合物与藻红蛋白 (PE) 标记的链霉亲和素按一定比例反应生成BF2/肽四聚体。

为了检测所制备BF2/肽四聚体的功能, 采用 10^{5.5} EID₅₀的IBV H52 株接种一周龄SPF鸡, 10d后采抗凝血用淋巴细胞分离液分离PBMC, 调整细胞浓度后取 1 \times 10⁶个细胞进行抗鸡CD8 单抗和BF2/肽四聚体双色荧光染色, 采用流式细胞术检测并分析染色结果, 结果表明所制备的BF2/肽四聚体可用于检测IBV N蛋白特异性T淋巴细胞, 检测一周龄SPF鸡接种H52 后 10d时针对N蛋白的特异性T细胞比率为 3.65%。

为了探讨 SPF 鸡在感染 IBV 后体内抗体水平及针对 N 蛋白特异性的 T 淋巴细胞的动态变化, 将 125 羽 SPF 鸡随机分为三组分别作为接种免疫组、攻毒对照组和空白对照组。采用 IBV H52 标准毒株对其通过滴鼻方式进行免疫, 之后每 3 天剖杀 5 羽观察各脏器的病理学变化、检测血清抗体效价并采用 BF2/肽四聚体评价其 N 蛋白特异性 T 细胞的比例; 免疫 15d 时采用 IBV M41 对免疫组和攻毒对照组进行攻毒, 同样检测上述指标。最后综合评价 IBV 在免疫及攻毒后血清抗体和 N 蛋白特异性 T 细胞的动态变化趋势及两者之间的相互关系。检测结果表明 H52 滴鼻免疫后特异

性 T 细胞免疫的产生早于血清抗体 IgG 的出现,攻毒结果显示在 SPF 鸡未产生坚强的体液免疫时仍能抵抗同型强毒的攻击,提示特异性 T 细胞在抵抗 IBV 早期感染免疫反应过程中可能起着重要作用。

关键词：鸡 MHC I 类分子；BF2-BSP；鸡 β 2m 微球蛋白；BF2/肽四聚体；传染性支气管炎病毒；核蛋白

Abstract

The major histocompatibility complex class I (MHC class I) peptide tetramer is a sensitive tool to evaluate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). However, no chicken MHC class I peptide tetramer has been reported by now.

In order to construct the chicken MHC class I peptide tetramer, genes of the chicken MHC I α chain (BF2*15) and β 2 microglobulin (Ch β 2m) were amplified from the total RNA of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by RT-PCR and cloned into pMD18-T. Then the PCR products deleted the signal sequence at the 5' end of both the BF2 and Ch β 2m genes and included the BirA substrate peptide (BSP) sequence at the 3' end of the BF2 gene were sub-cloned into the expression vector pET-28a (+) and named as pET-BF2-BSP and pET-Ch β 2m. High levels of BF2-BSP and Ch β 2m proteins were successfully expressed in *E. coli* strain BL21 (DE3) transformed with the recombinant vectors pET-BF2-BSP and pET-Ch β 2m. The recombinant target proteins were purified with a Ni²⁺NTA column including His-Bind Resin, and then high-quality recombinant proteins were recovered.

BF2-BSP and Ch β 2m were refolded with synthetic peptide originated from infectious bronchitis virus nucleoprotein (IBV N₇₁₋₇₈) in refolding buffer to generate the monomer of BF2/peptide complex. The folded product was then subjected to enzymatic biotinylation by BirA enzyme. After biotinylation the sample was run over a gel filtration column to purify the BF2/peptide fraction. The tetrameric complexes of biotinylated BF2/peptide were produced by mixing purified, biotinylated monomer with PE-labeled streptavidin at a molar ratio of 4:1.

In order to test the function of the prepared BF2/peptide tetramer, one-week SPF chicks were immunized with 10^{5.5} EID₅₀ IBV H52 strain through intranasal inoculation. The PBMCs were isolated at 10 days post infection (d.p.i.) and used for flow cytometry staining. The CTLs response of IBV-infected chicks was evaluated with the prepared BF2/peptide tetramer and 3.65% CTLs frequency specific to IBV N was detected.

To discuss the kinetics of the antibody titer and the IBV N-specific T cell when the SPF chicks were infected with the IBV, 125 SPF chicks were divided into three groups at random, namely vaccinated group, challenge control group and negative control group. The SPF chicks from the vaccinated group were immunized with 10^{5.5} EID₅₀ IBV H52 strain through intranasal inoculation. Five chicks were sacrificed every three days for pathogenesis observation, assessment of antibody titer and IBV N-specific T cell measured by prepared BF2/peptide tetramer. The chicks from vaccinated group and challenge control group were challenged with IBV M41 at the day 15 after vaccination. Also, the same assessments were taken on as described above. All the results were pooled together to investigate the interaction between the antibody titer and nucleoprotein-specific T cell after vaccination and challenge.

The results indicated that the CTL activity was shown to be effective during the initial elimination of virus in the chicks, later control of infection probably depends on antibody, especially the IgG response, which likely plays a important role in preventing recrudescence of infection.

Key words: Chicken MHC class I, BF2-BSP, chicken β 2m, BF2/peptide tetramer, IBV, nucleoprotein

目 录

英文缩略表.....	VIII
图表清单	IX
第一章 前言	1
1. 研究细胞毒性 T 淋巴细胞的新方法——MHC I/肽四聚体技术	1
1.1 ^{51}Cr 释放法.....	1
1.2 细胞内细胞因子染色法.....	2
1.3 酶联免疫斑点法.....	2
1.4 荧光测定法.....	2
1.5 有限稀释法.....	3
1.6 MHC/肽四聚体 (MHC/peptide tetramer) 技术	3
2. 传染性支气管炎病毒的免疫学相关研究	9
2.1 IBV 病毒结构.....	9
2.2 IBV 的体液免疫.....	10
2.3 IBV 诱导的细胞免疫.....	10
2.4 IBV 诱导的黏膜免疫及其抗感染作用	11
2.5 IBV N 蛋白的免疫学研究.....	11
第二章 可生物素化鸡 MHC I (α) 及鸡 $\beta 2$ 微球蛋白的基因克隆、构建、 表达及纯化	13
2.1 材料	13
2.1.1 实验动物	14
2.1.2 感受态菌种和表达载体.....	14
2.1.3 主要试剂	14
2.1.4 主要仪器	14
2.2 方法	14
2.2.1 引物设计	14
2.2.2 鸡全血总 RNA 的提取	15
2.2.3 RT-PCR 扩增 BF2 和 Ch $\beta 2\text{m}$ 基因及其克隆	15
2.2.4 所扩增 BF2 基因的进化分析	16
2.2.5 预测 BF2 和 Ch $\beta 2\text{m}$ 基因信号肽.....	16
2.2.6 BF2 和 Ch $\beta 2\text{m}$ 表达载体的亚克隆.....	16
2.2.7 pET-BF2-BSP 和 pET-Ch $\beta 2\text{m}$ 在 <i>E. coli</i> 中的表达.....	16
2.2.8 目的蛋白的鉴定.....	16
2.2.9 pET-BF2-BSP 和 pET-Ch $\beta 2\text{m}$ 表达条件的优化	17
2.2.10 目的蛋白 BF2-BSP 和 Ch $\beta 2\text{m}$ 的纯化	17
2.3 结果	17
2.3.1 BF2 和 Ch $\beta 2\text{m}$ 基因的克隆、序列测定及其分析	17
2.3.2 pET-BF2-BSP 和 pET-Ch $\beta 2\text{m}$ 重组质粒的构建及鉴定	19

2.3.3	pET-BF2-BSP 和 pET-Ch β 2m 在大肠杆菌中的表达及鉴定	20
2.3.4	表达条件的优化	21
2.3.5	融合蛋白 BF2-BSP 和 Ch β 2m 的纯化	22
2.4	讨论	22
第三章 BF2/肽四聚体的构建及其功能检测		25
3.1	材料	25
3.1.1	实验动物	25
3.1.2	病毒	26
3.1.3	多肽	26
3.1.4	主要试剂	26
3.1.5	主要仪器设备	26
3.2	方法	26
3.2.1	SPF 鸡的接种试验	26
3.2.2	包涵体的纯化	26
3.2.3	BF2-BSP 和 Ch β 2m 的定量	27
3.2.4	BF2/肽复合物的重折叠	27
3.2.5	重折叠蛋白的浓缩	27
3.2.6	BF2/肽单体复合物的纯化	28
3.2.7	体外生物素化	28
3.2.8	已生物素化 BF2/肽单体复合物的纯化	28
3.2.9	确定体外生物素化效率 (链霉亲和素迁移试验)	28
3.2.10	BF2/肽四聚体的生成及纯化	28
3.2.11	鸡 PBMCs 的分离	28
3.2.12	BF2/肽四聚体的功能检测	29
3.3	结果	29
3.3.1	包涵体的纯化及定量	29
3.3.2	BF2/肽复合物的重折叠及纯化	30
3.3.3	BF2/肽单体复合物生物素化效率的测定及其四聚体的生成	31
3.3.4	BF2/肽四聚体的功能检测	32
3.4	讨论	33
第四章 IBV 免疫过程中抗体消长规律和核蛋白特异性 T 细胞动态变化的关系		36
4.1	材料	36
4.1.1	实验动物	36
4.1.2	病毒	36
4.1.3	BF2/肽四聚体	37
4.1.4	主要试剂	37
4.1.5	主要仪器设备	37
4.2	方法	37
4.2.1	SPF 鸡的免疫与攻毒试验	37

4.2.2	SPF 鸡的剖杀	37
4.2.3	组织切片的制作及病理学观察	37
4.2.4	血清抗体效价的测定	38
4.2.5	采用 BF2/肽四聚体评价 IBV N 蛋白特异性 T 细胞动态变化	38
4.3	结果	38
4.3.1	各组 SPF 鸡主要组织器官的病理组织学变化	38
4.3.2	各组 SPF 鸡血清抗体效价动态变化	39
4.3.3	IBV N 蛋白特异性 T 细胞动态变化	40
4.4	讨论	42
第五章 全文结论		44
参考文献		45
致 谢		59
作者简历		60

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
CTLs	Cytotoxic T lymphocytes	细胞毒性 T 淋巴细胞
BF	Chicken Major histocompatibility complex class I	鸡主要组织相容性复合体 I 类分子
Ch β 2m	Chicken β 2 microglobulin	鸡 β 2 微球蛋白
BSP	BirA substrate peptide	BirA 酶底物肽
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells	外周血单核细胞
eCTL	Effector CTL	效应 CTL 细胞
CTLp	CTL Precursor	CTL 前体细胞
APC	Antigen presenting cell	抗原提呈细胞
PBL	peripheral blood lymphocyte	外周血淋巴细胞
d.p.i.	Days post infection	感染后天数
EID ₅₀	50% egg infectious dose	半数鸡胚感染量
IBV	Infectious bronchitis virus	传染性支气管炎病毒
FPLC	Fast protein liquid chromatography	快速蛋白液相色谱法
ELISPOT	Enzyme-link Immunospot Assay	酶联免疫斑点法
LDA	Limiting dilution analysis	有限稀释法
CMI	Cell mediated immunity	细胞介导免疫
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PE	Phycoerythrin	藻红蛋白
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
SPF	Specific-pathogen free	无特定病原体
TCR	T cell receptor	T 细胞受体

图表清单

图 1	四聚体结构模式图.....	4
图 2	传染性支气管炎病毒结构模式图	10
图 3	鸡 MHC I 重链 α (BF2)和轻链 Ch β 2m 基因的 RT-PCR 扩增结果.....	18
图 4	BF2 开放阅读框系统发育分析结果	18
图 5	重组质粒 pET-BF2-BSP 和 pET-Ch β 2m 的 PCR 鉴定.....	19
图 6	重组质粒 pET-BF2-BSP 和 pET-Ch β 2m 酶切鉴定结果	19
图 7	重组蛋白 BF2-BSP 和 Ch β 2m 的 SDS-PAGE 分析结果.....	20
图 8	重组蛋白 BF2-BSP 和 Ch β 2m 的 Western-blot 鉴定结果.....	20
图 9	pET-BF2-BSP 和 pET-Ch β 2m 表达条件的优化结果	21
图 10	重组蛋白 BF2-BSP 和 Ch β 2m 的纯化结果.....	22
图 11	BF2-BSP 和 Ch β 2m 包涵体纯化结果.....	29
图 12	BF2-BSP 和 Ch β 2m 蛋白含量薄层扫面结果.....	30
图 13	重折叠产物 SDS-PAGE 检测结果	30
图 14	BF2、Ch β 2m 和肽重折叠后 FPLC 纯化产物	31
图 15	生物素化 BF2/肽单体复合物经 FPLC 纯化	31
图 16	链霉亲和素迁移实验鉴定 BF2/肽四聚体的生成.....	32
图 17	BD 流式细胞仪双色荧光校正补偿.....	32
图 18	BF2/肽四聚体的功能检测.....	33
图 19	IBV 攻毒后各主要脏器病理组织学变化.....	39
图 20	IBV 感染免疫和攻毒后的血清抗体动态变化.....	40
图 21	流式细胞术分析 IBV N 蛋白特异性 CTL 的动态变化.....	41
图 22	SPF 鸡感染 IBV 后 N 蛋白特异性 CTL 与抗体产生时间的比较.....	41
表 1	免疫及攻毒后血清抗体效价检测结果.....	40
表 2	不同时间段检测 IBV N 蛋白特异性 CTL 的比率.....	41

第一章 前言

1. 研究细胞毒性 T 淋巴细胞的新方法——MHC I/肽四聚体技术

T细胞在调节机体免疫反应中起着关键性作用,其功能表达、亚群分布及频数的改变与疾病的发生发展及转归有着密切的关系。研究T细胞的识别、活化及频数分布是现代免疫学基础研究及应用研究最重要的环节之一。其中细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs或Tc)在T细胞免疫应答中发挥重要作用,CTLs通过识别细胞表面与MHC I类分子结合的抗原肽而杀伤靶细胞,是机体抗肿瘤、抗移植物以及有效控制各种感染的重要途径之一。然而,体外研究CTLs的活性和功能存在很多困难,如:抗原特异性T细胞的体外培养比较困难,扩增过程带来大量非抗原表位特异性T细胞,很难保证其T细胞的抗原特异性,此外,缺乏精确分析抗原表位特异性T细胞的频数及快速分离扩增这类细胞的技术。又由于T细胞识别存在着严格的组织相容性,不同抗原肽与不同组织相容抗原的亲和力不同,会导致完全不同的免疫应答。所以,多年以来科学家为了了解机体细胞免疫功能和探索疾病机理,一直在寻求检测体内CTL活性的敏感、特异、快速和简便可行的方法。目前,已有一些定性或定量检测特异性CD8⁺ T细胞的方法,并正在发展新的体内检测方法,如MHC四聚体技术。本综述将在概述已有的检测细胞毒性T淋巴细胞的几种经典方法之后,重点介绍新发展起来的MHC/肽四聚体技术。

1.1 ⁵¹Cr释放法

二十世纪六十年代末,Brunner等(1968)首先介绍了以⁵¹Cr标记靶细胞的同位素释放法测定CTLs的细胞毒活性,自此,⁵¹Cr释放法成为测定CTLs杀伤性的常规方法。其基本操作过程为:选择一种对CTLs介导的细胞毒性作用高度敏感的靶细胞用Na₂⁵¹CrO₄标记靶细胞,效应CTL细胞(Effector CTL, eCTL)以5:1-100:1的比例加入同一孔中,混合后离心沉淀,37℃、5%CO₂培养箱中孵育4h。如待检效应细胞能杀伤靶细胞,则⁵¹Cr从靶细胞中释出。以γ计数器测定释出的⁵¹Cr放射活性,靶细胞溶解破坏越多,⁵¹Cr释放越多,上清液的放射活性越高。将细胞培养板离心,取上清,用γ计数器测定每孔的cpm值,取均值为每组的γ计数值,应用公式可计算出待检细胞的杀伤活性。

此方法的优点是:(1)易操作、重复性好;(2)⁵¹Cr能渗透细胞质,为细胞质内标记,在细胞破损之后即被释放出来。标记时间短,一般1-2h;(3)一个效应CTL细胞可在4h内连续杀伤5个靶细胞,效应细胞和靶细胞的共孵育所需要的时间短,一般只需4h。基于上述优点,⁵¹Cr释放试验在国内外得以广泛应用,且成功地被用于检测几种疫苗的I期临床试验(Borysiewicz *et al.*, 1996; Tsang *et al.*, 1995; Egan *et al.*, 1995)。

此方法也存在一些不足:(1)使用放射性的⁵¹Cr不利于安全操作及废物处理,且需要特殊测定仪器;(2)⁵¹Cr标记细胞的自发释放率较高,每小时1-2%,不适用于较长时间的细胞毒试验,常因不同靶细胞标记效率变化差异大而影响结果判定。且⁵¹Cr标记时,要求细胞浓度较大;(3)对某一抗原表位的特异性eCTL的评价仅处于定性或至多半定量的水平,靶细胞的特异性溶解只能反映T细胞群体特异性CTL前体(CTLp)的比例,不能估计特异性CTLs的频数,且不能在单个细

胞水平进行测定。

1.2 细胞内细胞因子染色法 (Intracellular cytokine staining, ICS)

当 T 淋巴细胞经抗原活化后,可分泌多种细胞因子,如:IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 等,这些细胞因子的产生及其种类可用来衡量抗原刺激 T 细胞时的活化情况,单个细胞水平细胞因子的产生可用流式细胞仪来检测循环淋巴细胞中抗原特异性 T 淋巴细胞,其具体方法如下 (Prussin *et al.*, 1995): T 细胞在体外用特异性肽段等刺激活化,用 Brefeldin A 或 monensin 封闭细胞因子分泌途径,使细胞因子在细胞内累积。然后,用荧光或生物素标记的 CD8 的单克隆抗体对细胞进行 CD8 表面标志物染色,再经去垢剂增高细胞通透性,使抗细胞因子荧光抗体结合到细胞内,用流式细胞仪检测。

ICS 有如下优点 (Pala *et al.*, 2000):(1) 量化了分泌细胞因子的细胞,并鉴定其表型;(2) 因有效的应用了抑制细胞因子分泌的试剂 Brefeldin A 或 monensin,从而得到了分泌细胞因子的总量;(3) 通过多色流式细胞仪检测,可反映单细胞水平上分泌多因子的现象,同步明确抗原特异性 T 细胞的特点 (Asemussen *et al.*, 2001)。该方法的缺点是:染色破膜的细胞已是死细胞,不能再作功能试验。

1.3 酶联免疫斑点法 (Enzyme-link Immunospot Assay, ELISPOT)

活化的 T 细胞周围分泌有高浓度的细胞因子,可进行酶联免疫法检测和计数单个细胞因子的分泌细胞 (Scheibenboge *et al.*, 1997)。具体操作是:将硝酸纤维素膜用细胞因子特异性单克隆抗体预包被,经洗去多余的抗体后,再用牛血清白蛋白封闭游离位点,然后放在细胞培养板的微孔底部,将 T 细胞和抗原提呈细胞 (APC) 加入孔内,用特异性抗原刺激,以活化细胞并分泌细胞因子。然后加入碱性磷酸酶 (ALP) 或辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗细胞因子抗体,以检测细胞因子的分泌状况。一般来说,每个小斑都反映了一个细胞因子分泌细胞的情况。

此方法可定量检测产生 IFN- γ 和 TNF- α 的 CD8⁺T 细胞,在检测流感病毒特异性 CTLs 中该法与 ⁵¹Cr 释放法有良好的相关性 (Di Fabio *et al.*, 1994),在研究 T 细胞的频率时比 ⁵¹Cr 释放法更敏感 (Schneider *et al.*, 1998),且不需要体外增殖过程。现在国外已有一些商品化的 ELISPOT 试剂盒,基于 IFN- γ 和 TNF- α 分泌性 CD8⁺T 细胞的 ELISPOT 法已用于几种 MHC I 类分子限制性黑色素瘤抗原的检测 (Herr, 1996; Griffioen, 2001)。该方法的缺点在于斑点的数量较多,或由于斑点的性状变异较大等均会使人工分析变得困难。但是利用计算机辅助立体成像检测技术已可解决此问题,并且能够确定分泌斑的面积,分析 T 淋巴细胞对特异抗原的反应能力。

1.4 荧光测定法

用相同或不同的荧光染料对靶细胞和效应细胞进行染色,然后共同培养,根据荧光强度的变化,通过荧光扫描或流式细胞仪即可定量检测特异性 CTLs。这类方法包括:alamarBlue 荧光测定法 (Nociari *et al.*, 1998)、FITC-annexin V 荧光标记法 (Goldberg *et al.*, 1999)、Calceinace toxymethyl

酯 (Calcein AM) 荧光扫描测定法 (Roden *et al.*, 1999) 7-ADD/CFSE 荧光标记法 (Lecoeur *et al.*, 2001) 和 PKH-26/Anaexin V-FITC/PI 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 荧光标记法 (Fischer *et al.*, 2002) 等。下面将对 PKH-26/Anaexin V-FITC/PI 荧光标记法做一简要概述。

PKH-26 是亲脂性染料, 可稳定结合于靶细胞的细胞膜上, 且不影响细胞的活性和免疫原性; anaexin V 可与磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 高亲和力结合, 正常细胞的 PS 位于细胞膜内表面, 细胞凋亡时翻转位于外侧, 研究发现 PS 外翻为细胞凋亡的早期事件, 先于膜通透性增加所致的 ^{51}Cr 或其他染料的释放, 所以用 FITC anaexin V 可标记凋亡的靶细胞; PI 可标记坏死细胞。该法的具体操作为: 首先用 PKH-26 标记靶细胞, 将效应细胞与靶细胞在体外共同孵育 3h 后, 再用 FITC anaexin V 和 PI 共同标记以区分活细胞、凋亡细胞和坏死细胞, 用流式细胞仪进行定量此三类不同的细胞群, 即可计算出效应细胞杀伤靶细胞百分比率。此法的优点在于: (1) 简单快速、无需预标记; (2) 与 ^{51}Cr 释放法相关性好, 在早期时段更为灵敏, 还可在单细胞水平进行分析, 尤其适用于动力学分析。

1.5 有限稀释法 (Limiting dilution analysis, LDA)

LDA 法是定量分析特异性 CD8^+ T 细胞的一种常用方法 (Sharrock *et al.*, 1990), 是一种是用细胞培养板进行特定细胞群的体外培养的微克隆法, 在测定细胞培养板某一孔的淋巴细胞的 CTLs 活性之前, 需要将 CTLp 在体外培养进行增殖。其具体操作为: 将过量的 APC、相应的抗原和生长因子加入微孔中, 同时加入梯度稀释的 PBMCs 和 CTLs, 共同培养 9-14 天后, 收获 CTLs, 单孔进行细胞杀伤实验。

LDA 法使我们能够详细了解免疫反应动力学和记忆 CTL (memory CTL, mCTL) 细胞亚群的细胞周期 (Matsui *et al.*, 1991; Con *et al.*, 1994)。同时, 此方法还可用来研究 CTLp 和 mCTL 亚群中各种活化标志物的分布情况。但此方法也存在一些缺点: (1) 需要大量的 PBMCs, 每次分析至少需要 50ml; (2) 在 LDA 条件下培养, CTLs 的生长严格依赖培养基的性质, 在体外培养 1-2 周后, CTL 活性测定值变动较大, 造成 T 细胞数量损失, 从而低估了 CTLs 的数量。即便如此, LDA 法仍是我们进行机体免疫反应动力学、研究 mCTL 细胞亚群的持续时间、并且可对 CTLp 和 mCTL 亚群细胞表面的激活物进行研究常用方法。

1.6 MHC/肽四聚体 (MHC/peptide tetramer) 技术

1.6.1 MHC/肽四聚体技术的产生

主要组织相容性抗原是位于细胞表面的糖蛋白, 具有高度多态性, 是抗原递呈分子, 在免疫应答中起着关键的作用。抗原特异性 CTLs 所能识别的抗原, 主要是来源于内源性蛋白并结合于 MHC 类分子的肽段。MHC 类分子是由具有高度多态性的重链及保守的轻链即 $\beta 2$ 微球蛋白 ($\beta 2\text{m}$) 组成的异源二聚体 (Yewdell *et al.* 1989), 在所有的有核细胞中表达。通常与 MHC 类分子结合的抗原短肽在 APC 内合成 (内源性抗原), 在细胞的内质网中结合于由 MHC 类分子重链的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 功能区构成的肽结合槽内, 随后由于 $\beta 2\text{m}$ 与该重链的非共价结合而使这一 MHC 类分子

-肽复合物更加稳定,最终定位于细胞表面,通过与 $CD8^+$ 抗原特异性的CTLs表面的 $\alpha\beta$ 型T细胞受体(TCR)相互作用使CTL被激活,进而杀伤感染细胞。80年代以来已有许多学者应用可溶性MHC类分子来研究T淋巴细胞反应,但是结果并不理想。其原因是单价MHC-肽复合物(MHC-peptide complex)与TCR结合的亲和性较低($10^{-5}\mu M$),且解离快,形成的复合物半衰期不到1分钟(Corr *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1992),由于刚刚与特异性CTLs表面的TCR结合的MHC-肽复合物迅速解离,导致检测的阳性率很低,难以得到真实的结果。后来,有学者(Appay and Rowland-Jones, 2002)将MHC α 胞外区和 $\beta 2m$ 与Ig重链嵌合体外表达,将MHC/Ig纯化后与抗原特异性多肽共孵育形成多肽-MHC复合物,然后与荧光或酶分子的抗IgG-Fc连接成二聚体,与抗原特异性T细胞表面TCR结合后借助FACS检测。虽然二聚体延长了复合物半衰期寿命,但结果仍不理想。多价MHC-肽复合物能够同时结合多个TCR,使其解离速度大大减慢,从而提高检测的阳性率。Altman等(1996)基于这一原理发明了可溶性MHC/肽四聚体方法。该方法通过基因工程技术把长度为15个氨基酸的BirA底物肽(BSP)加在人白细胞抗原(HLA)-A2重链的羧基端形成融合蛋白,在体外按一定的比例与 $\beta 2m$ 及特异的抗原短肽共孵育,使其折叠成正确的构象,成为MHC-肽复合物,再经过纯化,把生物素标记在底物肽的赖氨酸残基上,使一个标记荧光素的链霉亲和素与4个生物素标记的MHC-肽复合物结合形成四聚体(如图1所示)。MHC/肽四聚体与抗原特异性CTLs上的TCR结合后,即可以通过灵敏度很高的流式细胞仪(FACS)进行检测。通过检测两种HIV短肽特异性的CTLs,证实这种新方法的检测结果与细胞毒性分析方法的结果一致,其灵敏性远远高于LDA方法。

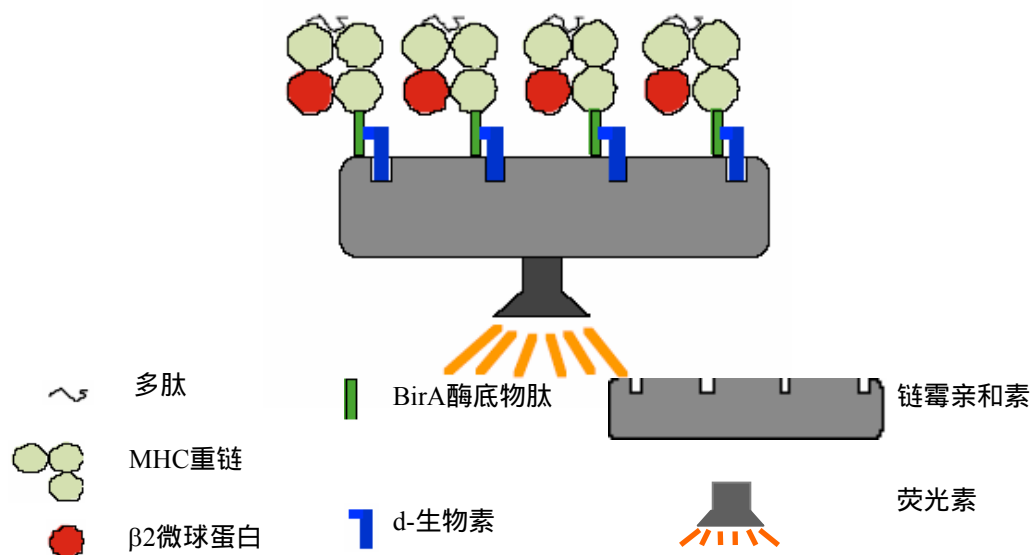


图1 四聚体结构模式图

Fig. 1 Structural pattern of MHC tetramer

1.6.2 MHC/肽四聚体技术的原理及制备过程

四聚体技术通过生物素-亲和素的作用,将四个MHC-肽复合物连成一个四聚体。以MHC I 类分子四聚体的制备为例,四聚体的制备过程如下:首先,选择检测某一特定的抗原特异的T细胞所识别的抗原表位和与该表位结合MHC分子的类型;通过设计特异的引物扩增所选MHC分子的胞外区,并在其COOH端加上15个特异的氨基酸(BirA酶可识别该序列,并将该序列中的赖氨酸进行生物素标记);表达MHC分子融合蛋白,将其与 $\beta 2m$ 和多肽进行体外折叠,形成MHC- $\beta 2m$ -肽复合物,并纯化该复合物;MHC- $\beta 2m$ -肽复合物在BirA酶的作用下,被生物素标记;生物素标记的MHC- $\beta 2m$ -肽复合体与荧光标记(PE或FITC)的亲和素以4:1的比例相混合,即得到荧光标记的四聚体。最先用于制备四聚体的MHC分子是HLA-A2,通过形成A2-Gag和A2-Pol两种四聚体,标记HLA-A2限制的HIV特异的CTL(Altman *et al.*, 1996)。起初,人们将MHC、 $\beta 2m$ 和多肽形成融合蛋白以制备四聚体,每研究一种多肽就需重新设计分子。后来研究者发现,MHC分子在体外也能与多肽结合,形成复合体,这样就大大加强了四聚体的应用。随后多种MHC分子,如HLA-A11、A28、B8、B27、B35、E1、G1、DR、DQ和CD1d分子的四聚体被制备成功,并被用于研究抗原特异的CD4⁺T辅助细胞、CD8⁺T杀伤细胞和NK细胞在多种免疫应答中的作用。

1.6.3 MHC/肽四聚体技术的改进

四聚体的早期构建是将生物素连接在MHC I类分子重链的羧基端,由于MHC分子的多态性,在研究每一种特定类型的MHC I类分子时,都要重新构建载体,使其表达后再纯化复合物,致使该项工作较为复杂。Walter等(1998)改变了策略,构建了一个 $\beta 2$ 微球蛋白的突变体(67位的酪氨酸突变为半胱氨酸),该突变体在体外与MHC分子及短肽形成MHC-肽复合体,并借助于半胱氨酸的巯基与生物素结合,然后一个标记荧光的亲和素与4个标记生物素的MHC-肽复合体结合,与特异的CTLs孵育,用FACS检测结果。由于 $\beta 2$ 微球蛋白是保守亚基,因此只需要构建一次载体即可。这种四聚体适用于多种类型的MHC I类分子,大大减低了检测过程中的工作量。

2000年,Kalergis等(2000)又设计出另外一种制备四聚体的方法,改变以前在MHC分子的COOH端加上15个氨基酸的策略,在MHC分子的COOH端加上一个非配对的半胱氨酸Cys,再以-SH-特异的生物素化试剂,使该Cys生物素化。这样只在MHC分子上引入了一个氨基酸,对MHC分子的结构影响较引入15个氨基酸小,且这种利用化学方法进行标记。这一策略具有良好的特异性、实用性,但仅适用于重链分子内不含非配对Cys的四聚体的制备。

对MHC-肽复合物单体的有效生物素化,是构建四聚体的基础。传统的方法是利用BirA酶在重链胞外区COOH端的BirA酶底物肽的赖氨酸残基上标记生物素。Yang等(2004)在制备HLA-D2四聚体时,同时构建BirA酶的表达载体,然后与HLA-D2表达载体共转染至昆虫表达系统,通过添加外源性生物素,使目的蛋白在体内即可获得生物素化。

1999年,Novak等报道了HLA-DR4-肽四聚体的制备方法,标志着MHC II类分子/肽四聚体技术的诞生(McMichael and Kelleher, 1999)。近年来MHC II类分子-肽四聚体技术逐渐完善,已成功用于抗原特异性CD4⁺T细胞的研究(Mallone and Nepom, 2004)。

1.6.4 MHC/肽四聚体技术的应用

MHC/肽四聚体技术可直接定量抗原特异性T细胞,无须依赖功能分析,无须体外培养扩增,通过流式细胞仪分选可获取高纯度的特异性T细胞克隆。在此基础上,与细胞表面标志分子检测、胞内效应分子荧光染色、功能实验等结合,可对抗原特异性T细胞在细胞免疫应答中的作用进行全面阐释。

1) MHC/肽四聚体技术在肿瘤研究中的作用

MHC/肽四聚体技术可用于检测某种肿瘤特异的抗原能否激发机体的免疫系统产生特异性抗肿瘤细胞的CTL。目前研究最多的是针对黑色素瘤分化抗原Melan-A/MART-1、酪氨酸酶和gp100的特异性细胞。在利用特异的四聚体标染肿瘤浸润的淋巴细胞和肿瘤浸润的淋巴结时发现,在大多数病人中可检测到,甚至高水平(0.25%~12%)的针对Melan-A/MART-1 26-35 肿瘤抗原的CD8⁺ T细胞,而在正常淋巴结中,却检测不出四聚体CD8⁺ T淋巴细胞。在利用Melan-A/MART-1四聚体检测外周血淋巴细胞时,发现正常人群和肿瘤患者的外周血均存在一定的比例的CD8⁺ T淋巴细胞,但它们具有不同的细胞表型:前者细胞表型为CD45RA^{high}CD45RO⁻CD28⁺CCR7⁻,而黑色素瘤患者的细胞表型为CD45RA^{low}CD45RO⁺CD28⁺CCR7⁺。表明四聚体技术的结果可为肿瘤特异的CD8⁺ T细胞研究提供许多借鉴,该技术还被用于研究其他肿瘤相关抗原的应答。由于存在肿瘤特异的CD8⁺ T细胞,因此人们就有希望通过增强这些特异性T细胞的能力,达到治疗肿瘤的目的。Jager等(2002)将四聚体技术与表型分析、TCR CDR3分析和细胞因子检测联合起来,研究了3名黑色素瘤患者在用来源于Melan-A/MART-1的肽免疫后的CD8⁺ T细胞的免疫应答。所用的四聚体分别载有正常存在于Melan-A/MART-1的九肽(AAGIGILTV)和该肽的类似物(ELAGIGILTV)。MHC/肽四聚体可以检测免疫过程中肽特异的CD8⁺ T细胞的变化规律,如再与其他检测指标联合,可对肿瘤肽疫苗的设计和免疫方案的选择提供重要参考。Echchakir等(2002)利用四聚体技术从大细胞肺癌患者的TIL和外周血获得两株针对 α -actinin-4突变体的T细胞克隆,虽然这两株克隆表现出相似程度的四聚体染色情况,但是从外周血获得的T细胞克隆表现出较低的抗原亲和力,杀伤靶细胞的能力也较差。通过TCR基因测序和CDR3大小分析,作者发现高亲和力具有强细胞毒作用的CTL克隆在肿瘤原位得到选择性扩增。这给寻找肿瘤特异的CTL研究者一些启示:TIL来源的CTL比PBL来源的CTL具有更好的抗肿瘤作用,具有更好地用于肿瘤治疗的前景。

2) MHC/肽四聚体技术在自身免疫病研究中的作用

在许多自身免疫病中,对自身反应性T细胞的检测是通过检测细胞因子或抗原刺激后的细胞增殖来实现的。这些依赖于功能的检测,不能反映自身反应性T细胞的真实比例,而MHC/肽四聚体与TCR的结合与细胞的激活状态无关,幼稚的和激活的自身反应性T细胞都能被检测。因此,人们可用MHC/肽四聚体来判断自身反应性T细胞在何时何处与抗原相遇;它们被活化后会迁移至何种器官或组织;分泌何种细胞因子或趋化因子。另外,虽然已有几种方法用于自身免疫病的免疫治疗,如通过删除自身反应性T细胞或诱导它们不对抗原发生应答,或通过口服或鼻内免疫诱导耐受,且也取得了较好的效果,但是治疗机制还知之甚少。利用MHC/肽四聚体来示踪自身反应性T

细胞的去向可使人们更好地了解以上免疫治疗的机制,可能也会使人们得知导致自身免疫病的自身反应性T细胞是如何逃避免疫耐受的。胰岛特异的CD4⁺ T细胞在自身免疫性糖尿病中发挥着关键的作用,因此许多研究者都尝试用MHC/肽四聚体来对这群细胞进行研究。Liu等(2000)将来源于谷氨酸脱羧酶(GAD)的一段小肽共价结合到MHC II类分子上,制备成MHC II类分子的四聚体,发现该四聚体可以对GAD特异的T细胞杂交瘤和来源于GAD免疫NOD鼠的CD4⁺ T细胞进行染色。Tarbell等(2002)发现,GAD65肽段286-300特异的CD4⁺ T细胞不导致糖尿病,对糖尿病的进程起阻碍作用。四聚体技术除了应用于I型糖尿病的研究外,还被用于类风湿性关节炎、莱姆关节炎的研究,以寻找与这些疾病相关的抗原特异的CD4⁺ T细胞和研究这些T细胞在疾病的发生、发展过程中的作用。

3) MHC/肽四聚体技术在抗病毒感染研究中的作用

人们一直想通过免疫的方法来遏制持续的病毒感染,但却苦于没有合适的方法来评价和估计CD8⁺ CTLs在病毒感染中的作用。近年来研究成功的荧光标记的四聚体,可方便地对抗原特异的CTLs进行直接且准确的定量,它与ELISPOT和细胞因子检测等方法相结合,可为研究CD8⁺ CTLs在控制慢病毒和疱疹病毒感染中的作用提供重要手段。

运用四聚体技术,人们发现在慢性HIV-1感染的病人的PBL中,存在很高比例HIV-1特异的CTLs,针对单个表位的CD8⁺ T细胞可占循环CD8⁺ T细胞的1%以上(Altman *et al.*, 1996)。除此之外,人们还发现外周血中HIV-1特异的CD8⁺ T淋巴细胞的比例与血浆中病毒的量成反比。Wilson等(2000)发现急性HIV感染的病人,其外周血中HIV-1特异的CTLs比例明显的高于以前人们的想象,并且与病毒的复制水平成反比。这些都说明CD8⁺ T细胞在抗HIV-1感染中具有重要作用。Callan等(1998)利用四聚体技术对EB病毒感染时EB病毒特异的CTLs进行了定量,发现在急性、感染性单核细胞增多症的外周血中,多达2%~44%的CD8⁺ T淋巴细胞针对EB病毒的某一表位。Reignat等(2002)发现了一群数量很少的CD8⁺ T细胞存在于慢性HBV感染的病人中,它们不是通常的耐受细胞,因为它们在体外可发生增殖,产生抗病毒的细胞因子,裂解靶细胞。它们的特点是细胞表面的TCR不能与对应的四聚体发生反应,且这种现象不是由于TCR表达下调或功能亲和力降低造成的,在受到反复刺激后,它们又能被四聚体标记。Callimore等(1998)在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒的研究中利用四聚体方法发现病毒特异性的CTLs占CD8⁺ T淋巴细胞的70%,其敏感性及其效率远远高于⁵¹Cr释放分析和LDA等方法。Engstrand等(2000)利用HLA-A2/pp65四聚体来研究健康人和肾移植患者感染巨细胞病毒(CMV)后外周血淋巴细胞中的特异性CTLs的数量及其活性,从而评价机体对CMV的免疫应答能力。Lechner等(2000)用四聚体方法分析了急性、慢性HCV感染和愈后患者体内的细胞毒性T淋巴细胞反应,发现慢性HCV感染患者的特异性CTLs的数量比急性HCV感染和已康复患者的数量少,说明了HCV特异性CTLs在治疗疾病过程中的重要性,为慢性HCV感染患者的治疗提供了基本原理。

4) MHC/肽四聚体介导的表位寻找

寻找CD4⁺ T细胞表位,将之用于调控免疫应答,一直是免疫研究人员不懈努力的目标,但这

却是一项非常费力和繁琐的工作。人们设计了许多计算机软件来预测MHC分子可能结合的表位。Novak等(2001)将MHC/肽四聚体技术成功地应用于CD4⁺ T细胞表位的鉴定工作。首先,他们针对Vp16蛋白,合成了60种多肽,这些多肽互相重叠,每个多肽含有20个氨基酸,相邻的两种多肽具有12个氨基酸的重叠。这60种多肽按在Vp16蛋白上的顺序,分为12组,每组为5种多肽形成的混合物。这12组多肽混合物分别与相同的MHC II类分子形成四聚体,然后用这些四聚体对来源于HSV-2阳性,并用Vp16蛋白免疫的个体的PBMC进行染色和流式分析,将阳性组中的多肽分别与MHC分子构建成四聚体,再对相同来源的PBMC进行染色和分析,这样即可快速地得到Vp16蛋白的CD4⁺ T细胞表位。

5) 原位四聚体染色

MHC/肽四聚体技术自从产生后的多年来,主要结合流式细胞术在体外研究免疫细胞。近年来,研究人员开发出一种四聚体应用的新方法——原位四聚体染色,这种方法将四聚体技术与免疫组化相结合,可使研究者清楚地看到存在于组织中抗原特异性CD8⁺ T细胞及与其存在空间关系的完整细胞群。

Haanen等(2000)和Skinner等(2000)首先尝试了该技术,为了便于原位四聚体染色技术顺利进行,他们采用了TCR转基因小鼠(Sha *et al.*, 1998; Hogquist *et al.*, 1994)。所采取的策略是用Extra Avidin-FITC制备MHC I四聚体以及用FITC作为表位放大四聚体信号。将未固定的新鲜组织,用振动切片机将脾脏切成200μm厚的切片。切片置于含0.5μg/mL四聚体、CD8抗体、2%健康羊血清的PBS溶液中4℃孵育过夜,固定之后依次与兔源的抗FITC抗体和结合了Cy3或其他荧光素的羊抗兔抗体孵育,四聚体信号得以放大,在镜下成功地检测到了MHC I和CD8信号。

Haanen等也尝试了另一种MHC四聚体染色抗原特异性CD8⁺ T细胞的方法——直接原位四聚体染色(Haanen *et al.*, 2000)。他们也分别采用了TCR转基因鼠新鲜脾切片和过继转移的抗原特异性T细胞鼠的脾脏(Mamalaki *et al.*, 1993; Toes *et al.*, 1996),同时用异藻蓝素标记的MHC I四聚体直接染色,抗原特异性T细胞检测到了很强的信号,定量组织中的四聚体染色阳性的细胞,经与流式细胞术计量获得数量相比,两者的结果无差异。也同样说明原位四聚体染色方法的敏感性和特异性均等同于流式细胞术。

6) 其他

MHC/肽四聚体技术的原理还被用于检测不同MHC分子与不同Ly49分子的结合。Michaelsson等(2000)制备了3种MHC I类分子的四聚体,即H-2D^d、H-2K^b、H-2D^b,用以检测不同MHC I类分子与不同Ly49分子结合的能力。结果发现,非糖基化的H-2D^d和H-2D^b可与Ly49A结合, Ly49C与H2-K^b和H2-D^b的结合也不需要糖基化,说明碳水化合物并非Ly49受体识别所必需;在H2-K^b与Ly49分子结合的过程中,肽可能起调控作用;还发现以前没有报道的MHC I/Ly49的相互作用组合。这说明用四聚体技术可使人们更全面、更细致地了解MHC分子与其受体的相互作用。Maile等(2001)将四聚体注射到体内,调控免疫应答。Robert等(2000)通过抗肿瘤细胞的抗体将四聚体固定在肿瘤细胞表面,引起特异性T细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤。

1.6.5 MHC/肽四聚体技术的在兽医学相关研究中的现状

自MHC/肽四聚体技术出现以来,在人MHC(即人白细胞抗原,HLA)、鼠MHC(即H-2)以及猿猴MHC等方面都已得到了深入的研究和广泛的应用。然而在兽医学相关研究领域方面起步较晚、发展也较为缓慢。Mealey等(2005)成功构建了马传染性贫血病毒(EIAV)7-6/Gag-GW12和7-6/Env-RW12的MHC I/肽四聚体,并用以分析了两匹EIAV感染马的7-6/Gag-GW12和7-6/Env-RW12特异性CTLs反应。在EIAV感染后14天,从未刺激的外周血单核细胞中检测到了Gag-GW12和Env-RW12四聚体阳性的CD8⁺ T细胞,在感染后127天的研究中,其四聚体阳性细胞的频数在0.4%-6.7%之间。这些结果表明它们所构建的MHC四聚体可用于鉴定马感染过程中的CTLs效应并对其定量。在猪的MHC方面,Oleksiewicz等(2002)克隆了两种单倍型(H4和H7)猪MHC I(SLA)重链胞外区,通过富甘氨酸连接子与猪 β 2微球蛋白连接起来,在大肠杆菌中高效表达,然后体外折叠复性。同时,他们还构建了同时表达SLA重链、轻链以及猪瘟病毒多聚蛋白T细胞表位的重组载体,在大肠杆菌中表达后体外折叠复性,然后采用抗SLA的单克隆抗体PT85A鉴别出在SLA肽结合槽内是否含有T细胞表位肽。SLA的相关工作也仅限于此,并未完全构建出其四聚体。

然而,迄今为止,还未有鸡MHC I类分子(BF)四聚体技术的相关报道和应用。因而,本文拟构建BF2四聚体,以为评价鸡在病毒感染及免疫过程中的T细胞免疫提供有力的依据。

2 传染性支气管炎病毒的免疫学相关研究

鸡传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus, IBV)引起鸡急性高度接触性传染病,发病症状主要表现为气管罗音、咳嗽、喷嚏和流涕,在雏鸡症状尤为严重(Shalk and Hawn, 1931; Alexander *et al.*, 1978; Hofstad, 1984)。IBV的感染影响鸡的产蛋量并能导致畸形蛋(Crinion and Hofstad, 1972),某些毒株能引起肾炎或肠道疾病(Lucio and Fabricant, 1990)。可以采用疫苗控制IBV的感染,但通常情况下效果并不明显,并导致IBV长期残留在商业鸡群中。

2.1 IBV病毒结构

IBV属尼多目(Nidovirales),冠状病毒科(Coronaviridae)、冠状病毒属(Coronavirus)抗原三群成员,和它同属一群的病毒还有火鸡冠状病毒(Turkey enteric coronavirus, TCoV)(Shalk and Hawn, 1931; Collisson *et al.*, 1992; Cavanagh, 1997)。该病毒含有四种结构蛋白、从宿主细胞获得的脂双层囊膜以及单股正链RNA(Lomniczi, 1977; Schochetman *et al.*, 1977; Liu and Inglis, 1991; Collisson *et al.*, 1992)。其中,纤突蛋白(S)、膜蛋白(M)和小膜蛋白(E)三种结构蛋白与囊膜有关,核蛋白(N)与病毒粒子内27.6 kb的基因关系密切(图2)。M蛋白的氨基末端位于病毒粒子的外部,是一种糖蛋白,而M蛋白的主体部分在囊膜上经过三次跨膜。小膜蛋白被埋在囊膜内。S蛋白含1145个氨基酸残基,翻译后裂解为外部S1和与膜结合的S2蛋白(Binns *et al.*, 1985; Collisson *et al.*, 1992)。许多中和表位和细胞吸附因子位于S1部分(Niesters *et al.*, 1987; Cavanagh *et al.*, 1988; Lenstra *et al.*, 1989; Ignjatovic and Galli, 1994)。传统疫苗的开发及其特点主要是针对诱导产生病毒中和抗体而设计,因此,主要针对S蛋白,特别是其S1部分。N蛋白是病毒粒子内最为丰富的结

构蛋白，与病毒RNA结合在一起形成核衣壳（Collisson *et al.*, 1992）。

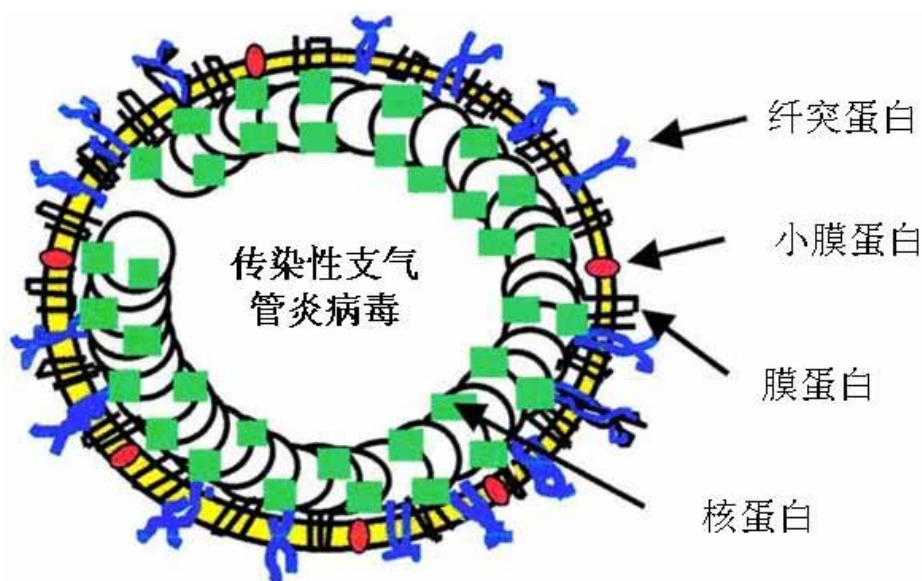


图 2 传染性支气管炎病毒结构模式图
Fig. 2 Structural pattern of IBV

2.2 IBV的体液免疫

体液免疫在鸡抗IBV感染中发挥重要的作用。IBV活病毒感染或灭活IBV免疫都可诱导试验鸡体内产生中和抗体、血凝抑制抗体和ELISA抗体（陈建飞, 2005）。IgG是体液含量最多的免疫球蛋白，在抗击全身性病毒感染中起主要作用，感染后4d就可在血清中检测到抗IBV的特异性IgG，第21d抗体效价达到最高水平，并可持续；而IgM在感染后血清中出现的时间较短，8d内出现一个特异性的效价高峰，之后开始下降。

同其他病原感染一样，母源抗体也能为雏鸡提供一定的保护力。研究发现具有较高母源抗体水平的1日龄鸡可得到较好的保护，保护率高于95%；随着日龄的增大，保护率逐渐降低，到7日龄时则低于30%。这种保护与气管局部的抗体水平有关而与血清抗体水平无关（Mondal and Naqi, 2001）。

2.3 IBV诱导的细胞免疫

鸡对IBV保护性免疫力与抗体反应之间没有直接关系，因而推测细胞免疫参与抗IBV感染的保护性免疫。试验证明IBV感染确实能够诱发特异性细胞免疫。来自IBV感染鸡的外周血淋巴细胞（peripheral blood lymphocytes, PBLs）在与IBV抗原共同培养时，确能发生细胞转化反应。PBLs对IBV抗原的这种增生反应在感染后12d时最强；在感染后30d时，这种增生反应就几乎下降到零（Kotani *et al.*, 2000）。

近年来，通过迟发型超敏反应（delayed type hypersensitivity, DTH）研究进一步发现，N蛋白、S1蛋白甚至S2和M蛋白的亚单位免疫都可诱导产生强烈的DTH反应，这充分证实了细胞介导免疫

(cell mediated immunity, CMI) 在IBV感染后的免疫保护中起着重要作用(Chen and Itakura, 1996), 同时提示这种CMI与某些异源血清型之间存在一定程度的交叉免疫保护有关。用IBV弱毒疫苗点眼接种后, 只有脾脏中的非黏附性白细胞具有这种靶细胞活性, 但如果进一步用野毒株点眼感染, 那么脾细胞的这种细胞毒性T淋巴细胞可持续3周以上, 而且外周血中的非黏附性白细胞也产生靶细胞活性。

近年来, 对N蛋白在介导细胞免疫方面的研究也取得了一定的进展, 进一步说明细胞免疫在鸡抗IBV感染中发挥重要的作用。现已肯定, 小鼠肝炎病毒的N蛋白上存在着T细胞受体识别位点, 被IBV N蛋白致敏的小鼠T淋巴细胞可对同源或异源的IBV刺激产生增殖反应。IBV N蛋白不仅可激活免疫鸡的细胞毒性T淋巴细胞, 而且可以激活体内的T辅助细胞。然而至今, 特异性细胞免疫在抗IBV感染的保护性免疫中究竟起多大作用还不能完全定论。

2.4 IBV诱导的黏膜免疫及其抗感染作用

黏膜免疫是指机体与外界相通的腔道黏膜表面的免疫, 黏膜免疫的基础是机体普遍存在着完整的黏膜免疫系统。当通过点眼接种疫苗时, 哈德氏腺在保护性免疫反应中起重要作用, 如用IBV-H120株点眼6周龄鸡后, 在血清、哈德氏腺浸出液和气管浸出液中的效价可达 10^3 , 这种局部性抗感染作用主要发生在结膜和鼻黏膜。哈德氏腺是重要的免疫器官, 在抗原刺激下产生的免疫球蛋白主要是IgA, 在黏膜局部抗击IBV的侵袭, 但有人认为鸡血清中抗体水平与免疫保护的相关性较差, 而局部抗体水平在IBV的免疫中具有重要作用(Cavanagh, 2003)。有试验证实, IBV疫苗的滴鼻、饮水、喷雾和泄殖腔接种等均能诱导泪液中产生较高水平的IgA, 接种中等剂量以上可使泪液中的IgA水平提高, 点眼、饮水、喷雾和泄殖腔接种都能产生特异性的血清抗体, 但点眼和饮水免疫血清中所产生的IgG水平高于其他接种方式(Tora *et al.*, 1997)。

2.5 IBV N蛋白的免疫学研究

N蛋白是病毒内核衣壳的组成蛋白, 为一种磷酸化蛋白, 由mRNA6编码, 分子量为46kD, 经磷酸化分子量变为50kD, 约含有409个氨基酸, 是唯一完全位于膜内的蛋白, 其组成中大约60%为碱性氨基酸, 其中包括199个组氨酸、42个赖氨酸和3个精氨酸(丁红梅等, 2001)。N蛋白特异性结合到先导RNA片段, 构成病毒的螺旋状核衣壳, N蛋白在病毒的复制、装配、免疫中均起一定作用。N蛋白能免疫识别相关靶位, 在细胞免疫和体液免疫中起作用(Koch *et al.*, 1990)。最近在N蛋白作用的研究中, 发现大肠杆菌表达的N蛋白虽不能直接产生免疫力, 但能提高其后的接种灭活苗的保护率, 而通过质粒表达的N蛋白通过肌肉接种能产生保护性应答(Cavanagh *et al.*, 2003)。但血清抗体水平并不与保护率相对应, 局部的抗体也可在免疫中起到重要的作用。

2.5.1 IBV N蛋白的表位

随着基因工程和杂交瘤技术的发展及应用, 目前对IBV N蛋白上的抗原表位的研究已取得新的进展。Boots等(1991a)发现MHC II (E^0)限制性鼠T细胞杂交瘤可与不同血清型IBV N蛋白发生反应。表明N蛋白上可能存在T细胞的相关抗原表位。此后Boots等(1991b)把基因克隆表达融合N

蛋白片段与含多型MHC的鸡T细胞反应,发现在N蛋白71-78位AA上有一T细胞表位能引起鸡细胞免疫应答。同时发现:在其Tyr70和Trp71间有一组织蛋白酶D切割位点(此酶在抗原递呈中起重要作用);72-78位AA形成能与I-E^d分子结合所必须的motif;71-78位aa两侧序列对T细胞对此表位的识别也有影响,其中Pro70可能影响表位形成,而抑制其与I-E^d有效结合或被T细胞杂交瘤所识别。氨基酸序列比较分析结果表明,在不同IBV株中都有此表位,可能是因为N蛋白比较保守。Seo等(1997)发现了位于C末端120氨基酸之间的另一个T细胞抗原表位,该表位与T细胞特异CTL效应有关。Seah等(2000)将IBV M41株N基因切割为12个片段并在大肠杆菌中表达,用抗Australia T、China Ch5、China T3、Singapore P4和USA M41等株的抗血清与各表达片段反应,在N蛋白上定位了三个线性B细胞抗原表位(175-241、310-370、369-409aa),最近Yu等(2001)发现在嵌合小鼠肝炎病毒N蛋白的306-386aa间存在一特异性抗原表位,该表位可使病毒从大脑中释放并进入血液。推测IBV N蛋白上也可能含有与此组织嗜性相关的抗原表位。对N蛋白上是否还存在着其它抗原表位仍需要进一步的研究,此外,对现有表位的深入研究及相关应用工作有待于展开。

2.5.2 IBV N蛋白的免疫学功能

近年来的研究发现,N蛋白是免疫识别相关靶位,在细胞免疫和体液免疫中起着非常重要的作用(Boots *et al.*,1992; Seo *et al.*, 1997)。N蛋白上存在T细胞抗原识别位点并可介导抗病毒免疫反应。所产生的免疫反应具有交叉性(Ignjatovic and Galli, 1994)。对IBV Gray株的研究发现,病毒在肺脏和肾脏中的动态变化水平与发病雏鸡脾脏中特异性CTL效应相关,表明受CTL限制的MHC可控制早期IBV感染。采用T淋巴细胞转化试验进一步发现,尽管CD4⁺ TCR1 T细胞表型可阻止病毒在体内复制,但保护雏鸡抗IBV急性感染的主要是CD8⁺ TCR2 T细胞表型(Collission *et al.*, 2000)。CTL抗原表位位于N蛋白和S蛋白上,利用编码N蛋白C末端120aa的cDNA重组质粒进行体内接种,即使缺乏中和抗体雏鸡仍可抵抗急性感染(Seo *et al.*, 2000)。Yu等(2001)报道,用表达IBV Ch3株N基因C末端119个氨基酸的重组禽痘病毒免疫接种两周龄SPF鸡,13天后用Ch3、Ch5和H4株分别进行攻毒试验,Ch3、Ch5组未表现出临床症状,而在H4组出现了高比例的致死性感染,同时三个免疫鸡群均监测出了不同水平的ELISA抗体,表明N蛋白介导的CTL效应尽管在部分毒株间存在交叉保护性,但并不能完全介导保护性免疫。

Koch等报道,针对IBV N蛋白的单抗具有病毒中和活性,表明在IBV感染细胞表面可表达N蛋白或其片段(Koch *et al.*, 1990)。Boots等发现含有MHC II (E^d)限制性的CD4⁺鼠T细胞杂交瘤能与不同血清型IBV株N蛋白起特异性反应,能识别N蛋白内的决定簇,暗示N蛋白在对IBV免疫应答中起作用(Boots *et al.*, 1991a),Boots等(1992)研究编码N蛋白重组DNA的免疫原性发现:用表达的融合蛋白首免小鼠和鸡,均能引起对IBV完整病毒粒子的免疫应答,用N蛋白免疫鸡后,能使鸡淋巴结细胞增生和对IBV产生特异性迟发型超敏反应;用N蛋白免疫鸡能增速其产生抗IBV抗体(包括血凝抑制抗体和病毒中和抗体);70%用N蛋白首免、IBV增强免疫的鸡能抵抗IBV对气管的攻击,表明呼吸道局部免疫对抵抗IBV是重要的。这表明N蛋白不仅能激活T细胞,对完整IBV粒子产生免疫应答,同时也能激活T辅助细胞,增强B淋巴细胞产生抗体的能力。

第二章 可生物素化鸡MHC I α (BF2) 及鸡 β 2微球蛋白 (Ch β 2m) 的克隆构建、表达及纯化

主要组织相容性复合体(MHC) I类分子四聚体技术自1996年Altman等首次报道以来,已成为研究特异性CD8⁺ T细胞免疫特性的重要技术 (Altman *et al.*, 1996; Appay and Rowland-Jones, 2002; Hugues *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Wolfl *et al.*, 2004), 被广泛应用于包括SARS-CoV (Wang *et al.*, 2004)在内的病毒性疾病、自身免疫性疾病 (Wolfl *et al.*, 2004)以及肿瘤 (Echchakir *et al.*, 2002)等基础和临床免疫学研究领域。MHC I类分子由一条45kD的重链(α 链)和12kD的轻链(β 链)经非共价键结合而成,其中重链由多个基因位点和多种等位基因所编码,共显性表达,呈高度多态性;成熟的 α 链由 α 1、 α 2、 α 3结构域组成,抗原结合槽位于 α 1和 α 2结构域之间,在抗原递呈过程中起着重要作用;而 β 2m对维持MHC I类分子天然构型的稳定性及其表达起关键作用 (Dohlsten *et al.*, 1993)。

MHC I类分子四聚体是通过生物素-亲和素的作用,将四个MHC-肽复合物连成一个四聚体。首先,设计特异的引物扩增MHC I类分子的胞外区,并在其COOH端加上15个氨基酸的BirA酶底物肽(BSP);表达MHC I类分子融合蛋白,将其与 β 2m和特定病原的特异性T细胞表位肽进行体外折叠,形成MHC- β 2m-肽复合物,并纯化该复合物;MHC- β 2m-肽复合物在BirA酶的作用下被生物素标记;生物素标记的MHC- β 2m-肽复合物与荧光标记(PE或FITC)的亲和素以4:1的比例相混合,即得到荧光标记的四聚体。因此,获取大量纯化的MHC I α 及 β 2m是制备抗原特异性MHC四聚体的必备条件之一 (Altman *et al.*, 1996; Garboczi *et al.*, 1992)。

目前,人MHC (即人白细胞抗原,HLA)、鼠MHC (即H-2)以及猿猴MHC I类分子四聚体技术都已得到广泛深入的研究 (Dunbar *et al.*, 1998; Donahoe *et al.*, 2000; Kalergis *et al.*, 2000; Skinner *et al.*, 2000; Meidenbauer *et al.*, 2003),猪MHC (SLA)、马MHC (ELA)四聚体的相关研究也已起步 (Oleksiewicz *et al.*, 2002; Mealey *et al.*, 2005)。然而迄今为止,还未见到鸡MHC I类分子 (BF) 四聚体技术的相关报道及应用。

为此,我们克隆了纯系SPF莱航鸡BF2及鸡 β 2m (Ch β 2m) 基因,采用相关软件预测了他们的信号肽序列,将表达BF2和Ch β 2m成熟肽的基因分别克隆至原核表达载体。同时,为了便于四聚体的构建,在BF2羧基端融合了一段BSP。该重组表达质粒在大肠杆菌(*E. coli*)中获得了高效表达,所表达融合蛋白以包涵体形式存在,将其超声波破碎离心后沉淀溶于8mol/L脲,建立了简便的BF2-BSP包涵体变性状态下纯化方法,为以基因工程方法制备BF四聚体提供了物质保障。

2.1 材料

2.1.1 实验动物

纯系SPF级莱航鸡 (*Gallus gallus*) 抗凝血由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

2.1.2 感受态菌种和表达载体

大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态菌种DH5 α 、BL21(DE3)菌株、表达载体pET-28a(+)质粒、由本室保存。

2.1.3 主要试剂

6 \times His单抗、His-Bind Resin和Chromatography Column纯化柱购自于Novagen ; DNA分子量标准DL2000、DL15000、pMD18-T载体、限制性内切酶*EcoR* I、*Hind* III、*Xho* I、*Bam*H I、DNA快速连接试剂盒、X-gal、反转录酶AMV、普通耐热DNA聚合酶、长片段耐热DNA聚合酶等均为宝生物工程(大连)有限公司产品; DEPC、TRIzol试剂购自Invitrogen; 质粒小量提取试剂盒与胶回收试剂盒为上海华舜公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗鼠IgG为Sigma产品; 蛋白分子量标准PageRulerTM Protein Ladder为Fragments产品; 氨苄青霉素、卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、尿素等为上海华舜分装Amerosco产品; DAB购自北京中杉公司。

2.1.4 主要仪器

Thermo PX2基因扩增仪。HITACHI CF16RX落地式低温离心机, Eppendorf连接仪, 电热恒温培养箱(上海医用仪表厂 WMZK-01), pH计(BECKMAN 320 PH Meter), 水平电泳槽(北京六一仪器厂), Bio-Rad蛋白电泳仪及转印系统, 电热恒温水浴锅(DK-8D上海精宏实验设备有限公司), JY92-2D超声波破碎仪。

2.2 方法

2.2.1 引物设计

参考GenBank已登录的BF2和Ch β 2m基因序列, 采用OLIGO6.0软件选取其开放阅读框(ORF)两端高度保守区域分别设计克隆引物, 其序列分别如下:

Fa1: 5'-TGC AGC GGT GCG AGG CGA T-3';

Ra1: 5'-TTA TTT CAC AGG AAG CAG TGC-3';

Fb1: 5'-ACA GCG GAG CCA TGG GGAA -3';

Rb1: 5'-ATC CCG GGC ACA GCT CAG A -3'.

待BF2和Ch β 2m的基因序列确定后, 采用SignalP 3.0软件预测该基因信号肽及BF2的跨膜

区序列,同时根据其基因特性结合 pET-28a(+)载体多克隆位点,采用 OLIGO6.0 软件设计去除信号肽及跨膜区序列的特异性表达引物,在各自的上下游引物分别引入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点,同时在 BF2 下游引物序列区引入编码长度为 15 个氨基酸的 BSP DNA 序列,BF2 和 Chβ2m 的上下游引物分别如下:

Fa2 : 5'-GGA ATT CAT GGG GCC GTG CGG GG -3' ;
EcoR I

Ra2-BSP : 5'-GCG CAA GCT TTT AAC GAT GAT TCC ACA CCA TTT TCT GTG CAT CCA
Hind III
 GAA TAT GAT GCA GGA TGG AGG GGT TGC TCC CGG G-3' ;

Fb2 : 5'-GGA ATT CAT GGG GAA GGC GGC GGC-3' ;
EcoR I

Rb2 : 5'-GCG CAA GCT TTT AGA ACT CGG GAT CCC A 3'
Hind III

以上引物均由上海英骏 (Invitrogen) 公司合成。

2.2.2 鸡全血总RNA的提取

取SPF级莱航鸡EDTA-2Na抗凝静脉全血400μL,加入1mL TRIzol混匀,室温静置5分钟;加300μL氯仿剧烈振荡15s,室温静置3min后于12 000 r/min 4℃离心15min;取水相移入新离心管,取等体积异丙醇混匀室温静置10min;12 000r/min 4℃离心10min,弃上清,用500μL 75%乙醇洗涤离心后将沉淀溶于30μL DEPC水,于-80℃保存备用。

2.2.3 RT-PCR扩增BF2和Chβ2m基因及其克隆

分别取10μL总RNA悬液与1μL (20pmol) BF2和Chβ2m基因的下游引物Ra1和Rb1混匀后置于70℃水浴中,作用10min,再依次加入5×反转录酶缓冲液、100mmol/L dNTP 4μL、RNA酶抑制剂1μL(20U)、M-MLV反转录酶1μL (10U),42℃水浴中作用1.5h,转录完毕后,在冰上冷却2min。在PCR管中依次加入10×长片段耐热DNA聚合酶缓冲液10μL、2.5mmol dNTP 4μL、20pmol/μL Fa1、Ra1以及Fb1、Rb1引物各1μL、长片段耐热DNA聚合酶1μL (2.5U),灭菌去离子水补足50μL,在基因扩增仪上扩增。反应条件是95℃预变性5min,94℃1min、62℃1min、72℃1min,35个循环,最后72℃延伸10min。取5μL PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳鉴定扩增结果。

将鉴定正确的样品在琼脂糖凝胶上用胶回收试剂盒切胶回收纯化的目的基因,然后与pMD18-T载体按适当比例混合,加入连接酶I于14℃~16℃水浴中反应1h。取10μL连接液转化至感受态DH5α中,最后与20μL X-gal (50mg/mL) 4μL IPTG(200mmol/L)混匀后涂布于含氨苄青霉素(100μg/mL)的LB平板,37℃培养过夜。挑取白色单菌落扩大培养后用质粒提取试剂盒提取重组质粒,并用PCR初步鉴定,最后将样品送至上海英骏 (Invitrogen) 生物技术有限公司以ABI 377自动DNA测序仪测定所获得的BF2及Chβ2m基因序列。鉴定阳性的重组质粒分别命名为T-BF2和T-Chβ2m。

2.2.4 所扩增BF2基因的进化分析

采用DNASP4、PUAPwin32和Treeview等进化分析软件，将扩增所得的我所SPF鸡BF2基因序列与GenBank中所登录的所有BF2单倍型基因进行进化分析，以确定本实验所用的我所SPF鸡的MHC I的遗传背景。

2.2.5 预测BF2和Ch β 2m基因信号肽

采用丹麦科技大学生物序列分析中心官方网站提供的在线蛋白信号肽预测软件SignalP 3.0对本实验所获得的两段基因BF2和Ch β 2m进行分析，以确定这两段基因是否含有信号肽以及其具体的切割位点等，同时预测BF2跨膜区序列，从而便于后续表达工作的开展。

2.2.6 BF2和Ch β 2m表达载体的亚克隆

采用删除信号肽和跨膜区、并添加BSP序列的BF2-BSP引物Fa2和Ra2以及扩增编码Ch β 2m成熟肽的引物Fb2和Rb2，以携带BF2和Ch β 2m基因全序列的质粒T-BF2和T-Ch β 2m为模板，按2.2.3中所介绍的方法进行PCR扩增编码BF2-BSP和Ch β 2m基因，扩增产物分别经EcoR I和Hind III双酶切后亚克隆至同上酶切处理的pET-28a(+)表达载体、连接后转化DH5 α 感受态细胞、涂布于含卡那霉素抗性的LB平板于37℃培养过夜，挑取单菌落接种于5mL含卡那霉素抗性的液体LB培养基，于37℃空气浴摇床培养过夜，用质粒提取试剂盒提取单菌液质粒，置后采用pET-28a(+)通用引物PCR扩增及Xho I酶切鉴定筛选转化子，将初步判定阳性重组子菌种送至上海英骏（Invitrogen）生物技术有限公司采用pET-28a(+)通用引物以ABI 377自动DNA测序仪测序鉴定。将阳性克隆分别命名为pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m。

2.2.7 pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m在*E. coli*中的表达

以测序鉴定正确的pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m重组质粒分别转化感受态细胞BL21(DE3)，挑取单菌落接种于含卡那霉素（50 μ g/mL）LB液体培养基，37℃振荡培养过夜；然后以1:100的比例接种于含50 μ g/mL卡那霉素的LB培养液，37℃振荡培养至D_{600nm}为0.6时，加入终浓度为0.4mmol/L IPTG于37℃诱导培养4h；离心收集菌体，以50mmol/L Tris-HCl（pH 8.0，含1mmol/L EDTA，50mg/L蛋白酶抑制剂PMSF及10mmol/L DTT）重悬，在冰水浴中采用超声波破碎仪破碎菌体，离心后分别收集上清和沉淀，其中沉淀部分（包涵体）以50mmol/L Tris-HCl（pH8.0，含100mmol/L NaCl，1mmol/L EDTA，1mmol/L DTT及0.5% Triton X-100）重悬离心洗涤3次，然后再以不含Triton X-100的同一缓冲液洗涤3次，得到的包涵体用10mmol/L Tris-HCl（pH7.0，含8mol/L 脲和1mmol/L DTT）溶解，30min后12 000g离心10min，取上清待检。

2.2.8 目的蛋白的鉴定

分别将裂解上清及溶解的包涵体加等量蛋白质电泳上样缓冲液，进行SDS-PAGE，浓缩胶浓度3%，分离胶浓度15%，然后用考马斯亮蓝R-250染色2h，脱色后观察目的条带。同时将另一块SDS-PAGE后的凝胶上的条带转至硝酸纤维滤膜上，膜以封闭液（PBS，pH 7.4，含1%牛血清白蛋白

白和0.05% Tween 20)于37℃振荡封闭2h,加入以封闭液稀释(1:5000)的抗6×His单抗于37℃温育2h,洗膜后加1:5000稀释的HRP-羊抗小鼠IgG于37℃温育1h,洗膜后用DAB显色,之后采用去离子水中止显色反应。

2.2.9 pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m表达条件的优化

优化IPTG诱导浓度:在一2000mL三角瓶中按1%接种剂量将阳性菌种接至400mL含卡那霉素的LB中,将其置于37℃恒温摇床225r/min振荡培养至OD_{600nm}为0.6时,将其分装至125mL三角瓶各20mL,分别向其中加入终浓度0~1.5mmol/L IPTG,继续在37℃恒温摇床培养4h,收菌离心后称量菌体湿重,超声裂解并洗涤后按每克菌体湿重加10mL 8mol/L脲溶解沉淀,沉淀溶解30min后12 000g离心取上清用SDS-PAGE检测表达状况。

优化菌体起始诱导浓度:在一三角瓶中如上法接种阳性菌种,在菌体浓度D_{600nm}每增加0.2时取出20ml菌液至小三角瓶,加入上述最佳诱导浓度的IPTG诱导培养4h,收菌后样品处理方法同上。

优化最佳诱导时间:如上法接种阳性菌,取上述优化IPTG浓度和菌体起始诱导浓度诱导,诱导过程中每隔1h取20mL样品用上述方法处理样品后用于SDS-PAGE检测。

2.2.10 目的蛋白BF2-BSP和Ch β 2m的纯化

分别取1mL Ni²⁺NTA树脂与8mL 8mol/L脲溶解的BF2-BSP和Ch β 2m包涵体上清混合物加入Chromatography Column空纯化柱中,轻柔混匀之后使其自然沉降,弃去上清,用3柱体积结合缓冲液(8mol/L脲;0.5mol/L NaCl;0.02mol/L Tris-HCl;0.005mol/L咪唑;pH7.9)预洗1次,再用3柱体积洗涤缓冲液(8mol/L脲;0.5mol/L NaCl;0.02mol/L Tris-HCl;0.02mol/L咪唑;pH7.9)洗涤2次,最后用3柱体积洗脱液(8mol/L脲;1mol/L咪唑;0.5mol/L NaCl;0.02mol/L Tris-HCl;pH7.9)洗脱2次,收集洗脱液,进行SDS-PAGE分析纯化产物。

2.3 结 果

2.3.1 BF2和Ch β 2m基因的克隆、序列测定及其分析

根据 GenBank 报道的几个不同品系鸡 BF2 和 Ch β 2m 基因序列,在其 ORF 两端保守区设计引物,以 SPF 莱航鸡全血细胞总 RNA 反转录第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,分别得到与预计大小(1035、360bp)相符的 DNA 片段(图 3 Lane 2,6)。目的基因与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 α ,选取白色菌落扩大培养后抽提质粒,经 PCR 初步鉴定为阳性之后经测序显示克隆正确,对这两段基因 ORF 序列分析结果显示:BF2 ORF 的 C+G 含量显著高于 A+T 含量,分别为 65.12%和 34.88%;Ch β 2m ORF 的 C+G 含量也显著高于 A+T 含量,分别为 65.56%和 34.44%。采用丹麦科技大学生物序列分析中心提供的蛋白信号肽在线预测软件 SignalP 3.0 分析,BF2 ORF 的前 63bp 为信号肽序列,C+G 含量高达 84.13%,其编码的 21 个氨基酸中含有 11 个强疏水性氨基酸;Ch β 2m ORF 的前 63bp 亦为信号肽序列,其 C+G 含量为 76.19%。这两段基因的序列已递交 GenBank 并正式公

开，登录号分别为 AY989897 和 AY989898。

本研究克隆所得基因与 GenBank 中登录的其他品系鸡 Chβ2m ORF 同源性高达 100%，而本实验所扩得的 BF2 的基因序列与 GenBank 中登录的相关序列同源性差异较大，采用 DNASP4、PUAPwin32 和 Treeview 等软件将该序列与 GenBank 中所有登录的 BF2 ORF 进行系统发育分析，结果表明，本研究所得到的我所 SPF 白色莱航鸡的 MHC I 的单倍型与 GenBank 中的 B15 处于同一聚类枝（图 4），由此可知我所 SPF 鸡的 MHC I 为 BF2*15。

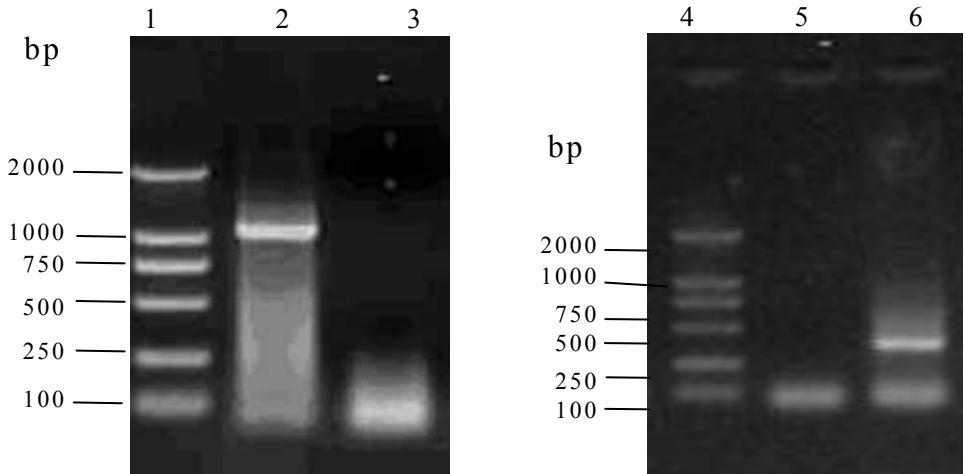


图 3 鸡 MHC I 重链α (BF2)和轻链 Chβ2m 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 Chicken MHC I α (BF2) and Chβ2m gene were amplified from the total RNA of whole blood by RT-PCR.

- 1、4：DNA 分子量标准 DL-2000；
2：BF2 基因 RT-PCR 扩增结果
3、5：水对照
6：Chβ2m 基因 RT-PCR 扩增结果

- Lane 1, 4: DNA Marker;
lane 2: RT-PCR product of BF2 gene;
Lane 3, 5: negative control;
Lane 6: RT-PCR product of Chβ2m gene.

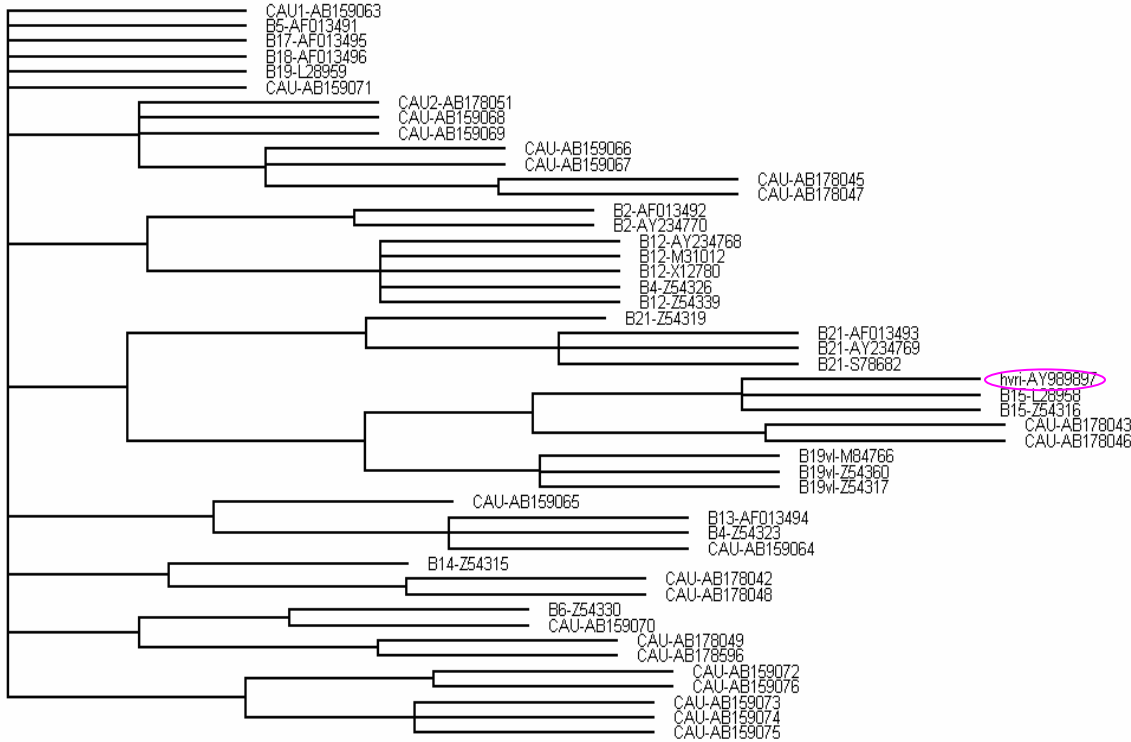


图 4 BF2 开放阅读框系统发育分析结果

Fig. 4 Phylogenetic Trees of BF2 Gene

2.3.2 pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m重组质粒的构建及鉴定

为在 *E. coli* 中表达 BF2-BSP 和 Ch β 2m 成熟肽融合蛋白, 以含 BF2 和 Ch β 2m 全基因的质粒 T-BF2 T-Ch β 2m 为模板, 分别以 Fa2 和 Ra2 以及 Fb2 和 Rb2 为引物, 经 PCR 方法扩增得到了编码 BF2-BSP 和 Ch β 2m 融合蛋白的 DNA 片段(长度分别为 1017bp 和 300bp), 经酶切、连接至 pET-28a(+) 载体, 提取重组质粒后采用 PCR 扩增和 *Xho* I 酶切筛选鉴定连入 BF2-BSP 基因的阳性克隆, PCR 鉴定结果显示目的片段已克隆表达载体 (图5 Lane 3, Lane 6), 重组质粒酶切结果与预期带型相符 (图6 Lane 3, Lane 8), 经序列测定验证插入序列为正确编码 BF2-BSP 和 Ch β 2m 融合蛋白的基因, 且位于载体自带的 6 \times His 编码序列下游, ORF 完整正确。获得的重组表达载体命名为 pET-BF2-BSP 和 pET-Ch β 2m。

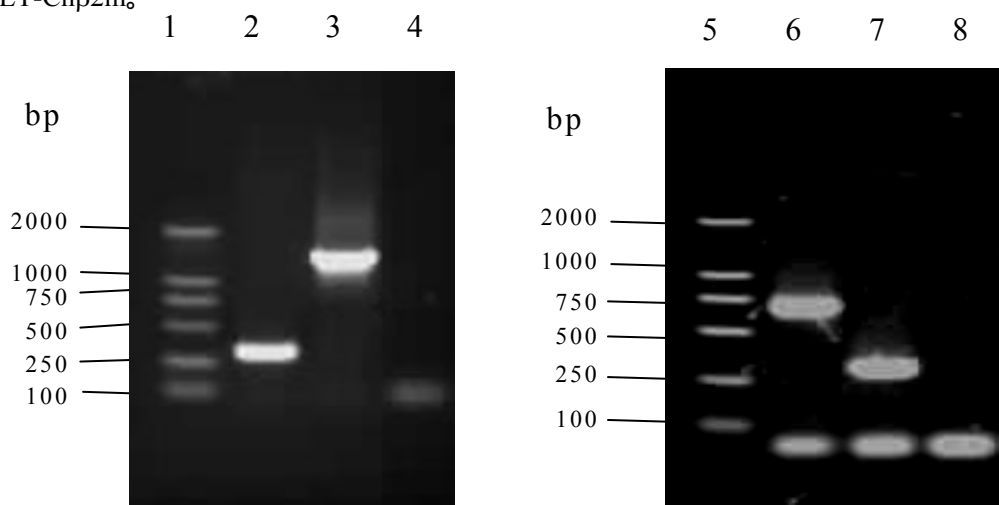


图 5. 重组质粒 pET-BF2-BSP 和 pET-Ch β 2m 的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of the recombinant plasmids pET-BF2-BSP and pET-Ch β 2m by PCR

1、5: DNA 分子量标准 DL2000

2、7: pET-28a(+)通用引物扩增空载体产物

3: 通用引物扩增 pET-BF2-BSP 结果

4、8: 水对照

6: 通用引物扩增 pET-Ch β 2m 结果

Lane 1, 5: DNA Marker;

lane 2, 7: PCR product of pET-28a(+) with universal primers;

lane 3: PCR product of pET-BF2-BSP with universal primers;

lane 4, 8: negative control;

lane 6: PCR product of pET-Ch β 2m.

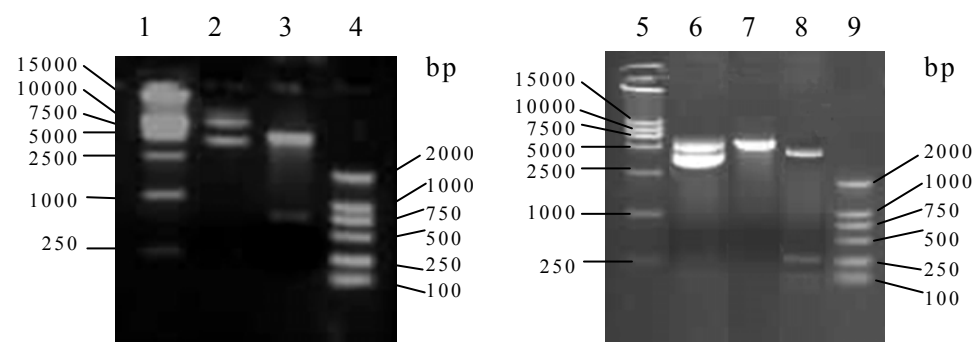


图 6. 重组质粒 pET-BF2-BSP 和 pET-Ch β 2m 酶切鉴定结果

Fig. 6 Identification of the recombinant plasmids pET-BF2-BSP and pET-Ch β 2m by restricted enzyme analysis

1、4、5、9: DNA 分子量标准 DL15000、2000

2: 重组质粒 pET-BF2-BSP

3: 重组质粒 pET-BF2-BSP 经 *Xho* I 酶切结果

6: 重组质粒 pET-Ch β 2m

7: 线性化的重组质粒 pET-Ch β 2m

8: 重组质粒 pET-Ch β 2m 经 *Bam*H I 酶切结果

Lane 1, 4, 5, 9: DNA Marker;

lane 2: recombinant plasmid of pET-BF2-BSP;

lane 3: pET-BF2-BSP digested by *Xho* I;

lane 6: recombinant plasmid of pET-Ch β 2m;

lane 7: lined recombinant plasmid of pET-Ch β 2m;

lane 8: recombinant plasmid of pET-Ch β 2m digested by *Bam*H I

2.3.3 pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m在大肠杆菌中的表达及鉴定

将构建的重组质粒pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m转化至大肠杆菌感受态BL21(DE3)，得到含重组质粒的基因工程菌。经IPTG在37℃诱导4h，菌体经超声波破碎离心后分为上清和沉淀，沉淀溶于8mol/L脲，样品经SDS-PAGE分析，结果表明：分子量约为38kD和15kD的融合蛋白分别得以表达，且大部分重组蛋白以包涵体形式存在于沉淀部分，而转入pET-28a(+)空载体对照的*E. coli*在相同分子量部位的蛋白条带明显较弱（图7 Lane 3, 8）。Western-blot分析显示，含pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m的工程菌表达产物分别在分子量38kD和15kD处的重组蛋白与抗6×His单抗有特异性反应（图8 Lane 3, 6），而阴性对照（即转入pET-28a(+)空载体的同一菌株）在IPTG诱导后，无任何特异性反应条带（图8 Lane 2, 5）；这说明所表达蛋白确为融合了6×His的重组蛋白。

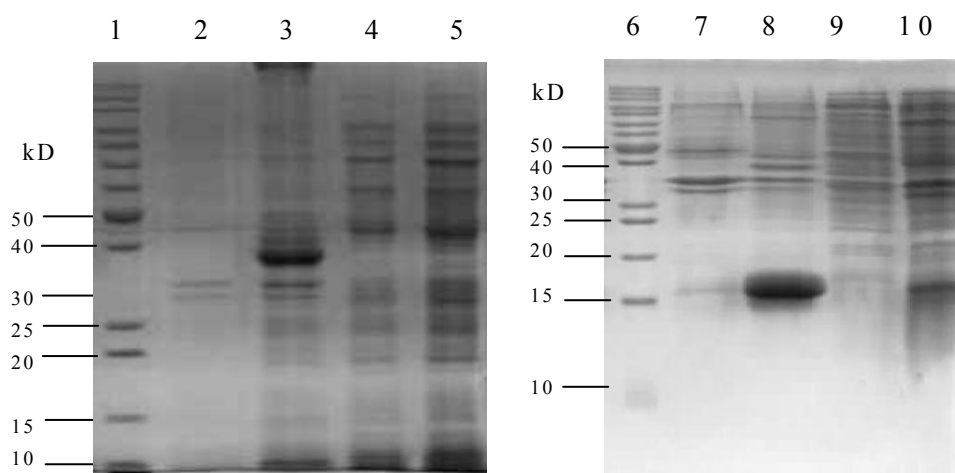


图7. 重组蛋白 BF2-BSP 和 Ch β 2m 的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.7 Recombinant proteins BF2-BSP and Ch β 2m were detected by SDS-PAGE

1、6：蛋白质分子量标准（10-200 kD）

2、7：pET-28a(+)空载体诱导产物

3：重组子 pET-BF2-BSP 诱导表达产物

4、9：pET-28a(+)空载体未诱导产物

5：重组子 pET-BF2-BSP 未诱导产物

8：重组子 pET-C β 2m 诱导表达产物

10：重组子 pET-C β 2m 未诱导产物

Lane 1, 6: Protein molecular ladder (10-200 kD);

lane 2, 7: pET-28a(+) induced;

lane 3: pET-BF2-BSP induced;

lane 4, 9: pET-28a(+) uninduced;

lane 5: pET-BF2-BSP uninduced;

lane 8: pET-C β 2m induced;

lane 10: pET-C β 2m uninduced.

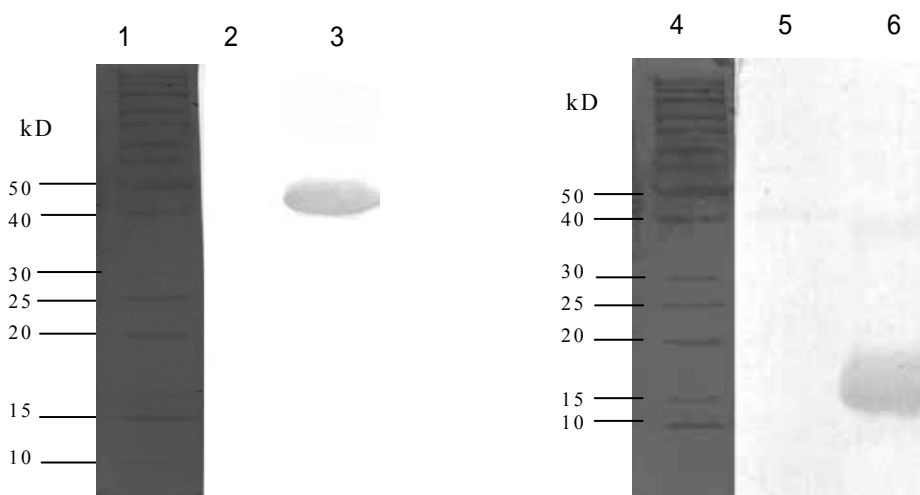
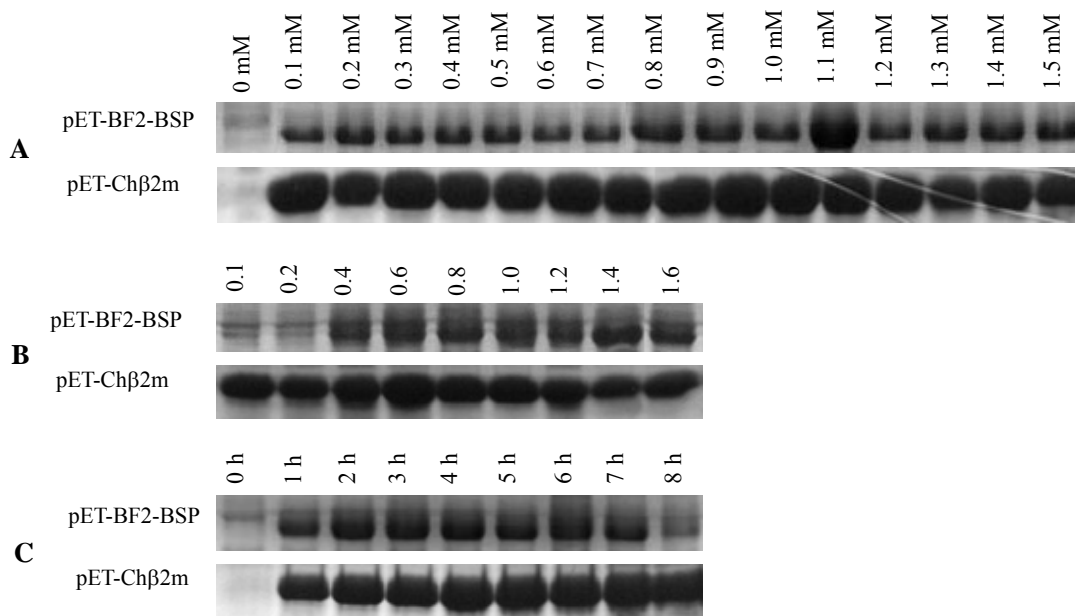


图 8. 重组蛋白 BF2-BSP 和 Ch β 2m 的 Western-blot 鉴定结果Fig.8 Identification of recombinant BF2-BSP and Ch β 2m by Western-blot

- | | |
|--|--|
| 1、4：蛋白质分子量标准（10-200 kD） | Lane 1, 4: protein Marker (10-200 kD); |
| 2、5：pET-28a(+)空载体对照 | lane 2, 5: pET-28a(+) Control; |
| 3：重组蛋白 BF2-BSP 的 Western-blot 鉴定结果 | lane 3: recombinant BF2-BSP; |
| 6：重组蛋白 Ch β 2m 的 Western-blot 鉴定结果 | lane 6: recombinant Ch β 2m. |

2.3.4 表达条件的优化

将含有pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m重组质粒的阳性菌种[BL21(DE3)]分别接种至含50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基，在菌体OD_{600nm}为0.6时分别加入0~1.5mmol/L IPTG诱导4小时，表达产物的SDS-PAGE结果显示：在培养液中极低的IPTG浓度时就能诱导重组质粒pET-BF2-BSP的表达融合蛋白，其表达量与IPTG浓度并不呈线性关系，并且IPTG浓度为1.1 mmol/L时表达量最高（图9，A）；而pET-Ch β 2m受IPTG诱导浓度的影响较小，各诱导浓度均能诱导pET-Ch β 2m高效表达目的蛋白（图9，A）。最佳菌体起始诱导浓度的优化结果表明：菌体浓度OD_{600nm}为0.2和0.4时，pET-BF2-BSP表达目的蛋白的量极低，当菌体浓度OD_{600nm}在0.8到1.2之间时表达效果最佳（图9，B）；而pET-Ch β 2m在各菌体浓度下均能高效表达目标蛋白，但在OD_{600nm}为0.6时表达量最高（图9，B）。从最佳诱导时间的SDS-PAGE分析结果可以看出，随着诱导时间的推移，目的蛋白表达量先呈上升趋势而后随之下降，其中在IPTG诱导2-4h之间时表达量最高（图9 C）；pET-Ch β 2m的表达随诱导时间的推移略呈上升趋势，且在诱导后5h表达量最高（图9 C）。综上所述，pET-BF2-BSP在大肠杆菌BL21(DE3)中优化的表达条件是：1.1 mmol/L IPTG，菌体浓度OD_{600nm}在0.8-1.2，诱导时间为2-4h；而pET-Ch β 2m最优表达条件分别为0.3 mmol/L IPTG，菌体浓度OD_{600nm}在0.6，诱导时间为5h。

图 9. pET-BF2-BSP 和 pET-Ch β 2m 表达条件的优化结果Fig. 9 Optimize the expression condition of pET-BF2-BSP and pET-Ch β 2m

- | | |
|--|--|
| A：不同 IPTG 诱导浓度（0 到 1.5mM） | A: different IPTG concentration from 0 to 1.5mM; |
| B：不同的菌体浓度(OD _{600nm} 从 0.1 到 1.6) | B: different concentration of <i>E. coli</i> at OD ₆₀₀ from 0.1 to 1.6; |
| C：不同的诱导时间（1-8h） | C: different induced time from 1 to 8 hours. |

2.3.5 融合蛋白BF2-BSP和Ch β 2m的纯化

优化条件后大量表达的菌体经超声波裂解且洗涤后获得了纯度较高的BF2-BSP和Ch β 2m包涵体(图10, Lane 2, 6), 溶解在8mol/L脲的包涵体经与Ni²⁺NTA树脂结合后杂蛋白基本被除去(图10, Lane 7), 并获得了纯度极高的目标蛋白(图10, Lane 3, 8), 且纯化后的目的蛋白大小正确、纯度高、损失较少。由此可见本实验建立的变性条件下包涵体纯化方法高效、简便易行。

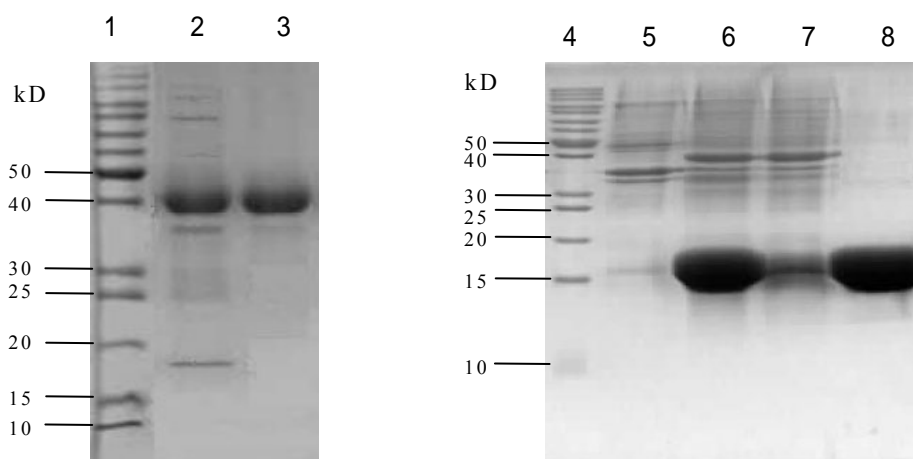


图10. 重组蛋白BF2-BSP和Ch β 2m的纯化结果

Fig.10 Purification of recombinant BF2-BSP and Ch β 2m

1、4: 蛋白分子量标准 (10-200kD)

2: 未纯化重组蛋白BF2-BSP

3: 纯化后的重组蛋白BF2-BSP

5: 空载体pET-28a (+)表达结果

6: 未纯化的重组蛋白Ch β 2m

7: 纯化过程中的洗涤液

8: 纯化后洗脱的目标蛋白Ch β 2m

Lane 1, 4: protein marker (10-200kD);

lane 2: unpurified recombinant BF2-BSP;

lane 3: purified recombinant BF2-BSP protein;

lane 5: pET-28a (+) vector expressed in BL21 (DE3);

lane 6: recombinant Ch β 2m expressed in BL21 (DE3);

lane 7: target protein was removed from the sample;

lane 8: target protein eluted from His-Binding Resin.

2.4 讨论

MHC分子的结构与功能是近年来的免疫学界研究热点之一。MHC I递呈被CTL识别的抗原肽, 在诱导机体产生抑制病毒增殖、控制肿瘤生长的细胞免疫反应过程中起关键作用。如何准确评价细胞免疫特别是特异性CTL反应一直是困扰免疫学家们的难题。1996年Altman等(Altman *et al.*, 1996)建立了MHC四聚体技术, 他将MHC Ⅰ类分子、抗原肽和荧光染料标记联接蛋白组成的单体物通过亲和素链成为四聚体复合物来定量检测HIV特异性CTL, 获得了理想的结果。

β 2m是组成MHC Ⅰ类分子复合体的轻链分子, 对于MHC Ⅰ类分子在细胞表面稳定表达和有效递呈抗原肽必不可少 (Kozlowski *et al.*, 1991; Otten *et al.*, 1992), 并且 β 2m能促进抗原肽与细胞表面MHC Ⅰ类分子的结合 (Shields *et al.*, 1998a; Shields *et al.*, 1998b); 它也是制备MHC I类分子四聚体的必要成分之一 (Altman *et al.*, 1996; Hugues *et al.*, 2002)。

本实验采用了pET-28a(+)高效表达载体, 其表达产物在目的蛋白的氨基端融合了6 \times His标签。根据6 \times His与过渡态金属离子Ni²⁺高亲和力结合的特性, 利用Ni²⁺NTA螯合物树脂可对表达产物直接纯化。Jauknecht等(1991)的研究表明: 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,故无需用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仍不影响其结合。这与Altman等(1996)建立MHC I类分子四聚体技术之初通过离子交换树脂和HPLC进行纯化方法相比大为简单。此外,该标签的引入还有利于采用商品化的His单抗检测融合的目的蛋白。此外,目的蛋白的羧基端融合了一段由15个氨基酸组成的可生物素化序列(Schatz, 1993),所表达重组蛋白可在体外进行生物素化。

钱丽等(2002)在克隆构建人MHC I类分子四聚体时选用了pET-42b(+)表达载体,该载体同样引入了6 \times His标签,然而该标签位于所表达蛋白的羧基端。这将影响羧基端BSP在BirA酶作用下与生物素的结合,从而降低生物素化的效果。若纯化后再采用酶切除6 \times His标签,势必造成操作步骤繁琐,且目标蛋白得率降低。而本实验所采用的pET-28a(+)表达载体成功避免了这一问题。

我们在实验中发现:BF2和Ch β 2m基因的信号肽序列均严重影响该基因在原核表达系统中的表达,含有信号肽序列的外源基因基本不表达(未发表数据),而在去除信号肽序列之后这两段基因在则均能在原核表达系统中高效表达(刘光亮等,2006;刘光亮等,2007)。Tobias等(Tobias *et al.*, 1991)曾报道:在大肠杆菌表达系统中,如果所表达蛋白的氨基端含有Arg、Lys、phe、Leu、Trp和Tyr,其半衰期仅为2min;而氨基端为其它任何氨基酸,其半衰期均在10h以上。序列分析结果表明:BF2基因的信号肽序列G/C含量高达84.13%,在所编码的21个氨基酸中,富含11个强疏水性氨基酸以及5个Leu残基;同样,Ch β 2m的信号肽序列G/C含量也高达76.19%,在所编码的氨基酸中,也富含5个Leu残基。这预示着包含信号肽序列的BF2和Ch β 2m基因在原核表达系统中难以起始表达,即使有表达也将迅速被降解,而去除信号肽可降低其5'端G/C含量,同时也避免了易降解氨基酸的出现,这些都有助于表达的进行(Yuriko *et al.*, 2002),从而能使不含信号肽序列的pET-BF2-BSP和pET-Ch β 2m在大肠杆菌表达系统中能得以高效表达。

对于人MHC I的原核表达,现有的国内外研究均表明人MHC I 重链和 β 2m基因在大肠杆菌表达系统中以包涵体形式存在(Kozlowski *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1992; 钱丽等, 2002; 何闲辉等, 2004)。本实验所表达的BF2-BSP和Ch β 2m在大肠杆菌表达系统中仍以包涵体形式存在。Eliana(1998)指出:重组蛋白以包涵体形式表达具有表达量高、对宿主细胞毒性小、不易被降解且易于纯化等优点。并且复性也较易进行,这对于MHC I类分子四聚体的制备极为有利(Altman *et al.*, 1996; Garboczi *et al.*, 1992)。

为了获得高效表达,以便于构建人MHC I类分子四聚体,Piao等(2004)先后尝试了pET-30a, pET-42b, pET-22b, pET-28b, pBV220, pKKH六种重组原核表达载体来优化表达条件,这极大地增加了克隆构建鉴定及表达过程中工作量。而本实验则以同一表达载体为基础,先后从IPTG诱导浓度、起始诱导菌体浓度和诱导时间等方面因素优化了诱导表达条件,使BF2-BSP和Ch β 2m均得以高效表达。此外,从结果可以看出,Ch β 2m的表达条件较BF2-BSP的更低,且在同一水平下的表达量也比BF2-BSP相应高。这可能是由于Ch β 2m仅为99个氨基酸组成的小分子蛋白,因而易于在大肠杆菌表达系统中表达。这些优化的表达条件在使之获得高效表达的同时节约了制备BF2四聚体所需的材料的成本。

本实验克隆了莱航鸡BF2和Ch β 2m全基因,利用软件分析了其信号肽及跨膜区序列,并构建了分别表达BF2-BSP和Ch β 2m融合蛋白的重组载体,且在*E. coli*中得到表达,并优化了其表达条件。SDS-PAGE分析表明所得目的蛋白与预期大小相符,Wstern-blot分析结果显示该重组蛋白成功融合了6 \times His标签。在此基础上建立了变性状态下纯化包涵体的方法,获得了高纯度的BF2-BSP和Ch β 2m融合蛋白。为以基因工程方法制备BF2四聚体及研究BF的结构与功能提供了重要保障,BF2四聚体技术一旦成功建立,只需置换抗原结合槽中的肽段,就可应用于任何禽类传染病的免疫机制的研究,对禽类免疫学研究意义重大。

第三章 BF2/肽四聚体的构建及其功能检测

MHC I类分子-肽复合物的制备最先由Garboczi等(1992)报道,将人MHC I类分子HLA-A2和 β 2m基因克隆于原核表达载体,在大肠杆菌分别表达并可大量提纯一种可溶性分子,而后将其与HIV-1 gp120包膜蛋白中的九肽以摩尔比1 : 2 : 40 : 4 透析过夜混合(透析法),或与肽共同稀释于200 ml 缓冲液10⁵ 孵育混合(稀释法)。但由于与特异性CTLs表面TCR结合的MHC-肽复合物容易迅速解离,以致难以得到较为真实的结果。后来Altman等(1996)改进了制备工艺,将四个MHC-肽复合物连成一个四聚体,从而可获得理想稳定的结果。

常规的四聚体的制备过程如下:首先,选择检测某一特定的抗原特异的T细胞所识别的抗原表位和与该表位结合MHC分子的类型;通过设计特异的引物扩增所选MHC分子的胞外区,并在其COOH端加上15个特异的氨基酸(BirA酶可识别该序列,并将该序列中的赖氨酸进行生物素标记);表达MHC分子融合蛋白,将其与 β 2m和多肽进行体外折叠,形成MHC- β 2m-肽复合物,并纯化该复合物;MHC- β 2m-肽复合物在BirA 酶的作用下,被生物素标记;生物素标记的MHC- β 2m-肽复合物与荧光标记(PE或FITC)的亲合素以4 : 1 的比例相混合,即得到荧光标记的四聚体。

最先用于制备四聚体的MHC分子是HLA-A2,通过形成A2-Gag和A2-Pol两种四聚体,标记HLA-A2限制的HIV特异的CTLs(Altman *et al.*, 1996)。起初,人们将MHC、 β 2m和多肽形成融合蛋白以制备四聚体,每研究一种多肽就需重新设计分子。后来研究者发现,MHC分子在体外也能与多肽结合,形成复合体,这样就大大加强了四聚体的应用。随后多种MHC分子,如HLA-A11、A28、B8、B27、B35、E1、G1、DR、DQ 和CD1d 分子的四聚体被制备成功,并被用于研究抗原特异的CD4⁺ T辅助细胞、CD8⁺的T杀伤细胞和NK细胞在多种免疫应答中的作用。

随着MHC四聚体技术的应用和发展,人、鼠、猴等相应的四聚体都已得到长足的发展和广泛的应用。MHC四聚体技术在动物的相关研究方面也已起步,近年来该技术已先后在猪和马上得以初步的研究和应用(Oleksiewicz *et al.*, 2002; Mealey *et al.*, 2005),而在禽类尚未见相关的研究报道。本研究在实验一成功制备了SPF莱航鸡MHC I重链和轻链的基础上,又根据文献报道(Boots *et al.*, 1991)鉴定正确的T细胞表位肽合成了IBV核蛋白N₇₁₋₇₈肽段,将其三者按一定比例复性重折叠制备MHC/肽复合物单体,之后进行生物素化,然后与PE标记的链霉亲和素结合成荧光标记的MHC/肽四聚体。

3.1 材料

3.1.1 实验动物

纯系SPF级莱航鸡(*Gallus gallus*)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供,饲养于负压隔离器。

3.1.2 病毒

IBV H52标准毒株由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽病研究室刘胜旺研究员滴定并惠赠。

3.1.3 多肽

IBV N蛋白T细胞表位肽N₇₁₋₇₈ (WRRQARYK) 合成于上海吉尔生化有限公司, 经HPLC纯化至纯度 > 95%。

3.1.4 主要试剂

溶菌酶、DNA酶、氧化型谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽、胃蛋白酶、抑亮蛋白酶肽、DTT、购自于Sigma公司; MgCl₂、叠氮钠、脱氧胆酸钠、Tris.Hcl、蔗糖、Triton X-100、NaCl、脘、L-精氨酸、Na₂EDTA、盐酸胍、PMSF上海生工生物工程公司分装Amersco产品; DMSO为Amersco公司原装产品; BirA酶及配套试剂购自于Avidity公司; PE-链霉亲和素为Zymed公司产品; 鼠抗鸡CD8单抗、FITC-羊抗鼠IgG购自于Southernbiotech公司; FITC-和PE-标记的Beads购自BD公司; BCA蛋白定量试剂盒购自于沈阳华特生生物公司; 淋巴细胞分离液为天津灏洋生物技术有限公司产品。

3.1.5 主要仪器设备

HITACHI CF16RX落地式低温离心机, BECKMAN超速离心机, pH计 (BECKMAN 320 PH Meter), Bio-Rad蛋白电泳仪, 岛津蛋白薄层扫描仪, JY92-2D超声波破碎仪, 蛋白超滤系统 (AMICON A820), 10kD、100kD圆盘滤膜, 10kD、100kD超滤离心管等购于Millipore公司, BD流式细胞仪。

3.2 方法

3.2.1 SPF鸡的接种试验

将出壳后饲养于负压隔离器的SPF鸡在一周龄时采用滴鼻方式接种10^{5.5} EID₅₀ IBV H52标准毒株, 接种后继续饲养于负压隔离器内待用。

3.2.2 包涵体的纯化

取表达BF2-BSP和Chβ2m的原始菌种稀释至1ml LB中, 然后将其加入1L含卡那霉素抗性的LB培养液中, 于37℃摇床振荡培养至OD_{600nm}为0.6时, 按照上一章所优化的表达条件诱导表达, 收菌后离心取沉淀, 将沉淀重悬于13ml solution buffer (50 mM TrisHCl, 25%蔗糖, 1mM NaEDTA, 0.1% NaAzide, 10mM DTT, pH 8.0) 并转至30ml离心管 (体积约15mL), 置于冰上; 之后用超声波裂解仪将其分散混匀, 然后在每管中各加入100μL溶菌酶 (50mg/ml)、250μL DNA酶I (2mg/mL)、50ul MgCl (0.5 M) 储存液, 轻柔混匀; 再加入12.5mL 裂解缓冲液 (lysis buffer), 轻柔混匀; 在室温下孵育至粘滞度下降为止 (一般需要1h), 然后在-80℃冻20 min, 之后于37

水浴解冻30min,之后加入50 μ l MgCl₂储存液,待粘滞度再次降低(约30min)后加入350 μ l Na₂EDTA储存液(0.5 M);之后各步操作均在冰浴或4℃进行,11000g离心20min取沉淀,再将沉淀重悬于10ml含Triton X-100的洗涤缓冲液(50 mM Tris HCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM NaCl, 1 mM NaEDTA, 0.1% NaAzide, 1 mM DTT pH 8.0)中,随后用超声波裂解仪使其分散混匀;重复洗涤一次,最后于4℃ 11000g离心20min,将沉淀用溶于2-4ml 8M脲;再4℃ 35000g离心45min之后将上清分装后冻存于-80℃备用。

3.2.3 BF2-BSP和Ch β 2m的定量

将上述制备好的溶于8M脲的蛋白BF2-BSP和Ch β 2m按照2.2.7所介绍的方法进行SDS-PAGE,然后将所制的蛋白胶采用岛津蛋白薄层扫描仪测定目标蛋白的纯度。同时采用BCA法测定所纯化的BF2-BSP和Ch β 2m包涵体浓度,具体操作为:将BSA溶解于8M脲中,分别制成2000、1750、1500、1250、1000、750、500、250和0 μ g/ml的浓度梯度,检测样品用8M脲稀释10倍;然后将试剂A(1%二喹啉甲酸, 2% Na₂CO₃, 0.16% Na₂C₄H₄O₆, 0.4% NaOH, 0.95% NaHCO₃, pH 11.25)和试剂B(4% CuSO₄)按照50:1混合制备工作液;按照蛋白样品和标准品与工作液1:20的比例混匀后于37℃孵育30min;之后测定OD_{562nm}的吸光度,制作标准曲线,计算检测样品浓度。

3.2.4 BF2/肽复合物的重折叠

计算重折叠所需BF2-BSP和Ch β 2m的量,将其分别封装成3等份(每份约为0.2 μ mol),冻存于-20℃待用;将200mL重折叠缓冲液(100mM Tris.HCl, 400mM L-精氨酸, 2mM NaEDTA, 0.5mM 氧化型谷胱甘肽, 5 mM还原型谷胱甘肽)置于250-300mL烧杯中采用磁力搅拌器搅拌并预冷至10℃;向重折叠缓冲液加入蛋白酶抑制剂:2 ml PMSF(100 mM), 100 μ l 胃蛋白酶抑制剂(2 mg/mL), 100 μ l 抑亮蛋白酶肽(2 mg/mL);将12 mg肽N₇₁₋₇₈溶解于重折叠缓冲液;将BF2-BSP和Ch β 2m样品分别按1:2的比例稀释至盐酸胍溶液(3M盐酸胍, 10mM醋酸钠, 10 mM NaEDTA),将其中一份溶于盐酸胍溶液的Ch β 2m用一个27号针头和一个1mL注射器将其注射至接近转轴中央,以便获得快速高效的稀释;然后采用同样的方法将BF2-BSP稀释至折叠缓冲液;将重折叠体系置于避光处10℃作用8 h,并不断缓慢搅拌;采取同样的方法将第二等份Ch β 2m和BF2-BSP样品稀释至盐酸胍溶液,再按照上述方法注射入重折叠缓冲液,继续避光10℃孵育6-12 h,同时不断缓慢搅拌;最后一等份Ch β 2m和BF2-BSP采用同上方法注射入重折叠缓冲液后继续避光10℃再孵育24 h,并缓慢搅拌溶液。重折叠产物采用非还原型SDS-PAGE检测折叠效果。

3.2.5 重折叠蛋白的浓缩

将重折叠缓冲液转移至离心瓶,于4℃ 2500g离心15 min除去沉淀;小心将上清转移至压力搅拌式超滤浓缩杯(冷藏室、4℃、55 psi),采用氮气提供压力;在10 kD超滤膜上浓缩溶液至体积约为10 mL时,加入90 mL交换缓冲液(20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl);再次浓缩至10 mL时再加入90 mL交换缓冲液;最后浓缩至10mL,采用0.22 μ m的针头滤器除去缓冲液交换过程中产生的沉淀,然后将其用于超滤离心管采用2000g离心浓缩至约700 μ l体积。

3.2.6 BF2/肽单体复合物的纯化

洗涤快速蛋白液相色谱仪 (FPLC) 的上样泵并在FPLC缓冲液 (20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl) 中平衡凝胶柱; 用0.22 μm 的微量滤器过滤样品, 然后上样, 在Superdex 200HR凝胶柱上以0.5 mL/min的流速运行, 采用OD_{280nm}峰收集加定量收集的方式每500 μL 样品收集一管, 将所收集的目标峰蛋白混合后将其用超滤离心管采用2000g离心浓缩至恰好700 μL 体积。

3.2.7 体外生物素化

在700 μL 纯化的BF2/肽单体复合物中分别加入100 μL 溶液A, 100 μL 溶液B, 100 μL d-生物素, 10 μL BirA 酶, 0.5 μL 胃蛋白酶抑制剂 (2 mg/mL), 0.5 μL 抑亮蛋白酶肽 (2 mg/mL); 于室温下孵育过夜进行生物素化。

3.2.8 已生物素化BF2/肽单体复合物的纯化

采用3.2.6中的方法用FPLC进一步纯化已生物素化后的BF2/肽单体复合物, 所收集的生物素化后的BF2/肽单体复合物采用微量超滤离心管 (10 kD) 浓缩至500-1000 μL , 同样采用3.2.2所介绍的BCA法测量蛋白浓度, 采用FPLC缓冲液溶解并稀释标准品。最后于每1000 μL 样品中分别加入0.5 μL 胃蛋白酶抑制剂 (2 mg/mL), 0.5 μL 抑亮蛋白酶肽 (2mg/mL), 1 μL 叠氮钠 (30%), 以及1 μL Na₂EDTA (0.5M)。

3.2.9 确定体外生物素化效率 (链霉亲和素迁移试验)

将生物素化后BF2/肽单体复合物纯化浓缩样品取出两等份10 μL 样品 (A+B), 再取等体积PBS作为第三份样品 (C), 加5 μL PBS至样品A, 分别加5 μL 链霉亲和素 (20 mg/mL)至样品B和C, 将上述样品在10% SDS-PAGE胶上进行非变性非还原型电泳, 采用考马斯亮蓝染色观察蛋白条带。

3.2.10 BF2/肽四聚体的生成及纯化

计算生成四聚体所需的PE-链霉亲和素的总量, 取出总量的一半直接加入生物素化后BF2/肽单体复合物纯化浓缩样品, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2h; 将剩余的一半PE-链霉亲和素分成10等份, 每隔20 min取一份加入反应体系。反应结束后, 将多聚化后的反应产物加至100 kD的超滤离心管中, 2000g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心浓缩至体积小于500 μL ; 再用PBS (pH 8.0) 将样品在离心管中稀释至4 mL, 然后再次离心浓缩至体积小于500 μL ; 用PBS (pH 8.0) 重复四次交换缓冲液; 再次用PBS (pH 8.0) 将体积加至4 mL后, 向体系中加入2 μL 胃蛋白酶抑制剂 (2 mg/mL), 2 μL 抑亮蛋白酶肽 (2mg/mL), 4 μL 叠氮钠 (30%), 以及8 μL NaEDTA (0.5M), 在超滤离心管中浓缩至四聚体浓度约为2-2.5 mg/mL; 然后将纯化后的四聚体分装于离心管中, 加入1mM IBV N₇₁₋₇₈肽段, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

3.2.11 鸡PBMCs的分离

从接种IBV H52株的SPF鸡翅下静脉采取抗凝血3mL; 在15mL离心管中加入3 mL鸡淋巴细胞

分离液（由小鼠淋巴细胞分离液和泛影葡胺按250：8调制而成），将3mL抗凝血缓缓加至淋巴细胞分离液上层；于室温下水平600g离心20min；采用长针头小心吸取中间单核细胞层；将吸出的PBMCs用5mL流式反应液（137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 0.2% NaEDTA, 0.1%NaN₃）重悬洗涤，500g水平离心后弃上清；重复洗涤两次后细胞计数用流式反应液调整至浓度为 2×10^7 个细胞/mL待用。

3.2.12 BF2/肽四聚体的功能检测

取 2×10^6 个PBMC于4℃ 350g离心5min，弃上清；加入20μL用流式反应液按1：100稀释的鼠抗鸡CD8单抗，将细胞重悬，置于4℃ 孵育30min；4℃ 350g离心5min，加入1mL流式反应液重悬细胞，4℃ 350g离心10min，弃上清；再重复洗涤离心一次，弃去上清；加入20μL用流式反应液按1：100稀释的FITC-羊抗鼠IgG，4℃ 孵育30min；按照上述方法洗涤细胞三次，弃去上清；加入20μL用流式反应液按10稀释的PE-BF2/肽四聚体，重悬细胞，于4℃ 孵育30min；洗涤细胞三次后，用500μL流式反应液重悬细胞待用；分别采用FITC-和PE-标记的Beads对流式细胞仪进行荧光补正，然后检测待检样品；采用CELLQuest软件分析并记录流式结果。

3.3 结果

3.3.1 包涵体的纯化及定量

采用上一章所优化的表达条件大量诱导表达 BF2-BSP 和 Chβ2m，经包涵体纯化后溶解于 8M 脲。SDS-PAGE 结果表明，所表达的蛋白条带大小正确，纯度较高（图 11）。PAGE 胶经岛津薄层扫描仪测定分析结果显示，BF2-BSP 的纯度为 89.3%，Chβ2m 的纯度为 85.3%（图 12）。所表达的溶解于 8M 脲的 BF2-BSP 和 Chβ2m 蛋白浓度采用 BCA 试剂盒测定，测定结果经分析计算后可知：BF2-BSP 的浓度为 25.57mg/mL，Chβ2m 的浓度 18.86mg/mL。其浓度和纯度已满足体外重折叠的基本要求。

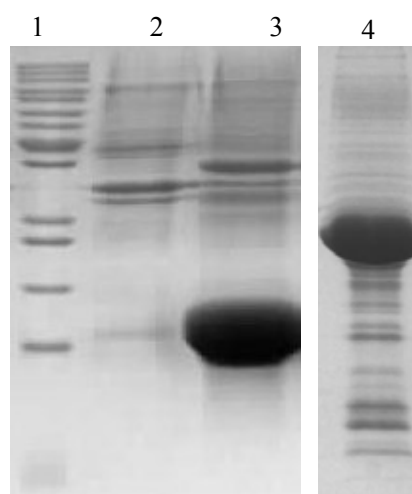


图11. BF2-BSP和Chβ2m包涵体纯化结果

Fig.11 Purification of BF2-BSP and Chβ2m inclusion bodies

1：蛋白分子量标准（10-200kD）

lane 1: protein marker (10-200kD);

2：空载体pET-28a (+)

lane 2: pET-28a (+) vector;

3：纯化后的Chβ2m包涵体

lane3: Purified Chβ2m inclusion body;

4：纯化后的 BF2-BSP 包涵体

lane 4: purified BF2-BSP inclusion body.

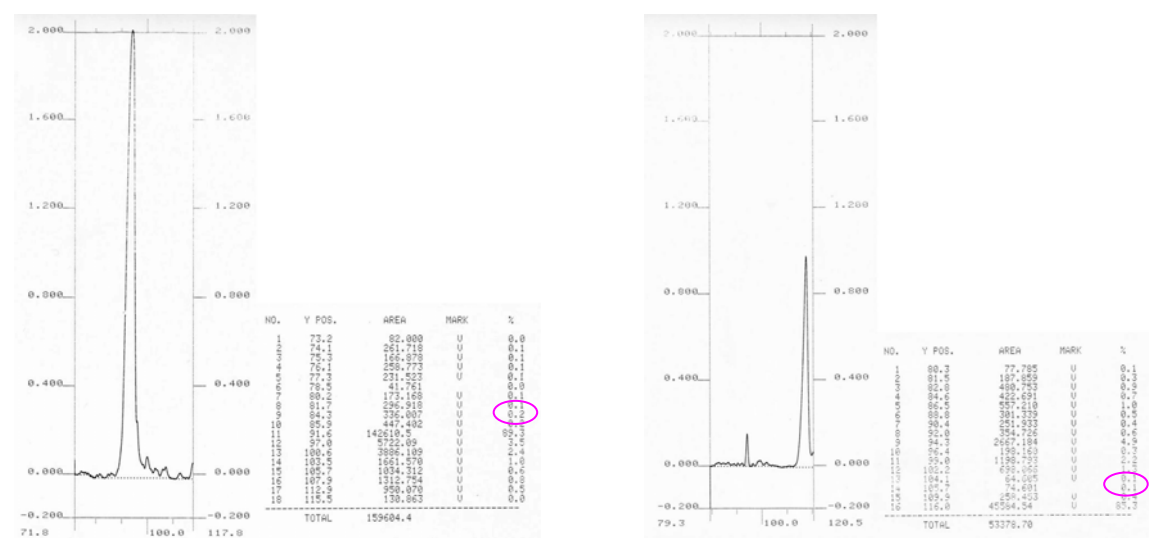


图12 BF2-BSP和Chβ2m蛋白含量薄层扫描结果
Fig 12 The percentage of BF2-BSP and Chβ2m determined by gel scan

3.3.2 BF2/肽复合物的重折叠及纯化

将上述纯化的BF2-BSP和Chβ2m与合成的IBV H52 N₇₁₋₇₈肽段在 10 重折叠缓冲液中折叠 48h，重折叠产物经非还原型SDS-PAGE检测可知BF2/肽单体复合物已成功组装（图 13）。重折叠液浓缩后采用FPLC纯化，由图可以看出，在纯化进行至缓冲液消耗 7-12mL时，BF2/肽单体复合物目标蛋白随过柱液流出（图 14）。收集该峰的蛋白浓缩后进行生物素化，生物素化后的单体复合物进一步采用FPLC纯化，同样得到单一的生物素化的BF2/肽单体复合物（图 15）。

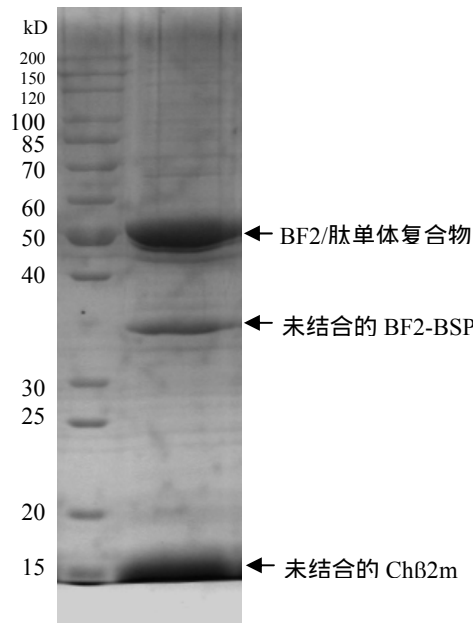


图 13 重折叠产物非还原型 SDS-PAGE 检测结果
Fig. 13 Non-reduced SDS-PAGE of refolded complexes

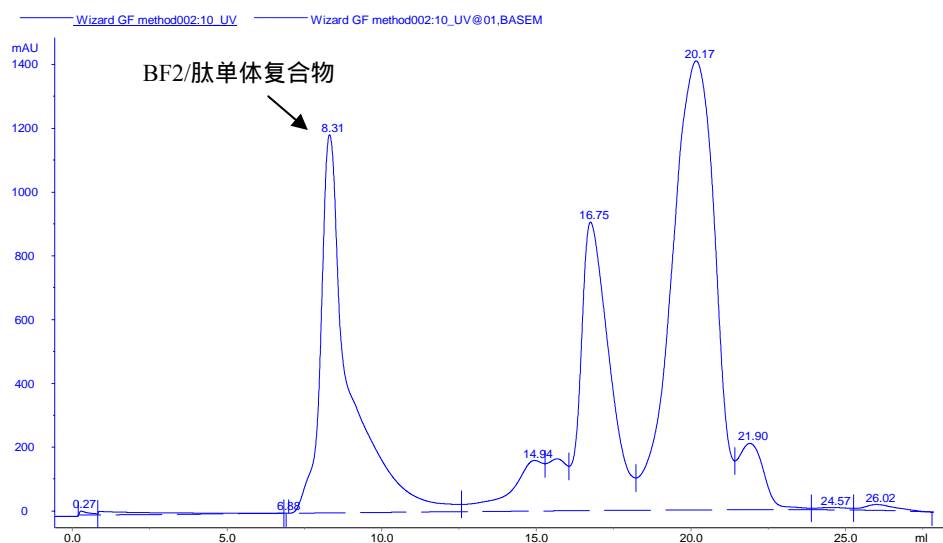


图 14 BF2、Chβ2m 和肽重折叠后 FPLC 纯化产物

Fig. 14 Refolding complexes was purified by FPLC

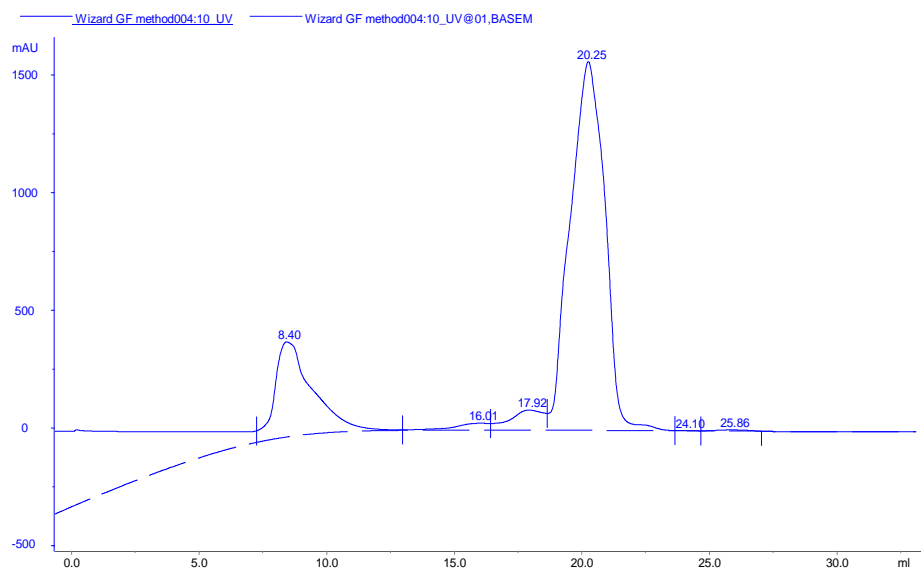


图 15 生物素化 BF2/肽单体复合物经 FPLC 纯化

Fig. 15 Biotinylated BF2 molecules was purified by FPLC

3.3.3 BF2/肽单体复合物生物素化效率的测定及其四聚体的生成

BF2/肽单体复合物生物素化后，采用链霉亲和素迁移实验检测生物素化效率，非还原性 SDS-PAGE结果显示，在远远大于200kD的位置产生一条新生条带，（图16 Lane 3）。说明生物素化后的BF2/肽单体复合物与链霉亲和素发生了结合，生成了四聚体，但链霉亲和素和BF2/肽单体

复合物都有剩余（图16 Lane 3），表明BF2/肽单体复合物的生物素化并不彻底。采用PE-链霉亲和素将BF2/肽单体复合物结合成BF2/肽四聚体后，采用100kD的蛋白浓缩超滤离心管纯化浓缩后，除去了未发生结合的链霉亲和素和BF2/肽单体复合物，从而获得了浓度较高纯度较好的BF2/肽四聚体。

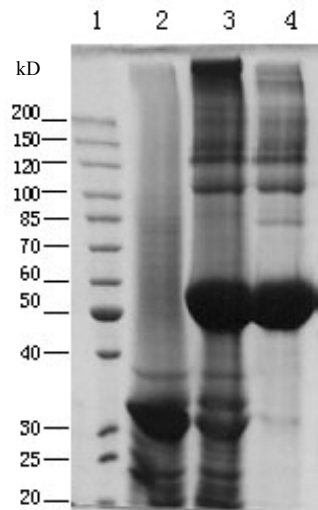


图16 链霉亲和素迁移实验鉴定BF2/肽四聚体的生成
Fig. 16 Streptavidin-shift assay to identify the information of BF2-peptide tetramer

1. 蛋白分子量标准(10-200kD)	Lane 1: protein marker (10-200kD)
2. 生物素化后的BF2/肽复合物	Lane 2: biotinylated MHC molecules
3. 生物素化BF2/肽复合物与PE-链霉亲和素多聚化产物	Lane 3: multimerization of biotinylated BF2 molecules with PE-streptavidin;
4. PE-链霉亲和素	Lane 4: PE-conjugated streptavidin.

3.3.4 BF2/肽四聚体的功能检测

饲养于负压隔离器的SPF鸡接种10d后，采取翅下静脉血分离PBMC，分别于鼠抗鸡CD8单抗、羊抗鼠IgG和本实验所制备BF2四聚体分别作用后，采用流式细胞仪检测，为保证结果的准确性，分别采用FITC-Beads和PE-Beads对流式细胞仪进行双色荧光校正补偿（图17）。从图18的结果看出，在所检测样品的FITC和PE双阳性区域存在相对集中的细胞群，占细胞总数的3.65%（图18 A），而在所检测的对照细胞的双阳性区域仅存在极少量的散在细胞（图18 B）。由此可见，本实验所构建的BF2/肽四聚体能用于检测IBV N抗原特异性CTLs细胞。

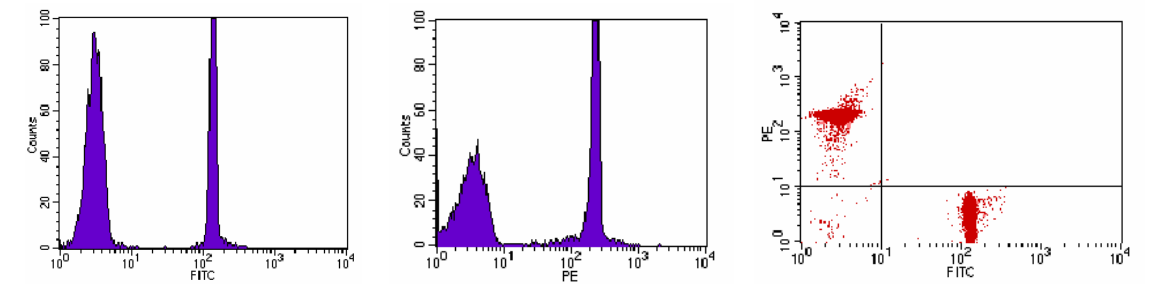


图 17 BD 流式细胞仪双色荧光校正补偿
Fig. 17 Fluorescence compensation of BD flow cytometry

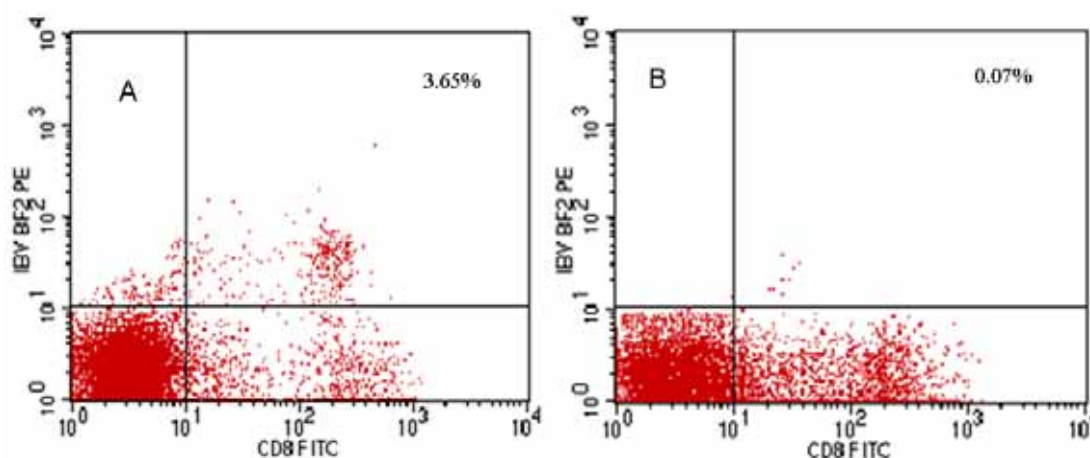


图 18 BF2/肽四聚体的功能检测

Fig. 18 Function test of BF2/peptide tetramer

A. 接种 IBV H52 株鸡的 PBMCs 检测结果

B. 阴性对照鸡的 PBMCs 检测结果

A. PBMCs from infected chicken was measured by FCM with BF2/peptide tetramer

B. PBMCs from negative control chicken was measured by FCM with BF2/peptide tetramer

3.4 讨论

CD8⁺ T细胞能介导机体抵抗病原微生物的初次感染，并能为其提供长期的保护性免疫 (Serbina *et al.*, 2003)，对抗原特异性T细胞进行定量分析可为免疫应答过程的研究提供重要信息 (Owen *et al.*, 1982; Maier *et al.*, 1986; Murali-Krishna *et al.*, 1998)。迄今为止，用于抗原特性T细胞定量及其功能分析的主要方法和技术有⁵¹Cr释放试验、LDA、ELISPOT、ICS和MHC/肽四聚体技术等 (Taswell, 1981; Jung, 1993; Scheibenbogen *et al.*, 1997; Scheibenbogen *et al.*, 2000; Altman *et al.*, 1996)。

⁵¹Cr具有放射性，不利于安全操作及废物处理，同时，⁵¹Cr标记细胞的自发释放率较高。LDA所需的周期较长，一般需要对所研究的T细胞进行至少6-7d的体外培养，然后才能进行杀伤检测 (Taswell, 1981)；众所周知，该方法稳定性欠佳，并不能如实反映出特异性细胞的频率、体外增殖能力以及裂解相应靶细胞的能力 (Rehermann *et al.*, 1996a; Rehermann *et al.*, 1996b)。在ELISPOT实验过程中，有些细胞因子可能因其分泌水平低于检测范围而无法检测，或者因斑点过多而无法准确计数。在ICS过程中，多肽刺激的T细胞通常为死细胞，不能再进行功能试验 (Jung, 1993)。MHC/肽四聚体技术开创了研究抗原特异性T细胞的新时代，并在病毒感染的相关研究方面起着重要作用。

构建MHC/肽四聚体之前需要获得大量的MHC/肽单体复合物，而MHC/肽单体复合物的生成需要大量原核表达的MHC重链和β2微球蛋白，然后在高浓度的体外合成多肽的存在下重折叠而成

(Garboczi *et al.*, 1996a; Garboczi *et al.*, 1996b; Busch *et al.*, 1998a)。本研究获得了大量高纯度的BF2和Ch β 2m, 同时, 为了便于MHC/肽复合物的生成, 去除了BF2的胞内区和跨膜区序列, 并在其C-末端融合了一段生物素化序列(LHHILDAQKMVWNHR), (Altman *et al.*, 1996 ; Busch *et al.*, 1998b), 该序列可在生物素蛋白连接酶BirA作用下进行体外生物素化 (Schatz 1993)。由于链霉亲和素具有四个生物素结合位点, 生物素化后的MHC/肽单体复合物能与链霉亲和素生成MHC/肽四聚体 (Altman *et al.*, 1996 ; Murali-Krishna *et al.*, 1998; Busch *et al.*, 1998a; Busch *et al.*, 1998b ; Busch *et al.*, 1998c; Busch *et al.*, 1999a; Busch *et al.*, 1999b)。该稳定的四聚体结构可以在无需体外增殖的情况下对抗原特异性T细胞进行计数、利用流式细胞仪对其进行表型分析以及对四聚体分选的T细胞克隆进行功能研究 (Altman *et al.*, 1996)。此外, MHC I四聚体技术还可应用于原位四聚体染色, 从而可以清楚地看到组织中的抗原特异性CD8⁺ T细胞及其与其它细胞之间的空间关系 (Haanen *et al.*, 2000; Skinner *et al.*, 2000)。

为了构建可溶性BF2/肽复合物, 重组BF2重链和Ch β 2m在高浓度MHC限制性多肽IBV N₇₁₋₇₈的条件下进行重折叠。所采用的方法借鉴了最初由David Garboczi建立的操作步骤, 即: 将溶解在胍中重组蛋白在特殊的折叠缓冲液(富含L-精氨酸的氧化-还原系统) 中稀释, 该方法效率较高, 得率在10-20% (按加入折叠体系中的重链计算)。在操作过程中, 本研究将David Garboczi的方法中的1L反应体系缩小到200mL, 以便于操作。此外, 我们还增加了BF2-BSP和Ch β 2m的添加量, 这样虽然略微降低了重折叠效率, 然而却大大地提高了200mL反应体系的产量, 但如果进一步提高重链浓度则会大量增加沉淀的形成。一般情况下, 我们可以从一次反应中获得1-2mg MHC/肽单体复合物, 这足以生成约800-1000次直接用于体外流式细胞染色所需的四聚体。如果一次需要大量的MHC/肽复合物, 反应体系则可以成比例放大。在重折叠过程中, 生物素化位点似乎是蛋白酶活性的偏嗜靶标而容易被降解, 因此, 在重折叠反应体系中需要加入蛋白酶抑制剂以保护生物素化位点, 我们在试验中发现, 如果不加入抑制剂经常会导致生物素化活性彻底消失。

在制备四聚体的过程中, 我们也参考了Altman所建立的操作方法 (NIH 四聚体中心, www.niaid.nih.gov/reposit/tetramer/index.html), 但我们没有对折叠反应液进行透析, 而是直接浓缩折叠缓冲液中的BF2/肽单体复合物, 这样可以使过膜液中的大量剩余的多肽用于下一次重折叠。为了降低制备四聚体的成本, 在合成MHC限制性的肽段时Busch等 (1999b) 采用了未经HPLC纯化的粗肽, 合成时冻干分装为12mg每管, 冻存于-80 °C条件下以免发生氧化等修饰过程。在重折叠前可直接溶解于重折叠缓冲液, 用于200mL反应体系。

在对重折叠后的蛋白进行浓缩时, 本试验采用了惰性气体氮气给超滤浓缩装置提供压力, 这样既便于浓缩的进行, 又不致于因影响缓冲液的pH值等而导致重折叠蛋白亚基的解离。此外, 该方法便于操作且可与缓冲液交换相结合, 这对后续的生物素化反应极为重要。或者将透析后的溶液加载至阴离子交换柱纯化之后采用超滤管离心浓缩洗脱液, 而后者的方法操作相对繁琐、且损失较大。

纯化后的BF2/肽单体复合物与生物素蛋白连接酶BirA、d-生物素和ATP共同孵育可以将C-端标记有生物素化位点的MHC重链在体外进行生物素化反应。我们从AVIDITY公司购买了BirA酶,

该公司同时提供了与之配套的d-生物素、ATP等试剂,这使得本实验的操作过程得以简化且可重复效率极高。生物素化后的样品可采用凝胶过滤柱纯化MHC/肽成分,在大约45kD处可检测到单一峰值。凝胶过滤可进一步除去游离的未结合的d-生物素,而它的存在可干扰四聚体的生成。

检测BF2/肽单体复合体外生物素化效率对生成BF2/肽四聚体的产量和质量来说十分重要。对于某些MHC等位基因而言,可利用单抗直接检测生物素化效率。该方法即通过生物素化复合物和含链霉亲和素的琼脂糖微粒先进行第一步沉淀反应,然后再采用结合了抗MHC单抗的琼脂糖微粒进行第二步沉淀反应,最后根据链霉亲和素所沉淀MHC与上清中残留MHC(被抗-MHC单抗沉淀,在蛋白胶上可分辨出来)的比例来确定生物素化效率。另一种确定生物素化程度的方法是链霉亲和素迁移试验。由于该试验比沉淀试验更加快捷且易于操作,且目前还没有BF2*15单抗的相关报道及其商品。因而本试验采用了后一种方法来检测BF2/肽单体复合物的生物素化效率。链霉亲和素迁移试验利用了生物素-链霉亲和素反应的极高亲和性(10^{-14} M),这种亲和性甚至在标准SDS-PAGE条件下仍能使其结构保持稳定(注意:切勿煮沸样品!)。少量样品在过量链霉亲和素的条件下孵育,从而使已生物素化物的BF2/肽单体复合物迅速与链霉亲和素结合,通过SDS-PAGE可检测到较大分子量蛋白的转移,而为生物素化蛋白保持不变。有文献报道,体外生物素化反应的效率应该远远大于90%(Laitinen *et al.*, 2001),然而,必须注意的是,该酶反应的最优条件对pH值、盐离子浓度和d-生物素浓度的改变极为敏感。从链霉亲和素迁移实验结果可知,本试验的BF2/肽单体复合物的生物素化的效率并不高,推测可能是受到pH值、盐离子浓度的影响。

链霉亲和素含有4个生物素结合位点,已生物素化的MHC/肽单体复合物纯化后可与其共同孵育形成四聚体。为了获得高质量的MHC/肽四聚体复合物,我们将链霉亲和素将分成几小份分别加入反应体系,因此,一般情况下,MHC/肽复合物极大地超出了链霉亲和素的浓度,这一点对生成四聚体来说十分重要,因为并不能足以精确计算BF2/肽单体复合物的蛋白浓度及生物素化效率。为了进一步确保MHC/肽单体复合物总是多于可利用的结合生物素化结合位点的数量,在实验中我们将链霉亲和素和BF2/肽单体复合物按照1:5的比例混合而不是1:4,这一做法的结果就是造成多聚化步骤结束之后仍有BF2/肽单体复合物残存。为了除去这些因素给后续试验带来干扰,进一步采取在100 kD超滤膜上洗涤BF2/肽四聚体,同时也可以将缓冲液更换成PBS。

MHC四聚体试剂通常用于流式细胞术及原位四聚体染色,因此需要在链霉亲和素上结合适当的荧光染料(FITC、PE、TR、Alexa568或APE)。在本实验中,我们选用了PE结合的链霉亲和素,因为PE激发的荧光信号强度较高,同时也便于与常用的FITC荧光区别,从而有利于对CD8⁺T细胞进行双染。

MHC/肽四聚体复合物在4℃条件下可稳定保存几个月,然而,某些成分如低亲和力结合肽可能会很快失去活性,在储存缓冲液中额外加入1 mM肽有时会提高长期保存的稳定性。此外,由于所制备的四聚体结合了荧光染料,所以应该对其进行避光保存。

为了进一步检测本实验所制备的BF2/肽四聚体是否能用于检测抗原特异性CD8⁺T细胞,我们根据Seo和Collisson(1997)的报道,用IBV H52株接种了SPF鸡,于接种10d后采血分离其PBMCs

用于检测BF2/肽四聚体是否具有活性。流式细胞术检测结果表明,本实验所制备的BF2/肽四聚体可用于检测IBV N蛋白抗原特异性CTLs,并且在接种后第10天特异性CTLs的比率达3.65%。

由于在IBV N蛋白的特异性T细胞免疫方面还并不全面和完善,仅有个别学者采用⁵¹Cr释放试验研究了其CTLs的比率,而由于存在相关实验条件欠缺及其放射性材料处理问题等,本试验未能与其他检测方法进行平行比较和符合,这是本实验的一大缺憾。然而,本实验所采用的四聚体检测结果与Seo所报道(1997)的结果基本一致。

利用本实验所制备的BF2/肽四聚体可用以评价IBV感染过程中抗原特异性CTLs效应,此外还可用来筛选BF2-限制的禽类病毒的T细胞表位。在重折叠过程中,通过置换BF2肽结合槽中的肽段,所制备的BF2四聚体及可用以评价其它禽类病毒抗原特异性CTL效应。然而,遗憾的是,目前所鉴定成功的BF2限制的T细胞表位肽极少。因此将BF2/肽四聚体技术广泛应用于禽类病毒感染过程中抗原特异性CTLs效应的研究还需要一个漫长的过程。

总之,本试验在大量表达的BF2-BSP、Chβ2m及合成多肽的基础上,成功地重折叠获得了BF2/肽单体复合物;进而在此基础上进行生物素化,而后制备了BF2/肽四聚体。这为研究IBV的抗原特异性T细胞免疫奠定了基础,也为研究IBV感染过程中抗原特异性CTLs的动态变化提供了有力的工具。此外,也为BF2/肽四聚体技术应用于禽类其它病毒性疾病的T细胞免疫及表位筛选等研究工作奠定了基础。

第四章 IBV 免疫过程中血清抗体消长规律和核蛋白抗原特异性 T 细胞动态变化的关系

有学者在研究中发现, 鸡对IBV保护性免疫力与抗体反应之间没有直接关系, 因而推测细胞免疫参与抗IBV感染的保护性免疫, 试验证明IBV感染确实能够诱发特异性细胞免疫。来自IBV感染鸡的PBLs在与IBV抗原共同培养时, 确能发生细胞转化反应。PBLs对IBV抗原的这种增殖反应在感染后12d时最强; 在感染后30d时, 这种增殖反应就几乎下降到零 (Kotani *et al.*, 2000)。

近年来, 通过迟发型超敏反应 (delayed type hypersensitivity, DTH) 研究进一步发现 (Chen and Itakura, 1996), N蛋白、S1蛋白甚至S2和M蛋白的亚单位免疫都可诱导产生强烈的DTH反应, 这充分证实了细胞介导免疫 (cell mediated immunity, CMI) 在IBV感染后的免疫保护中起着重要作用, 同时提示这种CMI与某些异源血清型之间一定程度的交叉免疫保护有关。用IBV弱毒疫苗点眼接种后, 只有脾脏中的非黏附性白细胞具有这种靶细胞活性, 但如果进一步用野毒株点眼感染, 那么脾细胞的这种细胞毒可持续3周以上, 而且外周血中的非黏附性白细胞也产生靶细胞活性。

近年来, 对 N 蛋白在介导细胞免疫方面的研究也取得了一定的进展, 进一步说明细胞免疫在鸡抗 IBV 感染中发挥重要的作用。现已确定, 小鼠肝炎病毒的 N 蛋白上存在着 T 细胞受体识别位点, 被 IBV N 蛋白致敏的小鼠 T 淋巴细胞可对同源或异源的 IBV 刺激产生增殖反应。IBV N 蛋白不仅可激活免疫鸡的 CTLs, 而且可以激活体内的 T 辅助细胞。然而至今, 特异性细胞免疫在抗 IBV 感染的保护性免疫中究竟起多大作用还不能完全定论 (刘思国等, 2001)。

本研究为了探讨 SPF 鸡在感染 IBV 后体内抗体水平及针对核蛋白特异性的 T 淋巴细胞的动态的变化, 将 125 羽 SPF 鸡随机分为三组分别作为免疫组、攻毒对照组和空白对照组。采用 IBV H52 标准毒株对其通过滴鼻方式进行免疫, 之后每 3 天剖杀 5 羽观察各脏器的病理学变化、检测血清抗体效价并采用 BF2/肽四聚体评价其 N 蛋白特异性 T 细胞的比例; 免疫 15d 时采用 IBV M41 对免疫组和攻毒对照组进行攻毒, 同样检测上述指标。最后综合评价在 IBV 免疫及攻毒后血清抗体和 N 蛋白特异性 T 细胞的动态变化趋势及两者之间的相互关系。

4.1 材料

4.1.1 实验动物

纯系SPF级莱航鸡 (Gallus gallus) 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供, 饲养于负压隔离器。

4.1.2 病毒

IBV H52和M41标准毒株由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽病研究室刘胜旺研究员滴定并惠赠。

4.1.3 BF2/肽四聚体

结合IBV核蛋白T细胞表位肽 N_{71-78} (WRRQARYK)的BF2四聚体由本研究室制备,标记PE荧光素,避光保存于4℃。

4.1.4 主要试剂

鼠抗鸡CD8单抗、FITC-羊抗鼠IgG购自于Southernbiotech公司; FITC-和PE-标记的Beads购自BD公司;淋巴细胞分离液为天津灏洋生物技术有限公司产品; IB抗体检测试剂盒为Biocheck B.V.公司产品; 其它化学试剂为分析纯。

4.1.5 主要仪器设备

HITACHI CF16RX落地式低温离心机, pH计 (BECKMAN 320 PH Meter), BD流式细胞仪, Lecia D300F显微镜, Bio-rad 96孔全波长酶标仪。

4.2 方法

4.2.1 SPF鸡的免疫与攻毒试验

将125羽刚出壳SPF鸡随机分为3组(免疫组50羽、攻毒对照组25羽、空白对照组50羽)分别饲养于负压隔离器,在一周龄时采用滴鼻方式对50羽免疫组的SPF鸡免疫接种 $10^{5.5}$ EID₅₀ IBV H52标准毒株,15天后对免疫组和攻毒对照组的鸡用 $10^{5.2}$ EID₅₀ IBV M41标准毒株采取滴鼻方式进行攻毒。

4.2.2 SPF鸡的剖杀

分别于免疫后3、6、9、12、15d剖杀免疫组和空白对照组的鸡各5羽,取0.5mL凝血于37℃放置1h、4℃放置1h分离血清待检血清抗体;同时采集3mL抗凝血分离PBMCs用于流式细胞术分析;此外,观察大体病理学变化并采集肺、肾和法氏囊等组织进行病理学观察。在攻毒后3、6、9、12、15d对免疫组、攻毒对照组和空白对照组的鸡同样进行上述操作。

4.2.3 组织切片的制作及病理学观察

将各组SPF鸡在剖杀时分别取肾、肺、法氏囊组织置于中性福尔马林固定液中固定24h;将固定好的组织修成2×1-1.5cm大小,自来水冲洗24h以除去固定剂中的成分;50%、70%、85%、95%、无水乙醇梯度脱水。脱水后的组织块置于等体积混合的无水乙醇和二甲苯混合液中作用1h,二甲苯透明30min;将透明后的组织块置于等比例混合的二甲苯和软蜡混合液中作用20min,高熔点蜡中作用2h,低熔点蜡包埋。将包埋好的组织块切成4μm,45℃水浴展片,裱于涂有蛋白甘油

的载玻片上, 50℃烘箱内干燥 3-4h。然后进行 HE 染色, 其基本过程简要如下: 二甲苯脱蜡 10min, 无水乙醇、95%、90%、80%、70%、60% 及蒸馏水中分别作用 5min, 然后用苏木素染液 (2g 苏木素、2g $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 、10mL 冰醋酸、100mL 甘油、100mL 无水乙醇、100mL 蒸馏水) 染色 10-15min, 水洗 1-2min, 1% 盐酸酒精脱色 10-30sec, 自来水冲洗 10-30min, 1% 伊红水液染色 1-2min, 水洗 1-2min, 然后分别置于 70%、80%、90%、95%、无水乙醇中脱色脱水 1-2min, 二甲苯中作用 2-5min; 中性树脂封固, 镜检。

4.2.4 血清抗体效价的测定

将各次剖杀时所采集的血清样品按 1:500 的比例稀释到 0.5 mL 样品稀释液中; 从密封袋中取出 IB 包被板, 记录板上的样品位置; 在 A1 和 B1 孔加入 100 μ L 阴性对照; 在 C1 和 D1 孔加入 100 μ L 阳性对照孔; 在相应的孔内加入 100 μ L 稀释的样品。用盖子盖住板, 在室温 (22-27℃) 下孵育 30 分钟; 弃去孔内液体, 用每孔 300 μ L 洗涤缓冲液洗涤 4 次, 弃去洗涤液, 在吸水纸上, 把孔壁内的残余液体扣拍掉; 每孔加入 100 μ L 酶标抗体; 用盖子盖住板, 在室温 (22-27℃) 下孵育 30 分钟; 重复洗涤步骤; 每孔加入 100 μ L 底物试剂, 用盖子盖住板, 在室温 (22-27℃) 下孵育 15 分钟; 每孔加入 100 μ L 终止液, 终止反应; 在酶标仪上以空气为空白读数, 读取并记录对照和样品在 OD_{405nm} 时的吸光光度值。按照 (被检样品平均值-阴性对照平均值) / (阳性对照平均值-阴性对照平均值) 算出 S/P 比值, 然后根据公式 $\text{滴度} = 10^{[(\log_{10} S/P) + 3.62]}$ 算出血清中 IBV 的抗体滴度。在不同时间分别再重复检测两次, 算出三次血清抗体滴度的平均值。

4.2.5 采用 BF2/肽四聚体评价 IBV N 蛋白特异性 T 细胞动态变化

在每次对各组 SPF 鸡进行剖杀时, 采取抗凝血和脾脏用以检测核蛋白特异性 T 细胞比例。抗凝血按照 3.2.11 中所介绍的方法分离 PBMC, 并采用 3.2.12 中所介绍的方法进行流式检测。将脾脏剪碎, 在 200 目铜网上研磨; 然后采用 3mL PBS 重悬研磨后的脾细胞; 然后将其缓慢加至 3mL 鸡淋巴细胞分离液上, 于室温下水平 600g 离心 20min; 采用长针头小心吸取中间淋巴细胞层; 将吸出的脾淋巴细胞用 5mL 流式反应液 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4 , 0.2% NaEDTA, 0.1% NaN_3) 重悬洗涤, 500g 水平离心后弃上清; 重复洗涤两次后细胞计数用流式反应液调整至浓度为 2×10^7 个细胞/mL; 然后采用 3.2.12 中所介绍的方法同样进行流式检测。

4.3 结果

4.3.1 各组 SPF 鸡主要组织器官的病理组织学变化

攻毒后免疫组 SPF 鸡未出现明显的发病症状, 而攻毒对照组的 SPF 鸡均出现了不同程度的发病, 并在攻毒后第 11d 时死亡 3 羽 (此时攻毒对照组共有 10 羽)。于攻毒后各个时间段剖杀时分别取肺、肾、法氏囊制作石蜡切片进行 HE 染色, 然后对其进行病理组织学观察。结果显示, 在肺部, 攻毒对照组 SPF 鸡的支气管粘膜水肿, 气管腔内有粘液渗出, 并混有细胞成分, 肺泡间质扩张, 淋巴细胞浸润 (图 19 A2); 而免疫组和空白对照组 SPF 鸡的肺组织未见明显病变 (图 19 A1, A3)。在肾脏, 攻毒对照组 SPF 鸡的近曲小管上皮细胞弥散性颗粒变性、坏死脱落, 变为嗜酸性

团块、伴有核浓缩，远曲小管管腔严重扩张、上皮细胞脱落（图 19 B2）；但免疫组和空白对照组 SPF 鸡的肾组织未见明显病变（图 19 B1, B3）。在重要的免疫器官法氏囊，攻毒对照组 SPF 鸡的淋巴滤泡坏死、间质水肿增宽，淋巴细胞严重损耗（图 19 C2）；免疫组和空白对照组 SPF 鸡的法氏囊的未见明显的病理组织学变化（图 19 C1, C3）。

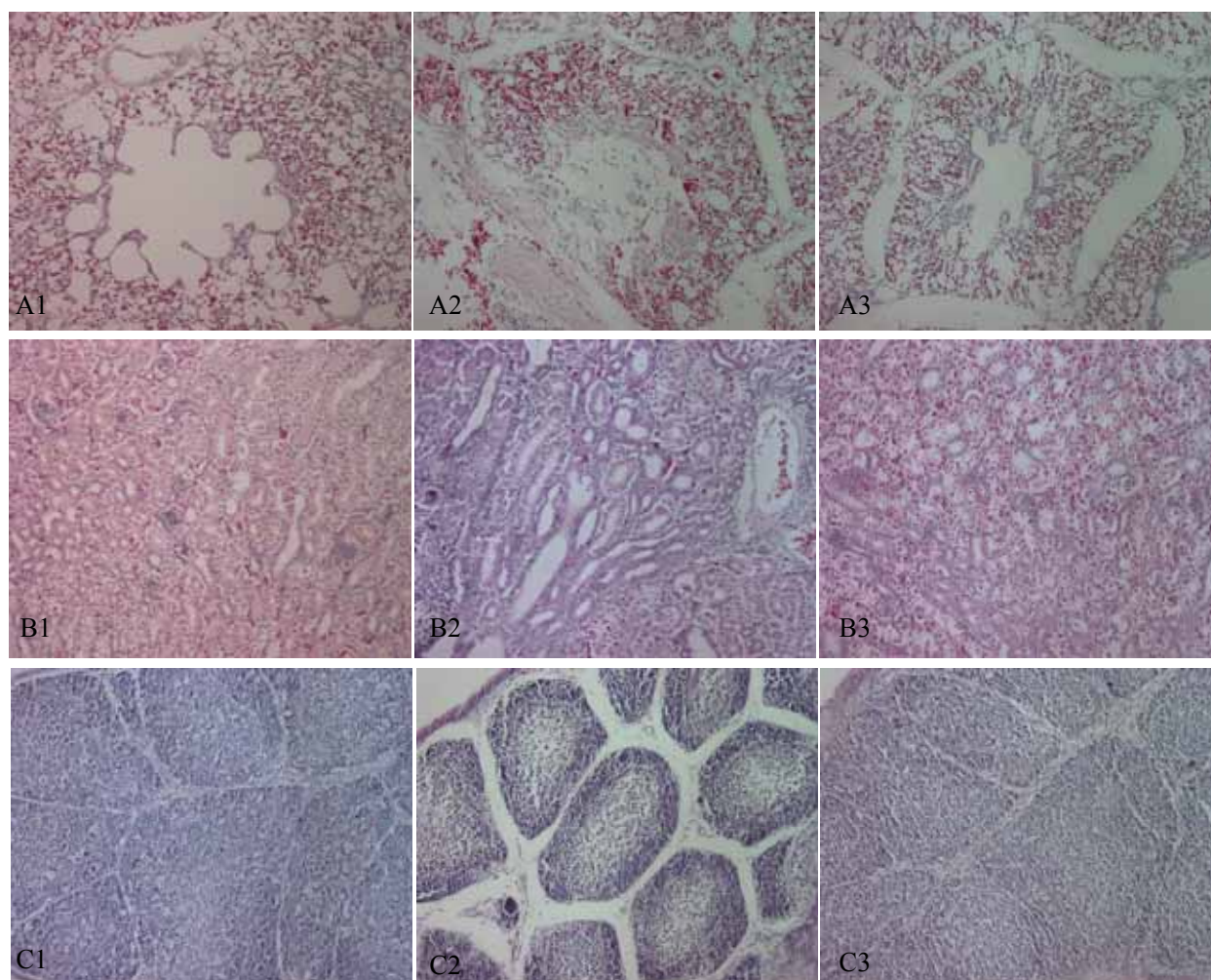


图 19 IBV 攻毒后各主要脏器病理组织学变化(A, B 200 × ; C 100 ×)

Fig. 19 Pathohistological changes in the major organs of chickens after being challenged by IBV M41

A1. 免疫组肺

A1. Section of lung from vaccinated chicken

A2. 攻毒对照组肺

A2. Section of lung from challenged chicken

A3. 空白对照组肺

A3. Section of lung from negative control chicken

B1. 免疫组肾

B1. Section of kidney from vaccinated chicken

B2. 攻毒对照组肾

B2. Section of kidney from challenged chicken

B3. 空白对照组肾

B3. Section of kidney from negative control chicken

C1. 免疫组法氏囊

C1. Section of bursa from vaccinated chicken

C2. 攻毒对照组法氏囊

C2. Section of bursa from challenged chicken

C3. 空白对照组法氏囊

C3. Section of bursa from negative control chicken

4.3.2 各组 SPF 鸡血清抗体效价动态变化

在每次剖杀各组SPF时采取 500μL凝血，制备血清，检测血清中IBV抗体效价动态变化。检测

结果表明, SPF鸡在人工接种 $10^{5.5}$ EID₅₀ IBV H52 病毒后 9d, 血清抗体缓慢出现, 在第 15d 采用 M41 同型强毒攻击后抗体效价迅速上升, 于攻毒后 9d 达到最高点, 其抗体效价为 2424.51 (表 1), 随后缓慢下降; 而攻毒对照组 SPF 在 M41 攻击 6d 后开始产生抗体, 并急剧持续升高 (表 1); 而空白对照组的 SPF 鸡在全程过程中未检测出任何血清抗体 (图 20)。

表 1 免疫及攻毒后血清抗体效价检测结果

Table 1 The IB antibody titre at different time courses after immunization and challenge

检测时间(d) 组别	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
免疫组	30.43*	0	17.8	325.57	457.31	864.24	2276.11	2424.51	1539.08	1224.36
攻毒对照组	-	-	-	-	-	0	0	1644.13	1781.7	3017.3
空白对照组	4.69	0	0	65.66	0	0	0	32.93	9.38	0

注: “*” 抗体效价 ≥ 834 判定为阳性

“-” 表示未做检测

Note: “*” The positive of the IB antibody titer is 834 or more

“-” Not determined

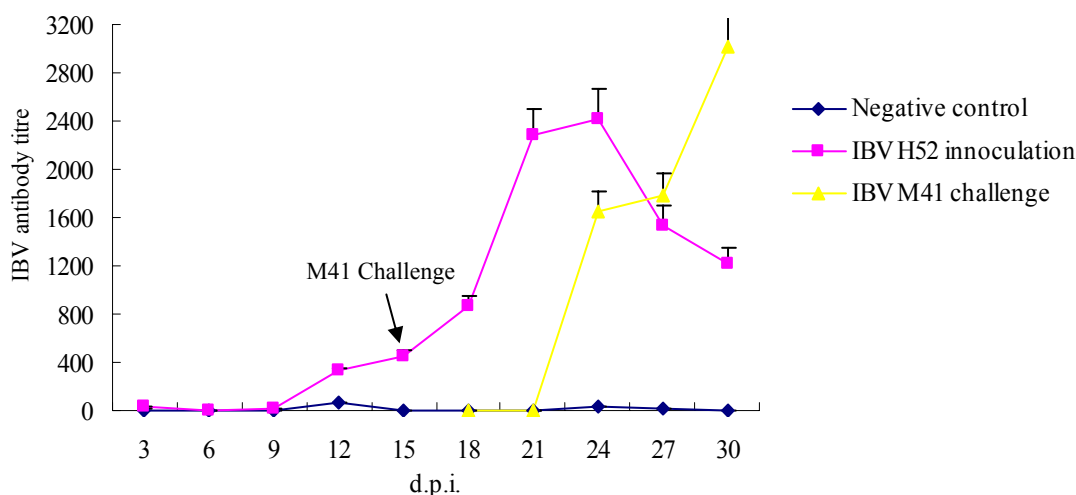


图 20. IBV 感染免疫和攻毒后的血清抗体动态变化

Fig. 20 Kinesis of the antibody in the serum from the chickens inoculated and challenged by IBV

4.3.3 IBV N 蛋白特异性 T 细胞动态变化

在采用 IBV H52 免疫和 M41 攻毒后的各时间段对 SPF 鸡进行剖杀时, 分别分离 PBMCs 和脾淋巴细胞, 然后采用前一章实验已制备的 BF2/肽四聚体和商品化的抗鸡 CD8 的抗体进行双染, 采用流式细胞术分析 SPF 鸡在感染 H52 和受同型强毒攻击后 N 蛋白特异性 CTLs 的动态变化。从表 2 和图 21 可以看出, 对于 PBMCs 的染色来说, SPF 鸡在接种 IBV H52 后第 3d 即能检测到针对 N 蛋白的特异性 CTLs, 但在前 9d 均保持在较低水平, 然后迅速升高, 到第 12d 时达到最高峰, 然后开始回落; 在第 15d 采用 M41 对其进行攻击后, 针对 N 蛋白的特异性 CTLs 的数量迅速回升, 于攻毒 6d 后达到最高峰, 攻毒 9d 后回落并保持相对稳定水平。由此也可以看出, IBV 感染 SPF 鸡后细胞免疫的产生时间明显早于体液免疫的发生 (图 22)。而攻毒对照组的 SPF 鸡在接受 M41

攻击后, 特异性 CTLs 产生的趋势与免疫组的 SPF 鸡类似, 但总体水平略高于前者, 到攻毒后第 15d 全部剖杀时, 达到最高水平。对于检测脾淋巴细胞特异性 CTLs 的结果来说, 其产生和变化的总体趋势与 PBMCs 中所检测的结果的基本相同, 但其可检测到的特异性 CTLs 的数量明显高于后者, 大致为后者的两倍。

组别	检测时间(d)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
PBM C	免疫组	0.63	0.65	0.63	1.7	1.26	3.12	3.23	0.91	0.47	0.41
	攻毒对 照组	-	-	-	-	-	0.59	0.99	1.05	0.95	3.13
脾淋 巴细 胞	免疫组	1.28	1.13	1.68	7.2	3.44	4.27	8.59	2.86	3.19	2.94
	攻毒对 照组	-	-	-	-	-	2.14	2.65	7.92	7.91	14.01

表 2 不同时间段检测 IBV N 蛋白特异性 CTL 的比例 (%)

Table 2 The frequency of nucleoprotein-specific CTLs of IBV assessed in different time course

注: “-”表示未做检测

Note: “-” Not determined

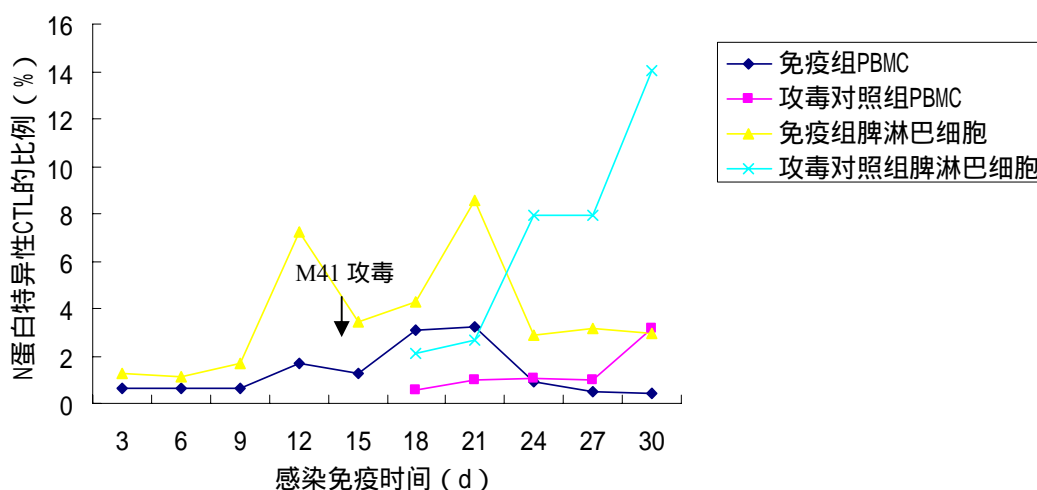


图 21. 流式细胞术分析 IBV N 蛋白特异性 CTL 的动态变化

Fig. 21. Kinesis of the nucleoprotein-specific CTLs of IBV determined by FCM

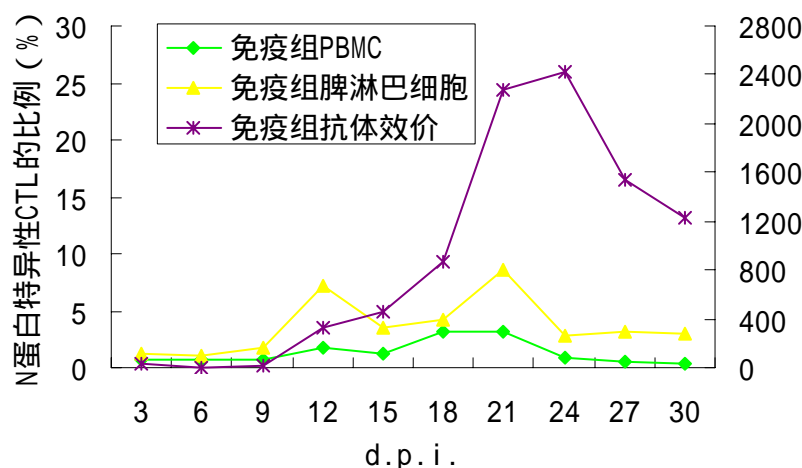


图 22 SPF 鸡感染 IBV 后 N 蛋白特异性 CTL 与抗体产生时间的比较

Fig.22 The antibody and the N protein-sepecific CTL response

4.4 讨论

CTLs 在机体免疫系统中清除自体细胞表达的外源抗原时起着重要作用,与体液免疫所不同的是,CTLs 的特异性取决于膜受体而并非所分泌的分子,其 T 细胞受体受 MHC 分子及其所递呈的抗原肽的双重限制性 (Doherty *et al.*, 1976; Townsend A., and Bodmer., 1989)。病毒特异性 CTLs 对于感染的清除及减少排毒十分重要 (Lin *et al.*, 1981; Reusser *et al.*, 1991; McNeal *et al.*, 1995)。

为了研究 SPF 鸡在感染 IBV 时体液免疫与病毒特异性 T 细胞免疫之间的消长关系,本试验对一周龄 SPF 鸡采用 $10^{5.5}$ EID₅₀ IBV H52 进行接种,并在 15d 后对其采用同血清型强毒 M41 进行攻击,分别采用 Biocheck 公司的 IBV 抗体检测试剂盒检测血清抗体及利用上一章节实验所制备的 BF2/肽四聚体检测 IBV 的特异性 T 细胞的变化趋势。

检测结果显示,IBV H52 接种 SPF 鸡后,血清抗体产生迟缓,按照抗体检测试剂盒所提供的判定标准(抗体效价 834 判定为阳性),在第 15d 以后抗体效价接近阳性标准。而目前国内市售的以 H52 毒株为基础的活疫苗在免疫后 5-8d 即可产生免疫力,但其针对的免疫群体是 1 月龄以上的商品鸡,而本试验检测的结果产生相对迟缓,可能的原因之一是与免疫日龄有直接关系,在一周龄时 SPF 鸡的免疫器官还未发育完全;另一个可能的因素是在免疫过程中未使用任何免疫佐剂、增强剂等辅助成分,因而抗体产生较慢。而 Seo 等 (1997) 也曾报道,他们在采用 IBV Gray 株接种试验鸡时,在接种后前 10d 均无法检测到血清中的 IgG 抗体,在第 20d 左右开始检测到抗体,并在 20-30d 之间时逐渐升高。同时在血清中也检测到了短暂的 IgM 效应,在接种后第 10d 出现,第 12d 达到高峰,到第 20d 时完全消失。

虽然未检测到理想的血清抗体效价,但在免疫第 15d 时采用 M41 株同型强毒攻击后,免疫组 SPF 鸡未出现明显的发病症状,而攻毒对照组的 SPF 鸡均出现了不同程度的发病,并在攻毒后第 11d 时死亡 3 羽。对肺脏、肾和法氏囊的病理组织学检测结果也表明,攻毒组 SPF 鸡的病理变化较为明显,而免疫组的相应组织没有明显病理组织学变化。此外,免疫组 SPF 鸡在攻毒后抗体效价迅速上升,于第 9d 达到最高点,随后缓慢下降。同时,攻毒对照组 SPF 鸡在 M41 攻击 6d 后开始产生抗体,并急剧持续升高。以上这些结果都说明,本实验过程中的免疫和攻毒途径和剂量完全正确,但免疫组在未检测到确实的血清抗体时仍能抵抗同源强毒的攻击,说明在抵抗 IBV 过程中,血清抗体并非决定因素,推测 IBV 特异性的 CTLs 在抵抗病毒的早期感染过程中可能起着较为重要的作用,此外,粘膜免疫和 IgM 在鸡体感染早期的抗病毒入侵过程中可能也起着重要的抵抗作用,而这两个指标在本实验中未做相应的检测。

采用上一章节实验所制备的 BF2/肽四聚体结合流式细胞术所检测的 N 蛋白特异性 T 细胞的比例,其结果显示,在 H52 株对 SPF 鸡免疫 3d 后即可检测到特异性 T 细胞的存在,而在免疫 9d 后其比例显著上升,在第 12d 时达到相应的最高水平。从这一结果可以看出,对于 IBV H52 株接种 SPF 鸡来说,T 细胞免疫明显要早于体液免疫的产生,这可能也是在 SPF 鸡尚未产生坚强的体液免疫时仍能抵抗同源强毒攻击的主要原因之一。Collisson 等 (2000) 在研究中也发现,CTLs 在清除 IBV 早期感染时起着重要作用,而在感染晚期鸡体抵抗病毒作用的主要取决于体液免疫

IgG。本实验研究所得到的结果显示, SPF 鸡在接种 H52 株第 12d 后 T 细胞免疫开始下降至较低水平, 而血清抗体的效价却不断上升, 随后维持在相对较高的水平, 下降速度较为缓慢。这一结果也恰好符合 Collisson 的这一推论。

IBV 特异性的 CTLs 效应的动态变化趋势与所报道的禽白血病病毒的变化趋势类似 (Thacker *et al.*, 1995), 此外, 鼠仙台病毒的 CTLs 效应的最高峰也和 IBV 的一样出现在感染后大约 12d (Tashiro *et al.*, 1988), 而马疱疹病毒的 CTLs 效应的最高峰出现相对较晚, 约在感染后 2-3 周 (Allen *et al.*, 1995)。这样的一些差别主要由于动物物种的不同、病源体的特性以及是否同时存在其他病毒感染等一些因素共同导致。

在实验过程中, 为了保证数据的可靠性, 我们同时检测了 PBMCs 和脾淋巴细胞的 IBV N 蛋白特异性 T 细胞的比例。从检测结果中, 我们发现脾淋巴细胞中的特异性 T 细胞的比例明显高于 PBMCs。其原因可能是因为 PBMCs 中的细胞种类较多, 而脾脏主要为鸡体内细胞免疫的发生器官, 其细胞的种类相对单一, 所以特异性 T 淋巴细胞的比例就相应升高。

本试验通过采用 BF2/肽四聚体评价了 SPF 鸡在免疫及攻毒过程中 N 蛋白特异性 T 细胞的动态变化趋势, 并检测了此过程中血清抗体效价的消长规律, 并考察了此二者对抵抗同源强毒攻击的作用。这些相关信息可为传染性支气管炎新型疫苗的设计提供一些思路 and 方向。

本实验在检测特异性 T 细胞时采用了自己制备的 BF2/肽四聚体, 由于在与特异性 T 细胞结合过程中同样受 MHC 及其所递呈的抗原肽的双重限制性, 所以其检测的原理与经典的 ^{51}Cr 释放试验类似, 其检测结果也应吻合。本试验所检测的 N 蛋白特异性 T 细胞的动态变化趋势与 Seo 等 (1997) 采用 ^{51}Cr 释放试验所获得结果基本一致。此外, 本实验所采用的方法无需体外增殖培养及利用对环境及人体有危害的放射性物质, 且实验结果无明显差异, 因而采用 BF2/肽四聚体技术用于禽类病毒感染及免疫过程中抗原特异性 T 细胞的研究有较大的潜力和发展空间。然而, 禽类病毒 T 细胞表位肽的相关研究工作相对于人类病毒的相关研究严重滞后, 所以要将该技术全面应用于禽类病毒细胞介导免疫的研究工作还需要相关研究工作的进展。

第五章 全文结论

- 5.1 从纯系 SPF 级莱航鸡(*Gallus gallus*)全血中提取 RNA ,经 RT-PCR 扩增获得了 BF2 和 Ch β 2m 全基因 ,并预测了 BF2 和 Ch β 2m 的信号肽序列及 BF2 的跨膜区序列 ;对 BF2 基因系统发育分析发现该基因为 B15 单倍型。
- 5.2 构建了不含信号肽、跨膜区并在 BF2 COOH-端融合了 BSP 的原核表达载体 pET-BF2-BSP 和 pET-Ch β 2m ,并在大肠杆菌中获得高效表达。
- 5.3 通过体外重折叠复性获得了含 IBV N₇₁₋₇₈ 抗原肽的 BF2/肽单体复合物 ,生物素化后通过与链霉亲和素结合制备了 BF2/肽四聚体。
- 5.4 对已制备的 BF2/肽四聚体功能进行了检测 ,发现可用以检测 IBV H52 株接种后 IBV N 蛋白特异性 T 细胞的比例。
- 5.5 采用已制备 BF2/肽四聚体对 IBV H52 株接种后 IBV N 蛋白特异性 CTLs 消长规律进行了评价 ,证实 IBV 的细胞免疫早于体液免疫的产生 ,且可作为抵抗 IBV 早期感染的重要因素之一。

参 考 文 献

1. 陈建飞. 鸡传染性支气管炎病毒中国主要疫苗株的分子特性, [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
2. 丁红梅, 周继勇, 于涟. 鸡传染性支气管炎病毒 N 基因及其编码产物的分子生物学. 预防兽医学进展 2001, 3(1): 1~4.
3. 何贤辉, 徐丽慧, 刘毅, 曾耀英. 人 β 2-微球蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的高效表达. 中国生物工程学报 2004, 20(1): 99~103.
4. 刘光亮, 童铁钢, 孟庆文, 吴东来. 鸡 β 2微球蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的高效表达. 中国兽医学报, 2007, 27 (5) : 1~4.
5. 刘光亮, 童铁钢, 王群, 肖一红, 孟庆文, 吴东来. 鸡 MHC I α -生物素化序列融合基因的构建、表达及纯化. 农业生物技术学报, 2006, 14 (5) : 662~668.
6. 刘思国, 康丽娟, 江国托, 孔宪刚, 卢中冶, 刘忠贵, 卢景良. 鸡传染性支气管炎病毒核蛋白基因重组真核表达载体的构建, 中国兽医学报 2001, 21(1): 14~16.
7. 钱丽, 钱书兵, 钱关祥. 可生物素化 HLA-A2-生物素化序列融合基因的构建与表达. 上海免疫学杂志 2002, 22(1): 26~29.
8. 钱丽, 钱书兵, 钱关祥. 人 β 2-微球蛋白基因的克隆与表达. 细胞与分子免疫学杂志 2001, 17(4): 384~385.
9. Alexander D.J., Gough R.E., Pattison M.. A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with 3 strains of avian infectious bronchitis virus. Research of Veterinary Science 1978, 24(2): 223~227.
10. Allen G.M., Yeargan L.R., Costa R. and Cross R.. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in horses infected with equine herpesvirus. Journal of Virology 1995, 69(1): 606~612.
11. Altman J.D., Moss P.A.H., Goulder P.J.R., Barouch D.H., McHeyzer-Williams M.G., Bell J.I., McMichael A.J., Davis M.M.. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science 1996, 274 (5284): 94~96.
12. Appay V., Rowland-Jones S.L., The assessment of antigen-specific CD8+ T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. Journal of Immunological

- Methods 2002, 268(1), 9~19.
13. Asemissen A.M., Nagorsen D., Keilholz U., Letsch A., Schmittel A., Thiel E., Scheibenbogen C.. Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN- γ for the quantification of antigen reactive T cells. *Journal of Immunological Methods* 2001, 251(1-2): 101~108.
 14. Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Heijne, G., Brunak, S.. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*. 2004, 340(4): 783~795.
 15. Binns M.M., Boursnell M.E.G., Cavanagh D., Pappin D.J.C., Brown T.D.K.. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *Journal of General Virology* 1985, 66(4): 719~726.
 16. Boots A.M., Benaissa-Trouw B.J., Hesselink W., Rijke E., Schrier C., Hensen E.J.. Induction of anti-viral immune responses by immunization with recombinant-DNA encoded avian coronavirus nucleocapsid protein. *Vaccine* 1992(2), 10:119~124.
 17. Boots A.M., Kusters J.G., van Noort J.M., Zwaagstra K.A., Rijke E., van der Zeijst B.A., Hensen E.J.. Localization of a T-cell epitope within the nucleocapsid protein of avian coronavirus. *Immunology* 1991b, 74(1): 8~13.
 18. Boots A.M., Van Lierop M.J., Kusters J.G., Van Kooten P.J., Van der Zeijst B.A., Hensen E.J.. MHC class II-restricted T-cell hybridomas recognizing the nucleocapsid protein of avian coronavirus IBV. *Immunology* 1991a, 72(1): 10~14.
 19. Borysiewicz L.K., Fiander A., Nimako M., Man S., Wilkinson G.W., Westmoreland D., Evans A.S., Adams M., Stacey S.N., Boursnell M.E., Rutherford E., Hickling J.K., Inglis S.C.. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 1996, 347(9014): 1523~1527.
 20. Briles W.E., Goto R.M., Auffray C., Miller M.M.. A polymorphic system related to but genetically independent of the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 1993, 37(6): 408~414.
 21. Brunner K.T., Mauel J., Cerottini J.C., Chapuis B.. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968, 14(2): 181~196.
 22. Busch D.H., Pilip I., Pamer E.G.. Evolution of a complex TCR repertoire during primary and recall bacterial infection. *The Journal of Experimental Medicine* 1998, 188(1): 61~70.
 23. Busch, D., Pamer E.. T lymphocyte dynamics during *Listeria monocytogenes* infection.

- Immunology Letters 1999, 65(1-2): 93~8.
24. Busch, D.H., Kerksiek K.M., Pamer E.G. Processing of *Listeria monocytogenes* antigens and the in vivo T cell response to bacterial infection. *Immunology Reviews* 1999, 172(2): 163~169.
 25. Busch, D.H., Pamer E.G. T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *The Journal of Experimental Medicine* 1999, 189(4): 701~710.
 26. Busch, D.H., Pilip I.M., Vijn S., Pamer E.G. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 1998, 8(3): 353~362.
 27. Callan M.F., Tan L., Annels N., Ogg G.S., Wilson J.D., O'Callaghan C.A., Steven N., McMichael A.J., Rickinson A.B.. Direct visualization of antigen-specific CD8⁺ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 1998, 187(9): 1395~1402.
 28. Cavanagh D., Davis P.J., Mockett A.P.. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Research* 1988, 11(2): 141~150.
 29. Cavanagh D.. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Archives of Virology* 1997, 142(3): 629~633.
 30. Cavanagh D.. Severe acute respiratory syndrome vaccine development; experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathology*, 2003, 32 (6): 567~582.
 31. Chen B.Y., Itakura C.. Cytopathology of chick renal epithelial cells experimentally infected with avian infectious bronchitis virus, *Avian Pathology* 1996, 25(4):675~694.
 32. Collins R.W.. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *European Journal of Immunogenetics* 2004, 31(3): 105~114.
 33. Collission E.W., Pei J., Dzielawa J., Sao S.H.. Cytotoxic T lymphocytes are critical in control of infectious bronchitis virus in poultry. *Developmental and Comparative Immunology* 2000, 24(2-3): 187~200.
 34. Collisson E.W., Parr R.L., Li W., Williams A.K.. An overview of the molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. *Poultry Science Review* 1992, 4(1): 41~55.
 35. Corr M., Slanetz A.E., Boyd L.F., Jelonek M.T., Khilko S., al-Ramadi B.K., Kim Y.S., Maher S.E., Bothwell A.L., Margulies D.H.. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 1994, 265 (5174): 946~949.

36. Crinion R.A.P., Hofstad M.S.. Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Disease* 1972, 16(2): 351~363.
37. Di Fabio S., Mbawuike I.N., Kiyono H., Fujihashi K., Couch R.B., McGhee J.R.. Quantitation of human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation of cytotoxicity and increased numbers of IFN-gamma producing CD8⁺ T cells. *International Immunology* 1994, 6(1): 11~19.
38. Doherty P.C., Blanden R.B., and Zinkernagel R.M.. Specificity of virus-immune effector T cells for H-2K or H-2D compatible interactions: implications for H-antigen diversity. *Transplant Review* 1976, 29: 89~124.
39. Dohlsten M., Sundstedt A., Bjorklund M., Hedlund G., Kalland T.. Super-antigen induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells. *International Journal of Cancer* 1993, 54(3): 482~488.
40. Donahoe S.M., Moretto W.J., Samuel R.V., Metzner K.J., Marx P.A., Hank T., Connor R.I., Nixon D.F.. Direct measurement of CD8⁺T cell responses in macaques infected with simian immunodeficiency virus. *Virology* 2000, 272(2): 347~356.
41. Donahoe S.M., Moretto W.J., Samuel R.V., Metzner K.J., Marx P.A., Hanke T., Connor R.I., Nixon D.F.. Direct measurement of CD8⁺ T cell responses in macaques infected with simian immunodeficiency virus. *Virology* 2000, 272(2): 347~356.
42. Dunbar P.R., Ogg G.S., Chen J., Rust N., van der Bruggen P., Cerundolo V.. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. *Current Biology* 1998, 8(7): 413~416
43. Echchakir H., Dorothe G., Vergnon I., Menez J., Chouaib S., Mami-Chouaib F.. Cytotoxic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar HLA tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, 99(14): 9358~9363.
44. Egan M.A., Pavlat W.A., Tartaglia J., Paoletti E., Weinhold K.J., Clements M.L., Siliciano R.F.. Induction of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a nonreplicating, host-range-restricted canaiypox vector (ALVAC) carrying the HIV-1 MN env gene. *Journal of Infectious Disease* 1995, 171(6): 1623~1627.
45. Eliana D.B.C.. Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 1998, 9(2): 157~163.

46. Engstrand M., Tournay C., Peyrat M.A., Eriksson Britt-Marie, Wadstrom J., Wirgart B.Z., Romagne F., Bonneville M., Totterman T.H., Korsgren O.. Characterization of CMVpp65-Specific CD8⁺ T Lymphocytes using MHC Tetramers in Kidney Transplant Patients and Health Participants. *Transplantation* 2000, 69(11): 2243~2250.
47. Fischer K., Andreesen R., Mackensen A.. An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *Journal of Immunological Methods* 2002, 259(1-2): 159~169.
48. Gallimore A., Glithero A., Godkin A., Tissot A.C., Plückthun A., Elliott T., Hengartner H., Zinkernagel R.. Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-specific Cytotoxic T Lymphocytes Visualized Using Soluble Tetrameric Major Histocompatibility Complex Class I-Peptide Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 1998, 187(9): 1383~1393.
49. Garboczi D.N., Hung D.T., Wiley D.C.. HLA-A2-peptide complexes: Refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89(8): 3429~3433
50. Garboczi D.N., Utz U., Ghosh P., Seth A., Kim J., VanTienhoven E.A.E., Biddison W.E., Wiley D.C.. Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alpha/beta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *The Journal of Immunology* 1996, 157(12): 5403~5410.
51. Garboczi, D.N., Gosh P., Utz U., Fan Q.R., Biddison W.E., Wiley D.C.. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996, 384(6605): 134~141.
52. Goldberg J.E., Sherwood S.W., Clayberger C.. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 1999, 224(1-2): 1~9.
53. Griffioen M., Borghi M., Schrier P.I., Osanto S.. Detection and quantification of CD8⁺ T cells specific for HLA-A*0201-binding melanoma and viral peptides by the IFN-gamma-ELISPOT assay. *International Journal of Cancer* 2001, 93(4): 549~55.
54. Haanen J.B., Van Oijen M.G., Tirion F., Oomen L.C., Kruisbeek A.M., Vyth-Dreese F.A., Schumacher T.N.. In situ detection of virus- and tumor-specific T-cell immunity. *Nature Medicine* 2000, 6(9): 1056~1060.
55. Herr W., Schneider J., Lohse A.W., Meyer zum Buschenfelde K.H., Wolfel T.. Detection and quantification of blood derived CD8⁺ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha

- response to HLA-A2.1 binding melanoma and viral peptide antigens. *Journal of Immunological Methods* 1996, 191(2): 131~142.
56. Hofstad M.S.. Avian infectious bronchitis. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M., Yoder H.W., editors. *Diseases of poultry*. Ames, IA: Iowa State University Press, 1984. p. 429~243 [8th ed.].
57. Hogquist K.A., Jameson S.C., Heath W.R., Howard J.L., Bevan M.J., Carbone F.R.. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994. 76(1): 17~27.
58. Hugues S., Malherbe L., Filippi, Glaichenhaus N.. Generation and use of alternative multimers of peptide pMHC complexes. *Journal of Immunological Methods* 2002, 268(1): 83~92
59. Ignjatovic J., Galli L.. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Archives of Virology* 1994, 138(1-2): 117~134.
60. Ikemura, T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Molecular Biology and Evolution*. 1985, 2(1): 13~34.
61. Jager E., Hohn H., Necker A., Forster R., Karbach J., Freitag K., Neukirch C., Castelli C., Salter R.D., Knuth A., Maeurer M.J. Peptide-specific CD8⁺ T cell evolution vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1. *International Journal of Cancer* 2002, 98(3): 376~388.
62. Jauknecht R., Martynoff G., Lou J., Hipkind R.A., Nordheim A., Stunnenberg H.G.. Rapid and efficient purification of native histidine tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, 88(20): 8972~8976.
63. Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C.. Detecion of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 1993, 159(1-2): 197~207.
64. Kalergis A.M., Goyarts E.C., Palmieri E., Honda S., Zhang W., Nathenson S.G. A simplified procedure for the preparation of MHC/peptide tetramers: chemical biotinylation of an unpaired cysteine engineered at C-terminus of MHC-I. *Journal of Immunological Methods* 2000, 234(1-2): 61~67.
65. Kaufman J., Andersen R., Avila D., Engberg J., Lambris J., Salomonsen J., Welinder K., Skjodt K.. 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. *Journal of*

- Immunology. 1992, 148(5): 1532~1546.
66. Kaufman J., Milne S., Gobel T.W., Walker B.A., Jacob J.P., Auffray C., Zoorob R., Beck S.. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature* 1999, 401(6756): 923~925.
67. Koch G., Hartog L., Kant A., van Roozelaar D.J.. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *Journal of General Virology* 1990, 71(9): 1929~1935.
68. Kotani T., Wada S., Tsukamoto Y., Kuwamura M., Yamate J., Sakuma S.. Kinetics of lymphocytic subsets in chicken tracheal lesions Infected with infectious bronchitis virus. *Veterinary Medicine Science*, 2000, 62 (4): 379~401.
69. Kozlowski S, Takeshita T, Boehncke WH, Takahashi H, Boyd LF, Germain RN, Berzofsky JA, Margulies DH. Excess β 2-microglobulin promoting functional peptide association with purified soluble class I MHC molecules. *Nature*, 1991, 349(6304): 74~77.
70. Laitinen O.H., Marttila A.T., Airenne K.J., Kulik T., Livnah O., Bayer E.A., Wilchek M., Kulomaa M.S.. Biotin induces tetramerization of a recombinant monomeric avidin. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276(11): 8219~8224.
71. Lechnera F., Wongc D.K.H., Rod Dunbarb P., Chapmana R., Chungd R.T., Dohrenwendc P., Robbinsc G., PhillipsaR., Klenermana P., Walkerc B.D.. Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus. *Journal of Experimental Medicine* 2000, 191(9): 1499~1512.
72. Lecoeur H., Fevrier M., Garcia S., Riviere Y., Gougeon M.L.. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 2001, 253(1-2): 177~187.
73. Lenstra J.A., Kusters J.G., Koch G., van der Zeijst B.A.M. Antigenicity of the peplomer protein of infectious bronchitis virus. *Molecular Immunology* 1989, 26(1): 7~15.
74. Lin Y.L., and Askonas B.A.. Biological properties of an influenza A virus-specific killer T-cell clone. *Journal of Experimental Medicine* 1981, 154(2): 225~234.
75. Liu C.P., Jiang K., Wu C.H., Lee W.H., Lin W.J.. Detection of glutamic acid decarboxylase-activated T cells with I-Ag7 tetramers. *Proceeding of National Academy of Science of the United States of America* 2000, 97(26): 14596~14601.
76. Liu D.X., Inglis S.C.. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion

- envelope. *Virology* 1991, 185(2): 911~917.
77. Lomniczi B. Biological properties of avian coronavirus RNA. *Journal of General Virology* 1977, 36(3): 531~533.
78. Lucio B., Fabricant J.. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Disease* 1990, 34(4): 865~870.
79. Maier B., Buhring H.J., Simon M., Eichmann K., Melchers I.. Limiting dilution analysis of proliferating and helper T cells in the in vivo immune response to KLH: derepression of helper T cells at moderately increased frequencies. *Journal of Molecular and Cellular Immunology* 1986, 2(5): 293~305.
80. Maile R., Wang B., Schooler W., Meyer A., Collins E.J., Frelinger J.A.. Antigen-specific modulation of an immune response by in vivo administration of soluble MHC class I tetramers. *Journal of Immunology* 2001, 167(7): 3708~3714.
81. Mallone R., Nepom G.T.. MHC Class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, and delete. *Journal Clinical Immunology*, 2004, 110(3): 232~242.
82. Mamalaki C., Elliott J., Norton T., Yannoutsos N., Townsend A.R., Chandler P., Simpson E., Kioussis D.. Positive and negative selection in transgenic mice expressing a T-cell receptor specific for influenza nucleoprotein and endogenous superantigen. *Developmental Immunology* 1993, 3(3): 159~174.
83. Matsui K., Boniface J.J., Reay P.A., Schild H., Fazekas de St Groth B., Davis M.M.. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 1991, 254(5039): 1788~1791.
84. McMichael A.J., Kelleher A.. The arrival of HLA class II tetramers. *Journal of Clinical Investigation* 1999, 104(12): 1669~1670.
85. McMichael, A., O'Callaghan C.. A new look at T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1998, 187(9): 1367~1371.
86. McNeal M.M., Barone K.S., Rae M.N., and Ward R.L.. Effector functions of antibody and CD81 cells in resolution of rotavirus infection and protection against reinfection. *Virology* 1995, 214(11): 387~397.
87. Mealey R.H., Sharif A., Ellis S.A., Littke M.H., Leib S.R. and McGuire T.C. Early detection of dominant Env-specific and subdominant Gag-specific CD8⁺ lymphocytes in equine infectious

- anemia virus-infected horses using major histocompatibility complex class I/peptide tetrameric complexes. *Virology* 2005, 339(1): 110~126.
88. Meidenbauer N., Hoffmann T.K., Donnenberg A.D.. Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC-class I tetrameric complexes. *Methods* 2003, 31(2): 160~171.
89. Michaelsson J., Achour A., Salcedo M., Kase-Sjostrom A., Sundback J., Harris R.A., Karre K.. Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity with soluble major histocompatibility complex class I tetramers. *European Journal of Immunology* 2000, 30(1): 300~307.
90. Miller M.M., Bacon L.D., Hala K., Hunt H.D., Ewald S.J., Kaufman J., Zoorob R., Briles W.E.. Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. *Immunogenetics* 2004, 56(4): 261~79.
91. Miller M.M., Goto R., Bernot A., Zoorob R., Auffray C., Bumstead N., Briles W.E.. Two MHC class I and two MHC class II genes map to the chicken Rfp-Y system outside the B complex. *Proceeding National Acad Sciences* 1994, 91(10): 4397~4401.
92. Mondal S.P., Naqi S.A.. Maternal antibody to Infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. *Veterinary*, 2001, 79 (1-2): 31~40.
93. Murali-Krishna K., Altman J.D., Suresh M., Sourdive D.J., Zajac A.J., Miller J.D. Slansky J., Ahmed R.. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998, 8(2): 177~187.
94. Niesters H.G.M., Bleumink-Pluym N.M., Osterhaus A.D, Horzinek M.C., van der Zeijst B.A.. Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis virus strain M41 as defined by monoclonal antibodies. *Virology* 1987, 161(2): 511~519.
95. Nociari M.M., Shalev A., Benias P., Russo C.. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 1998, 213(2): 157~167.
96. Novak E.J., Liu A.W., Gebe J.A., Falk B.A., Nepom G.T., Koelle D.M., Kwok W.W.. Tetramer-guided epitope mapping: rapid identification and characterization of immunodominant CD4 + T cell epitopes from complex antigens. *Journal of Immunology* 2001, 166(11): 6665~6670.
97. Oleksiewicz M.B., Kristensen B., Ladekjær-Mikkelsen A.S., Nielsen J.. 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). *Veterinary Immunology*

- and Immunopathology 2002, 86(1-2): 55~77.
98. Otten G.R., Bikoff E., Ribaldo R.K., Kozlowski S., Margulies D.H., Germain R.N.. Peptide and β 2-microglobulin regulation of cell surface MHC class I conformation and expression. *Journal of Immunology* 1992, 148(12): 3723~3732.
99. Owen J.A., Allouche M., Doherty P.C.. Limiting dilution analysis of the specificity of influenza-immune cytotoxic T cells. *Cell Immunology* 1982, 67(1): 49~59.
100. Pala P., Hussell T., Openshaw P.J.M.. Flow cytometric measurement of intracellular cytokine. *Journal of Immunological Methods* 2000, 243 (1-2): 107~124
101. Parker K.C., Silver M.L., Wiley D.C.. An HLA-A2/Pbeta2-microglobulin/peptide complex assembled from subunits expressed separately in *Escherichia coli*. *Molecular Immunology* 1992, 29(3): 371~378.
102. Piao W., Song X., Liu M., He Y., Zhang H., Xu W., Li Z., Zhang H., Ling S., Wang G.. Cloning, expression, and purification of HLA-A2-BSP and β 2m in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 2004, 35(2): 210~217.
103. Prussin C., Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *Journal of Immunological Methods* 1995, 188(1): 117~128.
104. Rehmann B., Chang K.M., McHutchison J., Kokka R., Houghton M., Rice C.M., Chisari F.V.. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *Journal of Virology* 1996, 70(10): 7092~7102.
105. Rehmann B., Chang K.M., McHutchison J., Kokka R., Houghton M., Rice C.M., Chisari F.V.. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Investigation* 1996, 98(6): 1432~1440.
106. Reignat S., Webster G.J., Brown D., Ogg G.S., King A., Seneviratne S.L., Dusheiko G., Williams R., Maini M.K., Bertoletti A.. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Experimental Medicine* 2002, 195(9): 1089~1101.
107. Reusser, P., Riddell S.R., Meyers J.D., and Greenberg P.D.. Cytotoxic T lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 1991, 78(5):1373~1380.
108. Robert B., Guillaume P., Luescher I., Romero P., Mach J.P.. Antibody-conjugated MHC class I

- tetramers can target tumor cells for specific lysis by T lymphocytes. *European Journal of Immunology* 2000, 30(11): 3165~3170.
109. Roden M.M., Lee K.H., Panelli M.C., Marincola F.M.. A novel cytotoxic assay using Fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology. *Journal of Immunological Methods* 1999, 226(1-2): 29~41.
110. Schagger H., Jagow G.V.. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 1987, 166(2): 368~379.
111. Schatz J.. Use of peptide libraries to map the substrate of a peptide modifying enzyme: A 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1993, 11: 1138~1143.
112. Schatz, P.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*. *Biotechnology* 1993, 11(10): 1138~1143.
113. Scheibenbogen C., Lee K.H., Mayer S., Stevanovic S., Moebius U., Herr W., Rammensee H.G., Keilholz U.. A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors and melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 1997, 3(2): 221~226.
114. Scheibenbogen C., Lee K.H., Stevanovic S., Witzens M., Willhauck M., Waldmann V., Naehrer H., Rammensee H.G., Keilholz U.. Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFN gamma-ELISPOT assay. *International Journal of Cancer* 1997, 71(6): 932~936.
115. Scheibenbogen C., Romero P., Rivoltini L., Herr W., Schmittel A., Cerottini J.C., Woelfel T., Eggermont A.M., Keilholz U.. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN-gamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *Journal of Immunological Methods* 2000, 244(1-2): 81~89.
116. Schneider J., Gilbert S.C., Blanchard T.J., Hanke T., Robson K.J., Hannan C.M., Becker M., Sinden R., Smith G.L., Hill A.V.. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nature Medicine* 1998, 4(4): 397~402.
117. Schochetman G., Stevens R.H., Simpson R.W.. Presence of infectious polyadenylated RNA in the coronavirus avian bronchitis virus. *Virology* 1977, 77(2): 772~782.

118. Seah J.N., Yu L. and Kwang J.. Localization of linear B cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. *Veterinary Microbiology* 2000, 75(1): 11~16.
119. Seo H.S., Collisson E.W.. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. *Journal of Virology* 1997, 71(7): 5173~5177.
120. Seo H.S., Wang L., Smith R.. The carboxy-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus from nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *Journal of Virology* 1997, 71(10): 7889~7894.
121. Seo, S.H., Pei J., Briles W.E., Dzielawa J., Collisson E.W.. Adaptive transfer of infectious bronchitis virus primed $\alpha\beta$ T cells bearing CD8 antigen protects chicks from acute infection. *Virology* 2000, 269(1): 183~189.
122. Serbina N., Pamer E.G.. Quantitative studies of CD8⁺ T-cell responses during microbial infection. *Current Opinion in Immunology* 2003, 15(4): 436~442.
123. Sha W.C., Nelson C.A., Newberry R.D., Kranz D.M., Russell J.H., Loh D.Y.. Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 1988, 335 (6187): 271~274.
124. Shalk AF, Hawn MC. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1931, 78: 413~422.
125. Sharrock C.E., Kaminski E., Man S.. Limiting dilution analysis of human T cells: a useful clinical tool. *Immunology Today* 1990, 11(8): 281~286.
126. Shields M.J., Assefi N., Hodgson W., Kim E.J., Ribaldo R.K.. Characterization of the interactions between MHC class I subunits: a systematic approach for the engineering of higher affinity variants of β 2-microglobulin. *Journal of Immunology* 1998a, 160(5): 2297~2307.
127. Shields M.J., Kubota R., Hodgson W., Jacobson S., Biddison W.E., Ribaldo R.K.. The effect of human β 2-microglobulin on major histocompatibility complex I peptide loading and the engineering of a high affinity variant. *The Journal of Biological Chemistry* 1998b, 273(43): 28010~28018.
128. Skinner P.J., Daniels M.A., Schmidt C.S., Jameson S.C., Haase A.T.. Cutting edge: in situ tetramer staining of antigen specific T cells in tissues. *Journal of Immunology* 2000, 165(2): 613~617.
129. Tarbell K.V., Lee M., Ranheim E., Chao C.C., Sanna M., Kim S.K., Dickie P., Teyton L., Davis M., McDevitt H.. CD4 (+) T cells from glutamic acid decarboxylase (GAD) 65-specific T cell receptor

- transgenic mice are not diabetogenic and can delay diabetes transfer. *J Exp Med*, 2002, 196(4): 481~492.
130. Tashiro M., Fujii Y., Nakamura K., and Homma M.. Cell-mediated immunity induced in mice after vaccination with a protease activation mutant, TR-2, of Sendai virus. *Journal of Virology* 1988, 62(7): 2490~2497.
131. Taswell C.. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies I. Data analysis. *Journal of Immunology* 1981, 126(4): 1614~1619.
132. Thacker E.L., Fulton J.E., and Hunt H.D.. In vitro analysis of a primary, major histocompatibility complex (MHC)-restricted, cytotoxic T lymphocyte response to avian leukosis virus (ALV), using target cells expressing MHC class I cDNA inserted into a recombinant ALV vector. *Journal of Virology* 1995, 69(10): 6439~6444.
133. Tobias J.W., Shader T.E., Rocap G., Varchavsky A.. The N end rule in bacteria. *Science* 1991, 254(5036): 1374~1377.
134. Toes R.E., Offringa R., Blom R.J., Melief C.J., Kast W.M.. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proceeding of National Academy of Science of the United States of America* 1996, 93(15): 7855~7860.
135. Tora H., Espinoza C., Ponce V., Rojas V., Morales M.A., Kaleta E.F.. Infectious bronchitis effect of viral dose and routes on specific lacrimal and serum antibody response in chickens. *Avian Disease*, 1997, 4(2): 379~387.
136. Townsend A., and Bodmer H.. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annually Review of Immunology* 1989, 7(4): 601~624.
137. Tsang K.Y., Zaremba S., Nieroda C.A., Zhu M.Z., Hamilton J.M., Schlom J.. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *Journal of the National Cancer Institute* 1995, 87(13): 982~990.
138. Walter J.B., Garboczi D.N., Fan Q.R., Zhou X., Walker B.D., Eisen H.N.. A mutant human β 2-microglobulin can be used to generate diverse multimeric class I peptide complexes as specific probes for T cell receptors. *Journal of Immunological Methods* 1998, 214 (1-2): 41~50.
139. Wang B., Chen H., Cao X., Jiang X., Zhang M., Wan T., Li N., Zhou X., Wu Y., Yang F., Yu Y., Wang X., Yang R.. Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8⁺ T-cell epitope SSp-1 of SARS-CoV spike protein. *Blood* 2004, 104(1): 200~206.

140. Weber S., Traunecker A., Oliveri F., Gerhard W., Karjalainen K.. Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 1992, 356 (6372): 793~796.
141. Wilson J.D., Ogg G.S., Allen R.L., Chao C.C., Sanna M., Kim S.K., Dickie P., Teyton L., Davis M., McDevitt H.. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS*, 2000(3), 14: 225~233.
142. Wölfl M., Schalk S., Hellmich M., Huster K.M., Busch D.H., Berthold F.. Quantitation of MHC tetramer-positive cells from whole blood: evaluation of a single-platform, six-parameter flow cytometric method. *Cytometry* 2004, 57(2): 120~130.
143. Yang J., Jaramillo A., Shi R., Kwok W.W., Mohanakumar T.. In vivo biotinylation of the major histocompatibility complex (MHC) class II/peptide complex by coexpression of BirA enzyme for the generation of MHC class II/tetramers. *Human Immunology* 2004, 65(7): 692~699.
144. Yewdell J.W., Bennink J.R.. Brefeldin A specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Science* 1989, 244(4908): 1072~1075.
145. Yu L., Liu W., Schnizlein W.M., Frippathy D.N., Kwang J.. Study of protection by recombinant fowl poxvirus expressing C-terminal nucleocapsid protein of infectious bronchitis virus against challenge. *Avian Disease* 2001, 45(2): 340~348.
146. Yuriko S., Hiroeki S., Tomohide T., Masako K., Yoshihiko H., Yuki N., Satoshi K., Hideyuki I., Toshihiko T., Shingo I., Yasuaki T., Takuro W., Toshihiko Y., Masashi G., Hideo T., Noriyuki S.. Improved generation of HLA class I/peptide tetramers. *Journal of Immunological Methods* 2002, 271(1-2): 177~184.

致 谢

本论文是在尊敬的导师吴东来研究员精心指导下完成的。导师严谨的治学态度、一丝不苟的敬业精神、实事求是、克己奉公、无私忘我的工作作风将永远指导我前进，使我终身受益。三年来，导师在学习、生活和工作等方面给予了无微不至的关怀，使我顺利完成了学业，在此特向尊敬的导师致以崇高的敬意和衷心的感谢。

特别感谢兽医生物技术国家重点实验室禽病研究室主任刘胜旺研究员在实验方面给予的指导并提供 IBV H52 和 M41 标准毒株。

衷心感谢人畜共患病研究室步志高研究员在实验过程中给与的指点及关心；感谢人畜共患病基础免疫组的肖一红博士、董铁钢博士、白宇博士、王群博士、张维军博士、徐树兰硕士、张文龙博士、殷喆博士、周欣荣博士、周雪梅博士、李鸿翼硕士及以毕业的王红霞硕士、李少英硕士、王陆宝硕士、李永强硕士、李贺硕士、操胜硕士在实验中给与的无私帮助以及在日常生活中的坦诚交流、支持和理解；感谢伊伟女士在实验准备过程中给予的大力支持与协助。

衷心感谢国家禽流感参考实验室陈化兰研究员、姜永萍副研究员、乔传玲副研究员、田国斌副研究员、邓国华副研究员、李雁冰副研究员、王秀荣副研究员以及施建忠老师和陈艳老师在实验、生活及学习中给予的关心、支持和帮助。

衷心感谢实验动物中心曲连东研究员、孟庆文副研究员、韩凌霞副研究员及姜影女士和董迎春女士，他们的大力协助使我的试验得以顺利进行。

衷心感谢基础服务与条件保障部的王岳老师、徐哮老师、刘霓红副研究员、尹训南副研究员、傅德霞副研究员、胡守萍助理研究员、张垚先生及吴合利先生给予的帮助和支持。

衷心感谢科研处王笑梅研究员、付朝阳副研究员、王靖飞副研究员、白侠老师、刘益民老师在生活和学习上给予的关心和鼓励。

向入学以来一直关心支持我的于子荣老师、安凤玲老师、杨建琳老师等研究生院的领导及教职员工致以衷心的感谢。

向三年来在生活、学习上给予我关照的哈尔滨兽医研究所的所有领导和老师们表示感谢。

感谢同窗好友焦培荣博士、朱启运博士、安同庆博士、张强博士、阎丽萍博士、祁小乐博士、王晓燕博士、全滢平博士、宫强博士王芳博士、李慧欣博士、周洁博士在学术和思想上的沟通和交流。

感谢妻子张芳芳博士多年来对我在工作、学习和生活中的沟通、支持、理解和鼓励。

最后，谨以此文献给我历经艰辛、生育和抚养我的父母！

本课题受黑龙江省自然科学基金重点项目“畜禽特异性细胞免疫评价技术和动物病毒致病机理的研究”(ZJN-0602-01)的资助，特此表示感谢。

作者简历

刘光亮, 男, 汉族, 中国共产党党员, 四川资中人。1996 年 9 月-2000 年 7 月在新疆农业大学动物医学学院兽医本科专业学习并获得学士学位; 2001 年 9 月-2004 年 7 月攻读新疆农业大学和哈尔滨兽医研究所预防兽医学联合培养硕士学位; 同年 9 月考取中国农业科学院研究生院预防兽医学专业博士研究生, 在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室进行博士课题研究, 从事畜禽分子与细胞免疫学研究工作。

发表论文

1. Guangliang Liu, Qun Wang, Yihong Xiao, Tiegang Tong, Donglai Wu. Construction and functional test of BF2-peptide tetramer. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. (Under Review)
2. 刘光亮, 童铁钢, 孟庆文, 吴东来. 鸡 β_2 微球蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的高效表达. *中国兽医学报*, 2007, 27 (5): 1-4.
3. 刘光亮, 童铁钢, 王群, 肖一红, 孟庆文, 吴东来. 鸡MHC I α -生物素化序列融合基因的构建、表达及纯化. *农业生物技术学报*, 2006, 14 (5): 662-668.
4. 刘光亮, 童铁钢, 王群, 肖一红, 孟庆文, 吴东来. H5 亚型禽流感病毒NP基因重组质粒的构建及其在Hela细胞瞬时表达. *中国兽医科学*, 2006, 36 (3): 189-192.
5. 王群, 刘光亮, 童铁钢, 肖一红, 吴东来. 鸡 γ -干扰素的实时定量RT-PCR检测方法的建立. *中国兽医科学*, 2007, 37 (6): 461-465.
6. 童铁钢, 刘光亮, 王群, 肖一红, 孟庆文, 吴东来. 马白细胞介素 12 在原核系统中的表达及其纯化. *畜牧兽医学报*. 2007, 38 (3): 307-312.
7. 孟庆文, 刘光亮, 于康震, 童光志, 刘娣, 施建忠, 陈化兰. H5 亚型禽流感病毒HA基因在昆虫/杆状病毒表达系统的表达及对BALB/c小鼠的保护. *科技导报*, 2006, 24: 5-8.
8. 操胜, 刘光亮, 孟庆文, 杨增歧, 亓文宝, 于康震, 吴东来. 通过载体表达siRNAs抑制禽流感病毒复制的研究. *科技导报*, 2006, 24: 9-13.
9. 张芳芳, 姜永萍, 刘光亮, 陈怀涛, 乔传玲, 陈化兰. 表达禽流感病毒H5HA、H7HA基因DNA疫苗的免疫原性研究. *预防兽医学报*, 2006, 28: 1-5.
10. 孟庆文, 刘光亮, 施建忠, 吴东来, 陈化兰. 禽流感H5 亚型基因工程亚单位疫苗对哺乳动物的免疫保护. *中国种禽业*. 2005, 8: 43-44.
11. 童铁钢, 刘光亮, 徐树兰, 王群, 肖一红, 孟庆文, 吴东来. 马 β_2 -微球蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的高效表达与纯化. *中国兽医科技*, 2005, 35: 851-855.
12. 张芳芳, 刘光亮, 姜永萍, 陈化兰, 陈怀涛. 禽流感病毒H5HA, H7HA基因共表达核酸疫苗质粒的构建及其在体外的表达. *动物医学进展*, 2004, 25: 107-110.

13. 肖一红, 刘光亮, 王群, 童铁钢, 白宇, 孟庆文, 吴东来. 猪 MHC- α 生物素化序列融合基因的构建、表达与纯化. *中国兽医学报*, 已接受.
14. 肖一红, 刘光亮, 童铁钢, 王群, 孟庆文, 吴东来. 猪 2-微球蛋白基因在大肠埃希氏菌中的表达与纯化. *中国兽医杂志*, 已接受.
15. Yihong Xiao, Qingwen Meng, Xunnan Yin, Yuntao Guan, Yonggang Liu, Changwen Li, Guangliang Liu, Tiegang Tong, Linfa Wang, Xiangang Kong, Donglai Wu. The clinical pathology of experimental infected civets by SARS-CoV. Submitted to Journal of comparative pathology. (Under Review)
16. 白宇, 童铁钢, 刘光亮, 肖一红, 王群, 徐树兰, 张维军, 吴东来. 马 γ -干扰素成熟蛋白基因在大肠埃希氏菌中表达及其多克隆抗体制备, *中国预防兽医学报*. (已接受)
17. 白宇, 童铁钢, 刘光亮, 肖一红, 王群, 徐树兰, 张维军, 吴东来. 马 γ -干扰素单克隆抗体的制备及其特性的鉴定, *农业生物技术学报*. (已接受)
18. 童铁钢, 白宇, 徐树兰, 刘光亮, 肖一红, 王群, 张维军, 吴东来. 马白细胞介素-18单克隆抗体的制备及其特性的初步鉴定, *农业生物技术学报*. (已接受)