

# 人 $\beta_2$ -微球蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的高效表达

何贤辉<sup>1</sup> 徐丽慧<sup>1,2</sup> 刘 毅<sup>1,3</sup> 曾耀英<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>( 组织移植与免疫教育部重点实验室(暨南大学)广州 510632 )

<sup>2</sup>( 暨南大学生物工程研究所 广州 510632 )

<sup>3</sup>( 郑州大学第一附属医院皮肤科, 郑州 450052 )

**摘 要**  $\beta_2$ -微球蛋白( $\beta_2m$ )是主要组织相容性复合体(MHC)Ⅰ类分子的轻链部分,为制备 MHC Ⅰ类分子四聚体的必要成分。根据已报道的序列设计特异引物,利用 RT-PCR 方法从人白细胞中克隆了  $\beta_2m$  基因,并构建了成熟  $\beta_2m$  的原核表达载体,在大肠杆菌中得到高效表达。表达的  $\beta_2m$  大部分在包涵体中,经洗涤、变性和复性,并以强阴离子交换柱层析纯化,获得 SDS-PAGE 纯的人重组  $\beta_2m$ 。Western 印迹法分析表明该蛋白具有与抗人天然  $\beta_2m$  抗体反应的特性。此工作为制备 MHC Ⅰ类分子四聚体奠定基础。

**关键词**  $\beta_2$ -微球蛋白,基因克隆,重组蛋白,包涵体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0099-05

主要组织相容性复合体(MHC)Ⅰ类分子四聚体技术(Tetramer technology)是近年来发展成熟的研究特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞免疫特性的重要技术<sup>[1-3]</sup>,该技术正在成为疫苗设计、肿瘤及自身免疫病治疗等研究领域必不可少的关键技术<sup>[3]</sup>。MHC Ⅰ类分子由一条分子量为 45 kD 的重链( $\alpha$ 链)和分子量 12 kD 的轻链( $\beta$ 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,具高度多态性,而轻链则为不变的  $\beta_2$ -微球蛋白( $\beta_2$ -microglobulin,  $\beta_2m$ )<sup>[4]</sup>。因此制备抗原特异性四聚体,除了需要某种特定的重链和抗原肽外,还需要大量纯化的  $\beta_2m$ <sup>[1,4]</sup>。为此,我们从人白细胞中克隆了  $\beta_2m$  基因,将表达成熟  $\beta_2m$  的基因克隆至原核表达载体,在大肠杆菌(*E. coli*)中获得了高效表达,建立了简便有效的  $\beta_2m$  包涵体复性方法,并对表达产物进行了纯化和鉴定,为进一步以基因工程方法制备 MHC Ⅰ类分子四聚体,以及研究 MHC Ⅰ类分子的结构与功能关系奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本校周天鸿教授惠赠;BL21(DE3)pLysS 和质粒 pET-3c 购自 Novagen;限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I、T4 DNA 连接酶、高保真 DeepVent DNA Taq 聚合酶等均为美国 New England Biolabs 产品;TRIzol 试剂、ThermoScript RT-PCR 系统购自 Invitrogen;QIAquick Gel Extraction Kit 与 QIAprep Spin Miniprep Kit 为德国 QIAGEN 公司产品;淋巴细胞分离液为挪威 NYCOMED 产品;兔抗人  $\beta_2m$  多抗(Protein A 柱纯化)购自 Antibody Diagnostica Inc;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 为北京中山产品;Q-Sepharose(Fast Flow)购自 Amersham;预染蛋白分子量标准为 Gibco 产品;IPTG、尿素等为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 人白细胞总 RNA 抽提及 cDNA 合成:**取健康成年志愿者肝素抗凝静脉血 3 mL,按常规方法以

收稿日期 2003-06-30,修回日期 2003-10-08。

基金项目 国家自然科学基金重点项目(No.30230350)和科技部重点基础研究发展规划项目(“973”资助(No.G2000057006))。

\* 通讯作者。 Tel 86-20-85220679; Fax 86-20-85221337; E-mail: zozms@jnu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),以 TRIzol 试剂提取总 RNA,直接进行逆转录反应。以 2  $\mu$ g 总 RNA 进行逆转录反应合成第一链 cDNA,反应体积为 20  $\mu$ L,其中包含 40 u RNase 抑制剂,1 mmol/L dNTP 混合物,2.5  $\mu$ mol/L Oligo(dT)<sub>20</sub> 及 15 u ThermoScript 逆转录酶,50℃ 反应 45 min 后,于 85℃ 温育 5 min 终止反应,合成的 cDNA 即可用于 PCR 扩增或存 -20℃。RNA 完整性以 1% 琼脂糖凝胶电泳及扩增管家基因 GAPDH 进行验证。

**1.2.2 PCR 扩增  $\beta_2$ m 基因及其克隆:**参照文献 [5] 报道  $\beta_2$ m 基因全序列设计引物,前向引物为 5'-ATATCCATATGCTCGCTCCGTGGCCTTAG-3', 逆向引物为 5'-AACTAGGGATCCTTACATGTCTCGATCCCAC-3', 引物由上海博亚(Bioasia)合成。PCR 反应在 50  $\mu$ L 总体积中进行,以 2  $\mu$ L cDNA 第一链为模板,反应条件为在 94℃ 变性 2 min 后开始循环,然后 94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环后,于 37℃ 延伸 10 min。PCR 产物以 *Nde* I + *Bam* H I 双酶切并以 QIAquick Gel Extraction Kit 从凝胶中回收,与 pET-3c 连接后,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,以碱裂解法从转化子中提取质粒,双酶切法筛选接入正确外源基因的转化子,QIAprep Spin Miniprep Kit 小量制备质粒,以 ABI377 自动 DNA 测序仪测定克隆的  $\beta_2$ m 基因序列(由 TaKaRa 公司测定)。

**1.2.3 成熟  $\beta_2$ m 表达载体的构建:**根据成熟  $\beta_2$ m 基因 5' 序列并进行优化使 G/C 含量降低,设计前向引物为 5'-ATATCCATATGATTCAACGTACTCCAAA AATTCAAGTTTACTCACGTCATCC-3', 逆向引物为 5'-CGACTGGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3', 以携带  $\beta_2$ m 基因全序列的 pET-3c 质粒为模板,按上述方法进行 PCR 扩增编码成熟  $\beta_2$ m 基因,经 *Nde* I + *Bam* H I 双酶切、连接至 pET-3c、转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞、筛选转化子,从阳性克隆中提取质粒测序鉴定。

**1.2.4  $\beta_2$ m 在 *E. coli* 中的表达、包涵体复性和纯化:**以测序验证的 pET- $\beta_2$ m 表达载体转化感受态 BL21(DE3)pLysS,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基,37℃ 振荡培养过夜,然后以 1:100 接种于含 50 mg/L 氨苄青霉素和 30 mg/L 氯霉素的 LB 中,37℃ 振

荡培养至  $A_{600}$  约为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 于 37℃ 诱导 4 h,离心收集菌体,以 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0,含 1 mmol/L EDTA,50 mg/L 蛋白酶抑制剂 PMSF 及 10 mmol/L DTT)重悬,在冰浴中以超声波破碎菌体,离心后分别收集上清和沉淀,其中沉淀部分(包涵体)以 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0,含 100 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L DTT 及 0.5% Triton X-100)重悬并经超声处理洗涤 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  $\beta_2$ m 以 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0,含 8 mol/L 脲和 1 mmol/L DTT)溶解,离心去不溶物后,对 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)透析使  $\beta_2$ m 复性<sup>[4]</sup>。复性产物上 Q-Sepharose 柱,以 0~100 mmol/L NaCl 线性梯度洗脱(Pharmacia GradiFrac System),合并含  $\beta_2$ m 的主峰级分,透析后以 Amicon Ultra-4 (MWCO10000)进行离心超滤浓缩。所有样品以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳进行分析。

**1.2.5 SDS-PAGE:**参照 Laemmli 的方法进行,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 15%,以考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白条带。

**1.2.6 Western 印迹法:**蛋白样品以 15% SDS-PAGE 进行电泳,然后以 15V 电压转移 16 h,将蛋白转移至硝酸纤维素膜(Bio-Rad),膜以封闭液(Tris-Buffered-Saline, pH 7.5,含 3% 小牛血清和 0.05% Tween 20)于 37℃ 振荡封闭 30 min,加入以封闭液稀释(1:800)的兔抗人  $\beta_2$ m 抗体,于 37℃ 温育 2 h,洗膜后加 1:2000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 于 37℃ 温育 1 h,洗

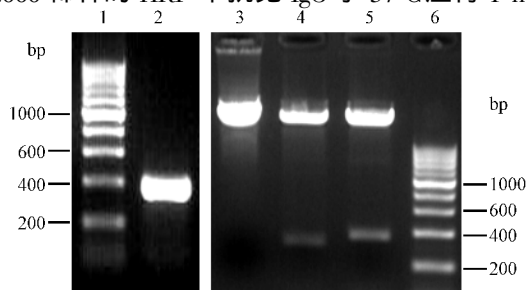


图 1 以 RT-PCR 方法从人白细胞中克隆  $\beta_2$ m 基因及成熟  $\beta_2$ m 表达载体的构建

Fig. 1 Cloning of  $\beta_2$ m gene from human leukocytes and construction of recombinant expression vector for mature  $\beta_2$ m  
1 6:200 bp DNA ladder; 2: RT-PCR product; 3: pET-3c/*Nde* I + *Bam* H I; 4: expression vector for mature  $\beta_2$ m/*Nde* I + *Bam* H I; 5: recombinant plasmid containing  $\beta_2$ m gene/*Nde* I + *Bam* H I  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

去二抗后以 4-氯-1-萘酚显色。

## 2 结 果

### 2.1 人 $\beta_2$ m 基因的克隆及其序列测定

根据 Parker 等<sup>[5]</sup>报道的  $\beta_2$ m 基因序列设计引物,以人白细胞总 RNA 逆转录第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应,扩增出一条与预计大小(360 bp)相符的 DNA 片段(图 1)。该片段经酶切后,与 pET-3c 连接,转化 DH5 $\alpha$ ,选取 3 个菌落抽提质粒,经酶切鉴定其中 2 个质粒已插入预计大小的外源片段(图 1, lane 5,显示其中一个),序列分析显示该基因即为  $\beta_2$ m 全长编码区基因,该基因已在 GenBank 登记,接受号为 AY187687。

### 2.2 表达成熟 $\beta_2$ m 的原核表达载体构建及鉴定

为在 *E. coli* 中表达成熟  $\beta_2$ m,以含  $\beta_2$ m 全基因的质粒为模板,经 PCR 方法扩增编码成熟  $\beta_2$ m 的 DNA 片段(长度 300 bp),经酶切、连接至 pET-3c 载体,筛选接入  $\beta_2$ m 基因的阳性克隆(图 1, lane 4)经测序验证插入序列为正确编码成熟  $\beta_2$ m 的基因,含

起始密码 ATG。获得的表达载体称 pET- $\beta_2$ m。

### 2.3 成熟 $\beta_2$ m 在 *E. coli* 中表达、包涵体复性和纯化

将构建的 pET- $\beta_2$ m 质粒转化 BL21(DE3) pLysS,得到含重组质粒的基因工程菌。SDS-PAGE 分析表明,该工程菌在未加 IPTG 诱导前就泄漏表达一定水平的分子量为 12 kD 外源蛋白(图 2, lane 3),而转入 pET-3c 空载体的 *E. coli* 在相同分子量部位的蛋白条带明显弱;经 IPTG 在 37℃ 诱导 4 h 后,分子量 12 kD 的外源蛋白表达水平大大提高(图 2, lane 4),该外源蛋白分子量与人成熟  $\beta_2$ m 一致。菌体经破碎后分为上清和沉淀,可见大部分重组蛋白以包涵体形式存在于沉淀部分(图 2, lane 6)。因此,沉淀部分经洗涤、脲溶解和透析复性后,以 Q-Sepharose 离子交换柱层析纯化(图 3),合并主峰各管并经超滤浓缩,以 Lowry 法测定蛋白浓度为 4.0 mg/mL,SDS-PAGE 分析表明该峰为纯的重组蛋白(图 2, lanes 8 and 9)。

### 2.4 重组 $\beta_2$ m 的 Western 印迹分析

Western 印迹分析显示,含 pET- $\beta_2$ m 的工程菌表达产物在分子量 12 kD 处的重组蛋白与抗人  $\beta_2$ m 抗体有特异性反应,而阴性对照(即转入 pET-3c 空载体的同一菌株)在 IPTG 诱导后,无任何特异性反应条带(图 2B, lane 2); $\beta_2$ m 大部分在沉淀中,仅有少量在上清可溶性部分。未经分离的混合物中在 27 kD 处显示的可能为非特异性条带,纯化后的  $\beta_2$ m 仅显示一条分子量为 12 kD 的特异性条带,说明纯化获得的重组  $\beta_2$ m 达到抗原性纯。

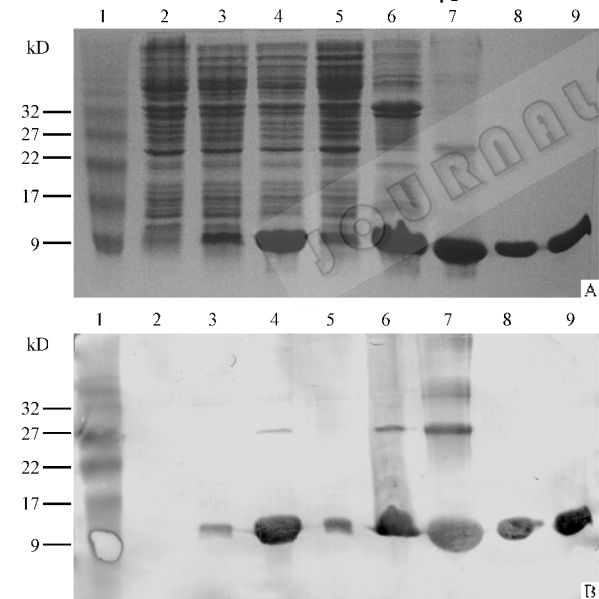


图 2 大肠杆菌中表达的  $\beta_2$ m 的 SDS-PAGE 和 Western 印迹鉴定

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analyses of mature  $\beta_2$ m expressed in *E. coli* BL21(DE3) pLysS strain (BL21)

1: prestained protein molecular weight marker; 2: BL21 (pET-3c) induced with IPTG for 4 h; 3: BL21 (pET- $\beta_2$ m) before IPTG induction; 4: BL21 (pET- $\beta_2$ m) induced with IPTG for 4 h; 5: supernatant of BL21 (pET- $\beta_2$ m) bacterial lysate; 6: pellet of BL21 (pET- $\beta_2$ m) bacterial lysate; 7: washed pellet (inclusion body); 8: purified  $\beta_2$ m (5  $\mu$ g); 9: purified  $\beta_2$ m (10  $\mu$ g)

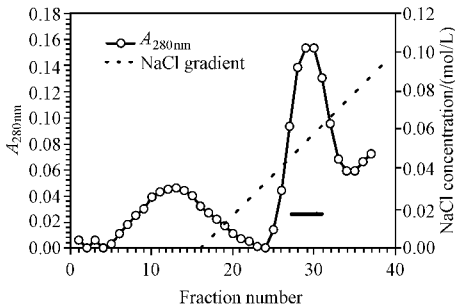


图 3 以 Q-Sepharose 离子交换柱层析纯化重组  $\beta_2$ m 结果  
Fig. 3 Purification of recombinant  $\beta_2$ m with Q-Sepharose column (2 cm  $\times$  8 cm) chromatography

The column was equilibrated with 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0). The sample dialyzed against the same buffer was loaded onto the column and eluted with 0 ~ 100 mmol/L NaCl linear gradient at a low rate of 1 mL/min. Fractions of 3 mL were collected. Bar indicates the pooled fractions

### 3 讨 论

$\beta_2m$  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提呈抗原肽必不可少<sup>[6,7]</sup>, 并且  $\beta_2m$  能促进抗原肽与细胞表面 MHC I 类分子的结合<sup>[8,9]</sup>; 它也是制备 MHC I 类分子四聚体的必要成分<sup>[1-3]</sup>。我们从人白细胞中克隆了  $\beta_2m$  全基因, 构建了成熟  $\beta_2m$  表达载体, 在 *E. coli* 中得到高效表达, 并对包涵体中  $\beta_2m$  进行了复性和纯化, 获得了高纯度的  $\beta_2m$ , 为特异性四聚体制备和探索 MHC I 类分子结构与功能关系提供了条件。

有关  $\beta_2m$  在 *E. coli* 中的表达国内也有报道, 其中一个研究报道在  $\beta_2m$  末端融合 His<sub>6</sub> 标签以便于纯化, 但未进行复性纯化<sup>[10]</sup>, 另一研究报道在  $\beta_2m$  上连接一段 OVA 肽<sup>[11]</sup>。与这些报道的设计不同, 我们构建的载体表达不带任何外源序列的成熟  $\beta_2m$ , 主要考虑到  $\beta_2m$  与 MHC I 类分子重链及抗原肽复性形成与天然相似的肽-MHC 复合体(pMHC), 需要天然的  $\beta_2m$ ; 如在末端连接其它外源氨基酸序列, 可能影响  $\beta_2m$  的整体构象<sup>[9]</sup>, 进而对 pMHC 的构象造成影响, 使获得的四聚体特异性发生改变, 不同于天然 pMHC I 类分子。可能基于这一理由, 一般利用不带外源序列的成熟重组  $\beta_2m$  构建 MHC I 类分子四聚体<sup>[1-3]</sup>。因此, 本研究获得的重组  $\beta_2m$  对于 MHC 四聚体的制备更为合适。其次, 我们通过对包涵体进行洗涤而进行初步纯化, 然后以离子交换柱层析进一步纯化, 获得了 SDS-PAGE 和 Western 印迹纯的  $\beta_2m$  重组蛋白, 复性和纯化都比较简便, 因此无需为了纯化方便而加入 His<sub>6</sub> 标签等外源序列, 避免外源序列对其构象带来影响。

我们构建的  $\beta_2m$  在 *E. coli* 中获得高效表达, 原因之一可能是该蛋白为只有 99 个氨基酸组成的小分子蛋白, 因而易于在原核系统表达; 另一重要原因可能是我们对  $\beta_2m$  基因 5' 密码进行无同突变, 保持氨基酸不变而降低了 G/C 含量<sup>[12]</sup>, 因而提高了表达水平。表达的  $\beta_2m$  大部分都在包涵体内, 这更利于纯化, 并且复性和纯化也较易进行, 这对于 MHC I 类分子四聚体的制备都是有利的<sup>[1,4]</sup>。

通过 Western 印迹法显示, 在转化空载体的 *E. coli* 中无任何阳性条带, 只有转入带有人  $\beta_2m$  基因载体的 *E. coli* 后才出现预计分子量大小的反应条

带, 因为检测所用的抗体为对人  $\beta_2m$  特异的 IgG, 这证明在 *E. coli* 中表达获得的重组蛋白为人  $\beta_2m$ 。由于  $\beta_2m$  为组成 MHC 的轻链结构成分, 除了通过 Western 印迹法等免疫学方法鉴定其抗原特性外, 无合适的生物活性测定方法, 只能通过构建 pMHC 复合体间接予以证明<sup>[4]</sup>。我们已经成功构建 MHC 重链分子原核表达载体, 并在大肠杆菌中得到高水平表达(未发表数据), 目前正在进行 MHC 四聚体的构建工作。

总之, 我们克隆了  $\beta_2m$  的基因并构建了原核表达载体, 同时, 建立了简便有效的  $\beta_2m$  包涵体复性和纯化方法, 为进一步大量工程化制备 MHC I 类分子四聚体及研究 pMHC 的功能奠定了基础。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [published erratum appears in Science 1998, 280(5371):1821]. *Science*, 1996, **274**: 94-96
- [2] Appay V, Rowland-Jones SL. The assessment of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *J Immunol Methods*, 2002, **268**: 9-19
- [3] Hugues S, Malherbe L, Filippi *et al.* Generation and use of alternative multimers of peptide/MHC complexes. *J Immunol Methods*, 2002, **268**: 83-92
- [4] 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
- [5] Parker KC, Silver ML, Wiley DC. An HLA-A2/beta 2-microglobulin/peptide complex assembled from subunits expressed separately in *Escherichia coli*. *Mol Immunol*, 1992, **29**: 371-378
- [6] Kozlowski S, Takeshita T, Boehncke WH *et al.* Excess  $\beta_2$ -microglobulin promoting functional peptide association with purified soluble class I MHC molecules. *Nature*, 1991, **349**: 74-77
- [7] Otten GR, Bikoff E, Ribaldo RK *et al.* Peptide and  $\beta_2$ -microglobulin regulation of cell surface MHC class I conformation and expression. *J Immunol*, 1992, **148**: 3723-3732
- [8] Shields MJ, Assefi N, Hodgson W *et al.* Characterization of the interactions between MHC class I subunits: a systematic approach for the engineering of higher affinity variants of (2-microglobulin. *J Immunol*, 1998, **160**: 2297-2307
- [9] Shields MJ, Kubota R, Hodgson W *et al.* The effect of human  $\beta_2$ -microglobulin on major histocompatibility complex I peptide loading and the engineering of a high affinity variant. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 8010-8018
- [10] Qian L(钱丽), Qian SB(钱书兵), Qian GX(钱关祥). Cloning and expression of human  $\beta_2m$ . *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), 2001, **17**: 384-

- [ 11 ] Qian L( 钱丽 ), Qian GX( 钱关祥 ). Induction of *in vivo* CTL immunity by OVA<sub>257-264</sub>- $\beta_2$ m fusion protein. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*( 细胞与分子免疫学杂志 ), 2002 , 18 : 439 - 441
- [ 12 ] Allan DSJ , Colonna M , Lanier LL *et al.* Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen ( HLA )-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* , 1999 , 189 : 1149 - 1155

## Cloning of Human $\beta_2$ -microglobulin Gene and Its High Expression in *Escherichia coli*

HE Xian-Hui<sup>1</sup> XU Li-Hui<sup>1 2</sup> LIU Yi<sup>1 3</sup> ZENG Yao-Ying<sup>1 \*</sup>

<sup>1</sup>( Key Laboratory of Tissue Transplantation and Immunology ( Jinan University ) , Ministry of Education , Guangzhou 510632 , China )

<sup>2</sup>( Institute of Bioengineering , Jinan University 601 Huangpu Road West , Guangzhou 510632 , China )

<sup>3</sup>( Department of Dermatology , the First Affiliated Hospital , Zhengzhou University , Zhengzhou 450052 , China )

**Abstract** Human  $\beta_2$ -microglobulin (  $\beta_2$ m ) is the light chain of major histocompatibility complex ( MHC ) class I molecule. High-yield production of this protein is a prerequisite to the preparation of MHC I tetramer. The present study aims to obtain recombinant human  $\beta_2$ m expressed in *Escherichia coli* ( *E. coli* ), for the purpose of preparing MHC class I tetramers. For cloning of human  $\beta_2$ m gene , a pair of specific primers was designed based on the published sequence of this gene and the cDNA of full coding region for  $\beta_2$ m precursor was obtained by RT-PCR from the total RNA of human leukocytes. The amplified cDNA was subsequently cloned and its sequence was confirmed by DNA sequencing analysis ( the sequence has been deposited in GenBank with accession number of AY187687 ). The prokaryotic expression vector containing a gene encoding mature  $\beta_2$ m was constructed by inserting the DNA fragment , which was generated by PCR reaction with the cloned  $\beta_2$ m gene as template , into an IPTG-inducible expression vector pET-3c plasmid. The first eight codons for N terminal amino acid residues of  $\beta_2$ m were optimized for its expression in *E. coli* . The complete sequence of  $\beta_2$ m gene in the expression vector was verified by DNA sequencing analysis. High-yield expression of  $\beta_2$ m was achieved in *E. coli* transformed with the expression vector , and most of the recombinant  $\beta_2$ m existed in the inclusion body after IPTG induction. The inclusion body was washed extensively and  $\beta_2$ m in the inclusion body was solubilized with 8 mol/L urea. The  $\beta_2$ m was refolded by dialysis and purified by ion-exchange chromatography ( Q-Sepharose ). Western blotting assay indicated that the polyclonal antibody against human native  $\beta_2$ m could react specifically with the recombinant protein. The purified protein appeared as a single band on both SDS-PAGE and Western blotting , indicating that it was chemical and antigenic pure. This work establishes a convenient approach for renaturation and purification of large quantity of recombinant  $\beta_2$ m which is identical to the native protein without any tags fused except for a methionine residue at the amino terminus. This provides the basis for the preparation of MHC tetramers.

**Key words**  $\beta_2$ -microglobulin ; gene cloning ; recombinant protein ; inclusion body

Received : 06-30-2003

This work was supported by grants from National Natural Science Foundation of China ( No. 30230350 ) and National Basic Research Priorities Program of China ( No. G2000057006 ).

\* Corresponding author. Tel 86-20-85220679 ; Fax : 86-20-85221337 ; E-mail : zozms@jnu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>