

超滤-高效液相色谱法检测 pHLA 复合物中的抗原肽

应婷, 程巧珍, 陈春, 廖学俊, 胡华军

中国计量大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310018

应婷, 程巧珍, 陈春, 廖学俊, 胡华军. 超滤-高效液相色谱法检测 pHLA 复合物中的抗原肽. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1209-1217.

YING T, CHENG QZ, CHEN C, LIAO XJ, HU HJ. Detection of the antigenic peptides in pHLA complexes by ultrafiltration-high performance liquid chromatography. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1209-1217.

摘要: 重组 HLA-I 类分子/抗原肽复合物 (pHLA 复合物) 在研究人类 T 细胞特异性免疫应答中有重要用途。pHLA 复合物的制备以基因工程及蛋白体外稀释折叠复性技术为基础, 在体外复性体系中重组 HLA-I 类分子正确折叠, 并结合抗原肽形成复合物。本研究建立了一种超滤-高效液相色谱法 (超滤-HPLC 法) 定量检测重组 pHLA 复合物中的抗原肽, 尤其针对少量制备产物中抗原肽的检测。通过将重组 HLA-I 类分子和抗原肽加入到复性缓冲液中, 使重组 HLA-I 类分子的重链 (heavy chain, HC) 与轻链 (β_2m) 复性折叠, 与含锚定残基的 VYF 抗原肽结合形成 pHLA 复合物, 经超滤去除未结合的游离抗原肽 VYF 而保留复合物, 最后将 pHLA 复合物经酸处理破坏其相互作用从而释放抗原肽, 再超滤收集 VYF 抗原肽并进行 HPLC 检测, 所测得的 VYF 抗原肽即为重组 HLA-I 类分子与抗原肽相互作用所结合的抗原肽。结果显示, 制备的重组 pHLA 复合物可被 HLA-I 分子构象特异性抗体 W6/32 识别, 这说明重组 HLA-I 类分子折叠构象正确, 可鉴定为 pHLA 复合物; 而超滤-HPLC 法也可检测到 pHLA 复合物中含有抗原肽 VYF, 因此将超滤-HPLC 法用于检测 pHLA 复合物的方法可行。与 Western blotting 法相比, 超滤-HPLC 法定量检测抗原肽浓度范围为 0–9 $\mu\text{g/mL}$, 可根据复合物中结合的抗原肽量来优化不同结合条件, 以提高 HLA-I 类分子折叠效率并促进 HLA-I 类分子结合抗原肽, 还可根据 pHLA 复合物结合的抗原肽含量计算复性体系中形成 pHLA 复合物的制备率。因此文中所建立的超滤-HPLC 法可用于 pHLA 复合物制备过程的质量控制, 在 T 细胞特异性免疫研究、人工抗原呈递细胞以及特异性四聚体探针应用开发方面都具有优势。

关键词: 超滤; 高效液相色谱; 重组 HLA-I 类分子; 抗原肽; 折叠复性

Received: June 29, 2021; **Accepted:** September 10, 2021; **Published online:** September 24, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0108403)

Corresponding author: HU Huajun. Tel: +86-571-86872735; E-mail: hhj@cjlu.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0108403)

Detection of the antigenic peptides in pHLA complexes by ultrafiltration-high performance liquid chromatography

YING Ting, CHENG Qiaozhen, CHEN Chun, LIAO Xuejun, HU Huajun

College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: Recombinant HLA- I molecules/antigenic peptide complexes (pHLA complexes) are applied in the research of human T cell-specific immune responses. The preparation of pHLA complex is based on genetic engineering and protein *in vitro* dilution and folding-refolding technology. In an *in vitro* refolding system, recombinant HLA- I molecules correctly fold and bind with antigenic peptides to form complexes. In this study, ultrafiltration-high performance liquid chromatography (ultrafiltration-HPLC) was used for quantitative determination of the antigenic peptides in recombinant pHLA complexes, especially for those in a small amount of prepared products. By adding the recombinant HLA- I molecules and antigenic peptides into the refolding buffer, the heavy chain (HC) and light chain ($\beta 2m$) of recombinant HLA- I molecules were refolded and bond with the VYF antigenic peptide containing anchor residues to form a pHLA complex. The unbound free antigenic peptide VYF was removed by ultrafiltration to retain the complex. Finally, the pHLA complex was treated by acid to destroy its interaction, thus releasing the antigenic peptide. The results showed that the prepared recombinant pHLA complex was recognized by HLA- I molecule specific antibody W6/32, which indicated that the recombinant HLA- I class molecule had correct folding and was identified as pHLA complex. The antigen peptide VYF contained in the pHLA complex was also detected by ultrafiltration-HPLC, so it is feasible to apply ultrafiltration-HPLC for determination of pHLA complex. Compared with Western blotting, the concentration of antigenic peptides detected by ultrafiltration-HPLC was 0–9 $\mu\text{g/mL}$. The binding conditions can be optimized according to the amount of antigenic peptides bound in the complex in order to improve the folding efficiency of HLA- I molecules and promote the binding of HLA- I molecules to antigenic peptides. The production rate of pHLA complexes in the refolding system can also be calculated according to the content of antigenic peptides bound by pHLA complexes. Therefore, ultrafiltration-HPLC in this study can be used for the quality control of the preparation process of pHLA complexes, and may facilitate the research of T cell-specific immunity, artificial antigen-presenting cells, and development of specific tetramer probe applications.

Keywords: ultrafiltration; high performance liquid chromatography (HPLC); recombinant HLA-I molecules; antigen peptide; refolding

HLA- I 类分子 (human lymphocyte antigen class I molecules) 是由高度多态性的重链跨膜糖蛋白 (heavy chain, HC) 和 $\beta 2$ 微球蛋白 ($\beta 2m$) 组成的异源二聚体^[1]。内源

性抗原经抗原递呈细胞 (antigen presenting cells, APCs) 处理后, 产生与 HLA-I 类分子结合的抗原肽 (又称抗原 CTL 表位肽), 通过 APCs 的抗原递呈作用, 被 CD8^+ T 细胞抗原受

体 (T cell receptor, TCR) 特异性识别, 诱导形成细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 克隆产生免疫应答^[2]。HLA-I 类分子 HC 的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域形成抗原肽结合槽, 抗原肽结合槽底部有 6 个小袋状凹陷 (A→F pocket), 其中 A pocket 和 F pocket 上的保守氨基酸与多肽 N 末端氨基和 C 末端羧基形成氢键, 对结合的抗原肽起到固定作用^[3]。同一等位型的 HLA-I 类分子通过识别多肽序列上特定的锚定氨基酸残基 (anchor amino acid residues), 可以结合多种抗原肽^[4]。筛选不同肽与 HLA-I 类分子相互作用形成 HLA-I 类分子/抗原肽复合物 (peptide/HLA, pHLA) 的研究有助于发现新抗原 CTL 表位肽, 对于阐明 CD8⁺ T 细胞特异免疫识别机制、研制多肽疫苗及发展特异性细胞免疫治疗都具有重要意义^[5-6]。而且在 pHLA 基础上发展的 HLA 四聚体技术也能为 CTL 的特异性检测与研究提供更直接、有效的方法^[7]。

获得 pHLA 复合物的常用方法是分别重组表达 HC 和 $\beta 2m$, 在复性缓冲液中结合抗原肽。然而 pHLA 复合物的人工复性过程受复性缓冲液体系包括 HC、 $\beta 2m$ 、抗原肽的摩尔数之比、pH 值、温度以及电解质条件的影响, 容易造成复性效果不易控制、耗时长, 且容易形成 HC 二聚体和极度不稳定的空载 HLA 分子^[8-9]。所以在其制备过程中需要对制备产物进行检测以优化复性条件, 促进 HC、 $\beta 2m$ 的正确折叠及与抗原肽之间相互作用形成 pHLA 复合物。此外由于 HLA 的高度多态性, 不同型别的 HLA-I 类分子又可通过识别多肽基序结合多种抗原肽, 理论上可形成无数种 pHLA 复合物。筛选与 HLA-I 类分子相互作用的抗原肽、研究 pHLA 复合物生物学功能、或者探索 pHLA 复合物制备条件, 往往采用少量的复性缓冲液制备体系, 不仅成本低而且易于操作。

目前验证制备 pHLA 复合物成功与否的常用方法有 Western blotting、ELISA 以及层析分离技术等方法。使用 HLA-I 类分子构象特异性抗体 W6/32 进行 Western blotting、ELISA 等方法是验证少量制备 pHLA 复合物成功与否的最常用方法, 其中 W6/32 是抗 HLA-I 类分子的单克隆构象抗体, 能识别 HC、 $\beta 2m$ 折叠后与抗原肽结合形成 HC- $\alpha 2$ 区的特定表位, 与单独的 $\beta 2m$ 不能结合, 与单独的 HC 仅有极微弱结合^[10]。但基于构象特异性抗体 W6/32 进行 Western blotting、ELISA 等方法只能定性检测 pHLA 复合物是否形成, 并不能定量检测 pHLA 复合物中结合的抗原肽。而且有研究表明体外稀释复性获得的 pHLA 复合物可能具有不同的构象, 但具有相同的生物学活性^[11]。这种构象差异有可能无法被构象特异性抗体 W6/32 特异性识别而导致鉴定结果具有不确定性, 因此检测 pHLA 复合物还需要寻找其他方法, 尤其是制备条件探索过程中对少量制备产物的检测鉴定。HLA-A*24 是亚洲人群最常见的 HLA 等位基因之一^[12], 且与 HLA-A24 超型具有高度同源性, 90% 的 HLA-A24 属于 HLA-A*2402 亚型, 因此本研究选择 HLA-A*2402 型基因来重组表达 HLA-I 类分子的 HC、 $\beta 2m$ 及融合蛋白 $\beta 2m/HC$, 并制备 pHLA 复合物。然后将超滤法与高效液相色谱法结合应用到 pHLA 复合物形成的检测, 建立一种超滤-高效液相色谱法 (超滤-HPLC) 用来定量检测少量的重组 pHLA 复合物中的抗原肽, 从而鉴定 pHLA 复合物的形成。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

含 HLA-A*2402 HC、 $\beta 2m$ 及 $\beta 2m$ -HLA-A*2402 HC 重组表达质粒的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 菌株为本实验室

前期构建; HLA-A*2402 限制性的人黑色素瘤相关抗原肽 gp100-intron 4 (氨基酸序列为 NH₂-VYFFLPDHL-COOH, 简称 VYF 抗原肽) 和 NH₂-IRAWVAWRNR-COOH (简称 IRA 肽) 由杭州固拓生物科技有限公司合成, 纯度均大于 98%; 单克隆抗体 W6/32 购自 Abcam 公司; BioBasic™ 18 LC 色谱柱购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司; HPLC Grade 乙腈购于 Spectrum Chemical; HPLC Grade 三氟乙酸购于上海麦克林生化科技有限公司。

主要仪器与设备: LC-10AT 高效液相色谱 (日本岛津); SPD-20A 高效液相检测器 (日本岛津); 超滤离心管 (Millipore, MWCO:3 kDa)。

1.2 抗原肽的选择

HLA-A*2402 分子提呈的抗原肽的第二位锚定残基分别为酪氨酸及苯丙氨酸, C 末端锚定残基分别为苯丙氨酸及亮氨酸^[13], 因此本研究选择含对应锚定残基的 VYF 抗原肽作为结合肽, 不含锚定残基的 IRA 肽作为不结合肽。

1.3 HC、β2m 和融合蛋白 β2m/HC 的表达

对含有重组表达质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株分别进行诱导表达。挑取单菌落至卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中, 37 °C 过夜振荡培养。然后将菌液 1:100 接种于新鲜的培养基中, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L 开始诱导表达。诱导表达 5 h 后, 离心收集菌体沉淀。菌体沉淀用预冷的 PBS 重悬, 超声破碎, 离心获得包涵体蛋白。包涵体蛋白溶解于 8 mol/L 尿素溶液中, 利用 Ni-NTA 亲和层析介质进行纯化, 纯化结束后利用超滤脱盐法去除蛋白溶液中的高浓度咪唑, 蛋白定量后 -80 °C 冻存备用。

1.4 VYF 抗原肽和 IRA 肽的超滤-HPLC 法检测

HPLC 采用 C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm,

5 μm), 以 0.1% TFA 乙腈溶液: 0.1% TFA 水溶液为 31:69, 为流动相, 流速为 1 mL/min, 柱温为 35 °C, 检测波长为 214 nm。对复性缓冲液、VYF 抗原肽的复性缓冲液和 IRA 肽复性缓冲液按照上述条件进行检测, 确定 VYF 抗原肽和 IRA 肽的特征峰。精确配制浓度分别为 0、2、3、4、5、6、7、8、9 μg/mL 的 VYF 抗原肽和 IRA 肽的溶液, 依次进行 HPLC 测定。以峰面积为纵坐标, 肽浓度 (μg/mL) 为横坐标, 绘制标准曲线。配制 2 μg/mL 肽标准品溶液按上述色谱条件进行多次检测, 记录峰的保留时间和峰面积, 计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD), 验证该方法的精密性。另将 VYF 抗原肽和 IRA 肽分别配制成 1、5、9 μg/mL 浓度的标准溶液, 一组实验取 20 μL 标准溶液进样检测, 另外一组实验将标准溶液超滤后取滤出液 20 μL 进行 HPLC 检测, 根据检测结果计算超滤后肽的回收率。

1.5 pHLA 复合物的少量制备

将 HC、β2m、VYF 抗原肽 (摩尔数比例为 1:2:10) 按照稀释复性的方法制备 pHLA 复合物^[14]。将 20 μg VYF 抗原肽加至预冷的 2 mL 复性缓冲液中, 10 °C 高速振荡混匀 30 min, 然后快速滴加 50 μg 的 β2m, 10 °C 高速振荡混匀 1 h, 最后分 3 次加入 60 μg 的 HC, 每次间隔 12 h, 10 °C 振荡复性至复性结束。同时设置 HC 和 VYF 抗原肽及 β2m 和 VYF 抗原肽为对照组。另外使用 IRA 肽作为不结合对照肽, 进行同样的复性过程。融合蛋白 β2m/HC、VYF 抗原肽 (摩尔数比例为 1:10) 复性制备 pHLA 复合物, 不需要加入 β2m, 其他步骤同上。

1.6 pHLA 复合物制备产物的超滤-HPLC 法检测

使用 1% BSA 溶液对截留分子量为 3 kDa 的超滤管进行过夜钝化。各组复性产物分别进行第一次超滤, 然后用复性缓冲液补足至 500 μL, 轻

轻吹打混匀后再次超滤,重复 3 次以除去游离肽。取 HC、 $\beta 2m$ 分别与 VYF 抗原肽及 IRA 肽复性折叠产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至硝酸纤维素膜上后,依次与一抗 W6/32 及二抗反应,显色并观察结果^[15]。向超滤后得到的 pHLA 复合物制备产物中加入 3% 三氟乙酸溶液补足至 100 μL ,静置 20 min,通过低 pH 破坏 HLA 分子与抗原肽之间的相互作用^[16],再次超滤收集滤出液,并取滤出液 20 μL 进行 HPLC 检测。

1.7 pHLA 复合物的制备条件优化

为进一步优化制备条件,改变复性缓冲液的 pH 值和改变复性体系中抗原肽的浓度(复性体系 pH 分别设置为 8.0、7.5 及 7.0,抗原肽浓度分别为 5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别将 HC、 $\beta 2m$ 、VYF 抗原肽和融合蛋白 $\beta 2m/\text{HC}$ 、VYF 抗原肽按照 1.5 中的稀释复性方法制备 pHLA 复合物,按上述超滤-HPLC 法检测 pHLA 复合物中抗原肽的结合量,比较不同 pH 和不同肽浓度对 pHLA 复合物肽结合量的影响。

2 结果与分析

2.1 HC、 $\beta 2m$ 和 $\beta 2m\text{-HC}$ 融合蛋白表达与纯化

经 IPTG 诱导作用,HLA-A*2402 HC、 $\beta 2m$ 及 $\beta 2m\text{-HC}$ 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中大量表达。表达菌体经过超声破碎和反复洗涤后,得到以包涵体的形式存在的大量重组蛋白。用高浓度的尿素溶液溶解包涵体沉淀并进行 Ni-NTA 亲和层析纯化,分别用含不同浓度咪唑的洗脱液洗脱得到了高纯度重组蛋白: HLA-A*2402 HC、 $\beta 2m$ 及 $\beta 2m\text{-HC}$ (图 1)。

2.2 HPLC 法检测 VYF 抗原肽和 IRA 肽及超滤回收率考察

HPLC 检测结果显示, VYF 抗原肽的复性缓冲液在 14–15 min 有特征吸收峰 (图 2A),因

此选择 14–15 min 的吸收峰为 VYF 抗原肽; IRA 肽在 8–9 min 有特征吸收峰 (图 2B)。

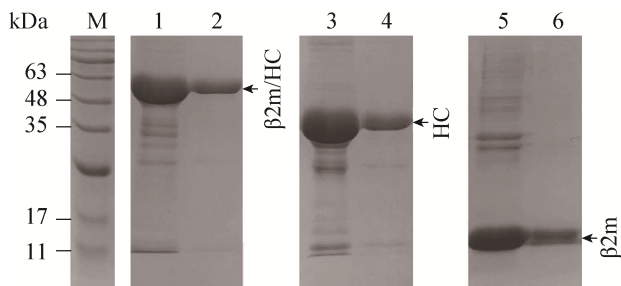


图 1 HLA-A*2402 HC、 $\beta 2m$ 及 $\beta 2m\text{-HC}$ 表达及纯化的 SDS-PAGE 结果

Figure 1 SDS-PAGE analysis of HLA-A*2402 HC, $\beta 2m$ and $\beta 2m\text{-HC}$. Lane M: protein marker; Lane 1: washed inclusion body of the $\beta 2m\text{-HC}$ -BL21 (DE3); lane 2: $\beta 2m\text{-HC}$ after ultrafiltration; lane 3: washed inclusion body of the HC-BL21 (DE3); lane 4: HC after ultrafiltration; lane 5: washed inclusion body of the $\beta 2m$ -BL21 (DE3); lane 6: $\beta 2m$ after ultrafiltration.

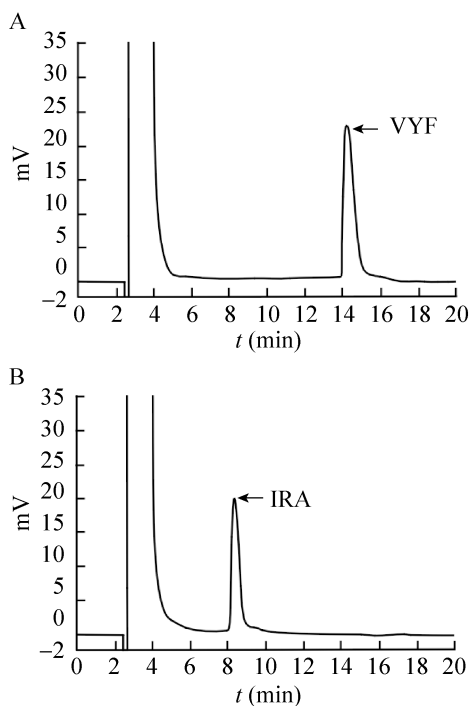


图 2 VYF 抗原肽及 IRA 肽的 HPLC 检测图

Figure 2 Chromatogram of refolding buffer solution of VYF (A) and IRA (B).

在 0–9 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, VYF 抗原肽和 IRA 肽标准曲线线性良好 (图 3), 回归方程分别为: $y=13.031 0x, R^2=0.996 3$; $y=9.491 3x, R^2=0.992 1$ 。

精密性结果显示, VYF 抗原肽和 IRA 肽的保留时间和峰面积 RSD 均小于 2% (表 1), 方法精密性良好。

VYF 抗原肽超滤回收率为 96.91%–98.14%, IRA 肽超滤回收率为 95.10%–98.48% (表 2)。实验结果表明, 超滤法具有较好的回收率, 可以用来测定 VYF 抗原肽和 IRA 肽与 HLA 分子的相互作用。

2.3 HC、 $\beta 2\text{m}$ 、VYF 抗原肽制备 pHLA 复合物的超滤-HPLC 法检测及 Western blotting 验证

在复性缓冲液中重组 HLA-I 类分子的重链 HC 与轻链 $\beta 2\text{m}$ 复性折叠, 与含锚定残基的抗

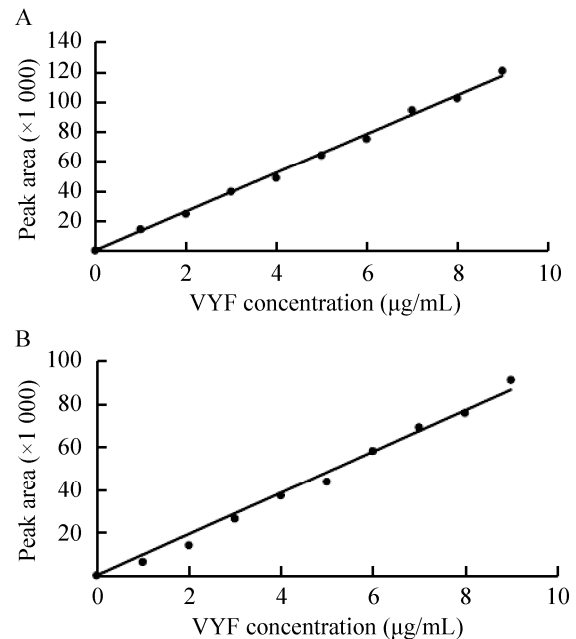


图 3 VYF 抗原肽及 IRA 肽的标准曲线

Figure 3 Standard curve of VYF control (A) and IRA control (B).

表 1 RP-HPLC 法检测 VYF 抗原肽及 IRA 肽的精密性验证结果

Table 1 Verification of precision of RP-HPLC for determination of VYF and IRA

Peptide	Retention time (min)			Peak area		
	\bar{x}	SD	RSD (%)	\bar{x}	SD	RSD (%)
VYF	14.97	0.098	0.651	32.48	1.241	0.764
IRA	8.41	0.027	0.326	19.46	1.419	1.458

表 2 VYF 抗原肽及 IRA 肽的回收率考察

Table 2 Ultrafiltration recovery of VYF and IRA

Peptide	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area before ultrafiltration	Peak area after ultrafiltration	Recovery (%)
VYF	1	14.57	14.12	96.91
	5	64.15	62.96	98.14
	9	120.62	117.73	97.60
IRA	1	9.79	9.31	95.10
	5	48.65	47.91	98.48
	9	83.32	80.19	96.24

原肽 VYF 产生相互作用而形成 pHLA 复合物, 经超滤去除未结合的游离抗原肽 VYF 而保留复合物, 最后将 pHLA 复合物经酸性缓冲液处理破坏其相互作用从而释放抗原肽, 再超滤收

集 VYF 抗原肽进行 HPLC 检测, 所测得的抗原肽 VYF 量即为重组 HLA-I 类分子与抗原肽相互作用所结合抗原肽的量。由于 IRA 肽不含锚定残基, 因此不能与 HLA-I 类分子结合。结果显

示 HC、 $\beta 2m$ 和 VYF 抗原共复性制备的 pHLA 复合物中结合的 VYF 抗原肽浓度显著高于其余几组 ($P < 0.01$) (图 4)。Western blotting 结果也显示, 结合 VYF 抗原肽的 pHLA 复合物可被 HLA-I 分子构象特异性抗体 W6/32 识别 (图 5), 说明重组 HLA-I 类分子结合 VYF 抗原肽形成正确折叠构象, 可鉴定 pHLA 复合物存在。同时超滤-HPLC 法也可检测到 pHLA 复合物中含有抗原肽 VYF, 说明将超滤-HPLC 法用于检测抗原肽与 HLA-I 类分子结合形成 pHLA 复合物的方法可行。

2.4 不同条件制备 pHLA 复合物的比较

对制备 pHLA 复合物的复性条件进行优

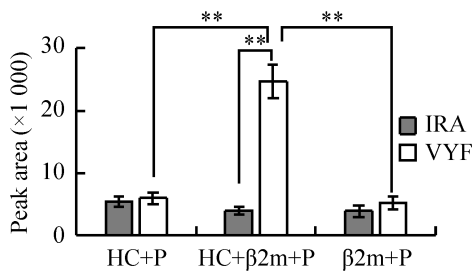


图 4 折叠产物的 RP-HPLC 分析
Figure 4 RP-HPLC analysis of refolding products.

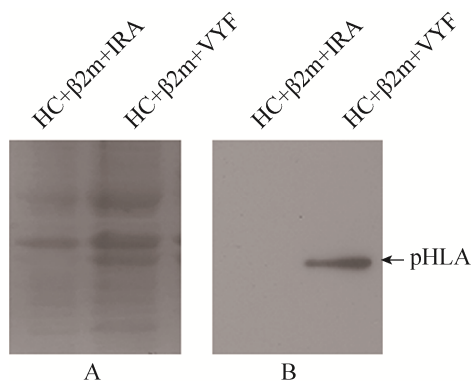


图 5 pHLA 的非变性电泳分析 (A) 和 Western blotting 鉴定 (B)

Figure 5 The Native-PAGE analysis (A) and Western blotting (B) of pHLA.

化, 在复性缓冲液 pH 7.0–pH 8.0 范围内, HC、 $\beta 2m$ 、VYF 抗原肽制备的 pHLA 复合物中 VYF 抗原肽的含量随着 pH 降低而下降, 但 $\beta 2m$ /HC、VYF 抗原肽制备的 pHLA 复合物中 VYF 抗原肽的含量随着 pH 降低而上升。在复性体系中提高抗原肽的浓度, 检测所制备的 pHLA 复合物中 VYF 抗原肽的含量均随之上升, 当抗原肽浓度由 5 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 所制备的 pHLA 复合物中 VYF 抗原肽的检测吸收峰面积显著性上升 ($P < 0.01$); 但抗原肽浓度从 20 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 所制备的 pHLA 复合物中 VYF 抗原肽吸收峰面积变化差异不明显 (图 6)。

根据检测 VYF 抗原肽浓度可计算 pHLA 复合物的制备率, 即制备率=HLA 分子结合的抗原肽摩尔数/复性体系中总 HLA 重链蛋白摩尔数 $\times 100\%$ 。在上述复性条件范围内, HC、 $\beta 2m$ 、

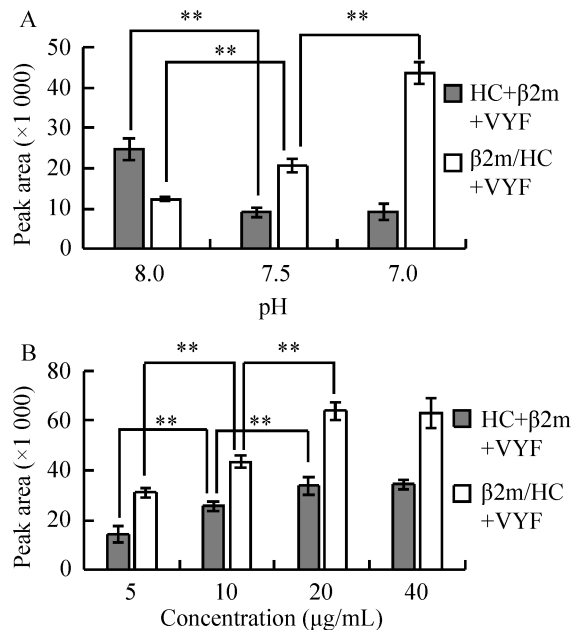


图 6 不同复性条件下折叠产物的 HPLC 分析
Figure 6 HPLC analysis of refolding products under different pH of refolded buffer (A) and different concentrations of peptide (B). **: $P < 0.01$.

VYF 抗原肽制备的 pHLA 复合物的最佳复性条件为 pH 8.0、添加肽浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其抗原肽结合量为 0.259 μg ，对应摩尔数为 0.225 nmol，即获得 pHLA 复合物为 0.225 nmol，其制备率约为 14.6%； $\beta 2\text{m}/\text{HC}$ 融合蛋白与 VYF 抗原肽制备的 pHLA 复合物的最佳复性条件为 pH 7.0、添加肽浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其抗原肽结合量为 0.490 μg ，对应摩尔数为 0.426 nmol，即折叠复性获得 0.426 nmol 抗原肽-HLA 复合体，其制备率约为 36.9%。由图 7 可知， $\beta 2\text{m}/\text{HC}$ 融合蛋白与 VYF 抗原肽制备 pHLA 复合物的制备率显著高于 HC、 $\beta 2\text{m}$ 与抗原肽形成复合物的制备率 ($P < 0.01$)。

3 讨论

HLA-I 类分子与抗原肽的相互作用是 CTL 细胞特异性识别靶细胞的分子基础。利用重组 HLA-I 类分子在复性体系中正确折叠并与抗原肽结合制备 pHLA 复合物，可用于研究人工 APC 刺激 CTL 细胞的特异性分化，以及开发特异性四聚体探针应用于 CTL 细胞特异性分化细胞群的检测。虽然通过改变蛋白体外稀释折叠复性条件、优化表位肽序列^[17]、应用 dtSCT 技术^[18]等为促进 HLA-I 类分子结合抗原肽、提高 pHLA 复合物制备效率方面提供改进方案，但是在制备条件探索过程中对少量制备产物的检

测鉴定仍需要一种有效检测方法。尽管传统方法使用 HLA-I 分子构象特异性抗体 W6/32 进行 Western blotting 可以用于验证 pHLA 制备是否成功，但此方法只是定性检测 pHLA 复合物，并不能定量检测 pHLA 复合物中结合的抗原肽量，无法计算 pHLA 复合物的制备率。由于复性体系的条件变化影响 pHLA 复合物形成，要实现 pHLA 复合物制备过程的质量控制就需要一种可以定量检测形成复合物中肽含量的技术，这样可以根据 pHLA 结合肽量的变化来优化复性条件，以提高 pHLA 的制备效率。本研究所建立的超滤-HPLC 法用于检测 pHLA 复合物中的抗原肽，所测得的抗原肽即为重组 HLA-I 类分子结合的抗原肽，这为解决少量制备 pHLA 复合物的检测鉴定提供一种有效方法。在本方法中，第一次超滤步骤是去除未结合的游离抗原肽，第 2 次超滤是收集 pHLA 复合物经酸处理破坏其相互作用从而释放抗原肽并用于检测，两次超滤的目的不同。

随着对 HLA-I 类分子与抗原肽相互作用的深入研究，预测结果为低亲和力的多肽可能具有激发相应表位特异性 CTL 的潜能^[17]。理论上 HLA-I 类分子与肽的亲合力低到一定程度时，pMHC 复合物不能稳定存在从而无法有效诱导特异性 CTL。同样多肽与 HLA-I 类分子之间过低的亲合力导致重组 HLA-I 类分子无法正确折叠，这在很大程度上阻碍了低亲合力抗原肽四聚体的应用^[19]。通过本研究建立的超滤-HPLC 法有助于优化复性条件，帮助提高 pHLA 复合物的形成效率，尤其以重链和轻链融合表达的重组 HLA-I 类分子结合抗原肽的能力大幅提高，更有利于形成 pHLA 复合物。鉴于 pHLA 复合物在未来免疫治疗与探针诊断领域的应用前景，本研究所建立的超滤-HPLC 法可用于 pHLA 复合物制备过程的质量控制，在 HLA-I

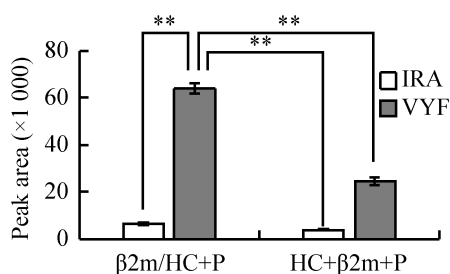


图 7 不同 pHLA 复合物肽结合量比较
Figure 7 Comparison of the amount of HC, $\beta 2\text{m}$ and $\beta 2\text{m}/\text{HC}$ binding peptides. **: $P < 0.01$.

类分子与抗原肽相互作用研究、人工 APC 以及特异性四聚体探针应用开发方面都具有优势。

REFERENCES

- [1] Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *J Immunol*, 2005, 174(1): 6-19.
- [2] Uebel S, Tampé R. Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol*, 1999, 11(2): 203-208.
- [3] Chelvanayagam G. A roadmap for HLA-A, HLA-B, and HLA-C peptide binding specificities. *Immunogenetics*, 1996, 45(1): 15-26.
- [4] Hillig RC, Coulie PG, Stroobant V, et al. High-resolution structure of HLA-A*0201 in complex with a tumour-specific antigenic peptide encoded by the *MAGE-A4* gene. *J Mol Biol*, 2001, 310(5): 1167-1176.
- [5] Letsch A, Keilholz U, Fluck M, et al. Peptide vaccination after repeated resection of metastases can induce a prolonged relapse-free interval in melanoma patients. *Int J Cancer*, 2005, 114(6): 936-941.
- [6] Aruga A, Takeshita N, Kotera Y, et al. Long-term vaccination with multiple peptides derived from cancer-testis antigens can maintain a specific T-cell response and achieve disease stability in advanced biliary tract cancer. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8): 2224-2231.
- [7] Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996, 274(5284): 94-96.
- [8] Shen CL, He Y, Meng FY, et al. Characterization of MHC/peptide complexes refolded by a one-step ion-exchange chromatography. *J Immunol Methods*, 2011, 369(1/2): 81-90.
- [9] Ferré H, Ruffet E, Blicher T, et al. Purification of correctly oxidized MHC class I heavy-chain molecules under denaturing conditions: a novel strategy exploiting disulfide assisted protein folding. *Protein Sci*, 2003, 12(3): 551-559.
- [10] Ladasky JJ, Shum BP, Canavez F, et al. Residue 3 of beta2-microglobulin affects binding of class I MHC molecules by the W6/32 antibody. *Immunogenetics*, 1999, 49(4): 312-320.
- [11] 刘传省, 施一, 高福. HLA-A*2402 多肽复合物的两种构象——对 Wolynes 理论的补充. *生物工程学报*, 2012, 28(11): 1370-1377.
Liu CS, Shi Y, Gao GF. Two conformations of pHLA-A*2402: a supplement to Wolynes' theory. *Chin J Biotech*, 2012, 28(11): 1370-1377 (in Chinese).
- [12] Zhou XY, Zhu FM, Li JP, et al. High-resolution analyses of human leukocyte antigens allele and haplotype frequencies based on 169, 995 volunteers from the China bone marrow donor registry program. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0139485.
- [13] Kubo RT, Sette A, Grey HM, et al. Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J Immunol*, 1994, 152(8): 3913-3924.
- [14] He XH. Procedure for preparing peptide-major histocompatibility complex tetramers for direct quantification of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(27): 4180.
- [15] 卢小玲. 利用 aAPC 制备 pMHC 特异性 T 细胞及其在同种 T 细胞识别和抗肿瘤实验研究中的应用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
Lu XL. Peptide/MHC-I specific T-cell induced by artificial antigen-presenting cell and its application in the study on T-cell allorecognition and tumor immunotherapy[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2007 (in Chinese).
- [16] Nelde A, Kowalewski DJ, Stevanović S. Purification and identification of naturally presented MHC class I and II ligands. *Methods Mol Biol Clifton N J*, 2019, 1988: 123-136.
- [17] Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*, 2004, 113(3): 425-433.
- [18] Yu YY, Netuschil N, Lybarger L, et al. Cutting edge: single-chain trimers of MHC class I molecules form stable structures that potently stimulate antigen-specific T cells and B cells. *J Immunol*, 2002, 168(7): 3145-3149.
- [19] Baba T, Sato-Matsushita M, Kanamoto A, et al. Phase I clinical trial of the vaccination for the patients with metastatic melanoma using gp100-derived epitope peptide restricted to HLA-A*2402. *J Transl Med*, 2010, 8: 84.

(本文责编 郝丽芳)