

# 克隆猪主要组织相容性复合体 类 DR 基因座 链和 链及其体外复合体的构建

高凤山<sup>1,2</sup> 王磊<sup>1</sup> 李新生<sup>1</sup> 李云岗<sup>1</sup> 王慧飞<sup>3</sup> 方勤美<sup>1</sup> 郝慧芳<sup>1</sup> 夏春<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 大连大学 生物工程学院, 辽宁大连 116622;

3. 中国人民武装警察部队学院 消防工程系, 河北廊坊 065000)

**摘要** 为推动猪主要组织相容性复合体(MHC)空间构象的研究,体外构建了猪的 MHC- 类蛋白复合体(SLA- )。首先克隆长白-达兰杂交商品猪 *DRA* 和 *DRB* 基因,用富含甘氨酸-丝氨酸的 Linker(G4S)<sub>3</sub> 连接 *DRA* 和 *DRB* 的胞外区,用 SOE-PCR 得到复合体基因 *DRA-linker-DRB*,插入原核表达载体进行表达;对表达的融合蛋白进行 Western-blot 鉴定、纯化、蛋白酶切割并对切割后的蛋白进行分离和纯化。对分离的目的蛋白、融合蛋白及麦芽糖结合蛋白(MBP)进行二级结构测定。得到 83.4 ku 的可溶性融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)<sub>3</sub>-DRB,其 Western 杂交带与表达条带大小一致。切割分离后的目的蛋白大小为 40.9 ku。目的蛋白 DRA-(G4S)<sub>3</sub>-DRB 二级图谱显示该蛋白呈典型  $\alpha$ -螺旋结构,各二级结构元件  $\alpha$ -螺旋、折叠、转角和随机卷曲的氨基酸数目分别为 80、121、101 和 80,融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)<sub>3</sub>-DR 与目的蛋白 DRA-(G4S)<sub>3</sub>-DRB 的二级结构各元件的符合率分别达到了 95%、96.7%、91.1% 和 93.0%。结果分析表明得到的复合体构象正确,可用于进一步的 B 细胞抗原表位的筛选等结构和功能研究。

**关键词** 猪;主要组织相容性复合体;基因座;二级结构

中图分类号 Q 518.1; S 858.28

文章编号 1007-4333(2006)03-0021-06

文献标识码 A

## Cloning and chains of SLA-DR loci and reconstruction of their complex in vitro

Gao Fengshan<sup>1,2</sup>, Wang Lei<sup>1</sup>, Li Xinheng<sup>1</sup>, Li Yungang<sup>1</sup>,  
Wang Huifei<sup>3</sup>, Fang Qinmei<sup>1</sup>, Hao Huifang<sup>1</sup>, Xia Chun<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Dalian University Bioengineering College, Liaoning Dalian, 116622, China;

3. The Fire Engineering Department, the Chinese People's Armed Police Forces Academy,  
Langfang city in Hebei province 065000, China)

**Abstract** In order to prompt conformational research on swine major histocompatibility complex (MHC), a swine MHC-protein complex (SLA- ) was constructed in vitro. *DRA* and *DRB* were cloned from an outbred pig (changbai-dalan). Subcloned extracellular parts of *DRA* and *DRB* were linked together by a linker containing rich glycine-serine (G4S)<sub>3</sub>, and the whole length of two genes, named *DRA-linker-DRB*, was amplified by splicing overlap extension PCR (SOE PCR). *DRA-linker-DRB* was inserted into pMAL-p2X prokaryotic system and expressed. The expressed fusion protein MBP-DRA-(G4S)<sub>3</sub>-DRB was identified by Western-blot, then purified and cleaved to obtain the protein of interest DRA-(G4S)<sub>3</sub>-DRB. The secondary structure of this protein was determined in circular dichroism (CD) apparatus. The results indicated that the subsequent protein MBP-DRA-(G4S)<sub>3</sub>-DRB was soluble, and its molecule weight was 83.4 ku in consistent with the Western blot. Cleaved by Factor Xa, the protein of interest was separated with a molecule weight of 40.9 ku. The CD spectrum demonstrated that the protein displayed a favorable  $\alpha$ -Helix structure,

收稿日期: 2005-12-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371098)

作者简介: 高凤山, 博士研究生, E-mail: gfsh0626@126.com; 夏春, 教授, 通讯作者, 主要从事分子免疫学和动物医学工程研究, E-mail: xiachun@cau.edu.cn

and the contents of  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -sheet, turn, and random coil were 80 aa, 121 aa, 101 aa and 80 aa respectively. The identical ratios of  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -sheet, turn, and random coil between MBP-DRA-(G4S)-3-DRB and DRA-(G4S)-3-DRB were 95%, 96.7%, 91.1% and 93.0% respectively. The result also indicated that the reconstructed SLA-DRB complex presented an ideal conformation and could be used to study its structure and function in vitro.

Key words pig; MHC; loci; secondary structure

主要组织相容性复合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) 类是参与细胞外抗原递呈的一类基因群。猪 MHC 类复合体简称为 SLA-DRB, 主要包括 DRa、DRb、DQa、DQb、DOb、DPa、TAP 和 LMP 等, 其中, 只有 SLA-DR 和 SLA-DQ 属于功能基因, 它们均有一条约 34 ku 的  $\alpha$  链和约 29 ku 的  $\beta$  链构成的穿膜异源二聚体。与 MHC 类分子类似, SLA 类分子也是一种跨膜蛋白, 分为 N 端的胞外区、中间的穿膜区和 C 端的胞质区。与 MHC 类基因不同, SLA 类基因胞外区有 2 个结构域, 在  $\alpha$  链上为 1 和 2, 在  $\beta$  链上为 1 和 2。1 和 1 各形成 4 条  $\beta$  折叠股和 1 条  $\alpha$  螺旋, 其中 8 条  $\beta$  折叠形成 1 个底层结构, 支撑分别来自于  $\alpha$  链和  $\beta$  链的 2 个  $\alpha$  螺旋。这 2 个  $\alpha$  螺旋组成呈开放型的抗原结合槽 (peptide binding domain), 能够结合 13~25 个氨基酸的多肽<sup>[1-2]</sup>。

体外重构 MHC 复合体, 研究其抗原肽结合谱及其三维结构解析, 是近年来分子免疫学发展的一个趋势。目前, 人和小鼠的 MHC 类分子已经进行了复合体的体外构建<sup>[3-6]</sup>, 而 MHC 类还未见报道。猪是重要的经济动物, 与人类的亲缘关系非常近, 以猪为模式动物, 体外构建其 MHC 类复合体, 为今后筛选重要病毒的 B 细胞表位提供筛选平台, 不仅会有利于提高猪的分子免疫研究水平, 也将为人类的 MHC 类限制性的病毒抗原肽的研究提供参考模型。本试验采取原核可溶性表达系统 pMAL-p2X 对 DR 基因座的  $\alpha$  链和  $\beta$  链基因进行了复合体的构建, 其结构通过圆二色谱进行了测定, 测定结果初步表明构建的复合体能够在体外正确折叠, 构象正确, 可以用于以后的 B 细胞抗原表位筛选以及进一步的 3D 结构研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器及软件

AMV 反转录酶, Ex Taq PCR 试剂盒, IPTG 和 X-gal, T<sub>4</sub> DNA 连接酶, EcoR 限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品 (宝生物工程大连有限公司); Trizol 试剂盒为 Invitrogen 公司产品; GLASS

MILK KIT 回收试剂盒为博大泰克公司产品; pGEM-T easy *E. coli* TB<sub>1</sub> 载体为 Promega 公司产品。p2X 载体, Factor Xa 因子均为 NEB 公司产品。DEAE 葡聚糖凝胶层析柱为欣经科公司产品。PCR 扩增仪为 Hybaid 公司产品; 电泳系统为 Bio-RAD 公司产品。

## 1.2 RT-PCR 扩增 DRA 和 DRB 基因、克隆、序列测定和分析

参照文献<sup>[7]</sup>的方法利用 Trizol 试剂盒提取长白-达兰杂交商品猪脾脏总 RNA, 以总 RNA 为模板, 以 OligodT-15 (生工合成) 为反转录引物, 采用 AMV 反转录酶合成 First-strand cDNA (fcDNA)。

参照 DDBJ/EMBL/GenBank 基因库中猪 SLA-DRA 基因序列 (AY191779), 采用 Oligo6.0 软件设计引物。上游引物 (RA1) 序列: 5'-ATGACCAT-CTTGGGGTCCCAAG-3', 下游引物 (RB2) 序列: 5'-GTCCATTCCCTGCAAGCACCTC-3'。采用 RA1/RB2 引物扩增 DRA 基因座。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L, fcDNA 模板添加量为 0.5  $\mu$ g。PCR 程序如下: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min、65  $^{\circ}$ C 退火 1 min、72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物 (RA01) 经 1 g/100 mL 琼脂糖电泳, GLASS MILK KIT 回收试剂盒回收大约 800 bp 左右的目的片段, 再与 pGEM-T easy 载体连接, 转化 JM109 感受态细胞, 筛选阳性重组质粒, 经 EcoR 酶切及 PCR 鉴定后送三博公司 (Sanbo) 测序。

DRB 基因的克隆方法同上, 其引物参照 AY135579, 上游引物 (RB1) 序列: 5'-GTTCTCCAGCATGTTGCACTCTGTG-3'; 下游引物 (RB2) 序列: 5'-AGAGGATGCTTGCTTGGA GTGTC-3'。PCR 程序如下: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min、65  $^{\circ}$ C 退火 1 min、72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。其 PCR 产物 (RB01) 经纯化、克隆鉴定后送三博公司测序。

测定的序列经 GENETYX version 9.0 (Software Development Co., Ltd, Tokyo, Japan) 分析。

### 1.3 SOE PCR连接 DRA 和 DRB 的胞外区以及 pMAL-p2X融合表达载体的构建

分别以 RA01 和 RB01 的序列为模板,设计其胞外区的表达引物,并参照 Yang 等的<sup>[8]</sup>方法,在 2 个片断之间加 1 个 15 个氨基酸的 Linker (G4S) 3, RA01 胞外区上下游引物: AP1: 5'-TCA-GAATTCATCGTAGA GAATCACGTGATCA TCC-3; AP2: 5'-ACCGCCA GAGCCACCTCCGCCTGACCGCTCCACCCTCCCA GTGCTTGA GAA GAGGCT-3。RB01 胞外区上下游引物 BP3: 5'-GGT-TCA GGC GGA GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGA GGGACACCCCACCGCA TTTC-3; BP4: 5'-AGTAAGCTTTTTACCA TTCCACTGTGACGGGGC-3。引物 AP1 和 AP4 分别加上了 *EcoR* 和 *Hind*

酶切位点。利用 AP1/AP2 引物对,以 pGEM-T easy/ RA01 重组子为模板,扩增其胞外区,PCR 程序如下:94℃,3 min 预变性,加入 Ex Taq 酶后,继续以下程序:94℃,1 min; 65℃,1 min; 72℃,1 min,30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。以 pGEM-T easy/ RB01 重组子为模板,用引物对 BP3/BP4 扩增 RB01 胞外区,其 PCR 程序同上。将 2 个片段的 PCR 产物分别用 GLASS MILK KIT(博大泰克)回收,然后以摩尔比 1:1 加入 50 μL 的体系中,不加任何引物的情况下进行 16 个循环,结束后取 1 μL PCR 产物,加入新的 50 μL PCR 体系,并加入引物对 AP1/BP4,在以下条件下进行 PCR 扩增:94℃,3 min; 94℃,1 min; 65℃,1 min; 72℃,1.5 min,30 个循环。PCR 产物(DRA-Linker-DRB)经电泳后 GLASS MILK KIT 回收,酶切,与 p2x 载体连接,并转化 TB1 感受态细胞。

### 1.4 表达产物的 SDS-PAGE、Western-blot、纯化和 Factor 因子切割

挑取转化后的重组质粒的单个菌落,加入 100 mL LB 培养基,37℃,180 次/min 摇菌直至 OD<sub>600</sub> 达到 0.4~0.6,按照终浓度为 0.03 mol/L 加入 IPTG (Sigma),继续培养 6 h 后,取培养物 1 mL 经 2 × SDS 变性后,进行 SDS-PAGE。电泳后经 Coomassie Brilliant Blue<sup>[9]</sup> 法染色脱色观察表达条带的大小。融合表达产物命名为 MBP-DRA-(G4S)3-DRB。

表达的蛋白经 SDS-PAGE 后,转到 PVDF 膜上,100 V,转印 1 h,取出膜后,立即放入含有 5 g/100 mL 犊牛血清的封闭液中,封闭 1 h 后加入 1:3 000 稀释的鼠抗 MBP,包被 1 h 后用 PBS 洗 3 次,

每次 10 min,再加入 1:500 稀释的辣根过氧化酶标记的羊抗鼠二抗,继续作用 1 h,用 PBS 洗 2 次,每次 10 min,最后加入四氯乙萘酚进行底物显色。

表达产物的纯化参照 NEB<sup>[10]</sup> 方法。菌体经 5 000 g × 20 min 离心去沉淀,加入过柱 buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA),混悬,然后冻入 -80℃ 冰箱。冻存物融化后,超声裂解菌体,然后 9 000 g × 20 min 离心取上清,经 amylose affinity resin column 用洗脱 buffer (10 mmol/L maltose in buffer A) 洗脱,得到纯化蛋白。SDS-PAGE 分析其纯化效果。为了得到更好纯度的蛋白,需经过 DEAE-sepharose ion exchange chromatography 进一步纯化。

融合蛋白带有大约 42.5 ku 的 MBP 标签,通过 Factor Xa 因子可以将 MBP 与目的蛋白切割开。取纯化蛋白 1 mg,在含有 20 IU 的 Factor Xa 因子的 1 mL 缓冲液体系中,4℃ 切割 48 h,然后先后过 DEAE-sepharose ion exchange chromatography 和 amylose affinity resin column 进行分离纯化目的蛋白,SDS-PAGE 鉴定。

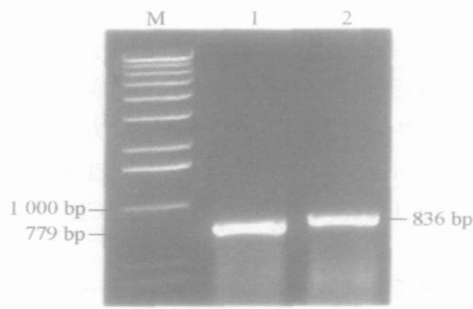
### 1.5 融合蛋白的二级结构测定

纯化蛋白经 Bradford<sup>[11]</sup> 法测定其浓度,并稀释至 0.4 g/L。取样品 600 μL,应用 Jasco J715 光谱仪在 25℃ 条件下对融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)3-DRB, DRA-(G4S)3-DRB 和 MBP 蛋白进行二级结构测定,光谱值范围为 190~250 nm,读数 4 次,圆二色谱(CD)分析。取信号平均值并基线校正,将所测定的 CD 值转换成摩尔椭圆度,deg·cm<sup>2</sup>/dmol;应用计算机专用软件(J-715 for Windows Secondary Structure Estimator, Version 1.10.00)分析各蛋白二级结构的组成。

## 2 结果

### 2.1 DRA 和 DRB 基因的 RT-PCR 及克隆测序

DRA 和 DRB 经过 RT-PCR,在 1 g/100 mL 的琼脂糖凝胶上电泳,在成像仪上分别显示 779 和 836 bp 的条带,与理论计算值大小一致(图 1)。DRA01 和 DRB01 的克隆产物经测序,分析比较,DRA 基因与 GenBank 上登录的猪其他 DRA 序列同源性达到了 100%,而 DRB 与其他猪 DRB 序列显示 90%~98%不等的同源性,并登录入 DDBJ/EMBL/GenBank(AB205163)。



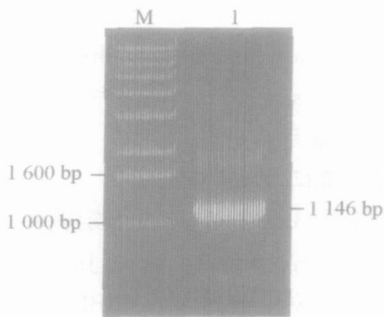
M. Marker; 1. *DRA* 基因, 779 bp; 2. *DRB* 基因, 836 bp

图1 PCR扩增 *DRA* 和 *DRB* 基因

Fig. 1 Amplification of *DRA* and *DRB* by PCR

### 2.2 SOE PCR 连接 *DRA* 和 *DRB* 的胞外区以及 pMAL-p2X 融合表达载体的构建

经过 SOE PCR 得到了一条大约 1 100 bp 大小的条带, 与理论设计值 1 146 bp 相符(图 2)。整个载体的构建示意图见图 3。



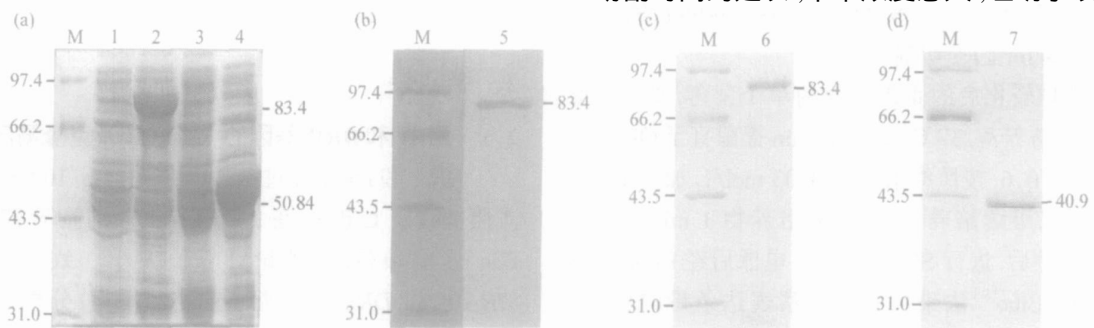
M: Marker; 1: *DRA-Linker-DRB*

图2 SOE PCR 扩增 *DRA-Linker-DRB*

Fig. 2 Amplification *DRA-Linker-DRB* by SOE PCR;

### 2.3 表达产物的 SDS-PAGE、Western-blot、纯化及 Factor 因子切割

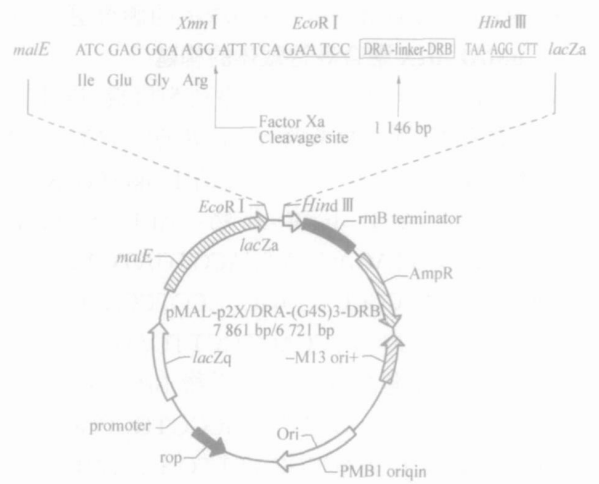
*DRA*-(G4S)3-DRB/p2X 重组子经过诱导, 其菌



(a) MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB 的全菌诱导表达。1. TB1; 2. MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB 诱导表达菌; 3. MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB 未诱导表达菌; 4. P2X 诱导 MBP 表达。(b) MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB 的 Western-blot。5. MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB 的杂交条带。(c) MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB 的纯化。6. 纯化后的表达条带。(d) Factor Xa 因子切割 MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB。7. 切割分离纯化后的目的蛋白 *DRA*-(G4S)3-DRB (40.9 ku)。M, 低分子质量蛋白 Marker (97.4, 66.2, 43.5, 31.0, 21.0 和 14.4 ku)

图4 MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB 的 SDS-PAGE、Western-blot、纯化和切割

Fig. 4 SDS-PAGE, Western-blot, Purification and Cleavage of MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB



右箭头指靠近 *EcoR* 的 Factor Xa 切割位点, 左箭头指示插入片段及其长度

图3 构建两端带有 *EcoR* 和 *Hind* 酶切位点的重组蛋白 PMAL-p2x/*DRA*-(G4S)3-DRB 载体

Fig. 3 Construction of PMAL-p2x/*DRA*-(G4S)3-DRB recombinant vector with *EcoR* at carboxyl site and *Hind* at amino site of the vector. The right arrow indicates Factor Xa cleavage site close to *EcoR* and the left arrow indicates the inserted fragment and its length

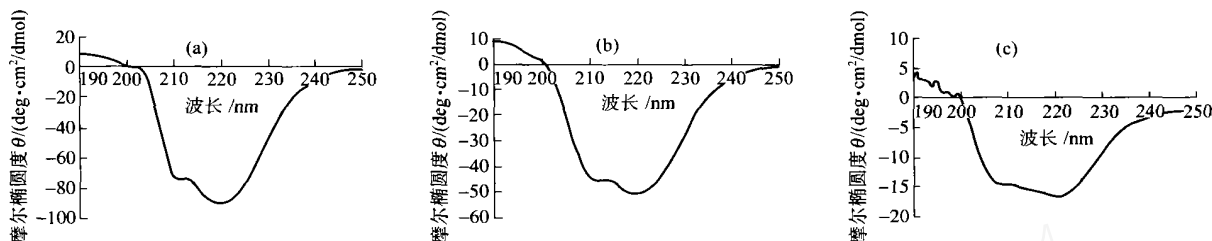
体蛋白 MBP-*DRA*-(G4S)3-DRB 在 SDS-PAGE 上电泳显示一条大约 80 ku 大小的条带, 与计算值 83.4 ku 一致(图 4(a))。Western-blot 结果显示, 抗体杂交条带大小为 80 ku 左右, 与表达条带大小完全一致(图 4(b))。菌体蛋白经过 amylose affinity resin column 和 DEAE-sepharose ion exchange chromatography 纯化, 得到了其纯化蛋白, 纯度经过薄层扫描, 显示纯度大约为 90% (图 4(c))。Factor Xa 因子切割后, 在 40 ku 处显示了一条单带, 并且随着切割时间的延长, 单带浓度愈大, 证明了该融合蛋白

的切割是特异性的(图 4(d))。

#### 2.4 二级结构测定和分析

对纯化的目的蛋白 DRA-(G4S)3-DRB, 标签蛋白 MBP 和融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)3-DRB 进行圆二色谱测定, 结果在 208 和 220 nm 附近均为最小值, 呈典型的螺旋结构(图 5)应用 CONTIN 程序

及 Yang-Chen 氏公式<sup>[12]</sup>计算结果见表 1, 目的蛋白 DRA-(G4S)3-DRB 中螺旋、折叠、转角、随机蜷曲分别占 80、121、101 和 80 个氨基酸。融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)3-DRB 中除去 MBP 蛋白相应二级结构元件的含量, 螺旋、折叠、转角、随机蜷曲分别占 76、117、103 和 89 个氨基酸。



(a) 单体蛋白 DRA-(G4S)3-DRB 的 CD 曲线; (b) 融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)3-DRB 的 CD 曲线; (c) 标签蛋白 MBP 的 CD 曲线

图 5 圆二色谱测定 3 类蛋白的二级结构

Fig. 5 Determination of the secondary structure of the three proteins by circular dichroism

表 1 蛋白各二级结构元件的测定结果

Table 1 Detecting result of secondary structure elements of proteins

二级结构元件	DRA-(G4S)3-DRB (382aa)		麦芽糖结合蛋白 MBP(392aa)		DRA-(G4S)3-DRB 氨基酸数目计算值	MBP-DRA-(G4S)3-DRB (774aa)	
	氨基酸数百分比	氨基酸数	氨基酸数百分比	氨基酸数	氨基酸数	氨基酸数百分比	氨基酸数
螺旋	20.2	80	18.9	74	76	19.4	150
折叠	38.5	121	19.1	75	117	24.8	192
转角	17.3	101	23.5	92	103	25.2	195
随机卷曲	24.0	80	38.5	151	86	30.6	237

注: 通过 CD 测定蛋白中各二级结构元件的氨基酸数百分比, 蛋白中各二级结构元件氨基酸数 = 氨基酸数百分比 × 蛋白氨基酸总数; DRA-(G4S)3-DRB 各二级结构元件氨基酸数计算值表示融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)3-DRB 各二级结构元件氨基酸数减去 MBP 中各二级结构元件相应氨基酸数。

### 3 讨论

长白-达兰杂交品种猪, 目前国内还未有其 SLA-DR 基因座序列报道。本试验采用分子克隆的方法, 分别测定了长白-达兰猪 DRA 和 DRB 基因的序列, 经过 GENETYX 等软件分析, 其 DRA 与 GenBank 上发表的参照序列(A Y19177)的同源性达到了 100%, 而 DRB 基因与国内发表各等位基因(A Y102479, A Y102480, A Y102481, A Y191776, A Y243103 和 A Y243107 等)的同源性也达到了 92.7%~98.0%。

根据 Yang<sup>[8]</sup>等的报道, 通过富含甘氨酸-丝氨酸结构的 Linker(G4S)3 将 DRA 和 DRB 胞外区片段连接, 然后采用 SOE PCR 扩增得到全长, 这样便

于研究 DRA 和 DRB 2 个基因之间的作用。另外, 该 Linker 中, 甘氨酸是最简单的氨基酸, 由于甘氨酸缺少侧链(只有 1 个 H), 因此转角中能很好调整其他残基的空间, 不易产生碰撞, 可用于调节片层的扭曲和曲度, 基本上不影响折叠片的结构; 丝氨酸则常出现在转角或无序结构。二者组成的接头仅有 3.5 nm 的跨度, 不会在折叠过程中形成二级结构, 从而不会影响表达蛋白的正确折叠及蛋白功能的发挥。通过 Linker(G4S)3 将 DRA 和 DRB 胞外区片段连接, 然后采用 SOE PCR 扩增得到全长, 这样通过人工的方法将 DR 基因座的链和链连接成形成一个复合体基因, 中间的 Linker(G4S)3, 便于 DRA 和 DRB 蛋白之间形成正确的折叠, 从而不影响其天然蛋白的结构<sup>[13]</sup>。

本试验采用的原核表达系统 pMAL/p2X, 由于在载体的 C 端含有 *malE*, 编码麦芽糖结合蛋白 MBP, MBP 可促进外源蛋白的可溶性表达<sup>[10]</sup>; 与其他带有 His6 或 GST 标签的表达系相比, pMAL 系统更易于实现外源蛋白的可溶性表达, 而且可溶性表达的外源蛋白易于形成正确的折叠<sup>[14]</sup>。MBP 标签蛋白由于对麦芽糖具有特异性的亲和性, 可以通过 Amylose Affinity Resin Column (NEB Inc.) 将融合蛋白纯化, 操作非常简单可行。在 *malE* 和多克隆位点之间, 有一个被蛋白酶 Factor Xa 特异性识别的蛋白序列, Ile-Glu-Gly-Arg, 可以将标签蛋白 MBP 切除, 得到目的蛋白。本试验表达的融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)3-DRB 以及去除 MBP 后的单体蛋白 DRA-(G4S)3-DRB 通过 SDS-PAGE 证明, 均具有很好的可溶性, 便于进行蛋白结构和功能的研究。

圆二色谱(circular dichroism spectrum)是一种利用不对称性分子在圆偏振光下具有不同的吸收、产生椭圆偏振光的光学效应来分析溶液中蛋白二级结构的技术。通过定量蛋白质中不同二级结构的摩尔椭圆度来计算螺旋、折叠、转角和随机卷曲的含量。本试验通过 CD 测定融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)3-DRB 和切割后的单体蛋白 DRA-(G4S)3-DRB 以及 MBP 的二级结构元件, 比较单体蛋白 DRA-(G4S)3-DRB 的测定值与融合蛋白 MBP-DRA-(G4S)3-DRB 去除 MBP 后的计算值, 螺旋、折叠、转角和随机卷曲的符合率分别达到了 95% (76/80)、96.7% (117/121)、91.1% (92/101) 和 93.0% (80/86), 融合蛋白和目的蛋白的二级结构图均呈现典型的螺旋, 说明 2 个蛋白的构象正确, 用以进一步的多肽结合以及晶体结构分析等研究。

### 参 考 文 献

- [1] Patrick M, Buchbinder R, Jolley D, et al. Incidence of inflammatory myopathies in Victoria, Australia, and evidence of spatial clustering [J]. *J Rheumatol*, 1999, 26(5): 1094-1100
- [2] Srinivasan M, Domanico S Z, Kaumaya P T, et al. Peptides of 23 residues or greater are required to stimulate a high affinity class II-restricted T cell response [J]. *Eur J Immunol*, 1993, 23(5): 1011-1016
- [3] Denkberg G, Cohen C J, Segal D, et al. Recombinant human single-chain MHC-peptide complexes made from *E. coli* By *in vitro* refolding: functional single-chain MHC-peptide complexes and tetramers with tumor associated antigens[J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(12): 3522-3532
- [4] Uger R A, Barber B H. Creating CTL targets with epitope-linked beta 2-microglobulin constructs [J]. *J Immunol*, 1998, 160(4): 1598-1605
- [5] Wang Y, Rubtsov A, Heiser R, et al. Using a baculovirus display library to identify MHC class I mimotopes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(7): 2476-2481
- [6] White J, Crawford F, Fremont D, et al. Soluble class I MHC with beta2-microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T cell hybridoma [J]. *J Immunol*, 1999, 162(5): 2671-2676
- [7] Yan R Q, Li X S, Yang T Y, et al. Characterization of BF2 and beta (2) m in three Chinese chicken lines [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 108(3-4): 417-425
- [8] Yang D F, Zhui H F, Wang Z H, et al. Construction of single chain Fv antibody against transferring receptor and its protein fusion with alkaline phosphatase [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(21): 3300-3303
- [9] Xia C, Wu D, Wu W X, et al. Cloning and expression of interferon-alpha/gamma from a domestic porcine breed and its effect on classical swine fever virus [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 104(1-2): 81-89
- [10] NEB. pMAL Protein Fusion and Purification System Instruction Manual[M]. Version 5.01. New England: Biolabs Inc, 2004:1-33
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [12] Chen Y H, Yang J T, Martinez H M. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion [J]. *Biochemistry*, 1972, 11(22): 4120-4131
- [13] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. (第3版). 北京: 高等教育出版社, 2002, 197-252
- [14] Kapust R B, Waugh D S. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused [J]. *Protein Sci*, 1999, 8(8): 1668-1674