

# 恒河猴 MHC-I 类分子 Mamu-A\*02 与猴免疫缺陷病毒抗原表位复合物的纯化和晶体学分析

戴连攀<sup>1,2</sup>, 周斌<sup>1</sup>, 齐建勋<sup>1</sup>, 马颖<sup>1</sup>, 高福<sup>1</sup>, 杨希才<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

**摘要:** 恒河猴是研究人免疫缺陷型病毒(HIV)感染与获得性免疫缺失综合征(AIDS)疫苗研制的最为重要的动物模型, 其组织相容性复合体(MHC)结构的解析将有助于了解 HIV 免疫逃逸机制。本研究克隆了 1 个恒河猴 MHC-I 类分子 Mamu-A\*02 轻链( $\beta_{2m}$ )基因并插入到 pET21a(+)原核表达载体中, 成功构建了重组表达质粒 pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$ 。pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$ 和之前构建好的恒河猴 Mamu-A\*02 重链( $\alpha$ )重组质粒 pET21a(+)- $\alpha$ 分别转入 BL21(DE3)大肠杆菌表达体系中, IPTG 诱导表达。Mamu-A\*02 重链和猴  $\beta_{2m}$  目的蛋白在 BL21(DE3)中以包涵体形式表达。重链、轻链的包涵体蛋白和 Mamu-A\*02 限制的猴免疫缺陷病毒(SIV)Nef 表位多肽(YY9)通过稀释法共复性。高纯度的复合物蛋白经分子筛层析和阴离子交换层析纯化后获得。复合物晶体利用悬滴法筛选并优化, 并在 0.1 mol/L BIS-TRIS (pH 5.5)、2.0 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  条件下收集一套 2.8 Å 分辨率的 X-射线衍射数据。晶体属于正交空间群  $P2_12_12_1$ , 其晶胞参数为  $a=128.99$  Å,  $b=129.01$  Å,  $c=129.03$  Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 。该数据可通过分子置换法解析。

**关键词:** 猴免疫缺陷病毒(SIV), Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物, 蛋白表达与纯化, X-射线晶体学

## Purification, crystallographic analysis of rhesus MHC-I Mamu-A\*02 complexed with simian immunodeficiency virus nonapeptide

Lianpan Dai<sup>1,2</sup>, Bin Zhou<sup>1</sup>, Jianxun Qi<sup>1</sup>, Ying Ma<sup>1</sup>, George F Gao<sup>1</sup>, and Xicai Yang<sup>1</sup>

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

**Abstract:** Rhesus macaque (*Macaca mulatta*) is the best model to study of human immunodeficiency virus (HIV) infection and to develop acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) vaccine. The crystal structure of its major histocompatibility antigen complex (MHC) is helpful to understand the mechanism of HIV immune evasion. In this study, we cloned the light chain ( $\beta_{2m}$ ) of MHC class I allele of rhesus macaques, Mamu-A\*02, and inserted it into pET21a(+) vector. We transfected the recombinant plasmid pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$  and pET21a(+)-Mamu- $\alpha$  into BL21(DE3). Mamu-A\*02 and  $\beta_{2m}$  were expressed in the form of inclusion bodies in BL21 (DE3). We co-refolded the inclusion bodies of Mamu- $\alpha$  and Mamu- $\beta_{2m}$  with SIV nonapeptide YY9 and obtained the

Received: May 5, 2009; Accepted: May 15, 2009

Supported by: National Natural Sciences Foundation of China (No. 30671903).

Corresponding author: Xicai Yang. Tel: +86-10-64807398; Fax: +86-10-64807598; E-mail: yangxc@im.ac.cn;

George F Gao. Tel: +86-10-64807688; E-mail: gaof@im.ac.cn

国家自然科学基金项目(No. 30671903)资助。

correct refolded protein complex. Then we purified the protein complex by the gel filtration and anion-exchange column. With hanging-drop method, we screened and optimized for the protein crystal. We managed to collect a X-ray diffraction with the resolution to 2.8 Å in the condition of 0.1 mol/L BIS-TRIS (pH5.5), 2.0 mol/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. This crystal belong to perpendicular space group P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, with unit-cell parameters a=128.99 Å, b=129.01 Å, c=129.03 Å. This data is available for the structure determination.

**Keywords:** simian immunodeficiency virus (SIV), Mamu-A\*02-Nef\_YY9 complex, protein expression and purification, X-ray crystallography

主要组织相容性复合物(Major histocompatibility antigen complex, MHC)是免疫系统识别自我与非自我的主要分子<sup>[1]</sup>。其中 MHC-I 分子在所有的有核细胞及血小板表面组成型表达。当体内细胞出现病毒感染或者产生突变蛋白时,细胞表面的 MHC-I-多肽复合物拷贝数将大量增加,免疫系统区分非自身的 MHC-I-多肽复合物,从而清除这些细胞。胞内合成的抗原蛋白往往被加工成 8~11 个氨基酸的短肽与 MHC-I 的重链和轻链形成复合物运送到细胞表面,被 T 细胞受体(T-Cell Receptor, TCR)识别,从而激活细胞毒 T 淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocyte CTLs),杀伤靶细胞。CTLs 杀伤作用被公认为是免疫系统清除病毒感染最有效的手段。Human immunodeficiency virus (HIV) 自从 1981 年被发现以来,至今已有 20 多年的研究历史。然而,科学家仍然没有研制出有效的途径来预防和根治由它引起的严重的获得性免疫缺陷综合征。SIV(Simian immunodeficiency virus)感染的恒河猴(*Macaca mulatta*)是目前研究 AIDS 病最好的模式动物<sup>[2-4]</sup>。SIV 与 HIV 基因高度同源,且 2 种病毒 SIV/HIV 都对嗜性 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞具有相似的致病过程<sup>[5-7]</sup>。由于人和恒河猴的 MHC-I 类分子同源性很高,具有保守的多肽锚定特性<sup>[7]</sup>,因此国际上大都使用 SIV 感染的恒河猴来研究 AIDS 的致病机理和开发疫苗,通过研究基于 CTL 的细胞学免疫从而有效清除 HIV。

Chu 等解析出了恒河猴 Mamu-A\*01 的重链与人的轻链  $\beta_{2m}$  以及 SIV 表位多肽复合体的结构<sup>[8,9]</sup>。然而由于 Mamu-A\*01 这种恒河猴 MHC-I 亚型只占种群频率的 22%,研究常常受到恒河猴这种模式动物来源和数量的限制,此外同一个恒河猴个体常常杂合表达 2 种 MHC-I A 类亚型,比如 Mamu-A\*01、Mamu-A\*02 亚型同时存在于一个恒河猴个体内,其抗病毒表位特异的 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞反应比纯合个体更强<sup>[10]</sup>,因此仍然亟需研究恒河猴其他 MHC-I 类

亚型的抗原递呈特点。Mamu-A\*02 是一个恒河猴 MHC-I 的高频亚型,约占种群频率的 20%,同时近年来其特异性表位也陆续被报道<sup>[11-13]</sup>。因此 Mamu-A\*02 递呈表位的晶体学结构特点研究显得十分重要。

多肽 YTSGPGIRY(以下简称 YY9)来源于 SIV Nef 蛋白 159~167 位氨基酸,已被鉴定为 Mamu-A\*02 的特异性表位,拥有很强的 Mamu-A\*02 结合能力和 CTL 效应。因此,YY9 是一个研究 Mamu-A\*02 复合物递呈表位的晶体学结构特点的理想多肽。同时,报道发现在 SIV 感染恒河猴之后的几周内,编码 YY9 的序列便发生突变。突变后的表位激发 CTL 杀伤效应的能力显著下降<sup>[13]</sup>。因此,研究 YY9 表位被 Mamu-A\*02 递呈的晶体结构为找到 SIV 的免疫逃逸机制提供了基础。

为了研究 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物的晶体结构,本实验室克隆表达了 Mamu-A\*02 重链胞外段蛋白和恒河猴  $\beta_{2m}$  去信号肽区蛋白。复性并纯化了复合物蛋白。利用蛋白结晶技术成功获得了具有良好衍射能力的 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物蛋白晶体,并获得衍射数据,为进一步解析第一个完整的恒河猴多肽 MHC-I 复合物蛋白结构(Mamu-A\*02-Nef\_YY9)提供数据,为研究 Mamu-A\*02 抗原递呈特性和 SIV 免疫逃逸机制提供了结构基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

重组质粒 pET21a(+)-Mamu- $\alpha$  由本实验室构建<sup>[14]</sup>,表达 Mamu-A\*02 重链。重组质粒 pGMT7-human- $\beta_{2m}$  由本实验室构建。原核表达载体 pET21a(+)从 Novagen 公司购得。SIV 表位 Nef159-167:YTSGPGIRY(简称为 YY9)由中科亚光公司合成,经过反相 HPLC 纯化,纯度>90%。分子筛 Hiload16/60 Superdex75 由 GE Healthcare 公司生产,阴离子交换

柱 Resource Q 由 Amersham Bioscience 公司生产。结晶试剂盒 Index kit (HR2-144) 购于 Hampton Research。蛋白浓度测定试剂盒 (BCA Protein Assay Kit) 购自 Pierce 公司, SDS-PAGE 低分子量标准蛋白购自上海生工公司。

## 1.2 Mamu-A\*02 重链、Mamu- $\beta_{2m}$ 蛋白的克隆、原核表达

重组质粒 pET21a(+)-Mamu- $\alpha$  编码含有恒河猴 MHC Mamu-A\*02 胞外部分的 1~276 个氨基酸。根据人与恒河猴  $\beta$  微球蛋白基因序列的比对 (GenBank Accession No. AAR01874.1), 将表达人  $\beta_{2m}$  质粒 pGMT7-human- $\beta_{2m}$  通过设计搭桥引物引入 9 个定点突变, 双酶切后把目的片段连入 pET21a(+) 原核表达载体中。构建重组质粒 pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$ , 表达恒河猴截去信号肽区后的 1~99 个氨基酸, 酶切位点为 *Xho* I、*Nde* I。重组质粒 pET21a(+)-Mamu- $\alpha$  和 pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$  经过双酶切和测序鉴定。

将重组质粒 pET21a(+)-Mamu- $\alpha$ 、pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$  转化大肠杆菌 BL21(DE3), 37°C、1 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h。通过超声波裂解细菌, 20 000  $\times$  g 离心, 分别收集细菌裂解液上清和沉淀。SDS-PAGE 鉴定蛋白的表达。

用 20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT 和 0.5% Triton X-100 组成的洗涤缓冲液洗包涵体沉淀 3 遍。重链和轻链的包涵体分别溶解于 pH 8.0 的 8 mol/L 尿素和 10 mmol/L Tris-HCl 组成的包涵体溶解液中, -20°C 保存。

## 1.3 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物蛋白的共复性和纯化

Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物的制备方法参照 Garboczi<sup>[15]</sup>的方法, 本实验室在其方法的基础上进行了改进<sup>[16]</sup>。即: 于 4°C 冷库中配置 Tris-HCl、L-Arg HCl、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG) 复性体系 (100 mol/L Tris-HCl pH 8.0、400 mol/L L-Arg HCl、2 mol/L EDTA、5 mol/L GSH、0.5 mol/L GSSG、0.5 mol/L PMSF)。将 Mamu-A\*02 重链和 Mamu- $\beta_{2m}$  包涵体分别溶解于上样缓冲液中 (3 mol/L Guanidine-HCl, 10 mmol/L NaAc, 10 mmol/L EDTA), 多肽 SIV-Nef\_YY9 溶解于 DMSO 中。Mamu-A\*02 重链、多肽、Mamu- $\beta_{2m}$  按照摩尔比 1:1:1 在复性体系中进行稀释复性。其中重链分 3 次加入, 每次加

样之间间隔 8 h 以上, 得到正确折叠的可溶性 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物。

浓缩换液后通过分子筛 Hiload16/60 Superdex75 和阴离子交换柱 Resource Q 纯化 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物。分子筛缓冲液为 C[20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、50 mmol/L NaCl]; 离子交换缓冲 A 液为 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、10 mmol/L NaCl, B 液为 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1 mol/L NaCl。收集的目的蛋白峰置于 Amicon Ultra-15 10 kD 浓缩离心管 (Millipore) 中离心浓缩, 同时换为缓冲液 C, 通过 SDS-PAGE (15% 分离胶) 检测。制备的纯化蛋白通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度, 置于冷柜中储存 (液氮快速冷冻后转入 -80°C), 用于蛋白结晶。

## 1.4 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物的晶体生长

采用悬滴式扩散法进行复合物蛋白结晶, 初筛试剂来源于 Hampton Research 公司的 Index 试剂盒。用缓冲液 C 将纯化的复合物蛋白 (45 kD) 稀释成 5 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL 和 20 mg/mL, 将 1  $\mu$ L 蛋白溶液与 1  $\mu$ L 池液混匀, 同 200  $\mu$ L 的池液进行气相平衡, 静置于 18°C 晶体柜中恒温生长。根据初筛条件改变沉淀剂浓度、盐浓度、pH 值以及蛋白浓度进行优化, 最终获得可供衍射的晶体。

## 1.5 X 射线衍射、数据收集和初步处理

复合物晶体首先用尼龙套圈 (Loop) 捞出, 然后在含有 30% 甘油的池液中浸泡约 30 s, 最后用液氮气将其快速冷冻到 -173°C<sup>[17]</sup>。衍射数据用 Rigaku Micromax007HF 旋转阳极 X-射线发生器 (40 kV, 30 mA;  $\lambda=1.5418$  Å) 和 R-AXIS IV++ 图像盘收集。衍射数据用 HKL2000<sup>[18]</sup> 进行处理。

## 2 结果

### 2.1 Mamu-A\*02 重链、 $\beta_{2m}$ 基因克隆产物的鉴定

用 *Xho* I 和 *Nde* I 双酶切鉴定重组质粒 pET21a(+)-Mamu- $\alpha$  和 pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$ , 1% 琼脂糖凝胶电泳显示得到了与预期目的片段大小一致的条带。Mamu- $\alpha$  条带大小约为 830 bp, Mamu- $\beta_{2m}$  条带大小约为 300 bp (图 1)。将重组质粒送交北京英骏公司进行 DNA 测序, 对测序结果做 Blast 分析, 重组表达载体中表达的序列与 GenBank 里公布的序列完全一致, 各连接位点以及阅读框架正确。

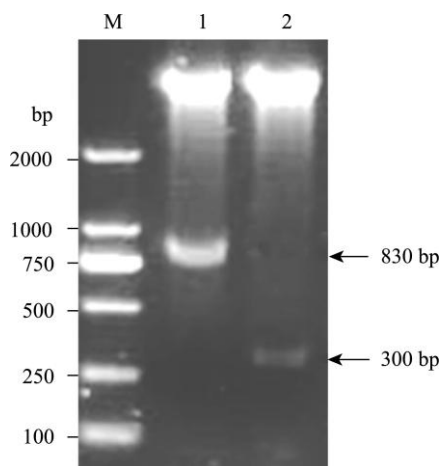


图 1 大肠杆菌 Mamu- $\alpha$  重链、Mamu- $\beta_{2m}$  表达质粒的双酶切鉴定图谱

Fig. 1 Digestion of Mamu- $\alpha$  and Mamu- $\beta_{2m}$  expressing plasmid of *E. coli* with double restriction enzymes. M: DNA marker; 1: pET21a(+)-Mamu- $\alpha$ /Nde I & Xho I; 2: pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$ /Nde I & Xho I.

## 2.2 Mamu-A\*02 重链、恒河猴 $\beta_{2m}$ 包涵体形式的表达和纯化

通过 IPTG 分别诱导转化了表达载体 pET21a(+)-Mamu- $\alpha$ 、pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$  的宿主菌 pET21a(+)-Mamu- $\alpha$ /BL21(DE3) 和 pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$ /BL21(DE3), 200 r/min、37°C、诱导 4 h。收集细菌, 超声裂解后, SDS-PAGE 检测。发现两者均存在于超声裂解沉淀中, 即以包涵体形式表达, 前者在 33 kD 左右有一条明显的目的蛋白带, 后者在 12 kD 左右有一条明显的目的蛋白带(图 2)。包涵体沉淀通过洗涤后, 纯度可达 80%。

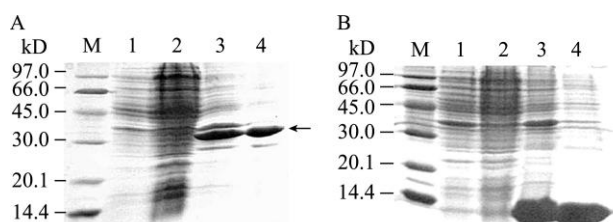


图 2 SDS-PAGE 分析 Mamu-A\*02 重链和恒河猴  $\beta_{2m}$  的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of Mamu-A\*02 heavy chain and Mamu- $\beta_{2m}$ . M: low molecular weight protein markers. (A) Determination of the Mamu-A\*02 heavy chain expression. 1: non-induced BL21(DE3); 2: supernatant of IPTG induced pET21a(+)-Mamu- $\alpha$ /BL21; 3: pellets of IPTG induced pET-21a(+)-Mamu- $\alpha$ /BL21; 4: inclusion bodies of Mamu-A\*02 heavy chain protein. (B) Determination of the Mamu- $\beta_{2m}$  expression. 1: non-induced BL21(DE3); 2: supernatant of IPTG induced pET21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$ /BL21; 3: pellets of IPTG induced pET-21a(+)-Mamu- $\beta_{2m}$ /BL21; 4: inclusion bodies of Mamu- $\beta_{2m}$  protein.

## 2.3 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物蛋白的纯化

通过稀释复性法对 Mamu-A\*02 重链、恒河猴  $\beta_{2m}$  与九肽 YY9 共复性。包涵体形式的重链、轻链蛋白在复性液中重新折叠, 得到正确折叠的复合物蛋白。将得到的复合物蛋白上样至 Hiload16/60Superdex75 柱进行分子筛层析, 得到 3 个峰(图 3A)。取每个峰的收集液经还原性 15% SDS-PAGE 鉴定, 1 号峰为非天然存在的聚合物, 2 号峰为复合物目的蛋白(45 kD), 3 号峰为未复合多余的恒河猴  $\beta_{2m}$ 。其中以 2 号峰为主。将 2 号峰的蛋白收集浓缩以后, 再上样至 Resource Q 柱进行阴离子交换, 得到 1 个平滑对称的单峰(图 3B), 被 15~25 mol/L 的 NaCl 洗脱。主峰收集液通过 15% SDS-PAGE 鉴定, 为 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物蛋白, 纯度大于 95%。

## 2.4 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物蛋白的晶体生长

晶体的生长通过 Index 试剂盒共 96 个条件的池液进行初筛, 7 d 后观察, 池液条件为 0.1 mol/L BIS-TRIS (pH 5.5), 2.0 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  长出的晶体外观呈现方块状, 表面光滑、厚实(图 4), 蛋白浓度包括 5、10、15、20 mg/mL, X-射线衍射证实是蛋白晶体。以此结晶条件, 改变缓冲液 BIS-TRIS 的 pH 值和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的浓度建立优化梯度池液矩阵, 2  $\mu\text{L}$  15 mg/mL 复合物蛋白溶液混合 2  $\mu\text{L}$  优化池液长晶体, 3 d 左右晶体出现, 1 周达到合适体积(0.15 mm $\times$ 0.15 mm $\times$ 0.1 mm), 用以 X 射线衍射。

## 2.5 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物晶体衍射数据的收集和初步处理与分析

Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物晶体的衍射数据采用 Rigaku 单晶 X-射线衍射仪收集, 其衍射花样如图 5 所示。晶体衍射数据统计见表 1。在 2.8 Å 时, 衍射数据的完整度为 99.6%, R<sub>sym</sub> 值为 0.074。晶体属于正交空间群 P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, 晶胞参数为 a=128.99 Å, b=129.01 Å, c=129.03 Å。每个不对称单元中含有 3 个分子(每个 45 kD), Matthews 系数是 3.22 Å<sup>3</sup>Da<sup>-1</sup>, 对应的溶剂含量为 69.08%<sup>[19]</sup>。Mamu-A\*02-Nef\_YY9 的晶体结构已经用分子置换法解析(模型是 Mamu-A\*01 复合物的晶体结构, PDB ID 为 1ZVS)。

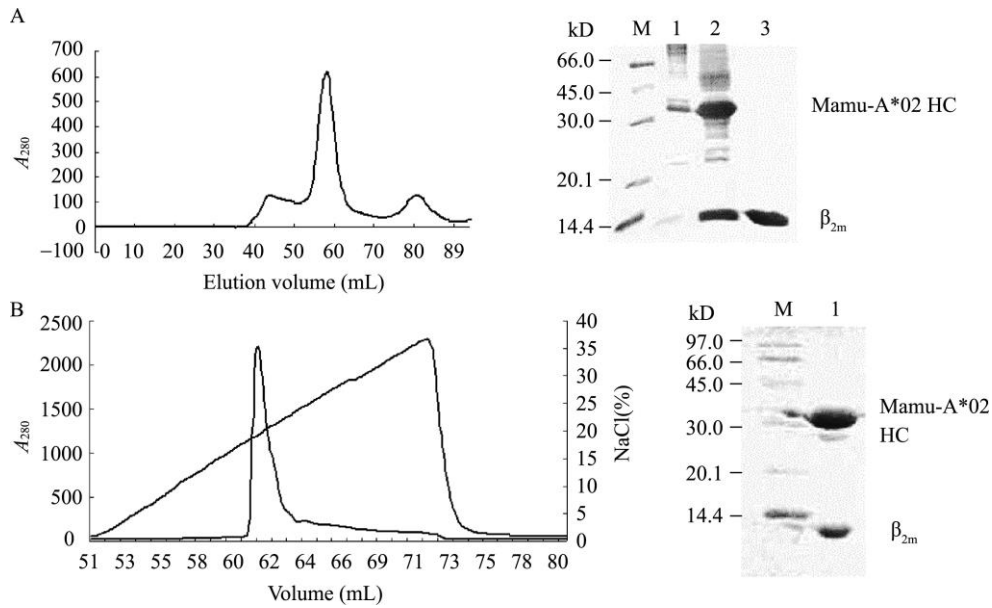


图3 Mamu-A\*02-Nef\_YY9复合物蛋白复合物蛋白纯化

Fig. 3 Purification of the refolded complex of Mamu-A\*02 heavy chain with Mamu- $\beta_{2m}$  and Nef\_YY9 peptide by FPLC Superdex 75 16/60 gel filtration and Resource-Q anion-exchange chromatography. The peaks were collected and determined by reduced SDS-PAGE. (A) The gel filtration profile of the refolded product. Peak 1 represents aggregated heavy chains; Peak 2 represents correctly refolded complex (45 kD); Peak 3 represents abundant Mamu- $\beta_{2m}$ . Lane 1, lane 2, lane 3 represent the SDS-PAGE results for their corresponding peaks. (B) Anion-exchange profile of further purification of the refolded complex (peak 2 in (A)). Peak 1 represent the Mamu-A\*02-Nef\_YY9 complex with its elution NaCl concentration between 15–25 mol/L. Lane 1 represents SDS-PAGE results for peak 1.



图4 Mamu-A\*02-Nef\_YY9复合物蛋白晶体

Fig. 4 Crystals of Mamu-A\*02-Nef\_YY9 complex grown at 291 K using the vapor diffusion method in hanging drop mode.

### 3 讨论

完全组装的MHC-I分子由3部分组成: I类分子重链、 $\beta_{2m}$ 微球蛋白以及抗原表位肽。重链包括胞外区、跨膜区、胞内区以及信号肽区间, 由于跨膜区含有大量疏水性氨基酸, 不利于蛋白堆积晶体生长, 同时跨膜区和胞内区不参与表位多肽的递呈, 因此在纯化蛋白生长晶体时一般把跨膜区及其以下的胞内区截去构建表达载体。同时由于信号肽区也不参

与复合物多肽的递呈, 因此也予以截去。因此本研究的表达载体为截去信号肽后编码 Mamu-A\*02 胞外区的1~276个氨基酸的DNA序列和截去信号肽后编码猴  $\beta_{2m}$  1~99个氨基酸的序列。多肽 YY9 (YTSGPGIRY)来源于SIV Nef蛋白的159~167号氨基酸,

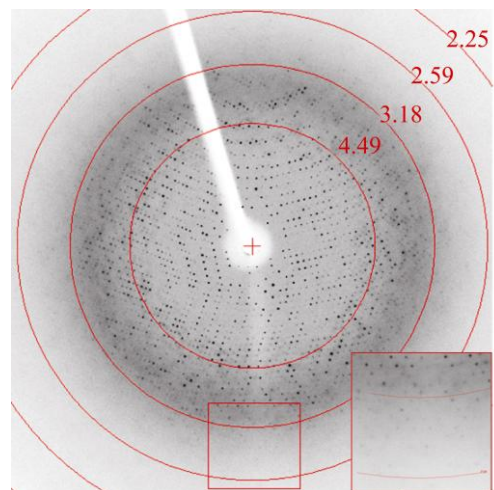


图5 Mamu-A\*02-Nef\_YY9复合物蛋白晶体X-射线衍射图  
Fig. 5 X-ray diffraction image of Mamu-A\*02-Nef\_YY9 complex.

**表 1 Mamu-A\*02-Nef\_YY9 复合物晶体衍射数据**  
**Table 1 Data-collection and processing statistics of the Mamu-A\*02-Nef\_YY9 complex**

Unit-cell parameters (Å)	a=128.99, b=129.01, c=129.03 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Resolution (Å)	50.0–2.8 Å (2.9–2.8 Å)*
No. of reflections	376798
Unique reflections	53070
Completeness (%)	99.6 (100)*
Average I/σ (I)	37.2 (4.75)*
Rsym	0.074 (0.074)*
Redundancy	7.1 (7.0)*

\* Numbers in parentheses correspond to the highest resolution shell.

YY9 表位在 SIV 感染 Mamu-A\*02 亚型恒河猴的急性期出现, 但其引起的特异性 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞效应在急性期有所下降, 经过文献报道, 测序发现表达 YY9 的 VDNA 序列出现非同义位点突变, 导致 YY9 多肽有单一位点突变, 进入感染的慢性期后, YY9 出现多个位点突变, 导致其特异性的 CTL 急速下降至很低水平。这说明宿主体内的 CTL 压力对于病毒进化产生了强大的选择压力, 导致在感染的早期就出现了 YY9 的逃逸株, 最终变异病毒占据优势, 从而导致宿主患上 AIDS 综合征。病毒表位的逃逸往往通过影响宿主对表位的加工, 多肽与 MHC-I 的锚定, MHC 递呈多肽给 TCR 识别来达到。病毒这种逃逸 CTL 的杀伤机制, 成为基于 CTL 疫苗策略的一个严重障碍。而 SIV Gag 蛋白来源的另一个 Mamu-A\*02 表位 GY9 在 SIV 感染后的急性期和慢性期都不发生突变, 这说明该表位可能是致死突变或者对复制有很大影响<sup>[13]</sup>。因此, 利用 SIV 感染的 Mamu-A\*02 恒河猴模型研究 CTL 的逃逸机制和疫苗开发策略十分理想。

本课题组前期工作中解析了 Mamu-A\*01 递呈表位多肽的结构, 揭示了第一个非人灵长类动物 MHC-I 表位递呈特性<sup>[9]</sup>。然而由于使用的是人的  $\beta_{2m}$  与重链复合, 因此还不能完全反应其天然递呈状况。虽然为了研究方便常常用不同种属来源的  $\beta_{2m}$  来研究 MHC-I 的结构和功能, 然而异种的  $\beta_{2m}$  可能会改变 MHC-I 复合物的递呈状态。Adnane Achour 等发现, 相比于鼠  $\beta_{2m}$  与鼠 MHC-I 的复合物, 人  $\beta_{2m}$  与鼠 MHC-I 的复合物拥有更高的稳定性和更强的多肽结合能力, 同时可能通过影响 CD8 分子与 pMHC

的结合进而影响 TCR 分子的识别强度<sup>[20]</sup>。本试验通过与 GenBank 里恒河猴的  $\beta_{2m}$  原始序列比对, 将人的  $\beta_{2m}$  突变成恒河猴  $\beta_{2m}$ 。此外, Mamu-A\*02 和 Mamu-A\*01 的同源性为 89%, 两者的表位特点不同<sup>[12]</sup>, 它们的抗原递呈特点也将有所不同。和之前的 MHC-I 类蛋白一样, Mamu-A\*02 重链和恒河猴  $\beta_{2m}$  都以包涵体形式表达。通过稀释复性法, 使得包涵体能够均匀地分布在复性体系里面, 大大降低了形成重链和轻链聚合体的可能。通过分子筛和离子交换可以得到高纯度的复合物蛋白。Mamu-A\*02 的复合物在分子筛缓冲液条件下 (pH 8.0, 20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl) 比较稳定, 能够在分子筛层析柱和离子交换柱中不解离, 但在非低温条件下, 重链容易发生降解, 特别是其  $\alpha 3$  结构域容易脱落, 故在 SDS-PAGE 分析时重链条带下方往往会有少量的降解带。因此, 为了满足晶体生长对于蛋白纯度的要求, 多肽 MHC-I 分子复合物蛋白在纯化之后立即进行晶体生长, 或者用液氮快速冷冻再转入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱冻存。高纯度的 pMHC-I 复合物除了应用来做晶体学研究以外, 还能够用于四聚体 (Tetramer) 染色实验。目前关于 Mamu-A\*02 表位的 T 细胞库方面的研究还是空白, 通过多肽-Mamu-A\*02 复合物进行 SIV 感染的恒河猴血液的四聚体实验便能够分离和鉴定出该表位的 T 细胞库, 找出其特异的受体 TCR 类型。

**致谢** 感谢刘军、陈勇和张建华同学给予的帮助和指导。

## REFERENCES

- [1] Shreffler DC. Seventy-five years of immunology: The view from the MHC. *J Immunol*, 1988, **141**: 1791–1798.
- [2] Johnson RP. Macaque models for AIDS vaccine development. *Curr Opin Immunol*, 1996, **8**: 554–560.
- [3] Stott J, Almond N. Assessing animal models of AIDS. *Nat Med*, 1995, **1**: 295–297.
- [4] Allen TM, Sidney J, Guercio MF, et al. Characterization of the peptide binding motif of a rhesus MHC class I molecule (Mamu-A\*01) that binds an immunodominant CTL epitope from simian immunodeficiency virus. *J Immunol*, 1998, **160**: 6062–6071.
- [5] Chakrabarti L, Guyader M, Alizon M, et al. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature*, 1987, **328**: 543–547.

- [6] Franchini G, Gurgo C, Guo HG, *et al.* Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses. *Nature*, 1987, **328**: 539–543.
- [7] Dzuris JL, Sidney J, Appella E, *et al.* Conserved MHC class I peptide binding motif between humans and rhesus macaques. *J Immunol*, 2000, **164**: 283–291.
- [8] Chu F, Lou Z, Gao B, *et al.* Complex assembly, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of rhesus macaque MHC Mamu-A\*01 complexed with an immunodominant SIV-Gag nonapeptide. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2005, **61**: 614–616.
- [9] Chu F, Lou Z, Chen YW, *et al.* First glimpse of the peptide presentation by rhesus macaque MHC class I: Crystal structures of Mamu-A\*01 complexed with two immunogenic SIV epitopes and insights into CTL escape. *J Immunol*, 2007, **178**: 944–952.
- [10] Newberg MH, McEvers KJ, Gorgone DA, *et al.* Immunodominance in the evolution of dominant epitope-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocyte responses in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol*, 2006, **176**: 319–328.
- [11] Robinson S, Charini WA, Newberg MH, *et al.* A commonly recognized simian immunodeficiency virus Nef epitope presented to cytotoxic T lymphocytes of Indian-origin rhesus monkeys by the prevalent major histocompatibility complex class I allele Mamu-A\*02. *J Virol*, 2001, **75**: 10179–10186.
- [12] Loffredo JT, Sidney J, Wojewoda C, *et al.* Identification of seventeen new simian immunodeficiency virus-derived CD8<sup>+</sup> T cell epitopes restricted by the high frequency molecule, Mamu-A\*02, and potential escape from CTL recognition. *J Immunol*, 2004, **173**: 5064–5076.
- [13] Vogel TU, Friedrich TC, O'Connor DH, *et al.* Escape in one of two cytotoxic T-lymphocyte epitopes bound by a high-frequency major histocompatibility complex class I molecule, Mamu-A\*02: A paradigm for virus evolution and persistence? *J Virol*, 2002, **76**: 11623–11636.
- [14] Feng Y, Qi J, Zhang H, *et al.* X-ray crystallographic characterization of rhesus macaque MHC Mamu-A\*02 complexed with an immunodominant SIV-Gag nonapeptide. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2006, **62**: 13–15.
- [15] Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: Refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 3429–3433.
- [16] Zhou M, Xu Y, Lou Z, *et al.* Complex assembly, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of MHC H-2Kd complexed with an HBV-core nonapeptide. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, **60**: 1473–1475.
- [17] Parkin S, Hope H. Macromolecular cryocrystallography: Cooling, mounting, storage and transportation of crystals. *J Appl Cryst*, 1998, **31**: 945–953.
- [18] Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 1997, **276**: 307–326.
- [19] Matthews BW. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 1968, **33**: 491–497.
- [20] Achour A, Michaelsson J, Harris RA, *et al.* Structural basis of the differential stability and receptor specificity of H-2Db in complex with murine versus human beta2-microglobulin. *J Mol Biol*, 2006, **356**: 382–396.